

# Laboratorio Clínico

Jorge Suardíaz • Celso Cruz • Ariel Collina



Editorial Ciencias Médicas



**Laboratorio  
Clínico**



# Laboratorio Clínico

Jorge Suardíaz • Celso Cruz • Ariel Colina



La Habana, 2004

Datos CIP- Editorial Ciencias Médicas

Suardíaz Jorge

Laboratorio Clínico/ Jorge Suardíaz,  
Celso Cruz, Ariel Colina... [y otros].  
La Habana: Editorial Ciencias Médicas;  
2004.

XIV. 662p. Tab. Fig.

Incluye tabla de contenido. Incluye 52 capítulos  
con sus autores. Bibliografía al final de cada ca-  
pítulo

ISBN 959-212-120-6

I. TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS DE LA-  
BORATORIO 2. ESTUDIANTES DE MEDI-  
CINA 3. LIBROS DE TEXTO I. Celso Cruz  
II. Ariel Colina

QY23

Edición: Lic. Marta Elizabet Ferrer Cutié

Redacción: Dra. Nancy Cheping Sánchez

Lic. Marta Liana García Hernández

Lic. María Emilia Remedios Hernández

Diseño interior y composición: D.I. José Manuel Oubiña González

Ilustraciones: D.I. Yasmila Valdés Muratte

D.I. José Manuel Oubiña González

© Jorge Suardíaz Pareras

Celso Cruz Rodríguez

Ariel Colina Rodríguez, 2004

© Sobre la presente edición:

Editorial Ciencias Médicas, 2004

Editorial Ciencias Médicas

Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas

Calle I, No. 202 esquina a Línea,

El Vedado, Ciudad de La Habana,

CP 10400, Cuba.

Teléfono: (537) 832 5338, (537) 55 3375

Correo electrónico: ecimed@infomed.sld.cu

## **Autores Principales**

### **Dr. Jorge H. Suardíaz Pareras**

Doctor en Medicina  
Especialista de II Grado en Laboratorio Clínico  
Profesor Auxiliar del Hospital "Hermanos Ameijeiras"  
Secretario de la Sociedad Cubana de Patología Clínica  
Ciudad de La Habana

### **Dr. Celso L. Cruz Rodríguez**

Doctor en Medicina  
Especialista de II Grado en Laboratorio Clínico  
Auxiliar del Hospital "Hermanos Ameijeiras"  
Jefe del Servicio de Laboratorio Clínico  
Director del Centro Nacional de Referencia y Control de la Calidad  
Ciudad de La Habana

### **Dr. Ariel de J. Colina Rodríguez**

Doctor en Medicina  
Especialista de II Grado en Laboratorio Clínico  
Asistente del Hospital "Hermanos Ameijeiras"  
Director Nacional del Departamento de Especialidades del MINSAP  
Secretario del Grupo Nacional de Laboratorio Clínico  
Ciudad de La Habana

### **Dra. Alina Alerm González**

Doctora en Medicina  
Especialista de II Grado en Inmunología Básica y Clínica  
Profesora Titular del Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas  
Ciudad de La Habana

### **Dra. María Elena Alfonso Valdés**

Doctora en Medicina  
Especialista de II Grado en Inmunología Básica y Clínica  
Investigadora Titular y Profesora Auxiliar del Instituto  
de Hematología e Inmunología  
Vicedirectora Docente del Instituto de Hematología e Inmunología  
Ciudad de La Habana

## **Colectivo de Autores**

### **Lic. Yalile Alfonso Valdés**

Licenciada en Biología  
Máster en Bioquímica  
Investigadora Agregada del Instituto de Hematología e Inmunología  
Ciudad de La Habana

### **Lic. María Eugenia Alonso Biosca**

Licenciada en Ciencias Biológicas  
Doctora en Ciencias Biológicas  
Facultad de Biología  
Universidad de La Habana

### **Lic. Celia Alonso Rodríguez**

Máster en Bioquímica  
Asistente del Hospital "Hermanos Ameijeiras"  
Ciudad de La Habana

**Dr. Rafael Álvarez Echevarría**

Doctor en Medicina  
Doctor en Ciencias  
Especialista de II Grado en Laboratorio Clínico  
Profesor Titular del Hospital "Freyre de Andrade"  
Ciudad de La Habana

**Dra. Rosa Elena Aranda Rivero**

Doctora en Medicina  
Especialista de II Grado en Inmunología Básica y Clínica  
Máster en Inmunología  
Centro Nacional de Biopreparados  
Ciudad de La Habana

**Lic. Antonio Bencomo Hernández**

Licenciado en Ciencias Biológicas  
Investigador Titular e Instructor del Instituto  
de Hematología e Inmunología  
Jefe del Departamento de Inmunohematología  
Ciudad de La Habana

**Dra. Blanca Blanco Mesa**

Doctora en Medicina  
Especialista de I Grado en Laboratorio Clínico  
Profesora Auxiliar del Hospital "10 de Octubre"  
Ciudad de La Habana

**Dra. Tania Carballo Treto**

Doctora en Medicina  
Especialista de I Grado en Hematología  
Instructora del Hospital "Hermanos Ameijeiras"  
Ciudad de La Habana

**Dr. Lázaro Cortina Rosales**

Doctor en Medicina  
Especialista de I Grado en Hematología  
Jefe del Departamento de Hemoterapia del Instituto  
de Hematología e Inmunología  
Ciudad de La Habana

**Dra. Martha Díaz Salazar**

Doctora en Medicina  
Especialista de I Grado en Inmunología Básica y Clínica  
Instituto de Hematología e Inmunología  
Ciudad de La Habana

**Dr. Jesús Gómez Arbesú**

Doctor en Medicina  
Especialista de II Grado en Inmunología Básica y Clínica  
Asistente del Hospital "Hermanos Ameijeiras"  
Ciudad de La Habana

**Dra. María Victoria Guntiñas Zamora**

Doctora en Medicina  
Especialista de I Grado en Inmunología Básica y Clínica  
Instructora del Hospital Pediátrico Docente "William Soler"  
Departamento de Alergia e Inmunología Clínica Pediátrica  
Ciudad de La Habana

**Lic. Patricia Hernández Díaz**

Licenciada en Bioquímica  
Investigadora Auxiliar de Laboratorios BETERA  
Ciudad de La Habana

**Dra. Pilar Hernández García**

Doctora en Medicina  
Especialista de II Grado en Laboratorio Clínico  
Profesora Auxiliar del Hospital Pediátrico Marfán  
Ciudad de La Habana

**Dr. Santiago Hung Llamas †**

Doctor en Medicina  
Doctor en Ciencias  
Especialista de II Grado en Endocrinología  
Profesor Titular del Hospital "Hermanos Ameijeiras"  
Ciudad de La Habana

**Dra. Elena Kokuina**

Doctora en Medicina  
Especialista de II Grado en Inmunología Básica y Clínica  
Asistente del Hospital "Hermanos Ameijeiras"  
Ciudad de La Habana

**Dra. María del Rosario López de Roux**

Doctora en Medicina  
Especialista de I Grado en Inmunología Básica y Clínica  
Instituto de Hematología e Inmunología  
Ciudad de La Habana

**Dra. Consuelo Macías Abraham**

Doctora en Medicina  
Especialista de II Grado en Inmunología Básica y Clínica  
Instructora e Investigadora Titular del Instituto  
de Hematología e Inmunología  
Ciudad de La Habana

**Dra. Vianed Marsán Suárez**

Doctora en Medicina  
Especialista de I Grado en Inmunología  
Instituto de Hematología e Inmunología  
Ciudad de La Habana

**Lic. Isabel Matamoros Díaz**

Licenciada en Ciencias Biológicas  
Especialista Superior en Laboratorio Clínico  
Hospital "Hermanos Ameijeiras"  
Ciudad de La Habana

**Dra. Delfina N. Padrón Brito**

Doctora en Medicina  
Especialista de I Grado en Laboratorio Clínico  
Profesora Auxiliar del Hospital "Hermanos Ameijeiras"  
Ciudad de La Habana

**Dra. Martha L. Paradoa Pérez**

Doctora en Medicina  
Especialista de II Grado en Inmunología  
Hospital Pediátrico Universitario "Juan Manuel Márquez"  
Ciudad de La Habana

**Lic. Francis Ramos Álvarez**

Licenciada en Ciencias Biológicas  
Investigadora Agregada del Laboratorio de Inmunología  
Instituto de Nefrología  
Ciudad de La Habana

**Lic. René Antonio Rivero Jiménez**

Licenciado en Microbiología  
Máster en Inmunología  
Investigador Titular del Instituto de Hematología e Inmunología  
Vicedirector Técnico del Instituto de Hematología e Inmunología  
Ciudad de La Habana

**Dr. José Salabarría González**

Doctor en Medicina  
Especialista de II Grado en Laboratorio Clínico  
Profesor Auxiliar del Hospital Pediátrico "Juan Manuel Márquez"  
Ciudad de La Habana

**Dra. Miriam de la Caridad Sánchez Segura**

Doctora en Medicina  
Especialista de I Grado en Inmunología Básica y Clínica  
Instituto de Hematología e Inmunología  
Ciudad de La Habana

**Dr. Wilfredo Torres Yribar**

Doctor en Medicina  
Doctor en Ciencias  
Especialista de II Grado en Hematología  
Profesor Consultante del Hospital "Hermanos Ameijeiras"  
Jefe del Grupo Nacional de Laboratorio Clínico  
Ciudad de La Habana





## Prefacio

*En la segunda mitad del pasado siglo xx, las ciencias médicas experimentaron avances superiores a todos los que habían tenido lugar en ese campo en los dos milenios anteriores. Y ese desarrollo continúa, de manera cada vez más acelerada: en los comienzos del tercer milenio, se avizoran perspectivas impresionantes para ellas. Se ha dicho que la medicina ha llegado a un punto en que es capaz de cambiar la historia de la humanidad. Por ello, en la medida que se incrementan los conocimientos científicos y aumenta el poderío técnico de que disponemos los profesionales de la salud, nuestras responsabilidades crecen de manera proporcional a este incremento, porque esas grandes posibilidades que se abren ante nosotros tienen también su lado oscuro. Es de primordial importancia, por tanto, que el médico del siglo xxi se forme no solo con un adecuado dominio de la ciencia y la técnica, sino también con una elevada moral profesional y social que le permita identificar sus deberes para con el individuo enfermo y para con la sociedad en su conjunto.*

*El laboratorio clínico, como rama de las ciencias médicas especializada fundamentalmente en el diagnóstico, no es ajeno a estos fenómenos y resume, hoy en día, todo lo asimilado en la evolución del diagnóstico médico. Es fruto de la inteligencia y del esfuerzo del hombre, que se fue adentrando cada vez más en la bioquímica del cuerpo humano, y no se conformó solo con describir lo variado. Los hitos más recientes e importantes a lo largo de ese camino, han sido la introducción de la mecanización, la automatización, la computación y la robótica. Sin embargo (y quizás como consecuencia de ello), el profesional del laboratorio clínico ha mostrado siempre una marcada tendencia a prestar su atención, en especial, a los aspectos técnicos de esta especialidad (cuya importancia es evidente). Pero ha descuidado, en la mayoría de los casos, aspectos de vital importancia como la comunicación y la interacción con los pacientes y con los médicos de asistencia, lo cual ha repercutido siempre, de manera desfavorable, sobre la calidad de las investigaciones. Superar esta situación representa un reto para nuestros especialistas jóvenes, para los médicos recién graduados que se forman como futuros especialistas y para los estudiantes de medicina que comienzan a interesarse por el laboratorio clínico. Enfrentar ese reto les permitirá mejorar la calidad del servicio y elevar el papel del profesional del laboratorio en la docencia médica, en la asistencia y en la investigación, así como colaborar de manera eficaz en la tarea impostergable de transformar los modernos modelos de deshumanizada eficiencia, que culturas ajenas a la nuestra nos ofrecen como paradigma, para que el tratamiento integral y el cuidado eficaz vuelvan a colocar al enfermo en el centro de nuestra mira.*

*Este texto, escrito por un grupo de especialistas cubanos, tiene como objetivo guiar a los alumnos de las facultades de Medicina del Instituto Superior de Ciencias Médicas de La Habana, en sus primeros pasos, en la más importante de las especialidades diagnósticas, y representa un modesto aporte a la formación de los médicos de la primera mitad del siglo XXI. Es nuestro deseo que los alumnos encuentren en estas páginas, las respuestas a sus inquietudes iniciales; que aquellos que en un futuro decidan dedicarse a la práctica del laboratorio clínico, tengan una guía para su preparación; y aquellos que se encaminan hacia otras especialidades médicas, puedan aprender a utilizar de manera racional el arsenal diagnóstico que esta especialidad pone en sus manos. La mejor recomendación que los autores podemos dar a los estudiantes, es que no se limiten solo a asimilar y a aplicar los conocimientos técnicos, sino que lo hagan con el espíritu de trabajar por y para el mejoramiento humano, dejando a un lado el interés personal, y que piensen ante todo en el bien común; que logren el adecuado balance entre el saber científico y el cumplimiento de las responsabilidades con el individuo y con la sociedad; que no sean nunca vendedores de servicios, sino promotores de salud, en especial entre los sectores menos favorecidos de la sociedad y en todo el mundo.*

Dr. Jorge H. Suardíaz Pareras  
Dr. Celso L. Cruz Rodríguez  
Dr. Ariel de J. Colina Rodríguez

## **PARTE I. GENERALIDADES**

**Capítulo 1.** Principios básicos del trabajo del laboratorio clínico/ **3**

**Capítulo 2.** Fase preanalítica/ **11**

**Capítulo 3.** Fase analítica/ **19**

**Capítulo 4.** Fase posanalítica/ **35**

**Capítulo 5.** Análisis instrumental/ **41**

**Capítulo 6.** Automatización del laboratorio clínico/ **53**

**Capítulo 7.** Valores de referencia/ **61**

**Capítulo 8.** Sistema Internacional de Unidades/ **67**

**Capítulo 9.** Bioseguridad en el laboratorio clínico/ **77**

**Capítulo 10.** Inmunoquímica/ **85**

## **PARTE II. QUÍMICA CLÍNICA**

**Capítulo 11.** Exploración del metabolismo de los carbohidratos/ **95**

**Capítulo 12.** Exploración del metabolismo de las proteínas/ **105**

**Capítulo 13.** Exploración del metabolismo de las lipoproteínas/ **115**

**Capítulo 14.** Trastornos del equilibrio hidromineral/ **129**

**Capítulo 15.** Trastornos del equilibrio ácido-básico y de los gases en la sangre/ **137**

**Capítulo 16.** Alteraciones de laboratorio en las enfermedades respiratorias y cardiovasculares/ **145**

**Capítulo 17.** Alteraciones de laboratorio en las enfermedades del aparato digestivo/ **151**

**Capítulo 18.** Alteraciones de laboratorio en las enfermedades del aparato urogenital/ **159**

**Capítulo 19.** Alteraciones de laboratorio en las enfermedades del sistema endocrino/ **165**

**Capítulo 20.** Alteraciones de laboratorio en las enfermedades del sistema osteomioarticular/ **183**

**Capítulo 21.** Marcadores tumorales/ **187**

**Capítulo 22.** Monitoreo de los niveles de medicamentos en la sangre/ **193**

### **PARTE III. HEMATOLOGÍA Y HEMOSTASIA**

- Capítulo 23.** Hematopoyesis/ **201**
- Capítulo 24.** Estudio de las anemias/ **217**
- Capítulo 25.** Estudio de las alteraciones leucocitarias y del síndrome adenosplénico/ **265**
- Capítulo 26.** Enfermedades neoplásicas de los tejidos hematopoyéticos/ **281**
- Capítulo 27.** Hemostasia normal/ **309**
- Capítulo 28.** Laboratorio clínico en los trastornos de la hemostasia/ **323**
- Capítulo 29.** Enfermedades hemorrágicas/ **335**
- Capítulo 30.** Trombofilias/ **349**
- Anexo/ 362**

### **PARTE IV. EXAMEN DE LA ORINA, DEL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO Y DE OTROS LÍQUIDOS ORGÁNICOS**

- Capítulo 31.** Examen de la orina/ **377**
- Capítulo 32.** Examen del líquido cefalorraquídeo y de otros líquidos orgánicos . Exudados y trasudados/ **387**

### **PARTE V. INMUNOLOGÍA**

- Capítulo 33.** Inmunidad. Respuesta inmune/ **395**
- Capítulo 34.** Autoanticuerpos e inmunoglobulinas/ **403**
- Capítulo 35.** Procesamiento y presentación del antígeno. Moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad/ **415**
- Capítulo 36.** Reconocimiento antigénico de linfocitos. Células asesinas naturales/ **425**
- Capítulo 37.** Complemento y cininas/ **433**
- Capítulo 38.** Inflamación/ **443**
- Capítulo 39.** Respuesta alérgica/ **459**
- Capítulo 40.** Autoinmunidad y enfermedades autoinmunes/ **467**
- Capítulo 41.** Inmunodeficiencias congénitas y adquiridas/ **485**
- Capítulo 42.** Trasplante clínico/ **497**

**Capítulo 43.** Moléculas de adhesión/ **507**

**Capítulo 44.** Métodos de laboratorio para el estudio de la respuesta inmune celular/ **519**

**Capítulo 45.** Métodos de laboratorio para el estudio de la función fagocítica/ **531**

**Capítulo 46.** Pruebas de laboratorio para el diagnóstico de la alergia/ **539**

**Capítulo 47.** Técnicas de histocompatibilidad para el trasplante de órganos y tejidos/ **545**

## **PARTE VI. INMUNOHEMATOLOGÍA Y MEDICINA TRANSFUSIONAL**

**Capítulo 48.** Grupos sanguíneos eritrocitarios/ **553**

**Capítulo 49.** Procedimientos para la determinación e identificación de anticuerpos eritrocitarios. Pruebas de compatibilidad pretransfusional/ **575**

**Capítulo 50.** Inmunología de las plaquetas y los leucocitos/ **593**

**Capítulo 51.** Medicina transfusional/ **611**

**Capítulo 52.** Reacción transfusional/ **647**

## **CONTENIDO**

---

**Objetivos y funciones del laboratorio clínico/ 3**

**Exámenes que se realizan en el laboratorio clínico/ 4**

**Personal del laboratorio clínico/ 5**

**Instalaciones del laboratorio clínico/ 6**

**Cristalería, reactivos y equipos/ 7**

Cristalería/ 7

Reactivos/ 7

Equipos/ 8

**Aplicaciones de la computación en el laboratorio clínico/ 9**

**Bibliografía recomendada/ 9**

# PARTE I. GENERALIDADES

## Capítulo

## 1



## PRINCIPIOS BÁSICOS DEL TRABAJO EN EL LABORATORIO CLÍNICO

*Dr. Jorge H. Suardíaz Pareras*

### RESUMEN

Laboratorio Clínico es una especialidad que resulta indispensable en la medicina actual. En este capítulo se definen sus objetivos y funciones, en lo que se refiere a la asistencia médica; se señala la compleja situación a que se enfrenta en la actualidad, motivada entre otros factores por la creciente introducción de nueva tecnología y el aumento de la demanda, y se ofrecen algunas propuestas para el uso racional de este recurso. Asimismo, se presenta la variedad de exámenes que se realizan en el laboratorio clínico, el personal que trabaja en él y las instalaciones de que consta. También se dedica un espacio a los materiales y reactivos, así como a las perspectivas que abrió al trabajo de los laboratorios médicos la introducción de la computación.

### OBJETIVOS Y FUNCIONES DEL LABORATORIO CLÍNICO

Laboratorio Clínico es una especialidad médica básica, perteneciente al grupo de las que se denominan comúnmente medios de diagnóstico y, como todas ellas, resulta indispensable en la actualidad. En cuanto a la asistencia médica, los exámenes de laboratorio tienen como objetivos:

1. Ayudar a confirmar o descartar un diagnóstico.
2. Establecer un pronóstico.
3. Controlar la evolución de la enfermedad y los resultados del tratamiento.
4. Detectar complicaciones.
5. Colaborar con estudios epidemiológicos y de grupos de riesgo.
6. Constituir una parte esencial de los protocolos de investigación científica y de los ensayos clínicos para la introducción de nuevos medicamentos.

El valor diagnóstico de la mayoría de las investigaciones de laboratorio está limitado porque, aunque refleja cambios en la función de los órganos y de los sistemas, la mayoría de estos cambios son inespecíficos. Por lo tanto, si bien estas investigaciones

detectan la presencia de una alteración patológica, a menudo no identifican la enfermedad concreta. Es decir, dirigen la atención del médico hacia un diagnóstico particular (incluso en el caso de que los resultados sean considerados normales), o permiten excluirlo con una razonable confiabilidad; pero no pueden emplearse como sustitutos del interrogatorio ni del examen físico, sino como complemento de estos. La interpretación de los resultados de los análisis de laboratorio depende sobre todo de su sensibilidad, su especificidad nosográfica y su valor predictivo (estos conceptos serán expuestos con mayor profundidad en otra sección de este libro).

El perfil de trabajo del laboratorio clínico se fue conformando desde finales del siglo XIX y no permaneció ajeno al impetuoso desarrollo que experimentaron las ciencias médicas en la segunda mitad del siglo XX. Durante ese tiempo se ha acumulado un vasto caudal de experiencia en el estudio de las alteraciones humorales, que tienen lugar durante la evolución de una enfermedad o como consecuencia de un tratamiento. Esto conllevó a una demanda creciente de pruebas para el diagnóstico, que tuvo que ser enfrentada por los profesionales del laboratorio, quienes respondieron, a su vez, con una oferta que superó la demanda y, al mismo



tiempo, la hizo aumentar, lo que originó una espiral viciosa con la cual se creó una situación muy compleja, que puede resumirse de la manera siguiente:

1. Incremento considerable en la variedad de análisis que se realiza en los laboratorios, algunos de los cuales duplican la información brindada por otros, sin aportar nuevos datos.
2. Incremento progresivo de la cantidad de investigaciones que se indica, motivada por la masificación de los servicios de salud, el mercantilismo de la medicina, los estudios de poblaciones (*screening*) y las exigencias de los sistemas de seguros médicos en muchos países, entre otras causas. En varios países de nuestro continente, este aumento es del orden de aproximadamente el 15 % en el último quinquenio del siglo xx.
3. El propio progreso científico-técnico (el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico rápido y la difusión y perfeccionamiento de los equipos automatizados, por ejemplo) ha estimulado el desarrollo de una mentalidad que lleva a los profesionales de la medicina a realizar determinadas investigaciones y procedimientos, no porque sean necesarias, sino porque son posibles.
4. El trabajo del laboratorio se ha hecho en pocos años tan complejo y la cantidad de información que brinda es tan considerable, que muchos profesionales no han tenido tiempo de adaptarse a esos cambios y de asimilar esa información.
5. Ha tenido lugar una transformación epistemológica en la enseñanza de la medicina en las últimas décadas: por una parte, los programas no enfatizan el uso correcto de los medios de diagnóstico ni estimulan, en los futuros médicos, el desarrollo de una mentalidad que permita obtener los máximos beneficios para los enfermos con el menor costo posible para la sociedad; por otra parte, el propio personal de los laboratorios suele estar poco preparado en cuanto a la gestión de calidad que le permita lograr resultados de excelencia. Además, a menudo este personal carece de una formación que le permita entablar un diálogo efectivo con los médicos de asistencia.
6. Existe un reclamo creciente de que los laboratorios clínicos utilicen sus recursos de manera efectiva y se desempeñen con calidad ejemplar, al tiempo que se hace evidente la necesidad de un uso racional de este importante recurso.

Es decir, al alborear el siglo xxi nos encontramos ante varias antinomias y una situación muy compleja, que es importante resolver de manera interdisciplinaria, para promover el uso racional del laboratorio clínico. A

continuación se ofrecen algunas sugerencias para el logro de este objetivo:

1. Precisar, de manera adecuada, las limitaciones y la utilidad clínica de las investigaciones que se realizan en el laboratorio.
2. Promover la eliminación de las pruebas que duplican información.
3. Fijar plazos lógicos de realización de exámenes evolutivos.
4. Elaborar protocolos apropiados, de conjunto con los médicos de asistencia, tanto para la práctica diaria como para la investigación y definir las circunstancias en que serán empleados.
5. Hacer énfasis en los estudios de costo-beneficio y costo-efectividad y trazar una adecuada política orientada a la disminución de los costos sin perjudicar por ello la atención al paciente.
6. Reducir la solicitud de urgencias al mínimo indispensable.
7. Prestar especial atención a las etapas preanalítica y posanalítica.
8. Identificar los problemas que entorpecen el flujo de trabajo del laboratorio y establecer medidas para su solución.
9. Evaluar de forma crítica las necesidades actuales y las perspectivas de desarrollo del laboratorio, antes de introducir nuevos exámenes y nuevas tecnologías.
10. Educar al personal para los cambios que deben introducirse.
11. Los profesionales del laboratorio deben fomentar un sistema de manejo de la calidad total, acorde con las crecientes expectativas, tanto explícitas como implícitas, actuales y futuras.

## EXÁMENES QUE SE REALIZAN EN EL LABORATORIO CLÍNICO

En la actualidad, la variedad de los exámenes que realiza el laboratorio clínico es considerable; sin embargo, no todos los laboratorios pueden realizar esta amplia gama de investigaciones, como tampoco todas las instituciones médicas de un país, incluidas las más especializadas, ofrecen todos los servicios. Cada país establece, de acuerdo con su propia política de salud, las investigaciones que se realizan en los laboratorios de la red de salud pública, en los distintos niveles de asistencia (primario, secundario y terciario). En cuanto al sector privado, en los países en que existe, este aspecto por lo general es controlado mediante la acreditación de los laboratorios de este sector, por las

asociaciones médicas nacionales, en coordinación con los organismos gubernamentales que regulan la actividad sanitaria.

En principio, antes de incorporar la determinación de algún analito a las investigaciones que se realizan en un laboratorio, es importante adquirir toda la información básica disponible acerca de su fisiología, su fisiopatología y su importancia clínica. Ello incluye aspectos tales como su estructura, origen, causas fisiológicas y patológicas de su aumento o disminución; sensibilidad y especificidad nosográficas; intervalos de referencia, nivel de cambio significativo desde el punto de vista clínico y su valor diagnóstico o pronóstico. Además, es preciso conocer las características de los métodos de análisis, las limitaciones de estos, las posibles interferencias, la preparación del paciente y, por último, realizar los cálculos de costo-beneficio de su introducción.

De manera general, los exámenes de laboratorio se pueden agrupar en:

1. Química sanguínea: incluye pruebas para el estudio del metabolismo de los carbohidratos, las proteínas, los lípidos, el agua y los electrolitos y el equilibrio ácido-básico; enzimas séricas, productos intermedios o finales del metabolismo, oligoelementos, hormonas y niveles de medicamentos en sangre, entre otros.
2. Hematología: incluye un grupo de exámenes denominados *básicos* o *habituales* (hemoglobina, hematócrito, recuentos de células de la sangre, examen de la extensión coloreada de sangre periférica, cálculo de las constantes corpusculares, velocidad de sedimentación globular) y pruebas más especializadas, como los estudios de anemias hemolíticas y nutricionales, el examen de las extensiones coloreadas de médula ósea (medulograma), las coloraciones citoquímicas y algunos estudios realizados con el empleo de radionúclidos, sondas moleculares o microscopia electrónica.
3. Estudios de la hemostasia: agrupan a todas las pruebas que permiten explorar los mecanismos de la coagulación sanguínea, la fibrinólisis y la actividad de los trombocitos.
4. Inmunología: incluye una amplia gama de pruebas para el estudio de la autoinmunidad, las inmunodeficiencias, el tipaje para trasplantes y otras.
5. Examen químico y citológico de la orina, del líquido cefalorraquídeo, del líquido amniótico o sinovial, del seminal, de la saliva, y de exudados y trasudados.
6. Biología molecular: de introducción reciente en el laboratorio clínico, se emplean las sondas de ADN

para el estudio de enfermedades infecciosas, neoplásicas y de origen genético, así como para sustituir cada vez más los métodos clásicos de estudio del sistema inmunológico. El ADN disponible para una reacción, es ampliado por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que redundo en diagnósticos más rápidos y específicos y abre posibilidades insospechadas unos pocos años atrás.

7. En Cuba, los laboratorios del nivel primario de atención médica realizan examen parasitológico de heces fecales, así como examen directo de esputo, para la búsqueda de bacilos ácido-alcohol resistentes (como parte del Programa Nacional de Control de Tuberculosis). En los demás niveles, estas investigaciones, así como todos los demás exámenes parasitológicos, microbiológicos y serológicos, son realizados por los laboratorios de microbiología, que constituyen una especialidad diferente. En la mayoría de los países del continente americano, todas estas investigaciones forman parte del contenido de trabajo de los laboratorios clínicos, al igual que los exámenes citológicos.

## PERSONAL DEL LABORATORIO CLÍNICO

El recurso más importante de cualquier actividad humana, es el propio hombre; en el laboratorio clínico no constituye una excepción. La composición, el grado de instrucción y las responsabilidades del personal de los laboratorios, varían de un país a otro e, incluso, dentro de un mismo país. Hace algunos años, la Organización Mundial de la Salud (OMS) intentó introducir un orden en la denominación que reciben los miembros del equipo de un laboratorio, de acuerdo con su categoría y atribuciones. Aunque este orden no ha sido aceptado en todos los países, es una guía útil para clasificar el personal:

1. Médicos especialistas en Laboratorio Clínico: al finalizar la carrera de medicina, realizan estudios de posgrado con una duración variable, de acuerdo con el país (siempre tres años o más). En algunos países, como Cuba, esta etapa de formación recibe el nombre de Residencia. Al finalizarla, los médicos poseen un perfil muy amplio, que les permite dominar casi cualquier aspecto de la actividad del laboratorio. En algunos países, este especialista es llamado patólogo clínico.
2. Licenciado en Bioquímica: esta carrera capacita a sus egresados para realizar funciones asistenciales, docentes, administrativas y científicas que incluyen distintas áreas de actividad dentro del laboratorio, en lo fundamental, la de química clínica y todo lo relacionado con el manejo de la calidad. Algunas de

estas actividades pueden requerir estudios de posgrado. En varios países también se incluyen en este grupo: los licenciados en Biología, en Química y en Farmacia. En México, por ejemplo, existe el perfil llamado químico-farmacéutico-biólogo (QFB) y en España el de farmacéutico analista.

3. Especialistas en Tecnología de la Salud: poseen una formación universitaria, al igual que los anteriores, que les capacita para realizar casi todas las actividades del laboratorio, excepto las de índole médica. En algunos países se les denomina tecnólogos médicos o tecnólogos de laboratorio.
4. Técnicos de laboratorio clínico: poseen nivel de escolaridad medio superior (bachiller) y se forman en un instituto de enseñanza técnica (a veces dependiente de una Universidad). Este personal realiza la mayor parte del trabajo de los laboratorios clínicos.
5. Auxiliares técnicos: poseen un nivel escolar de secundaria básica y reciben un adiestramiento en servicios de no menos de un año. Pueden realizar tareas menos complejas en el laboratorio, bajo la supervisión del tecnólogo. En algunos países, se incluyen en este grupo los llamados *flebotomistas*, cuya principal función es la obtención de las muestras de sangre.
6. Auxiliares de laboratorio: con un nivel de enseñanza primaria y un adiestramiento breve, pueden realizar funciones sencillas de apoyo (preparación de muestras, limpieza y preparación del material, entre otros).

## INSTALACIONES DEL LABORATORIO CLÍNICO

El local en el que se realizan las investigaciones de laboratorio debe reunir determinadas condiciones físicas que respondan a las necesidades de trabajo actuales del departamento y permitan determinada flexibilidad para adaptarse a los cambios tecnológicos en un futuro previsible. Para ello se deben tener en cuenta las necesidades y las perspectivas de la institución (o instituciones) de salud a la(s) que brinda sus servicios el laboratorio; en otras palabras, resulta conveniente considerarlo como un ambiente dinámico.

Para el diseño de un laboratorio clínico se deben valorar los factores siguientes:

1. Necesidades que dependen del flujo de trabajo (cantidad y variedad de análisis electivos o de urgencia, cantidad de personal, flujo de muestras, entre otras).
  2. Necesidades que dependen del tipo y cantidad de equipos, automatización, informatización, estaciones de trabajo (*work-stations*).
  3. Necesidades de locales auxiliares, de tipo administrativo (oficinas), docente (aulas), para la limpieza y esterilización de materiales, para el almacenamiento (que incluya refrigeración), sala de espera, para la toma de muestras y otras facilidades para el personal (servicios sanitarios, taquillas, duchas, cuarto de descanso para el personal de guardia, etc.).
  4. Necesidad de áreas con características especiales (área estéril, área para trabajo con isótopos radiactivos).
- Esto indica que no existe un proyecto único de diseño de un laboratorio clínico, que pueda ser aplicado de manera universal. En todos los casos, el diseño debe ser realizado por el arquitecto responsable, con la asesoría del especialista en laboratorio clínico, que presentará su propuesta al inversionista principal. El proyecto debe incluir:
1. Planificación del área total, con espacio suficiente (incluida la perspectiva de crecimiento futuro).
  2. Secciones de trabajo: en la actualidad predomina el concepto de módulos móviles, que permiten flexibilidad para adaptarse a los cambios tecnológicos y al flujo de trabajo.
  3. Paredes, pisos y techos: de color claro y sin brillo, cubiertos de un material que permita una fácil limpieza (en el caso de los pisos, el linóleo es una buena opción). En muchas ocasiones es importante la climatización del local, así como el aislamiento acústico. La iluminación juega un papel primordial.
  4. Instalaciones auxiliares y áreas especiales (mencionadas antes). Debe procurarse que estas últimas se ubiquen al final del laboratorio, para evitar el tránsito de personal ajeno a las funciones que se realizan en ellas.
  5. Las necesidades de electricidad, agua, gases o vacío, así como de servicios telefónicos y terminales de computadoras, deben ser previstas también.
  6. Campanas de extracción, para el manejo de sustancias que liberan gases tóxicos.
  7. La disposición de desechos debe estar prevista dentro de las características constructivas (sobre estos dos últimos temas, se trata en el capítulo acerca de la Bioseguridad en el laboratorio clínico).

## CRISTALERÍA, REACTIVOS Y EQUIPOS

### CRISTALERÍA

Durante décadas, la totalidad de los tubos de ensayo o de cultivo, las pipetas, los embudos y los frascos para medir o para contener (figura 1.1), se fabricaron de vidrio, lo que hizo que se les diera el nombre genérico de cristalería. No siempre el vidrio con el que estaban elaborados era inerte, lo cual provocaba frecuentes interacciones con su contenido; pero su inconveniente fundamental era su fragilidad al chocar y el coeficiente de expansión al ser sometido a la acción de las altas temperaturas, lo cual también provocaba su rotura. Esta última condición se resolvió con el cristal de boro-silicato, de alta resistencia térmica.

En la actualidad, los utensilios de vidrio han sido sustituidos casi todos por similares de plástico (sobre todo polietileno y polipropileno), con alto grado de resistencia a la acción de los ácidos y álcalis. Sin embargo, su resistencia térmica es menor que la del cristal de boro-silicato y oscila entre 80 °C como límite, para el polietileno de baja densidad y 120 °C para el de alta densidad, algo superior para el polipropileno. El policarbonato posee una resistencia superior a las temperaturas elevadas (hasta 160 °C), pero es más vulnerable a la acción de los álcalis y de los ácidos fuertes. Por su parte, el teflón tiene propiedades de resistencia a la corrosión que le hacen



**Figura 1.1** Algunos utensilios de vidrio y plástico empleados en el laboratorio médico (cristalería).

superior al polietileno y al polipropileno y resiste temperaturas superiores a 200 °C. Además, es casi inerte y su superficie es impermeable. Estas características hacen que se le emplee con frecuencia para los sistemas de tuberías de los equipos automatizados.

Muchos de estos utensilios plásticos son desechables (los tubos para colectar las muestras de sangre, las puntas de las pipetas de pistón y otros). Los que son reutilizables requieren un tratamiento cuidadoso que garantice que han quedado libres de cualquier sustancia contaminante. El tubo, pipeta o recipiente plástico que se va a reutilizar, no solo debe parecer limpio, sino que tiene que estar muy limpio. En caso de dudas, es preferible desecharlo.

La limpieza de los recipientes y de otros artículos de vidrio, casi siempre se realiza con algún detergente industrial (previo enjuague con abundante agua corriente, para eliminar su contenido). Después del tratamiento con detergente, se dan varios pases por agua desmineralizada y, en caso de necesidad, se tratan con ácido (nítrico o clorhídrico) o con solución de bicromato de potasio y ácido sulfúrico. El secado se efectúa en una estufa, a 90 °C, durante una hora. Para el material plástico, se recomienda usar detergentes ligeramente alcalinos o neutros, no-iónicos y realizar un cuidadoso enjuague con agua desmineralizada. Pueden secarse bajo una corriente de aire. En ambos casos se han empleado con éxito máquinas para el lavado y secado automáticos y, en el caso de utensilios plásticos, baños ultrasónicos.

Existen muchos catálogos de fabricantes, que deben ser consultados cuando se va a escoger el material que se va a emplear en el laboratorio clínico.

### REACTIVOS

Los reactivos son soluciones de sustancias químicas puras, o compuestos biológicos específicos (enzimas, antígenos, anticuerpos), o una mezcla de ambos, que se añaden a la muestra para producir una reacción capaz de determinar en ella una modificación tal que genere una señal medible. Muchas de estas soluciones pueden prepararse en el laboratorio, pero la mayor parte de las que se usan en la actualidad son producidas de forma industrial por casas fabricantes especializadas, que las comercializan en forma de juegos de reactivos, presentados en estuches, por lo general con un nivel de calidad muy confiable.

A menudo, los fabricantes no comunican ciertos detalles acerca de la composición de los reactivos contenidos en el estuche; pero existe un mínimo de información

que debe estar incluido en este estuche y que comprende la descripción tanto de solventes como de solutos (incluso la fórmula molecular), la concentración de los solutos, las interferencias que pueden afectar su capacidad de reacción, las características de conservación, el número de lote y la fecha de vencimiento, así como los símbolos de riesgo (véase la sección de bioseguridad en el laboratorio clínico). La información se completa con la descripción de la técnica.

El almacenamiento de los reactivos debe hacerse siguiendo las instrucciones del fabricante. De modo muy general, los que se conservan a temperatura ambiente (de 20 a 25 °C) requieren un lugar fresco, seco, ventilado y no expuesto a la luz. En nuestro país, donde la temperatura ambiente suele exceder los 30 °C en locales no climatizados, la conservación de algunos reactivos puede crear un conflicto. En este sentido, la situación de los que se conservan en refrigeración (es decir, de 0 a 4 °C) plantea menos dificultades. Recuerde siempre que la mesa de trabajo y la campana de extracción, no son lugares adecuados para almacenar reactivos.

A menudo, un reactivo liofilizado se conserva a temperatura ambiente hasta que se reconstituye y después se debe refrigerar o congelar. En este caso particular, es preciso tener en cuenta el plazo de vencimiento, que cambia después de la reconstitución. Es muy importante estar atentos a los cambios en el aspecto físico (cambio de coloración, aparición de turbidez, formación de un precipitado), que suelen ser signos de deterioro: un programa del manejo total de la calidad, debe incluir el control de la calidad de los reactivos empleados.

La programación del suministro de reactivos es todo un arte que se domina con experiencia y sentido común. Aunque el jefe del departamento delegue en otro profesional (por lo general, un bioquímico o tecnólogo), ello no lo exime de mantener una supervisión constante de esta actividad. La cantidad de un reactivo en existencia en el almacén, debe oscilar entre un mínimo que no permita que se agote antes de la llegada de la siguiente remesa y un máximo por encima del cual no se debe pasar para evitar su posible vencimiento, con el consiguiente perjuicio económico.

## EQUIPOS

Los equipos que se emplean en los laboratorios clínicos, muestran un grado cada vez mayor de complejidad y sofisticación en su diseño, pero su manejo es sencillo para un operador calificado. Existen instrumentos para cubrir todas las necesidades de los laboratorios, a todos los niveles de la red sanitaria; corresponde al profesional responsable evaluar sus necesidades específicas (actuales y perspectivas),

mediante un estudio serio y detallado, antes de proceder a solicitar la compra de un determinado equipo.

Cada laboratorio tiene necesidades específicas, de acuerdo con la variedad y la cantidad de análisis que realiza; por ello, los criterios de selección de un determinado equipo, varían de manera considerable. Sin embargo, existen lineamientos generales que pueden aplicarse a todos los laboratorios y que deben tenerse en cuenta a la hora de tomar decisiones en este sentido.

Para realizar la valoración inicial, es necesario informarse bien sobre las características técnicas y de seguridad de los distintos equipos disponibles en el mercado, así como de su costo inicial y de mantenimiento, el consumo de reactivos y de material gastable. También debe tenerse en consideración el apoyo técnico ofrecido por el fabricante para la instalación del equipo, mantenimiento preventivo y su reparación, entrenamiento del operador y garantía de suministros. Una vez que se disponga de toda la información requerida, debe realizarse la selección de acuerdo con los criterios siguientes:

1. Costo-efectividad: la inversión debe estar justificada por la utilidad que reporta la adquisición del equipo y debe ser compatible con el presupuesto del que se dispone.
2. Seguridad: el equipo debe cumplir los requisitos de seguridad establecidos y, en caso de que produzca desechos peligrosos, debe estar prevista la forma de eliminarlos.
3. Ajuste a las necesidades: la capacidad de trabajo del equipo debe corresponderse con la carga de trabajo del laboratorio y con los requerimientos específicos de este (flexibilidad del *software*, interfase con otras computadoras, variedad de pruebas, capacidad de introducir urgencias, método de identificación de la muestra y volumen de esta, precisión, procedimientos en secuencia o en paralelo).
4. Grado de entrenamiento del personal operador y consumo del tiempo de trabajo por parte de este personal.
5. Requerimientos de espacio, temperatura, humedad, luz, suministro de agua, electricidad, vacío y gases.
6. Consumo de reactivos, calibradores, soluciones de limpieza, electrodos y material desechable.
7. Respuesta de servicio del fabricante: tiempo para acudir a llamadas y disponibilidad de suministros en plaza.

Antes de tomar la decisión definitiva, es conveniente estudiar la posibilidad de que el equipo pueda estar sometido a un período de prueba en el laboratorio para evaluar su función antes de adquirirlo. Este proceso incluye la verificación de las especificaciones del fabricante, la facilidad de operación y de mantenimiento

preventivo, la compatibilidad con el ambiente, las características de sus funciones y los controles de calidad. En el caso de los grandes analizadores automáticos, el costo de esta fase de prueba puede ser muy elevado, tanto para el fabricante como para el cliente, por lo que puede ser preciso analizar distintas variantes.

Los aspectos técnicos de los equipos de laboratorio (principios de construcción y de funcionamiento) se estudian en otros capítulos de este libro.

## APLICACIONES DE LA COMPUTACIÓN EN EL LABORATORIO CLÍNICO

En el laboratorio clínico moderno resulta imprescindible la introducción de la computación como parte esencial del proceso de automatización del trabajo (sistema de informatización del laboratorio). Las funciones que permite realizar dentro de este sistema de trabajo, se pueden resumir como sigue:

1. Entrada de solicitudes de análisis, a través de terminales en la recepción del laboratorio, o en las salas de hospitalización.
2. Confección de listas de trabajo por secciones o por puestos de trabajo.
3. Registro de los resultados.
4. Envío directo de resultados al archivo central o a las salas de hospitalización, según sea el caso.
5. Cálculos del control interno de la calidad y registro de los resultados de este.
6. Inventarios e informes estadísticos y administrativos.
7. Interconexión de equipos automatizados (los equipos entre sí).
8. Conexión a distancia con los laboratorios satélites.
9. Interpretación de los resultados (sistema experto).

Todas estas funciones pueden ser realizadas por sistema *off-line* o mejor aún, de tipo *on-line*. En el primer caso, los datos se introducen de forma manual entre una y otra fase del proceso y, por lo tanto, la rapidez del sistema es mucho menor y las posibilidades de introducir errores son mucho mayores que en el segundo caso. En el de tipo *on-line* existe interconexión interna entre todos los elementos del sistema, por lo que la intervención humana en el proceso es mínima.

Una cuestión importante por aclarar es si resulta más conveniente la compra de un sistema de dirección computarizada para la automatización del trabajo del laboratorio o si es elaborado por los miembros del equipo que posean una calificación adecuada para ello. Para esta segunda opción se requiere capacitar y especializar

en operaciones complejas a ese personal, se corre el riesgo de fallas y los costos no son predecibles con facilidad. Además, la necesidad de actualizar, de manera periódica, el programa para adecuarlo a la situación cambiante del laboratorio, obliga a mantener un personal que puede resultar excesivo y que, en una parte apreciable del tiempo, carece de un contenido de trabajo que justifique su presencia. Otro argumento adverso a este personal es su posible traslado hacia otra institución, lo cual crea un conflicto que puede ser insalvable. Por todo lo antes expuesto, a largo plazo resulta más barato y eficiente encargar la confección del sistema a una casa comercial especializada en este tipo de actividades, y contratar, a su vez, el entrenamiento de los operadores, así como el mantenimiento y la actualización periódica del sistema.

En cuanto a la secuencia de introducción, algunos especialistas recomiendan que se realice por etapas, mientras que otros son partidarios de la introducción "en bloque". En realidad, la decisión en cada caso debe tomarse de acuerdo con las características específicas del laboratorio, sus perspectivas de desarrollo a mediano plazo y sus posibilidades económicas.

Junto con la introducción de la computación en el laboratorio, ha tenido lugar la automatización cada vez mayor de los procesos que se llevan a cabo, lo cual ha traído aparejado un incremento apreciable de la eficiencia y una mejoría en la calidad de los resultados (en otra sección de este libro se aborda este tema en detalles). En los últimos años del siglo xx, comenzó la introducción de la robótica, con la finalidad de cumplir tareas repetitivas y consumidoras de tiempo, como la preparación de muestras. Muchos equipos automatizados tienen incorporados robots de tipo cartesiano o cilíndrico, para dispensar los reactivos y las muestras (los cartesianos, son brazos que realizan movimientos en los tres planos del espacio; los cilíndricos, además de realizar estos movimientos, giran sobre un eje). En la actualidad se diseñan sistemas robotizados de transporte y distribución de muestras, lo cual acelera los procesos del laboratorio y disminuye los riesgos de contaminación para el personal.

## BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- Mayne PD. Clinical Chemistry in Diagnosis and Treatment. 6<sup>th</sup> ed. Little, Boston: Brown & Co, 1995.
- Mc Clatchey KD. Clinical Laboratory Medicine. Baltimore: Williams and Wilkins, Baltimore, MD, 1994.
- Noe DA, Rock RC. Laboratory Medicine: Selection and Interpretation of Clinical Laboratory Studies. Baltimore: Williams and Wilkins, 1994.
- Sacher R, Mc Pherson RA. Widmann's Clinical Interpretation of Laboratory Tests. 10<sup>th</sup> ed. Philadelphia: FA. Davis Co., 1991.

## **CONTENIDO**

---

### **Introducción/ 11**

### **Factores que dependen del paciente/ 12**

Factores no susceptibles de modificación/ 12

Factores susceptibles de modificación/ 12

### **Factores que dependen del personal de salud/ 13**

### **Obtención de muestras de sangre/ 13**

Momento para tomar la muestra de sangre/ 13

Obtención de sangre venosa. Causas de error/ 13

Obtención de sangre capilar. Causas de error/ 14

Obtención de sangre arterial. Causas de error/ 14

### **Conservación de muestras de sangre. Empleo de anticoagulantes/ 15**

### **Muestras de orina y de otros líquidos biológicos/ 15**

### **Solicitud de los análisis/ 16**

### **Bibliografía recomendada/ 17**

# PARTE I. GENERALIDADES

## Capítulo 2



### FASE PREANALÍTICA

Dr. Jorge H. Suardíaz Pareras

#### RESUMEN

Se denomina fase preanalítica a la etapa previa a la realización de un análisis de laboratorio. Esta etapa incluye la preparación del paciente, la confección de la solicitud de análisis y los cuidados para la obtención de las muestras. La atención que el médico de asistencia y el personal del laboratorio concedan a esta fase determinará, en gran medida, la calidad de los resultados que se van a obtener. En este capítulo se estudian los factores que inciden durante esta fase, la influencia que estos pueden tener en la calidad de los resultados y las prácticas clínicas y de laboratorio para optimizarla. Se hace especial énfasis en las interferencias producidas por factores que dependen del paciente, del personal de salud o de ambos.

#### INTRODUCCIÓN

Como se expresa en el capítulo anterior, el objetivo de cualquier procedimiento para el diagnóstico médico es ofrecer resultados con un nivel de seguridad y confiabilidad tal, que le permitan al médico de asistencia establecer conclusiones acertadas y tomar las decisiones más apropiadas. La calidad de los métodos analíticos empleados juega un papel decisivo, pero no puede olvidarse que de la preparación del paciente, la confección de la solicitud de análisis y los cuidados para la obtención de las muestras, depende también la calidad de los resultados. Estos factores componen lo que se llama *fase preanalítica*. La atención que el médico de asistencia y el personal del laboratorio concedan a esta fase, determinará en gran medida, la calidad de los resultados que se van a obtener, porque *ningún resultado puede ser mejor que la muestra de la cual se obtuvo*.

Ante todo, el médico que indica una determinación debe conocer el valor real y las limitaciones de esta, para el establecimiento de un diagnóstico o de un pronóstico. Asimismo, también deben tenerse en cuenta los resultados de las pruebas efectuadas con anterioridad, ya que el estudio comparativo puede ser de gran utilidad. Debe evitarse la indicación de investigaciones innecesarias, que ocasionan gastos inútiles y molestias,

y pueden constituir un factor de confusión en el momento de evaluar los resultados. Es frecuente, por desgracia, la solicitud de verdaderas listas de 12 o 15 investigaciones para el estudio, por ejemplo, de un paciente con síntomas y signos de hepatitis viral, para cuyo diagnóstico sería suficiente con la determinación de niveles sanguíneos de alanino-aminotransferasa, marcadores de los virus A, B y C y, a lo sumo, bilirrubinemia (si presenta íctero) y fosfatasa alcalina en suero. Nunca se insistirá lo suficiente en que no se puede indicar un examen, solo porque sea posible realizarlo, sino porque es necesario para el paciente: esto debe constituir una norma de conducta. Por último, no debe subestimarse la importancia de la correcta confección de la solicitud de análisis, que debe contener la información necesaria para el laboratorio, además de los datos de identificación del paciente, escritos con letra legible, para evitar confusiones. No representa un gasto considerable de tiempo reseñar en la solicitud, al menos, el diagnóstico presuntivo o algún dato de interés, formulado de forma breve (por ejemplo: “síndrome febril de 20 días de evolución, sin signos de localización”).

Por otra parte, la calidad en la recolección de la muestra y en su conservación, las condiciones de transporte y tratamiento, el tiempo transcurrido entre el momento de la recolección y la realización del análisis, son factores



que dependen a menudo (¡pero no siempre!) del propio personal del laboratorio. En cambio, el factor de la fase preanalítica que con mayor frecuencia afecta la exactitud de los resultados y, por ende, su utilidad clínica, es la presencia de interferencias en la muestra, debidas a factores que dependen del paciente, susceptibles o no de ser controladas por el facultativo que lo atiende, pero que siempre deben ser tenidas en cuenta por este, en el momento de interpretar los resultados.

## **FACTORES QUE DEPENDEN DEL PACIENTE**

Los factores que pueden influir en los resultados y que dependen del paciente, pueden ser modificables o no, por el propio paciente, el médico o el personal del laboratorio; sin embargo, siempre deben ser tenidos en cuenta por el facultativo que solicita la investigación y por el personal del laboratorio (si se le comunica su existencia). A continuación, se exponen estos factores.

### **FACTORES NO SUSCEPTIBLES DE MODIFICACIÓN**

La edad, el sexo y la raza del paciente pueden influir de manera importante en la interpretación de los resultados obtenidos. Así, por ejemplo, la actividad de la fosfatasa alcalina y los valores de las inmunoglobulinas en suero, serán muy distintos en el niño y en el adulto; los niveles de hemoglobina, hierro sérico y algunas hormonas, difieren en el hombre y la mujer; la anemia por eritrocitos falciformes se observa en individuos de ascendencia negroide, mientras que determinadas enfermedades metabólicas hereditarias son mucho más frecuentes en los hebreos. Por otra parte, el embarazo y la fase del ciclo menstrual pueden determinar variaciones importantes en el comportamiento de algunos parámetros.

### **FACTORES SUSCEPTIBLES DE MODIFICACIÓN**

El ejercicio físico intenso y la tensión mental, pueden afectar los niveles de muchos componentes de la sangre. Así, por ejemplo, la simple flexión excesiva del antebrazo poco antes de la punción venosa (piense en un individuo que para llegar al laboratorio tuvo que hacer un viaje largo, de pie en un ómnibus repleto), modifica los valores de potasio, glucosa, proteínas o lactato-deshidrogenasa, mientras que los largos períodos de

excesiva tensión mental (estrés) pueden afectar los niveles séricos de glucosa y colesterol, así como la fórmula leucocitaria. Ambos factores favorecen la elevación del cortisol y la renina plasmática.

El ayuno es imprescindible para la realización de muchas pruebas de laboratorio. Las muestras de sangre deben ser tomadas temprano en la mañana, después de un ayuno de aproximadamente 12 horas. En el caso de la determinación de triglicéridos, es muy importante, incluso, que la última comida del día anterior haya sido exenta de grasas. La determinación de los niveles de glicemia, así como de algunas hormonas, se afecta de manera significativa en el caso de una ingestión reciente de alimentos. Además, la presencia de quilomicrones en el suero, determina una turbidez que interfiere con algunas mediciones.

Muchas pruebas específicas requieren determinadas limitaciones dietéticas en los días previos a su realización, mientras que otras, por el contrario, exigen la ingestión de algunos alimentos durante ese tiempo. Por todo ello, es importante asesorarse con el especialista en laboratorio clínico en caso de duda, e informar al paciente, de manera adecuada (o a sus familiares, en el caso de niños o de pacientes discapacitados mentales), con la suficiente antelación y asegurarse de que este ha comprendido las instrucciones y de que las cumple.

La ingestión de medicamentos influye en grado sumo en los resultados de muchas investigaciones de laboratorio, tanto por sus efectos en la regulación metabólica como por las posibles interferencias en los métodos de análisis. A pesar de que la información acerca de estas posibles interferencias es responsabilidad del fabricante de los estuches de reactivos o de los equipos en que se realizan las determinaciones, a menudo esa información resulta insuficiente, pues no especifica hasta qué punto la interferencia es significativa. La lista de estos efectos es bastante larga e imposible de ser memorizada, por lo que en años recientes se han escrito manuales acerca del tema, con el objetivo de que el médico de asistencia los tenga al alcance de la mano y pueda consultarlos cada vez que sea necesario. En muchos casos no es posible interrumpir el tratamiento para realizar los análisis, pero puede suceder que no exista otra alternativa y ello debe ser decidido de manera casuística. De cualquier forma, es imprescindible un adecuado interrogatorio al paciente, pues él mismo puede estar automedicándose (drogas antiinflamatorias no esteroideas [AINE] o anticonceptivos orales, por solo citar dos ejemplos) o siguiendo un tratamiento impuesto por otro facultativo.

La ingestión de bebidas alcohólicas (etanol) produce cambios en algunos parámetros, en dependencia de

la cantidad ingerida y del tiempo transcurrido. El aumento de la actividad de las enzimas hepáticas, en especial la gammaglutamiltranspeptidasa (GGT), es un buen ejemplo. La ingestión reciente de alcohol puede ser causa de una hipoglicemia y la ingestión crónica, de una hipertrigliceridemia.

Debe advertirse al paciente que, en la mañana en que se le realicen los análisis, no fume hasta que no se haya realizado la toma de las muestras, ya que ello puede afectar también algunos parámetros, como la glucosa y la amilasa. El hábito de fumar disminuye los valores de HDL-colesterol y los niveles de teofilina en la sangre de los pacientes que ingieren esta droga (por aumento de la excreción).

La posición del paciente en el momento de la extracción de sangre puede determinar modificaciones importantes de los resultados. La posición erecta durante la toma de la muestra es inadecuada y debe proscribirse. Sin embargo, los valores de algunos parámetros pueden mostrar diferencias –incluso– entre muestras obtenidas con el paciente en posición sentada, en decúbito, o al pasar de esta posición a la primera de forma brusca, después de permanecer acostado por un intervalo prolongado.

Por último, algunos procedimientos clínicos (palpación profunda del abdomen o tacto rectal, por ejemplo) o diagnósticos (administración de contrastes por vía intravenosa, o de radionúclidos), pueden también influir en la concentración sérica de determinados analitos.

## **FACTORES QUE DEPENDEN DEL PERSONAL DE SALUD**

Las interferencias relacionadas con la actividad del personal de salud (médicos, enfermeras, personal del laboratorio) se deben, por lo general, al incumplimiento de las normas de operación. Las más frecuentes:

1. Errores en la toma de muestras, identificación y manipulación de estas (más adelante se reitera este asunto).
2. Errores en la conservación de la muestra, sobre todo en relación con el empleo de un anticoagulante inapropiado, insuficiente o excesivo (más adelante se insiste en este aspecto).
3. Demora en el envío de las muestras al laboratorio.
4. Preparación incompleta o incorrecta del paciente.
5. Hemólisis de las muestras de sangre.
6. Recolección incompleta, en el caso de muestras seriadas (prueba de tolerancia a la glucosa, por ejemplo).

7. Información al laboratorio incompleta, inexacta o ilegible.

## **OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE**

### **MOMENTO PARA TOMAR LA MUESTRA DE SANGRE**

Las muestras de sangre para los análisis que no son urgentes, se obtienen preferiblemente en las primeras horas de la mañana, después de una noche de ayuno, con el paciente en posición sentada o en decúbito. Este horario debe respetarse, pues los niveles de muchos componentes de la sangre siguen ritmos circadianos (es decir, que varían de manera notable, en el transcurso del día). Las hormonas son el ejemplo más fiel, pero no el único. Algunas de ellas (las hormonas sexuales femeninas, por ejemplo) varían también durante el ciclo menstrual y es imprescindible tener esto en cuenta en el momento de interpretar los resultados.

La toma de muestras de sangre para el monitoreo de los niveles de medicamentos (TDM), constituye un caso particular y será tratado en otra sección de este libro.

### **OBTENCIÓN DE SANGRE VENOSA. CAUSAS DE ERROR**

La punción venosa es la forma más corriente de obtener sangre para análisis. Por lo general se escoge una vena del pliegue del codo, con el brazo del paciente en extensión. Es necesario aplicar un torniquete al brazo, por encima del sitio donde se va a puncionar, para provocar distensión venosa, pero este debe mantenerse el menor tiempo posible, pues puede provocar modificaciones importantes en los valores de algunos parámetros. En los niños pequeños, en ocasiones es necesario puncionar la vena yugular externa, lo cual tiene importantes contraindicaciones (trastornos de la hemostasia, por ejemplo). Debe ser realizada con precauciones especiales y requiere el auxilio de un ayudante que inmovilice la cabeza del niño, colocándola en posición ligeramente colgante (al extremo de la camilla).

La piel del sitio escogido para la punción se limpia con etanol al 70 % o isopropanol al 60 % y se deja secar. Se debe evitar palpar de nuevo con el dedo, a menos que se empleen guantes esterilizados.

La aguja debe poseer un diámetro apropiado (0,8 a 1,1 mm para adultos) y se le hará penetrar en la vena con el bisel hacia arriba y en un ángulo próximo a los 45°. La punción debe ser lo más limpia posible, para

evitar la entrada de líquido hístico en la muestra y el torniquete debe retirarse tan pronto penetre sangre al interior de la jeringa o del tubo al vacío, según el caso. Al terminar la extracción, se retirará la aguja y se colocará una torunda de algodón o gasa en el sitio de la punción.

Si se empleó una jeringa, se separará la aguja de esta (¡cuidado!, pues puede pincharse una mano) y se procederá a depositar con cuidado la sangre en los tubos correspondientes, que pueden contener algún anticoagulante o no (más adelante se hace referencia a estos). En el caso de que se emplee el sistema de tubos al vacío (*Vacutainer*), este paso se obvia.

Las causas de error más frecuentes al obtener sangre por punción venosa son:

1. Escoger una extremidad edematosa, fría o colgante.
2. Puncionar una vena que ha sido empleada previamente para administrar algún medicamento.
3. Tomar la muestra aprovechando que la vena tiene colocado un catéter o aguja a través de los cuales se está pasando una infusión por venoclisis.
4. Colocar el torniquete muy bajo o dejarlo por un tiempo excesivo (más de un minuto).
5. Punción muy traumática. Si no logra canalizar la vena al primer intento, quite el torniquete y pruebe en el otro brazo o solicite ayuda de una persona más experimentada.
6. Empleo de una aguja de calibre muy pequeño, lo cual provoca hemólisis.
7. Formación de espuma, que también favorece la hemólisis.
8. Confusión al rotular los tubos. La incorrecta identificación es un grave error que puede ocasionar inconvenientes serios.
9. Uso del anticoagulante no apropiado. Proporción inadecuada entre la cantidad de este y la de sangre. Mezcla incorrecta de la sangre y del anticoagulante (demasiado enérgica, provoca hemólisis; mezcla insuficiente, provoca coagulación parcial o total).
10. Mientras está realizando un muestreo, toda su atención debe estar concentrada en este. Evite distraerse o distraer a otros que estén realizando esta labor. Además de constituir una grave falta de ética, es una fuente importante de error.

## OBTENCIÓN DE SANGRE CAPILAR. CAUSAS DE ERROR

La sangre capilar es una mezcla de sangre arterial y venosa. Si se desea una mayor semejanza con la

sangre arterial, se puede elevar la temperatura en el sitio escogido para la punción, sumergiéndolo en agua tibia (a 37 °C) por 3 o 4 minutos, o empleando cloruro de etilo. En este caso, antes de proceder a la punción, se debe esperar la fase de rubicundez del área, que indica la dilatación de las arteriolas.

Los lugares que con más frecuencia se escogen para la toma de este tipo de muestras, son: la superficie lateral del dedo medio de una mano, o el lóbulo de la oreja. En el caso de los lactantes, se obtiene por punción del talón. El sitio seleccionado se debe limpiar con etanol o isopropanol y secar con una torunda de gasa. La punción debe ser suficientemente profunda como para que la sangre fluya de manera espontánea, sin necesidad de oprimir el sitio. Se debe desechar la primera gota.

Las causas de error más frecuentes al obtener sangre capilar, son:

1. Escoger una extremidad edematosa, cianótica, fría o colgante.
2. Punción muy superficial, que obliga a presionar mucho el dedo o el talón para obtener la muestra, por lo cual esta se contamina con líquido hístico.
3. No descartar la primera gota, pues esta contiene líquido hístico.
4. Recogida inadecuada de las muestras en los tubos capilares empleados (sobre este tema, se insiste en otras secciones del libro).

## OBTENCIÓN DE SANGRE ARTERIAL. CAUSAS DE ERROR

La punción arterial tiene pocas indicaciones en laboratorio clínico. En general, se emplea solo para tomar muestras para la determinación de gases en sangre (hemogasometría), o cuando todos los intentos de obtener sangre venosa han fracasado. Sin embargo, en este último caso, debe tenerse en cuenta que los resultados de algunos parámetros difieren en la sangre venosa y en la arterial.

Para la toma de muestras de este tipo, en adultos, se emplea por lo general la arteria radial, que se puede localizar con facilidad, por la palpación de su latido, en la muñeca del paciente. También la arteria femoral (sobre todo en los niños), en el triángulo de Scarpa. Con menor frecuencia se punciona la arteria cubital, en el pliegue del codo.

Una vez localizada la arteria (sin colocar torniquete), se limpia la zona en la misma forma que para realizar la punción venosa y se introduce la aguja, con el bisel hacia arriba, en un ángulo próximo a los 60°. La sangre debe fluir de manera espontánea, por efecto de

la presión arterial. Al terminar la extracción, se retira la aguja y se hace una ligera presión con una torunda sobre el sitio de la punción durante un minuto, aproximadamente. La elasticidad de la pared arterial debe impedir un sangrado; sin embargo, este tipo de punción es riesgoso en pacientes con trastornos de la hemostasia, por lo que debe evitarse en ellos.

La causa más frecuente de error, es puncionar una vena profunda y tomar la muestra como si fuera arterial. Otras causas son similares a las mencionadas en el caso de obtención de sangre venosa: escoger una extremidad edematosa, fría o colgante; emplear una aguja de calibre muy pequeño; confusión al rotular los tubos; usar un anticoagulante no apropiado; mala mezcla o inadecuada proporción de la sangre y el anticoagulante en el tubo de recolección. Si la muestra fue tomada para la determinación de gases en la sangre, el tiempo transcurrido entre la extracción y la realización del análisis es crítico y debe ser el menor posible (se insiste en este tema en otra sección).

Recuerde siempre que toda muestra de sangre es potencialmente peligrosa para el personal que la manipula, mientras no se demuestre lo contrario. Extreme las precauciones para no contaminarse ni contaminar a otros (las medidas de seguridad al respecto, se exponen en otra sección de este libro).

## **CONSERVACIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE: EMPLEO DE ANTICOAGULANTES**

Para la mayoría de las determinaciones de química clínica se emplea el suero (plasma libre de fibrinógeno), obtenido por el simple procedimiento de dejar coagular la muestra de forma espontánea, después de depositarla en un tubo seco. En el caso de que se desee obtener plasma, o trabajar con sangre completa (como sucede con las determinaciones hematológicas), es necesario emplear un anticoagulante.

Los anticoagulantes más utilizados son la heparina y la sal disódica o dipotásica del ácido etilén diamino-tetraacético (EDTA). La primera es una antitrombina y el segundo, un agente quelante del calcio iónico. Otras sustancias de uso casi común son el citrato de sodio, el fluoruro de sodio y las mezclas de oxalatos, que también tienen acción quelante.

Sea cual sea el anticoagulante empleado, existen requisitos cuyo cumplimiento estricto determina la calidad de los resultados que se van a obtener:

1. En primer lugar, la selección del anticoagulante debe ser la correcta, pues cada uno de ellos tiene sus indicaciones concretas, de acuerdo con el parámetro que se investiga, el método analítico que se va

a utilizar y el equipo (analizador químico o hematológico) que se va a emplear. El uso de un anticoagulante no adecuado, puede causar serias interferencias.

2. La mezcla con la sangre debe ser adecuada y la proporción entre la muestra y el anticoagulante debe ser respetada. Si la mezcla se realiza de manera enérgica, se corre el riesgo de provocar hemólisis; en cambio, si es insuficiente, provocará que la muestra se coagule. En cuanto a la proporción incorrecta, es causa de serios errores en los resultados.
3. La separación del plasma y las células debe realizarse lo más pronto posible, con el fin de evitar que algunos componentes de estas pasen al plasma y viceversa. La centrifugación no debe ser muy prolongada ni a una temperatura muy alta, pues ello también favorece el deterioro celular. Sería ideal poder emplear para estos fines una centrífuga refrigerada.
4. Si la determinación de los analitos no se va a realizar de inmediato, es necesario guardar el plasma en tubos apropiados (viales de plástico, por ejemplo), rotulados de forma correcta, con un cierre hermético y conservarlos a una temperatura de 4 a 6 °C o menor, es decir, en congelación, si el intervalo hasta la realización de las determinaciones va a ser de varios días. Lo mismo puede decirse para la conservación de las muestras de sueros.

## **MUESTRAS DE ORINA Y DE OTROS LÍQUIDOS BIOLÓGICOS**

La recolección de una muestra de orina depende del tipo de investigación que se va a realizar. Este último aspecto será objeto de un estudio en otra sección del libro. Sin embargo, existen principios generales que se expondrán a continuación.

Las muestras pueden obtenerse por micción espontánea o mediante una sonda vesical. Si se trata de la recolección de una muestra aislada, se prefiere la primera micción de la mañana y en cuyo caso la cantidad no es esencial; pero si no, se recoge la orina emitida en un período que puede oscilar entre 2 y 24 horas. En este segundo caso, la cantidad exacta recogida de toda la orina es crítica para garantizar la calidad de los resultados y, por ende, la información verbal y por escrito al paciente, sobre las instrucciones para la correcta recolección de la muestra, es imprescindible y debe ser clara y detallada. En el caso del paciente internado, la supervisión de la recogida será responsabilidad directa de la enfermera.

En todos los casos, los frascos empleados para la recolección deben estar muy limpios, con tapas seguras que impidan los derrames, y bien rotulados con los datos del paciente y el nombre de la prueba que se va a realizar. Algunos estudios pueden requerir de la adición de un preservante, que debe estar contenido en el frasco antes de entregarlo al paciente, el cual debe ser informado del objetivo de esa sustancia. En general, se prefiere conservar las muestras en refrigeración cuando el período de recolección es largo.

En el caso de los niños pequeños, es usual recurrir a bolsas colectoras de plástico que se colocan sobre el área genital, luego del aseo adecuado de esta área.

Las muestras de líquido cefalorraquídeo se extraen por punción lumbar, que debe ser llevada a cabo por el médico que realiza la indicación. El paciente debe estar colocado, preferiblemente, en decúbito lateral, aunque en ocasiones se escoge la posición de sentado. Luego de la esterilización de la piel (se limpia con iodo-povidona, esta a su vez con alcohol y por último se seca con una torunda esterilizada; en los tres casos, el movimiento de la torunda debe ser en forma de una espiral que se desarrolla hacia afuera), se realiza la punción en el espacio que media entre la tercera y la cuarta vértebras lumbares, llevando la aguja hasta el espacio subaracnoideo. El líquido debe fluir de manera espontánea y se recogerán 2 mL en un tubo limpio (por lo general, se recoge también una muestra en un tubo estéril para realizar un análisis microbiológico). En todos los casos, estas muestras deben remitirse al laboratorio cuanto antes, bien tapadas y, si es posible, se deben colocar los tubos en recipientes con agua helada.

Deben extremarse las precauciones en pacientes en los que existan razones para sospechar la presencia de una hipertensión endocraneal, pues en estos casos la punción puede tener consecuencias fatales para su vida. También está contraindicada en los trastornos de la hemostasia.

En los últimos años, debido a la conmoción mundial provocada por la epidemia del SIDA, ha cobrado especial interés la determinación de analitos en la saliva, líquido orgánico exento de riesgos en este sentido, lo cual le convierte en una alternativa de las determinaciones en la sangre. La recolección es sencilla y la cantidad puede ser estimulada depositando sobre la lengua una pequeña cantidad de ácido cítrico o haciendo al paciente masticar algún material que no interactúe con la muestra. La saliva se recoge en un recipiente adecuado, rotulado de manera conveniente, se congela y luego se descongela y se centrifuga, y por último, se recoge el sobrenadante para análisis. Con este procedimiento se eliminan la mucina y las células de la mucosa oral.

Es importante que el paciente no haya realizado ningún procedimiento de higiene bucal por lo menos durante tres horas antes de recolectar la muestra (el cepillado de los dientes puede provocar hemorragias microscópicas que afecten los resultados). La administración previa de algún alimento o droga, también puede influir sobre los valores de los parámetros que se van a estudiar. Por último, la presencia de una gingivitis contraindica el empleo de las muestras de saliva, por la alteración que puede inducir en los resultados de las determinaciones.

## SOLICITUD DE LOS ANÁLISIS

Lamentablemente, con frecuencia se subestima la importancia de la correcta solicitud de los análisis de laboratorio (este aserto es válido para todas las pruebas de diagnóstico). Por lo general, la solicitud es un modelo que contiene una lista de pruebas, agrupadas de distinta forma, según el laboratorio de que se trate, aunque lo habitual es que los exámenes hematológicos, los de química clínica, los de orina, los estudios de gases en sangre y las pruebas serológicas y microbiológicas, estén segregados. Existen algunos estudios más complejos, como los medulogramas o las pruebas para el estudio de los trastornos de la hemostasia, que por lo general tienen modelos específicos de solicitud. Algunos laboratorios que emplean grandes equipos automatizados, que ofrecen la posibilidad de realizar los llamados paneles o perfiles (grupos de análisis que permiten estudiar de manera funcional y completa, un órgano, o explorar un síndrome), imprimen solicitudes adecuadas a esta posibilidad, cuya aplicación incrementa considerablemente la eficiencia del trabajo del laboratorio.

Sea cual sea el caso, existen normas generales para la confección de la solicitud que deben ser respetadas siempre:

1. Escribir con letra clara y legible todos los datos.
2. Emplear el modelo adecuado para la solicitud de que se trate.
3. Brindar toda la información que se solicita en el modelo, y añadir cualquier dato que, a juicio del facultativo, pueda ser de interés para el laboratorio (sobre todo si son posibles causas de interferencias).
4. Identificar de manera adecuada las solicitudes de análisis realizados a los pacientes portadores o sospechosos de enfermedades que implican riesgo de contagio para el personal que manipula las muestras (SIDA, hepatitis B o C).

5. No indicar análisis innecesarios; mucho menos en la categoría de urgencia sin una razón de peso que lo justifique. A menudo, no se requiere la realización de un *perfil* completo, ni existe una verdadera premura por conocer los resultados.
6. La solicitud de exámenes de laboratorio debe seguir una secuencia lógica. Si esta se altera, se produce un gasto innecesario de recursos, molestias al paciente y se corre el riesgo de cometer errores (no tiene sentido indicar una cuantificación de los niveles de hierro sérico, si no se ha realizado primero una determinación de hemoglobina sanguínea, hematócrito y constantes corpusculares, por ejemplo).
7. El paciente tiene derecho a recibir toda la información que solicite sobre su enfermedad. Esto incluye todas las pruebas para el diagnóstico, para la realización de las cuales debe otorgar su pleno consentimiento. No tener en cuenta este factor, además de una falta grave de ética, es una fuente importante de errores. La información incluye, entre otros datos, las razones por las cuales se le indica(n) determinada(s) prueba(s), los beneficios y los riesgos que se derivan de la realización o no de esta(s) y la repercusión de los resultados obtenidos sobre

la conducta que se seguirá con posterioridad; además de las instrucciones referentes a la preparación previa y a la recolección de la muestra, en particular, de la orina.

El médico que indica un examen para realizar un diagnóstico, debe tener nociones acerca de la forma en que este se realiza, cómo se obtienen los resultados y las limitaciones del valor de estos para la toma de decisiones. Este conocimiento y una correcta comunicación, son factores claves para llevar a cabo la fase preanalítica de manera adecuada.

## BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- Castillo de Sánchez ML, Fonseca Yarena ME, (eds.). *Mejoría continua de la calidad. Guía para los laboratorios de América Latina*. México DE: Editorial Médica Panamericana, 1995.
- Fischbach FT. *A manual of Laboratory & Diagnostic Tests*. 4<sup>th</sup> ed. New York: JB. Lippincott Co., 1992.
- Kazmierczak SC, Catrou PG. Analytical interference. *Am J Clin Pathol* 2000;113:9-11.
- Mayne PD. *Clinical Chemistry in Diagnosis and Treatment*. 6<sup>th</sup> Ed. Boston: Little, Brown & Co., 1995.
- Sacher R, Mc Pherson RA. *Widmann's Clinical Interpretation of Laboratory Tests*. 10<sup>th</sup> FA. Davis Co. Ed. Philadelphia, 1991.

## **CONTENIDO**

---

**Introducción/ 19**

**Evaluación y selección de los métodos analíticos/ 19**

**Precisión, exactitud y error analítico/ 20**

**Calibración de los métodos analíticos/ 25**

**Control de la calidad de los procedimientos analíticos: aseguramiento interno de la calidad/ 28**

**Materiales para el control de la calidad/ 28**

**Cartas de control/ 29**

**Aseguramiento de la calidad en química clínica y en hematología/ 31**

**Evaluación externa de la calidad/ 32**

**Bibliografía recomendada/ 33**

# PARTE I. GENERALIDADES

## Capítulo 3



### FASE ANALÍTICA

*Dr. Celso Cruz Rodríguez*

#### RESUMEN

**La fase analítica se desarrolla en el interior del propio laboratorio clínico. La selección, aplicación y evaluación de los diferentes procedimientos analíticos constituyen el factor fundamental que, como un marcador ultrasensible, se hace necesario revisar siempre, cuando se trata de conocer la calidad con que se desempeña el laboratorio clínico, también llamado laboratorio médico. El aseguramiento de la calidad, en sus dos variantes: interno y externo, constituye un aliado insustituible de los analistas para conocer el comportamiento del desempeño diario, dentro y fuera del laboratorio.**

#### INTRODUCCIÓN

La fase analítica tiene como principal objetivo establecer las características analíticas y funcionales de los métodos de análisis y las técnicas de control de la calidad que se utilizan para detectar los errores que afectan la calidad de los resultados obtenidos, una vez que el método ha sido introducido en el trabajo habitual del laboratorio clínico.

Los materiales biológicos que se utilizan (muestras) y los requisitos para su recolección, conservación y transportación, fueron descritos en el capítulo anterior, dedicado a la fase preanalítica.

#### EVALUACIÓN Y SELECCIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS

La selección del método está encaminada a la búsqueda de un proceder que satisfaga las expectativas planteadas y, de esta forma, apoyar al médico en su labor de diagnóstico (tabla 1.1). El paciente será el principal beneficiado al definirse la conducta que se debe seguir ante el problema de salud que lo llevó a solicitar ayuda médica.

La selección del método comprende los aspectos siguientes:

1. Definición de los requisitos para el método.

2. Revisión de la literatura técnica para conocer los métodos disponibles.
3. Selección del método que mejor se adapte a las condiciones del laboratorio y los requerimientos clínicos.

La definición de los requisitos requiere un estudio detallado, con el objetivo de encontrar un método que se ajuste a las necesidades planteadas. Debe valorarse el material biológico que se utiliza, el volumen requerido de la muestra, el tiempo que consume la ejecución del método, si se trata de un procedimiento de uso frecuente, si está comprendido dentro del grupo de análisis de urgencia, el equipamiento necesario, la posibilidad de su automatización y si el personal que lo va a realizar requiere entrenamiento y medidas de protección especiales. Deben constituir también motivo de análisis, el límite de detección (sensibilidad analítica) y la especificidad. Ambas tienen que ver con la calibración, el intervalo de referencia (valores normales), la precisión, la exactitud y las sustancias que causan interferencias (medicamentos y otras sustancias).

Los aspectos mencionados se obtienen al revisar la literatura técnica actualizada, e intercambiar opiniones con los clínicos para conocer las características de los diagnósticos de la enfermedad en particular.



## PRECISIÓN, EXACTITUD Y ERROR ANALÍTICO

Concluida la fase de la selección, comienza el proceso de la evaluación, en el que se estudian, de manera experimental, algunas de las características del método, como son: precisión, exactitud, linealidad, límite de detección, especificidad y estabilidad de los reactivos. Si los requisitos de la fase de selección fueron bien analizados, se facilitará el estudio de la fase evaluativa. Esta descansa, sobre todo, en el estudio experimental de la precisión y la exactitud del método (tablas 1.2 a 1.5, cuadros 1.1 a 1.3 y figuras 1.2 a 1.4).

La precisión se define como la mejor concordancia entre los resultados de mediciones independientes, obtenidos mediante un procedimiento de medición (método analítico), bajo condiciones prescritas. Depende solo de la distribución de los errores aleatorios del procedimiento de medición y constituye una medida de la reproducibilidad. No tiene expresión numérica. Si esta expresión existiera, se refiere entonces a la imprecisión, que se define como la dispersión de resultados independientes obtenidos mediante un procedimiento de medición, bajo condiciones específicas. La imprecisión es el inverso de la precisión y puede ser medida sobre un sistema de ordenadas como pequeña, media y grande.

De modo más simple, la precisión se refiere a la concordancia entre los valores obtenidos en determinaciones repetidas. Cuando basado en este valor, se califica con números, entonces se hace referencia a la imprecisión.

Si el estudio de la precisión se realiza dentro de una corrida analítica, se denomina *precisión dentro de la corrida* y el error detectado es aplicable solo a este período. Si el estimado se realiza incluyendo a varias corridas, se denomina *precisión entre corridas*. Ambas constituyen la llamada precisión del día, la que se conoce también como *repetibilidad*. Cuando el estudio de la precisión se realiza entre corridas realizadas en días sucesivos, se denomina *precisión de día a día o reproducibilidad*.

La reproducibilidad ofrece un mejor estimado de los errores aleatorios, pues, al prolongarse el período

del estudio, se ofrece la oportunidad de que esté presente un mayor número de estos errores, como ocurre en el trabajo diario y que son fuentes de variación analítica.

El error analítico aleatorio se refiere a la imprecisión y puede ser negativo o positivo. Por lo general, su dirección y magnitud puede llegar a no conocerse, aunque siempre estará presente. Este tipo de error suele causar variaciones mínimas; pero, en ocasiones, esto puede cambiar de manera radical y convertirse en la causa de grandes variaciones. Estas se cuantifican mediante el cálculo de la media o promedio de todos los valores ( $\bar{X}$ ), de la desviación estándar ( $s$ ) y del coeficiente de variación (CV) (tablas 1.2 y 1.5 y cuadros 1.2 y 1.3).

El error analítico sistemático se refiere a la inexactitud y está siempre en una dirección por encima o por debajo del valor verdadero (figura 1.4). Este tipo de error tiene dos variantes: constante y proporcional. El error sistemático constante tiene siempre igual magnitud, independientemente de la concentración del componente que se está midiendo. El error sistemático proporcional, constituye siempre el mismo porcentaje de la concentración del componente que se está midiendo, por lo cual, su magnitud aumenta a la par que la concentración.

El error sistemático, en cualquiera de sus variantes, da lugar a variaciones groseras en los resultados obtenidos. El estudio experimental de la inexactitud (errores sistemáticos), se realiza por medio de los estudios de recuperación, interferencias y el estudio comparativo entre el método objeto de la evaluación y un método de referencia (tablas 1.2 a 1.4, cuadros 1.1 y 1.2).

El método de referencia es un procedimiento analítico que se caracteriza por mostrar precisión y exactitud, lo cual permite su uso referencial para evaluar otros métodos y materiales de referencia (tabla 1.1).

En resumen, los errores analíticos ocurren en cualquier momento y en cualquier etapa de un procedimiento analítico, aunque se cuente con un personal de experiencia y bien entrenado y se trabaje con las más modernas tecnologías.

Los procedimientos experimentales para el estudio de comparación se relacionan en la tabla 1.5.

**Tabla 1.1** Clasificación de los métodos analíticos

Métodos	Características	Uso
Definitivo	Métodos que no presentan inexactitud ni imprecisión, por ejemplo: dilución isotópica con espectrometría de masa, métodos cromatográficos	Para asignar valores a los materiales primarios y de referencia
Referencia	Métodos que presentan inexactitud e imprecisión mínimas, por ejemplo: Ca II en sangre por espectrofotometría de absorción atómica (EAA), colesterol por el método de Abell y Kendall	Para asignar valores a los materiales de referencia secundarios
Habitual (rutina, campo)	Métodos de uso habitual (rutina) en el laboratorio clínico, obtenidos comercialmente o preparados en el propio laboratorio	Para asignar valores a las muestras de los pacientes

**Tabla 1.2** Cálculo de la desviación estándar de valores obtenidos a partir de muestras duplicadas

Muestra	1 <sup>er</sup> .valor	2 <sup>do</sup> . valor	d	d <sup>2</sup>
1	5,4	6,2	0,8	0,64
2	5,4	6,4	0,9	0,81
3	4,5	4,6	0,1	0,01
4	10,5	12,0	1,5	2,25
5	3,8	4,1	0,3	0,09
6	9,5	8,0	1,5	2,25
7	5,5	6,2	0,7	0,49
8	4,2	6,0	1,8	3,24
9	5,0	5,3	0,3	0,09
10	4,9	5,0	0,1	0,01

**Leyenda**

d: diferencia entre los valores de la muestra.

d<sup>2</sup>: diferencia elevada al cuadrado.**Nota:** las muestras cuya diferencia esté por encima de 1,4 como ocurre en las 5 y 8, deben ser analizadas de nuevo.

$$\Sigma d^2 = 9,88$$

$$\frac{d^2}{2n} = \frac{9,88}{20} = 0,5$$

$$\sqrt{\frac{Sd^2}{2n}} = \sqrt{0,5} = 0,7$$

$$1 \text{ DE} = 0,7$$

$$2 \text{ DE} = 1,4$$

**Tabla 1.3** Cálculo de la desviación estándar y del coeficiente de variación

Muestra	Xi	(Xi - $\bar{X}$ )	(Xi - $\bar{X}$ ) <sup>2</sup>
1	5,5	0	0
2	5,4	-0,1	0,01
3	5,5	0	0
4	5,7	+0,2	0,04
5	5,6	+0,1	0,01
6	5,4	-0,1	0,01
7	5,4	-0,1	0,01
8	5,7	+0,2	0,04
9	5,6	+0,1	0,01
10	5,3	-0,2	0,04
11	5,3	-0,2	0,04
12	5,7	+0,2	0,04
13	5,4	-0,1	0,01
14	5,7	+0,2	0,04
15	5,5	0	0
16	5,4	-0,1	0,01
17	5,3	-0,2	0,04
18	5,6	+0,1	0,01
19	5,3	-0,2	0,04
20	5,6	+0,1	0,01

**Leyenda**

Xi: valor individual.

**Nota:** los valores se obtuvieron al procesar la misma muestra 20 veces.

$$\bar{X} = 5,5$$

$$DE = \sqrt{\frac{\sum(Xi - \bar{X})^2}{n-1}} = \frac{0,1936}{19} = 0,010 = 0,10$$

$$CV = \frac{DE}{\bar{X}} \times 100 = \frac{0,10}{5,5} \times 100 = 1,8$$

**Tabla 1.4**

Muestra	Resultados	d = Xi - $\bar{X}$	d <sup>2</sup> = (Xi - $\bar{X}$ ) <sup>2</sup>
1	87	2	4
2	85	4	16
3	90	1	1
4	88	1	1
5	89	1	1
6	87	2	4
7	91	2	4
8	93	4	16
9	90	1	1
10	88	1	1

**Nota:** los valores de DE y de CV indican una buena precisión del método estudiado.

$$X = 89$$

$$DE = \sqrt{\frac{Sd^2}{n-1}} = \sqrt{\frac{49}{9}} = \sqrt{5,4} = 2,3$$

$$1 \text{ DE} = 2,3$$

$$2 \text{ DE} = 4,6$$

$$CV = \frac{DE}{X} \times 100 = \frac{2,3}{89} \times 100 = 2,5$$

**Cuadro 1.1** Pasos que se deben seguir en el estudio de la calibración

**I. Preparar las muestras de la forma siguiente:**

- 3 mL de suero + 0,3 mL de H<sub>2</sub>O (muestra basal).
- 3 mL de suero + 0,3 mL de una solución acuosa con una concentración de glucosa de 8 mmol/L.
- 3 mL de suero + 0,3 mL de una solución acuosa o sérica con una concentración de glucosa de 16 mmol/L.

**II. Resultados:**

Concentración de glucosa obtenida en las muestras (mmol/L)	Concentración añadida (mmol/L)	Concentración recuperada (mmol/L)	Porcentaje de recuperación (%)
5,8	-	-	-
6,47	0,72	0,67	93
7,10	1,44	1,30	90

**Nota:**  $\bar{X}$  de la recuperación = 91,5 %.

**Cuadro 1.1** Continuación

**III. Cálculos para obtener los resultados en (II):**

$$\text{Concentración añadida} = \frac{\text{Concentración del componente en la solución o el calibrador}}{\text{mL de solución o del calibrador}} \times \frac{\text{mL de suero + mL de la solución o del calibrador}}{\text{mL de suero + mL de la solución o del calibrador}}$$

$$\text{Concentración recuperada} = \frac{\text{Resultado del componente en la muestra} - \text{Resultado basal}}{\text{Resultado del componente en la muestra} - \text{Resultado basal}}$$

$$\text{Recuperación} = \frac{\text{Concentración recuperada}}{\text{Concentración añadida}} \times 100$$

Con este ejemplo, la recuperación promedio (91,5 %) expresa que cada valor obtenido con el método en estudio tiene un error proporcional de 8,5 %. Si dos muestras con valores reales de glucosa de 7,0 y 10 mmol/L, respectivamente, se analizan con este método, los valores obtenidos serán:

$$\begin{aligned} 8,5 \% \text{ de } 7,0 &= 0,595 \\ 7,0 - 0,595 &= 6,4 \text{ mmol/L} \\ 8,5 \% \text{ de } 10,0 &= 0,85 \\ 10,0 - 0,85 &= 9,15 \text{ mmol/L} \end{aligned}$$

Se aprecia el aumento proporcional del error (de 0,595 a 0,85) cuando se analizan muestras con concentraciones crecientes de glucosa.

**Cuadro 1.2** Pasos que se deben seguir en el estudio de las interferencias

**I. Preparar las muestras de la forma siguiente:**

3 mL de suero + 0,3 mL de H<sub>2</sub>O (muestra basal)

3 mL de suero + 0,3 mL de una solución (calibrador) de bilirrubina con una concentración de 80 mmol/L

3 mL de suero + 0,3 mL de una solución (calibrador) con una concentración de bilirrubina de 120 mmol/L

**II. Resultados:**

Concentración de creatinina en las muestras (μmol/L)	Bilirrubina añadida	Interferencias
95	-	-
50	7,2	- 45
20	10,8	- 75

**III. Cálculos:**

$$\text{Concentración añadida} = \frac{\text{Concentración de bilirrubina en el calibrador}}{\text{mL de suero + mL del calibrador}} \times \frac{\text{mL del calibrador}}{\text{mL de suero + mL del calibrador}}$$

$$\text{Interferencia} = \text{Resultado de la muestra} - \text{Resultado basal}$$

**Nota:** los resultados del estudio demuestran que la bilirrubina interfiere en la determinación de creatinina. Esto causa una disminución marcada de los valores de este componente y, por lo tanto, invalida su utilidad clínica.

**Tabla 1.5** Objetivos de tres de las pruebas más empleadas para la evaluación de los métodos analíticos

Estudio	Objetivos
Prueba t para series apareadas	Permite conocer si la diferencia entre las medias ( $\bar{X}$ ) de dos grupos de resultados (valores) es estadísticamente significativa
Regresión lineal	Se utiliza con el objetivo de estimar la mejor relación lineal entre dos variables (método de referencia y método de estudio)
Coeficiente de correlación (r)	Permite estimar el grado de asociación entre dos variables

**Cuadro 1.3** Proceso evaluativo de los datos (resultados) de un programa de evaluación externa de la calidad (PEEC)

1. Se agrupan los resultados por componente y por método analítico.
2. Se calculan la  $\bar{X}$  y la DE.
3. Se ajustan los datos, eliminando los que queden por fuera de los límites establecidos por el programa  $\pm 2$  DE ó  $\pm 3$  DE.
4. Se calcula el porcentaje de variación:

$$V = \frac{X - \bar{X}}{X} \times 100 \quad (1)$$

Se calcula el índice de variación:

$$IV = \frac{V}{CVS} \times 100 \quad (2)$$

De acuerdo con el valor del IV, se puede preparar una escala de resultados para evaluar cada laboratorio participante:

0 - 50 Excelente  
 51 - 150 Bueno  
 151 - 200 Aceptable  
 201 - 300 Regular  
 más de 301 Deficiente

**Leyenda**

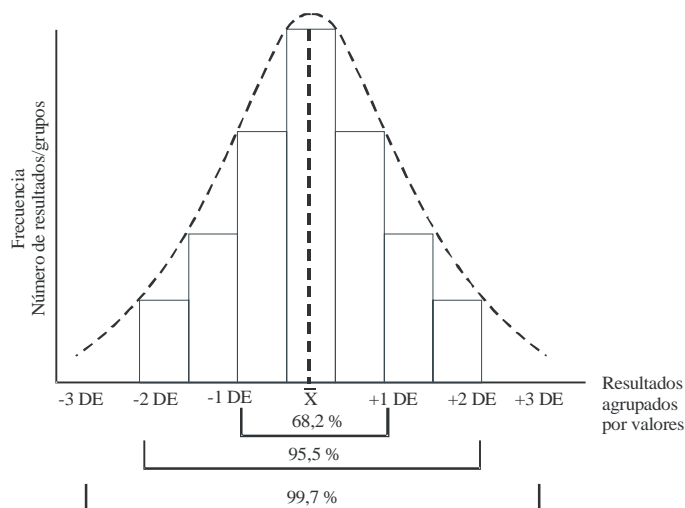
X: resultado del componente.

$\bar{X}$ : media de los valores para ese componente y método.

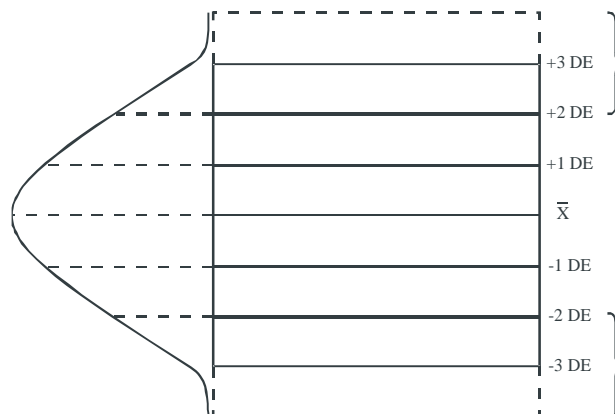
V: porcentaje de variación obtenido en 1.

IV: índice de variación.

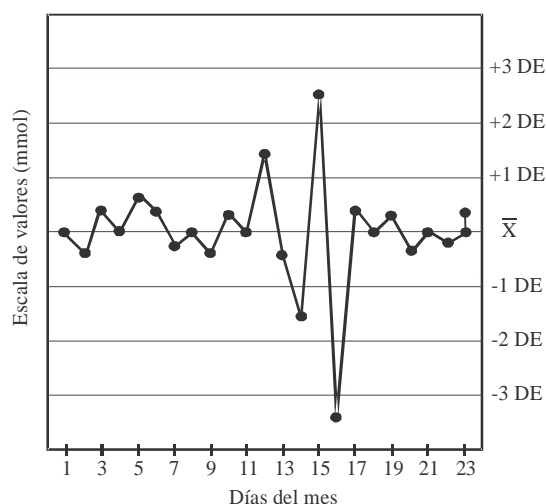
CVS: coeficiente de variación seleccionado para cada componente y que no se modifica por el Centro Rector, con el objetivo de evaluar el comportamiento de un componente en el tiempo (meses, años).



**Figura 1.2** Distribución normal de frecuencia.



**Figura 1.3** Confección de la carta de control a partir de la distribución de frecuencia.



**Figura 1.4** Carta de control que muestra la dispersión de resultados en tres periodos: controlada, imprecisa e inexacta.

## CALIBRACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS

La calibración es uno de los experimentos iniciales en el montaje y estandarización de los métodos en el laboratorio clínico. Tiene como principal objetivo conocer si el método que está en estudio tiene una respuesta lineal y, de ser así, verificar que el intervalo

de valores de interés clínico (intervalo de referencia: IR) pertenece al segmento lineal. De esta forma, todos los resultados cuyos valores se encuentren en el intervalo lineal, se pueden calcular con un valor del calibrador, que debe tener una concentración próxima al límite superior del intervalo de referencia. En otras palabras, no es necesario utilizar una curva de calibración. Si los valores de interés clínico se ubican total o parcialmente fuera del segmento lineal, es necesario que las muestras sean diluidas para que el resultado obtenido esté incluido en el intervalo lineal; se debe recordar, que al final, es necesario multiplicar este resultado por el factor de dilución de la muestra o utilizar para el cálculo de los valores una curva de calibración. La porción recta de la curva representa el rango analítico útil del método.

La curva de calibración relaciona dos variables. La variable independiente, constituida por las concentraciones del patrón o calibrador (eje de las X) y la variable dependiente, constituida por las absorbancias o densidades ópticas correspondientes (eje de las Y). En la actualidad, la escala de lectura de los fotocolorímetros y espectrofotómetros no viene graduada en porcentaje de transmisión. Cuando era así, la curva de calibración tenía que dibujarse en papel semilogarítmico. Cuando se trabaja con absorbancias (DO), la curva se dibuja en un papel milimetrado.

La curva de calibración se debe preparar con cinco valores de concentración diferente del patrón o calibrador. Estas concentraciones deben abarcar todo el intervalo de interés clínico y sobrepasar el límite superior de este en dos concentraciones como mínimo. Deben hacerse duplicadas.

Hoy se utilizan ambos tipos, aunque la gran cantidad de métodos directos en uso, obliga que se usen calibradores. De esta forma se evitan los errores causados por la diferencia de matriz (los patrones acuosos no contienen proteínas; los materiales biológicos con los que se va a trabajar: plasma, suero u otros, sí las contienen y en cantidades apreciables).

Los pasos que se deben seguir en la confección de la curva de calibración son:

1. Preparar diluciones del patrón o calibrador: lo correcto es utilizar un juego de calibradores preparado para estos fines y que trae cinco muestras, con concentraciones crecientes del analito. Si no se dispone de este tipo de estuche, estas muestras se pueden obtener mediante diluciones de una solución concentrada. Por ejemplo, a partir de un patrón acuoso o de un calibrador con una concentración de glucosa de 30 mm/L, se preparan diluciones (mediante la regla de 3) para obtener concentraciones de 3, 7, 10, 15 y 20 mmol/L (tabla 1.6). Después de mezclar bien el contenido, se extrae de cada dilución, con la pipeta adecuada, igual cantidad que la de la muestra utilizada por el método objeto de la calibración y se depositan en los tubos para ensayo correspondientes. Entonces se realizan las lecturas y se anotan los valores de DO.
2. Para dibujar la curva de calibración: se utiliza el papel milimetrado. Las líneas de este papel sirven como guía para el dibujo de la curva de calibración (ejes X y Y) (figura 1.5).  
Se llama recta de mejor ajuste a la unión de los puntos con la ayuda de una regla, de manera que

la línea que se trace esté equidistante de cada uno de los puntos. Con frecuencia no se obtiene una recta ideal.

Si cada dilución se prepara por duplicado o triplicado, se puede calcular la media y la desviación estándar para cada valor de las cinco concentraciones y entonces se dibujan también en el gráfico. La media ( $\bar{X}$ ) es el punto y los extremos de las pequeñas líneas por encima y por debajo son  $\pm 2$  la desviación estándar (DE) de cada uno de ellos. La línea de mejor ajuste, aunque no pasa siempre por encima de cada punto (valor medio), no rebasa los límites de  $\pm 2$  DE. Disponer de estos límites de seguridad a la hora de dibujar la recta de mejor ajuste, permite el trazado de esta con seguridad.

3. Regresión lineal (método de los mínimos cuadrados): se utiliza para explorar la relación entre variables. Conociendo el comportamiento de una de ellas, la independiente (eje de las X), se puede predecir el comportamiento de la otra, la dependiente (eje de las Y) (tabla 1.6).
4. Uso de la curva de calibración: se utiliza para informar la concentración de las muestras que han sido analizadas para un determinado componente. Si esta curva no es lineal, hay que utilizarla de manera obligatoria para obtener todos los resultados. Si el trazado es lineal, siempre que el valor obtenido esté dentro de este, los resultados se calculan con el uso de un factor, relacionando las DO de la muestra, el patrón y la concentración del patrón (fórmula general de la fotometría) (véase el acápite correspondiente al análisis instrumental, en esta misma sección).

Los pasos fundamentales que se deben seguir en el estudio de un método analítico se muestran en la tabla 1.7.

**Tabla 1.6** Preparación de la curva de calibración

Tubos de ensayo	Calibrador (mL)	Agua (mL)	Concentración (mmol/L)	Absorbancia (densidades ópticas)
1	0,6	3,4	3	0,029
2	1,4	2,6	7	0,070
3	2,0	2,0	10	0,10
4	3,0	1,0	15	0,152
5	4,0	0	20	0,21

**Nota:** para trazar la recta de mejor ajuste, se debe calcular el intercepto (a) y la pendiente (b), utilizando los datos de concentraciones y de absorbancia de la tabla anterior en las fórmulas siguientes:

$$b = \frac{SXY - n \bar{X} \bar{Y}}{SX^2 - n \bar{X}^2} \quad (\text{Fórmula I})$$

$$a = \bar{Y} - b \bar{X} \quad (\text{Fórmula II})$$

(Continuación)

$$\begin{aligned}\Sigma X &= 55 \\ \bar{X} &= 11 \\ \Sigma X^2 &= 783 \\ \Sigma Y &= 0,561 \\ \bar{Y} &= 0,1121 \\ \Sigma Y^2 &= 0,082945\end{aligned}$$

Sustituyendo en la fórmula I:

$$b = \frac{8,057 - 4 \times 11 \times 0,1121}{783 - 4 \times 121}$$

$$b = \frac{8,057 - 4,9324}{783 - 484}$$

$$b = \frac{3,1246}{299}$$

$$b = 0,010$$

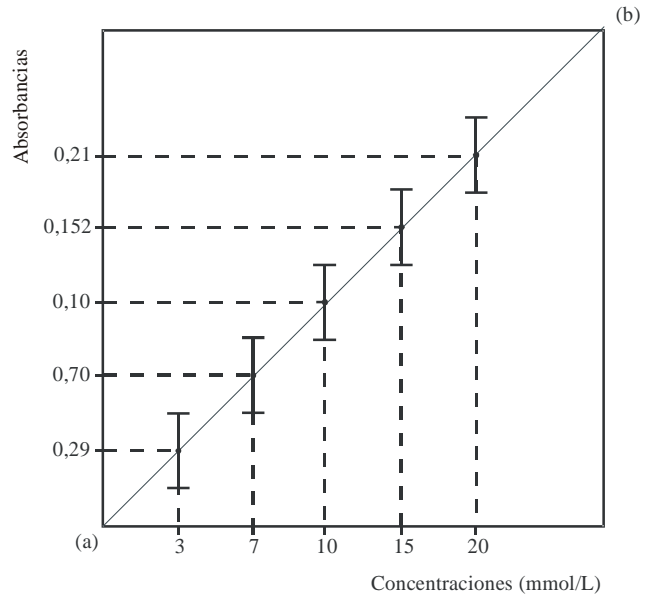
$$b = 1$$

Sustituyendo en la fórmula II:

$$a = 0,1121 - 0,11$$

$$a = 0,0021$$

La regresión lineal comprueba la relación lineal entre ambas variables (figura 1.5).



**Figura 1.5** Curva de calibración ideal (que debe ser dibujada en papel milimetrado), que muestra su linealidad:  $a = 0$ ;  $b = 1$ .

**Tabla 1.7** Pasos fundamentales que se deben seguir en el estudio de un método analítico

Medidas	Objetivos
Comprobar linealidad	Conocer el rango analítico del método (intervalo lineal) y saber si este abarca el intervalo de interés clínico
Estudio de recuperación	Conocer el error sistemático proporcional
Estudio de interferencias	Conocer las sustancias (drogas, bilirrubina, lípidos, hemoglobina) que interfieren
Estudio de la imprecisión	Conocer el comportamiento del método (errores aleatorios) en la corrida y entre corridas
Corridas en paralelo (diagramas de dispersión)	Comparar los resultados obtenidos por ambos métodos: referencia y en estudio
Regresión lineal	Conocer el error sistemático proporcional (pendiente $b$ ) y el error sistemático constante (pendiente $a$ )
Coefficiente de correlación ( $r$ )	Conocer el error aleatorio
Prueba $t$	Conocer los errores sistemáticos constantes y proporcionales
Estudio del error total del método	Comparar el error médico permisible



## **CONTROL DE LA CALIDAD DE LOS PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS: ASEGURAMIENTO INTERNO DE LA CALIDAD**

El control de la calidad en la fase analítica se realiza con el principal objetivo de mantener una vigilancia constante para detectar a tiempo los errores que pueden afectar la excelencia de los resultados. Durante años, la industria realizó el control estadístico de la calidad para supervisar la eficacia de los productos que se fabricaban. La similitud entre el proceso industrial (materia prima → elaboración → producto terminado) y el trabajo dentro del laboratorio clínico (muestra → procesamiento → resultado), fue la causa por la cual las técnicas para el control de la calidad utilizadas industrialmente, fueran introducidas en los laboratorios con las adaptaciones pertinentes. Hoy día, este control constituye una herramienta indispensable en el laboratorio clínico para alcanzar la excelencia en el trabajo.

El control de la calidad en el laboratorio clínico tiene dos variantes:

1. Aseguramiento interno de la calidad (control interno de esta).
2. Evaluación externa de la calidad (control externo de esta).

El aseguramiento interno de la calidad tiene como principal objetivo la detección de errores en el trabajo diario del laboratorio, para resolverlos de inmediato. La liberación de los resultados obtenidos con el método afectado, está supeditada a la detección y corrección de la fuente del error o de los errores del procedimiento analítico de que se trata. De esta forma se procura evitar la entrega de resultados no confiables y que carezcan de utilidad para el diagnóstico.

El aseguramiento interno de la calidad abarca los aspectos siguientes:

1. Óptima preparación del paciente.
2. Recolección correcta de la muestra, su identificación, transportación, almacenamiento y tratamiento especial si lo requiere (acidificación y protección de la acción de la luz solar directa).
3. Organización del trabajo en el laboratorio.
4. Procedimiento analítico (método).
5. Cálculo de los resultados.
6. Aceptación o rechazo de cada serie o corrida de análisis.
7. Informe de los resultados después de validados.

El aseguramiento interno de la calidad comprende las 3 fases del proceso analítico en el laboratorio clínico: preanalítica, analítica y posanalítica, o lo que es igual, desde la preparación del paciente, antes de la toma de la muestra, hasta que los resultados llegan a las manos del médico de asistencia, con la calidad requerida, para que pueda interpretarlos y tomar las decisiones pertinentes. Cualquier error que aparezca en este proceso analítico, en cualquiera de las 3 fases, debe ser detectado por el Programa de Aseguramiento Interno de la Calidad, establecido en el laboratorio clínico. Este programa, escrito de la forma más detallada posible, se debe conservar en cada una de las secciones del laboratorio para que sea revisado por el personal técnico o profesional siempre que sea necesario. Deben formar parte de él los temas siguientes:

1. Materiales de control (controladores).
2. Instrucciones para calcular: la media aritmética ( $\bar{X}$ ), la desviación estándar (DE), el coeficiente de variación (CV) de los controladores (tabla 1.3).
3. Dónde y cuándo introducir los controladores.
4. Señalar en las cartas de control, los límites de confianza.
5. Establecer la frecuencia de la supervisión de los resultados del control de la calidad. Para esta labor se debe escoger al personal mejor entrenado y capaz de tomar decisiones oportunas.

## **MATERIALES PARA EL CONTROL DE LA CALIDAD**

Los controladores son los materiales fundamentales en los programas de control de la calidad. Este vocablo es más amplio, ya que permite su empleo cuando se trata de sueros o de sangre total preservada para el control de la calidad en hematología.

Los controladores séricos, desde el punto de vista bioquímico, deben parecerse lo más posible al suero humano, para evitar las interferencias que producen las diferencias de matriz que aparecen cuando, en lugar de controladores séricos, se utilizan soluciones acuosas (patrones acuosos) u otros materiales cuyo contenido proteico, por ejemplo, es muy diferente al del suero humano. A pesar de esto, en la actualidad, la preparación de los controladores con suero humano se trata de evitar por razones éticas, y se reserva su uso para cuando es muy necesario, como es el caso de las determinaciones de proteínas con métodos inmunológicos o de isoenzimas. Se recomienda el uso de suero animal de origen

bovino o equino, a pesar de que es necesario realizar ajustes en la concentración de algunos componentes. El uso de suero animal se prefiere también porque para el manipulador no existe riesgo de contagio con agentes infecciosos como el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y la hepatitis.

Una característica muy importante de los controladores es su estabilidad (de 6 meses a 1 año). Con frecuencia los errores originados por deficiencias en el trabajo son atribuidos por el usuario a una supuesta deficiencia de la calidad del controlador. Estos pueden prepararse mezclando los sueros sobrantes de los -pacientes, que se vierten todos los días en un frasco apropiado y se congelan a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Cuando se reúne la cantidad suficiente para garantizar su uso durante 6 a 12 meses, se debe descongelar, mezclar, separar en alícuotas y congelar de nuevo a igual temperatura. En este caso no hay problemas éticos, pues no se ha extraído la sangre con el fin predeterminado de utilizarla como control, aunque se mantiene el peligro de la contaminación del manipulador.

Los controladores líquidos poseen la ventaja de que no tienen que ser reconstituidos con un solvente que, por lo general, se trata de agua destilada o desionizada. Además, pueden contener preservantes como el etilenglicol o el glicerol. Las concentraciones de los componentes pueden aumentarse o disminuirse si se elimina el sobrenadante del frasco, el cual contiene el suero después de descongelado y entonces se añade etilenglicol en mayor o menor cantidad. La forma de presentación más utilizada hoy por las casas comerciales es la liofilizada, por la gran estabilidad que le

confiere a los controladores séricos. Cuando se utiliza esta presentación, hay aspectos que cobran gran importancia y que deben cumplirse de manera estricta por el fabricante y por el usuario:

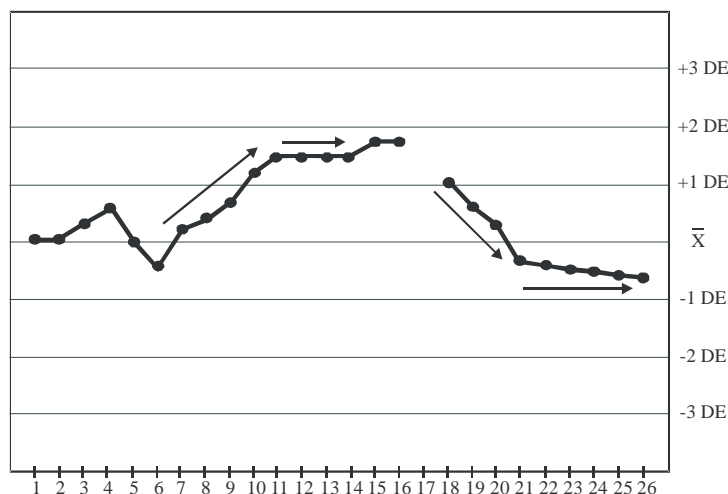
1. El suero debe ser dispensado antes de ser liofilizado.
2. La reconstitución requiere de una exacta medida del solvente (agua) que se va a añadir.
3. Los controladores que se utilizan para el control de la calidad, por lo general se adquieren de firmas comerciales especializadas en estos tipos de materiales.

## CARTAS DE CONTROL

Las cartas de control son los gráficos que permiten la evaluación rápida del comportamiento de cada uno de los componentes. Cualquier cambio en la disposición de los valores alrededor de la media (dispersión, tendencias, desplazamientos) será detectado con facilidad. De esta forma, se tomarán las medidas correspondientes para encontrar la causa de tal variación.

Hay varios tipos de cartas de control. Entre las más utilizadas están las siguientes:

1. Carta de la media de Levey y Jennings (figuras 1.6, 1.7, 1.8 y 1.9).
2. Carta de Shewhart, muy parecida a la anterior, y que puede combinarse con una carta de duplicados.
3. Carta de sumas acumulativas (CUSUM).



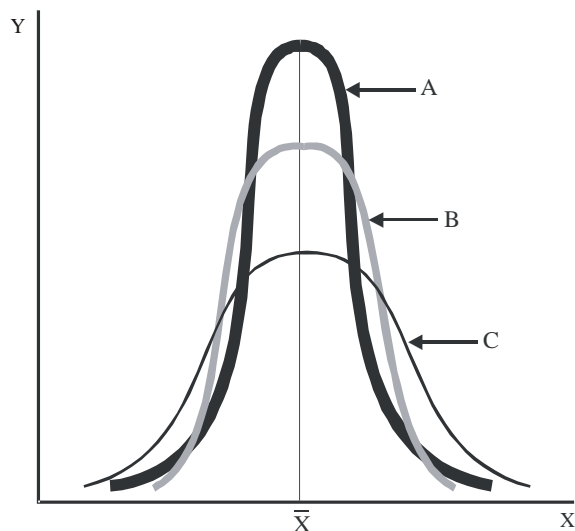
**Figura 1.6** Carta de control que muestra el desplazamiento ascendente, en bloque, y descendente de los resultados.

Por ser la carta de Levey y Jennings la que se introdujo primero (1947) en el laboratorio clínico, y por mantenerse vigente después de tantos años, a continuación se expone su preparación.

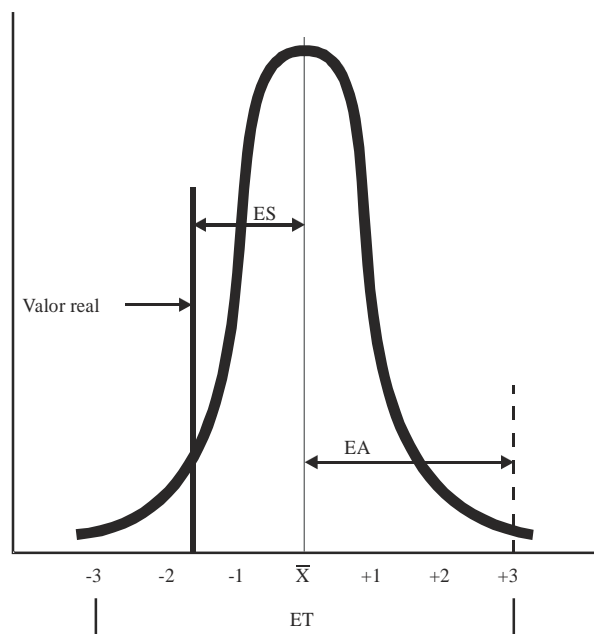
Calcular la  $\bar{X}$ , DE y CV de 20 valores como mínimo, del componente que se va a controlar, utilizando como muestra el controlador designado. Los 20 valores se obtienen realizando una determinación diaria (duplicada) durante 20 días y, una vez reunidos, deben revisarse para detectar si alguno de ellos no corresponde al grupo (diferente al resto de los valores) y entonces eliminarlo mediante la prueba estadística para estos fines. Si se ha tenido la precaución de reunir más de 20 valores, entonces podrá tomarse el valor 21 para sustituir al eliminado.) La figura 1.3 tiene una línea central ( $\bar{X}$ ), tres líneas por encima (+1, +2 y +3 DE) y tres líneas por debajo (-1, -2 y -3 DE). Los límites de confianza, dentro de los cuales se deben mantener los valores para considerarlos bajo control, están dados por  $\bar{X} + 2$  DE y  $\bar{X} - 2$  DE. Siempre que los valores se distribuyan alrededor de la media y no caigan fuera de los límites de confianza, el componente de que se trata puede considerarse controlado, o lo que es igual, no hay

errores aleatorios ni sistemáticos que causen variación en los resultados y estos pueden ser enviados a las salas o a la consulta para que sean valorados por el médico de asistencia.

La decisión de utilizar  $\pm 2$  DE como límites de confianza, se basa en la distribución del área bajo la curva de Gauss, que se conoce como distribución normal. Para los propósitos de las cartas para el control de la calidad en el laboratorio clínico, y como los errores aleatorios se distribuyen de manera normal (distribución *gaussiana*, distribución normal o distribución de Gauss), el área bajo la curva que está entre  $\pm 2$  DE, comprende el 95 % de la población (resultados, en este caso) (figuras 1.6 y 1.7). De esta forma se puede asegurar, con 95 % de probabilidades, que si los valores se mantienen dentro de estos límites, el componente está bajo control, y queda solo el 5 % de las probabilidades para la posibilidad de que no lo esté. Por esto, uno de cada 20 valores, puede caer fuera de los límites y entonces la conducta que se debe seguir es repetir la determinación con el controlador. Si no hay problemas, este segundo valor caerá dentro de los límites; de no ser así, se deben retener los resultados y buscar la causa que ha dado origen a la salida de control.



**Figura 1.7** Distribución de frecuencia con igual  $\bar{X}$  y diferente dispersión de valores.

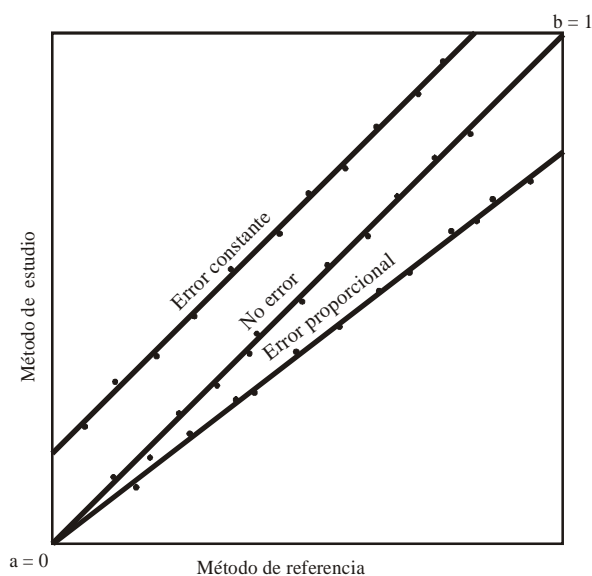


**Figura 1.8** Distribución de frecuencia que muestra el error sistemático (ES) y el error aleatorio (EA).

La carta de la  $\bar{X}$ , no es muy sensible a los cambios en la exactitud del método, pero cuando esto ocurre, y el error sistemático es grande, se aprecian los desplazamientos de los valores por encima o por debajo de la media. Días antes de establecerse el desplazamiento, la observación diaria de la carta de control, por un personal con experiencia, permitirá detectar la tendencia a subir o bajar de los puntos. Estos son los cambios que producen los errores sistemáticos y que constituyen la inexactitud. Los errores aleatorios que dan lugar a la imprecisión, causan la dispersión de los puntos alrededor de la media. Estos ocuparán casi todo el espacio comprendido entre  $\pm 2$  DE, en forma desordenada y pueden ubicarse en el espacio comprendido entre  $\pm 3$  DE.

Después de confeccionadas las cartas de control, se hace necesario tomar algunas medidas organizativas que respaldarán el buen funcionamiento del Programa de Control de la Calidad:

1. Frecuencia en la introducción de los controladores.
2. Cantidad de controladores que se va a introducir en cada corrida.
3. En qué momento deben ser introducidos los controladores.
4. Designar el personal que evaluará los resultados del controlador.
5. Tomar las decisiones pertinentes ante cualquier dificultad, como no liberar los resultados del controlador si no son correctos.



**Figura 1.9** Expresión gráfica de las modalidades de error sistemático.

La introducción de los controladores es diaria, y hay procedimientos técnicos que requieren de una atención especial como la introducción de más de un controlador en cada corrida y de valores diferentes (alto, normal y bajo). Por ejemplo, se deben tomar medidas especiales para los análisis urgentes, pues son determinaciones que se realizan, incluso después del horario laboral establecido, cuando el personal encargado de realizar la supervisión diaria, ya no se encuentra.

Las cartas de control deben permanecer en los puestos de trabajo y constituyen una herramienta muy útil cuando se quiere demostrar, ante una reclamación, que el procedimiento analítico para el componente de que se trata está bajo control.

## ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD EN QUÍMICA CLÍNICA Y EN HEMATOLOGÍA

El aseguramiento de la calidad en las dos secciones más importantes del laboratorio clínico tiene algunas diferencias, relacionadas sobre todo con los materiales de control y su estabilidad. En el caso de la química clínica, los controladores por lo general están constituidos por suero, recolectado en el propio laboratorio u obtenido de alguna casa comercial. En hematología fue necesario, durante años, utilizar como controladores las muestras de pacientes duplicadas (repetibilidad), por la pobre estabilidad de la sangre total. En la actualidad, las casas comerciales ofertan controladores con una estabilidad que alcanza los seis meses, y los laboratorios tienen la posibilidad de prepararlos con lo que se conoce como *sangre preservada*, la cual tiene también una buena estabilidad. Cuando se utilizan analizadores hematológicos, los vendedores de estos equipos ofertan materiales de control, que aunque tienen un precio elevado, permiten controlar las determinaciones que realiza el equipo. En ocasiones, esto se convierte en un inconveniente, pues estos equipos se comportan como controladores y calibradores dependientes.

En el laboratorio de hemostasia, el uso del plasma como principal material biológico para los análisis y la buena estabilidad de este material a  $-20^{\circ}\text{C}$  o por debajo, no crea mayores dificultades.

## EVALUACIÓN EXTERNA DE LA CALIDAD

Los programas de evaluación externa de la calidad tienen como principal objetivo la reducción de la variación de los resultados entre laboratorios de un área geográfica determinada: municipio, provincia, nación y entre países, para lograr de esta forma que los resultados de los análisis realizados en laboratorios separados por pequeñas o grandes distancias, sean comparables entre sí.

Los laboratorios incluidos en estos programas se clasifican como laboratorios participantes, se les asigna una clave para que no puedan ser identificados por el personal que trabaja en el resto de los laboratorios incluidos en este plan y están obligados a informar al centro rector de todo lo relacionado con este tema. En la actualidad existen en el mundo cientos de programas en funcionamiento, lo cual ha permitido avanzar en el logro del objetivo principal.

A este objetivo se unen otros específicos:

1. Suministrar datos para la comparación entre los laboratorios participantes.
2. Informar a terceros acerca del desempeño analítico, por ejemplo, a las autoridades en la atención de salud o cuerpos de acreditación.
3. Mejorar la calidad y cooperar con los participantes en la detección de errores.
4. Complementar los programas de aseguramiento interno de la calidad de los laboratorios participantes.
5. Conocer el “estado del arte” de un componente determinado.
6. Eliminar los métodos imprecisos e inexactos cuyos resultados, en las evaluaciones periódicas, son deficientes cuando se comparan con los de otros laboratorios participantes y que, para el mismo componente, por otro método, se obtienen resultados satisfactorios. En este caso, se sugiere al laboratorio que presenta deficiencias analíticas, que introduzca el método que no cause problemas al resto.
7. Estimular a los laboratorios participantes para que alcancen una calidad analítica superior.

Estos programas están organizados de la forma siguiente:

1. Uso de materiales de control (controladores) estables que soporten las agresiones físicas de la transportación prolongada (semanas) como en el caso de los programas internacionales.
2. Distribución de los controladores por el centro rector a cada uno de los laboratorios participantes.
3. Realización de las determinaciones por cada uno de los laboratorios participantes de acuerdo con el perfil del programa: química clínica, hematología, hemostasia, inmunología, endocrinología, farmacocinética, entre otros.
4. El laboratorio participante debe enviar la relación de sus resultados, al centro rector, en el plazo establecido.
5. Evaluación de los resultados recibidos por el centro rector (cuadro 1.3).
6. Envío del informe evaluativo a cada laboratorio participante. Este puede contener, además de la evaluación (sistema evaluativo que utilice el programa), las sugerencias que ayuden a resolver las dificultades detectadas en la determinación de algunos componentes.

La trayectoria de las muestras y los resultados es la causa de que a estos programas se les llame experimentos circulares.

Por lo general, los programas de evaluación externa de la calidad (PEEC), detectan errores sistemáticos, pues el esquema que se sigue para la evaluación de los resultados de cada laboratorio participante, está basado en la comparación de este valor con otro valor, calculado por el Centro Rector y que se considera como el valor real o verdadero. Como puede apreciarse, este procedimiento coincide con la definición de la exactitud, la cual se ve afectada por los errores sistemáticos (figura 1.10).

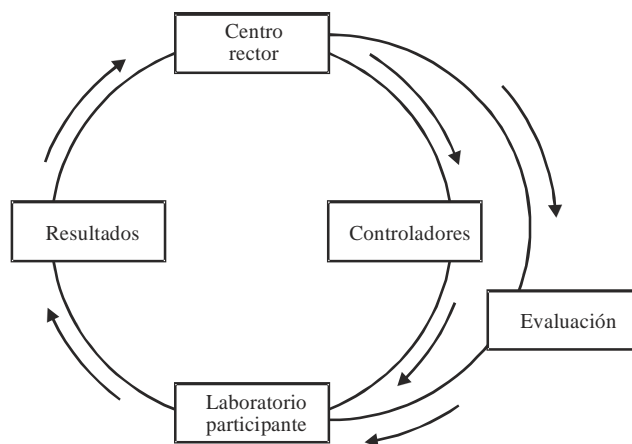
El valor real o verdadero que utiliza el centro rector, es una característica de este programa y puede ser obtenido de dos formas:

1. Mediante un valor asignado, que es la  $\bar{X}$  obtenida para cada componente al realizar un grupo de determinaciones en 4 o 5 laboratorios de elevada confiabilidad.
2. Mediante la  $\bar{X}$  consenso, la cual se calcula para cada componente y método con los datos enviados por cada laboratorio participante.

En algunos programas se obtiene el valor verdadero con una mezcla de las dos variantes señaladas, para evitar que los datos enviados por laboratorios cuya calidad es insuficiente, conduzcan a que laboratorios participantes con la calidad requerida, obtengan resultados deficientes.

Por la importancia que revisten los cálculos estadísticos para la evaluación de los métodos, la

confección de las cartas de control y los programas de aseguramiento de la calidad y evaluación externa de la calidad, se muestran en los cuadros, tablas y figuras.



**Figura 1.10** Esquema organizativo de los programas de evaluación externa de la calidad.

## BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

Niño HV. Garantía de Calidad en el Laboratorio Clínico. Colombia: Panamericana, 1993.

Vázquez de R, Olazábal DA. La Química Clínica en los Laboratorios de Salud. Valencia: Impresos Ciscar, 1991.

## **CONTENIDO**

---

**Introducción/ 35**

**Confirmación de los resultados/ 35**

**Sensibilidad, especificidad y valor predictivo/ 36**

**Informe de los resultados/ 37**

**Tiempo total requerido para la obtención de un resultado/ 38**

**Bibliografía recomendada/ 39**

# PARTE I. GENERALIDADES

## Capítulo 4

### FASE POSANALÍTICA

Dr. Jorge H. Suardíaz Pareras

#### RESUMEN

Se considera fase posanalítica a la etapa en que se confirman los resultados y el laboratorio redacta un informe. En este debe constar la interpretación, por parte del médico de asistencia, de los datos obtenidos, la evaluación del tiempo total que duró la obtención (*turn-around-time*) y la confidencialidad que se mantuvo. Se denomina inesperado un resultado que contradiga la información previa sobre el paciente. Por tanto, debe ser confirmado lo mismo si se encuentra dentro de los intervalos de referencia como fuera de ellos. En cuanto a la correcta interpretación de los resultados, es imprescindible tener en cuenta las unidades en que se expresan y el intervalo de referencia para estas unidades, la sensibilidad y especificidad nosográficas y el valor predictivo del parámetro que se analice. Por último, el tiempo total invertido en la realización de un análisis es un aspecto al cual se le presta cada vez mayor atención y constituye una medida de la eficiencia de un laboratorio.

#### INTRODUCCIÓN

La fase posanalítica incluye la confirmación de los resultados obtenidos en la etapa anterior y la confección de un informe por parte del laboratorio que incluye, entre otros datos, la adecuada interpretación de los resultados por el médico de asistencia, la evaluación del tiempo total invertido en su obtención (*turn-around-time*) y la confidencialidad de esta información.

Para cualquier valoración de los datos en esta etapa, deben tenerse presente las razones que llevaron a indicar y realizar el estudio y las implicaciones de los resultados de este sobre el estado de salud del paciente; es decir, el interés diagnóstico (tanto para confirmar una impresión clínica como para descartar una o varias posibilidades) y su importancia en la toma de decisiones (establecimiento de un pronóstico, selección de un tratamiento, monitoreo de su eficacia o predicción de la respuesta al tratamiento, detección y prevención de complicaciones o ambos). Pero, para ello es preciso asegurarse de que los resultados obtenidos poseen la calidad requerida, independientemente de los cuidados que se hayan tomado durante las dos fases precedentes.

#### CONFIRMACIÓN DE LOS RESULTADOS

Todo resultado no esperado requiere ser confirmado, lo mismo si se encuentra dentro de los intervalos de referencia como fuera de ellos. Se considerará inesperado aquel que esté en contradicción con la información previa que se tiene sobre el paciente (información clínica o referente a los resultados anteriores del parámetro de que se analizó o de otros parámetros relacionados). Un ejemplo extremo es el de un paciente, conocido como afectado por una anemia por eritrocitos falciformes, al que se realiza un control de rutina, en el cual se obtiene una cifra de hemoglobina de 120 g/L; o también el de un paciente con un íctero evidente de piel y mucosas, cuyos niveles séricos de bilirrubina están dentro de valores considerados *normales*. Son también resultados inesperados aquellos que se apartan del intervalo de referencia y que difícilmente pueden ser considerados como compatibles con la vida (valores de potasio sérico con cifras superiores a 7,5 mmol/L, por ejemplo).

Lo antes expuesto permite afirmar que para poder asegurar una adecuada comprobación de los resultados, es necesario:

1. Que al llenar la solicitud, el médico de asistencia incluya al menos un mínimo de datos clínicos.



2. Que el laboratorio lleve un registro de los resultados, con el cual puedan compararse los obtenidos de los pacientes a los que se les realizan investigaciones seriadas.
3. Que los resultados se revisen siempre, por un personal capacitado para ello, antes de ser emitidos.
4. Realizar la confrontación clínica en todos los casos que presenten resultados inesperados. Esto es fácil de realizar, incluso con rapidez, en los pacientes internados o en los que se han realizado análisis de urgencia en el cuerpo de guardia; pero es más engorroso, aunque no imposible, en los pacientes externos.

La confirmación de un resultado implica, en primer lugar, la repetición del análisis de la muestra a partir de la cual se obtuvo. De subsistir alguna duda al respecto, se debe tomar una nueva muestra o emplear otro método, si ello es posible. Además de todas las fuentes de error que han sido analizadas en los dos capítulos anteriores, siempre es importante tener en cuenta la confusión de pacientes. En efecto, es normal que un enfermo internado en el hospital sea cambiado de cama o incluso, de sala. Esto puede conllevar a que los resultados de sus análisis les sean atribuidos de erróneamente a otro paciente; o que cuando ocupe otra cama, le atribuyan los resultados del paciente que la dejó. Todo laboratorio debe disponer de una metodología adecuada que le permita, en caso de duda, poder establecer con seguridad que no existió confusión de este tipo y, si sucedió, que permita resolver la situación.

Es importante señalar que cuando los valores obtenidos a partir de las pruebas realizadas a un paciente se encuentren fuera del intervalo de referencia, no siempre implica que padece una enfermedad (véase en el capítulo 2 lo relacionado con las interferencias). Asimismo, un valor que esté dentro del intervalo de referencia no excluye la posibilidad de que exista una enfermedad (un diabético puede tener cifras de glucosa en sangre dentro del intervalo *normal*, en cualquier momento de su evolución; un paciente contagiado con el VIH puede tener una prueba negativa, si la muestra fue obtenida durante el *período de ventana*). Debe recordarse que el intervalo de referencia es un concepto estadístico, que constituye una guía para la decisión médica, pero con un margen de error que está muy influido por la selección del grupo de población en el cual se estableció. Por ejemplo, si para determinar los intervalos de referencia de hemoglobina sanguínea se emplean solo donantes de bancos de sangre, los resultados estarán muy influidos porque esa población está integrada, en

su mayoría, por hombres, con un rango de edad que oscila entre los 18 y 50 o 55 años (aunque las normas de los bancos de sangre permiten la donación hasta los 60); o si se establece un *valor de corte* para la determinación del nivel de antígeno prostático específico (PSA) en sangre, y se toma una población de varones mayores de 50 años, los resultados estarán influidos porque muchos de los individuos presentan hiperplasia benigna de próstata, que eleva los valores de este antígeno.

Una vez que se ha confirmado que el resultado inesperado es correcto, se debe proceder a ponerlo en conocimiento del médico de asistencia en el menor tiempo posible, mediante la comunicación directa. Si el informe debe ser entregado al paciente o a un familiar, es importante explicarle con claridad, las posibles implicaciones de ese resultado para la salud del paciente y asegurarse de que quien lo reciba ha comprendido la explicación. Ello requiere en todos los casos una evaluación, por parte del profesional del laboratorio, de la capacidad intelectual de la persona que va a recibir la información, pues de su comprensión depende la actitud que va a asumir.

## SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y VALOR PREDICTIVO

En presencia de un resultado cualquiera, sea positivo o negativo, se impone la pregunta acerca de su significación para el diagnóstico y, de manera eventual, del tratamiento. Para valorar la utilidad diagnóstica de un parámetro, tiene una importancia fundamental la determinación de tres de sus características: la sensibilidad y especificidad nosográficas, y el valor predictivo del parámetro de que se trate.

En términos estadísticos, se puede definir la sensibilidad nosográfica como la capacidad que tiene una prueba para poder detectar la enfermedad que se investiga, en todas las personas que la padecen. Es decir, la relación entre los verdaderos positivos y la sumatoria de estos y de los falsos negativos, multiplicada por ciento:

$$\frac{\text{Verdaderos positivos}}{\text{Verdaderos positivos} + \text{Falsos negativos}} \times 100$$

De igual manera, se define la especificidad nosográfica como la capacidad que tiene una prueba para poder detectar la ausencia de la enfermedad que se investiga, en todas las personas que no la padecen. Es decir, será la relación entre los verdaderos

negativos y la sumatoria de estos y de los falsos positivos, multiplicada por ciento:

$$\frac{\text{Verdaderos negativos}}{\text{Verdaderos negativos} + \text{Falsos positivos}} \times 100$$

Por último, el valor predictivo indica la probabilidad de que el sujeto sometido a examen padezca la enfermedad o no la padezca, según sean los resultados positivos o negativos.

El valor predictivo positivo se determina:

$$\frac{\text{Verdaderos positivos}}{\text{Verdaderos positivos} + \text{Falsos positivos}} \times 100$$

El valor predictivo negativo se calcula:

$$\frac{\text{Verdaderos negativos}}{\text{Verdaderos negativos} + \text{Falsos negativos}} \times 100$$

Este parámetro depende de la sensibilidad y la especificidad nosográficas, pero a la vez está muy relacionado con la muestra de población que se analice y la prevalencia que tenga en ella la enfermedad que se investiga. Así, al comparar un determinado parámetro que se estudia en un grupo de riesgo, con los resultados a partir de una muestra de población general, se observa que los valores de sensibilidad y especificidad nosográficas no se diferencian; mientras que el valor predictivo positivo es mucho mayor y el negativo es mucho menor, en el grupo de riesgo.

## INFORME DE LOS RESULTADOS

El informe de los resultados por parte del laboratorio representa la culminación de su trabajo, por tanto, es imprescindible redactar este documento con la precisión y seriedad que merece. Los datos que se incluyen en él deben estar completos y ser expuestos con una claridad que garantice su correcta interpretación. Además, es preciso asegurar que llegue, de manera rápida y segura a las manos del médico que indicó la investigación.

Este documento que recogerá los resultados, debe incluir todos los datos de identificación del paciente: nombre, número de su historia clínica, procedencia, número de registro de entrada de la muestra. También resulta importante la fecha en que fue tomada la muestra y la fecha de emisión del resultado. En el caso de las investigaciones de urgencia, se debe disminuir el tiempo en que es recibida la solicitud, el tiempo en que fue tomada la muestra y el tiempo de entrega del resultado,

con el objetivo de poder evaluar el *turn-around-time* en caso de necesidad (véase más adelante).

Un aspecto decisivo del informe de los resultados, es el de las unidades de medida en que estos se ofrecen, ya que ello puede ser fuente de errores de interpretación, sobre todo al comparar resultados de distintos laboratorios. En la actualidad, tanto la Federación Internacional de Química Clínica (IFCC) como la Asociación Mundial de Sociedades de Patología (WASP), recomiendan el empleo del Sistema Internacional de Unidades (SI), del cual se ofrecen detalles en otro capítulo de este libro. Sin embargo, varios países aún no se han decidido a adoptarlo, mientras que otros lo implantaron hace ya más de un cuarto de siglo. A pesar de ello, incluso en el grupo de los que lo han implantado, subsisten pruebas para las cuales se siguen empleando unidades convencionales: por ejemplo, la mayoría de los laboratorios, al menos en el continente americano, prefieren emplear los milímetros de mercurio, en vez de los kilopascasles (kPa) para los gases en la sangre o las drogas terapéuticas, por lo general expresadas en microgramos o nanogramos por mililitro. Durante mucho tiempo existió también cierta resistencia al empleo del katal para expresar la actividad enzimática, pero en la actualidad se emplea cada vez más la unidad de masa para el informe de las mediciones de enzimas.

Sea cual sea el tipo de unidades empleadas, el informe del laboratorio debe incluir los intervalos de referencia para los parámetros reportados, con el objetivo de evitar confusiones y ayudar a la interpretación de los resultados por parte del médico. Se han diseñado modelos para la presentación de los resultados, encaminados a este fin, que resultan muy prácticos, pues el médico puede percatarse, con solo un vistazo, de que los valores se encuentran fuera del intervalo de referencia.

En ocasiones, algunas pruebas requieren del informe de conclusiones adicionales. Este es un aspecto polémico en muchos casos, pues entre muchos médicos de asistencia suelen rechazarlo, por diversas razones. La tendencia actual es que el resultado de un medulograma, por ejemplo, no suele resultar muy útil para el facultativo, si se limita a informar las características de las células observadas en cada uno de los sistemas, al examen microscópico. Otro tanto puede decirse de determinadas pruebas para el estudio de los trastornos de la hemostasia, o en relación con muchos exámenes para el diagnóstico inmunológico. También en algunos casos puede ayudar a la interpretación, por parte del médico de asistencia, que el laboratorio incluya algunos gráficos (las corridas electroforéticas son un buen ejemplo de ello). Las posibilidades que se abren gracias a la introducción creciente de la inteligencia artificial en el laboratorio clínico, pueden cambiar estos conceptos en los próximos años.

## TIEMPO TOTAL REQUERIDO PARA LA OBTENCIÓN DE UN RESULTADO

Se denomina tiempo total de obtención de un resultado (*turn-around-time*), al tiempo que transcurre desde que el médico confecciona la solicitud de análisis hasta que recibe el informe de los resultados. Es uno de los aspectos más visibles del trabajo del laboratorio clínico, pero solo se tiene en cuenta (y esto genera inconformidad) cuando excede las expectativas de los médicos de asistencia. Este tiempo depende de muchos factores. Entre los más importantes:

1. Que el análisis sea solicitado como urgencia o no.
2. El mecanismo de solicitud.
3. La distancia física entre el paciente y el laboratorio.
4. El muestreo (incluido el transporte de la muestra).
5. Método analítico empleado.
6. Procesamiento de los datos por el laboratorio.
7. Mecanismo de entrega de los resultados.

En cualquier caso, el tiempo total debe ser el más corto posible, pero sin sacrificar la calidad de los resultados, ni incrementar los costos más allá de lo razonable. En este sentido, reviste especial interés poder definir qué se entiende por análisis de urgencia, ya que el abuso de las indicaciones con estas características, sobrecarga el trabajo del laboratorio y conspira contra la calidad y la puntualidad de otras investigaciones que sí requieren de esta urgencia, sin contar con que la obtención de un resultado de urgencia puede resultar hasta tres veces más cara que obtenerlo por la vía de rutina.

Se debe entender por análisis de urgencia, aquel cuyo resultado se requiere con una rapidez considerable para tomar una decisión certera para la salud o la vida de un paciente, es decir, que la conducta que debe seguir el médico, depende de la rapidez con la que este resultado llegue a sus manos. Como ejemplos típicos se pueden citar: la glicemia, en el caso de un diabético con una presunta cetoacidosis; la determinación de mioglobina, de troponina o de la isoenzima MB de la creatinquinasa (CK-MB), en un paciente del que se tengan sospechas de infarto agudo del miocardio, en el cual se precisa iniciar cuanto antes la terapia trombolítica; la dosificación de niveles de digoxina en la sangre, en el caso de una posible intoxicación digitalica, o la determinación del pH y los gases en la sangre en caso de una acidosis severa, en un niño que padece una deshidratación por diarreas profusas.

De manera general, puede decirse que los resultados de una determinación de hemoglobina y del valor o índice hematócrito, de una glicemia, o de una gasometría (pH + gases en sangre) pueden ser necesarios,

en determinadas ocasiones de emergencia, en un plazo de pocos minutos; mientras que un segundo grupo, cuyos resultados pueden requerirse en el espacio de hasta una hora, estará integrado por un número mayor de determinaciones, variable de acuerdo con las circunstancias. En este segundo grupo se incluyen, entre otras, los marcadores de infarto agudo del miocardio, los electrolitos en sangre y la osmolalidad sérica, el examen del líquido cefalorraquídeo, los recuentos de células, con examen de la extensión coloreada de sangre periférica, algunas pruebas para el estudio de los trastornos de la hemostasia, la búsqueda de sustancias tóxicas o drogas de abuso en la orina y la cuantificación de los niveles de algunos medicamentos en la sangre (teofilina o digoxina, por ejemplo).

En estas situaciones se justifica el empleo de métodos menos exactos, en aras de abreviar el tiempo en que los resultados lleguen a las manos del médico; incluso se justifica la comunicación verbal de estos resultados por vía telefónica, sin dejar de hacer llegar luego el informe por escrito. En este último caso, la comunicación verbal debe hacerse al médico que atiende al paciente, o a algún miembro del equipo, si fueran varios los facultativos. Resulta muy peligroso hacer llegar un mensaje verbal a través de terceras personas, por la posibilidad de error en su transmisión oral. La costumbre, muy extendida, de informar los resultados por vía telefónica debe ser sustituida por medios más seguros.

En estudios realizados por el colegio norteamericano de patólogos, se demostró que la forma más eficaz de disminuir el tiempo que media entre la indicación de un análisis a un paciente internado (en especial, en los casos de urgencia) y la llegada de la muestra al laboratorio, es la realización de la flebotomía y del transporte de la muestra por el propio facultativo que la indicó o por la enfermera. Por supuesto, en el caso concreto de las urgencias, la distancia entre el Cuerpo de Guardia o la sala de Terapia Intensiva y el laboratorio, influyó en el tiempo total invertido en esta fase. Existen experiencias muy positivas con el empleo de un sistema de tubos neumáticos empotrados en las paredes, para el envío de las muestras y el recibo de los resultados.

En la actualidad, existe una polémica en torno a la conveniencia de realizar las investigaciones de urgencias en un laboratorio central o en pequeños laboratorios satélites de respuesta rápida, ubicados junto a los lugares que con más frecuencia generan investigaciones de este tipo (*point of care testing*). Los métodos de transporte más eficientes (de los que ya se ha hecho referencia) y la introducción de la automatización

total y de la computación, que pueden generar informes de los resultados y hacerlos llegar al médico de asistencia con la máxima rapidez y seguridad, parecen inclinar la balanza hacia la primera opción. Sin embargo, la realidad actual indica un incremento de los laboratorios satélites descentralizados, dotados de equipos de muy fácil manejo, que pueden ser operados por los médicos o enfermeras y no por el personal del laboratorio, y cuya prontitud de las respuestas es mayor, por lo que en algunos países se están sustituyendo muy rápido los tradicionales laboratorios de urgencias o de cuidados intensivos por los nuevos.

Cuando la conducta médica que se debe seguir no dependa de la rapidez en la obtención del resultado, no está justificado apelar a ella, de modo que se sacrifique (aunque sea de modo mínimo) la calidad. Existen muchas determinaciones de laboratorio cuyos resultados son necesarios en el transcurso del día. Por ejemplo, un paciente que concurre a una consulta de cardiología o de angiología para el seguimiento de un tratamiento ambulatorio con anticoagulantes orales, requiere la evaluación de un tiempo de protrombina que debe ser inmediatamente antes del tratamiento, pero esta prueba puede haberse realizado varias horas antes de la consulta.

En nuestro medio, en cuanto a los análisis llamados *electivos*, es decir, aquellos cuyos resultados no son imprescindibles en el transcurso del mismo día, el mejor sistema para disminuir el tiempo total de obtención de resultados a cifras mínimas, incluye una buena organización de todas las fases del trabajo del laboratorio, unida a la automatización y la computación. Muchos equipos modernos de química clínica ofrecen la posibilidad, de introducir muestras para determinaciones de urgencia sin afectar el procesamiento de las demás. La unión *on-line* de los equipos a la computadora central del laboratorio aporta mayor rapidez y seguridad, y evita los errores de transcripción. Este sistema resulta imprescindible en los laboratorios grandes (los que realizan 50 000 o más investigaciones por mes).

Como medidas generales para incrementar la eficiencia del flujo de trabajo del laboratorio y con ello disminuir a cifras mínimas el tiempo total, se pueden señalar:

1. Identificar los problemas que entorpecen el flujo de trabajo, establecer medidas para mejorarlo y asignar la tarea de controlar a algún miembro del equipo de trabajo la eficiencia en las fases preanalítica y posanalítica.
2. Adecuar la tecnología al flujo de trabajo (empleo de código de barras para la identificación, uso de

estaciones de servicio, de analizadores automáticos, actualización de los programas de computación del sistema de dirección y de los sistemas *on-line*).

3. Adecuar los horarios del personal al flujo de trabajo, de acuerdo con los "picos" de horario en que hay más personas. Redistribuir los puestos de trabajo en busca de una mayor eficiencia.
4. Educar al personal para el cumplimiento de los protocolos de trabajo, del control total de la calidad y para el cambio de la mentalidad, de acuerdo con las nuevas exigencias y los desafíos que imponen las nuevas tecnologías.
5. Reducir los análisis de urgencias al mínimo necesario.

Un aspecto que a menudo no recibe toda la atención que merece, es la confidencialidad. Es importante recordar que un paciente es el único propietario (y administrador) de la información referente a su enfermedad; por lo tanto, esta información solo puede ser comunicada al paciente o al médico de asistencia, quien está obligado, a su vez, a respetar el secreto profesional. Entregar a terceras personas, los resultados de los análisis efectuados a un paciente, sin el consentimiento del interesado, constituye una falta de ética grave, con posibles implicaciones legales. El profesional que dirige un laboratorio, por tanto, debe tomar las medidas organizativas necesarias para garantizar la confidencialidad de los resultados; pero ninguna medida será eficaz si el personal del laboratorio carece de una adecuada formación de valores éticos. El diagnóstico que, de ocultarse, pueda causar daños a terceros o al propio paciente (el VIH positivo, por ejemplo), constituye una situación polémica que debe ser objeto de análisis casuístico por el Comité de Bioética correspondiente.

## BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- Auxter S. Ten ways to improve your laboratory's workflow. CLN. July, 1995:13.
- Burtis CA & Ashwood ER (eds.). Tietz fundamentals of Clinical Chemistry. Philadelphia: WB. Saunders & Co., 1996.
- Castillo De Sánchez ML, Fonseca Llerena ME (eds.). Mejoría continua de la calidad. Guía para los laboratorios de América Latina. México DF:ED. Médica Panamericana, 1994.
- Fishbach FT (ed.). Laboratory and Diagnostic Tests. J. Philadelphia: B. Lippincott & Co., 1992.
- Mayne PD. Clinical Chemistry in Diagnosis and Treatment. 6<sup>th</sup> Ed Boston MA: Little, Brown & Co., 1995.
- Noe DA, Rock RC. Laboratory Medicine: Selection and Interpretation of Clinical Laboratory Studies. Baltimore: Williams and Wilkins, 1994.
- Sacher R, Mc Pherson RA. Widmann's Clinical Interpretation of Laboratory Tests. 10<sup>th</sup> Ed. Philadelphia: FA. Davis Co., 1991.

## **CONTENIDO**

---

### **Introducción/ 41**

### **Fotometría y espectrofotometría de absorción/ 41**

- Principios generales/ 41
- Principios de construcción de equipos/ 42
- Turbidimetría y nefelometría/ 43

### **Espectrometría de emisión y de absorción atómica/ 43**

- Espectrometría de emisión/ 43
- Espectrometría de absorción atómica/ 44

### **Fluorimetría/ 44**

### **Reflectometría/ 44**

- Estructura y principios de funcionamiento de una tira de química seca/ 44
- Principios de funcionamiento del reflectómetro/ 45

### **Equipos de inducción eléctrica/ 45**

- Potenciometría/ 45
- Medición electrométrica del pH/ 45
- Voltametría/ 46
- Coulometría/ 46

### **Osmometría/ 46**

- Osmómetro de punto crioscópico/ 46
- Osmómetro de presión de vapor/ 46

### **Equipos de amplificación y procesamiento de imágenes/ 47**

- Microscopia óptica/ 47
- Microscopia electrónica/ 47

### **Contadores para radioinmunoensayo/ 48**

### **Equipos de fraccionamiento o separación/ 48**

- Electroforesis/ 48
- Cromatografía/ 49
- Centrifugación/ 50

### **Bibliografía recomendada/ 51**

# PARTE I. GENERALIDADES

## Capítulo 5



### ANÁLISIS INSTRUMENTAL

*Dr. Jorge H. Suardíaz Pareras*

#### RESUMEN

**El avance en los métodos de análisis clínicos se debe a la introducción de nuevas tecnologías en el laboratorio médico. En el transcurso del siglo xx fueron diseñados e introducidos con creciente rapidez equipos cada vez más potentes y sofisticados que, sobre todo en los últimos 40 años de la pasada centuria, transformaron de manera radical este trabajo. En el presente capítulo se estudian los principios de construcción y funcionamiento de los equipos más utilizados hoy en el laboratorio clínico, clasificados por grupos, de acuerdo con la función que realizan.**

#### INTRODUCCIÓN

Históricamente, el desarrollo de nuevos métodos analíticos ha dependido de la aparición de una nueva tecnología y de su introducción en el laboratorio clínico. Así, por ejemplo, los primeros métodos desarrollados fueron los gravimétricos, que surgieron al aparecer las primeras balanzas con determinado grado de precisión. Con posterioridad, el empleo de una cristalería calibrada con cuidado hizo posible la aparición y difusión de los métodos volumétricos, que ofrecían más posibilidades desde el punto de vista de su aplicación práctica. La invención del fotómetro, a fines del siglo xix, significó un extraordinario paso de avance al permitir la introducción de métodos basados en la absorción de la luz por una sustancia coloreada (o el grado de dispersión de esta al pasar por una suspensión turbia), con lo cual se hizo posible la cuantificación de sustancias que no podían ser medidas por los métodos ya mencionados, además de resultar menos engorroso. La aparición, en el transcurso del siglo xx, de equipos que permiten la separación muy selectiva de los componentes de una muestra (cromatografía, electroforesis, ultracentrífuga); la introducción de los electrodos para medición electrométrica; de los isótopos radiactivos como herramienta de trabajo; de una cada vez más amplia gama de procedimientos

de inmunoanálisis; el empleo de nuevos y potentes equipos de amplificación y procesamiento de imágenes; la entrada de los analizadores químicos y hematológicos, de la espectrometría de masa y de la resonancia magnética nuclear, así como la automatización de casi todos los procesos del laboratorio (con la excepción de la toma de muestras), son algunos ejemplos del incesante y cada vez más acelerado desarrollo de la tecnología aplicada al diagnóstico clínico.

El objetivo de este capítulo es dar a conocer las características de algunos de los principales equipos empleados para los modernos métodos de análisis de laboratorio. No se incluyen los analizadores automatizados, tanto químicos como hematológicos, que serán tratados en otra sección de este libro.

#### FOTOMETRÍA Y ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN

##### PRINCIPIOS GENERALES

La absorción y emisión de energía en el espectro electromagnético tiene lugar en “paquetes” separados de fotones. Para nuestros fines, conviene representar la energía radiante como una sucesión de ondas. La

longitud de estas permite dividir el espectro electromagnético en regiones, de acuerdo con los cambios en la energía (cuadro 1.4).

**Cuadro 1.4** Espectro electromagnético

Rayos gamma	<0,1 nm
Rayos X	0,1 - 100 nm
Ultravioleta	100 - 400 nm
Visible	400 - 800 nm
Infrarrojo	800 nm - 0,4 mm
Microondas	0,4 mm - 25 cm
Ondas de radio	> 25 cm

La intensidad de poder radiante es proporcional al número de fotones por segundo que son propagados por el rayo. Un rayo que posee la radiación de una longitud de onda determinada, se denomina monocromático; si contiene radiación de varias longitudes, se denomina policromático. Como se puede observar en la tabla presentada antes, la luz visible representa solo una parte muy pequeña del espectro electromagnético.

Cuando un rayo de energía radiante incide sobre una sustancia, puede suceder que:

1. La atraviese casi sin pérdida de energía.
2. La dirección de propagación se altere por reflexión, refracción o difracción.
3. La energía sea absorbida total o parcialmente (transferencia de energía al medio).

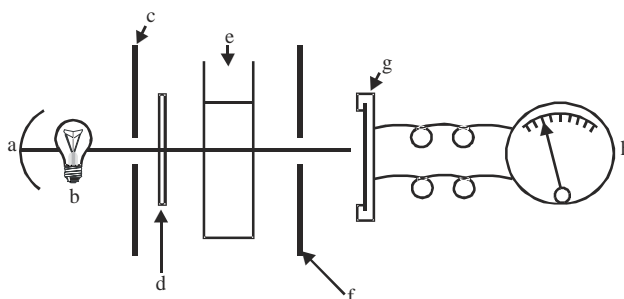
Dos leyes fundamentales rigen la práctica de la fotometría: la ley de Lambert, que establece que la disminución del poder radiante de un rayo de luz monocromática que pasa a través de un medio absorbente, es proporcional al poder radiante del rayo, y la ley de Beer, que establece que la energía radiante de un rayo de luz monocromática disminuye en proporción directa con el incremento de la concentración de la sustancia absorbente. El principio básico de casi todos los métodos basados en la ley de Lambert-Beer, consiste en la comparación de la absorción o la transmitancia de energía radiante (a una longitud de onda determinada, por una solución que se ha de investigar), con uno o varios calibradores (soluciones de la concentración conocida del analito).

## PRINCIPIOS DE CONSTRUCCIÓN DE EQUIPOS

Los componentes básicos de un equipo de medición de absorción, son los siguientes (figura 1.11):

1. Fuente de energía radiante: se emplean lámparas de W, Xe, Hg y de D2 (deuterio).

2. Selector de banda: pueden ser filtros de absorción o de interferencia, prismas o red de difracción.
3. Detector: una fotocelda, un fototubo o un fotomultiplicador, en dependencia del equipo.
4. Elementos asociados: lentes, espejos, diafragmas y cubetas para las muestras.
5. Galvanómetro.



### Leyenda

a: espejo cóncavo, b: lámpara, c: rendija, d: selector de banda, e: cubeta, f: rendija, g: detector, h: galvanómetro.

**Figura 1.11** Componentes básicos de un equipo de medición de absorción de la luz (espectrofotómetro o colorímetro).

La función de la fuente de luz es iluminar con la intensidad requerida. Para trabajar en la zona visible, se emplea la lámpara de W. Para la zona ultravioleta, se utiliza la de D2, mientras que cuando se requieren elevados niveles de iluminación, son necesarias las de arco de Xe o de vapor de Hg. Estas se calientan demasiado y requieren un aislamiento térmico, además, su vida útil es muy corta. Debe prestarse especial atención a este último aspecto pues, una vez que la lámpara ha llegado al término de su vida útil, puede estallar si se pretende continuar empleándola y causar daños irreparables al instrumento.

Los dispositivos para la dispersión de la luz limitan la longitud de onda de la que incide sobre la muestra, a la banda en que se produce la absorción. Los filtros se construyen de gelatina, líquido o cristal coloreados y el ancho de banda seleccionada es de 40 a 50 nm; con los filtros de interferencia (un espaciador dieléctrico transparente colocado entre películas semitransparentes de Ag) se obtienen bandas más estrechas (de 10 a 15 nm). Por su parte, los prismas dispersan la luz policromática según su índice de refracción, y seleccionan una longitud de onda determinada. El poder dispersante de un prisma es proporcional al grosor de su base. La red (o rejilla) consiste en una serie de muescas o canales paralelos, alineados en breves intervalos (hasta 10 000 en 1 cm) sobre una superficie muy pulida (aluminio, por ejemplo), con ello se logra una selección muy clara de la longitud de onda deseada.

El detector es el encargado de transformar la energía radiante en energía eléctrica, que será registrada por el galvanómetro. La fotocelda es una placa de metal sobre la cual se deposita una fina capa de un semiconductor. Este, a su vez, está cubierto con una capa de plata que actúa como electrodo colector; en la interfase se generan los electrones que fluyen hacia el galvanómetro. El fototubo posee un electrodo negativo similar al descrito y un ánodo que lo enmarca, sellados en un tubo al vacío. El más sensible y de más rápida respuesta es el fotomultiplicador, que combina la emisión fotocatódica con la amplificación en cascada de los electrones emitidos.

Se denominan fotocolorímetros, los equipos que emplean filtros para la dispersión de la luz y espectrofotómetros los que poseen para ese fin un prisma o una red de difracción. Los primeros no se utilizan en la zona ultravioleta del espectro. Su fuente de luz es la lámpara de W. El detector es una fotocelda y las cubetas pueden ser de vidrio o plásticas. Los espectrofotómetros por lo general cubren el rayo ultravioleta cercano y por lo tanto requieren, además de la lámpara de W, una de D2 y cubetas de cuarzo (el vidrio y el plástico absorben la radiación ultravioleta). La luz se amplifica con espejos y el detector es un fototubo o un fotomultiplicador. En la actualidad se fabrican equipos de doble rayo, en los cuales la radiación original es separada en dos haces, por medio de una combinación de espejos y rendijas, e incide por separado sobre la muestra y la solución de referencia.

## TURBIDIMETRÍA Y NEFELOMETRÍA

Cuando un rayo de luz golpea una partícula en suspensión, una parte de la luz es reflejada, otra absorbida, otra desviada y el resto es transmitida. La turbidimetría mide la reducción de la intensidad de la luz en su paso a través de una suspensión, a causa de las partículas presentes en esta, y cuantifica la luz residual transmitida. La nefelometría mide la luz desviada en diversos ángulos (entre  $15^\circ$  y  $90^\circ$ ) por las partículas presentes en esta suspensión.

La sensibilidad de la turbidimetría está limitada, en lo fundamental, por la exactitud y sensibilidad del instrumento utilizado para la medición, y depende de la capacidad del detector para registrar pequeños cambios en la intensidad de la luz. Las lecturas realizadas en longitudes de onda bajas, en un espectrofotómetro de buena calidad, permiten obtener buenos resultados.

Para la nefelometría es necesario emplear un equipo con características específicas, que recibe el nombre de nefelómetro. Sus componentes básicos son:

1. Fuente de luz: los modelos más antiguos empleaban la lámpara de W. En la actualidad se usan lámparas de arco de Hg, diodos emisores o láser de helio-neón, de baja potencia.
2. Sistema colimador (innecesario con la lámpara de láser), cuya función es la de concentrar el rayo de luz en haces paralelos.
3. Selector de longitud de onda.
4. Cubeta de medición.
5. Detector (fotomultiplicador).
6. Galvanómetro.

Los primeros equipos de este tipo efectuaban la medición de la luz en un ángulo de  $90^\circ$ , pero hoy se prefiere trabajar con la detección en ángulo más pequeño, lo cual confiere una mayor sensibilidad.

## ESPECTROMETRÍA DE EMISIÓN Y DE ABSORCIÓN ATÓMICA

### ESPECTROMETRÍA DE EMISIÓN

La espectrometría de emisión se basa en la radiación característica emitida por un elemento que se introduce en una llama y en la correlación de la intensidad de esta emisión con la concentración del elemento. La energía térmica absorbida por los átomos lleva a uno o a varios electrones a un nivel orbital superior; al enfriarse y retornar los electrones a su órbita normal, la energía absorbida es liberada en forma de luz, cuya longitud de onda es específica para cada elemento. Es decir, que cada metal, al ser calentado, tiene su propio espectro de emisión. El fotómetro de llama consta, en esencia, de seis partes:

1. Sistema de regulación de entrada de gases.
2. Atomizador.
3. Quemador.
4. Sistema óptico.
5. Detector.
6. Galvanómetro.

El sistema de entrada de gases incluye un compresor para la entrada de aire ambiental y un regulador que controla el flujo del gas empleado como combustible (por lo general una mezcla de butano-propano). La calidad de la llama es un punto crítico. Estos equipos, de amplio uso permiten la determinación de rutina de sodio, potasio y litio (Na, K y Li). Sin embargo, en la actualidad, se han visto desplazados por equipos que



emplean electrodos ion-selectivos, más sencillos de operar y que ofrecen resultados con mayor rapidez.

## ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA

La espectrometría de absorción atómica se basa en la medición de la luz absorbida a la longitud de onda de la línea de resonancia de un elemento, por átomos no excitados de este. A la temperatura de una llama de acetileno, solo una fracción muy pequeña de los átomos es estimulada a realizar emisión por la llama: el 99 % permanece no excitado; por lo tanto, la absorción debida a la transición a un nivel superior de energía es una medida virtualmente absoluta de la concentración del elemento en la llama. Por otra parte, la banda de absorción de energía es muy estrecha y corresponde a la longitud de onda en que el átomo hubiera emitido en estado de excitación.

El esquema general de un espectrofotómetro de absorción atómica (AAS) es el siguiente: una fuente de luz monocromática, representada por un tubo catódico al vacío, que contiene el elemento que se ha de investigar y emite luz en una sola línea de resonancia; un quemador, a través de cuya llama se nebuliza la muestra; un dispositivo monocromador y un fotomultiplicador. En la actualidad, el monocromador es una red de difracción. Con estos equipos se ha logrado realizar determinaciones de oligoelementos como: Mg, Ca, Cu, Zn, Pb, Li, expresadas en partes por billón, gracias a la elevada sensibilidad y especificidad que les son inherentes.

## FLUORIMETRÍA

El fenómeno de la fluorescencia consiste en la propiedad de algunas sustancias de absorber la radiación electromagnética en una longitud de onda (espectro de excitación) y de emitirla de inmediato (en forma de fotones) en otra (espectro de emisión). El espectro de emisión constituye una característica intrínseca de cada sustancia y la intensidad de emisión es proporcional a la concentración de la sustancia. Los equipos para la medición de la fluorescencia se denominan fluorímetros. En general, el patrón de construcción es el siguiente:

1. Lámpara de arco de Hg o Xe.
2. Lente de cuarzo o de vidrio.
3. Rendija.
4. Filtro primario (longitud de onda de excitación).
5. Cubeta para la muestra.
6. Filtro secundario (longitud de onda de emisión).
7. Fotomultiplicador.
8. Galvanómetro.

En línea recta con la lámpara, el filtro primario y la cubeta, se sitúa una superficie de absorción de luz; el detector y el filtro secundario están en una línea que forma un ángulo con la anterior.

## REFLECTOMETRÍA

Vinculado con la llamada química seca (capítulo 6), este método analítico permite medir, por reflexión de la luz en una determinada longitud de onda, los cambios en la intensidad de coloración de una tira. La incorporación de un microprocesador al equipo, permite simplificar en grado sumo e incluso omitir, muchos pasos en el procedimiento operativo y en la calibración. La facilidad de operación de los instrumentos de este tipo, unida al pequeño espacio requerido para el almacenamiento de las tiras reactivas y al hecho de que la calibración del equipo es estable por largo tiempo, hace que este método se considere ideal para ser empleado en la propia consulta del médico, sin necesidad del personal de laboratorio entrenado.

## ESTRUCTURA Y PRINCIPIOS DE FUNCIONAMIENTO DE UNA TIRA DE QUÍMICA SECA

La química seca se basa en la estabilización de los componentes de la reacción necesarios para el análisis (indicadores, enzimas y reactivos auxiliares), por pretratamiento y secado de las respectivas soluciones, en papel de filtro, fijado a su vez sobre una tira de material sintético. Estos dispositivos se emplean desde hace décadas para el análisis cualitativo de muestras de orina, pero en el último cuarto del siglo xx se amplió de manera considerable su uso para la cuantificación de diversos analitos en muestras biológicas, por reflectometría.

Los componentes estructurales de la tira son: un soporte de material sintético, con un código magnético en un extremo; sobre el soporte del material sintético, un material de transporte del plasma; una serie de capas que contienen material separador (por lo general, fibra de vidrio) y reactivos, recubierto todo con una capa protectora. La muestra de sangre es depositada sobre el material separador, que retiene los eritrocitos y permite la difusión del plasma hacia el material de transporte. De aquí, asciende por capilaridad a través de las capas embebidas con los reactivos, en las cuales se lleva a cabo la reacción. Los tiempos de preincubación y de reacción, así como la temperatura necesarios, son controlados por el equipo. Algunos sistemas

poseen dos compartimientos en la tira: uno para la muestra y otro para un calibrador acuoso.

## PRINCIPIOS DE FUNCIONAMIENTO DEL REFLECTÓMETRO

El “corazón” del reflectómetro está constituido por la llamada esfera de Ulbricht, la cual contiene una fuente de emisión de luz en una determinada longitud de onda, constituida en algunos sistemas por un diodo y en otros, por una lámpara de arco de xerón. El rayo emitido incide sobre el área de lectura de la tira y es reflejado por esta. Los detectores comparan la intensidad de la luz emitida por el diodo emisor con la de la luz reflejada. Mientras mayor sea esta última, menor será la concentración del analito. Algunos sistemas solo pueden realizar determinaciones colorimétricas, mientras que otros pueden llevar a cabo análisis enzimáticos. Toda la información que el equipo requiere, está contenida en el código magnético de la tira: identificación del analito, duración de la fase de preincubación y de reacción, longitud de onda requerida, número de mediciones e intervalo entre ellas, cálculo de los resultados y factores de conversión. Algunos de estos sistemas están aptos para realizar hasta cinco ensayos de forma simultánea.

## EQUIPOS DE INDUCCIÓN ELÉCTRICA

La electrometría analítica incluye una amplia gama de técnicas, que se emplean en la medición de la corriente eléctrica generada por la actividad de iones en el interior de una celda electroquímica. La actividad del ion es directamente proporcional a su concentración. Además de su grado de complejidad, la celda está formada por dos o más electrodos que se encuentran en contacto con una o más soluciones, que unen al sistema químico con el sistema eléctrico. Si la celda es capaz de transformar la energía química en energía eléctrica y suministrar esta al exterior, recibe el nombre de galvánica; en este caso, tiene lugar una reacción de oxidación en un electrodo y una de reducción en otro. Si la energía eléctrica es suministrada por una fuente externa, para influir sobre la reacción química, entonces se trata de una celda electrolítica.

## POTENCIOMETRÍA

La potenciometría consiste en la diferencia de potencial entre dos electrodos sumergidos en una solución, bajo condiciones de corriente cero. Uno de

los electrodos es sensible al componente que se pretende medir y responde a los cambios de concentración, a la actividad de este en la solución (electrodo indicador) o a ambos. El otro posee un potencial que es independiente de la composición de la solución y que, por lo tanto, permanece inalterado (electrodo de referencia).

Las principales aplicaciones al trabajo habitual del laboratorio clínico son los equipos medidores de pH (para la preparación de soluciones tampón, por ejemplo), los electrodos para la medición del pH y de la  $p\text{CO}_2$  de los equipos analizadores de gases en sangre y los electrodos ion-selectivo (ISE). En el caso de estos últimos, la respuesta de la celda electroquímica se basa en la interacción entre una membrana selectiva y el analito, que altera el potencial de esta. La selectividad, por lo tanto, depende de la especificidad de la membrana.

## MEDICIÓN ELECTROMÉTRICA DEL pH

**Electrodos.** Con el fin de medir el pH, se han empleado electrodos indicadores de hidrógeno, de quinhidrona, de antimonio y de vidrio. El electrodo de vidrio se compone de un capilar de vidrio sensible a los cambios de pH, incluido en un bulbo del mismo material, pero no sensible y más resistente. Este electrodo se sumerge en la solución que se ha de investigar; la envoltura contiene un tampón con pH conocido, en el cual se ha colocado un alambre (por lo general, de Ag-AgCl) y se encuentra a su vez comunicado con un electrodo de calomel, que es el de referencia (calomel =  $\text{Hg}_2\text{Cl}_2 + \text{KCl}$ ), por medio de un puente salino, casi siempre de KCl o de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . El esquema de un electrodo medidor de pH se muestra en la figura 1.12.

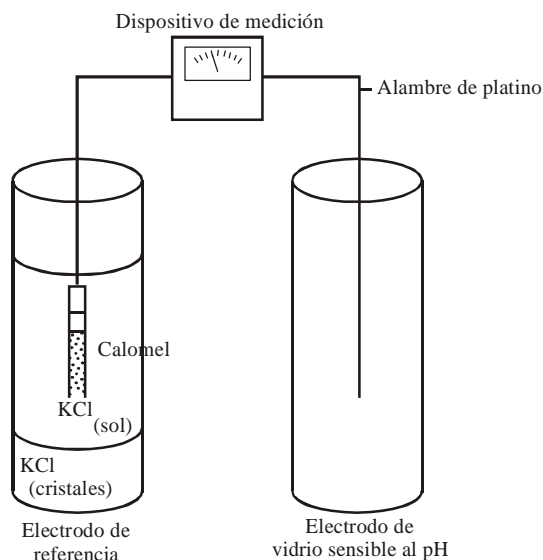


Figura 1.12 Esquema de un electrodo para medir el pH.

**Voltímetro.** El circuito se completa con el dispositivo de medición. La fuerza electromotriz desarrollada por la celda electroquímica es comparada con la del potenciómetro y la diferencia se mide en voltios, convertida y presentada como un valor de pH. En los equipos modernos, esta lectura es digital, tanto en los medidores de pH como en los analizadores de gases en la sangre.

**Electrodo medidor de  $p\text{CO}_2$ .** Está diseñado de acuerdo con el principio de Severinghausen, que combina un electrodo de pH con una membrana selectiva y un espaciador. Este último asegura que haya electrólito entre la membrana y el electrodo, pues el extremo de este es muy suave y tiende a repeler el electrólito; así, actúa como una trampa para retenerlo. La membrana es permeable al  $\text{CO}_2$ , pero impermeable a los iones cargados, como el  $\text{H}^+$ . El  $\text{CO}_2$  disuelto en la muestra difunde a través de ella y causa un cambio de pH en el medio que se encuentra en contacto con la extremidad del electrodo. La lectura de pH se convierte en una cifra de  $p\text{CO}_2$ , y se basa en una relación lineal entre el pH y el logaritmo de la  $p\text{CO}_2$ .

## VOLTAMETRÍA

En la voltametría, un potencial eléctrico es aplicado a una celda electroquímica y se mide la corriente resultante de la reacción. Para ello son necesarios tres electrodos: a los que ya conocemos (indicador y de referencia) se añade uno, llamado auxiliar, que suministra la corriente requerida a un voltaje constante. Esta corriente se aplica al cátodo, en el cual tienen lugar procesos de oxidación y de reducción, mientras que en el ánodo se verifican los mismos procesos de forma inversa. La más importante aplicación en clínica es el electrodo medidor de  $p\text{O}_2$ . Se trata de un electrodo polarográfico, consistente en un cátodo de platino y un ánodo de Ag-AgCl, sumergidos en una solución electrolítica y en cuyo extremo se coloca una membrana de polipropileno. Un voltaje constante es aplicado al cátodo, en el cual el  $\text{O}_2$  es reducido, con consumo de electrones, mientras que en el ánodo se producen electrones libres. La corriente producida será proporcional al número de iones reducidos.

## COULOMETRÍA

La coulometría se basa en la medición de la cantidad de electricidad que pasa a través de una solución durante una reacción electroquímica. El analito que se investiga puede ser oxidado o reducido en uno de los electrodos, o reaccionar, de modo cuantitativo, en la

solución con un solo producto de la electrólisis. En ambos casos, la condición esencial es que tenga lugar una sola reacción. En la práctica, el empleo de la coulometría en el laboratorio clínico, consiste en la aplicación de una corriente eléctrica a un agente titulador. La cantidad de analito presente en la muestra se determina en función del tiempo requerido para la titulación. La concentración molar se mide de manera directa, sin necesidad de un calibrador. En la práctica diaria se emplean tituladores de  $\text{Cl}^-$  y de  $\text{Ca}^+$ .

Los equipos analizadores de gases en sangre, introducidos en la década de los años 50 del siglo xx, utilizan en general los principios antes expuestos. Sus aplicaciones clínicas serán abordadas en otro capítulo de este libro (capítulo 5).

## OSMOMETRÍA

La osmolalidad de una solución depende solo del número de partículas en solución. El tamaño o carga del ion o molécula no afecta la medición. Un osmol de una sustancia, es igual al peso molecular en gramos, dividido por el número de partículas o iones en que se disocia en la solución. Un osmol de soluto por kilogramo de solvente forma una solución osmolal; un osmol por litro de solvente constituye una solución osmolar. La primera es independiente de la temperatura, pero la segunda no; sin embargo, en el caso de los fluidos biológicos de muy baja concentración, la diferencia carece de significación.

## OSMÓMETRO DE PUNTO CRIOSCÓPICO

Cuando a un kilogramo de agua se añade un osmol de soluto, el punto de congelación de esta se deprime en  $1,86^\circ\text{C}$ ; por lo tanto, el grado de depresión del punto de congelación, será directamente proporcional a la concentración de solutos en la solución. Para determinarlo será necesario comparar la muestra con mediciones de punto crioscópico en agua desionizada y en un calibrador de osmolalidad conocida.

Este equipo posee en un sistema de enfriamiento para congelar la muestra y un dispositivo llamado termistor, cuya resistencia eléctrica disminuye a medida que disminuye la temperatura y, en última instancia, es un termómetro eléctrico. La medición es muy exacta y precisa, y la calibración es sencilla.

## OSMÓMETRO DE PRESIÓN DE VAPOR

La depresión del punto de congelación es una propiedad coligada de las soluciones. Otra propiedad

aprovechada para la medición de la osmolalidad es la depresión del vapor de agua, que se basa en el principio de que el vapor presente en la fase gaseosa de un solvente sobre una solución, disminuye en proporción inversa a la osmolalidad de la solución. Un número reducido de moléculas de agua en la fase gaseosa, requiere mayor reducción de la temperatura de condensación para pasar al estado líquido.

Los equipos de este tipo son más simples en su diseño que los anteriores y requieren menor cantidad de muestra; sin embargo, aunque los resultados son muy similares a los obtenidos con el osmómetro de punto de congelación, su precisión es algo menor que la de este y la exactitud se afecta con la lipemia.

## EQUIPOS DE AMPLIFICACIÓN Y PROCESAMIENTO DE IMÁGENES

La obtención y el análisis de imágenes han sido métodos de trabajo del laboratorio clínico desde los orígenes de este. Durante mucho tiempo fue sinónimo de microscopia. Luego, se le unieron la fotografía y la televisión, asociadas a ella, y en la actualidad, la aparición y el rápido desarrollo de la citometría de flujo ha revolucionado este campo y ha abierto posibilidades insospechadas.

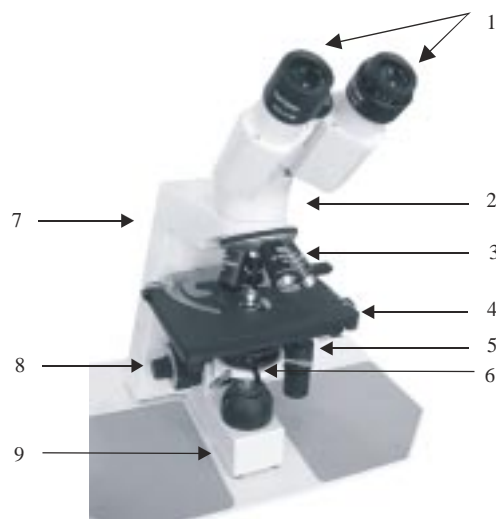
## MICROSCOPIA ÓPTICA

El microscopio de luz consta, en esencia, de dos sistemas de lentes separados (el objetivo y el ocular), un sistema de condensador, una platina y una fuente de luz. El aumento total es igual al cociente de los aumentos obtenidos con cada uno de ambos sistemas de lentes. La imagen que llega al ojo (imagen virtual) se ve invertida.

Se conoce como apertura numérica, la cantidad de luz que entra al objetivo a través del campo microscópico o al condensador, procedente de la fuente de luz; es constante para cada lente y depende del radio y de la longitud focal de la lente. En la práctica deben ser iguales las aperturas numéricas del objetivo y del condensador. Si se coloca aceite entre el objetivo y la preparación, la velocidad de la luz disminuye y se incrementa la apertura numérica.

El poder resolutivo o límite útil de aumento está dado por la capacidad de las lentes, a determinado aumento, de distinguir entre dos objetos separados y revelar detalles finos; es directamente proporcional a la apertura numérica.

Los componentes del microscopio de luz se señalan en la figura 1.13.



### Leyenda

1. Oculares: todos los microscopios modernos son binoculares.
2. Tubo: une ambos sistemas de lentes.
3. Objetivos: por lo general, dos o tres secos y uno de inmersión.
4. Platina con sistema de sujeción para la preparación.
5. Diafragma.
6. Condensador.
7. Brazo: une el sistema de lentes oculares al segmento inferior; siempre debe sujetarse por esta parte para trasladarlo.
8. Tornillos de ajuste grueso y fino.
9. Base.

**Figura 1.13** Componentes del microscopio de luz.

## MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

La longitud de onda asociada al movimiento de los electrones rápidos es 100 000 veces menor que la de las radiaciones luminosas. Como el poder de resolución de los microscopios ópticos es limitado porque la longitud de onda de los rayos luminosos es muy grande, estos se pueden reemplazar por haces de electrones en este tipo de microscopios, capaces de lograr aumentos de 100 000 diámetros. El principio de funcionamiento de ambos difiere poco; las tres diferencias esenciales entre ellos resultan de las características propias de los electrones (partículas negativas), cuyos haces no pueden atravesar el aire y el cristal como lo hace la luz y que no pueden impresionar la retina. Esto se subsana como sigue:

1. En el interior del aparato se practica el vacío, con el fin de que las moléculas de aire no constituyan un obstáculo para los electrones.

2. Las lentes ópticas son sustituidas por lentes electromagnéticas.
3. El haz de electrones, en vez de excitar el ojo por medio de un ocular, forma la imagen en una pantalla fluorescente.

En resumen, los electrones producidos por un cátodo caliente, son concentrados sobre la preparación y luego refractados por un condensador para formar una imagen en la pantalla, la cual puede ser observada por un portillo. Por lo general, se proyecta el haz sobre una emulsión sensible, para obtener fotografías de la imagen. Para que los electrones puedan atravesarlas, las preparaciones deben ser muy tenues; a menudo el espesor es de unos pocos nanómetros.

El esquema estructural del equipo es el siguiente: tubo catódico, condensador, preparación, objetivo, lente intermedia, proyector, cámara de observación, pantalla fluorescente y cámara fotográfica.

## CONTADORES PARA RADIOINMUNOENSAYO

El radioinmunoensayo (RIA) es un sistema de inmunoanálisis (véase el capítulo correspondiente), que utiliza como trazador un isótopo radiactivo, el cual puede emitir radiaciones gamma o beta. Se conforma a partir del principio de unión competitiva, basado a su vez en la ley de acción de masas (descripción matemática de reacciones reversibles que logran un equilibrio).

La liberación de energía durante la transformación de un átomo inestable en uno más estable, se conoce con el nombre de radiación. La estabilidad está determinada por el número y ordenamiento de los protones y neutrones en el núcleo de un átomo. Los núcleos inestables se transforman en estables mediante un proceso de desintegración que recibe el nombre de radiactividad. La cantidad de energía liberada con cada desintegración es fija y la mayor parte de esta (si no toda) aparece como la energía cinética de las partículas o fotones emitidos. La unidad básica de energía usada en la medición de radiación es el electrón volt (eV), definido como la cantidad de energía adquirida por un electrón cuando es acelerado por un potencial eléctrico de un voltio. La radiactividad es medida en Curies (Ci) que es la actividad de un gramo de Ra 226. En el laboratorio médico, las cantidades de radiación usadas están por lo general en el rango de nanocuries a microcuries. En la actualidad, se tiende a expresar la radiactividad en Becquerels (Bq):  $1 \mu\text{Ci} = 3,7 \times 10,4 \text{ Bq}$ .

La desintegración de un átomo radiactivo es acompañada por la eyección de una partícula de alta velocidad, que produce cambios en la materia a través de la cual atraviesa. Por ejemplo, si se trata de un gas, su paso es mostrado por un rastro de átomos de gas ionizados, cuyos electrones exteriores han sido disturbados. Este tipo de detector es un recipiente sellado que contiene aire, hidrógeno, helio, neón o argón. La diferencia de potencial entre dos electrodos genera la ionización y los electrones libres migran hacia el electrodo positivo, mientras que las moléculas de gas cargadas positivamente migran hacia el negativo, lo que da como resultado un flujo de corriente, que es directamente proporcional al número de pares iónicos formados y por tanto a la cantidad de energía depositada en el gas. En cambio, si las partículas radiactivas chocan con un cristal de ioduro de sodio que contiene una pequeña cantidad de talio como activador, se produce un relámpago de luz, por emisión de fotones en la región visible o en el ultravioleta cercano, del espectro electromagnético. Esta emisión de luz es registrada y amplificada por un fotomultiplicador. Cada relámpago de luz hace funcionar un dispositivo contador. Este proceso se denomina *centelleo*. Ambos fenómenos se emplean en la construcción de equipos. La cantidad de radiactividad es medida como recuentos por minuto (CPM).

## EQUIPOS DE FRACCIONAMIENTO O SEPARACIÓN

Los métodos de fraccionamiento se emplean cada vez con mayor amplitud en el Laboratorio Clínico, tanto en el trabajo asistencial como en la investigación. En general, se aprovechan determinados fenómenos físicos para separar distintos componentes presentes en las muestras: la migración en un campo eléctrico, en el caso de la electroforesis; la adsorción o diferencia de afinidad, en el caso de la cromatografía; y la fuerza de la gravedad, en el de la centrifugación.

## ELECTROFORESIS

Se entiende por electroforesis, la migración de una partícula cargada, en un medio a través del cual circula una fuerza electromotriz. En el caso de las proteínas, es necesario tener en cuenta el pH del medio, pues a determinado valor de este, no tiene lugar la migración. Este valor de pH recibe el nombre de punto isoeléctrico y varía de una proteína a otra. La intensidad de la fuerza electromotriz es otro factor crítico a tener en cuenta; la

corriente debe ser directa (no alterna) y se puede trabajar a un voltaje o amperaje constantes. El equipo empleado para lograr la conversión de corriente alterna en corriente continua tiene como elementos fundamentales un rectificador de germanio o selenio, un miliamperímetro, un reóstato transformador y una impedancia, y recibe el nombre de fuente rectificadora o fuente de poder. El factor tiempo, es decir, la duración de la corrida electroforética se estandariza en dependencia de la técnica y del equipo empleado.

La electroforesis que más se emplea en el laboratorio clínico (conocida como electroforesis de zona) tiene lugar en una cubeta que contiene una solución tampón, y se emplean diversos soportes como el papel de filtro, el acetato de celulosa, los geles de agar, de almidón y de poliacrilamida. El papel de filtro fue en otros tiempos el más difundido, pero se reveló insuficiente para un fraccionamiento más fino del conglomerado proteico, por lo que debió ser sustituido por sistemas físico-químicos como los geles, que actúan como filtros moleculares. Además, la migración en papel se encuentra sometida a factores tales como: evaporación, capilaridad, electroósmosis, acción del potencial, trama y calidad del papel. Casi todos estos factores se obvian con el empleo del acetato de celulosa, mientras que los geles permiten lograr fraccionamientos con una excelente resolución y separación en un tiempo muy corto, además del ya mencionado efecto de tamiz molecular. La electroforesis en gel de poliacrilamida permite aumentar el fraccionamiento de mezclas proteicas y combinar el fenómeno de la migración con el de ultrafiltración molecular, al poder obtener geles sintéticos con trama de poro efectivo que puede ser ajustada a voluntad. La corrida se efectúa en tubos o placas de gel, ubicados de manera vertical. La muestra se introduce en la zona de poro grande, se concentra en la zona intermedia y se separa en la zona de poro fino, por la acción del tamiz molecular. En la preparación de la solución tampón, se diferencian un ion rápido (con movilidad mayor que la de cualquier proteína) y un ion de arrastre (con movilidad inferior a cualquiera de estas); con ello se logra un gradiente de voltaje y uno de pH.

La valoración de la intensidad de color sobre la tira del proteinograma, sin destrucción de este, se logra empleando el densitómetro, que mide por transparencia o por reflexión la intensidad de la zona coloreada. El aparato está constituido por una fotocelda a la que llega un haz de luz proveniente de una fuente luminosa, la cual es delimitada antes por un colimador. Su paso a través

de la tira determina la absorción de luz en relación proporcional con la cantidad de colorante fijado a la proteína, lo cual se expresa de manera gráfica en una curva.

En la actualidad, se cuenta con densitómetros de rayos láser, acoplados a microprocesadores o a una computadora con programas de aplicación específicos.

## CROMATOGRAFÍA

En 1903, el botánico ruso Tswett logró separar los pigmentos de plantas, empleando una columna de vidrio rellena con carbonato de cal y fluyendo los pigmentos ya separados con éter de petróleo. El procedimiento recibió el nombre de cromatografía y se define como un método físico de separación de los componentes de una mezcla, en el que las sustancias que se van a separar se distribuyen entre dos fases: una móvil (líquida o gaseosa) y una estacionaria (sólida o líquida) de acuerdo con un proceso de equilibrio. Uno de los componentes de la mezcla se retiene con más fuerza por la fase estacionaria que los otros, y se desplaza, por tanto, con más lentitud; es decir, la separación se lleva a cabo por la diferencia entre los distintos tiempos de retención en el lecho cromatográfico.

La fase móvil es una corriente líquida o gaseosa que fluye, de modo continuo, a través de la fase estacionaria, que permanece fija durante el proceso y que puede aplicarse en forma de placa o lámina (cromatografía planar), o utilizarse para rellenar una columna de plástico, vidrio o metal (cromatografía de columna). En este último caso, puede emplearse un adsorbente poroso (cromatografía de adsorción) o un gel con determinada distribución de poro (cromatografía de afinidad), partículas sólidas activadas o inertes, recubiertas de residuos polihidrocarbonados (fase reversa) o de grupos iónicos (intercambio iónico). Estas tres últimas variantes reciben, en conjunto, el nombre de cromatografía de reparto.

**Cromatografía planar.** Tiene dos modalidades, la de capa fina (aparecida en 1930) y la de papel (1944). En ambas, la fase estacionaria es una lámina más o menos delgada, a través de la cual la fase móvil se mueve y asciende por capilaridad. En el caso de la capa fina (TLC), se trata de una película de silica gel, que se aplica sobre una placa de vidrio; en cuanto a la otra variante, se trata de un papel de filtro de tipo cromatográfico. La muestra se “siembra” a escasa distancia del borde inferior de la lámina y se deja arrastrar por el flujo ascendente de la fase móvil. Cuando termina la corrida, se deja secar y se efectúa el revelado.

Tiene como ventajas la sencillez, rapidez y economía (exige muy pocos recursos), pero es un método cualitativo o semicuantitativo.

**Cromatografía gas-líquido (GLC).** La fase móvil es un gas, que se hace llegar al equipo mediante una tubería de acero, cobre o teflón y cuya presión de entrada se controla con un regulador. La fase estacionaria es líquida a la temperatura de trabajo y la columna que la contiene se encuentra situada en un horno que permite trabajar a elevadas temperaturas (120 °C o más). La muestra se inyecta en una cámara, la cual se calienta, denominada inyector y tiene como función vaporizarla, para que sus componentes sean arrastrados por el gas portador, por lo general es nitrógeno, argón o helio. Después de efectuada la separación en la columna, la muestra pasa por un detector, cuyo funcionamiento se basa en la respuesta a una determinada propiedad del soluto, de manera tal que emite una señal eléctrica, la cual puede ser amplificada, registrada o digitalizada; esto permite la identificación de los componentes de la muestra. La sensibilidad del método está dada por la relación entre la señal obtenida y la magnitud de la propiedad física que se va a controlar. Los resultados son procesados por un integrador-registrador o una computadora acoplada al equipo.

A su especificidad, este método une la sensibilidad, muy elevada en dependencia del detector; pero es caro, engorroso y consume tiempo. La cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masa es el método normado por el Comité Olímpico Internacional (COI) para confirmar los casos de dopaje de atletas; tiene también un amplio uso en toxicología.

**Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).** La fase móvil es un líquido, que circula por un sistema cerrado, impulsado por una bomba de alta presión (a menudo es 10, 20 o 30 MPa). La separación de los componentes de la muestra se lleva a cabo en una columna, cuyas características son similares a las ya descritas en los principios generales, salvo en la forma de empaquetamiento del relleno y en el tamaño, que por lo general no excede los 25 cm. La identificación de los componentes separados se efectúa por medio de un detector, que emite una señal eléctrica hacia un integrador-registrador. Este método es más

versátil que la GLC, aunque similar en sus ventajas y desventajas.

## CENTRIFUGACIÓN

La centrífuga es un instrumento empleado para separar componentes de una suspensión, aplicando la fuerza gravitacional incrementada por rotación rápida de la muestra (fuerza centrífuga). El esquema de construcción es sencillo: un motor que hace girar un eje al cual se fijan los brazos en número variable; en el extremo de estos brazos se encuentran los cabezales que soportan a los portatubos. La centrífuga puede ser de cabezal fijo (formando un ángulo con el brazo) o de cabezal colgante, que al girar hace que el tubo quede horizontal en relación con este. En general, el sistema de cabezal fijo alcanza mayor velocidad de rotación, la cual se mide en revoluciones por minuto (rpm).

La velocidad de la centrífuga debe ser controlada con una frecuencia trimestral, al igual que el tiempo, pues constituye un índice de deterioro del equipo, además de que puede ser una fuente de error. Para este control, se emplea un tacómetro eléctrico o uno de agua (menos preciso).

Es imprescindible para la prolongación de la vida útil del equipo, balancear los tubos que se colocan en su interior. Algunos modelos modernos están programados para no funcionar si existe un mínimo desbalance.

**Determinación de la fuerza centrífuga relativa (FCR).** Los parámetros que se deben tener en cuenta para centrifugar una muestra son la velocidad y el tiempo de duración del proceso. Resulta más objetivo hablar de fuerza centrífuga relativa, porque existen muchos modelos y tamaños distintos en el mercado. La ecuación para obtenerla es:

$$FCR = (1,118 \times 10^{-5})(\text{rpm})^2 r$$

donde  $1,118 \times 10^{-5}$  es una constante y  $r$  es la distancia en centímetros, desde el eje hasta la mitad del tubo en posición de giro.

Existe una amplia variedad de modelos de centrífugas de uso común. Se utilizan mucho para la separación del suero o del plasma de los elementos formes de la sangre y para cualquier otro tipo de separación preparativa. En los bancos de sangre se

emplean modelos mayores, siempre refrigerados, que alcanzan velocidades superiores. Otro grupo, de uso cada vez más frecuente, está formado por las microcentrífugas modelos de mesa, que alcanzan velocidades hasta de 12 000 o 15 000 rpm, y se emplean para realizar microhematócritos, por ejemplo.

Las ultracentrífugas se utilizan sobre todo para la investigación (la clasificación de las lipoproteínas en HDL, LDL y VLDL, se estableció por este método), así como en los laboratorios de genética. Alcanzan velocidades de cientos de miles de rpm. Se trata de equipos muy costosos, que requieren condiciones especiales de trabajo, un local adecuado y un sistema de enfriamiento apropiado.

## BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- Andrews AT. Electrophoresis: theory, techniques and biochemical and technical applications. 2<sup>nd</sup> ed. London: Oxford Univ. Press, 1986.
- Burtiss CA Ashwood ER. (eds.). Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. Philadelphia: W. B. Saunders Co., 1996.
- Kaplan LA, Pesce AJ, (eds.). Clinical chemistry: theory, analysis and correlation. 2<sup>nd</sup> ed. St. Louis: CV. Mosby, 1989.
- Schoeff LE, Williams RH. Principles of laboratory instruments. St. Louis: Mosby, 1993.
- Siggard-Andersen O. The acid-base status of the blood, 4<sup>th</sup> ed. Baltimore: William & Wilkins, 1974.
- Skoog DA, West DM. Principles of instrumental analysis. New York: Holt. Rinehart & Winston, 1971.
- Wiley J. Practical High Performance Liquid Chromatography. V. Meyer, (ed). University of Bern, 1996.



## **CONTENIDO**

---

**Introducción/ 53**

**Analizadores químicos/ 53**

**Química seca/ 55**

**Analizadores hematológicos/ 56**

**Otras aplicaciones de la citometría de flujo/ 58**

**Automatización en hemostasia/ 58**

**Ensayos inmunológicos/ 59**

**Bibliografía recomendada/ 59**

## Capítulo 6



### AUTOMATIZACIÓN DEL LABORATORIO CLÍNICO

*Dr. Celso Cruz Rodríguez*

#### RESUMEN

La automatización del laboratorio médico en los últimos veinte años del siglo xx puede calificarse de explosiva. Las nuevas aplicaciones de técnicas ya conocidas, la incorporación de la informática, la robótica, la biotecnología, la tecnología de los biosensores y la resonancia magnética nuclear han invadido todos los campos diagnósticos que conforman el actual laboratorio clínico multidisciplinario. Por citar solo un ejemplo, los analizadores, en cualquiera de sus variantes y diseños, han llevado los valores de precisión y exactitud a límites que jamás habrían sido alcanzados si se trabajara sin este desarrollo tecnológico. A esto se une el aumento de la productividad y la disminución, a corto y mediano plazo, de los costos.

#### INTRODUCCIÓN

La automatización en el laboratorio clínico se refiere a los procesos analíticos que son realizados por equipos, con la menor participación posible del ser humano.

Muchas tecnologías desarrolladas en los últimos 30 años del siglo xx tuvieron como resultado la aparición de una generación de sistemas analíticos en los cuales el instrumento, su funcionamiento y los reactivos constituyen una unidad funcional. Las operaciones realizadas por los analistas pasaron a ser ejecutadas por el sistema. Este desarrollo tecnológico en el campo del diagnóstico por parte del laboratorio clínico tiene en la actualidad más fuerza que nunca y tendrá que ser enfrentado por todos los profesionales de esta especialidad, quienes tienen la responsabilidad de prepararse para ello.

#### ANALIZADORES QUÍMICOS

La historia de la automatización en los laboratorios comenzó en los primeros años de la década del 50 del siglo xx, cuando Leonard Skeggs, bioquímico de la Western Reserve University en Cleveland, Ohio, se dio a la tarea de encontrar una solución al aumento en la carga de trabajo, unida a la escasez de personal calificado,

que tuvo que enfrentar los laboratorios. Las causas de tal aumento fueron las siguientes:

1. Aumento de la población después de la II Guerra Mundial.
2. Nuevas tecnologías de la era espacial.
3. Expansión de los programas de construcción de hospitales de gran tamaño: con más de 1 000 camas.
4. Disposición de un mayor número de pruebas diagnósticas.

Después de algunos años de intenso trabajo, Skeggs logró alcanzar la meta que se había propuesto y presentó su protocolo a varias compañías. La producción comenzó en el año 1954. Había surgido el primer analizador y tenía el mérito de ser un producto de origen químico-clínico, no había sido tomado de ninguna otra disciplina. Sin estos equipos no hubiera sido posible, ni imaginarse siquiera, enfrentar la carga de trabajo de los laboratorios actuales, obligados a prestar servicio en hospitales de 1 000 camas o más y a atender también a los pacientes ambulatorios de territorios extensos.

Los primeros analizadores que aparecieron en el mercado fueron los de flujo continuo. Estos se mantuvieron durante muchos años como únicos representantes de los nacientes analizadores y ayudaron a resolver, en parte, los problemas originados por

el exceso de trabajo. En este tipo de analizador, las muestras se desplazaban una detrás de la otra, separadas por burbujas de aire en el interior de pequeñas mangueras flexibles ( $\pm 3$  mm de diámetro). Durante su recorrido, las proteínas presentes se eliminaban (diálisis) y también era posible la incubación, al pasar las mangueras por baño de María con la temperatura requerida. Los analizadores continuos alcanzaron una gran capacidad de procesamiento de muestras (750 muestras/h) y eran capaces de realizarle a cada muestra más de 15 determinaciones. A pesar de haber constituido un importante paso de avance, este tipo de analizador tenía algunos inconvenientes que condujeron a que no se continuara su fabricación. Entre ellos:

1. Arrastre: se trata de la contaminación que produce una muestra con valor elevado de un componente, sobre la que le sigue. Una muestra hiperglicémica contamina a la siguiente normoglicémica. Esto ocurría para todos los componentes que se determinaban en el analizador.
2. Selectividad: un analizador es selectivo cuando el operador tiene la posibilidad de programarle al equipo qué análisis debe realizar a cada una de las muestras. Estos equipos carecían de selectividad.
3. Cinética enzimática: las determinaciones enzimáticas requieren una o más lecturas fotométricas en períodos determinados. Estos analizadores no eran capaces de realizar este tipo de reacción.

A estos inconvenientes se suman los frecuentes desperfectos mecánicos de las bombas peristálticas que le imprimen movimiento a las muestras en el interior de las mangueras.

Años más tarde (1975), apareció en el mercado una versión más depurada de los analizadores químicos. Conocidos como analizadores discontinuos y discretos, desde el punto de vista metodológico imitan las etapas de los análisis que eran realizados de forma manual. Por ejemplo, la pipeta de muestras aspira la cantidad de muestra requerida tantas veces como determinaciones tenga indicadas el paciente, y la deposita en cubetas de reacción independientes. Ninguna muestra entra en contacto con la siguiente y esto los identifica como analizadores discretos. Son discontinuos porque las muestras y reactivos no viajan uno detrás de los otros por el interior de las mangueras.

A estas características se suman las siguientes:

1. No existe arrastre (muestras y reactivos independientes).
2. Son selectivos: el operador programa los análisis que se le hacen a cada muestra (paciente), por medio del teclado de una computadora.
3. Los desperfectos mecánicos no son frecuentes.

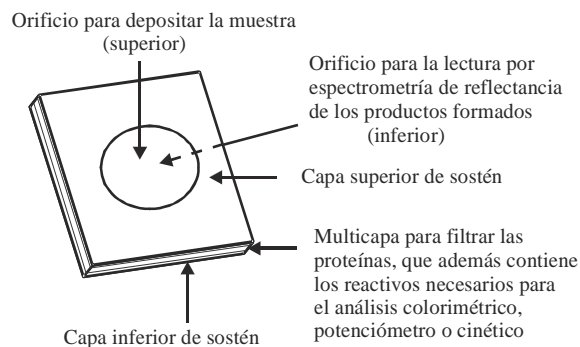
Por la importancia que tiene la selectividad en los analizadores químicos, es necesario detenerse en esta propiedad.

Los analizadores de flujo continuo, por razones de diseño, impedían que el usuario pudiera seleccionar los análisis que se le iban a realizar a cada muestra. Esto originó serios problemas de carácter ético y económicos. Como el equipo le realizaba a todas las muestras el total de análisis que tenía diseñados (canales), a todos los pacientes se les realizaban determinaciones que no habían sido indicadas por el médico de asistencia y que carecían de interés clínico en muchos pacientes. Ello trajo como consecuencia:

1. La creación de los perfiles de análisis no justificados, pues obedecían a exigencias del analizador y no tenían en cuenta el interés clínico-diagnóstico.
2. Diagnósticos que no obedecían a un cuadro clínico, sino al valor elevado de un componente que no era de interés clínico en ese paciente, pero que solo por estar elevado obligaba a averiguar la causa de esa elevación.
3. La elevación de los costos por el gasto que implicaba el empleo de reactivos costosos en determinaciones que no eran necesarias.
4. La prolongación del estadió hospitalario.

Los analizadores químicos –discontinuos y discretos– utilizan reactivos líquidos que se colocan en un área determinada, por lo general refrigerada (de 4 a 8 °C) y envasados en frascos de polietileno suministrados por el fabricante. A esto se refiere cuando se dice que el analizador utiliza el sistema de química húmeda (*wet chemistry*) para diferenciarse de otro grupo de analizadores que utilizan la química seca (*dry chemistry*). En los primeros, los reactivos en estado líquido se vierten sobre las muestras; en los segundos, la muestra se vierte sobre un

soporte constituido por varias capas fotográficas (de 3 a 6), impregnadas de reactivos (figura 1.14).



**Figura 1.14** Partes que componen la placa fotográfica múltiple de un analizador que utiliza el principio de la química seca (*dry chemistry*).

## QUÍMICA SECA

La química seca tiene entre sus ventajas la de no emplear reactivos químicos líquidos. Esto facilita la eliminación de desechos y, por tanto, la contaminación es mínima. Esta característica fue la que impulsó, hace décadas, el uso de las tiras reactivas, tanto por el médico en el consultorio como por el propio paciente en su casa, para determinar la glucosa en sangre y orina, lo cual ha contribuido al buen control de la glicemia en los pacientes diabéticos. Más tarde aparecieron los glucosímetros, que sustituyeron la lectura visual por la reflectometría. En la actualidad se encuentran en el mercado múltiples aplicaciones de la química seca que van desde las pruebas de embarazo hasta la detección de marcadores tumorales como el antígeno prostático específico (PSA).

Se sugiere al lector que vea el tema de reflectometría, en el acápite de Análisis Instrumental. Se hace referencia a las nuevas tecnologías que se usan en química clínica y que han repercutido de manera positiva en el desarrollo de esta especialidad diagnóstica. Más adelante, en este capítulo y en capítulos posteriores, se expone cómo estas tecnologías han penetrado el resto de los campos diagnósticos del laboratorio como: hematología, hemostasia, inmunología, endocrinología, nefrología, oncología y farmacocinética. Los resultados son muy importantes: aumento de la calidad y disminución de los

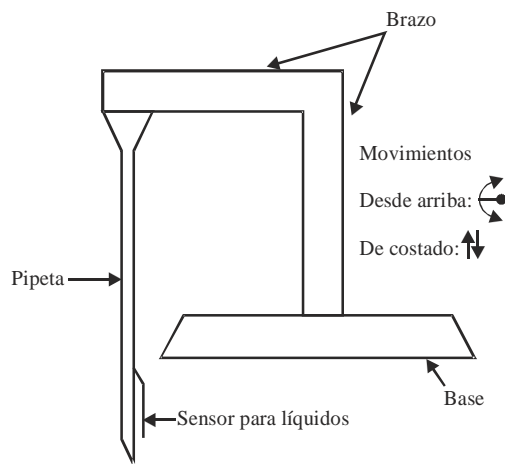
costos. El acortamiento en los tiempos de entrega de los resultados (*turn-around-time*) y la fusión de tales equipos automáticos, ha tenido también repercusiones muy importantes en la atención médica.

Algunas definiciones nuevas comienzan a aparecer en la literatura especializada. Tal es el caso de la quimiohematología, como se denomina a la fusión de los analizadores químicos con los hematológicos, y a los que ya aparecen unidos en el mercado, los inmunológicos.

La versatilidad del equipamiento automático se debe en gran medida al desarrollo de la informática y de otras tecnologías:

1. Aplicaciones de diferentes medidas para el aseguramiento de la calidad.
2. Uso de métodos fotométricos, fluorimétricos, quimioluminiscentes, electroquímicos y de la fotometría de reflectancia.
3. La posibilidad de incorporar la inteligencia artificial y, por esta vía, brindar información sobre el funcionamiento del equipo: capaz de seleccionar los resultados y de transferirlos a una red de procesadores, para que estén a la disposición de los médicos de cada una de las estaciones terminales cercanas o distantes.
4. Los microprocesadores que, entre sus múltiples funciones, le permiten al equipo la adquisición de datos, su organización y exposición al operador en la pantalla (monitor o *display*), así como interactuar con él por medio del teclado.  
Estos equipos (es decir, los microprocesadores) marcaron el cambio de la mecanización en automatización y permitieron compactar los equipos al sustituir válvulas, interruptores y cronómetros con el programa de computación (*software*).
5. Aplicación de los métodos matemáticos y estadísticos (quimiometría) a las determinaciones químicas.
6. Uso de los sensores que responden a los estímulos físicos con un impulso y que pueden ser electroquímicos y ópticos.
7. Uso del código de barras para la identificación única de muestras y pacientes.
8. Aplicación de la robótica, que consiste en el uso de robots durante el transcurso de procesos, transportación, manipulación individual de las muestras y mezclas de reacción. Aunque los robots son más

lentos que el ser humano, son capaces de trabajar durante 24 horas sin detenerse. Un sencillo ejemplo lo constituye el brazo que sujeta a la pipeta de muestras de un analizador químico (figura 1.15).



**Figura 1.15** Movimiento del brazo que sostiene la pipeta de muestra de un analizador químico.

Ya es una realidad que la robótica aumentará la eficiencia de los laboratorios y liberará de tareas rutinarias a los profesionales que laboran en él; entonces estos podrán dedicarse al desarrollo de métodos e investigaciones, así como interactuar con el resto de los profesionales del hospital.

## ANALIZADORES HEMATOLÓGICOS

Los avances mencionados se aplican también a los analizadores o complejos hematológicos, los cuales se diferencian de los químicos por la singularidad de algunas técnicas hematológicas. Los primeros equipos que aparecieron en el mercado hace más de 4 décadas, solo eran capaces de realizar recuentos celulares (eritrocitos y leucocitos). Para ello utilizaban un principio descubierto por la firma norteamericana Coulter (apertura-impedancia), en el que se basó toda una generación de estos analizadores. Durante años, los principios utilizados se fueron perfeccionando para sumar a la etapa de los recuentos globales, la de la identificación de los tipos celulares o recuentos diferenciales. Los sistemas patrones de reconocimiento que se crearon fueron los siguientes:

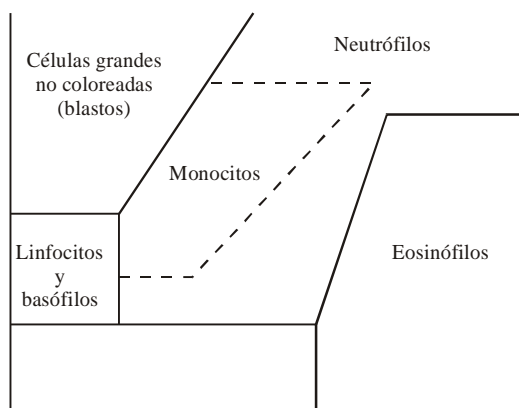
1. Apertura-impedancia (sistema Coulter): en este sistema, las células se suspenden en una solución

diluyente que tiene como característica principal una conductividad fija. Cuando estas células pasan a través de una pequeña abertura u orificio, se produce un cambio en la impedancia (resistencia) de una corriente eléctrica constante que atraviesa esta abertura. Los impulsos producidos se registran y permiten calcular, según el número de interrupciones, la cantidad de células. Este principio para los recuentos celulares, aún se mantiene vigente.

2. Dispersión de la luz: este principio siguió al anterior. La muestra de sangre diluida pasa a través de un detector celular colocado en el paso de luz de un rayo luminoso muy estrecho. Cuando las células pasan, interrumpen la luz y el número de estas interrupciones es registrado por un detector y se obtiene así el recuento de células. El diámetro celular se logra por la dispersión de la luz, la cual es una suma de un conjunto de propiedades celulares como el volumen, el contorno y la granulosidad. De todas ellas, el tamaño es la más importante. Algunos instrumentos alcanzaron un buen perfeccionamiento en su parte óptica luego del uso de un rayo láser monocromático. De esta forma quedó resuelto el recuento diferencial de leucocitos, limitado a tres subpoblaciones: neutrófilos, monocitos y linfocitos. Este recuento, aunque limitado, era válido desde el punto de vista clínico. Cualquier anomalía era detectada por el esquema de distribución que aparecía en la pantalla y por una alarma sonora.
3. Citometría de flujo: la introducción de la citometría de flujo enriqueció mucho más las posibilidades de los analizadores hematológicos. Esta técnica permite la identificación, caracterización y aislamiento de células por medios ópticos, basándose en las propiedades físicas, químicas o inmunológicas. Entre las propiedades se incluyen el tamaño, la forma, el contenido de ADN, la distribución de antígenos y la actividad enzimática. En los años 50 del siglo xx, las limitaciones del microscopio de luz y de las determinaciones bioquímicas, obligaron a emprender la búsqueda de otras técnicas que permitieran obtener información sobre células aisladas y subpoblaciones celulares. Dos décadas después, la citometría de flujo era una realidad y comenzaron a aparecer los primeros analizadores hematológicos que utilizaban este principio. Su perfeccionamiento le

añadió a estos equipos la posibilidad de realizar un recuento diferencial de seis poblaciones, un recuento absoluto para cada una de ellas y detectar las desviaciones a la izquierda (presencia de leucocitos con núcleos no segmentados). Para realizar los recuentos, los eritrocitos son lisados. A continuación, los leucocitos son estabilizados y coloreados, para evidenciar su actividad peroxidásica y de esta forma identificarlos (absorbancia de la luz) y conocer su tamaño (dispersión de la luz), cuando son registrados al pasar las células independientes, una tras otra, entre dos detectores. Las poblaciones celulares se muestran en una pantalla; el eje vertical indica el tamaño celular y el horizontal, la intensidad de la coloración peroxidásica.

Los linfocitos y las células grandes no coloreadas (blastos) no se desplazan horizontalmente y, por lo tanto, son medidas solo por su tamaño y a lo largo del eje vertical (izquierda). Los monocitos tienen una actividad peroxidásica discreta y un tamaño moderado, por lo que aparecen en el centro de la pantalla. Los neutrófilos, algo menores, pero con una actividad peroxidásica intensa, aparecen a la derecha y ocupan la parte media y superior de la pantalla. Los eosinófilos, menores que los monocitos y los neutrófilos, pero con la actividad peroxidásica más elevada, aparecen a la derecha y en el extremo inferior. Los basófilos son detectados como grandes células, en un canal separado, después que el resto de los leucocitos han sido despojados de su citoplasma (figura 1.16).



**Figura 1.16** Esquema de la ubicación celular (leucocitos) en la pantalla de un analizador hematológico capaz de realizar recuentos celulares diferenciales según el principio de la citometría de flujo.

Por lo general, los analizadores hematológicos disponen de tres canales para realizar las determinaciones:

1. Canal A: determinación de la concentración de hemoglobina.
2. Canal B: recuentos celulares de eritrocitos, trombocitos y otros índices.
3. Canal C: recuento global y diferencial de leucocitos (canal de la peroxidasa).

Los analizadores hematológicos están diseñados para realizar hasta 28 determinaciones diferentes, entre las que se encuentran:

1. Hemoglobina.
2. Hematócrito.
3. Recuentos celulares globales.
4. Recuentos diferenciales absolutos y relativos.
5. Recuento de reticulocitos.
6. Constantes corpusculares y un conjunto de índices, entre los que se destacan la amplitud de la distribución de eritrocitos (RDW), que constituye una medida de la anisocitosis; la amplitud de la distribución de los trombocitos (PDW); las células grandes no coloreadas (LUC); el índice de lobularidad (LI), y el índice de la actividad peroxidásica promedio (MPXI).

A estos analizadores, igual que ocurre con los químicos, se les ha incorporado la robótica. Como ejemplo se puede mencionar la posibilidad de realizar de forma automática las extensiones de sangre sobre portaobjetos y efectuar las coloraciones. La ayuda ofrecida por estos equipos es primordial, pues los profesionales del laboratorio solo tienen que examinar las extensiones en las que el analizador ha señalado, mediante la alarma sonora, la presencia de alguna anomalía en la cantidad o en el tipo de alguno de los elementos celulares.

En resumen, los analizadores hematológicos actuales combinan dos principios para realizar las determinaciones antes mencionadas: la apertura-impedancia y la citometría de flujo, para realizar los recuentos globales (eritrocitos, leucocitos y trombocitos), y el estudio de subpoblaciones celulares (recuentos diferenciales), respectivamente.

## OTRAS APLICACIONES DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO

Ya que se ha hecho referencia a la citometría de flujo en este capítulo, no se debe pasar por alto el resto de las aplicaciones de esta tecnología en el laboratorio clínico.

Análisis de antígenos expresados por las células humanas: cada tipo celular del sistema hematopoyético puede ser clasificado por los antígenos expresados en los diferentes estadios de la diferenciación celular. Estos antígenos están asociados a células específicas como son linfocitos, granulocitos, monocitos, trombocitos, eritrocitos o también pueden expresarse en grupos celulares de igual linaje (leucocitos). Este tipo de análisis ha demostrado su utilidad en la identificación de las células precursoras hematopoyéticas, en la diferenciación entre células normales y anormales (leucemias) y en la clasificación estadual de las enfermedades hematológicas. Tal es el caso de las leucemias y los linfomas que resultan de la transformación de una sola célula hematológica en un clono maligno. La citometría de flujo permite el análisis de miles de células de forma rápida y, una vez que el linaje de las células malignas ha sido determinado, la morfología celular se analiza por medio del microscopio. Esta técnica se utiliza también para la identificación de las *stem cells*.

La producción de anticuerpos monoclonales *in vitro* con hibridomas ha despejado el camino para la preparación ilimitada de reactivos inmunológicos específicos, que reaccionan con el antígeno de que se trate y permiten el fenotipaje inmunológico. Este tipaje, realizado con la citometría de flujo, representa un importante papel en el diagnóstico y establecimiento del pronóstico de las enfermedades hematológicas. Esta técnica se ha utilizado mucho en el inmunotipaje de los leucocitos humanos (sistema humano de histocompatibilidad [HLA]) y entre sus principales aplicaciones se encuentra la trasplantología. En otras enfermedades como la espondilitis anquilosante, la citometría de flujo permite la rápida detección de la seropositividad para el HLA-B27, muy vinculado a este grupo de afecciones.

El control evolutivo de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), tiene en la

citometría de flujo un sólido apoyo. Durante la infección por VIH, la cantidad de células T inductoras CD4+ disminuye.

La determinación exacta de estas células es importante para establecer el estadio en que se encuentra la enfermedad y controlar la evolución durante el tratamiento, con la cuantificación de los linfocitos CD4+ y CD8+.

## AUTOMATIZACIÓN EN HEMOSTASIA

En la década del 60 del siglo xx, los análisis para el estudio de la coagulación se encontraban limitados a la observación visual de la formación del coágulo o a su disolución, con el uso de pruebas como: el tiempo de sangrado, el tiempo de coagulación, el tiempo de protrombina, el tiempo parcial de tromboplastina (activado con caolín) y el tiempo de trombina. En los años 70 del mismo siglo, la automatización de las llamadas pruebas de coagulación fue impulsada, entre otras razones, por la necesidad de estudiar, de forma masiva, aquellos pacientes sometidos a terapia anti-coagulante (warfarina, heparina) y de estudiar las alteraciones de la coagulación que acompañan a múltiples enfermedades humanas.

Los principios utilizados en los equipos automáticos para los estudios de la hemostasia son:

1. Detección del coágulo: está basado en el uso de detectores ópticos de punto final que detectan el cambio de la luz transmitida cuando el plasma pasa de la fase líquida a la gelificada. El cambio luminoso puede ser registrado en una pantalla. También se usan detectores electromecánicos que poseen diminutos imanes en movimiento que se detienen al gelificarse el plasma, lo que indica el final de la reacción. Este es el principio más utilizado por su elevada sensibilidad.
2. Ensayos cromogénicos: los avances en los conocimientos de los mecanismos de la coagulación en el ser humano exigieron que las técnicas que terminan con la formación de un coágulo no fueran las únicas a disposición del laboratorio de hemostasia. En estas reacciones cualquier falla en el proceso, debido a inhibidores o activadores, hacía difícil la interpretación de los resultados de las pruebas. De esta forma, aparecieron los ensayos cromogénicos que no son más que reacciones bioquímicas aisladas y específicas. En estas no se requiere una total estabilidad del sistema, como ocurre en las que

terminan con la formación de un coágulo. En el grupo de las cromogénicas se encuentran los ensayos con sustratos sintéticos y los amidolíticos.

3. Agregación trombocitaria: los recuentos trombocíticos durante años se han realizado con el microscopio, y en los analizadores para el estudio de la hemostasia se ha utilizado el mismo principio que para los recuentos de eritrocitos en los estudios hematológicos. Sin embargo, estos recuentos no ofrecen ninguna información sobre la funcionalidad trombocitaria, lo cual, de una manera muy general, se expresa en la prueba que mide el tiempo de sangrado.

Entre los equipos modernos para los estudios hemostáticos se incluyen los agregómetros, capaces de medir una función trombocitaria importante: la agregación. Los trombocitos después de activados, se unen unos a otros (adhesión), liberan su contenido granular y forman agrupaciones (agregados), las cuales son detectadas por los cambios que se producen en la transmisión de la luz del sistema óptico acoplado al equipo.

## ENSAYOS INMUNOLÓGICOS

Los ensayos inmunológicos se introdujeron desde hace poco tiempo. Las sustancias liberadas durante el proceso de la coagulación, bien definidas desde el punto de vista químico y de bajo peso molecular, aparecen en la sangre, pero en cantidades mínimas. Por ello, para su detección, es necesario utilizar métodos muy sensibles como los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) y radioinmunoenzimáticos (RIA). Cuando se trata de proteínas de mayor tamaño (elevado peso molecular) tal es el caso del fibrinógeno y la antitrombina III, se utilizan otras técnicas como la inmunodifusión radial y la electroforesis bidimensional.

## BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- Felder RA, Boyd JC. Robotics in the medical laboratory. Clin Chem 1990; 36:1534-43.
- Schoeff LE. Principles of Laboratory Instruments. St. Louis: CV. Mosby, 1993.
- Tilton RC. Clinical Laboratory Medicine USA. St. Louis: Mosby Yearbook, 1992.



## **CONTENIDO**

---

**Introducción/ 61**

**Uso de la estadística en la obtención de valores de referencia/ 62**

**Términos recomendados por la Federación Internacional de Química Clínica/ 64**

**Otros aspectos que se deben tener en cuenta para la obtención de valores de referencia/ 64**

**Bibliografía recomendada/ 65**

## Capítulo 7



### VALORES DE REFERENCIA

*Dr. Celso Cruz Rodríguez*

#### RESUMEN

El perfeccionamiento alcanzado en los últimos años en el establecimiento de los intervalos de referencia, ha repercutido de manera favorable en el trabajo del laboratorio clínico. Los estudios de la variación biológica en un individuo y entre todos los individuos, para la mayoría de los componentes, efectuados en la década del 70 del pasado siglo xx, han permitido una clasificación más correcta entre población sana y enferma. Es justo reconocer los esfuerzos de la Federación Internacional de Química Clínica al respecto y los beneficios que ello ha aportado al paciente. El establecimiento de su estado de salud, con la mayor claridad a nuestro alcance, le ofrece al médico de asistencia posibilidades casi ilimitadas de ayudar a su principal cliente: el enfermo.

#### INTRODUCCIÓN

Los médicos tienen hoy día a su disposición gran cantidad de pruebas analíticas que, por lo general, proporcionan información muy útil cuando su indicación se hace después de una cuidadosa meditación. Sin embargo, cuando esta indicación no responde a un análisis detallado del cuadro clínico del paciente ni a las hipótesis diagnósticas, planteadas frente al conjunto de síntomas y signos que componen el cuadro clínico, la indicación médica resulta incorrecta y no cumple con su principal objetivo: ayudar al paciente. En este caso, el paciente es el más perjudicado, pues se retrasa el comienzo de su tratamiento y se le originan molestias o peligros innecesarios. En los países en los que la atención de salud no es gratuita, el factor económico se hace presente al tener que pagar por un servicio que no ha contribuido en la solución del problema del paciente.

El resultado de un análisis, ya sea normal o anormal, está basado en probabilidades, pues no hay un

límite entre ello. Más bien puede decirse que es probable que un valor alejado del valor medio es anormal, y si se mantiene cerca, dentro de determinados límites ( $\pm 2$  DE), hay probabilidad (95 %) de que sea un valor normal.

Llama la atención, la superficialidad con la cual se utilizan los criterios de normalidad y anormalidad, a pesar de que se emplean de manera constante en la práctica clínica diaria.

Muchos médicos tienen el criterio de que existe una división bien definida entre un resultado normal y uno anormal, y lo demuestran con frecuencia al preocuparse por un resultado que sobrepasa el límite superior del intervalo de referencia en 2 o 3 mmol/L. En algunos componentes, como por ejemplo la creatinina en suero, en la cual existe una gran variación en el individuo y entre todos los individuos, la demarcación entre normal y anormal se hace todavía más difícil. La antigua valoración de las pruebas cualitativas como positiva o negativa, contiene o no contiene, es responsable, en parte,

de la aplicación de esta simple evaluación a los análisis cuantitativos.

Actuar con rigidez frente a la evaluación de un resultado normal o anormal, y más aún, cuando se trata de un criterio tan flexible, dará lugar a la toma de decisiones erróneas en un campo tan delicado como el diagnóstico médico.

Es necesario tener presente que si se aceptan como límites  $\pm 2$  DE, un valor entre 20 y cinco valores entre 100 caerán fuera del intervalo de referencia, lo cual no debe causar sorpresa. Cuando se repita el análisis es probable que ese valor se ubique dentro del intervalo considerado normal.

## USO DE LA ESTADÍSTICA EN LA OBTENCIÓN DE VALORES DE REFERENCIA

La estadística es una importante herramienta de trabajo para los profesionales del laboratorio clínico, cuando se trata de incursionar en temas como aseguramiento de la calidad, estudio y selección de métodos, y obtención de valores de referencia. Por lo general se requiere la ayuda de personal capacitado en esta disciplina o revisar la literatura especializada (bastante común) para encontrar sus aplicaciones en el laboratorio clínico y así adquirir la destreza necesaria.

### Distribución normal

Cuando una muestra se analiza varias veces, los valores obtenidos difieren unos de otros en mayor o menor cuantía, por lo que al final se obtiene un rango de valores que podrá ser estrecho o ancho. La distribución de los resultados (valores) se puede obtener si se construye un gráfico en el que se coloquen los valores ordenados de menor a mayor en el eje de las X, y la frecuencia en que aparecieron, en el eje de las Y. Cuando se unen los puntos que corresponden a la frecuencia en la aparición de cada

uno de los valores, se obtiene una campana que se conoce con varios nombres: campana de Gauss, distribución normal o *gaussiana*. Los dos parámetros que la definen son la media ( $\bar{X}$ ) y la desviación estándar (DE). La media (promedio de todos los valores) constituye una medida de la tendencia central e indica dónde se localiza el histograma de la distribución a lo largo del eje de las X. La desviación estándar constituye una medida de la variabilidad de los datos de una distribución de frecuencia. Otras medidas descriptivas están dadas por la mediana (que se define como la medición central, si existe, después que los valores se han dispuesto en orden de magnitud), y la moda (que se define como la medida, si existe, que se presenta con la máxima frecuencia). El rango es la diferencia entre el valor más alto y el más bajo de la distribución. El coeficiente de variación (CV) expresa la DE como un porcentaje de la media o promedio.

En una distribución normal, alrededor del 68 % de los valores se encuentran en  $\pm 1$  DE, cerca del 95 % en  $\pm 2$  DE y el 97 %, aproximadamente, en  $\pm 3$  DE. La distribución de frecuencias normal e ideal, (figura 1.17) se caracteriza por lo siguiente:

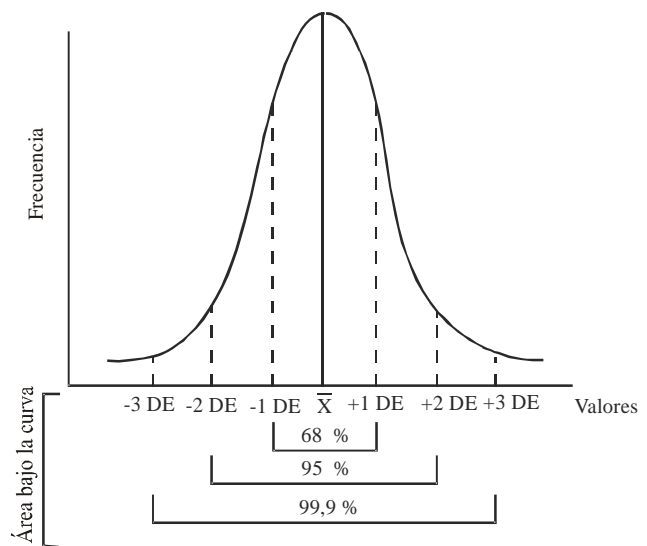
1. La media, la mediana y la moda coinciden.
2. La curva alrededor de la media es simétrica.
3. Los valores entre la media y  $\pm 1$  DE,  $\pm 2$  DE y  $\pm 3$  DE pueden ser calculados. Si la curva es asimétrica, pierde su carácter normal y entonces los valores en el área debajo de ella se calculan de otra forma (métodos no paramétricos) (figura 1.18).

Cuando se observa una distribución de frecuencias en la cual están incluidos resultados normales y anormales, se pueden apreciar dos campanas. La primera es la distribución adoptada por los valores normales y la segunda por los anormales. Es entonces que se puede apreciar, de forma gráfica, que la división entre las dos poblaciones de resultados se superponen y da lugar a la zona de difícil

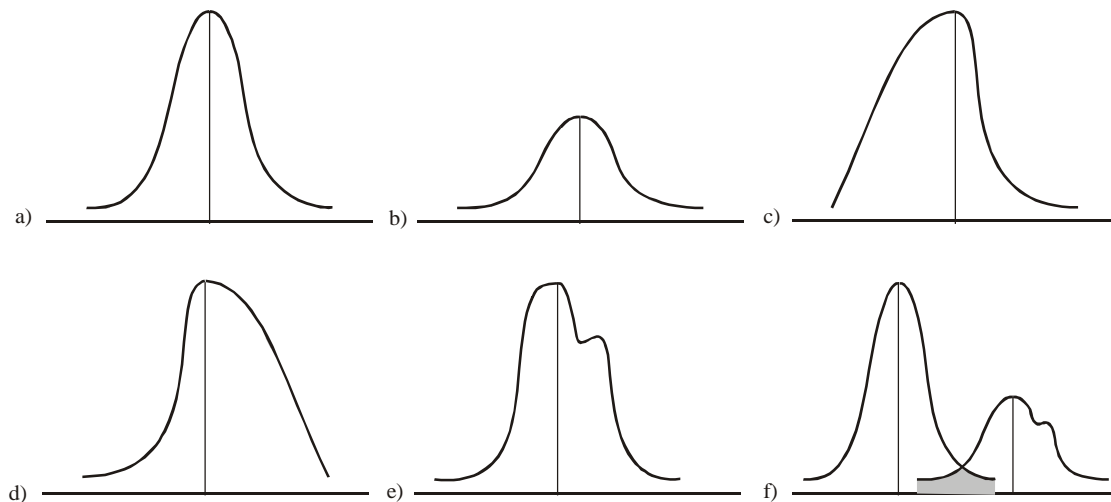
interpretación, en la cual lo normal deja de serlo y comienzan a aparecer los valores anormales (zona de transición) (figura 1.18 inciso f). Esta zona comienza a partir de +2 DE en la primera campana.

En el estudio de los valores de referencia hay que tener presente que los métodos estadísticos son solo herramientas, que deben ser utilizadas de manera adecuada y conocidas bien sus suposiciones básicas. Por ejemplo, la difundida creencia de que todos los datos biológicos se distribuyen de manera normal es incorrecta. La realidad es que la mayoría no se distribuyen de manera normal, y esto da lugar a distribuciones asimétricas que muchas veces requieren un tratamiento estadístico diferente para ser utilizadas en el cálculo de los valores de referencia. De esta forma, si la distribución es normal, su definición es mediante técnicas estadísticas paramétricas o no paramétricas. Si la distribución no es normal, se puede intentar la transformación logarítmica para luego definirla con métodos paramétricos o aplicar, de entrada, los métodos no paramétricos. Esta última variante es la recomendada en la actualidad, por tratarse

de métodos sencillos y que poseen una buena precisión cuando se procesan muestras pequeñas (menos de 120), como ocurre con frecuencia al obtener valores de referencia para su uso en el laboratorio clínico.



**Figura 1.17** Distribución normal de frecuencias en la que aparecen la media ( $\bar{X}$ ), la desviación estándar (DE) y la distribución de los valores alrededor de la media  $\pm 1$  DE,  $\pm 2$  DE y  $\pm 3$  DE.



**Figura 1.18** Diferentes tipos de curvas normales: a) Aguda, b) Aplanada, c) Cola izquierda, d) Cola derecha, e) Bimodal, f) Curva en la cual se mezclan dos poblaciones: sana y enferma. La zona sombreada señala el área mezclada. La asimetría de las curvas en los incisos c, d y e se debe a la mezcla de poblaciones, aunque en menor cuantía que en el inciso f.

## **TÉRMINOS RECOMENDADOS POR LA FEDERACIÓN INTERNACIONAL DE QUÍMICA CLÍNICA**

Los componentes bioquímicos del cuerpo humano están sujetos a variaciones causadas por procesos fisiológicos, diferencias genéticas, enfermedades y factores ambientales. Una interpretación racional de los resultados del laboratorio exige del conocimiento de la variación de los resultados por la acción de las variables mencionadas. Este aspecto es de relevante importancia en la evaluación individual (paciente), así como en el conjunto de individuos que constituyen la población de referencia.

En 1987, la Federación Internacional de Química Clínica (IFCC) emitió un conjunto de términos cuya definición debe tenerse en cuenta para la obtención de valores de referencia:

1. Individuo de referencia: es el individuo seleccionado para una comparación a partir de un criterio definido.
2. Población de referencia: conjunto de los individuos de referencia.
3. Grupo muestra de referencia: grupo de individuos seleccionados de manera adecuada para representar a la población de referencia.
4. Valor de referencia: valor obtenido por la observación o medición de un tipo particular de magnitud o de un individuo de referencia perteneciente al grupo muestra de referencia.
5. Distribución de referencia: es la distribución estadística de los valores de referencia.
6. Límite de referencia: es el límite que se deduce a partir de la distribución de referencia y es usado para propósitos descriptivos.
7. Intervalo de referencia: es el intervalo entre los límites de referencia, incluyendo a estos.
8. Valores observados: son valores de un tipo particular de magnitud, obtenidos por observación o medición y producidos para obtener una decisión médica. Pueden ser comparados con los valores de referencia, distribuciones de referencia, límites de referencia o intervalos de referencia.

Los últimos cinco conceptos de referencia son los que hacen posible la comparación de los valores observados en un individuo.

Tradicionalmente los valores de referencia de individuos sanos han sido utilizados en el laboratorio clínico. Sin embargo, como se ha mencionado antes, el límite entre salud y enfermedad es por lo general difuso y los valores de referencia pueden ser utilizados para evaluar el estado de salud, identificar personas con riesgo ante una determinada afección, ayudar en la toma de decisiones en la clínica y con propósitos científicos. De lo anterior se infiere que en la selección de los individuos de referencia, el criterio de salud que se aplica responde al objetivo de la investigación que ha de realizar el laboratorio clínico. De este modo, los individuos de referencia, en este caso en particular, no siempre serán individuos sanos.

## **OTROS ASPECTOS QUE SE DEBEN TENER EN CUENTA PARA LA OBTENCIÓN DE VALORES DE REFERENCIA**

Los valores de referencia se obtienen bajo condiciones claramente descritas y estandarizadas. La descripción debe incluir:

1. Características de los individuos de referencia y del grupo muestra de referencia: edad, sexo, masa corporal, factores genéticos, étnicos y socioeconómicos.
2. Condiciones fisiológicas y ambientales de los individuos de referencia y el momento de recolección de la muestra.
3. Procedimiento para la obtención y conservación de las muestras.
4. Características del método analítico que se utilizará y el aseguramiento de la calidad de todo el proceso analítico.

La exclusión de individuos del grupo de muestra de referencia debe hacerse con sumo cuidado. Muchos factores contribuyen a la variación biológica y la presencia de cualquiera de ellos puede

ser la causa de la exclusión de algunos de los individuos de referencia.

Para propósitos específicos, el criterio descrito a continuación puede considerarse como de partición para obtener valores de referencia:

1. Estados fisiopatológicos: los individuos que padecen enfermedades sistémicas u otras afecciones como insuficiencia renal, cardíaca, respiratoria, hepática, síndrome de malabsorción y anemias nutricionales.
2. Drogas terapéuticas y de abuso: se excluyen los individuos que reciban agentes para el tratamiento farmacológico suplementario o sustitutivo y a los drogadictos. Pueden ser motivo de exclusión

también el uso de los anticonceptivos orales, el alcoholismo y el tabaquismo.

3. Estados fisiológicos modificados: embarazo, ejercicio o actividad física, enfermedades mentales, obesidad e hipertensión.

## **BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA**

- Fajardo Martín JA. Métodos paramétricos indirectos en el cálculo de valores de referencia. *An Clín* 1986; 43:141-6.
- Solberg HE. Teoría de los valores de referencia. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 1988; 22(3)(4):293-303; 443-72;603-21.
- Uldall A. Quality assurance in clinical chemistry. *Scan J Clin Lab Invest* 1987;187 (suppl 47):10-4.

## **CONTENIDO**

---

**Introducción/ 67**

**Estructura del Sistema Internacional de Unidades/ 67**

**Aplicaciones prácticas del Sistema Internacional de Unidades/ 68**

**Tabla de conversión de valores de unidades convencionales  
al Sistema Internacional de Unidades/ 70**

**Bibliografía recomendada/ 75**

# PARTE I. GENERALIDADES

## Capítulo 8



### SISTEMA INTERNACIONAL DE UNIDADES

Dr. Celso Cruz Rodríguez

#### RESUMEN

El Sistema Internacional de Unidades constituye un gran paso de avance en la estandarización de las unidades de medida. Los valores obtenidos en cualquier laboratorio de Cuba, ya sea municipal, provincial o nacional, pueden compararse con los valores de los laboratorios de igual categoría en otros países, sin importar cuán lejos se encuentren uno de otro. Después de los esfuerzos por alcanzar esta estandarización, asumida en 1985 en la República de Cuba, que es lo que corresponde con el desarrollo alcanzado por el Laboratorio Clínico, llama la atención que algunos países desarrollados no hayan adoptado esta solución de inmediato.

#### INTRODUCCIÓN

El Sistema Internacional de Unidades, conocido en el mundo como SI, fue creado con el principal objetivo de alcanzar una estandarización a escala internacional de las unidades de medida en las ramas de la ciencia y la tecnología. Este sistema constituye la versión más moderna del Sistema Métrico y se considera el sustituto de todos los anteriores.

La conversión al SI comenzó en la década de los años 70 del siglo xx en los países europeos, a los cuales se unieron Australia y Nueva Zelanda. El SI siempre tuvo detractores que se opusieron a su implantación, de manera abierta o velada. La resistencia al cambio, una vez más, se hizo presente, y trata de restarle importancia a la introducción de un sistema uniforme para presentar valores numéricos, lo que permitiría el intercambio de información entre naciones y disciplinas. No faltaron aquellos que argumentaron que la asimilación de este sistema era defendida solo por los profesionales del laboratorio clínico, por ser los únicos interesados, y que tal cambio no redundaría en beneficios para los pacientes. Estas opiniones provenían de algunos clínicos de los países que asumieron esta metodología, a los que no entusiasmó la introducción del SI, y adoptaron la actitud pasiva de aguardar la decisión gubernamental o de algún otro cuerpo legislativo autorizado.

Los países como Cuba, que decidieron implantar el SI en las instituciones sanitarias (1985), dieron un paso de avance al comprender la razón más importante para este cambio: los componentes biológicos reaccionan *in vivo* sobre una base molecular. Por lo tanto, el SI conllevaría a una mejor comprensión de las cantidades relativas de los componentes de los líquidos corporales, de los procesos biológicos y sus interrelaciones, y favorecería además el intercambio de la información científica.

El mol, la unidad de cantidad de sustancia del SI y la más importante para los profesionales de los laboratorios de salud, ocupó el lugar que durante años perteneció al gramo, sus múltiplos y submúltiplos, como unidad de concentración de masa.

#### ESTRUCTURA DEL SISTEMA INTERNACIONAL DE UNIDADES

La estructura del Sistema Internacional de Unidades comprende tres tipos de unidades:

1. Unidades de base.
2. Unidades derivadas.
3. Unidades suplementarias.

Las unidades de base agrupan a las que interesan a los profesionales de la salud. En el laboratorio clínico,



el mol constituye la unidad más importante y se hace acompañar del litro (L), que aunque no es una unidad SI, se decidió utilizarlo como nombre especial para el decímetro cúbico y que fuera la unidad SI para expresar los valores de volumen (tabla 1.8).

**Tabla 1.8** Unidades SI de base

Magnitud	Nombre	Símbolo
Longitud	Metro	m
Masa	Kilogramo	kg
Tiempo	Segundo	s
Cantidad de sustancia	Mol	mol
Temperatura termodinámica	Kelvin	K
Corriente eléctrica	Ampere	A
Intensidad luminosa	Candela	cd

Las unidades derivadas se forman al multiplicar una unidad de base por sí misma o al asociar dos o más unidades de base por una simple multiplicación o división. De manera que las unidades SI derivadas constituyen un amplio grupo de unidades (tabla 1.9).

**Tabla 1.9** Unidades SI derivadas simples

Magnitud	Nombre	Símbolo
Superficie	Metro cuadrado	m <sup>2</sup>
Volumen	Metro cúbico	m <sup>3</sup>
Concentración de cantidad de sustancia	Mol por metro cúbico	mol/m <sup>3</sup>

Las unidades suplementarias son independientes de las unidades de base. La Conferencia General de Pesos y Medidas no ha decidido considerarlas como unidades de base o derivadas. Ninguna de ellas ofrece interés para las profesiones médicas.

Hay un cuarto grupo que está constituido por las unidades no pertenecientes al SI (tabla 1.10). Entre ellas se encuentra el litro que, como otras unidades de este grupo, fue designado por ser muy conocido. En algunos casos, las unidades SI de base y las derivadas, resultan demasiado grandes o demasiado pequeñas para determinados fines. La incorporación de prefijos, conocidos

como prefijos SI, permite obviar estas dificultades mediante la creación de múltiplos y submúltiplos de las unidades SI (tabla 1.11).

**Tabla 1.10** Unidades que no pertenecen al SI

Magnitud	Unidad	Símbolo	Valor en unidades SI
Tiempo	minuto	min	60 s
	hora	h	3 600 s
	día	d	86 400 s
Volumen	litro	L	1 dm <sup>3</sup> = 10 <sup>-3</sup> m <sup>3</sup>

**Tabla 1.11** Algunos prefijos SI

Factor	Prefijo	Símbolo
10 <sup>12</sup>	tera	T
10 <sup>9</sup>	giga	G
10 <sup>6</sup>	mega	M
10 <sup>3</sup>	kilo	k
10 <sup>2</sup>	hecto	h
10 <sup>1</sup>	deca	da
10 <sup>-1</sup>	deci	d
10 <sup>-2</sup>	centi	c
10 <sup>-3</sup>	mili	m
10 <sup>-6</sup>	micro	μ
10 <sup>-9</sup>	nano	n
10 <sup>-12</sup>	pico	p
10 <sup>-15</sup>	femto	f
10 <sup>-18</sup>	atto	a
10 <sup>-21</sup>	zepto	z

## APLICACIONES PRÁCTICAS DEL SISTEMA INTERNACIONAL DE UNIDADES

Los resultados de los diferentes componentes analizados que se obtienen en los laboratorios ofrecen una mejor información, desde el punto de vista científico, cuando las unidades de medida utilizadas se basan en la concentración molar y no en la concentración de masa. Existen muchos ejemplos que apoyan esta afirmación: la conversión de glucosa a lactato y piruvato, o la unión de una droga a la albúmina. En el caso de las combinaciones, es muy evidente cuando se expresa que 4,0 mmol de hemoglobina se combinan con 4,0 mmol de oxígeno (utilizando el sistema SI). A esto se contraponen la escasa

información científica que se brinda si expresamos que 1,0 g de hemoglobina se combina con 1,37 mL de oxígeno.

El SI prioriza el uso del mol como unidad para la concentración de *cantidad de sustancia* en los componentes cuya masa molecular relativa (peso molecular) se conoce. El mol, que se define como la cantidad de sustancia de un soluto dividida por el volumen de solución (mol/L), se expresa siempre como tal o en submúltiplos: milimol (mmol), micromol ( $\mu\text{mol}$ ), nanomol (nmol). En aquellos casos en que se desconoce la masa molecular relativa o cuando se trata de proteínas, el SI permite el uso de la unidad de concentración de masa (g) y se mantiene el litro como unidad de volumen.

Para los componentes enzimáticos, la unidad SI de actividad catalítica es el mol por segundo (mol/s), aunque la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada aprobó para su uso provisional el nombre especial de katal (kat) para esta unidad ( $1 \text{ kat} = 1 \text{ mol/s}^{-1}$ ). La aprobación del katal no se ha efectuado, por lo que no constituye una unidad SI. Mientras tanto, se autorizó el uso de la unidad por litro (U/L) para expresar la actividad catalítica (antes, actividad enzimática).

Los componentes urinarios se expresan en función de la excreción total diaria de orina, y para ello se emplean unidades de cantidad de sustancia referidas al período durante el cual se recolectó la muestra (mmol o mmol/24 h).

Las presiones parciales de gases sanguíneos ( $\text{pO}_2$  y  $\text{pCO}_2$ ), según el SI, se expresan en kilopascales (kPa) y no en milímetros de mercurio (mmHg). Este cambio de unidades en las presiones parciales, no ha sido aceptado por la mayoría de los países y, como ocurre también con la presión arterial, se expresan en mmHg.

Para los componentes hematológicos, el SI introdujo dos magnitudes y unidades de concentración que se unen a las ya mencionadas (tabla 1.12).

En cuanto a la concentración de hemoglobina en la sangre, a pesar de conocerse la masa molecular relativa de esta proteína, se acordó que su concentración fuera informada como concentración de masa (g/L) igual que las demás proteínas. De esta forma se evitan los valores numéricos muy diferentes que se obtienen al utilizar la concentración de sustancia ( $\mu\text{mol/L}$  o  $\text{mmol/L}$ ) en lugar de g/dL que se utilizaba antes.

La enumeración de células (antes recuento global), que en el sistema tradicional se expresaba en células por milímetros cúbicos, fue eliminada por el SI y los resultados se expresan en un volumen  $10^6/\text{L}$ . La magnitud recomendada es la concentración de número (tabla 1.13).

Los nombres de eritrocito y trombocito sustituyen a los anteriores de hematíes y plaqueta, respectivamente.

La información de los recuentos celulares diferenciales (recuentos diferenciales) fue sustituida por la concentración de fracción de número, el total se considera como la unidad y los diferentes tipos de células, como la fracción de esta (tabla 1.14).

Cuando se trata del hematócrito, análisis que requiere de la centrifugación de la sangre, los resultados se refieren a la fracción de volumen, y se basa en que tiene la dimensión de la unidad. Un hematócrito de 45 %, se reportará como 0,45.

En los estudios de hemostasia se aplicará, siempre que sea posible, la unidad de tiempo: segundo (s).

Los cambios en las unidades de medida, como resultado de la introducción del SI, se acompañaron de cambios en los nombres de algunos componentes (tabla 1.15).

**Tabla 1.12** Magnitudes y unidades de concentración en hematología

Nombre de la magnitud	Definición	Unidad
Concentración de número	Número de partículas o entidades elementales especificadas dividido por el volumen del sistema (mezcla)	$\text{L}^{-1}$
Fracción de número	Número de partículas o entidades elementales especificadas dividido por el número total de partículas o entidades del sistema (mezcla)	1 (relación)
Fracción de volumen	Volumen de un componente dividido por el volumen del sistema (mezcla)	Fracción de la unidad

**Tabla 1.13** Algunas magnitudes recomendadas para hematología

Componentes	Magnitud recomendada
Leucocitos	10 <sup>9</sup> /L
Eritrocitos	10 <sup>12</sup> /L
Eosinófilos	10 <sup>9</sup> /L
Trombocitos	10 <sup>9</sup> /L
Leucocitos en el líquido cefalorraquídeo	10 <sup>6</sup> /L
Polimorfonucleares	0,67
Linfocitos	0,30
Monocitos	0,03

**Tabla 1.14** Sustitución de los porcentajes por la fracción de número en los recuentos celulares diferenciales

Células	%	Fracción de número
Neutrófilos	68	0,68
Linfocitos	25	0,25
Monocitos	4	0,04
Eosinófilos	3	0,03
	100	1

**Tabla 1.15** Algunos componentes cuyos nombres han cambiado al introducirse el SI

Nombre convencional	Nombre recomendado	Unidades
Bilirrubina total	Bilirrubinas	μmol/L
Colesterol total	Colesteroles	mmol/L
Fósforo inorgánico	Fosfato	mmol/L
Ácido úrico	Uratos	mmol/L
Calcio	Calcio (II)	mmol/L
Ácido ascórbico	Ascorbato	mmol/L
Ácido salicílico	Salicilato	mmol/L
Proteínas totales	Proteínas	g/L
Hierro en suero	Hierro (III)	μmol/L
Eritrocitos	Eritrocitos	10 <sup>12</sup> /L
Plaquetas	Trombocitos	10 <sup>9</sup> /L
Eritrosedimentación	Velocidad de sedimentación eritrocitaria (VSE)	mm/L
TGP	ALAT	U/L
TGO	ASAT	U/L

## TABLA DE CONVERSIÓN DE VALORES DE UNIDADES CONVENCIONALES AL SISTEMA INTERNACIONAL DE UNIDADES

**Tabla 1.16** Intervalos de referencia y otros datos importantes para cada uno de los componentes de uso más frecuente en el laboratorio clínico o médico

Componentes	Material biológico que se utiliza	Intervalo de referencia y unidades			Sexo		Fecha		
		Convencionales	Factor	SI	M	F	D	M	A
AFP	S, P	0-15 ng/mL	1,00	0-15 μg/L					
ALAT	S*	0-35 U/L	1	0-35 U/L					
Albúmina	S	3,4-4,7 g/dL	10,00	34-47 g/L					
Amilasa	S		1,85	< 300 U/L					

**Tabla 1.16** Continuación

Componentes	Material biológico que se utiliza	Intervalo de referencia y unidades			Sexo		Fecha		
		Convencionales	Factor	SI	M	F	D	M	A
Amoníaco	St**		0,554	44-61 $\mu\text{mol/L}$					
Alfa 1 antitripsina	S	110-270 mg/dL	0,01	1,1-2,7 g/L					
Antitrombina III	P***	22-39 mg/dL	0,01	0,22-0,39 g/L					
ASAT	S	0-35 U/L	1	0-35 U/L					
Basófilos concentración de número	St			0,01-0,12 $\times 10^9/\text{L}$					
Bilirrubinas	S, P	0,1-1,2 mg/dL	17,10	2-17 $\mu\text{mol/L}$					
Bilirrubina directa	S	0,1-0,4 mg/dL	17,10	< 7 $\mu\text{mol/L}$					
Bilirrubina indirecta	S	0,1-0,7 mg/dL	17,10	< 12 $\mu\text{mol/L}$					
C3	S	64-116 mg/dL	10,00	640-1660 g/L					
C4	S	15-45 mg/dL	0,01	0,015-0,045 g/L					
CH 50	P, S			22-40 U/L					
Calcio	S	8,5-10,5 mg/dL	0,25	2,1-2,6 mmol/L					
Calcio ionizado	S	4,6-5,3 mg/dL	0,25	1,15-1,32 mmol/L					
CD4T, células	St			359-1725 células/ $\mu\text{L}$					
CEA	S, P			0-2,5 $\mu\text{g/L}$					
Ceruloplasmina	S	25-30 mg/dL	10,00	200-350 g/L					
CK	S			32-267 U/L					
CK-MB	S			4 % de la CK					
Cortisol	P, S	5-20 $\mu\text{g/L}$	27,59	140-550 nmol/L					
Creatinina	S	0,6-1,2 mg/dL	27,59	50-100 $\mu\text{mol/L}$					
Creatinina, depuración	S y O	90-140 mL/min		90-140 mL/min $\times 173 \text{ m}^2$ de superficie corporal					

**Tabla 1.16** Continuación

Componentes	Material biológico que se utiliza	Intervalo de referencia y unidades			Sexo		Fecha		
		Convencionales	Factor	SI	M	F	D	M	A
Dímero, D	P	Negativo		Negativo					
Eosinófilos, concentración de número	St			0,4-0,5 x 10 <sup>9</sup> /L					
Eritrocitos, concentración de número	St			4,2-5,6 x 10 <sup>12</sup> /L					
Eritropoyetina	S			5-20 U/L					
Factor II	P			60-100 %					
Factor V	P			60-100 %					
Factor VII	P			60-100 %					
Factor VIII	P			50-150 %					
Factor IX	P			60-100 %					
Factor X	P			60-100 %					
Factor XI	P			60-100 %					
Factor XII	P			60-100 %					
Factor XIII	P			Coágulo estable en urea 1 M					
Ferritina	S			14:16-300 µg/L M:4-161 µg/L					
Fibrinógeno	P			1,75-4,3 g/L					
Folato	S, P			370-1720 nmol/L					
Fosfatasa alcalina	S			41-133 U/L					
Fosfato	S	2,5-4,5 mg/dL	0,32	0,8-1,45 mmol/L					
FSH	S			4-22 U/L					
GGT	S			9-36 U/L					
Glucosa	S, P			3,2-6,2 mmol/L					
Haptoglobina	S	30-160 mg/dL	10,00	300-1 600 g/L					

**Tabla 1.16** Continuación

Componentes	Material biológico que se utiliza	Intervalo de referencia y unidades			Sexo		Fecha		
		Convencionales	Factor	SI	M	F	D	M	A
Hemoglobina (Hb)	St	12-15 mg/dL	10,00	120-150 g/L					
HbCO	St								
HbA <sub>2</sub>	St			0,015-0,035 de la Hb total					
Hb, electroforesis	St			Hb A <sub>2</sub> > 95 % Hb A <sub>2</sub> 1,5-3,5 %					
Hierro sérico	S			9-29 µmol/L					
Hierro, capacidad total	S			41-73 µmol/L					
Hb fetal	St			< 2 %					
Hb glicosilada	P, S			3,9-6,9 %					
LCG (fracción beta)	S, O			< 5 mU/mL					
Colesteroles		< 200 mg/dL		< 5,2 mmol/L					
HDL colesterol	S			0,7-2,28 mmol/L					
IgA	S			0,78-3,67 g/L					
IgG	S			5,83-17,6 g/L					
IgM	S			0,52-3,35 g/L					
Lactato	St			0,5-2,0 mmol/L					
LDH	S			88-230 U/L					
LDL colesterol	S			< 3,37 mmol/L					
Leucocitos concentración de número	St			3,4-10 x 10 <sup>9</sup> /L					
Lipasa	S y O			0-160 U/L					
Linfocitos concentración de número	St			0,8-3,5 x 10 <sup>9</sup> /L					
LH	S			24-105 U/L					
Magnesio (Mg)	S			0,75-1,25 mmol/L					
Monocitos									

**Tabla 1.16** Continuación

Componentes	Material biológico que se utiliza	Intervalo de referencia y unidades			Sexo		Fecha		
		Convencionales	Factor	SI	M	F	D	M	A
concentración de número	St			0,2-0,8 x 10 <sup>9</sup> /L					
Neutrófilos concentración de número	St			2,2-8,6 x 10 <sup>9</sup> /L					
Osmolalidad	S y O			275-293 mmol/kgH <sub>2</sub> O					
pCO <sub>2</sub>	St			83-108 mmHg					
pH	St			Arterial 7,35-7,45 Venoso 7,31-7,41					
pO <sub>2</sub>	St			83-108 mmHg					
Péptido C	S			0,8-4,0 µg/L					
Potasio (K)	S			3,5-5,0 mmol/L					
Progesterona	S								
PRL (prolactina)	S			< 20 g/L					
PSA	S, P			0-4 µg/L					
Proteínas	S			60-80 g/L					
Proteína C	P			71-176 %					
Proteínas, electroforesis	S			Alb: 33-47 g/L α1: 1-4 g/L α2: 3-9 g/L β: 7-15 g/L γ: 5-14 g/L					
Protrombina, tiempo	P			11-15 s					
PTH	S			1,2-5,7 pmol/L					
Reticulocitos	St			33-137 x 10 <sup>9</sup> /L					
Reptilasa, tiempo	P			14-19 s					
Salicilato	S			2 000-3 000 g/L					
Sodio (Na)	S			135-145 mmol/L					
Testosterona	S, P			10-35 nmol/L					
TPT caolín	P			28-32 s					

**Tabla 1.21** (Continuación)

Componentes	Material biológico que se utiliza	Intervalo de referencia y unidades			Sexo		Fecha		
		Convencionales	Factor	SI	M	F	D	M	A
Tiroglobulina	S, P			3-42 µg/L					
T3	S, P			1,5-2,9 nmol/L					
T4	S, P			64-142 nmol/L					
T4 libre	S, P			6,5-12,5 nmol/L					
Transferrina	S, P	205-374 mg/dL	10,00	2 050-3 740 g/L					
TSH	S, P			0,6-6 mU/L					
Triglicéridos	S			< 2,0 mmol/L					
Trombina, tiempo de	P			24-35 s					
Trombocitos, concentración de número	St			150-450 x 10 <sup>9</sup> /L					
Troponina I	S			< 1,5 ng/mL					
Troponina T	S			0-0,1 ng/mL					
Uratos	S			140-440 µmol/L					
Vit B <sub>12</sub>	S, P			100-600 pmol/L					
VSE	St	Mm/h		< 10 mm/h					
Urea	S			20-40 mmol/L					

**Leyenda**

\* S: suero.

\*\* St: sangre total.

\*\*\* P: plasma.

\*\*\*\* O: orina.

**BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA**

Laposata MMD. SI Unit Conversion Guide. England: Robquest Print Ltd, 1993.

Las unidades SI para las profesiones de salud. Ginebra: OMS, 1980.

Sistema Internacional de Unidades. Fundamentos y aplicación. Santo Domingo: Publicaciones de la Universidad Autónoma de Santo Domingo, 1983.

Young DS. Implementation of SI units for Clinical Laboratory Data. Annals Int Med 1987;106:114-29.

Young DS. Why SI? JIFCC, 1996:8-1.



## **CONTENIDO**

---

### **Introducción y principios básicos/ 77**

#### **Agentes de riesgo/ 78**

Riesgo biológico/ 78

Riesgo químico/ 79

Riesgo físico/ 80

Riesgo condicionado a factores humanos y ambientales/ 81

#### **Medidas de seguridad en el laboratorio clínico/ 81**

Control de acceso al laboratorio/ 82

Reglas de seguridad para el empleo de sustancias químicas/ 82

Reglas de seguridad contra riesgos por agentes físicos/ 82

### **Elementos del Programa de Bioseguridad/ 82**

#### **Señalizaciones/ 83**

#### **Bibliografía recomendada/ 83**

# PARTE I. GENERALIDADES

## Capítulo 9



### BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO CLÍNICO

*Dr. Jorge H. Suardíaz Pareras*

#### RESUMEN

Los laboratorios de análisis clínicos constituyen un área en la cual coinciden muchos agentes potencialmente agresivos, tanto para la salud del personal como para las propias instalaciones. Por ello, todos los procedimientos analíticos entrañan un riesgo, a veces indeterminado, que aumenta con la introducción de nuevas técnicas, productos químicos y biológicos, así como con los equipos. Este capítulo pretende dar una visión de los principales riesgos por agentes biológicos, físicos y químicos que pueden existir en un laboratorio. Además, ofrece la metodología adecuada para la prevención de accidentes, por medio del establecimiento preciso de medidas de bioseguridad que deben ser tomadas en el laboratorio clínico.

#### INTRODUCCIÓN Y PRINCIPIOS BÁSICOS

La Organización Panamericana de la Salud (OPS) define como riesgo, la probabilidad de que se produzca daño a un individuo o grupo en un área determinada. Cualquier actividad humana lleva implícito un riesgo y los laboratorios clínicos constituyen zonas en las cuales coinciden varios agentes altamente agresivos, tanto para la salud humana como para las instalaciones en sí. Todos los procedimientos analíticos pueden ocasionar riesgos, muchas veces incalculables, que aumentan con la introducción de nuevas técnicas y equipos, así como de productos químicos y biológicos. Además, debe tenerse en cuenta que en los laboratorios trabajan personas con características individuales diversas y diferente nivel cultural y educacional. Son numerosos y variados los accidentes que pueden tener lugar en ellos y su severidad varía desde efectos mínimos sobre los humanos o daños ligeros a los equipos, hasta pérdidas de vidas o destrucción de instalaciones. Sin embargo, los accidentes no ocurren por casualidad: “Son consecuencias no planeadas, pero previsibles, de actos inseguros, en una combinación de circunstancias de riesgo.” Es decir, son provocados por factores como la no-percepción del riesgo, el desconocimiento de la forma de evitarlo, la imprudencia o negligencia, las distracciones, el cansancio físico o mental y la falta de medios de

protección, entre otros (o más a menudo, por combinaciones de estos factores). Aunque no puede soslayarse la importancia del factor tecnológico, no cabe duda que el factor humano es esencial. Además, el daño a los individuos no solo está asociado a los episodios accidentales, sino también a la exposición crónica a los agentes nocivos (tóxicos químicos, cancerígenos y radiaciones).

La seguridad del trabajo en los laboratorios de la red nacional de salud depende, ante todo, del conocimiento de los factores de riesgo, la determinación de las medidas preventivas encaminadas a evitarlos y la observancia de una estricta disciplina tecnológica; pero las normas y los manuales no serán suficientes sin una adecuada concientización del personal y una voluntad de los niveles administrativos, dirigida al desarrollo de una mentalidad preventiva, como objetivo básico en la salud ocupacional. Lamentablemente, en nuestro medio (y, en general, en casi toda Latinoamérica) hay un desconocimiento de la magnitud de los riesgos que enfrenta el personal de los laboratorios y no existen mecanismos para la obtención y los análisis de datos sobre este tipo de situaciones, que en su mayoría pasan inadvertidas, a menos que sus consecuencias sean en extremo graves. Esta es una situación que debe abordarse desde el punto de vista bioético: la ética de la convivencia es un bien moral y,

como tal, debe ser estimulado. Existe un compromiso moral no explícito del hombre ante sí mismo y hacia la comunidad, por sus actos, que implica ante todo no perjudicar a los demás y, cuando se transgreden o no se incorporan los hábitos del buen manejo de elementos peligrosos, se falta a ese compromiso. Se define como Bioseguridad el conjunto de medidas técnicas, ingenieras y científicas, encargadas de proteger de los riesgos biológicos al hombre, a la comunidad y al ambiente. Como principios elementales tiene:

1. Técnicas y prácticas correctas de laboratorio.
2. Equipos de seguridad.
3. Diseño adecuado de las instalaciones de laboratorio.

El objetivo de la bioseguridad es preservar al hombre de los riesgos derivados del trabajo en el laboratorio, por lo que incluye, además de las medidas contra los riesgos biológicos, las relacionadas con la protección contra el daño por agentes químicos y físicos.

## AGENTES DE RIESGO

Los agentes potenciales de riesgo para la salud en el trabajo de los laboratorios se clasifican para su estudio en cuatro grupos:

1. Biológicos.
2. Químicos.
3. Físicos.
4. Humanos y ambientales.

## RIESGO BIOLÓGICO

En los laboratorios médicos, el riesgo principal es el biológico. Este puede traer como consecuencia que la persona sufra una enfermedad infecciosa, mediante el contacto con un agente patógeno (bacterias, hongos, virus, *rickettsias*) que esté presente en el material analizado. Todos los trabajos con estos agentes se realizan en laboratorios que, en dependencia de su designación pueden ser de investigación, de diagnóstico o de docencia.

En la actualidad, con los logros alcanzados en la biotecnología (ingeniería genética y tecnología celular), se pueden manipular y transferir genes de uno a otro organismo. Esto también entraña un riesgo en caso de accidente o de condiciones no adecuadas para el desarrollo del trabajo.

### Fundamentos del riesgo biológico en los laboratorios

El trabajo de laboratorio con microorganismos patógenos se realiza en condiciones específicas que pueden influir de manera negativa en la salud del

personal que labora con ellos. Es preciso desterrar la suposición de que el riesgo biológico es un problema que afecta, en lo fundamental, a los laboratorios de microbiología: toda muestra de sangre u otro fluido procedente de un ser humano debe considerarse potencialmente infeccioso. Las instalaciones donde se trabaje con microorganismos patógenos, constituyen, además, un foco potencial de contaminación para aquellas personas que se relacionan con sus trabajadores o se encuentran cerca de ellas. También existe el riesgo de que los microorganismos contaminen el ambiente de manera directa por averías, accidentes o vencimiento de los sistemas de seguridad instalados.

Las causas de riesgo biológico son:

1. Accidentes por punción.
2. Derrame de sustancias contaminadas.
3. Producción de aerosoles.
4. Cristalería rota contaminada.
5. Aspiración oral con pipeta (pipetear).
6. Trabajo con centrifugas, de forma incorrecta.
7. Mala higiene personal.
8. Contravenciones de las normas de seguridad más generales.
9. Inadecuada disposición de los desechos potencialmente contaminantes.

Los factores de los que depende la infección son:

1. Extensión de la contaminación.
2. Vías de infección:
  - a) Percutánea.
  - b) Ingestión.
  - c) Inhalación.
  - d) Ocular.
3. Virulencia del microorganismo.
4. Susceptibilidad del hospedero.

Se ha demostrado que la mayoría de los casos de infecciones adquiridas en laboratorios se deben a la formación de aerosoles, lo que constituye, por tanto, la fuente principal de contaminación. Las medidas de protección deben ser tomadas teniendo en cuenta esta situación, pero sin olvidar las demás fuentes posibles.

Las operaciones que contribuyen a la formación de aerosoles peligrosos son:

1. Apertura brusca de recipientes o contenedores de material infeccioso.
2. Trabajo con pipetas manuales o automáticas.
3. Soplar la última gota de una pipeta al pipetear.
4. Apertura de ampollitas con material liofilizado.
5. Abrir un frasco de cultivo o de suspensión líquida luego de agitarlo.

6. Remover, verter o cambiar grandes volúmenes de líquidos contaminados, de un recipiente a otro.
7. Agitar cultivos o muestras con pipetas.
8. Salpicaduras por agitación (sobre todo si se emplea un agitador tipo *vortex*).
9. Aperturas de centrifugas (producen grandes cantidades de aerosoles, en dependencia de la velocidad y el tiempo).

El aerosol que se forma en estas operaciones está constituido por partículas de diferentes tamaños que se propagan y precipitan por la fuerza de gravedad, las fuerzas electrostáticas y los procesos térmicos, sobre las distintas superficies que encuentren en su desplazamiento. De esta manera, forma las fuentes secundarias de contaminación, que constituyen un peligro potencial por las razones siguientes:

1. Son causa de contaminación por contacto directo.
2. Son fuente de contaminación por la reconversión en aerosoles, por el movimiento de las personas, por la limpieza u otras operaciones.

#### **Clasificación de los agentes biológicos en grupos de riesgo**

Según la OMS, se establecen cuatro grupos de riesgo para microorganismos que puedan causar daño en humanos y animales, atendiendo a la peligrosidad del agente y si el daño es individual o comunitario.

1. Grupo de riesgo I: trabajo con agentes que provocan escaso riesgo individual y comunitario. Son microorganismos con pocas posibilidades de provocar enfermedades en humanos o en animales (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, etc.).
2. Grupo de riesgo II: riesgo individual moderado y riesgo comunitario limitado. Agentes patógenos que pueden provocar enfermedades en humanos o en animales, pero tienen pocas posibilidades de entrañar un riesgo grande (*Brucella*, *Mycobacterium tuberculosis*).
3. Grupo de riesgo III: riesgo individual elevado y riesgo comunitario escaso. Las infecciones no se propagan de una persona a otra.
4. Grupo de riesgo IV: riesgo individual y comunitario elevado. Los microorganismos suelen provocar graves enfermedades en el hombre y en los animales y se propagan con facilidad.

En correspondencia con esto, los laboratorios han sido clasificados en distintos niveles de seguridad:

1. Laboratorio básico. Nivel de bioseguridad I: existe en la enseñanza básica. Se trabaja con agentes del grupo de riesgo I.
2. Laboratorio básico. Nivel de bioseguridad II: existe en los servicios primarios de salud y en la enseñanza

universitaria. Se trabaja con agentes del grupo de riesgo II. La mayoría de los laboratorios de nuestra red nacional de salud pertenece a este nivel.

3. Laboratorio de contención. Nivel de bioseguridad III: se crea para el diagnóstico especializado e investigaciones. Se trabaja con agentes del grupo de riesgo III.
4. Laboratorio de máxima contención. Nivel de bioseguridad IV: se crea para actividades especializadas. Se trabaja con agentes del grupo de riesgo IV.

Cada tipo de instalación tiene sus particularidades constructivas que garantizan la menor afectación al trabajador y al medio ambiente. Para los laboratorios básicos, con niveles de bioseguridad I y II, no se establecen requisitos especiales de diseño, salvo aquellos que garantizan confort y seguridad acorde con el grupo de riesgo que se manipula en ellos.

Para todos los casos se establece un grupo de obligaciones que deben ser cumplidas por todos los trabajadores de la instalación y que se conocen como *buenas prácticas de laboratorio* (BPL). Estas prácticas, unidas a la efectividad de los sistemas técnicos e ingenieros instalados, garantizan que el riesgo a que se somete el trabajador esté en el mínimo de posibilidad de afectarle y, por consiguiente, protegen el medio ambiente.

#### **RIESGO QUÍMICO**

El trabajo del laboratorio requiere la manipulación de sustancias químicas que, por sus propiedades, pueden resultar peligrosas para el hombre, para las instalaciones y para el medio ambiente. Estas propiedades se clasifican en explosivas, inflamables, tóxicas, corrosivas, irritantes y nocivas (cancerígenas, mutagénicas y teratogénicas):

1. Explosivas: se consideran las más peligrosas. Se incluyen en este grupo no solo las sustancias explosivas, sino también las sales metálicas, que por sí mismas, en ciertas mezclas o cuando se exponen al choque, fricción, cargas electrostáticas o al calor, pueden explotar, lo que tal vez provoque quemaduras al hombre o incendios en los locales de trabajo. También se incluyen derivados del acetileno, compuestos orgánicos nitroso y nitro, peróxidos orgánicos, azidas y ésteres de ácido nítrico, entre otros. Pueden ser explosivas, además, las mezclas de sustancias oxidantes (nitratos, cloratos, perclorato, ácido nítrico fumante) con sustancias comburentes o reductoras, por ejemplo, el ácido nítrico fumante reacciona con acetona o éter dietílico de manera explosiva. De igual forma, deben

tenerse en cuenta los gases en el laboratorio, importante fuente de riesgo.

2. Inflamables: se subdividen a su vez en muy inflamables (líquidos con punto de inflamación inferior a 0 °C y punto máximo de ebullición de 35 °C y mezclas de gases que con el aire a presión normal tienen un punto de encendido) e inflamables (líquidos con punto de inflamación inferior a 21 °C, peróxidos orgánicos, sustancias sólidas que son fáciles de inflamar o de arder sin llama por la acción de una fuente de encendido).
3. Tóxicas: pueden causar daños graves para la salud, a veces irreversibles, por absorción única, repetida o de larga duración, por vía oral, dérmica o inhalatoria. Se incluyen en este grupo las sustancias que desprenden un gas venenoso, en contacto con agua o ácido, o bajo la influencia de otras sustancias. Con estas propiedades están: el arsénico y sus combinaciones, el benceno, los cianuros, los éteres, los fluoruros y el mercurio, entre otras.
4. Corrosivas: este término se usa para sustancias que pueden destruir los tejidos vivos en el ser humano. Se incluyen los ácidos fuertes, álcalis y sustancias que causan irritación y quemaduras en la piel, en los ojos o en el aparato respiratorio, tanto por contacto como por desprendimiento de vapores. Además, pueden atacar a otras sustancias como metales y madera (ácidos: clorhídrico, nítrico, acético, sulfúrico; hidróxido de sodio o de potasio; sales de amonio cuaternario, halógenos, hipoclorito de sodio, etc.).
5. Irritantes: capaces de provocar una reacción inflamatoria local en los ojos, la piel o las vías respiratorias, que se mantiene como mínimo 24 horas, por lo general sin afectación severa de los tejidos (el acetaldehído, el formaldehído y el metanol son ejemplos de este grupo de sustancias).

Existe también un grupo de sustancias que producen un daño irreversible a la salud, de tipo muy específico y que se manifiesta mucho tiempo después de que ha tenido lugar la exposición al producto. De acuerdo con las características del daño producido se clasifican como sigue:

1. Mutagénicas: compuestos o sustancias que producen cambios químicos en la composición de bases del ADN, con distorsión de la información genética en las células germinales. Estos cambios conllevan daños (mutaciones) que serán reconocibles en los sucesores del individuo afectado (a veces después de varias generaciones). Entre estas sustancias podemos mencionar análogos de bases como el 5-bromouracilo y la 2-aminopurina; el ácido nitroso, las acridinas, los agentes alquilantes o desaminantes y la cafeína, entre otras.

2. Cancerígenas: agentes químicos cuyo efecto adverso es la producción de tumores malignos en el hombre y los animales. Los efectos biológicos de estos agentes son persistentes y acumulativos, es decir, entre la exposición y la aparición de un daño reconocible pueden transcurrir años, lo cual hace que su identificación sea difícil. Otra característica peculiar es que las dosis divididas en la mayoría de los casos, son más efectivas que las grandes dosis individuales.

Muchas de las sustancias capaces de provocar mutaciones son también cancerígenas. En la actualidad están consideradas como tales: las sales de arsénico, el polvo fino de asbesto, la bencidina, el benceno, la acrilamida y las sales de níquel, cadmio y cromo, entre otras, cuyo número aumenta de forma constante. Por ello, han sido retirados del mercado muchos reactivos y productos químicos que antes eran de uso habitual.

3. Teratogénicas: agentes que producen efectos sobre el embrión, y dan lugar a malformaciones irreversibles. Los daños causados aparecen en la nueva generación inmediata. El conocimiento de los productos químicos nocivos para el embrión es deficiente, en general, no resulta fácil fundamentar ni cuantificar el riesgo y, justo por ese motivo, las medidas preventivas revisten importancia fundamental.
4. Otras: existe un grupo de sustancias químicas que tienen especial interés para las personas dentro del riesgo químico. Estas, por sí mismas, no resultan nocivas, pero cuando se ponen en contacto con otra sustancia pueden provocar reacciones violentas y formar compuestos explosivos o altamente tóxicos. Son denominadas sustancias químicas incompatibles y deben ser almacenadas en estantes independientes y manipularlas con mucha cautela.

La señalización correspondiente a todos estos grupos de sustancias, normada por la Unión Europea, se muestra al final de este capítulo.

## RIESGO FÍSICO

Los agentes físicos pueden provocar daños considerables o, incluso, causar la muerte al ser humano durante el trabajo en el laboratorio. Los riesgos de este tipo se agrupan en:

1. Mecánicos:
  - a) Objetos que interfieren con el movimiento y pueden provocar caídas.
  - b) Objetos en movimiento (motores, centrifugas, compresores, etc.).

- c) Objetos con energía potencial que se encuentran mal ubicados (en estantes altos, por ejemplo, que pueden caer sobre las personas) u objetos sometidos a altas presiones.
- 2. Térmicos:
  - a) Fuego (mecheros de Bunsen, por ejemplo).
  - b) Equipos que generan temperaturas muy altas o muy bajas (hornos, congeladores).
- 3. Eléctricos:
  - a) Cables y equipos eléctricos defectuosos.
  - b) Ausencia de conexión a tierra.
  - c) Errores operacionales. Incluyen, además de la posibilidad de *shock*, la de fuego, pues las chispas actúan como fuente de ignición. También los propios equipos pueden sufrir daños serios.
- 4. Radiaciones: entre las radiaciones, las ionizantes son las que presentan un mayor potencial de riesgo (rayos alfa, beta o gamma) y sus fuentes más importantes son los isótopos radiactivos empleados para radioinmunoensayo (RIA). No obstante, otras fuentes de radiaciones no ionizantes pueden tener también importancia (luz ultravioleta y rayos láser).

## RIESGO CONDICIONADO A FACTORES HUMANOS Y AMBIENTALES

Existe además un grupo de factores humanos y ambientales que pueden incrementar de manera considerable el riesgo de los otros factores y que pueden estar relacionados con las aptitudes y habilidades para el trabajo, el estado físico y psicológico del trabajador, su capacidad intelectual y entrenamiento laboral, así como la organización general y las condiciones ambientales del laboratorio.

Entre los factores humanos están: el estado físico del trabajador, sus problemas de salud, problemas personales, fatiga, apatía o consumo de algunos medicamentos que pueden provocar reacciones lentas, dificultad para la concentración y para la percepción de los riesgos; desconocimiento de las medidas en el laboratorio por falta de comunicación o exceso de confianza, y los estereotipos negativos.

Los factores ambientales implican tener en cuenta las características de las condiciones de trabajo a que está sometido el hombre y que pueden afectar también al trabajo. Entre estos se encuentran: temperatura (condiciones adecuadas para poder realizar el trabajo: ni muy bajas ni muy altas), humedad, ventilación e iluminación adecuadas.

## MEDIDAS DE SEGURIDAD EN EL LABORATORIO CLÍNICO

En el laboratorio se deben establecer prácticas de higiene personal, como:

1. No ingerir o guardar cualquier tipo de alimento o bebida en el local del laboratorio, sobre todo en los refrigeradores donde se guardan muestras infecciosas, cultivos de microorganismos, agentes químicos o soluciones.
2. No fumar ni maquillarse en el puesto de trabajo.
3. Manipular las muestras biológicas con guantes. No llevarse las manos a la cara, los ojos, ni la boca durante el trabajo, para evitar la autoinoculación.
4. No llevarse objetos a la boca.
5. Prohibir el pipeteo bucal. Utilizar pipetas automáticas o emplear peras de goma u otro dispositivo similar.
6. Cambio de guantes según lo requiera el trabajo y en caso de accidente.
7. Al finalizar cualquier tipo de actividad y durante su estancia en el laboratorio, lavarse bien las manos de manera frecuente.
8. Utilizar siempre las prendas de vestir apropiadas para el trabajo que se va a realizar.
9. No extraer el vestuario del laboratorio sin antes descontaminarlo.
10. Usar equipos de protección cuando el trabajo lo requiera (careta, respirador, gorro, tapabocas, gafas protectoras, etc.).
11. Desinfectar el puesto de trabajo antes de comenzar cualquier labor.
12. Mantener el laboratorio limpio y retirar de este cualquier material que no tenga relación con el trabajo.
13. Mantener las puertas cerradas durante el trabajo.
14. Evitar la caída de gotas o el derrame de líquidos sobre las mesetas (poner papel de filtro, gasa, algodón o paño húmedo con desinfectante, etc.).
15. No soplar la última gota de una pipeta.
16. No homogeneizar con la pipeta, soplando e inhalando después.
17. No dejar caer el contenido de la pipeta de manera directa en un líquido, sino dejarlo rodar por las paredes del recipiente (tubo, frasco).
18. No levantar la tapa de una centrífuga después de terminada una centrifugación, debe abrirse luego de 10 min si se trabaja con material infectado o contaminado.
19. Abrir con cuidado una preparación liofilizada (procurar no herirse al romper la ampolla).

20. Todos los derramamientos accidentales se deben limpiar de inmediato con agua y detergente, y proceder después a la desinfección de la superficie sobre la que tuvo lugar. Estos derrames, así como la exposición accidental a un material infeccioso deben ser notificados con rapidez al jefe del laboratorio.

## CONTROL DE ACCESO AL LABORATORIO

Se debe mantener un control estricto en el laboratorio:

1. Control del personal que debe permanecer en el laboratorio.
2. Chequear (todos los días) los equipos de trabajo.
3. Chequear y organizar el trabajo que se va a realizar.
4. No permitir el acceso de personal ajeno a las funciones del departamento.

## REGLAS DE SEGURIDAD PARA EL EMPLEO DE SUSTANCIAS QUÍMICAS

Entre las reglas de seguridad que se deben establecer para el uso de sustancias químicas está:

1. Todo producto químico debe estar contenido en un envase adecuado, que garantice el cierre hermético, debidamente identificado y rotulado con los símbolos de peligrosidad correspondientes.
2. El local empleado como almacén debe ser fresco, ventilado y seguro. Las sustancias explosivas e inflamables requieren normas de almacenamiento especiales que deben cumplirse estrictamente. Colocar señalamientos de peligro donde se requiera.
3. No acumular recipientes con sustancias químicas en las mesetas de trabajo ni en la campana de extracción de gases.
4. Utilizar protección individual adecuada (espejuelos de seguridad, delantal y guantes gruesos) en todas las operaciones que lo requieran. Los productos que desprenden vapores tóxicos o irritantes deben manipularse en una campana de extracción que cumpla las exigencias de seguridad correspondientes.
5. Evitar todo contacto de sustancias químicas con la piel, los ojos y la boca.
6. Enjuagar de inmediato, con abundante agua fría, todas las salpicaduras.
7. Enjuagar los ojos con un chorro suave de agua, si ha ocurrido contacto con sustancias corrosivas o irritantes.
8. Despojarse de inmediato de cualquier prenda de ropa impregnada con algún producto químico.
9. No pipetear con la boca.
10. Evitar el contacto entre sustancias incompatibles.

## REGLAS DE SEGURIDAD CONTRA RIESGOS POR AGENTES FÍSICOS

Entre las reglas de seguridad que se deben establecer contra riesgos por agentes físicos está:

1. Instalaciones apropiadas para el tipo de trabajo y la cantidad que se realiza. Adecuada distribución del mobiliario y de los equipos. Evitar que se obstruya la circulación del personal y, sobre todo, mantener libres las salidas.
2. Sistema de ventilación apropiado, que garantice la adecuada entrada y salida de aire sin recirculación.
3. Antes de instalar un equipo nuevo, chequear que existan los requisitos básicos de seguridad eléctrica.
4. Ningún equipo debe producir un ruido por encima de 70 decibeles (dBA) o vibraciones excesivas.
5. Los equipos no deben representar un riesgo mecánico para el trabajador. Debe tenerse especial cuidado con las partes móviles de estos.
6. Ingeniería de protección contra incendios. Ubicación adecuada de extintores y otros medios necesarios para combatir un incendio local.
7. Mantener las redes eléctricas y los equipos en adecuado estado técnico y evitar la sobrecarga de las líneas. Proveer de conexión a tierra todos los equipos eléctricos y no dejarlos encendidos al terminar el trabajo, a menos que ello sea necesario. Las tomas de corriente deben estar identificadas de acuerdo con su voltaje.
8. No conservar sustancias inflamables en el refrigerador ni cerca de fuentes de ignición.
9. Evitar cualquier exposición innecesaria a las radiaciones, así como evitar que sean contaminados personas, objetos o el ambiente. Manipular estas sustancias protegiéndose con guantes y sobrebata.
10. Esforzarse por lograr tiempos cortos de exposición a las sustancias radiactivas y no manipular más cantidades que las necesarias.
11. Asegurar una adecuada disposición de los desechos radiactivos.

## ELEMENTOS DEL PROGRAMA DE BIOSEGURIDAD

La elaboración y desarrollo del Programa de Bioseguridad en un laboratorio es una responsabilidad del jefe. Para ser efectivo, este programa debe incluir el entrenamiento y motivación del personal, con el objetivo de desarrollar actitudes positivas y eliminar estereotipos negativos: son los propios trabajadores, en última instancia,

quienes deciden si van a trabajar seguros. La confección del programa incluye los pasos siguientes:

1. Diagnóstico de la situación:
  - a) Determinación de factores de riesgo.
  - b) Determinación de puntos focales de riesgo.
2. Determinación de prioridades.
3. Organización administrativa.
4. Asignación de recursos.
5. Desarrollo de programas educativos.
6. Asignación de responsabilidades y deberes.

El Programa de Bioseguridad es específico para cada laboratorio, en dependencia de sus características particulares y de su carga de trabajo. Los elementos generales que debe incluir son los siguientes:

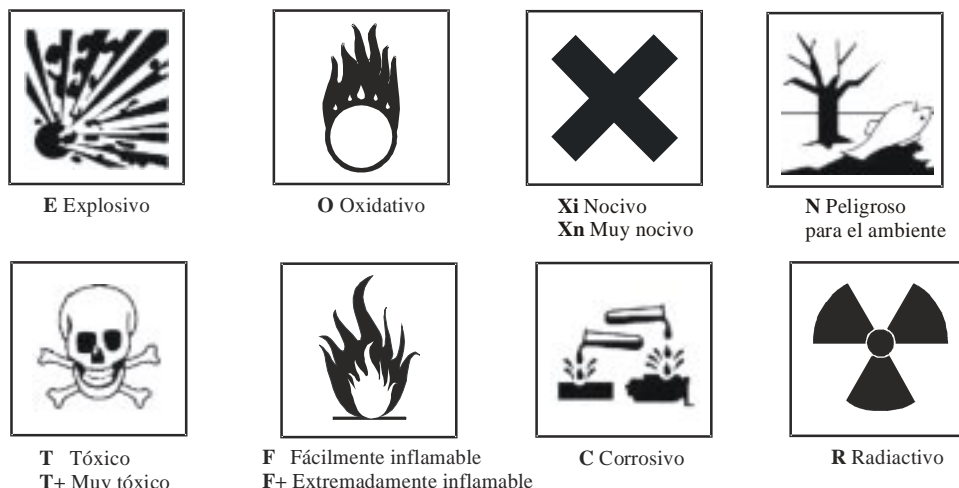
1. Medidas de protección del personal, además de las buenas prácticas de laboratorio, uso de equipos para la protección, conservación de normas de higiene personal, realización de exámenes médicos periódicos e inmunización (contra el tétanos y la hepatitis B), entre otras.
2. Medidas para el cuidado y mantenimiento de las instalaciones y los equipos.
3. Medidas de seguridad en la obtención y manipulación de muestras biológicas y en el manejo y conservación de sustancias químicas y radiactivas.

4. Medidas de emergencia.
5. Disposición de desechos.
6. Registros, inspecciones y auditorías.

Una vez confeccionado, el programa debe estar incluido en el *Manual de procedimientos del laboratorio* y mantenerse al alcance de todo el personal para que pueda ser consultado cada vez que sea necesario. Debe revisarse de manera sistemática (al menos una vez al año), con el objetivo de evaluar su efectividad, así como de introducir las enmiendas necesarias. Si el tamaño o la carga de trabajo del laboratorio lo demandan, debe nombrarse un profesional responsable de la seguridad. Este velará por el cumplimiento del programa, llevará los registros correspondientes y brindará asesoría al jefe del departamento para la evaluación y actualización del documento.

## SEÑALIZACIONES

Las señalizaciones de riesgo químico recomendadas por la Unión Europea, que se emplean en casi todos los países, deben aparecer en las etiquetas de los frascos que contienen las sustancias, según las características a las que corresponden; algunas, como las de riesgo radiactivo, pueden identificar locales (figura 1.19).



**Figura 1.19** Símbolos de riesgo químico.

## BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- Bernabei D. Seguridad. Manual para el laboratorio. Darmstadt: Ed. GfT Verlag, 1994.
- Betances de Holguín N, Andújar de Báez G, García-Peguero BO (eds.). Principios de Bioseguridad. Santo Domingo: Ed. Universitaria UASD, 1989.
- Castillo de Sánchez ML, Fonseca Llerena ME (eds.). Mejoría continua de la calidad. Guía para los Laboratorios Clínicos de América Latina. México D. F: Ed. Médica Panamericana, 1995.

- Coto CE, Lucero NE (coordinadoras). Simposio sobre Bioseguridad, V Congreso Argentino de Microbiología. Mar del Plata, Nov. 1988.
- Dibkaer R, Martín DV, Rowan RM (eds.). Good practice in decentralized analytical clinical measurement. Copenhagen: ECCLS, IFCC, WHO, 1992.
- Furr AK, Ed. CRC Handbook of Laboratory Safety. 4<sup>th</sup> ed. Boca Ratón: CRC Press INC, 1995.
- World Health Organization: Laboratory Biosafety Manual. 2<sup>nd</sup> ed. Geneva: WHO, 1993.



# CONTENIDO

---

## **Introducción/ 85**

### **Desarrollo del radioinmunoensayo/ 86**

- Reacción básica del radioinmunoensayo/ 86
- Características del anticuerpo. Ensayos homólogos y heterólogos/ 86
- Uso de anticuerpos monoclonales/ 86
- Métodos de separación de la fracción libre y la unida/ 87
- Cálculo de las concentraciones/ 87
- Aplicaciones, ventajas y desventajas del radioinmunoensayo/ 87

### **Ensayos inmunoradiométricos/ 88**

- Reacción básica del ensayo inmunoradiométrico/ 88
- Sistemas de separación/ 88
- Métodos de cálculo de concentraciones/ 88
- Aplicaciones, ventajas y desventajas del ensayo inmunoradiométrico/ 88

### **Otras técnicas isotópicas/ 88**

- Ensayos de receptores como técnicas de detección/ 88
- Ensayos de receptores aplicados a la investigación/ 88
- Métodos de cálculo/ 89

### **Ligandos alternativos/ 89**

- Proteínas de unión específicas: naturales o diseñadas/ 89
- Receptores heterólogos como ligandos/ 89

### **Marcadores alternativos/ 89**

- Isótopos de vida media muy corta, larga y muy larga/ 90
- Marcadores no isotópicos/ 90

### **Enzimoinmunoensayos/ 90**

- Reacción básica del enzimoinmunoensayo/ 90
- Separación de la fracción libre y la unida/ 90
- Cálculo de las concentraciones/ 91
- Aplicaciones, ventajas y desventajas del enzimoinmunoensayo/ 91
- Variantes más extendidas/ 91

### **Fluorescencia/ 91**

- Reacción básica de los ensayos fluorescentes/ 91
- Variantes más extendidas/ 92
- Aplicaciones, ventajas y desventajas de los ensayos fluorescentes/ 92

### **Luminiscencia/ 92**

- Reacción básica de los ensayos luminiscentes/ 92
- Variantes más extendidas/ 92
- Aplicaciones, ventajas y desventajas de los ensayos luminiscentes/ 93

### **Inmunoensayos automatizados/ 93**

### **Selección del método de ensayo/ 93**

### **Bibliografía recomendada/ 93**

# PARTE I. GENERALIDADES

## Capítulo 10

### INMUNOQUÍMICA

Lic. Cella A. Alonso Rodríguez

#### RESUMEN

Todos los métodos agrupados bajo la denominación común de *inmunoensayos* se basan en la reacción de una proteína (anticuerpo específico) con un antígeno marcado y con un antígeno endógeno (el que se quiere determinar). Ambos antígenos compiten por la unión con el anticuerpo y ello ha hecho que estas metodologías reciban también el nombre de *ensayos de unión competitiva*. Su introducción en la década de los 60 del siglo xx significó una verdadera revolución en el laboratorio médico. La sensibilidad del empleo de isótopos radiactivos primero y de otros ligandos después, unido a la alta especificidad de las proteínas de unión, hizo posible alcanzar la sensibilidad y especificidad necesarias para medir con precisión las concentraciones fisiológicas de sustancias que se encuentran en el plasma: en microgramos, nanogramos y picogramos. En este capítulo se resumen las características principales de las técnicas de unión competitiva más empleadas en los laboratorios.

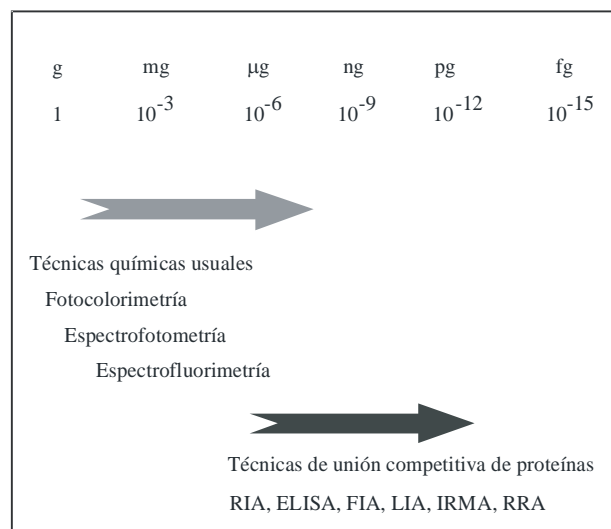
#### INTRODUCCIÓN

##### Principios y aplicación de los ensayos de ligandos

Cuando los exámenes de laboratorio estaban limitados a la medición de sustancias en cantidades de gramos, miligramos y, de manera ocasional, microgramos, el desarrollo de las técnicas radioisotópicas hizo posible por primera vez determinar sustancias presentes en muy pequeñas concentraciones en los fluidos biológicos. La combinación de los radioisótopos con la alta especificidad de las proteínas de unión hizo posible la sensibilidad y especificidad para medir con precisión, las concentraciones fisiológicas de sustancias en: microgramos, nanogramos y picogramos ( $10^{-6}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-12}$ , respectivamente) (figura 1.20).

La base de la teoría de los ensayos de unión competitiva de proteínas fue demostrada primero por Berson y Yalow; se planteaba que la adición de cantidades crecientes de antígeno a una mezcla que contiene cantidades fijas de anticuerpo en exceso y de antígeno marcado, causaba una gradual disminución en la cantidad de este último unido al anticuerpo, proporcional al incremento en el antígeno no marcado.

Berson y Yalow trabajaban con pacientes diabéticos, insulino dependientes y realizaron experimentos de supervivencia de insulina marcada con yodo ( $^{131}\text{I}$ ). Encontraron que en algunos de ellos la supervivencia de esta hormona era muy prolongada e identificaron que estaba unida a la fracción de inmunoglobulinas del suero,



**Figura 1.20** Niveles de detección de inmunoensayos y otras técnicas de laboratorio.

por lo cual infirieron la existencia de anticuerpos específicos para la insulina en estos pacientes.

Su genialidad consistió en llegar a invertir el hecho fundamental de este hallazgo, para revolucionar las metodologías de determinación de sustancias en fluidos biológicos. Cuando introdujeron la técnica del radioinmunoensayo, en 1960, para la hormona insulina, lograron invertir la posibilidad de detección hasta el nivel de picogramos. Con ello culminó una década de trabajo intenso sobre la naturaleza de la unión, producción e interacción de los anticuerpos con antígenos marcados y no marcados. Este considerable aporte al desarrollo del laboratorio les valió, en 1979, el Premio Nobel de Química.

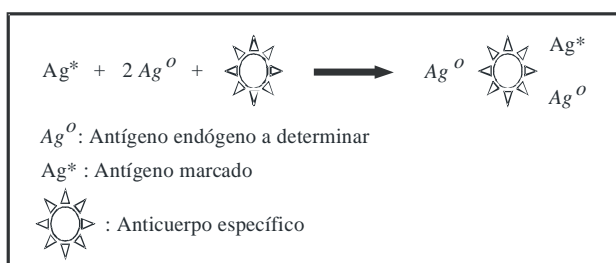
## DESARROLLO DEL RADIOINMUNOENSAYO

El radioinmunoensayo (RIA) fue la primera de las técnicas de unión competitiva de proteínas desarrollada.

## REACCIÓN BÁSICA DEL RADIOINMUNOENSAYO

Este ensayo se basa en la reacción de una proteína (anticuerpo específico) con un antígeno marcado isotópicamente, y con un antígeno endógeno, el que se quiere determinar, según el esquema siguiente (figura 1.21).

Por la Ley de acción de masas, los sitios de unión del anticuerpo serán ocupados por los antígenos marcado y endógeno, en forma proporcional a las concentraciones relativas que tienen en el medio de reacción. Para ello es imprescindible que se cumplan dos condiciones: que el anticuerpo se encuentre en concentración limitada (para que haya concurrencia entre antígeno marcado y no marcado por sus sitios de unión), y que haya similar avidez de ambos antígenos, por los sitios de unión del anticuerpo.



**Figura 1.21** Reacción básica del radioinmunoensayo.

## CARACTERÍSTICAS DEL ANTICUERPO. ENSAYOS HOMÓLOGOS Y HETERÓLOGOS

Las características más importantes de un anticuerpo para que sea utilizado en el RIA son: alta especificidad, gran avidez por el antígeno y elevado título. El anticuerpo debe ser utilizado en una concentración conocida y limitada, para que la reacción se mantenga en la llamada zona de equivalencia.

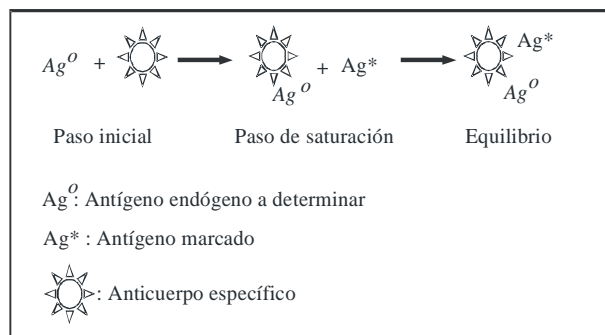
Si el anticuerpo es levantado con el mismo antígeno que se va a detectar, y el antígeno marcado también, se considera un ensayo homólogo, en el caso contrario, es un ensayo heterólogo.

La principal diferencia es que para los ensayos heterólogos se considera necesario un determinado tiempo de *ventaja* para el antígeno que se va a detectar, si es el de especie distinta. Por tanto, en lugar de un RIA de competencia, se convertiría en un ensayo de saturación, lo que permite que el antígeno endógeno se una preferentemente al anticuerpo y luego se añade el antígeno marcado, que satura los sitios libres del anticuerpo (figura 1.22).

Este tipo de ensayo de saturación también se utiliza para antígenos que se encuentran en muy pequeñas concentraciones (por ejemplo, las hormonas hipofisarias).

## USO DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

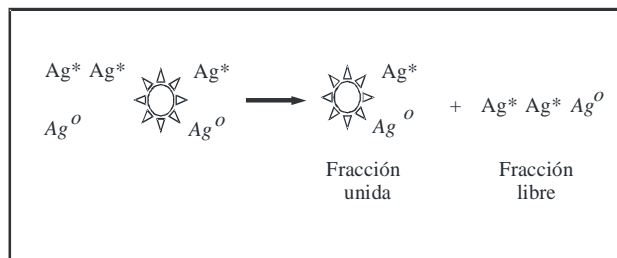
El desarrollo de este tipo de anticuerpos mejoró de manera notable la eficiencia de las técnicas isotópicas y disminuyó, en mucho, el efecto de reacción cruzada entre proteínas, el cual se presentaba con los antiseros policlonales cuando había cadenas comunes entre el antígeno que se iba a determinar y otros presentes en la muestra. Estos anticuerpos reconocen un epítipo específico de la proteína que se desea detectar, y pueden utilizarse en combinación: se fija uno a la superficie, y se marca el otro, como se aprecia en las técnicas sándwich y en el ensayo inmunorradiométrico (IRMA).



**Figura 1.22** Ensayo de saturación.

## MÉTODOS DE SEPARACIÓN DE LA FRACCIÓN LIBRE Y LA UNIDA

Una vez desarrollada la reacción, debe separarse el complejo antígeno-anticuerpo del medio donde aún queda antígeno marcado libre y antígeno endógeno, para poder cuantificar la radiactividad unida al anticuerpo (figura 1.23).



**Figura 1.23** Separación de la fracción libre y la unida al anticuerpo.

Los primeros métodos de separación usados fueron la electroforesis y la cromatografía en papel, pero ambos se desecharon muy rápido por la lentitud, laboriosidad y gran contaminación que producían. En la actualidad se emplean los siguientes:

1. Físicos: fundamentalmente de adsorción sobre partículas como el carbón activado, micelas de carbón con dextranos, etc. Son muy laboriosos y necesitan temperaturas muy fijas (por ejemplo 4 °C, trabajar en bandejas con hielo, centrifugación refrigerada, etc.). También se emplea la extracción de líquido del medio para hacer que el complejo antígeno-anticuerpo precipite con más facilidad, con sustancias que absorben el agua: polietilenglicol.
2. Químicos: se basan sobre todo en desnaturalizar la proteína para precipitarla. Son muy inespecíficos, pues puede precipitarse también antígeno marcado. La precipitación se hace con solventes orgánicos, ácidos y álcalis débiles.
3. Inmunológicos: consisten en el uso de un segundo anticuerpo contra el primer anticuerpo que aumente el tamaño del complejo y, por tanto, precipite más rápido.
4. Combinados: se basan en el empleo de dos de los métodos anteriores, por ejemplo, un segundo anticuerpo con polietilenglicol. Es el más usado en la actualidad.

Se han desarrollado ensayos comerciales que utilizan un anticuerpo fijado a la pared del tubo. Esto elimina la necesidad de métodos de separación complicados, pues basta con decantar el líquido sobrante.

Una vez separadas las fracciones libre y unida, se cuantifica la radiactividad y se compara con una curva de concentraciones conocidas de antígeno frío, que se utiliza como calibrador.

## CÁLCULO DE LAS CONCENTRACIONES

Los métodos de cálculo más usuales incluyen la fracción isotópica unida al anticuerpo (fracción unida) por comparación al llamado 100 % de unión, unión máxima o unión en ausencia de antígeno. Con frecuencia se utilizan los logaritmos de los índices de fracción unida/fracción libre o artificios matemáticos.

Por sus características especiales, los ensayos de ligando han requerido sistemas de cálculo diferentes, como el diseño del LOGIT (logaritmo inverso [de la fracción unida/la unión máxima]). Este artificio matemático logra que la curva del RIA sea lineal y mejora la proporcionalidad entre la señal isotópica y la concentración del antígeno que se va a determinar.

## APLICACIONES, VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL RADIOINMUNOENSAYO

El RIA se utiliza en la actualidad para determinar hormonas, vitaminas, neuropéptidos, monoaminas y otras sustancias que se encuentran en pequeñas concentraciones en los fluidos biológicos y en otros muchos medios.

Las ventajas principales son su especificidad, sensibilidad y reproducibilidad que, unidas a la constancia de la señal isotópica y a la duración, hacen de este método uno de los más robustos de la tecnología moderna.

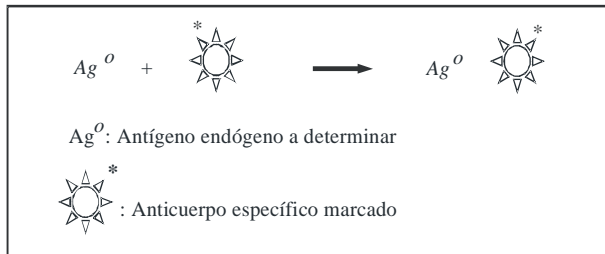
Las desventajas son la necesidad de equipos especiales y el uso de isótopos radiactivos, lo que implica la sujeción a múltiples normas para la utilización, conservación y desecho de estos productos, de acuerdo con las legislaciones de cada país y con las normativas internacionales.

## ENSAYOS INMUNORRADIOMÉTRICOS

El IRMA es una variante del radioinmunoensayo, con la diferencia de que lo marcado, en este caso, es el anticuerpo específico, por lo que la señal isotópica es directamente proporcional a la concentración de antígeno que se va a determinar.

### REACCIÓN BÁSICA DEL ENSAYO INMUNORRADIOMÉTRICO

Para la reacción básica véase la figura 1.24.



**Figura 1.24** Reacción básica de los ensayos inmunorradiométricos.

### SISTEMAS DE SEPARACIÓN

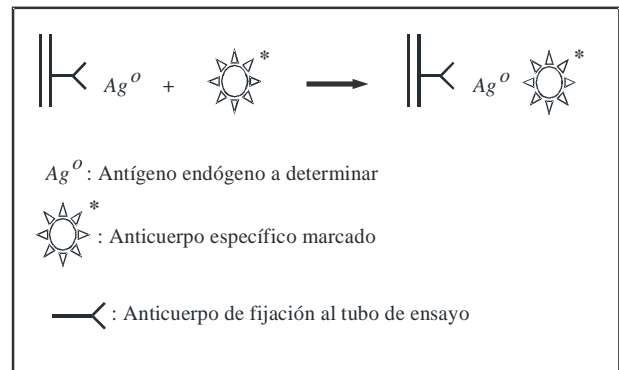
Por lo general, los sistemas de separación son diseñados con un doble anticuerpo, en el que hay un segundo anticuerpo que puede:

1. Atrapar al antígeno endógeno para que sea identificado por el anticuerpo marcado.
2. Atrapar al complejo antígeno-anticuerpo marcado.

En la actualidad se utilizan con mucha frecuencia anticuerpos monoclonales, que son mucho más específicos y sensibles. Permiten combinar con mayor facilidad anticuerpos contra dos epítopes diferentes de una misma molécula. Con ello se ha conseguido diseñar un ensayo muy sensible con un anticuerpo adherido a la pared del tubo, que atrapa al antígeno y un segundo anticuerpo que se una al antígeno por otro fragmento. Estos son los llamados ensayos sándwich (figura 1.25).

### MÉTODOS DE CÁLCULO DE LAS CONCENTRACIONES

Como no hay concurrencia, el cálculo de las concentraciones es sencillo, la señal detectada es directamente proporcional a la existencia del antígeno endógeno en la muestra.



**Figura 1.25** Ensayo de sándwich.

### APLICACIONES, VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL ENSAYO INMUNORRADIOMÉTRICO

Las sustancias a las que se aplican los métodos isotópicos son, sobre todo, aquellas que tienen concentraciones muy pequeñas, como las hormonas hipofisarias, y los anticuerpos que al ser marcados no pierdan las características necesarias, antes expuestas.

Los ensayos sándwich se consideran más sensibles que los RIA similares. Su principal desventaja es que el marcaje de anticuerpos es difícil, pues con frecuencia durante este proceso se alteran las características necesarias para que el ensayo sea exitoso. Además, implica el uso de isótopos como en el RIA y la necesidad de contadores de radiactividad para la detección de la señal.

### OTRAS TÉCNICAS ISOTÓPICAS

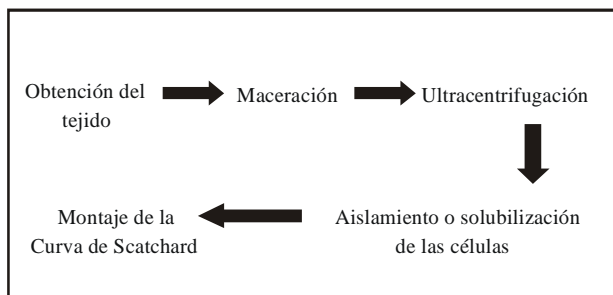
Los ensayos de receptores (RRA) son muy diversos en cuanto a objetivos y métodos, y dependen principalmente de los objetivos.

### ENSAYOS DE RECEPTORES COMO TÉCNICAS DE DETECCIÓN

Este tipo de ensayos se utiliza sobre todo en fragmentos de tejidos extraídos por biopsias o cirugías y, sobre todo, en la detección de receptores hormonales en tejidos malignos, los cuales pueden orientar en cuanto a la conducta que se debe seguir con un paciente (figura 1.26).

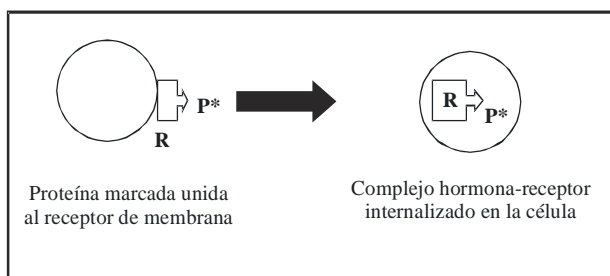
### ENSAYOS DE RECEPTORES APLICADOS A LA INVESTIGACIÓN

Los ensayos de receptores aplicados a la investigación son utilizados con intereses muy específicos.



**Figura 1.26** Ensayo de receptores en muestras de tejidos.

Se desarrollan sobre todo en células vivas o en fragmentos de tejidos recién obtenidos, pues se considera fundamental también el proceso de internalización del complejo hormona-receptor (figura 1.27).



**Figura 1.27** Ensayo de receptores celulares aplicados.

## MÉTODOS DE CÁLCULO

En su mayoría, los ensayos de receptores se basan en la técnica de Scatchard, tanto si usan la curva completa o la técnica del punto único. El principio básico de esta técnica es la unión del antígeno marcado isotópicamente con su receptor celular (ya sea en célula blanca íntegra, en homogenizado de tejido o en fracción celular separada por ultracentrifugación precisa).

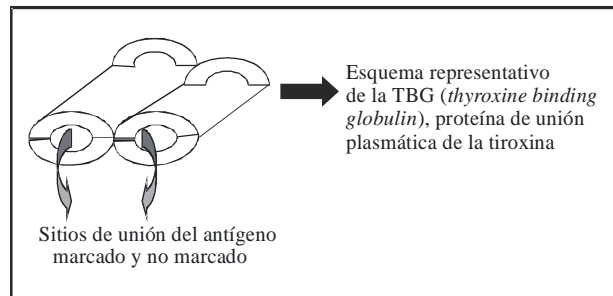
Para cada concentración de isótopo marcado se usa un blanco, cuyos receptores son previamente “bloqueados” con antígeno “frío” (sin marcar), lo que impide la unión específica.

Se construye entonces una curva del producto unido/libre (*bound/free*) en el eje Y, contra la concentración de antígeno marcado añadido en cada punto. La distribución de los puntos puede ser sobre una línea recta (una sola población de receptores saturables) o sobre dos nubes de puntos (dos poblaciones de receptores no saturables) o combinaciones de ambos.

## LIGANDOS ALTERNATIVOS

Los ligandos alternativos son aquellos que por características peculiares pueden servir para unir a los

antígenos en lugar de los anticuerpos, por ejemplo, proteínas de transporte de las hormonas tiroideas (TBG) y del cortisol (CBG) fueron utilizadas durante décadas para desarrollar los *ensayos de unión competitiva de proteínas* (CPBA), que fueron los primeros ensayos isotópicos para pequeñas moléculas (figura 1.28).



**Figura 1.28** Principio del ensayo de unión competitiva: proteína de transporte como ligando alternativo.

## PROTEÍNAS DE UNIÓN ESPECÍFICAS: NATURALES O DISEÑADAS

En la actualidad se utilizan poco los CPBA; el desarrollo tecnológico ha resuelto las dificultades para el diseño de anticuerpos y su obtención rutinaria en una cantidad suficiente para suplir las necesidades del diagnóstico. Pero en caso de que no se cuente con un anticuerpo específico, siempre es válido recurrir a las proteínas de unión naturales, por lo general fáciles de obtener.

En este siglo XXI, con mayor frecuencia cada vez, se obtienen productos de síntesis, diseñados según las necesidades de la tecnología, y así ocurre también con proteínas de unión para ensayos muy especiales.

## RECEPTORES HETERÓLOGOS COMO LIGANDOS

Pocas veces se usa un receptor como proteína de unión específica. Tal es el caso de los receptores de mucosa intestinal de pollo que, durante mucho tiempo, fueron los ligandos de elección para la medición de la vitamina D<sub>3</sub> marcada con tritio (<sup>3</sup>H).

## MARCADORES ALTERNATIVOS

Hasta el momento se ha hecho referencia al yodo y a sus isótopos como marcadores; pero existen otros átomos capaces de almacenar y de emitir energía, como el cobalto, el fósforo, el hierro, el cromo y el azufre. Cada uno tiene aplicaciones específicas, así como también un nivel (ventana) de emisión de energía



característico en el espectro, lo que permite utilizar dos isótopos para detectar, en la misma muestra, dos sustancias a la vez. Estos son los llamados ensayos de doble marcaje (tabla 1.17).

Tabla 1.17 Marcadores alternativos: ventanas de energías de otros isótopos

Nombre	Símbolo	Vida media
Tritio	<sup>3</sup> H	12,3 años
Carbono	<sup>14</sup> C	5 730 años
Fósforo	<sup>32</sup> P	14,3 días
Azufre	<sup>35</sup> S	87,1 días
Cromo	<sup>51</sup> Cr	27,8 días
Hierro	<sup>59</sup> Fe	45 días
Cobalto	<sup>57</sup> Co	270 días
Cobalto	<sup>60</sup> Co	5,26 años
Tecnecio	<sup>99</sup> Tc	6 horas
Yodo	<sup>125</sup> I	60 días
Yodo	<sup>131</sup> I	8 días

ISÓTOPOS DE VIDA MEDIA MUY CORTA, LARGA Y MUY LARGA

Al principio, en los RIA se utilizaron isótopos como el <sup>131</sup>I de vida media muy corta, luego se han empleado isótopos de vida media larga (como <sup>3</sup>H, 10 años de vida media), y el <sup>14</sup>C, con una vida media de miles de años, lo que hace a los primeros muy poco útiles, y al segundo y tercero muy contaminantes para el uso de rutina.

MARCADORES NO ISOTÓPICOS

Con el desarrollo tecnológico se comenzaron a utilizar otros marcadores, cromógenos, sustancias fluorescentes, luminiscentes, tierras raras, etc. En el cuadro 1.5 se muestran algunos de los ensayos específicos desarrollados

Cuadro 1.5 Marcadores no isotópicos

Quimioluminiscencia Éster de acridinium, isoluminol, luminol	
Enzima	Fosfatasa alcalina, luciferasa, betagalactosidasa, glucosa oxidasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, peroxidasa de rábano picante, lisozima, malato deshidrogenasa, microperoxidasa, ureasa, xantina oxidasa
Fluoróforos	Quelatos de Europio, fluoresceína, ficoeritrinas, Quelatos de Terbio
Radicales libres	Nitróxido
Inhibidores	Metrotexate
Metales	Oro soluble, selenio soluble, plata soluble
Partículas	Bacteriófagos, eritrocitos, esferas de látex, liposomas
Sustratos	Galactosil-umbeliferona

con estos marcadores alternativos, en los cuales siempre se utilizan enzimas que acortan el tiempo de desarrollo de los ensayos, y aportan características peculiares a los inmunoensayos.

ENZIMOINMUNOENSAYOS

REACCIÓN BÁSICA DEL ENZIMOINMUNOENSAYO

La técnica de enzimoinmunoensayo (ELISA) se desarrolló a partir del RIA. La diferencia fundamental es la sustitución del isótopo por la unión de una enzima al anticuerpo, que “activa” al marcador alternativo (sustancia que emite la señal), cuando se libera al producirse la unión del anticuerpo con el antígeno que se quiere detectar. Por lo general, ello acorta el tiempo de incubación de los ensayos (figura 1.29).

La mayor parte de los enzimoinmunoensayos son de origen comercial, desarrollados originalmente en pequeños viales. En la actualidad se utilizan microplacas que facilitan el trabajo, muchas de ellas con pocillos desprendibles para ahorrar reactivos.

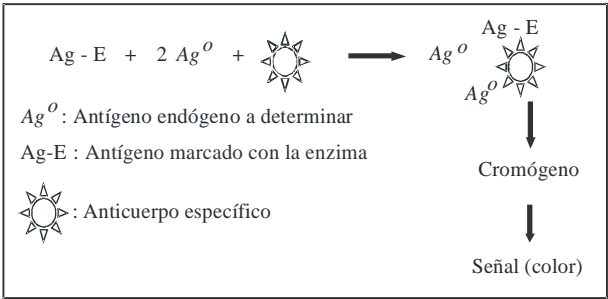
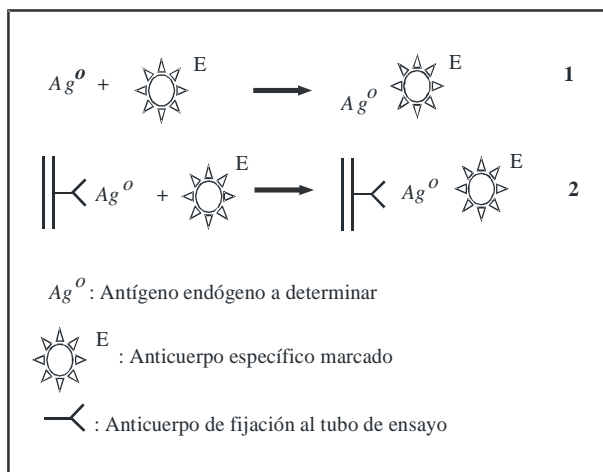


Figura 1.29 Reacción básica del ELISA.

SEPARACIÓN DE LA FRACCIÓN LIBRE Y LA UNIDA

La separación de la fracción libre y la unida es mucho más sencilla que en el RIA, por lo general los anticuerpos han sido fijados sobre las paredes del pozo o vial, de forma tal que solo es necesario lavar estos para eliminar la forma libre y luego añadir el cromógeno que reacciona con la enzima. Entonces, en los ELISA colorimétricos, ocurre la reacción de desarrollo de color, aunque hay otras señales a las que se hará referencia de manera oportuna (figura 1.30).



**Figura 1.30** Comparación del ELISA competitivo (1) y del ELISA sándwich (2).

## CÁLCULO DE LAS CONCENTRACIONES

Los métodos de cálculo son muy sencillos: absorbancia frente a concentración de los calibradores, y contra esta curva se calcula la concentración en las muestras. En la actualidad, muchos lectores de ELISA contienen un sistema automatizado de cálculo, además del sistema de detección (lectura).

## APLICACIONES, VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL ENZIMOINMUNOENSAYO

Los ELISA son mucho más sencillos de aplicar que los RIA similares. Se plantea que son tan sensibles como los RIA, sin el peligro del manejo de sustancias peligrosas como los isótopos. Su costo en el mercado es, por lo general, inferior.

Las desventajas principales son la necesidad de cumplir, de manera estricta, con los tiempos de incubación y la precisión en todos los pasos, para obtener resultados confiables.

La adición de una enzima a la reacción inmunológica hace que este ensayo dependa, además, de todos los factores que intervienen en la velocidad de una reacción enzimática: pH, temperatura, tiempo, concentración de sustrato, concentración de enzima y, sobre todo, la presencia de sustancias inhibitoras o activadoras de la reacción de color (es conocido el efecto de compuestos nitrogenados naturales como la urea y la creatinina sobre el ABTS, sustancia que interviene en la mayoría de los enzimoinmunoensayos).

## VARIANTES MÁS EXTENDIDAS

1. Enzimoinmunoensayo homogéneo (EMIT): variante que no requiere pasos de separación final y, por tanto, ha aumentado su posibilidad de ser automatizado.
2. Enzimoinmunoensayo de enzimas clonadas (CEDIA): variante con la que se han reproducido fragmentos inactivos de la enzima y del donador. Ambos se unen de manera espontánea, para formar la enzima activa, pero la unión del anticuerpo hace la enzima inactiva; por tanto, la señal es inversamente proporcional a la cantidad de antígeno endógeno presente en la muestra.

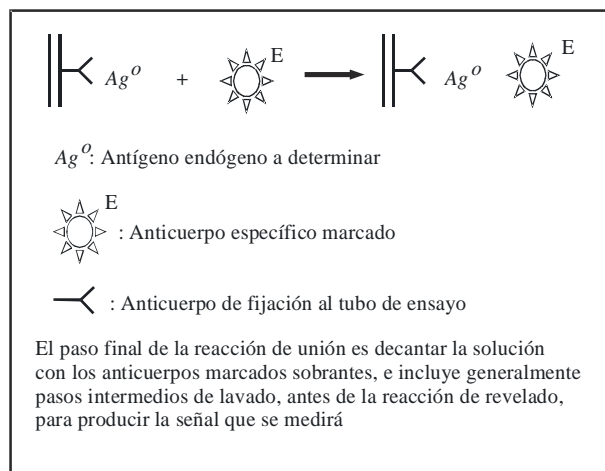
## FLUORESCENCIA

La fluorescencia es una variante muy particular de los inmunoensayos que, por su gran especificidad, sensibilidad y la introducción de tecnologías automatizadas, ha alcanzado un alto grado de desarrollo.

Esta técnica se basa, como su nombre lo indica, en la utilización de sustancias que son capaces de absorber energía luminosa y emitirla a otra longitud de onda (fluorescencia). Su principal desventaja es que muchos otros compuestos presentes en el suero son capaces de emitir fluorescencia, como la bilirrubina y algunas proteínas. Por esta razón se han desarrollado tecnologías basadas en lo que se ha denominado fluorescencia de tiempo prolongado.

## REACCIÓN BÁSICA DE LOS ENSAYOS FLUORESCENTES

Para la reacción básica véase la figura 1.31.



**Figura 1.31** Separación de la forma libre y la unida.



VARIANTES MÁS EXTENDIDAS

Las variantes más extendidas de esta técnica son:

- 1. Ensayo inmunofluorescente (FIA): la sustancia fluorescente es un quelato de Europio o de alguna otra tierra rara, cuya cualidad permite recibir el haz de luz y emitir la fluorescencia durante un tiempo 800 veces más prolongado.
- 2. Ensayo de inmunofluorescencia polarizada (FPIA): el haz de luz atraviesa un prisma que no permite pasar más que una longitud de onda, por lo cual el rayo de luz emergente es unidireccional (figura 1.32).

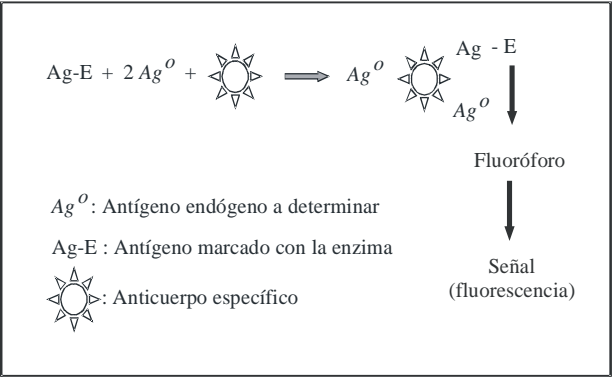


Figura 1.32 Reacción básica de los métodos fluorescentes.

APLICACIONES, VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS ENSAYOS FLUORESCENTES

Las aplicaciones son las mismas de los inmunoensayos mencionados hasta ahora, es decir, para la medición de sustancias en pequeñas concentraciones. Es importante notar que se han desarrollado numerosos fluoroinmunoensayos para la detección de drogas, medicamentos y otras moléculas pequeñas.

LUMINISCENCIA

Los ensayos luminiscentes (LIA) han sido muy usados. La diferencia con los métodos anteriores radica en que la señal es emitida por sustancias luminosas, las cuales se miden fácilmente en un luminómetro. Al inicio de estos ensayos fueron usadas sustancias naturales: se utilizaban células de insectos que poseían el sistema luciferina-luciferasa, por eso se les denominó ensayos bioluminiscentes.

REACCIÓN BÁSICA DE LOS ENSAYOS LUMINISCENTES

La reacción básica se ofrece en el cuadro 1.6.

Cuadro 1.6 Variantes más frecuentes

Fluoróforos	Método
Quelatos de Europio	DELFA
Quelatos de Terbio	SLFA
Fluorescencia	FIA
Ficoeritrinas	FIA

VARIANTES MÁS EXTENDIDAS

Las variantes más extendidas son las quemiluminiscencias, en las que la señal luminosa se emite por una reacción química.

Las más usadas son:

- 1. Quemiluminiscencia intensificada: el haz luminoso tiene tal poder, que una pequeña exposición de este es posible medirla de manera adecuada.
- 2. Quemiluminiscencia amplificada: similar a la anterior, solo que, en lugar de intensidad de la señal luminosa, se utiliza la ampliación de esta, y puede ser medida durante más tiempo o varias veces.
- 3. Electroquimioluminiscencia: esta técnica se basa en que la quemiluminiscencia emitida es producida por un salto electrónico en la cámara de reacción (figura 1.33).

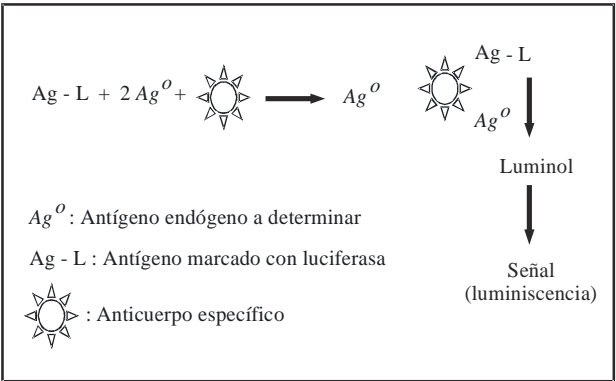


Figura 1.33 Reacción básica de los métodos luminiscentes.

## APLICACIONES, VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS ENSAYOS LUMINISCENTES

Las aplicaciones de los métodos luminiscentes son similares a las de otros inmunoensayos, es decir, para la medición de sustancias a bajas concentraciones. Se han adaptado al empleo en equipos automatizados.

## INMUNOENSAYOS AUTOMATIZADOS

La automatización ha ido ocupando un importante espacio en el laboratorio clínico. Muchas de las técnicas han servido como principio para aplicar al desarrollo de tecnologías de punta por varias compañías dedicadas a ello.

En la actualidad, los sistemas automatizados de inmunoensayo utilizan, fundamentalmente, técnicas no isotópicas, como los métodos fluorescentes, los luminiscentes, los enzimoensayos, entre otros.

## SELECCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

La selección del método que se va a emplear depende de varios factores: del tipo de muestra biológica

que trabaja, del tipo de pacientes que es atendido en el centro de salud y, sobre todo, de la relación costo-beneficio que se espera, así como de las posibilidades económicas con que se cuenta.

Por lo general, los equipos de última tecnología para inmunoensayo procesan volúmenes de muestras de alrededor de 90 muestras por hora, hasta 120 muestras por hora, con muy buena eficiencia. Estos pueden desarrollar varios ensayos para la misma muestra.

## BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- Burton RH, Knippenberg PH (eds.). *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 15, Tiejssen, P. *Practice and Theory of Immunoassay*, Amsterdam, Elsevier Publisher, 1995.
- Klotz M, Smith I, Lagomasino, JM. *Practice in Fluorescence Immunoassay*, DLI Press, Berkely, 1999.
- Nakamura RM, Kasahara Y, Rechnitz GA (eds.). *Immunochemical Assays and Biosensor Technology for the 1990s*. Washington D. C.: American Association for Microbiology, 1992.
- Price CP, Newman DJ (eds.). *Principles and Practice of Immunoassay*. New York: Stockton Press, 1991.
- Tietz NW (ed.). *Clinical Guide to Laboratory Tests*, 2<sup>nd</sup> Ed. Philadelphia: WB Saunders, 1990.
- Tietz, NW (ed.). *Fundamentals of Clinical Chemistry*. Philadelphia: WB Saunders, 1996.

## **CONTENIDO**

---

### **Introducción/ 95**

Regulación de la concentración de la glucosa en la sangre/ 95  
Historia de la diabetes/ 95

### **Secreción de la insulina/ 96**

Función pancreática/ 96  
Acción de la insulina/ 96  
Degradación de la insulina/ 97  
Mecanismo de acción del glucagón y de la adrenalina/ 98

### **Diagnóstico de diabetes mellitus: criterios de la Organización Mundial de la Salud/ 100**

### **Métodos para la determinación de la glucosa en la sangre/ 100**

Métodos reductores y métodos enzimáticos/ 100  
Especificidad de los métodos/ 100  
Valores de referencia/ 101

### **Exploración del metabolismo de los carbohidratos/ 101**

Glicemia en ayunas/ 101  
Prueba de la tolerancia oral a la glucosa/ 101  
Prueba de la tolerancia a la glucosa con corticoides/ 101  
Niveles de insulina plasmática/ 101  
Dosificación del péptido C/ 101  
Dosificación del glucagón/ 102  
Glucosa en la orina/ 102  
Hemoglobina glicada/ 102  
Perfil lipídico/ 102

### **Cetoacidosis diabética/ 102**

### **Bibliografía recomendada/ 103**

### Capítulo 11



## EXPLORACIÓN DEL METABOLISMO DE LOS CARBOHIDRATOS

Lic. Cella Alonso Rodríguez

### RESUMEN

En este capítulo se hace referencia a la fisiología del páncreas, a la acción y degradación de la insulina y a los mecanismos de control del metabolismo de los carbohidratos por parte de esta hormona. Asimismo, se hace una revisión de los mecanismos fisiopatológicos de la diabetes mellitus y de los análisis de laboratorio para su diagnóstico y seguimiento, así como para el estudio de sus complicaciones.

### INTRODUCCIÓN

Carbohidratos, hidratos de carbono, sacáridos o glúcidos son los nombres genéricos dados a los polihidroxialdehídos, polihidroxicetonas y sus derivados. De acuerdo con su composición se denominan: monosacáridos, oligosacáridos o polisacáridos.

El monosacárido más abundante e importante es la glucosa, combustible principal para la mayor parte de los organismos.

### REGULACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LA GLUCOSA EN LA SANGRE

Después de la absorción de los alimentos, el metabolismo procede de acuerdo con los requerimientos del organismo. Entonces la glucosa puede realizar diferentes funciones: producción de energía por conversión a dióxido de carbono y agua; almacenamiento como glucógeno en el hígado o triglicéridos en el tejido adiposo; o conversión a cetoácidos, aminoácidos o proteínas.

El conjunto de reacciones que constituyen el metabolismo de los carbohidratos es complejo e interacciona con el metabolismo de los lípidos y de los aminoácidos. En él ocurren diversas fases: *glucogénesis*, que es la conversión de glucosa a glucógeno; *glucogenólisis*, que

es la degradación del glucógeno a glucosa y otros productos intermediarios. La formación de glucosa a partir de fuentes no glucídicas se denomina *gluconeogénesis*. El proceso de degradación de la glucosa a piruvato o lactato es llamado *glucólisis*, y está seguido por el ciclo de Krebs o de los ácidos tricarboxílicos. La cadena de transporte electrónico y la fosforilación oxidativa es la fuente principal de obtención de energía celular.

### HISTORIA DE LA DIABETES

El término diabetes mellitus se refiere a la excreción de grandes cantidades de orina dulce. *Diabetes* es un viejo término para describir un sifón y significa 'fluir a través, atravesar' (diuresis); y *mellitus* significa 'miel'. La primera descripción clínica de la diabetes data de 1550 a.n.e. Por entonces ya se hablaba del estado poliúrico. El sabor dulce de la orina fue descrito por físicos hindúes en los siglos v y vi d.n.e. En el siglo xvii, Thomas Willis hizo alusión al término actual: diabetes mellitus. Un siglo después, John Rollo junto a otros colegas distinguieron este estado poliúrico de otros estados similares. Matthew Dobson, por su parte, descubrió que el suero de los diabéticos contenía azúcares. Pero no fue hasta el siglo xix que Claude Bernard realizó numerosos hallazgos en cuanto al metabolismo en la

enfermedad, y descubrió el almacenamiento de glucosa en forma de glucógeno en el hígado y la hiperglicemia aguda.

## SECRECIÓN DE LA INSULINA

La insulina fue descubierta en 1921 por una colaboración entre Frederick G. Banting, James B. Collip y otros. Los principales avances en la comprensión del metabolismo de la diabetes se realizan después de 1957, fecha a partir de la cual muchos investigadores han contribuido al conocimiento actual de la enfermedad.

## FUNCIÓN PANCREÁTICA

El páncreas es una glándula con función exocrina y endocrina, de 15 cm de longitud con un peso aproximado de 100 g. Se localiza, de manera transversal, a lo largo de la pared posterior del abdomen y ocupa el epigastrio e hipocondrio izquierdo. Se desarrolla como divertículo dorsal a partir de la cara posterior del duodeno y como divertículo ventral, desde el conducto biliar primitivo. Su riego sanguíneo lo proporcionan las arterias esplénica y mesentérica superior, y el drenaje sanguíneo se realiza a través de las venas del mismo nombre. Está innervado por fibras simpáticas y parasimpáticas, cuyas terminales se hallan en contacto con la membrana celular de las células de los islotes de Langerhans.

Estos islotes son los responsables de la función endocrina. En el páncreas normal de los adultos se puede encontrar casi 1 millón de estas unidades estructurales, es decir, entre el 1 y el 2 % de su masa seca. Fueron descubiertos en 1869 por Paul Langerhans y contienen, cuando menos, tres tipos de células secretoras de hormonas:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\delta$ . Las células  $\alpha$  secretan glucagón, las  $\beta$  producen insulina, y las  $\delta$ , somatostatina. Las células  $\beta$  se localizan en el centro del islote, mientras que las  $\alpha$  y las  $\delta$  están en la periferia. Se ha encontrado una cuarta célula pancreática, la célula F, que secreta la hormona que se ha llamado polipéptido pancreático (PP).

La proporción de estas células en los islotes es:  $\alpha$  (20 %),  $\beta$  (68 %),  $\delta$  (10 %), PP (2 %). Las células  $\beta$  expresan el gen que produce preproinsulina, a partir de la cual, por un clivaje proteolítico, se obtiene proinsulina. Por un procesamiento semejante, la proinsulina rinde insulina y péptido C. Los islotes son densamente innervados, el vago estimula la secreción de insulina, y el simpático inhibe la secreción de insulina y estimula la liberación de glucagón.

El gen de la preproinsulina está localizado en el cromosoma 11 e incluye una secuencia guía que codifica para 23 aminoácidos, está fija a la cabeza de la cadena B y la secuencia de la proinsulina, en la cual se alberga la acción hormonal. La proinsulina es una molécula lineal constituida por tres cadenas peptídicas designadas como A, B y C. Las cadenas A y B están conectadas por el péptido C. Durante el procesamiento de la proinsulina, las cadenas A y B se unen por medio de dos enlaces disulfuro. La proinsulina se transfiere desde el retículo endoplasmático hacia el complejo de Golgi, en el cual se separa el péptido C por acción de enzimas proteolíticas. La insulina coprecipita con los iones  $Zn^{2+}$  en un medio ácido, y se forman microcristales dentro del gránulo de secreción.

La insulina, junto al péptido C y otros productos, es liberada por exocitosis de la célula  $\beta$ . La secreción de insulina es modulada por numerosas hormonas. Algunos secretagogos de la insulina (por ejemplo, glucosa y arginina) pueden iniciar, ellos mismos, la secreción de insulina; mientras que otros, como el glucagón, no lo pueden hacer por sí solos. No obstante, estos potencian la respuesta de la glucosa y de otros iniciadores.

El mayor estímulo fisiológico para la exocitosis de esta hormona es la concentración elevada de glucosa en sangre. El incremento en la concentración extracelular de glucosa estimula la biosíntesis de proinsulina, pero no la conversión de proinsulina a insulina.

La mayor parte de la glucosa metabolizada en la célula  $\beta$ , se encarga de la estimulación de la secreción de insulina. Este constituye un mecanismo de especialización de estas células. La glucosa que entra en la célula es fosforilada por la glucoquinasa (GK), y oxidada por vía de la glucólisis para la obtención de trifosfato de adenosina (ATP). La célula  $\beta$  es sensible a cambios pequeños en la concentración de glucosa en la sangre. En los islotes aislados, la secreción de insulina como respuesta a la glucosa, tiene un comportamiento sigmoidal. Los valores de glucosa inferiores a 5 mM no afectan los niveles de liberación de insulina. El incremento en las tasas de liberación de insulina ocurre cuando los niveles de glucosa oscilan entre 5,5 y 17 mM con un máximo a los 8 mM.

## ACCIÓN DE LA INSULINA

En el estado posprandial, la homeostasis de la glucosa depende del balance entre la producción de glucosa hepática y la utilización de esta por los tejidos que dependen de insulina, como son: hígado, tejido adiposo y músculo, y por aquellos tejidos independientes de esta

hormona, como son: el cerebro y los riñones. Este exquisito balance es regulado por las hormonas pancreáticas debido a que, en los individuos normales, la respuesta al incremento de la glucosa plasmática es un incremento en la secreción de insulina por las células  $\beta$  del páncreas. Este estimula el transporte de glucosa en los tejidos periféricos hacia su interior y, a la vez, inhibe la gluconeogénesis hepática.

En la diabetes tipo 2, confluyen dos factores defectuosos: el primero es un detrimento de la habilidad de los tejidos periféricos como respuesta a la insulina (resistencia a la insulina); y el segundo es el resultado de la disfunción de la célula  $\beta$ , como consecuencia de una hiperglicemia sostenida. A esto contribuyen dos componentes: el genético y el ambiental. Ambos responsables del paso de tolerancia normal a la glucosa, hacia diabetes tipo 2.

En la homeostasis de la glucosa, la hormona también promueve otros eventos celulares, incluyendo el transporte de aminoácidos e iones, interviene además en el metabolismo lipídico, en la síntesis de glucógeno, en la transcripción de genes y en el recambio de ARNm, en la síntesis y degradación de proteínas y en la síntesis de ARN. Además, juega un papel importante en la reserva de combustibles de la ingesta y en el normal crecimiento y diferenciación celular (figura 2.1).

El mecanismo de acción de la insulina no se ha esclarecido del todo. La unión de la insulina a sus receptores en la membrana plasmática de las células de sus órganos diana (hígado, músculo y tejido adiposo) produce la estimulación de la actividad tirosinkinasa de varias proteínas intracelulares, entre ellas el propio receptor y el sustrato receptor de la insulina (IRS-1).

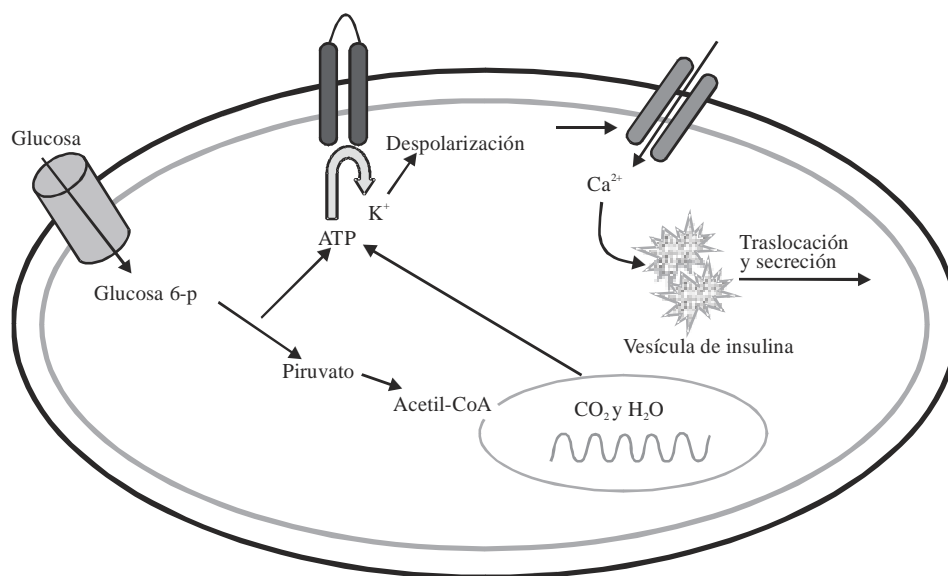
La insulina inhibe la gluconeogénesis hepática, antes estimulada por el glucagón, y disminuye la concentración de AMPc por el incremento de la fosfodiesterasa y también estimula la actividad de las proteínas fosfatasa. Al activar la desfosforilación de la enzima bifuncional PFK-2 / FBPasa-2, produce la formación de fructosa 2,6 y, por tanto, aumenta la glucólisis y disminuye la gluconeogénesis.

En general, la insulina induce las enzimas glucolíticas e inhibe las gluconeogénicas por un mecanismo que implica la fosforilación de factores que se unen a zonas específicas del ADN para estimular o inhibir la transcripción de los correspondientes genes. También actúa por un efecto indirecto que provoca la inhibición de la degradación de las proteínas musculares, lo que disminuye la disponibilidad de aminoácidos libres como sustratos gluconeogénicos; por el contrario, activa la entrada de aminoácidos y la síntesis de proteínas en las células musculares.

La insulina inhibe la lipólisis en el tejido adiposo, tal vez por la activación de la fosfodiesterasa, que hidroliza el AMPc, y a la vez inhibe la lipasa sensible a hormona. Esta inhibición disminuye la liberación de glicerol y ácidos grasos. Por el contrario, la insulina estimula la síntesis de ácidos grasos y triacilglicéridos en el tejido adiposo y en el hígado.

## DEGRADACIÓN DE LA INSULINA

La degradación de la insulina ayuda al control de la respuesta celular a la hormona por una disminución eficaz de esta; pero el proceso degradativo puede estar involucrado en la medición de algunos aspectos de la acción de la insulina.



**Figura 2.1** Esquema de la secreción de la insulina.

El hígado y el riñón son los principales órganos implicados en la degradación de la insulina circulante, aunque otros tejidos como el muscular y el adiposo han sido descritos como sitios importantes en el aclaramiento de la hormona. Los nutrientes alteran la degradación de la insulina: en general la ingestión de glucosa incrementa el consumo (captación) de insulina por el hígado, tal vez debido a señales provenientes del intestino. La glucosa induce el incremento en la secreción de insulina, pero además disminuye la extracción hepática de glucosa. Los ácidos grasos libres también disminuyen la captación y degradación de la insulina, lo cual puede estar involucrado con los cambios asociados a la diabetes tipo 2.

Las alteraciones primarias en el aclaramiento de la insulina pueden desembocar en insulino-resistencia, hiperinsulinemia, dislipidemia, hipertensión y otras alteraciones. Los riñones juegan un papel importante en el aclaramiento de la insulina: en los pacientes con una función residual de la célula  $\beta$  que no requieren de insulina exógena para el control de la glucosa, la falla renal puede causar hipoglicemia, debido a la reducción del aclaramiento.

En condiciones normales, casi toda la insulina es degradada de manera intracelular o en procesos de membrana. La captación es mediada por el receptor de insulina, y existe una pequeña contribución de procesos no específicos, por ejemplo, pinocitosis, los que asumen gran importancia en concentraciones elevadas de insulina.

Algunas proteinasas ácidas están implicadas en la degradación tardía del endosoma. No toda la insulina internalizada es degradada en el endosoma. Esto depende de la concentración de insulina, de la duración de la exposición y de otros factores. *In vitro*, en condiciones óptimas de pH y temperatura, el producto degradado no se excede del 50 %. Los remanentes de insulina son liberados a otros compartimentos celulares que incluyen citosol, núcleo y lisosomas. El mecanismo por el cual la insulina alcanza estos comportamientos no se conoce todavía; pero el proceso intracelular de proteólisis de insulina envuelve varias etapas relacionadas con la vía que involucra a la enzima degradadora de insulina (IDE).

Hasta ahora no está claro que la degradación y el aclaramiento de esta hormona sea un proceso regulado como para que su falla produzca enfermedades como la diabetes tipo 2. Por otra parte, no se puede separar la acción de la insulina del aclaramiento de esta hormona. Todos los tejidos sensibles a ella, la degradan, y el primer paso para la destrucción es la unión al

receptor. Esto sugiere que la unión de la insulina a su receptor específico es parte de la señal para la terminación de la acción de esta.

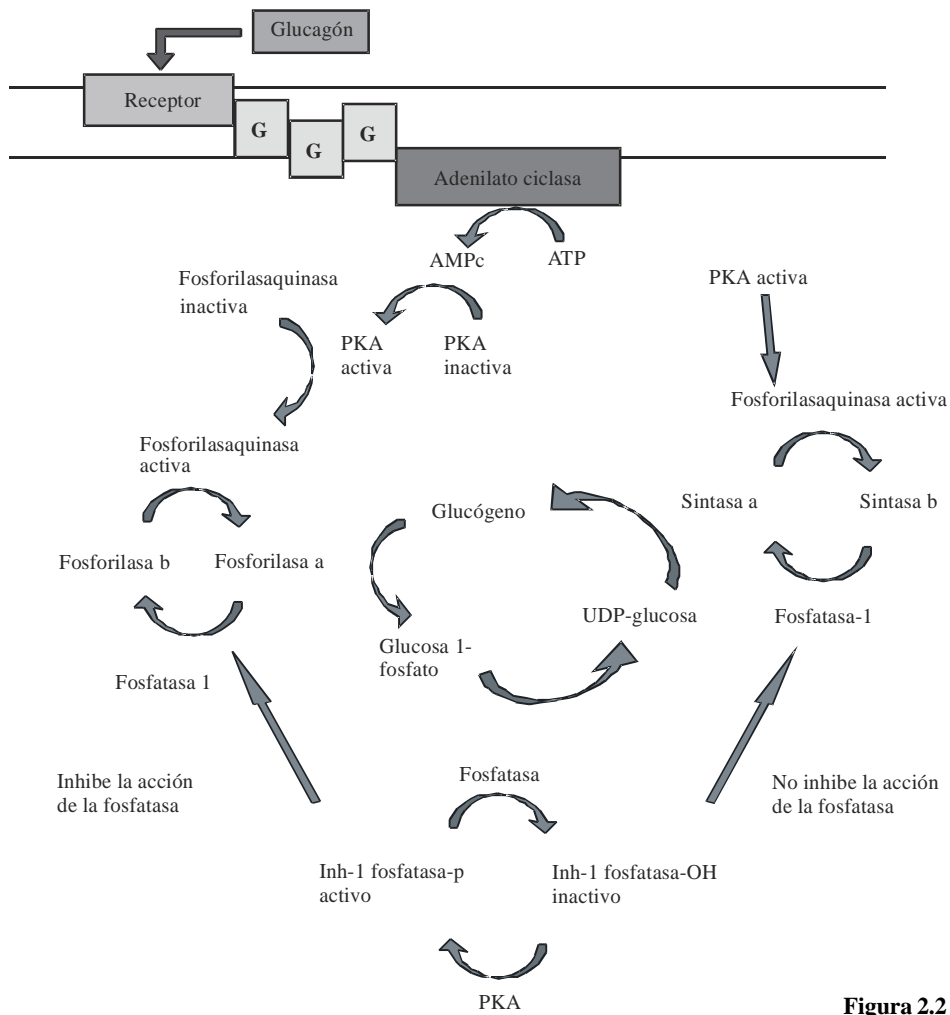
## MECANISMO DE ACCIÓN DEL GLUCAGÓN Y DE LA ADRENALINA

El glucagón y la adrenalina tienen función primordial en la homeostasis de la glucosa. Sus efectos opuestos en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas ayudan a mantener el nivel de glucosa normal. Por la importancia que revisten, a continuación se analiza la acción metabólica de estas hormonas.

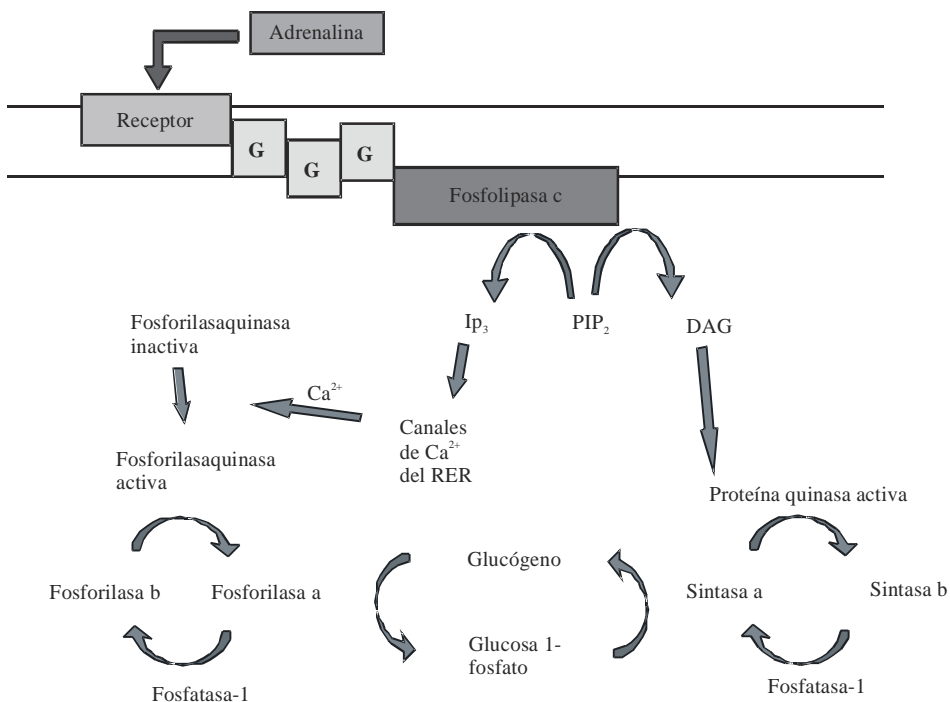
**Glucagón.** El principal sitio de acción del glucagón es el hígado y el efecto predominante es un aumento en la producción de glucosa, que da como resultado la degradación del glucógeno y la activación de la gluconeogénesis. Cuando la hormona se une al receptor, activa la proteína G, que a su vez, promueve la activación de la adenilatociclase, lo que transforma el ATP a AMPc. Este activa a la proteínaquinasa A (PKA), que fosforila a la fosforilasaquinasa ( $\alpha\beta\gamma\delta$ ) y esta se activa. La fosforilasaquinasa fosforila, a su vez, a la fosforilasa b del glucógeno. La modificación covalente genera la forma activa (la fosforilasa a), la cual interviene de forma directa en la degradación del glucógeno, y se libera glucosa al suero (figura 2.2).

**Adrenalina.** La adrenalina, que se libera en situaciones de estrés y de hipoglicemia intensa, participa también en la regulación del metabolismo del glucógeno hepático. La adrenalina se une preferentemente a receptores  $\alpha$  de la membrana plasmática de los hepatocitos. La interacción del complejo hormona-receptor estimula la apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y el aumento en la concentración citosólica del ion. El calcio liberado se une a la fosforilasaquinasa y la activa. De esta forma, se desencadena la glucogenólisis. La fosforilasaquinasa se activa, por tanto, por dos mecanismos: fosforilación y unión a calcio (figura 2.3).

Puesto que la fosforilasaquinasa participa en la fosforilación de la sintasa y, por tanto, en su inhibición, la adrenalina inhibe también la síntesis de glucógeno hepático. Por otra parte, el diacilglicerol (DAG) liberado como segundo mensajero activa una proteína quinasa C que participa en la fosforilación de la sintasa, y colabora, por tanto, en su inhibición. El  $\text{Ca}^{2+}$  liberado por la adrenalina en el hígado estimula una proteína quinasa dependiente de calcio y calmodulina, que fosforila la piruvatoquinasa y la inactiva, con lo que se inhibe la glucólisis.



**Figura 2.2** Esquema de la acción del glucagón.



**Figura 2.3** Esquema de la acción de la adrenalina.



En el tejido adiposo, la adrenalina se une a receptores  $\beta$  adrenérgicos, con lo que su actuación se desarrolla de forma semejante a lo descrito para la actuación del glucagón, se libera como segundo mensajero AMPc y se activa la PKA. Los glucocorticoides tienen una importante acción hiperglicemiante: por una parte, provocan proteólisis muscular, con lo que suministran al hígado aminoácidos utilizados en la gluconeogénesis, y por otra, inducen algunas enzimas de esta vía.

La concentración de la glucosa en la sangre es regulada mediante complejas vías moduladas por hormonas, sobre todo la insulina y el glucagón, aún cuando el cortisol, la corticotrofina (ACTH), la hormona del crecimiento (GH), la adrenalina y la noradrenalina también ejercen su papel.

## **DIAGNÓSTICO DE DIABETES MELLITUS: CRITERIOS DE LA ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD**

La diabetes mellitus no es una enfermedad en el sentido clásico, sino que se trata de un síndrome heterogéneo, que carece de una patogenia definida, así como de hallazgos clínicos invariables, o de un tratamiento curativo y definitivo. Es un padecimiento crónico, que exige cuidados médicos permanentes y sistemáticos, muy individualizados. El dato básico por el cual se conoce el trastorno es la hiperglicemia. Lamentablemente, esta es inespecífica y solo representa una de las múltiples facetas de este padecimiento metabólico común. La sintomatología se relaciona con las anomalías del metabolismo, que pueden conducir a una amplia gama de trastornos, entre los que se incluyen miocardiopatías, trastornos cerebrovasculares, angiopatías o neuropatías periféricas, nefropatías y retinopatías.

Según la clasificación de 1998, la diabetes se divide en diabetes tipo 1 (DMID, insulinodependiente) y diabetes tipo 2 (DMNID, no insulinodependiente):

1. La diabetes tipo 1 se caracteriza por la destrucción de las células  $\beta$  pancreáticas. Estos enfermos son propensos a la cetoacidosis. Esta forma incluye los casos adscritos, en la actualidad, a un proceso autoinmunitario, de los cuales se desconoce la causa. No incluye aquellas formas de destrucción o falla de las células  $\beta$  para las que no se puede asignar una causa autoinmunitaria, como la fibrosis quística.
2. La diabetes tipo 2 incluye la forma más prevalente de diabetes, que resulta de la resistencia a la insulina con un defecto secretor o sin él.

La prevalencia global está en aumento y las previsiones para el actual siglo (año 2010) son preocupantes. Mc Carthy y Zimmet estimaron que el número de sujetos con DMNID en el mundo aumentará de 100 a 200 millones en los próximos 15 años. En nuestro país hay 239 474 pacientes. De ellos, 2 mujeres por cada 1 hombre, con una tasa de prevalencia de 21/49 por 1 000 habitantes. Se calcula que la diabetes mellitus tipo 2 o DMNID, debe alcanzar proporciones epidémicas en los próximos 10 a 20 años, determinadas por el incremento de la obesidad, de los hábitos sedentarios y por el envejecimiento de la población.

Aunque los síntomas de la diabetes tipo 1 se pueden presentar a cualquier edad, aparecer antes de los 40 años. Los enfermos, por lo general delgados, tienen cetonemia y dependen de la insulina para su supervivencia. La diabetes tipo 2 se presenta, por lo general, después de los 40 años y los que la padecen son obesos y tienen una historia familiar de diabetes. No presentan, de manera habitual, una tendencia a la cetoacidosis. Aunque al principio no dependen de la insulina exógena, pudieran requerirla con el tiempo.

## **MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA GLUCOSA EN LA SANGRE**

### **MÉTODOS REDUCTORES Y MÉTODOS ENZIMÁTICOS**

Los antiguos métodos para la detección de la glucosa en la sangre, por lo general se basaban en su poder reductor frente a metales como el cobre, que cedían electrones con facilidad, y se convertían a otro ion metálico de color diferente. Estos métodos, hoy en desuso, jugaron su papel en el diagnóstico y seguimiento evolutivo de los pacientes diabéticos, durante varias décadas.

Los métodos modernos son enzimáticos y varían en cuanto a las enzimas utilizadas. Estos pueden ser automáticos o manuales. Las enzimas utilizadas pueden ser: hexoquinasa, glucosa-oxidasa, glucosa-deshidrogenasa. Existen variantes en forma de tiras reactivas para la llamada *química seca*, en lo fundamental para el monitoreo *en el domicilio* por el propio paciente.

### **ESPECIFICIDAD DE LOS MÉTODOS**

Los métodos químicos eran muy inespecíficos, pues cualquier sustancia reductora producía interferencia y

arrojaban valores falsamente elevados. Sin embargo, los métodos enzimáticos que se emplean hoy son muy específicos, pues las enzimas que se utilizan tienen especificidad de sustrato.

## VALORES DE REFERENCIA

Por lo general, los valores de referencia varían de un laboratorio a otro; pero la mayoría acepta un rango entre 4 y 6,4 mmol/L para la dosificación de la glucosa en ayunas.

## EXPLORACIÓN DEL METABOLISMO DE LOS CARBOHIDRATOS

### GLICEMIA EN AYUNAS

El valor de la glicemia en ayunas ha sido muy utilizado, sobre todo para descartar alteraciones groseras del metabolismo de los carbohidratos. Está influenciado por muchos factores endógenos (estrés, insomnio, ejercicio físico) y exógenos (exceso de medicamentos), por lo cual muchos especialistas prefieren realizar la prueba de tolerancia oral a la glucosa, que mide, en efecto, una respuesta del organismo. La limitante fundamental de las determinaciones de glicemia en ayunas está dada porque proporcionan una visión aislada de un momento particular de la evolución del paciente, a muy corto plazo, ya que sus valores fluctúan de manera muy amplia a lo largo del tiempo.

### PRUEBA DE LA TOLERANCIA ORAL A LA GLUCOSA

Con la prueba de la tolerancia oral a la glucosa se realiza la comparación del valor basal de la glucosa con el valor medido 2 horas después de ingerir una sobrecarga oral de glucosa (aproximadamente 75 g de glucosa disueltos en un vaso de agua, para personas de complexión normal). Esta prueba resulta engorrosa para el laboratorio y molesta para el paciente y, por lo tanto, debe ser usada solo en los casos dudosos. Está contraindicada en aquellos pacientes en los que se ha constatado, en más de una ocasión, una hiperglicemia en ayunas.

Los valores esperados son: para el basal, de 4 a 6,4 nmol/L, y a las 2 horas, menor que 7,6 nmol/L. En algunos laboratorios se mide la respuesta a la hora (menor que 11 nmol/L), y también a las 3 horas (menor que 6,6 nmol/L).

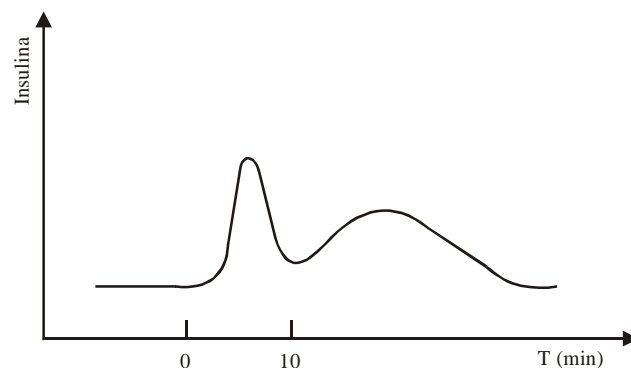
## PRUEBA DE LA TOLERANCIA A LA GLUCOSA CON CORTICOIDES

La prueba de tolerancia a la glucosa puede realizarse también luego de administrarle cortisona al paciente, la cual incrementa la glucosa en la sangre. Por lo general se administran 2 dosis de cortisona: la primera, la noche antes, a las 11 p.m.; y la segunda, a las 5 a.m., para realizar la prueba a las 7 a.m. El procedimiento es igual al explicado antes. En la actualidad, a esta prueba no se le concede el valor que se le atribuyó en otros tiempos.

## NIVELES DE INSULINA PLASMÁTICA

La insulina es la hormona producida por las células beta de los islotes de Langerhans en el páncreas, que regula los valores de la glucosa plasmática, así como su internalización en los tejidos.

Los valores basales en adultos son de 6 a 24  $\mu\text{U/mL}$  o de 15 a 145 pmol/L. Casi siempre se utilizan los valores basales y la posterior sobrecarga de glucosa, para evaluar de forma correcta, la secreción pancreática (figura 2.4).



**Figura 2.4** Curva de la secreción de la insulina ante el estímulo.

Los valores de insulina en cualquier paciente durante una prueba de tolerancia a la glucosa, estarán siempre relacionados con el valor basal de la hormona en cada paciente. Aproximadamente a los 30 minutos, este valor sería de 3 a 5 veces el valor basal; a los 60 minutos, de 2 a 4 veces el valor basal; a los 120 minutos, de 2 a 3 veces el valor basal; y a los 180 minutos, el valor debe ser igual o inferior al valor basal.

## DOSIFICACIÓN DEL PÉPTIDO C

El péptido C es un residuo de la degradación hepática de la proinsulina en insulina. Es, por tanto, un

producto de la secreción de la insulina en sí, muy útil en los pacientes en quienes se sospeche una resistencia a la hormona, e incluso en pacientes diabéticos que utilicen insulina con regularidad, en bajas dosis, para complementar su secreción endógena (llamados insulinoconvenientes). Casi siempre se mide por métodos de inmunoensayo, pues sus concentraciones son muy bajas en el plasma. Los valores habituales son de 0,26 a 0,62 nmol/L.

## DOSIFICACIÓN DEL GLUCAGÓN

Rara vez utilizada, con frecuencia mal interpretada, la dosificación de glucagón pudiera explicar trastornos del metabolismo de los carbohidratos de causa desconocida o *idiopática*.

Por lo general se mide por inmunoensayo. Sus valores de referencia en ayunas son entre 50 y 200 pg/mL o ng/L en plasma. Los valores basales pueden ser comparados con el resultado disminuido durante la prueba de tolerancia oral a la glucosa.

## GLUCOSA EN LA ORINA

El valor de la glucosa en la orina en una muestra simple es relativo, pues es una prueba con muchas interferencias. Es preferible recolectar el volumen urinario total, y medir la glucosuria en la orina de 24 horas.

Los valores de referencia son:

1. Muestra simple: resultado negativo.
2. Glucosuria en 24 horas: menor que 2,78 mmol/dL, o de 0,1 a 0,8 mmol/L.

Los métodos más usuales para determinar la glucosuria en una muestra simple son los reductores. De ellos, el más usado fue el método de Benedict. En la actualidad se utilizan con más eficacia las tiras reactivas, de química seca, que tienen adsorbidas enzimas específicas y colorantes que reaccionan de manera proporcional al contenido de glucosa en la muestra. Por ser específicos para la glucosa, son métodos más confiables.

### Otras melliturias

Existen otras alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos, muy raras, pero que pueden ocurrir e interferir los métodos reductores. Entre ellas, la fructosuria y la lactosuria en pacientes con intolerancia

a estos carbohidratos, pero son muy poco frecuentes. No obstante, siempre debe interrogarse al paciente cuando exista una prueba positiva, sin hiperglicemia y sin antecedentes de diabetes.

## HEMOGLOBINA GLICADA

La hemoglobina glicada mide el porcentaje de hemoglobina A<sub>o</sub> que está unido a azúcares. Se expresa como HbA<sub>1</sub> o *hemoglobina rápida*, aunque en realidad está formada por la unión de, al menos, cuatro componentes. Sus resultados representan un índice muy objetivo de los niveles medios de la glicemia en los últimos tres meses (ciclo vital de la hemoglobina), lo cual la convierte en la prueba ideal para seguir la evolución, a largo plazo, en los pacientes diabéticos, tanto los de tipo 1 como los de tipo 2. Los resultados se expresan como un porcentaje de la hemoglobina total. Los métodos de laboratorio más empleados para su determinación son la cromatografía de afinidad, la electroforesis y los inmunoensayos (isotópicos o enzimáticos).

## PERFIL LIPÍDICO

Los trastornos del metabolismo de los lípidos acompañan casi siempre a la diabetes y son los principales responsables de las complicaciones macrovasculares que, a su vez, constituyen el más importante factor de mortalidad y de trastornos funcionales. Por lo tanto, es recomendable la realización (al menos una vez al año) de un perfil lipídico que incluya colesterol (total, HDL y LDL) y triglicéridos. Para más información sobre las alteraciones del metabolismo lipídico, se sugiere consultar el capítulo 13 de esta misma sección.

## CETOACIDOSIS DIABÉTICA

Los cuerpos cetónicos son, en lo fundamental, tres compuestos: la acetona, el ácido beta-hidroxibutírico y el ácido acetoacético, los cuales se derivan del metabolismo de los ácidos grasos. En los individuos sanos, los cuerpos cetónicos se forman en el hígado y son metabolizados por completo; sin embargo, cuando tiene lugar una alteración importante del metabolismo de los carbohidratos, que obliga al organismo a obtener energía a partir de los ácidos grasos, se produce un aumento en la producción

de estos compuestos, que son eliminados por la orina. Así, la detección de una cetonuria constituye, en el caso de los diabéticos descompensados, un indicador sugestivo de cetoacidosis, la cual sigue con frecuencia a los estados de hiperglicemia, y constituye una emergencia médica frecuente.

La presencia de cuerpos cetónicos en la orina se puede evidenciar por pruebas de laboratorio. Durante muchas décadas, la clásica reacción de Imbert fue el método más empleado. En la actualidad se ha sustituido por el empleo de tiras reactivas, método mucho más rápido, sencillo y seguro.

El estado de cetoacidosis diabética se acompaña de una acidosis metabólica por acúmulo de ácidos

fijos no volátiles (véase el capítulo 15), marcada hiperglicemia, glucosuria y contracción hipertónica del volumen extracelular, secundaria a la poliuria por diuresis osmótica (véase el capítulo 14).

## **BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA**

- Casanueva F, Vázquez JA. Endocrinología Clínica. Ed. Barcelona: Salvat, 1995.
- González JM, De Buitrago y col. Bioquímica Clínica. Amsterdam: Elsevier Publisher, 1998.
- Jubiz W. Endocrinología Clínica, Barcelona, Ed. Salvat, 1996.
- Pickup S. Diabetes, Amsterdam, Stckton Press; 1998.
- Tietz NW, ed. Clinical Guide to Laboratory Tests. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders, 1990.
- Tietz NW (ed.). Fundamentals of Clinical Chemistry. Philadelphia: WB Saunders, 1996.

## **CONTENIDO**

---

### **Introducción/ 105**

### **Estructura de las proteínas/ 105**

### **Propiedades físico-químicas/ 105**

### **Otros principios y técnicas para la separación y cuantificación de las proteínas/ 106**

Electroforesis/ 106

Inmunoelectroforesis/ 108

Inmunofijación electroforética/ 109

Turbidimetría/ 109

Nefelometría/ 110

Inmunodifusión radial/ 110

Radioinmunoensayo y ensayo inmunorradiométrico/ 110

Ensayos inmunoenzimáticos/ 111

### **Reactantes de la fase aguda/ 111**

Las alfa globulinas y las beta globulinas en la velocidad de sedimentación eritrocitaria/ 112

Características de las proteínas comprendidas en el grupo de los reactantes de la fase aguda/ 112

### **Bibliografía recomendada/ 113**

### Capítulo 12



## EXPLORACIÓN DEL METABOLISMO DE LAS PROTEÍNAS

*Dr. Celso Cruz Rodríguez*

### RESUMEN

Con razón se ha dicho que las proteínas constituyen el pilar fundamental en el laboratorio bioquímico que todos los seres vivos tienen en su interior. Las enzimas y muchas hormonas, entre otras sustancias, son proteínas que rigen los procesos vitales en el organismo de los seres humanos y de los animales. La diversidad proteica es considerable, al igual que las posibilidades para la cuantificación de estos compuestos que contienen nitrógeno, carbono y oxígeno. En este capítulo se expone un grupo de métodos que se utilizan para la determinación de las proteínas en material biológico y se trata acerca de otros avances importantes como la sustitución de los métodos cinéticos (actividad total de la enzima) por los que miden la masa molecular (por medio de reacciones antígeno-anticuerpo), más sensibles y específicos. También se hace referencia a los reactantes de la fase aguda y al valor de la proteína C reactiva como factor de riesgo de la enfermedad cardíaca coronaria.

### INTRODUCCIÓN

Las proteínas se sintetizan en el interior de las células, pasan al líquido intersticial y, de allí, se vierten en el plasma y demás líquidos corporales. La cantidad, tipo y secuencia de los aminoácidos de las cadenas polipeptídicas que las constituyen, les proporcionan su forma característica e influyen, de manera decisiva, en sus funciones biológicas.

### ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS

La estructura primaria de las proteínas está constituida por el tipo y secuencia aminoacídica. La secuencia depende solo de los enlaces covalentes (peptídicos) y es predeterminada por el código del ADN.

La secundaria está formada por la disposición en espiral de la cadena polipeptídica de la estructura primaria, en una dimensión. Esta estructura, en muchas proteínas globulares, presenta dilataciones, plegamientos y enrollados, debidos a muchos enlaces de hidrógeno y, de manera ocasional, a enlaces covalentes disulfuro.

La terciaria es la estructura constituida por el plegamiento intramolecular de la cadena polipeptídica para

formar una estructura tridimensional compacta de forma específica y que se mantiene por los enlaces electrovalentes, los enlaces hidrógeno, los puentes disulfuro, las fuerzas de Van der Waals y las interacciones hidrofóbicas. Estas últimas son consideradas la fuerza mayor en la conservación de la estructura terciaria, la cual le confiere a las proteínas sus propiedades biológicas específicas.

La estructura cuaternaria está representada por la asociación de varias cadenas polipeptídicas que forman una gran unidad de agregados oligoméricos. Esta estructura se consolida con el estrecho ajuste de las unidades polipeptídicas a través de contactos de su superficie con los grupos prostéticos. La albúmina, por ejemplo, carece de estructura cuaternaria, pues posee solo una cadena polipeptídica. Sin embargo, la enzima creatinquinasa, constituida por dos cadenas polipeptídicas, tiene tres isoformas enzimáticas mayores, que dan lugar, en ella, a varias estructuras cuaternarias.

### PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

Las propiedades físico-químicas de las proteínas se utilizan como base para su identificación, separación y

cuantificación. Ellas constituyen los principios o fundamentos de los métodos para su estudio.

Las proteínas pueden ser separadas, desde el punto de vista físico, de acuerdo con su tamaño. Su masa molecular relativa permite la separación de las moléculas grandes o pequeñas mediante la diálisis o la filtración en gel. La densidad de muchas proteínas es de aproximadamente 1,33 con excepción de las lipoproteínas, en las cuales oscila entre 1,006 y 1,21, lo cual permite la separación de estas por medio de la ultracentrifugación.

La solubilidad, otra propiedad de las proteínas, está dada por la afinidad que tienen por diferentes solventes. Si esta se pierde, al modificarse las propiedades físico-químicas del solvente (pH, fuerza iónica, constante dieléctrica, temperatura) por medio de experimentos, se produce la precipitación de las proteínas al estado de insolubilidad. Lo mismo ocurre cuando las proteínas son desnaturalizadas por la acción de agentes físicos como el calor o por distintas sustancias como la urea, el dodecilsulfato de sodio, y ácidos y bases débiles, lo que produce la destrucción de sus estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria.

Hasta hace pocos años fue muy utilizado el método conocido como precipitación salina (*salting out*) para separar proteínas. La caída de la constante dieléctrica del solvente, producida por la adición de sales o solventes orgánicos, da origen a la separación y precipitación de las proteínas.

Los análisis cuantitativos del contenido proteico en la orina y en el líquido cefalorraquídeo (LCR), se basan, por lo general, en los siguientes principios:

1. Reacción de los enlaces polipeptídicos con iones de cobre en solución alcalina (reacción Biuret) o de los residuos de tirosina y triptófano de los aminoácidos en soluciones fenoladas (método de Lowry).
2. Absorción ultravioleta (UV) en los intervalos de 200 a 255 nm y de 270 a 290 nm.
3. La precipitación y posterior cuantificación con métodos turbidimétricos o nefelométricos.
4. La unión a colorantes indicadores como: azul brillante Coomassie, rojo Ponceau S, bromocresol verde y bromocresol púrpura.

## OTROS PRINCIPIOS Y TÉCNICAS PARA LA SEPARACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS

Además de los referidos antes, existen otros principios y técnicas para la separación y cuantificación de las proteínas. Algunos, descritos hace varias décadas,

se mantienen vigentes hoy día y otros forman parte de los procedimientos nuevos que han surgido al amparo de nuevas tecnologías introducidas en años recientes. A continuación se exponen algunos.

## ELECTROFORESIS

El principio de la electroforesis se basa en que las partículas cargadas, en este caso las proteínas, ubicadas en un campo eléctrico, migran hacia uno de los electrodos del campo, en dependencia de:

1. La carga eléctrica de la partícula.
2. El tamaño de la partícula.
3. La fuerza del campo eléctrico.
4. Las características del medio utilizado como soporte durante el proceso de la migración.

Las partículas cargadas negativamente (aniones) se dirigen al ánodo (electrodo positivo), y las cargadas positivamente (cationes) se dirigen al cátodo (electrodo negativo). Si se hace variar el pH de la solución amortiguadora, en la cual están disueltas las proteínas, estas migrarán en el campo eléctrico creado, y se separarán unas de otras, al migrar cada una de ellas distancias diferentes. Esta migración se produce sobre un soporte que puede estar constituido por soluciones coloidales, geles (agar, almidón, agarosa, acrilamida) o papel (de filtro o acetato de celulosa). En el caso de la electroforesis en papel de acetato de celulosa, una vez separadas las fracciones, son coloreadas y luego cuantificadas. Para ello se utiliza la técnica densitométrica, descrita en otra sección de este libro. El gráfico que se obtiene, conocido como electroforegrama o patrón electroforético, lo componen (cuando se utiliza el papel como soporte), en un orden de izquierda a derecha, las fracciones siguientes:

1. Albúmina.
2. Alfa 1 globulinas.
3. Alfa 2 globulinas.
4. Betaglobulinas.
5. Gammaglobulinas.

Los espacios que ocupan estas fracciones, se conocen como zonas del electroforegrama y reciben el nombre de la fracción correspondiente.

La correcta interpretación del patrón electroforético requiere del conocimiento de la semiología de cada una de las fracciones que lo constituyen.

La albúmina es la principal proteína producida por el hígado y representa más de la mitad del contenido proteico total del suero. Es la proteína más homogénea, la más soluble y la más estable de las

que se encuentran en el plasma. Sus funciones más importantes las realiza manteniendo la presión osmótica, transportando una gran variedad de sustancias, y como fuente endógena para el suministro de aminoácidos. Puede ser metabolizada por cualquier órgano del cuerpo humano.

El aumento en la concentración sérica de la albúmina se produce, por lo general, durante la deshidratación (aumento relativo), la administración intravenosa de concentrados de esta proteína o por error en su determinación en el laboratorio. Los trastornos más frecuentes que tienen relación con este componente, se corresponden con su disminución, conocida como hipoalbuminemia y que se acompaña casi siempre del signo clínico del edema.

La hipoalbuminemia aparece en numerosas enfermedades, asociada con otros signos clínicos (tabla 2.1).

Los métodos utilizados para su cuantificación son los siguientes:

1. Electroforéticos.
2. Inmunoquímicos: electroinmunodifusión, inmunodifusión radial, turbidimétricos y nefelométricos.
3. Unión a colorantes indicadores: bromocresol verde y bromocresol púrpura.

En la zona de las alfa globulinas migra un conjunto de proteínas que se conocen como alfa 1 globulinas y alfa 2 globulinas. Las alfa 1 globulinas están representadas por las siguientes:

1. Alfa 1 antitripsina: proteína inhibidora de la tripsina y la plasmina, cuya función es proteger al organismo de la autodigestión. Forma parte del grupo de los reactantes de la fase aguda. Aumenta en las enfermedades inflamatorias y disminuye en la deficiencia congénita de esta proteína, enfermedad cuyo cuadro clínico se caracteriza por presentar enfisema pulmonar asociado con insuficiencia hepática.
2. Alfa 1 glicoproteína ácida: es un reactante de la fase aguda.
3. Alfa 1 lipoproteína: transportadora de lípidos, vitaminas liposolubles y hormonas.
4. Globulina unida a la tiroxina.
5. Alfa 1 fetoproteína: sintetizada por el hígado embrionario. Su determinación constituye una prueba diagnóstica para los defectos del tubo neural y es un marcador tumoral para el carcinoma de células embrionarias del testículo, teratocarcinomas, cáncer gástrico, pulmonar y hepatocelular.

**Tabla 2.1** Causas de la hipoalbuminemia

Enfermedades	Causas de la hipoalbuminemia
Enfermedad hepática	Disminución en la síntesis por: Enfermedad hepática intrínseca Alcoholismo Desnutrición
Enfermedad renal	Aumento de las pérdidas por: Rápida degradación Aumento de la presión oncótica en suero (uremia) Desnutrición
Enfermedad gastrointestinal	Aumento de las pérdidas por: Obstrucción hepática Malabsorción Desnutrición
Enfermedad pulmonar	Aumento de las pérdidas por: Expectoración Daño hepático Aumento en la producción de globulina y reactantes de la fase aguda
Quemaduras	Aumento de las pérdidas por: Daño hístico extenso Exudación intensa Recirculación anormal



En el grupo de las alfa 2 globulinas se incluyen las siguientes:

1. Alfa 2 macroglobulina: es una inhibidora de la plasmina y la tripsina.
2. Alfa 2 lipoproteína: transportadora de lípidos, en especial, triglicéridos.
3. Haptoglobina: reactante de la fase aguda y además transportadora de la hemoglobina libre en plasma. El estudio de sus niveles se utiliza cuando hay hemólisis en las reacciones postransfusionales. En los pacientes que han sufrido reacciones postransfusionales, disminuye la concentración de haptoglobina al agotarse la capacidad del hígado para sintetizarla, ante la demanda excesiva por la cantidad de hemoglobina que debe transportar.
4. Ceruloplasmina: proteína transportadora del cobre.
5. Colinesterasa: proteína que hidroliza la acetilcolina.

Las betaglobulinas agrupan a las siguientes:

1. Betalipoproteína: transportadora de lípidos.
2. Transferrina: proteína transportadora del hierro en suero. También se une de manera reversible a otros cationes como cobre, cinc, cobalto y calcio. Los niveles plasmáticos son regulados por la disponibilidad de hierro. Como se sintetiza en el hígado, sus valores pueden disminuir en enfermedades hepáticas agudas como las hepatitis y en las crónicas, en la desnutrición y enteropatías con pérdida de proteínas. Sus niveles plasmáticos varían en la anemia por déficit de hierro, lo cual causa un incremento en su síntesis. Por el contrario, si la anemia se debe a una falla en la incorporación del hierro a los eritrocitos, sus niveles son normales o bajos. En la sobrecarga de hierro, sus valores son normales, pero la saturación es muy alta.
3. Plasminógeno: proteína encargada de la lisis de la fibrina.
4. Complemento: constituido por un grupo de proteínas que intervienen en la propiedad fagocítica de la sangre.
5. Fibrinógeno: factor proteico de la coagulación de la sangre.

Las gammaglobulinas agrupan a las llamadas inmunoglobulinas, constituidas por cinco fracciones diferentes: G, A, M, D y E. Todas tienen funciones de anticuerpos contra virus, bacterias y parásitos. En las enfermedades autoinmunes se comportan como autoanticuerpos al actuar contra células del organismo al cual pertenecen.

## INMUNOELECTROFORESIS

La inmunoelectroforesis combina el poder de separación de la electroforesis con la capacidad resolutive de la inmunoprecipitación, basada en la especificidad inmunológica. Después de realizar la electroforesis a las muestras de suero, se depositan en pocillos individuales, un suero polivalente (antinmunoglobulinas total) y sueros monovalentes (anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM, anti kappa y anti lambda). El antígeno y el antisuero difunden el uno hacia el otro, y se produce una banda de precipitina cuando alcanzan la zona de equivalencia.

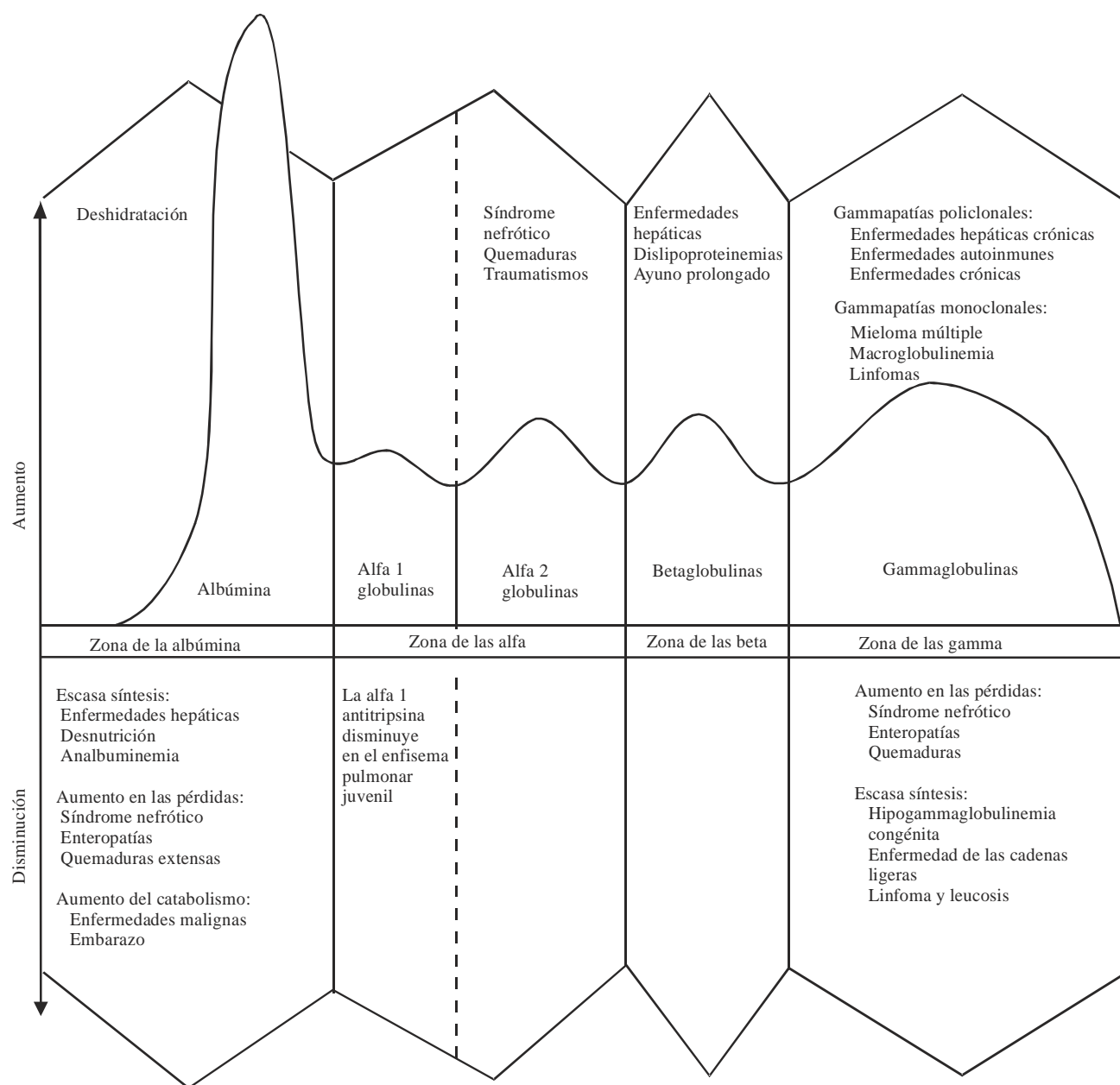
La inmunoelectroforesis tiene su indicación precisa cuando se aprecian anomalías en el estudio electroforético realizado antes.

El patrón electroforético normal es de fácil interpretación. Lo mismo ocurre cuando adopta características especiales que identifican a un buen grupo de enfermedades (figuras 2.5 y 2.6).

Un ejemplo de ello se observa cuando en la zona de las alfa globulinas, de las betaglobulinas o de las gammaglobulinas, zonas que por lo general no tienen picos, aparece un pico proteico, de base estrecha, que señala la presencia de una proteína monoclonal. La inmunoelectroforesis mantiene su vigencia diagnóstica, al igual que la electroforesis y la cuantificación de las inmunoglobulinas, cuando un patrón con estas características está presente.

Las células productoras de inmunoglobulinas (células plasmáticas y linfocitos) tienen una función muy especializada. Cada una de ellas, agrupadas en clones, produce la misma clase y tipo de inmunoglobulina. La proliferación de estas células, conocidas como inmunocitos, puede ocurrir en varios grupos de ellas, que dan lugar a varias clases y tipos de inmunoglobulinas. En este caso, se dice que la afectación es policlonal (varios clones) y su expresión en el patrón electroforético se caracteriza por un pico proteico no pronunciado, con una base ancha. Si la proliferación ocurre de forma aislada en un grupo celular que produce una clase y tipo de inmunoglobulina, la afectación es monoclonal (un clon) y su expresión en el patrón electroforético se caracteriza por un pico proteico muy pronunciado, con base estrecha, en la zona de las alfa globulinas, betaglobulinas o gammaglobulinas (figura 2.6, esquemas VII, VIII, IX y X).

La respuesta de los inmunocitos en las enfermedades infecciosas e inflamatorias crónicas es siempre policlonal. En el caso opuesto, cuando la respuesta es monoclonal, en el 45 % de los pacientes constituye un signo de malignidad y se relaciona con enfermedades como mieloma múltiple, amiloidosis, enfermedades linfoproliferativas, plasmocitoma solitario y macroglobulinemia.



**Figura 2.5** Diagrama semiológico del electroforegrama.

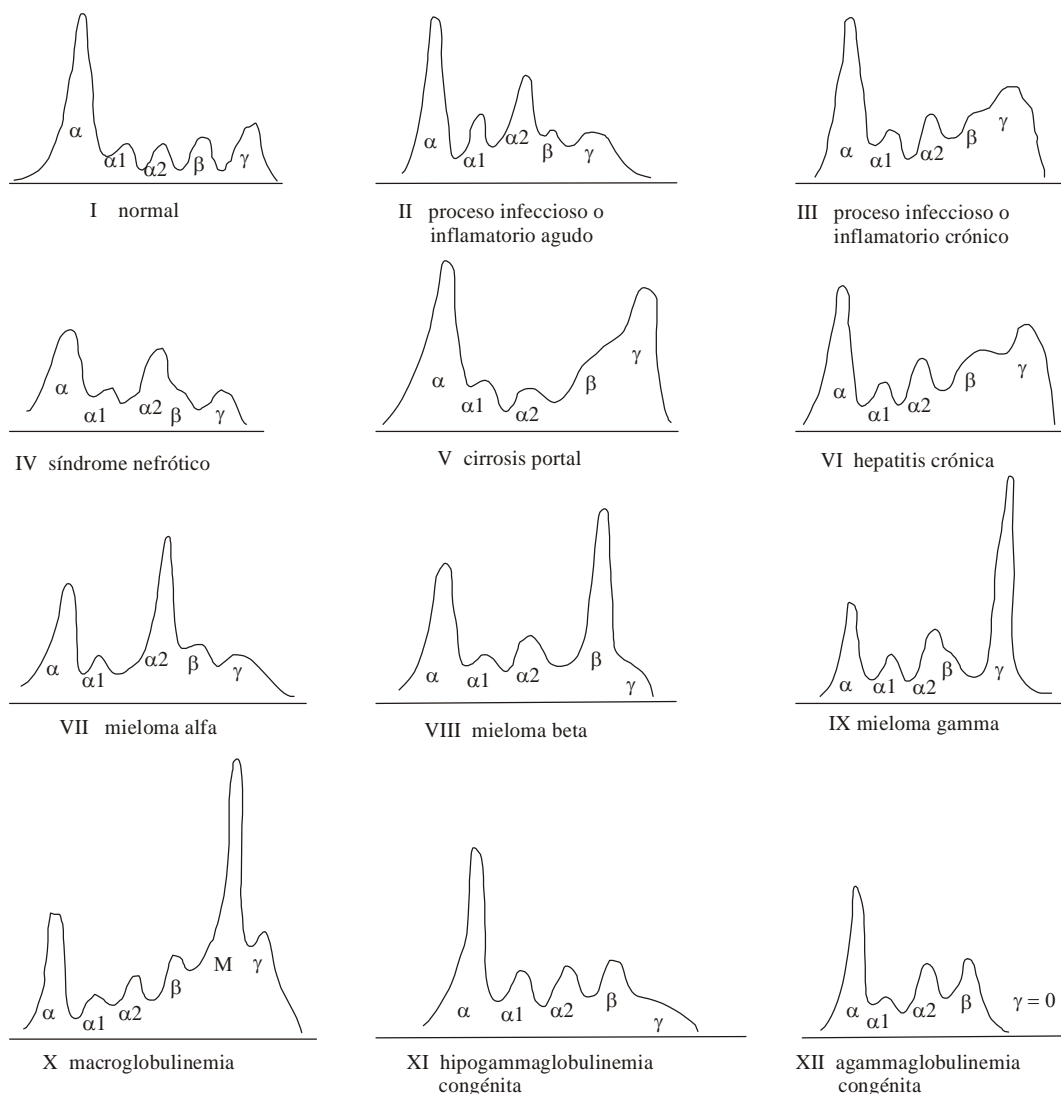
## INMUNOFIJACIÓN ELECTROFORÉTICA

La inmunofijación electroforética ofrece una elevada resolución, por lo que facilita la identificación de proteínas monoclonales en cantidades mínimas. Se basa en la combinación de la electroforesis seguida por la inmunoprecipitación. Las tiras de acetato de celulosa se saturan con antisuero monoespecífico y se aplican a proteínas séricas, antes separadas por electroforesis, en sus respectivas zonas de migración. Durante la incubación, los complejos inmunes formados pueden ser identificados como bandas diferentes. Aunque este método es muy sensible, tiene algunas desventajas,

como son: el elevado costo de los antisueros monoespecíficos y la gran cantidad que de ellos se necesita para empapar las tiras de acetato.

## TURBIDIMETRÍA

La turbidimetría es uno de los dos métodos que involucra la interacción de la luz con partículas en solución. Estas disminuyen la transmisión de la luz debido a la reflexión, dispersión y absorción del rayo luminoso. Es un método sensible y sigue la ley de Beer en un amplio rango de concentraciones.



**Figura 2.6** Patrones electroforéticos en algunas enfermedades inflamatorias, renales, hepáticas y hematológicas.

## NEFELOMETRÍA

La nefelometría es una técnica similar a la turbidimetría y se utiliza cuando las partículas en solución son pequeñas y en escasa concentración. Se emplea con frecuencia para medir la dispersión de la luz, que ocurre como resultado de la reacción antígeno-anticuerpo, lo que permite su cuantificación. Entre sus ventajas se encuentran las siguientes: rapidez, reactivos simples y posibilidades de automatización. Es una metodología simple y precisa. Sus principios se exponen en otra sección de este libro.

## INMUNODIFUSIÓN RADIAL

La inmunodifusión radial es un método para cuantificar proteínas mediante una reacción con difusión única en una dimensión.

Los sueros de referencia (calibradores), controladores y muestras, se colocan en pocitos ponchados en gel de agarosa que contiene el antisuero monoespecífico. El antígeno presente en la muestra difunde de forma radial a través del gel y forma un anillo de precipitación, al unirse al anticuerpo presente en el antisuero monoespecífico (reacción antígeno-anticuerpo). El diámetro de los anillos se mide, y se calculan los valores. Antes de disponerse de la nefelometría, este método fue muy utilizado para la cuantificación de las inmunoglobulinas.

## RADIOINMUNOENSAYO Y ENSAYO INMUNORRADIOMÉTRICO

El principio en que se basan las técnicas de radioinmunoensayo (RIA) y de ensayo inmunorradiométrico

(IRMA) es el mismo para ambas. En las dos se utiliza un antígeno marcado con un isótopo (el más frecuente es el  $^{125}\text{I}$ ). El antígeno marcado compite por los sitios de unión en el anticuerpo. En este sistema, la avidéz del anticuerpo por el antígeno marcado y el no marcado, debería ser igual. Para conocer la cantidad de proteína (antígeno) presente, se obtiene la cuantificación del antígeno marcado, al separar el anticuerpo que está unido al antígeno marcado del antígeno marcado libre. Esta separación puede lograrse por 3 vías:

1. Absorción del antígeno libre marcado.
2. Precipitación de los antígenos marcado y no marcado unidos al anticuerpo.
3. Uso de anticuerpos de fase sólida para atraer los anticuerpos unidos al antígeno marcado y no marcado.

La inmunorradiometría, a diferencia del RIA, utiliza, en lugar de antígenos, anticuerpos marcados con isótopos. En este tipo de ensayo, el ligando en las muestras compite con el ligando unido a una superficie sólida (tubos o perlas de vidrio recubiertas) por los sitios de unión del anticuerpo marcado. Hay entonces una competencia entre el ligando unido a una superficie sólida y el ligando de la muestra con el anticuerpo marcado. La cantidad de anticuerpo marcado unido a la superficie sólida, es detectada después que el exceso del anticuerpo marcado y la muestra se han eliminado. De nuevo hay una relación inversa entre la cantidad de radiactividad detectada en el tubo y la concentración del ligando en la muestra desconocida.

## ENSAYOS INMUNOENZIMÁTICOS

Los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) son métodos muy útiles para la cuantificación de proteínas y se utilizan mucho en el diagnóstico de enfermedades infecciosas, endocrinas y autoinmunes. Estos requieren de la separación del complejo antígeno-anticuerpo. Las variantes más comunes son:

1. Método indirecto para la detección de anticuerpos.
2. Método de doble anticuerpo (sándwich) para la detección de antígenos.

Las características del ensayo inmunoenzimático han sido estudiadas en otra sección de este libro. Este método ha desplazado bastante al RIA, al dejar a un lado las implicaciones que tiene trabajar con material radiactivo. En cuanto a la sensibilidad, el ELISA es similar al RIA, aunque su especificidad es discretamente

menor. Los reactivos son estables y las lecturas se pueden realizar en un espectrofotómetro común.

Mención aparte merece la electroquimioluminiscencia, principio que ha invadido el mercado internacional al incorporarse a una gran variedad de equipos automáticos que han simplificado, de forma drástica, los análisis de hormonas, marcadores tumorales, marcadores para anemias, infarto de miocardio y dosificaciones de medicamentos en sangre. La electroquimioluminiscencia ocurre con numerosas moléculas como rutenio, osmio y renio. Con el uso del rutenio quelado, como complejo para el desarrollo de luz, se ha hecho posible la determinación de aminoácidos, haptenos y ácidos nucleicos. Este método ha sido descrito en otra sección de este libro (véase el capítulo sobre inmunoquímica).

## REACTANTES DE LA FASE AGUDA

Casi todas las proteínas plasmáticas se sintetizan en el hígado, con la excepción de las inmunoglobulinas y las hormonas proteicas. Son múltiples las enfermedades en las cuales se alteran la cantidad y las proporciones de estas proteínas en los líquidos corporales, como ocurre, por ejemplo, en las reacciones inflamatorias que aparecen durante la evolución del infarto del miocardio (IMA), infecciones, tumores, y después de intervenciones quirúrgicas. Las proteínas plasmáticas que sufren alteraciones durante la inflamación, se conocen como reactantes de la fase aguda (RFA). Se supone que este grupo proteico juega un importante papel en el complejo proceso de la inflamación (cuadro 2.1).

**Cuadro 2.1** Causas de la elevación de los reactantes de la fase aguda

<p>Enfermedades inflamatorias Enfermedades malignas Traumatismos Posoperatorio Enfermedades autoinmunes</p>
---

Los niveles plasmáticos de los RFA se elevan en tiempos diferentes. En primer lugar lo hacen la proteína C reactiva (PCR) y la alfa 1 antitripsina; 12 horas después, se elevan la alfa 1 glicoproteína ácida, la haptoglobina, la fracción C4 del complemento y el fibrinógeno. Las últimas en elevarse son la ceruloplasmina y la fracción C3 del complemento. Todas alcanzan su máxima concentración entre 2 y 5 días. Los cambios en su concentración, que responden a un

aumento en la síntesis por parte del hígado, no permiten conocer ni la ubicación ni las causas de la reacción inflamatoria, pero constituyen una excelente herramienta para controlar, desde el punto de vista evolutivo, su progreso o desaparición y, por lo tanto, la eficacia o no del tratamiento impuesto (tabla 2.2).

**Tabla 2.2** Respuesta de los reactantes de la fase aguda ante el proceso inflamatorio

Reactantes	Elevación de los resultados Comienzo (h)	Pico máximo (h)
Proteína C reactiva	2	48
Alfa 1 antitripsina	8	72 - 120
Alfa 1 glucoproteína ácida	8	72 - 120
Haptoglobina	8	72 - 120
C3 y C4	8	72 - 120
Fibrinógeno	8	72 - 120

El aumento de la síntesis de las proteínas de la fase aguda, se acompaña de la disminución de la prealbúmina, de la albúmina y de la transferrina, que constituyen los llamados reactantes de la fase negativa.

Por lo general, las proteínas de la fase aguda forman parte del grupo de las alfa 1 globulinas y alfa 2 globulinas. Estas, a su vez, constituyen la llamada zona de las alfa en el diagrama electroforético.

El fibrinógeno, proteína de la fase aguda, influye en la determinación de la velocidad de sedimentación eritrocitaria (VSG). En las enfermedades hepáticas crónicas, la concentración del fibrinógeno disminuye, y su efecto acelerador sobre la VSG queda a cargo de la albúmina, que disminuye, y de las globulinas, que aumentan.

## LAS ALFAGLOBULINAS Y LAS BETAGLOBULINAS EN LA VELOCIDAD DE SEDIMENTACIÓN ERITROCITARIA

La albúmina es estabilizadora de la VSG. En las infecciones agudas, la albúmina plasmática disminuye y las alfa globulinas y el fibrinógeno aumentan, combinación que acelera la VSG y que constituye la causa principal de esta aceleración en afecciones como la nefrosis y la cirrosis.

En el mieloma múltiple, la VSG se acelera de manera considerable. La formación de pilas de monedas, originadas por la sedimentación rápida de los eritrocitos,

impide muchas veces que se extienda, de forma adecuada, la sangre periférica sobre el portaobjetos. Aunque el cuadro proteico plasmático es muy variable en esta enfermedad, por lo general hay una gran concentración proteica en la zona de las globulinas (pico monoclonal, paraproteína) y una discreta disminución de la albúmina. Estas alteraciones proteicas en el plasma de los pacientes, causan la aceleración de la VSG por encima de 100 mm/h.

En la VSG, la sedimentación de los eritrocitos transita por 3 fases (A, B, C):

- A: fase inicial, de pocos minutos, durante la cual se forman las pilas de monedas.
- B: fase que tiene una duración de 30 minutos a 2 horas, que depende de la longitud de la pipeta y en el transcurso de la cual la sedimentación ocurre a una velocidad constante.
- C: fase lenta, en la que se produce el empaquetamiento de la columna de eritrocitos.

La fase B es la más importante. La VSG debe “montarse” preferiblemente antes de transcurrir 2 horas de tomada la muestra. En determinadas circunstancias, este período puede prolongarse hasta 6 horas, pero no más, pues se invalidan sus resultados.

La VSG se determina con métodos manuales y automáticos. Entre los métodos manuales, el más utilizado es el de Westergreen en cualquiera de sus modificaciones. Para el uso en pediatría, existen las microtécnicas.

## CARACTERÍSTICAS DE LAS PROTEÍNAS COMPRENDIDAS EN EL GRUPO DE LOS REACTANTES DE LA FASE AGUDA

**Proteína C reactiva (PCR).** Esta proteína fue identificada en 1930, en el suero de pacientes con neumonía causada por neumococos y se comprobó que podía unirse al polisacárido C del *Streptococcus pneumoniae*, y producir floculación. Luego, se detectó su presencia en otras enfermedades inflamatorias agudas. La PCR fue el primer reactante de la fase aguda que se identificó. Es sintetizada por el hígado y se vierte en el plasma. Un subgrupo de los linfocitos también la produce en pequeñas cantidades, pero en este caso permanece unida a la superficie celular. Su elevación en el plasma se produce a las 2 horas, y alcanza su máxima concentración a las 48 horas. Esta proteína constituye el marcador de la inflamación por excelencia y tiene numerosas funciones como: dar comienzo a la opsonización, a la fagocitosis y a la

activación del complemento, de los neutrófilos y de los monocitos macrófagos. Estas propiedades le permiten jugar un importante papel en el reconocimiento de organismos microbianos y como inmunomodulador en el huésped. También es importante para el reconocimiento de los tejidos necrosados. Durante muchos años fue poco utilizada, a pesar de conocerse su importancia como marcador inflamatorio. A comienzos de la década de los 90 del siglo xx, se prestó atención una vez más a sus posibilidades de diagnóstico y aparecieron publicaciones más completas, que volvieron a situarla entre las determinaciones más utilizadas en el laboratorio clínico. Un hecho importante en su revalorización, lo fue la comparación de esta prueba con otra, muy utilizada desde hace años como marcador no específico de la actividad de los procesos patológicos: la VSG.

La PCR tiene algunas ventajas en relación con la VSG. Entre ellas sobresale el hecho de que el fibrinógeno, las proteínas monoclonales y la morfología eritrocitaria, no son causas de interferencia.

Al igual que la VSG, cuando la PCR es positiva, indica la existencia de un proceso inflamatorio, pero no ofrece datos sobre sus causas.

En relación con los métodos para la determinación de la PCR, también existen ventajas si los comparamos con la VSG.

La VSG, cuando se determina con métodos manuales, requiere de pipetas especiales, de una observación estricta de la relación anticoagulante-sangre, de la colocación de la pipeta cargada en un soporte en posición vertical y del reposo durante 1 hora. Cualquier variación en las condiciones antes señaladas, causa errores groseros en los resultados. Para la VSG existen métodos automáticos que se reservan para los laboratorios que tienen una carga grande de trabajo, que justifique la adquisición de un equipo tan costoso para realizar ese tipo de análisis.

En su determinación, la PCR ofrece las ventajas siguientes:

1. Prueba de aglutinación con látex, de fácil realización.
2. Ensayos inmunoenzimáticos manuales o automáticos (ELISA), nefelometría con láser, fluorescencia polarizada e inmunoturbidimetría. Ya sea el método manual o el automático, el tiempo consumido en su determinación no es mayor que 10 minutos y el material biológico es, por lo general, suero.

Aunque todavía la VSG se mantiene como una prueba de uso generalizado, tiene en la PCR una potente

rival que ha ganado territorios diagnósticos en enfermedades como apendicitis, pancreatitis, enfermedades reumáticas (artritis reumatoidea) y cardiovasculares. En este grupo de enfermedades y en los trastornos vasculares periféricos, la PCR es considerada un factor de riesgo. A partir de estudios publicados en 1997, se demostró la importancia de la PCR como agente predictivo de futuros IMA, o de la posible repetición del IMA cuando, después de ocurrido el primer ataque, sus valores se mantienen elevados.

**Alfa 1 antitripsina.** Es un inhibidor de la tripsina y la plasmina, por lo cual protege al cuerpo de la autodigestión. Se eleva en las reacciones de la fase aguda y en el embarazo. Su deficiencia es causa de enfisema pulmonar y falla hepática en la enfermedad homocigótica.

**Alfa 1 glucoproteína ácida.** Su función es desconocida. Su determinación se utiliza para seguir las reacciones de la fase aguda.

**Haptoglobina.** Se une a la hemoglobina libre en el suero. Se determina para el seguimiento de las reacciones de la fase aguda y en los procesos en los que ocurre hemólisis, como las reacciones postransfusionales y anemias hemolíticas, en las cuales su concentración disminuye al unirse a la hemoglobina libre que proviene de los eritrocitos destruidos.

**C3 y C4.** Los niveles del complemento aumentan en las reacciones inflamatorias (fase aguda). Sus valores disminuyen en las enfermedades autoinmunes.

**Fibrinógeno.** Es un factor de la coagulación de la sangre. Además, forma parte de los RFA, por lo que aumenta en las infecciones, en las reacciones inflamatorias y en el embarazo. Disminuye en los trastornos de la coagulación como la coagulación intravascular diseminada (CID), en las enfermedades de origen congénito y adquirido (hepatopatías).

## BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- Analite of the month: C reactive protein CLI, 2000 May. Boehringer Diagnostics Div. C-reactive protein as a predictor of cardiovascular diseases. Analyte of the month CLI, 2000 May.
- Gambino R. C-reactive protein as a measure of risk for myocardial infarction and stroke. Labmedica International 1998 May-June.
- Kawai Tadashi Diagnostic significance of low serum albumin. Lab Med, 1985, Oct-Nov.
- Kopek JA. Laboratory diagnosis of acute inflammation. Labmedica 1986, June-July.
- Schoeff LE. Principles of laboratory instruments Philadelphia: Mosby, 1993.
- Speicher, Carl. Choosing effective laboratory tests. Philadelphia W. B. Saunders, 1983.

## **CONTENIDO**

---

### **Introducción/ 115**

### **Lipoproteínas plasmáticas/ 115**

### **Transporte de los lípidos exógenos/ 117**

### **Transporte de los lípidos endógenos/ 117**

Transporte por las lipoproteínas de muy baja densidad/ 117

Transporte por las lipoproteínas de baja densidad/ 118

Transporte por las lipoproteínas de alta densidad/ 118

### **Lipoproteínas y aterosclerosis/ 118**

Papel de las lipoproteínas de baja densidad/ 119

Papel de las lipoproteínas de muy baja densidad/ 119

Papel de las lipoproteínas de alta densidad/ 119

Papel de la lipoproteína (a)/ 119

### **Clasificación clínica de las hiperlipoproteinemias/ 120**

### **Evaluación de las hiperlipoproteinemias/ 120**

### **Dislipoproteinemias/ 121**

Hiperlipoproteinemias primarias/ 121

Hipolipoproteinemias primarias/ 124

Hiperlipoproteinemias secundarias/ 125

### **Bibliografía recomendada/ 127**

### Capítulo 13



## EXPLORACIÓN DEL METABOLISMO DE LAS LIPOPROTEÍNAS

*Dr. Rafael Álvarez Echevarría*

### RESUMEN

En este capítulo se hace una breve reseña acerca del metabolismo de las lipoproteínas, sus trastornos, agrupados según la clasificación de Fredrickson, modificada luego por la Organización Mundial de la Salud, así como las funciones y características de cada una de sus fracciones. Además, se presentan los exámenes del laboratorio que permiten el diagnóstico, estudio y clasificación de las dislipidemias y que resultan imprescindibles para el monitoreo del tratamiento que se debe realizar. Se establecen también los grupos de riesgo de enfermedades coronarias y vasculares periféricas.

### INTRODUCCIÓN

Las alteraciones del metabolismo de los lípidos y de las lipoproteínas plasmáticas constituyen un importante capítulo de la patología, que ha tomado creciente valor por su relación con las enfermedades cardiovasculares y otras enfermedades de gran importancia clínica por su elevada morbilidad y mortalidad. En el presente capítulo se ofrece una información básica sobre la estructura y el metabolismo de las lipoproteínas, el papel de las apoproteínas en el metabolismo, y la relación de las diferentes lipoproteínas con la aterosclerosis. Se presenta, además, el esquema de Fredrickson para la clasificación de las dislipoproteinemias y un esquema para la evaluación, por parte del laboratorio, de las alteraciones del metabolismo de las lipoproteínas y de los lípidos plasmáticos. Al final, se hace un recuento breve de las principales alteraciones primarias o genéticas y secundarias de las lipoproteínas.

### LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS

Los lípidos como: los triglicéridos, los colesterolos y otros, no son solubles en el plasma, por lo que su

transporte en él se realiza en forma de complejos moleculares llamados lipoproteínas, en las que el componente proteico se denomina apolipoproteína o apoproteína. Las lipoproteínas constituyen un sistema heterogéneo de partículas de diferentes tamaños y funciones metabólicas. Ellas poseen un núcleo hidrófobo que contiene los lípidos no polares (triglicéridos y colesterol esterificado), mientras que la superficie externa está constituida por lípidos polares (colesterol no esterificado y fosfolípidos) y apoproteínas. Estas apoproteínas, además de jugar un papel determinante en la estabilidad de la estructura de la lipoproteína, desempeñan diversas funciones en el metabolismo de esta. Los lípidos y las lipoproteínas se pueden clasificar según su composición. La clasificación más utilizada hoy incluye, además, la densidad específica de las lipoproteínas, y de esa manera las divide.

**Quilomicrones.** Son las partículas de mayor tamaño y menor densidad. Tienen un alto contenido en triglicéridos, se originan en el intestino y transportan los lípidos de la dieta. Contienen apoproteínas A-I, A-II, A-IV, B-48, C-I, C-II, C-III y E. Cuando el plasma o



suelo contiene quilomicrones y se deja en reposo a temperatura de refrigeración, se observa la formación de un sobrenadante cremoso.

**Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL).** Son lipoproteínas que transportan triglicéridos de origen endógeno y, en menor grado, colesterol. Se originan, sobre todo, en el hígado. Contienen apoproteínas B-100, C-I, C-II, C-III y E. En ausencia de quilomicrones, la mayor parte de los triglicéridos plasmáticos se encuentra en esta fracción. El aumento de esta fracción le confiere un aspecto lactescente al plasma.

**Lipoproteínas de densidad intermedia (IDL).** Están constituidas por partículas lipoproteicas de densidad intermedia entre las VLDL y las lipoproteínas de baja densidad (LDL), transportan triglicéridos y, en menor grado, colesterol. Contienen las apo B-100, C-III y E. Su metabolismo está dirigido por la apo E y alguna variante genética de esta puede condicionar un aumento de estas lipoproteínas.

**Lipoproteínas de baja densidad (LDL).** Son muy ricas en colesterol esterificado y se originan de la transformación de las VLDL y de las IDL. Tienen la función de transportar colesterol hacia los tejidos periféricos. Están asociadas con la apoproteína B-100. Los altos niveles de colesterol plasmático dependen, sobre todo, del aumento de estas lipoproteínas. Están identificadas como lipoproteínas aterogénicas.

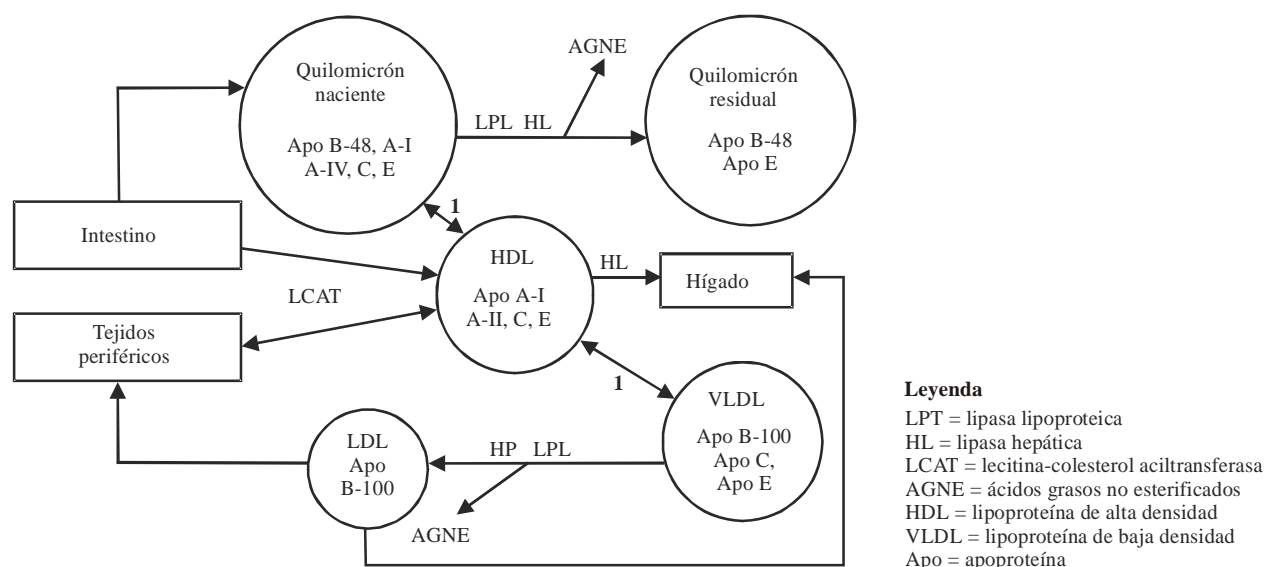
**Lipoproteínas de alta densidad (HDL).** Son las lipoproteínas más pequeñas y densas. Son ricas en proteínas y fosfolípidos y transportan colesterol esterificado. Hay dos subclases principales de HDL: HDL<sub>2</sub> y HDL<sub>3</sub>.

El papel de las HDL parece ser el transporte del colesterol desde los tejidos periféricos hacia el hígado. Contienen apoproteínas A-I, A-II, C-I, C-IIA, C-III, D y E. En la actualidad se les reconoce un papel protector contra la aterosclerosis.

**Lipoproteína (a) o Lp (a).** Esta lipoproteína parece representar el vínculo entre el metabolismo de los lípidos y la fibrinólisis. Desde el punto de vista estructural, está compuesta de una molécula de apo B-100 unida por un puente disulfuro a una lipoproteína (a) que se presenta en siete diferentes formas alélicas y está muy glicosilada. Existen marcadas similitudes antigénicas entre el plasminógeno y la lipoproteína (a) debido a semejanzas estructurales entre ambas. La presencia de la Lp (a) en la placa aterosclerótica y su capacidad de interferir la fibrinólisis sugieren un posible papel en la aterogénesis.

**Apolipoproteínas.** Las principales funciones de las apolipoproteínas resultan de interés, mientras que los defectos en el metabolismo de estas traen por resultado trastornos de los lípidos. Entre las principales funciones de las apolipoproteínas se han identificado:

1. Solubilizar los lípidos para su secreción por las células.
2. Servir de componente estructural para el ensamblaje de las lipoproteínas.
3. Activador de enzimas lipolíticas.
4. Aceptar lípidos a través de reacciones de intercambio en el plasma.
5. Unión a receptores de superficie celular específicos; mecanismo de captación celular y degradación de lipoproteínas (figura 2.7).



**Figura 2.7** Esquema del metabolismo de las lipoproteínas.

Por medio de la lipólisis, las lipoproteínas ricas en triglicéridos (quilomicrones y VLDL) dan lugar a un grupo de compuestos intermedios:

1. Los remanentes de quilomicrones, que son captados por el hígado.
2. Las VLDL, que se convierten en LDL o son captadas por el hígado.
3. Las LDL, que transportan colesterol a los tejidos y por último, son captadas por el hígado.
4. Las HDL, sintetizadas en el hígado y en el intestino, que captan lípidos desde los quilomicrones y las VLDL, a la vez que intercambian (1 de la figura 2.7) lípidos y apoproteínas con las VLDL.

Las funciones de las principales apoproteínas se muestran en la tabla 2.3.

### TRANSPORTE DE LOS LÍPIDOS EXÓGENOS

El colesterol y los triglicéridos dietéticos que resultan de la digestión por las enzimas pancreáticas e intestinales, se encuentran en la luz intestinal como colesterol libre, ácidos grasos y 2-monoglicéridos. Los ácidos grasos de cadena corta pasan de inmediato a la circulación portal y en el plasma viajan unidos a la albúmina. Los ácidos grasos de cadena larga son reesterificados en las células epiteliales. El colesterol es también reesterificado por acción de la enzima acil-colesterol-aciltransferasa (ACAT). Estos lípidos y algunas apolipoproteínas dan lugar a los quilomicrones. Estos, compuestos en el 90 % por triglicéridos, son secretados a la linfa y alcanzan el plasma a través del conducto torácico. Forman parte de los quilomicrones, sobre todo, las apo B-48, apo C-II y apo E. La apo B-48 no se une al receptor LDL; evita la eliminación prematura de los quilomicrones de la circulación antes de la acción de la lipasa lipoproteica. La apo C-II es un cofactor para esta enzima. Los quilomicrones maduros circulantes entran en contacto con la lipasa lipoproteica presente en el endotelio de los capilares de algunos tejidos como el muscular y el adiposo. Allí, por efecto de la enzima, son hidrolizados los triglicéridos y los ácidos grasos son almacenados o utilizados como fuente de energía. El producto final del metabolismo de los quilomicrones son los quilomicrones residuales o remanentes, que son eliminados del plasma por el hígado, aproximadamente el 35 %, mediante el receptor LDL, mientras que la mayor parte es eliminada mediante el receptor apo E dependiente, denominado proteína relacionada con el receptor LDL (LRP). Por medio de estos mecanismos, los lípidos absorbidos alcanzan el hígado, para su metabolismo ulterior.

**Tabla 2.3** Funciones de las principales apoproteínas

Apoproteínas	Principales funciones
Apo A-I	Estructural en las HDL, activador de la lecitina-colesterol-aciltransferasa (LCAT), ligando para unión de HDL
Apo A-II	Estructural en las HDL, activador de la lipasa hepática, ligando para la unión de HDL
Apo A-IV	Activador de LCAT, ligando para la unión de HDL
Apo B-100	Estructural para VLDL, IDL, LDL y Lp (a), ligando para el receptor LDL
Apo B-48	Estructural para los quilomicrones
Apo C-I	Activador de LCAT
Apo C-II	Cofactor esencial para la lipasa lipoproteica (LPL)
Apo C-III	Inhibidor de la hidrólisis de triglicéridos por las lipasas lipoproteica y hepática
Apo D	Posible cofactor de la proteína que transfiere el colesterol esterificado (CETP)
Apo E	Ligando para la depuración de remanentes de quilomicrones y VLDL. Ligando para el receptor LDL
Apo (a)	Estructural para la Lp (a), inhibidor de la activación del plasminógeno

### TRANSPORTE DE LOS LÍPIDOS ENDÓGENOS

#### TRANSPORTE POR LAS LIPOPROTEÍNAS DE MUY BAJA DENSIDAD

Los ácidos grasos en forma de triglicéridos almacenados en el hígado junto al colesterol esterificado y a las apo B-100, C y E, se ensamblan en partículas VLDL en el retículo endoplásmico de los hepatocitos y son secretados al torrente circulatorio. Estas partículas contienen una molécula de apo B-100, son ricas en triglicéridos (60 %) y constituyen una gama de partículas de tamaño y densidad variables. En la circulación, ellas reciben componentes de las HDL (colesterol

esterificado, apo C-I, C-II, C-III y E) y donan triglicéridos. Por acción de la lipasa lipoproteica (LPL) se produce la deslipidación de las VLDL por hidrólisis de los triglicéridos, la que origina VLDL residuales, también llamados IDL. Los componentes en exceso de la capa superficial (fosfolípidos, colesterol y apoproteínas A, C, y E) son transferidos a las HDL plasmáticas nacientes. Estas partículas residuales pueden ser eliminadas de la circulación mediante la unión a los receptores hepáticos para apo B y apo E (receptor LDL). Las IDL pueden también dar origen a las LDL por un proceso de remodelación en el que participa la lipasa hepática. En los defectos del receptor LDL, se ha encontrado una disminución de la tasa de remoción de VLDL, lo que resulta en un aumento de la concentración plasmática de LDL.

### TRANSPORTE POR LAS LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD

Las lipoproteínas de baja densidad (LDL), enriquecidas en apo B-100, contienen un núcleo de colesterol esterificado y pocos triglicéridos, originados durante el metabolismo VLDL-IDL-LDL y contienen alrededor del 75 % de colesterol plasmático. Estas pueden ser internalizadas por los hepatocitos mediante el receptor LDL, y el colesterol puede ser convertido en ácidos biliares y ser excretado por la bilis. En los tejidos extrahepáticos, el colesterol es utilizado en la síntesis de las membranas y hormonas o es almacenado como ésteres de colesterol. La función básica de las LDL es transportar colesterol a los tejidos periféricos y al hígado.

La internalización de las LDL por los tejidos extrahepáticos es parte de un complejo sistema de regulación de la expresión en la membrana celular de los receptores LDL y de enzimas citoplasmáticas del metabolismo del colesterol. El receptor LDL es una glicoproteína transmembrana de 839 aminoácidos, a la cual se unen las LDL, mediante la apo B-100 y otras lipoproteínas mediante las apo E. Una vez unidas, el complejo ligando-receptor es internalizado, se disocia en el interior del endosoma, el receptor se recicla hacia la superficie celular, mientras que la LDL se hidroliza en el lisosoma secundario. La disponibilidad de colesterol en el interior de la célula, inhibe la actividad de la hidroximetilglutaril-CoA reductasa (HMG-CoA reductasa); reprime la expresión de los receptores LDL en la membrana y activa la acil-colesterol-aciltransferasa (ACAT) que esterifica el colesterol libre intracelular. En condiciones de demanda de colesterol se activan los mecanismos de síntesis endógena y de captación

de LDL plasmática. Las LDL también pueden entrar en otros tejidos y en los macrófagos, mediante el receptor barredor o limpiador (*scavenger*). Esta vía metabólica puede ocasionar la acumulación excesiva de colesterol y la formación de células espumosas que contribuyen a la formación de la placa ateromatosa.

### TRANSPORTE POR LAS LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD

El papel de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) parece ser transportar colesterol desde los tejidos periféricos hacia el hígado (transporte reverso de colesterol). Las HDL nacientes, originadas en el hígado e intestino, ricas en fosfolípidos y discoidales, interactúan con los tejidos y otras lipoproteínas e incorporan colesterol que es esterificado por la enzima lecitina-colesterol-acil-transferasa (LCAT) y transforma las HDL en partículas esféricas. En el hígado se unen a un receptor mediante las apo A y tal vez mediante otro de los receptores existentes, lo que da como resultado un flujo de colesterol hacia el hígado, desde los tejidos periféricos. El colesterol puede también ser transferido a las VLDL o quilomicrones, por acción de la proteína transportadora de ésteres de colesterol (CETP) en intercambio por triglicéridos. Es por ello que existe cierta relación inversa entre las concentraciones plasmáticas de VLDL y HDL.

### LIPOPROTEÍNAS Y ATEROSCLEROSIS

Entre los factores de riesgo para la aterosclerosis, las alteraciones del metabolismo de las lipoproteínas han recibido gran atención. Muchos estudios han puesto en evidencia la relación entre lípidos plasmáticos y la cardiopatía isquémica coronaria (CIC). Entre los resultados más significativos se señalan:

1. La naturaleza y evolución de la placa aterosclerótica.
2. Producción de aterosclerosis experimental en animales con dietas que inducen hipercolesterolemia.
3. La relación entre enfermedad isquémica coronaria y los trastornos primarios del metabolismo de las lipoproteínas.
4. La existencia de hiperlipoproteinemia en una buena proporción de los individuos que padecen CIC.
5. Grandes estudios epidemiológicos de población con diferentes concentraciones de lípidos plasmáticos.
6. La reversión de lesiones ateroscleróticas en pacientes que están bajo tratamiento con drogas hipolipemiantes.

A pesar de los resultados, variables en muchos estudios, en la mayoría de ellos se ha llegado a la conclusión de que existe una relación entre enfermedad coronaria y concentración plasmática de colesterol. Los individuos con concentraciones más elevadas de colesterol plasmático están en mayor riesgo de desarrollar cardiopatía isquémica coronaria.

Estudios epidemiológicos prospectivos han demostrado una fuerte y progresiva relación entre el colesterol total y el colesterol LDL, con la morbilidad y la mortalidad por CIC. Los beneficios de disminuir la concentración plasmática de colesterol se calcula que son del 2 % de reducción en el riesgo de CIC por cada 1 % de reducción en la concentración de colesterol total. Estos estudios han permitido identificar, de manera adicional, otros factores de riesgo, tales como: edad, sexo masculino, diabetes mellitus, obesidad, sedentarismo, concentración plasmática de triglicéridos, historia familiar de CIC, baja concentración de colesterol HDL y, más reciente, subclases de lipoproteínas, concentración elevada de fibrinógeno y de Lp (a).

### PAPEL DE LAS LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD

En sujetos normolipémicos, aproximadamente 2/3 del colesterol es transportado por las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Un aumento en la concentración de LDL-colesterol se considera aterogénico. No existen dudas respecto al efecto aterogénico de las LDL. Su potencial aterogénico está dado por su capacidad de acumularse en la matriz extracelular y en las células de la íntima arterial. Las LDL nativas son captadas por el receptor LDL; mientras que aquellas que sufren modificaciones, son captadas por los receptores barredores de los macrófagos y pueden dar lugar a células espumosas. Entre las modificaciones que pueden sufrir las LDL, las más importantes son la oxidación y la glicosilación. Estos procesos parecen producirse casi siempre en los tejidos y no en la circulación. Las LDL oxidadas promueven la aterosclerosis por diferentes mecanismos, tales como: efecto quimiotáctico sobre los monocitos que se convierten en macrófagos; daño directo sobre el endotelio vascular, que promueve la liberación de citoquinas; producción de radicales libres y la supresión de funciones normales; liberación de componentes celulares activos de las células espumosas (macrófagos) repletos de LDL, entre los que se encuentran mediadores de apoptosis. También promueven la agregación plaquetaria y la liberación de tromboxano que favorece la vasoconstricción y la trombosis. La activación

plaquetaria promueve, además, la liberación de citoquinas que estimulan la proliferación de las células musculares lisas. Se señala que las LDL pequeñas y densas tienen mayor potencial aterogénico.

### PAPEL DE LAS LIPOPROTEÍNAS DE MUY BAJA DENSIDAD

La contribución de la hipertrigliceridemia al riesgo coronario es controvertida, en parte, porque la hipertrigliceridemia está asociada con otras alteraciones de los lípidos, que, por sí mismos, pueden predisponer a la aterosclerosis. Entre las asociaciones encontradas con más frecuencia se señalan: bajos niveles de HDL-colesterol, presencia de remanentes de lipoproteínas ricas en triglicéridos, resistencia a la insulina y presencia de LDL pequeñas y densas.

### PAPEL DE LAS LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD

Las HDL, al contrario de las LDL y VLDL, tienen un efecto anti-aterogénico, y existe una fuerte correlación inversa entre las concentraciones plasmáticas de HDL-colesterol y la incidencia de CIC. Se considera que concentraciones superiores a 1,6 mmol/L tienen un efecto protector sobre la CIC, mientras que, inferiores a 0,9 mmol/L, se consideran un factor de riesgo. Existe una correlación inversa entre HDL-colesterol y la concentración plasmática de triglicéridos, y resulta frecuente encontrar asociada la disminución de HDL con hipertrigliceridemia. Varios factores, además del estilo de vida, se han vinculado con los bajos niveles de HDL. Entre ellos, el hábito de fumar, la obesidad y la falta de actividad física, parecen ser los más significativos. Las HDL son capaces de remover colesterol desde los tejidos. Tienen efecto antiaterogénico por transporte reverso del colesterol, el mantenimiento de la función endotelial y la protección contra la trombosis. Hace poco se ha señalado, de manera adicional, un efecto protector de las HDL contra la oxidación de las LDL.

### PAPEL DE LA LIPOPROTEÍNA (a)

Estudios epidemiológicos sugieren una relación entre el exceso de Lp (a) y CIC, pero estudios prospectivos posteriores han tenido resultados controvertidos. No obstante, se considera que concentraciones superiores a 30 mg/dL de esta lipoproteína se asocian con un aumento de la morbilidad y de la mortalidad por CIC. Sin embargo, en sujetos con hipercolesterolemia o disminución

del HDL-colesterol, el exceso de Lp (a) es un factor de riesgo adicional para la CIC. La presencia de Lp (a) en las lesiones ateroscleróticas puede ser contribuyente por tres posibles razones: inhibe la conversión del plasminógeno en plasmina, favorece la proliferación de células musculares lisas y recluta los monocitos para la pared vascular.

## CLASIFICACIÓN CLÍNICA DE LAS HIPERLIPOPROTEINEMIAS

El sistema de clasificación de los fenotipos de las hiperlipoproteinemias, desarrollado por Fredrickson y luego modificado, ha sido aceptado en todo el mundo. Y aunque en la actualidad se reconoce que un fenotipo puede ser causado por diferentes enfermedades genéticas o que una misma enfermedad puede producir más de un fenotipo de hiperlipoproteinemia, este sistema de clasificación ofrece apreciables ventajas para el manejo médico de estos trastornos y contribuye a su comprensión. Cada tipo de hiperlipoproteinemia describe un patrón anormal de lipoproteínas plasmáticas y no constituye la designación de una enfermedad específica (tabla 2.4).

## EVALUACIÓN DE LAS HIPERLIPOPROTEINEMIAS

Las alteraciones de las lipoproteínas pueden estar ocasionadas por múltiples causas (primarias y secundarias).

La expresión fenotípica de estos trastornos puede ser diferente en dependencia de factores asociados, presentes en cada paciente, lo que determinará, de manera adicional, el tipo de intervención más conveniente que deberá realizarse en cada caso. No todas las hiperlipoproteinemias secundarias desaparecen al controlar la causa metabólica. Debe tomarse en consideración, además, la posible existencia de una causa primaria subyacente (tabla 2.5).

La eficiente utilización del laboratorio clínico posibilita, mediante un grupo de determinaciones, una correcta clasificación de las hiperlipoproteinemias, a partir de los fenotipos de estas. Desde el punto de vista práctico, la evaluación del riesgo coronario debe incluir las determinaciones plasmáticas de colesterol total, triglicéridos, LDL-colesterol, HDL-colesterol y los cocientes LDL-col/HDL-col y col-tot/HDL-col. La simple prueba de dejar el plasma o suero en reposo, durante la noche, en refrigeración, brindará información adicional de gran utilidad en la tipificación de las dislipoproteinemias. Las dislipoproteinemias más frecuentes son los tipos IIa, IIb y IV; mientras que los tipos I, III y V solo se encuentran de manera ocasional.

El Panel de Tratamiento de Adultos (ATPII) del Programa Nacional de Educación para Colesterol (NCEP) y otros paneles de expertos han hecho recomendaciones sobre los niveles deseables y de riesgo de CIC para las determinaciones antes señaladas sobre la base de amplios estudios epidemiológicos.

Es necesario destacar que la determinación de colesterol total solo debe utilizarse como un método para

**Tabla 2.4** Fenotipos de hiperlipoproteinemias

Tipo	Colesterol	Triglicéridos	Electroforesis	Lipoproteínas
I	Ligero aumento o normal	Muy aumentados > 11,3 mmol/L	Presencia de quilomicrones	Presencia de quilomicrones
IIa	Aumentado > 6,2 mmol/L	Normales	Aumento de betalipoproteína	LDL
IIb	Aumentado > 6,2 mmol/L	Moderadamente aumentados > 1,7 mmol/L	Aumento de betalipoproteínas y de prebetalipoproteínas	LDL y VLDL
III	Aumentado > 6,2 mmol/L	Aumentados > 7,0 mmol/L	Banda beta-prebeta	IDL
IV	Ligero aumento o normal	Aumentados > 3,0 mmol/L	Aumento de prebeta	VLDL
V	Moderado	Muy aumentados	Aumento de prebeta	Quilomicrones

detectar hipercolesterolemia. En caso de que exista un resultado por encima de los valores deseables, este método debe estar acompañado de la determinación de LDL-col y HDL-col. Para el diagnóstico diferencial de las dislipoproteinemias, deben ser evaluados tanto los lípidos como las lipoproteínas plasmáticas. Estudios recientes han

demostrado que en la CIC los cambios en apo B y apo A son similares a los del colesterol total, LDL y HDL, respectivamente. Si bien los niveles de apo A-I y apo B discriminan mejor entre los individuos con CIC documentada de forma angiográfica y los individuos normales que el colesterol de las lipoproteínas correspondientes, no son aún determinaciones habituales para la evaluación de las hiperlipoproteinemias (tablas 2.6 y 2.7).

**Tabla 2.5** Hiperlipoproteinemias secundarias

Tipo	Causas
I	Diabetes mellitus insulín dependiente, disglobulinemia, lupus eritematoso sistémico, pancreatitis
II	Síndrome nefrótico, hipotiroidismo, enfermedad obstructiva hepática, porfiria, mieloma múltiple, cirrosis portal, hepatitis viral aguda, mixedema, estrés, anorexia nerviosa, hiperparatiroidismo, síndrome de Cushing
III	Hipotiroidismo, disgammaglobulinemia, mixedema, cirrosis biliar primaria, acidosis diabética
IV	Diabetes mellitus, síndrome nefrótico, gestación, contraceptivos orales, enfermedad de almacenamiento de glucógeno, alcoholismo, pancreatitis, hipotiroidismo, enfermedad de Niemann-Pick, acromegalia
V	Diabetes mellitus insulín dependiente, síndrome nefrótico, alcoholismo, mieloma múltiple, pancreatitis, macroglobulinemia, diabetes mellitus no insulín dependiente, contraceptivos orales

## DISLIPOPROTEINEMIAS

El término *dislipoproteinemia* engloba todas las alteraciones de las lipoproteínas plasmáticas, ya sean cuantitativas (por exceso o defecto) o cualitativas; ya sean primarias y hereditarias o secundarias y adquiridas, que se producen como consecuencia de otra enfermedad, hábito de vida o tratamiento farmacológico.

Si bien el modelo fenotípico de Fredrickson fue el punto de partida para la comprensión de estos trastornos, hoy se sabe que la expresión fenotípica de una dislipoproteinemia puede cambiar por efecto del estado metabólico o del tratamiento. Hoy ha sido posible en gran medida, la clasificación de los trastornos primarios según las alteraciones genéticas implicadas, aunque de ello no siempre resulta un cuadro completo de la patogenia de la enfermedad.

## HIPERLIPOPROTEINEMIAS PRIMARIAS

Las hiperlipoproteinemias primarias son trastornos del metabolismo de las lipoproteínas de carácter hereditario que condicionan un aumento de una o varias de las lipoproteínas plasmáticas. Su mayor importancia

**Tabla 2.6** Anormalidades de los lípidos en adultos

Lípidos	Nivel sérico deseable	Límite de alto riesgo de CIC	Alto riesgo de CIC	Alto riesgo de pancreatitis
Colesterol	<5,2	5,2 - 6,2	≥6,2	—
LDL-colesterol	<3,4	3,4 - 4,1	≥4,1	—
HDL-colesterol	>1,6	—	<0,9	—
Triglicéridos	<2,3	2,5 - 4,5	>4,5	>11,3
Colesterol total/ HDL-colesterol	<5,0	5,0 - 6,0	>6,0	—

**Nota:** los resultados se expresan en mmol/L.

**Tabla 2.7** Principales factores de riesgo para cardiopatía isquémica coronaria

No modificables	Modificables
Edad	Tabaquismo
Sexo	Hipertensión arterial
Historia familiar de CIC	Aumento de LDL-colesterol
Antecedentes personales de CIC	Descenso de HDL-colesterol
Diabetes mellitus	Obesidad Sedentarismo Hipertrofia ventricular izquierda Elevación fibrinógeno Elevación Lp (a) Microalbuminuria

radica en la asociación de algunas de estas enfermedades con la aterosclerosis y la aparición temprana de cardiopatía coronaria.

**Hipercolesterolemia familiar.** Es una enfermedad hereditaria, con herencia autosómica dominante, ocasionada por mutaciones en el gen del receptor LDL (receptor apo B/apo E), lo que condiciona alteraciones funcionales que se expresan con una acumulación de colesterol en los tejidos.

El receptor LDL es una proteína localizada en la membrana de la mayoría de las células del organismo, que realiza un papel esencial en la regulación del metabolismo del colesterol. Está compuesto por 839 aminoácidos y su gen se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 19. Se han descrito decenas de mutaciones en este receptor, cuya expresión clínica es semejante, si bien pueden variar en la intensidad de su expresión o de la respuesta terapéutica. Las mutantes del receptor LDL se han caracterizado en cuatro clases de alelos, basados en el fenotipo y en el comportamiento de la proteína mutante. Estas cuatro clases son:

**Clase I.** Nula, en la que la síntesis de la proteína es defectuosa.

**Clase II.** Defecto de transporte, en el que está bloqueado el transporte de la proteína desde el retículo endoplásmico al aparato de Golgi.

**Clase III.** Defecto de unión, en el que la proteína es sintetizada y transportada a la superficie celular, pero hay un defecto en la unión de las LDL.

**Clase IV.** Defecto de internalización, en el que la proteína llega a la superficie celular, une las LDL de manera normal, pero el receptor no internaliza las LDL.

La forma heterocigota de la enfermedad se presenta con una frecuencia de 1/500 mientras que a la homocigota se le calcula una prevalencia de 1/100 000.

Los pacientes heterocigotos expresan alrededor de la mitad de los receptores de los individuos normales, mientras que en los homocigotos, casi no se detecta actividad de receptor. El aclaramiento fraccional de LDL está reducido en los heterocigotos, mientras que en los homocigotos está muy reducido (casi al doble). La captación de IDL por los hepatocitos también está afectada, por lo que una mayor cantidad de estas partículas se convierten en LDL. Parte del exceso de LDL es depositado en las paredes de las arterias, en los tendones y en la piel en forma de xantomas y xantelasmas. Los macrófagos aumentan la captación de LDL, mediante el receptor barredor o limpiador (*scavenger*) lo que resulta en un incremento de las LDL oxidadas, que parecen tener un mayor efecto aterogénico.

El dato clínico más relevante es el hallazgo de concentraciones elevadas de colesterol plasmático. En los adultos, las concentraciones suelen oscilar entre 7 y 10 mmol/L para el colesterol total y entre 5,7 y 8,3 mmol/L de LDL-colesterol.

Es posible realizar el diagnóstico en sangre del cordón umbilical con cifras de colesterol total de 2,6 mmol/L y de 1,6 mmol/L de LDL-colesterol.

Las concentraciones de HDL-colesterol suelen ser normales o con tendencia a estar disminuidas y los niveles de triglicéridos son normales, aunque algunos casos (10 %) de pacientes con hipercolesterolemia familiar heterocigótica pueden presentar hipertrigliceridemia.

El diagnóstico definitivo en los laboratorios especializados, se hace mediante la confirmación del defecto genético o celular del receptor LDL.

**Defecto familiar de la apoproteína B-100.** Es un desorden autosómico dominante, también asociado con la incapacidad de unión de las partículas de LDL al receptor LDL. En este caso, el defecto no radica en el receptor LDL, sino en el ligando de la apoproteína B-100, cuya afinidad por el receptor LDL está disminuida del 3 al 5 % de lo normal. Ello da por resultado una disminución de la depuración de las partículas de LDL y un incremento en su concentración plasmática. La frecuencia de esta mutación (B-3 500), en la que resulta sustituido un aminoácido arginina por glutamina, está calculada en el 0,08 % de la población general y, entre un grupo de sus portadores, se encontró un aumento promedio de 2,06 mmol/L en la concentración de colesterol plasmático.

Las manifestaciones clínicas son semejantes a las encontradas en la hipercolesterolemia familiar, con alta prevalencia de cardiopatía coronaria, y solo puede ser diferenciada de la hipercolesterolemia familiar mediante técnicas de biología molecular.

**Hiperlipemia familiar combinada.** Es un trastorno relativamente común, presente en el 1,5 % de la población general y da por resultado la elevación de las LDL, las VLDL o ambas, lo que pone de manifiesto los fenotipos II, IIa o IV. El riesgo aterogénico de este trastorno es elevado. Se encuentra hasta en el 10 % de los enfermos con cardiopatía coronaria prematura y del 0,5 al 2 % de la población general. Su herencia es autosómica compleja con gran penetrancia. Parece causado por la sobreproducción de apo B-100 asociada con VLDL, y con la presencia de LDL, pequeñas y densas, asociada con un aumento plasmático de apo B, triglicéridos y la reducción de HDL. La heterogeneidad fenotípica resulta de la variación en la subclase de LDL y la asociación con trastornos de la actividad de lipasa lipoproteica que hacen difícil el diagnóstico.

**Hipercolesterolemia familiar poligénica.** Es una enfermedad genética, en la que parecen participar varias anomalías del metabolismo de las LDL, que dan por resultado un aumento plasmático de LDL. Se considera el trastorno del metabolismo lipídico más frecuente.

Entre las anomalías reportadas se encuentran: ligeros defectos del receptor LDL, apo B-100 defectiva, aumento de la síntesis de apo B y la presencia del fenotipo E-4 de apo E.

**Hiperapobetalipoproteinemia.** Se caracteriza por una sobreproducción de apolipoproteína B. Las manifestaciones de la afección incluyen enfermedad cardíaca coronaria prematura, xantelasma, obesidad e hipertrigliceridemia, con frecuencia asociada con la diabetes mellitus o con la intolerancia a los carbohidratos. La característica de esta enfermedad es el enriquecimiento en apo B de las LDL con un cociente LDL-colesterol/apo B menor que 1,2 (valor de referencia mayor que 1,4).

**Lipoproteínas de baja densidad (LDL) pequeñas y densas.** Si bien el tamaño de las partículas de LDL es heterogéneo, los individuos pueden ser clasificados en tres fenotipos, de acuerdo con el tamaño predominante de las LDL, mediante la electroforesis en gradiente de gel:

1. Fenotipo patrón A: partículas grandes (mayor que 26,3 nm de diámetro).
2. Fenotipo patrón B: partículas pequeñas (mayor que 25,8 nm de diámetro).
3. Fenotipo patrón I: partículas intermedias (entre 25,8 y 26,3 nm de diámetro).

El fenotipo B de partículas pequeñas y densas ha sido asociado en varios estudios con la enfermedad cardíaca coronaria. Estas partículas se asocian con concentraciones superiores de triglicéridos y menores de HDL. El potencial aterogénico parece estar relacionado con una mayor susceptibilidad a la oxidación, afinidad reducida por el receptor LDL y mayor afinidad por los proteoglicanos arteriales.

**Deficiencia de lipasa lipoproteica.** Se trata de un desorden infrecuente (menor que  $1 \times 100\,000$ ), que se hereda con carácter autosómico recesivo. La enfermedad se debe a la ausencia o marcada deficiencia de la lipasa lipoproteica, lo que determina una persistencia prolongada de los quilomicrones en el plasma aun después de varios días con dieta libre de grasas o en ayunas.

Los individuos afectados muestran hiperquilomicronemia, hiperlipoproteinemia tipo I, con concentración de VLDL normal o ligeramente elevada. La concentración de triglicéridos plasmáticos se encuentra entre 11,3 y 45,2 mmol/L o aun más elevada.

Se presenta en la infancia o adolescencia con ataques recurrentes de dolor abdominal como consecuencia de pancreatitis, debida al aumento de quilomicrones en el plasma. Es característica la presencia de xantomas eruptivos, con predominio en las nalgas y en las regiones sensibles a la presión, hepatoesplenomegalia e infiltración de células espumosas en la médula ósea. En el fondo de ojo se encuentra lipemia retinalis. No se produce aterosclerosis acelerada. Esta sintomatología permite el diagnóstico antes de los 10 años de edad y rara vez cursa libre de síntomas hasta los 30 o 40 años.

El diagnóstico se establece al comprobar altas concentraciones de triglicéridos plasmáticos y prueba de frío del plasma o suero positiva, que muestra una capa sobrenadante cremosa. En la electroforesis de lipoproteínas se constata la presencia de quilomicrones. La actividad lipolítica del plasma, luego de administrar heparina, está disminuida o ausente.

**Deficiencia familiar de apoproteína C-II.** Enfermedad autosómica recesiva, determinada por la ausencia de la apoproteína C-II, cofactor esencial para la actividad de la lipasa lipoproteica. Se presenta en la infancia. Son características las crisis de pancreatitis; sin embargo, no se ha reportado ni xantomatosis ni hepatoesplenomegalia. En heterocigóticos se encuentra un discreto aumento de los triglicéridos, pero no presentan pancreatitis.

Se puede presentar como hiperlipoproteinemia tipo I ó V y prueba de frío positiva. El diagnóstico definitivo



se determina al encontrar deficiencia de apoproteína C-II en la electroforesis de apoproteínas.

**Hipertrigliceridemia mixta (hyperlipoproteinemia tipo V).** Está caracterizada por un aumento marcado de los triglicéridos, la presencia de turbidez y un sobrenadante cremoso a la prueba de frío del suero debido a un exceso de VLDL y la presencia de quilomicrones.

El defecto primario parece radicar en una sobreproducción y metabolismo defectuoso de las VLDL y de los quilomicrones debido a un déficit de lipasa lipoproteica. Este es un cuadro diferente de la hiperlipoproteinemia tipo I en la que solo se encuentran quilomicrones. Parece estar relacionada con el grado de deficiencia de lipasa lipoproteica que en este caso es parcial.

**Hipertrigliceridemia familiar (hyperlipoproteinemia tipo IV).** Es un desorden autosómico dominante asociado con moderada elevación de los triglicéridos. Con frecuencia está asociado con obesidad, hiperinsulinemia, hiperglicemia, hiperuricemia e hipertensión. El consumo de alcohol la exacerba. Se asocia con bajas concentraciones de HDL, por lo que el riesgo de enfermedad cardíaca coronaria está aumentado.

**Disbetalipoproteinemia familiar (hyperlipoproteinemia tipo III).** Es un trastorno multifactorial heredado con carácter autosómico recesivo, resultante de la acumulación de remanentes de VLDL que no son removidos de manera adecuada, y que presentan características fisicoquímicas particulares. Esto hace que en el análisis electroforético se observen las llamadas  $\beta$ -VLDL. También se acumulan remanentes de quilomicrones. El factor determinante parece ser la presencia del fenotipo E-2 de apoproteína E en los remanentes que no son aclarados con eficiencia.

Los hallazgos de laboratorio característicos son: aumento del colesterol y triglicéridos plasmáticos, una banda  $\beta$ -VLDL en la electroforesis de lipoproteínas y la identificación de la isoforma E<sub>2</sub> de la apoproteína E.

## HIPOLIPOPROTEINEMIAS PRIMARIAS

Las hipolipoproteinemias primarias son trastornos poco frecuentes del metabolismo de las lipoproteínas, ocasionados por la disminución o ausencia de una de

las apoproteínas, resultado de la disminución de la concentración plasmática de una o varias lipoproteínas.

**Abetalipoproteinemia (síndrome de Bassen-Kornzweig).** Esta enfermedad, de expresión en la infancia temprana y herencia autosómica recesiva, se caracteriza por la ausencia de apoproteína B-100 y la presencia de manifestaciones clínicas tempranas de malabsorción y acantocitosis eritrocitaria, y la aparición en la adolescencia de disminución de los reflejos tendinosos, ataxia, degeneración retiniana y esteatosis hepática. La ausencia de apo B-100 se expresa en el plasma por la ausencia de quilomicrones, de VLDL y de LDL y baja concentración de vitamina E. El diagnóstico se establece cuando se observan concentraciones muy bajas de colesterol (menor que 1,5 mmol/L), triglicéridos (menor que 0,2 mmol/L) y ausencia de LDL-colesterol y apo B.

**Hipobetalipoproteinemia.** Enfermedad rara, con un patrón de herencia autosómico dominante que, en su forma heterocigótica, cursa sin manifestaciones clínicas y se diagnostica por las bajas concentraciones de apo B, colesterol plasmático (entre 1,5 y 3,0 mmol/L), LDL-colesterol (entre 0,5 y 2,0 mmol/L) y la presencia de familiares afectados por la enfermedad.

La forma homocigótica presenta manifestaciones clínicas de malabsorción, ataxia, afectación de los reflejos tendinosos, degeneración retiniana y acantocitosis eritrocitaria. Hay disminución de las concentraciones plasmáticas de colesterol (menor que 1,5 mmol/L), triglicéridos (menor que 0,2 mmol/L) y de HDL.

**Hipoalfalipoproteinemia (enfermedad de Tangier).** Trastorno autosómico recesivo poco frecuente que se evidencia en la infancia y está caracterizado por bajas concentraciones de HDL-colesterol y deficiencia o ausencia de apo A-I. La concentración plasmática de colesterol es normal, y la de triglicéridos, normal o ligeramente aumentada.

En los homocigóticos se produce un aumento de la concentración de ésteres de colesterol en el tejido reticuloendotelial con adenopatías y, en especial, un aumento de volumen de las amígdalas, que toman un color amarillo-naranja; también se observa neuropatía periférica con toma sensitiva y motora.

La carencia de HDL se traduce en trastornos del metabolismo de otras lipoproteínas, en especial

quilomicrones y VLDL, por la disponibilidad reducida de otras apolipoproteínas como la C-II.

**Deficiencia de lecitina-colesterol-aciltransferasa (LCAT).** La deficiencia de esta enzima puede presentarse de manera parcial o completa, con baja frecuencia poblacional y herencia autosómica recesiva. Se caracteriza por la existencia de opacidades corneales desde la primera infancia. El transporte reverso del colesterol desde los tejidos periféricos se encuentra afectado.

Aparece en dos formas clínicas: una con deficiencia completa de la actividad de la enzima, concentraciones normales de colesterol plasmático en la infancia, que aumenta en la adolescencia hasta la adultez, y concentraciones disminuidas de colesterol esterificado y HDL. Los triglicéridos, en principio normales, aumentan después de la adolescencia. Esta variante de la enfermedad evoluciona en la adultez a la insuficiencia renal. La variante en la que se observa deficiencia parcial de la actividad enzimática, muestra concentraciones plasmáticas de colesterol normales, triglicéridos normales o aumentados y HDL disminuido. No se constata disminución del colesterol esterificado ni evoluciona a la insuficiencia renal.

## HIPERLIPOPROTEINEMIAS SECUNDARIAS

Se consideran secundarias las hiperlipoproteinemias encontradas en asociación con otras enfermedades orgánicas o metabólicas. Las hiperlipoproteinemias más frecuentes son las asociadas con la obesidad y una dieta inadecuada, con diabetes mellitus, hipotiroidismo, enfermedades renales y hepáticas y con la ingestión de alcohol y medicamentos, tales como: estrógenos, ciclosporina, tiazidas y  $\beta$ -bloqueadores.

**Obesidad.** Esta enfermedad metabólica está asociada con el aumento de las VLDL y de los triglicéridos plasmáticos (fenotipo IV). El grado de hipertrigliceridemia está muy relacionado con el exceso de peso. El aumento de las VLDL, con frecuencia se asocia con un aumento de la síntesis, y a menudo se encuentran LDL pequeñas y densas, así como una disminución de las HDL. La pérdida de peso revierte las alteraciones de las lipoproteínas. Se ha encontrado una asociación entre obesidad, intolerancia a la glucosa, hipertensión

arterial, hipertrigliceridemia y baja concentración de HDL, denominado síndrome X o síndrome de Reaven.

**Dieta.** La dieta parece ser el factor no genético más influyente sobre la regulación de la concentración plasmática de los lípidos y las lipoproteínas que actúa en estrecha relación con los factores genéticos que potenciarán los efectos negativos de una dieta inadecuada, de acuerdo con la carga genética individual.

Las dietas ricas en colesterol y en ácidos grasos saturados, aumentan la concentración de colesterol plasmático lo que provoca un aumento de las LDL. Los ácidos grasos de configuración *cis* y los monoinsaturados disminuyen la concentración de LDL al facilitar la captación de las lipoproteínas por los receptores hepáticos. De manera adicional, los ácidos grasos polinsaturados reducen la concentración de HDL, mientras que el ácido oleico no influye o provoca un moderado aumento de las LDL.

**Alcohol.** El consumo de alcohol, aun en dosis moderadas, agrava la hipertrigliceridemia y se constata en el 80 % de los casos de alcoholismo. Esto da lugar a una hiperlipoproteinemia tipo IV por aumento de la síntesis de VLDL y por la acumulación de ácidos grasos que, a su vez, origina esteatosis hepática como resultado de la sobreproducción de acetil-CoA, producto de la oxidación hepática del alcohol. En el alcoholismo crónico puede presentarse hiperlipoproteinemia tipo V, con frecuencia asociada a pancreatitis aguda. A pesar de que la ingestión de alcohol en dosis moderadas produce un aumento de las HDL (lo que pudiera justificar su efecto protector sobre la cardiopatía isquémica coronaria), no es recomendable su consumo, por los efectos dañinos sobre otros órganos y tejidos.

**Hipotiroidismo.** Las alteraciones de las lipoproteínas encontradas en el hipotiroidismo comprenden los fenotipos II-a y II-b con aumento de LDL plasmática aislada o asociada con un aumento de VLDL. En el primer caso se señala como causa una disminución de la síntesis de los receptores hepáticos de LDL. En el segundo caso se le asocia una tasa catabólica reducida de las VLDL, aun en presencia de una tasa de síntesis hepática de VLDL reducida. Los individuos homocigóticos para apo E-2 pueden presentar un fenotipo III o disbetalipoproteinemia, si desarrollan un hipotiroidismo.

Debe tenerse presente el diagnóstico de hipotiroidismo en pacientes con edad avanzada en los que no se aclare la causa o no haya respuesta al tratamiento de una hiperlipoproteinemia de estos tipos.

**Enfermedades hepáticas.** En el curso de la hepatitis viral o alcohólica se puede presentar hipertrigliceridemia moderada por una disminución de la actividad de la lipasa hepática y CLAT, y menor captación de las partículas residuales de quilomicrones y VLDL.

En la insuficiencia hepatocelular con reducción de la síntesis y secreción de VLDL, se presenta una disminución de LDL y, por consiguiente, una reducción de las concentraciones plasmáticas de triglicéridos y de colesterol. Hay también disminución de HDL y Lp (a). En la cirrosis hepática se encuentran concentraciones muy disminuidas de colesterol.

En la colestasis se presenta un aumento del colesterol y de los triglicéridos plasmáticos, así como una disminución de HDL y la presencia de la lipoproteína llamada LP-X, que se caracteriza por un alto contenido de colesterol no esterificado, y cuya morfología la diferencia del resto de las lipoproteínas.

**Diabetes mellitus.** Las alteraciones de las lipoproteínas plasmáticas en el curso de la diabetes presentan diferente expresión, de acuerdo con el tipo y estado metabólico del paciente.

En la diabetes mellitus isulinodependiente (DMID o tipo 1) se puede constatar un aumento de triglicéridos (VLDL) y colesterol (LDL) plasmáticos, con un predominio de partículas pequeñas y densas y una disminución de HDL. La magnitud de las alteraciones de las lipoproteínas guarda estrecha relación con el control metabólico de la enfermedad. Además, la hiperglicemia es responsable de la glicosilación no enzimática de las LDL de mayor propensión a la oxidación, lo que favorece su captación por los macrófagos y su transformación en células espumosas. En situación de carencia marcada de insulina, se puede presentar un cuadro de fenotipo V, con marcado aumento de VLDL y de quilomicrones (lipemia diabética) que revierte con el tratamiento insulínico.

En la diabetes mellitus no isulinodependiente (DMNID o tipo 2) se observa un aumento de los triglicéridos plasmáticos por el aumento de la síntesis y cierta disminución del catabolismo de las VLDL, asociado con una disminución de las HDL (prevalencia entre el 20 y el 60 % en diferentes estudios). La hipertrigliceridemia se relaciona con los niveles de glicemia y con la obesidad, frecuente entre estos pacientes. Es, además, un factor que agrava la dislipoproteinemia del diabético, la que resulta entonces más frecuente y más severa. Las LDL pueden ser normales o ligeramente aumentadas y muestran, con mayor frecuencia, LDL pequeñas y densas.

Debe tenerse presente la posible existencia de un trastorno primario subyacente en los pacientes diabéticos, en los cuales las dislipoproteinemias no mejoren, aun con un estricto control metabólico.

**Enfermedades renales.** En la insuficiencia renal crónica, el hallazgo más frecuente es la hipertrigliceridemia; mientras que la concentración de colesterol es habitualmente normal o puede incluso estar disminuida, al parecer, por causa del mal estado nutricional en algunos pacientes. La alteración más precoz reportada es el aumento de apoproteínas C-III y disminución de C-II. La reducción de la actividad de la lipasa lipoproteica y de la lipasa hepática, condicionan un aclaramiento disminuido de las VLDL. Se ha hecho alusión a la presencia de un inhibidor de la lipasa que no se puede dializar por los métodos convencionales y sí por hemodiálisis de alto flujo. Se reporta también una moderada disminución del HDL-colesterol y la elevación de la concentración de lipoproteína (a), así como una mayor susceptibilidad a la oxidación de las LDL. En pacientes sometidos a diálisis peritoneal continua, se refieren mayores concentraciones de colesterol por causa de la glucosa del dializado. Todos estos factores pueden contribuir a la reconocida aterosclerosis acelerada, observada con frecuencia, en los estadios finales de las enfermedades renales.

En el síndrome nefrótico predomina el aumento del colesterol plasmático, debido a un aumento de la síntesis de apo B y colesterol, que se relaciona con la disminución de la presión oncótica del plasma. Se señala que esta constituye un estímulo para la transcripción del gen de apo B. No obstante, estudios

recientes señalan una reducción del catabolismo de las LDL. En los casos severos, el aumento de los triglicéridos confiere a estos pacientes un fenotipo II-b, que parece estar causado por la disminución del catabolismo de las VLDL.

Hoy es aceptado que la hiperlipidemia es un factor que acelera la progresión de la lesión glomerular y de la insuficiencia renal, a la vez que se reconoce la importancia de la reducción de la proteinuria, para reducir los niveles de LDL y Lp (a) en estos pacientes.

Entre los pacientes sometidos a trasplantes, es frecuente la hipertrigliceridemia y en algunos casos se encuentra hipercolesterolemia. Se ha considerado que la terapéutica esteroidea y la ciclosporina son causantes de estas alteraciones. Los esteroides provocan resistencia a la insulina, hiperinsulinemia y aumento de la síntesis de VLDL. La reducción de la ACTH parece disminuir la actividad del receptor LDL. Los pacientes tratados con ciclosporina tienen niveles de triglicéridos y de Lp (a) superiores a los tratados con prednisona y azathioprina. Es posible que la incorporación de la ciclosporina a las lipoproteínas interfiera con la remoción de las LDL del plasma. El efecto del tacrolimus (FK 506) sobre el metabolismo de los lípidos parece ser similar, aunque menos pronunciado que el de la ciclosporina.

## BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- Brown MS, Goldstein JL. Familial hypercholesterolemia: a genetic defect in the low density lipoprotein receptor. *N Engl J Med* 1976;294: 1386.
- Fredrickson DS. Phenotyping. On reaching base camp (1950-1975) (Review). *Circulation* 1993; 87 (Supl. III).
- Gould AL, Rossouw JE, Santanillo NC. Cholesterol reduction yield clinical benefit: impact of statin trials. *Circulation* 1998;97:946.
- Halvoet P, Vanhaecke J, Janssens S. Oxidized LDL and malondialdehyde-modified LDL in patients with coronary syndrome and stable coronary artery disease. *Circulation* 1998;98:1487.
- Loscaez J. Lipoprotein(a): a single risk factor for atherothrombotic disease. (Review) *Atherosclerosis* 1990;10:672.
- Rifai N, Warnick R. Laboratory measurement of lipids, lipoproteins and apolipoproteins. Washington D.C. AACC Press, 1994.
- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis. A perspective for 1990s. *Nature* 1993;362:801.
- Scanu A. Physiopathology of plasma lipoprotein metabolism. *Kidney Int* 1991;(Supl. 31): S-3.
- Schaefer EJ, Levy RI. The pathogenesis and management of lipoprotein disorders. *N Engl J Med* 1985;312:1300.
- Strong JP. Natural history and risk factors for early human atherogenesis. *Clin Chem* 1995;41/1:134.
- The Expert Panel Second Report on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. *Arch Intern Med* 1988;148:36.
- Wilson PW. Established risk factors and coronary artery disease. The Framingham Study. *Am J Hypertens* 1994;7:75.
- Yeshurun D, Gotto A. Hyperlipidemia perspective in diagnosis and treatment. *South Med J* 1995;88:379.

## **CONTENIDO**

---

### **Introducción/ 129**

### **Balance hídrico/ 129**

### **Principales iones inorgánicos/ 130**

- Sodio/ 130
- Potasio/ 131
- Cloruro/ 132
- Magnesio/ 133

### **Contracciones y expansiones del volumen del espacio extracelular/ 133**

- Contracción isotónica del volumen del espacio extracelular/ 133
- Contracción hipertónica del volumen del espacio extracelular/ 134
- Contracción hipotónica del volumen del espacio extracelular/ 134
- Expansión del volumen del espacio extracelular/ 135

### **Bibliografía recomendada/ 135**

### Capítulo 14



## TRASTORNOS DEL EQUILIBRIO HIDROMINERAL

*Dra. Delfina N. Padrón Brito  
Dr. Jorge H. Suardíaz Pareras*

### RESUMEN

En este capítulo se estudian los mecanismos reguladores que compensan las agresiones de que es objeto el organismo y que tienden a romper el equilibrio hidromineral, con el objetivo de mantener la constancia del medio interno. Las alteraciones patológicas de este equilibrio del agua y del sodio, se conocen con los nombres de contracciones y expansiones del volumen del espacio extracelular, las cuales dan lugar a alteraciones idénticas del volumen del espacio intracelular. También se hace referencia a las pruebas de laboratorio para el estudio de estas alteraciones, con especial énfasis en la importancia de la determinación de la osmolalidad plasmática.

### INTRODUCCIÓN

El agua y los electrólitos son elementos vitales para la vida, que deben mantenerse en constante equilibrio en el interior del organismo, dentro de límites de variación muy estrechos. Para ello, el cuerpo humano posee mecanismos que compensan las agresiones del medio, que tienden a romper este equilibrio. Estos reciben el nombre de mecanismos reguladores (el riñón, la hormona antidiurética y la aldosterona). En circunstancias normales, los cambios en la osmolalidad del medio interno estimulan o deprimen la secreción de la hormona antidiurética (ADH), con aumento o disminución, respectivamente, de la reabsorción tubular de agua y cambios de la concentración de solutos en orina, plasma y líquido intersticial, lo que hace que se restablezca el equilibrio hidromineral.

Las alteraciones patológicas del equilibrio hidromineral o lo que es igual, el equilibrio del agua y del sodio, se conocen como contracciones y expansiones del volumen del espacio extracelular. De manera secundaria, estas producen alteraciones idénticas del volumen del espacio intracelular.

La determinación de la osmolalidad plasmática y urinaria posee gran importancia para el estudio de los trastornos del volumen extracelular. Esta se realiza con un instrumento llamado osmómetro, cuyas características

y principios de funcionamiento han sido descritos en otra sección de este libro. Debe tenerse en cuenta que existen modificaciones fisiológicas tales como: la variación diurna (ritmo circadiano), el ejercicio físico y la ingestión de medicamentos. El intervalo de referencia en plasma es de 280 a 300 mOsmol/kg (miliosmoles por kilogramo) y en la orina varía entre 50 y 1 200 mOsmol/kg. Se consideran valores de riesgo en plasma los inferiores a 250 mOsmol/kg y los superiores a 320 mOsmol/kg.

### BALANCE HÍDRICO

El agua constituye entre el 45 y el 60 % del peso corporal total del ser humano, en dependencia de su edad, sexo y complexión física.

En el organismo, el agua se distribuye en dos grandes compartimientos: el extracelular (AEC), con el 35 % del agua corporal total y el intracelular (AIC), con el 65 %; separados entre sí por membranas semipermeables. Esta conformación permite el paso de agua y solutos en una u otra dirección, pero con características de selectividad para estos últimos, que contribuyen a mantener una distribución desigual de electrólitos entre los diferentes compartimientos. La pared celular es muy selectiva al paso de proteínas, cloruros (Cl), potasio (K) y sodio (Na). Estos tres elementos, disueltos en el agua,

atravesan la membrana mediante los procesos químicos de difusión y de ósmosis. El endotelio vascular y la membrana celular son permeables al agua, por lo que esta pasa libremente, por los gradientes osmóticos, de un espacio al otro.

El agua extracelular, a su vez, se distribuye en dos compartimientos: el intersticial y el intravascular, separados por las membranas del endotelio capilar, que se mantienen en equilibrio por los mecanismos que se expresan en las leyes de Donan y de Starling, en lo fundamental. El primer mecanismo establece que la suma de cationes debe ser igual a la suma de aniones, tanto en el plasma como en el intersticio y que la presión osmótica del líquido intersticial, que depende del número de partículas en suspensión, debe ser igual a la del plasma. Por su parte, la ley de Starling expresa que el endotelio capilar es impermeable a las proteínas y ejerce por ello una presión negativa que es capaz de atraer a su interior el líquido intersticial que le rodea y que está exento de proteínas. Esta presión (llamada presión oncótica) es equilibrada por la presión hidrostática en el vaso capilar.

En condiciones normales, el agua ingresa al organismo con la bebida, los alimentos, y producto del metabolismo (agua endógena). Cada una de estas fuentes representa unos 1 200, 900 y 300 mL diarios (es decir, 50 %; 37,5 % y 12,5 % del total de los ingresos, respectivamente). Las pérdidas, por su parte, se producen por el riñón (unos 1 200 mL), el pulmón (400 mL), las heces fecales (100 mL) y a través de la piel (500 mL). Estas cifras varían entre individuos o en un mismo individuo de un día para otro, en dependencia de múltiples factores como: la dieta, la influencia de variaciones fisiológicas o de procesos patológicos e incluso del medio ambiente (temperatura y humedad del aire). A manera de ejemplo, se puede citar que la perspiración imperceptible, que es de unos 15 mL/kg/día, aumenta en 13 % con cada grado Celsius de temperatura corporal por encima de 37 °C.

El transporte de agua se debe, sobre todo, a gradientes osmóticos creados por el transporte activo de electrólitos de un compartimiento a otro; por consiguiente, los mecanismos de intercambio de estos y, en especial, de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , son esenciales para el balance hídrico e inseparables de este. Su regulación es efectuada por los mecanismos responsables de la tonicidad y el volumen del fluido extracelular. Ellos son:

1. El efecto de la ADH sobre los tubos colectores.
2. El sistema renina-angiotensina-aldosterona.
3. El centro de la sed, en el bulbo.

Si las pérdidas de agua exceden los ingresos, se desarrolla una deshidratación (contracción de volumen),

con hipovolemia. Usualmente, el sodio se pierde con el agua, pero su concentración relativa varía en dependencia del tipo de fluido perdido. Entre las causas más comunes de depleción de volumen están: vómitos, diarreas, drenaje quirúrgico, enfermedad renal, administración de diuréticos, fiebre, sudación profusa, restricción de la ingestión de líquidos y pérdidas internas, como ocurre en la peritonitis o el íleo.

No existen métodos directos de laboratorio que puedan cuantificar la cantidad de fluidos perdidos. La evaluación se puede realizar de manera indirecta por el valor del hematócrito y los niveles de proteínas séricas que, aunque no constituyen una medida segura, ayudan a estimar el estado del volumen plasmático. Por lo general, la concentración de urea está aumentada en mayor grado que la de creatinina en la depleción de volumen (insuficiencia prerrenal). El coeficiente osmolal orina/sangre es mayor que 1.

## PRINCIPALES IONES INORGÁNICOS

### SODIO

El sodio es el principal catión del líquido extracelular y el factor determinante de la osmolalidad plasmática: los cambios de la concentración plasmática de sodio se acompañan de cambios más o menos rápidos e importantes en la cantidad de agua que pasa hacia el interior o el exterior de las células, lo que da lugar a las alteraciones del volumen extracelular (estas alteraciones serán descritas más adelante, en este mismo capítulo). El papel del sodio en el mantenimiento de la osmolalidad plasmática se hace evidente si se revisa la fórmula de Jackson y Forman, para calcularla:

$$\text{osmolalidad del plasma} = 2([\text{Na}] + [\text{K}]) + [\text{glicemia}] + [\text{urea}]$$

Todas las concentraciones están expresadas en milimol por litro. Si recordamos que la osmolalidad del plasma oscila entre 280 y 300 mOsmol/kg, tendremos que, de acuerdo con esta fórmula, el sodio representa aproximadamente el 96 % de la osmolalidad del plasma, en circunstancias normales.

Los intervalos de referencia de este mineral oscilan entre 135 y 145 mmol/L en plasma. Las necesidades mínimas diarias son de aproximadamente 15 mmol/L y con la dieta ingresan al organismo, por lo general, no menos de 100 mmol/L. Las funciones principales que desempeña en el organismo, además del mantenimiento de la presión osmótica y del papel

que juega en el equilibrio ácido-básico, es la transmisión del impulso nervioso.

Su concentración sanguínea está bajo el control del riñón y del sistema nervioso central (SNC), que actúa a través del sistema endocrino. El sistema de transporte activo de cationes en la membrana celular, mantiene niveles altos de sodio en el espacio extracelular, mientras que el potasio está concentrado en el interior de la célula. El sodio es filtrado libremente por el glomérulo y, aproximadamente el 70 % de la cantidad filtrada, se reabsorbe de manera isotónica por el túbulo proximal, por el mecanismo contracorriente en el asa de Henle y por efecto de la aldosterona en el túbulo distal. Los niveles usuales de excreción de sodio en la orina, varían dentro de límites muy amplios, de 30 a 280 mmol/día, influidos por la ingestión diaria.

El más común de los trastornos del metabolismo del sodio en la práctica clínica es la hiponatremia o disminución de su concentración sanguínea. Los síntomas pueden variar desde cambios muy sutiles hasta alteraciones neurológicas manifiestas, e incluir los cuadros convulsivos generalizados. Puede presentarse como consecuencia de una amplia gama de trastornos, ya sea por pérdida del soluto (el sodio) o por exceso de solvente (el agua). En ambos casos, la osmolalidad plasmática está disminuida. La pérdida aumentada del catión puede ocurrir por vía renal o extrarrenal. La primera incluye el tratamiento con diuréticos, la nefropatía perdedora de sal, la insuficiencia renal, la enfermedad de Addison, la bicarbonaturia y la cetonuria. La segunda puede deberse a una sobrehidratación con soluciones hipotónicas en caso de vómitos, diarreas o sudación profusa, pérdidas del *tercer espacio* y quemaduras. El exceso de agua corporal está presente en el síndrome nefrótico, en la cirrosis, en la insuficiencia cardíaca, en la insuficiencia renal aguda y en la insuficiencia renal crónica en fase terminal.

La hiponatremia sin un incremento evidente del volumen extracelular (euvolemia) puede ser observada en el hipotiroidismo, la deficiencia de glucocorticoides y la secreción inapropiada de la hormona antidiurética (ADH).

La hipernatremia (aumento de los niveles de sodio en plasma), es poco común. Puede asociarse con el aldosteronismo primario, la enfermedad de Cushing y la diabetes insípida; pero la causa más frecuente es la iatrogénica (reposición de volumen con soluciones hipertónicas de cloruro de sodio).

Se consideran valores extremos para la concentración plasmática de sodio (con riesgo para la vida del paciente), menos de 120 o más de 155 mmol/L.

## POTASIO

El potasio es el principal catión intracelular y su metabolismo mantiene estrecha relación con la función de la célula. Solo el 2 % del potasio total del organismo es extracelular. Este es el resultado de la actividad de la bomba de cationes de la membrana, que mantiene un gradiente de 30:1 entre ambos compartimientos.

La concentración de potasio en suero oscila en un rango muy estrecho: de 3,5 a 5 mmol/L (en el interior de la célula es de aproximadamente 150 mmol/L). Esta distribución tan desigual mantiene una relación, dentro de ciertos niveles, que permite hacer una estimación aproximada de las pérdidas de potasio total: una disminución de 1 mmol/L en el potasio sérico, en el rango comprendido entre los niveles de 2 y 4 mmol/L, representa una disminución del 10 % del potasio corporal total (por fuera del intervalo mencionado, la relación deja de ser lineal).

La principal función del potasio en el organismo es la regulación de la excitabilidad de algunas células, y son los trastornos de los tejidos excitables los que pueden causar problemas médicos serios. Su presencia es imprescindible para la conducción nerviosa y la contracción muscular. Junto al calcio y al magnesio, el potasio controla la velocidad y la fuerza de la contracción cardíaca y, de este modo, el gasto cardíaco. También está vinculado con la síntesis de las proteínas.

El organismo está adaptado a una eficiente excreción de potasio: entre el 80 y el 90 % es excretado en la orina, por los glomérulos renales; el resto es eliminado en el sudor y en las heces fecales. Aunque la ingestión de potasio con la dieta sea escasa, el riñón es capaz de eliminar hasta 50 mmol/día. Ello implica que una ingestión deficiente del mineral puede provocar una severa disminución de su concentración en el organismo.

La depleción del potasio corporal (hipocaliemia o hipopotasemia) ocurre como resultado de pérdidas de fluidos gastrointestinales, debido a vómitos y diarreas, o por pérdidas renales, como consecuencia de tratamientos con diuréticos, alcalosis metabólicas, acidosis renal tubular o exceso de mineralocorticoides (hiperaldosteronismo). El tratamiento prolongado con glucocorticoides también puede conducir a una deficiencia en los niveles de potasio. La desnutrición y el síndrome de malabsorción intestinal son causas importantes. La hipocaliemia se puede evidenciar en el trazado electrocardiográfico (aparición de onda U).

La hipercaliemia (hiperpotasemia) resulta de la transferencia de iones potasio ( $K^+$ ) del espacio intracelular al extracelular y de un incremento del potasio corporal total. La transferencia ocurre en la acidosis,



en la hemorragia interna y en el daño celular (hemólisis, rabdomiólisis, quemaduras, en la fiebre mantenida y en la quimioterapia con drogas antineoplásicas). El aumento del potasio corporal total ocurre, casi siempre, en la insuficiencia renal aguda y crónica y en la deficiencia de mineralocorticoides (enfermedad de Addison).

La hipercaliemia (hiperpotasemia) artefactual puede aparecer cuando existe un aumento considerable en el número de plaquetas y leucocitos circulantes: al ocurrir la coagulación de la sangre en el interior del tubo de colección, se produce liberación del potasio intraplaquetario hacia el suero. Esto puede resolverse, en la práctica, con el empleo de sangre heparinizada para la determinación de potasio en estos pacientes. Otras causas de falso aumento de las cifras de potasio son el empleo, por un tiempo prolongado, del torniquete al realizar la toma de la muestra y, sobre todo, la hemólisis de esta.

Tanto el aumento como la disminución de la concentración de potasio en plasma, pueden causar efectos adversos severos sobre el sistema neuromuscular, que hagan aparecer síntomas tales como: apatía, debilidad y parálisis. Los efectos sobre el miocardio provocan arritmias severas que pueden llevar al paciente a la muerte. Se ha sugerido como valores extremos de concentración plasmática, con riesgo para la vida, menos de 2,5 o más de 6,5 mmol/L.

Tanto los iones de sodio como los de potasio, son importantes en la regulación del balance ácido-básico, pues los hidrogeniones ( $H^+$ ) son intercambiados por ellos en el túbulo renal. El bicarbonato de potasio es el tampón intracelular primario.

Las concentraciones de ambos electrolitos pueden ser medidas por fotometría de emisión, de absorción atómica o, con más frecuencia, con el empleo de electrodos ion-selectivos (ISE). Estos métodos se describen en otra sección de este texto. En la actualidad, la mayoría de los analistas prefieren el empleo de los ISE, por su rapidez, sencillez, precisión y confiabilidad en los resultados, en especial los que emplean el método directo (sin dilución de la muestra).

## CLORURO

El cloruro es el principal anión extracelular y representa la mayor fracción del anión inorgánico total plasmático. La mayor parte del cloruro ingerido es absorbido en el tracto gastrointestinal, y el exceso es eliminado con la orina y el sudor. La concentración en plasma oscila en un intervalo de 95 a 105 mmol/L. En

muestras extraídas en la etapa posprandial se observan valores ligeramente más bajos, debido al incremento de la síntesis de ácido clorhídrico (HCl) por las células parietales del estómago. La eliminación urinaria en 24 horas oscila entre 110 y 250 mmol/L.

El cloruro (como cloruro de sodio) está involucrado, de manera significativa, en el mantenimiento de la distribución hídrica, de la presión osmótica y del equilibrio entre aniones y cationes en el fluido extracelular. Las alteraciones de su concentración rara vez constituyen un problema primario. Su valor es importante, sobre todo en la alcalosis hipocaliémica, ya que si se restituye el potasio sin adicionar cloruros, la alcalosis persistirá.

Los cloruros son excretados durante la diuresis masiva y por pérdidas a través del tracto digestivo, como sucede con los vómitos, diarreas y fístulas intestinales. El cloro es el anión más abundante en las secreciones gástricas y también en las intestinales (tanto del intestino delgado como del intestino grueso).

La medición de cloruro en el sudor es una prueba útil para el diagnóstico de la fibrosis quística del páncreas, en la cual se le encuentra muy por encima del intervalo de referencia (en el niño, de 5 a 45 mmol/L; en el adulto, las cifras son ligeramente superiores).

La hipocloremia (disminución de la concentración plasmática de cloro) acompaña, por lo tanto, a las pérdidas digestivas (sobre todo los vómitos), a las nefritis perdedoras de sales y al exceso de mineralocorticoides. También hay disminución de cloro plasmático en las acidosis metabólicas causadas por un aumento en la producción o por una disminución de la excreción de ácidos orgánicos, como ocurre en la cetoacidosis diabética (en este caso disminuye para compensar el aumento de la concentración de estos ácidos). Otras causas de aumento de las concentraciones plasmáticas de cloruros son: la acidosis respiratoria compensada, las quemaduras extensas, el tratamiento con diuréticos del asa, o con tiazidas, y el síndrome de secreción inadecuada de la hormona antidiurética.

La hipercloremia se observa en las contracciones de volumen extracelular, la insuficiencia renal aguda, la acidosis renal tubular, la acidosis metabólica por pérdida de bicarbonato, la diabetes insípida y la intoxicación por salicilatos.

Durante mucho tiempo, el método de laboratorio más empleado para la medición de la concentración de cloruros en plasma fue la titrimetría, primero manual y después con equipos coulométricos-amperométricos (véase la sección: Análisis instrumental). En la actualidad se emplean, con preferencia, los electrodos selectivos (ISE), más precisos, sensibles y rápidos.

## MAGNESIO

El magnesio es el cuarto metal más abundante en los organismos vivos y, por su importancia, ocupa el segundo lugar como catión extracelular. Es un cofactor esencial de todas las reacciones enzimáticas que involucran ATP (incluida la síntesis de proteínas y la de ácidos nucleicos) y forma parte de la bomba de membrana que mantiene la excitabilidad eléctrica en las células musculares y nerviosas.

Su concentración plasmática oscila entre 1,5 y 2 mmol/L. Su distribución en los compartimientos líquidos del cuerpo no es uniforme: solo el 1 % está presente en los fluidos, mientras que el 65 % forma parte de la fase mineral del esqueleto. Todo ello impide que sea posible medir de manera confiable el magnesio corporal total. La ingestión diaria es de 6 a 10 mg/kg/día (la absorción es interferida por una dieta rica en fosfatos) y su eliminación se efectúa por la vía renal. Más del 90 % del magnesio filtrado por el glomérulo es reabsorbido por el sistema tubular.

La hipomagnesemia (disminución de los valores de concentración plasmática de magnesio) se produce por el aumento de las pérdidas renales por insuficiencia renal, el empleo de diuréticos y de aminoglicósidos (en todos los casos, por disminución de la reabsorción tubular), por cirrosis hepática, por alcoholismo crónico y por diarreas. La administración de dosis elevadas de insulina para tratar la cetoacidosis diabética, moviliza el magnesio hacia el interior de las células, y da como resultado la disminución de sus niveles sanguíneos. Por otra parte, la depleción del magnesio se asocia con otras anomalías electrolíticas como la hiperpotasemia, la hiponatremia y la hipocalcemia. Sus manifestaciones clínicas mejor definidas son las relacionadas con el deterioro de la función neuromuscular, que se traduce en hiperreflexia, temblores musculares, tetania, convulsiones y cambios electrocardiográficos. Son frecuentes las arritmias cardíacas y los casos de muerte súbita. La disminución de las concentraciones plasmáticas de magnesio, eleva la sensibilidad del miocardio a la digoxina, lo que aumenta el riesgo de intoxicación digitalica. También disminuye la síntesis de las proteínas.

La hipermagnesemia (aumento de los valores de concentración plasmática de magnesio) no es frecuente. Puede deberse al aumento de la ingestión (antiácidos o catárticos), a la cetoacidosis diabética (antes de iniciar el tratamiento con insulina), al hipotiroidismo y a la enfermedad de Addison. Desde el punto de vista clínico, se acompaña de somnolencia, hiporreflexia, lengua tropelosa, náuseas y vómitos, así como de alteraciones electrocardiográficas.

Para la medición de la concentración de magnesio en material biológico se han empleado métodos colorimétricos (químicos), titrimétricos, la fotometría de absorción atómica y los electrodos selectivos (ISE). Se consideran valores extremos, con riesgo para la vida del paciente, los inferiores a 0,5 o los superiores a 3,0 mmol/L en plasma.

## CONTRACCIONES Y EXPANSIONES DEL VOLUMEN DEL ESPACIO EXTRACELULAR

Las alteraciones del equilibrio del agua y el sodio acompañan muchos trastornos médicos y quirúrgicos, y son causa frecuente de morbilidad y mortalidad. Cuando la alteración del volumen del espacio extracelular se manifiesta por la pérdida o depleción de agua en él y afecta, en lo fundamental, al compartimiento vascular, este fenómeno se denomina contracción de volumen. En cambio, cuando tiene lugar una sobrehidratación de este, se habla de expansión de volumen.

## CONTRACCIÓN ISOTÓNICA DEL VOLUMEN DEL ESPACIO EXTRACELULAR

La contracción isotónica del volumen del espacio extracelular es la que con mayor frecuencia se observa en la práctica médica. En ella tiene lugar una depleción mixta de agua y sodio, en igual proporción, con paso posterior de agua del espacio intracelular hacia el intersticio. Las causas más frecuentes son las pérdidas, por vía gastrointestinal (vómitos, diarreas, fístulas, íleo obstructivo), de líquido isotónico o ligeramente hipotónico en relación con el plasma. También acompaña a menudo a las neumopatías agudas en los ancianos. Desde el punto de vista clínico, se caracteriza por sed, astenia, aparición de pliegue cutáneo, oliguria y, en los casos más graves, taquicardia e hipotensión, como manifestación de hipovolemia. En los lactantes se suele encontrar depresión de la fontanela. El diagnóstico de laboratorio se establece por el cuadro siguiente:

1. Hematócrito que muestra elevación ligera a moderada (por hemoconcentración).
2. Urea sanguínea ligeramente elevada.
3. Sodio plasmático normal o ligeramente elevado.
4. Osmolalidad plasmática normal o ligeramente elevada.

## CONTRACCIÓN HIPERTÓNICA DEL VOLUMEN DEL ESPACIO EXTRACELULAR

Antiguamente este cuadro clínico era denominado *deshidratación hipertónica*. En ella tiene lugar una pérdida mayor de solvente (agua) que de soluto (sodio), o una depleción mixta proporcional con empleo de soluciones hipertónicas para la reposición de volumen. En ambos casos, habrá un incremento relativo o absoluto de la concentración plasmática de sodio, con paso posterior de líquido del interior de la célula al intersticio. La secuencia de fenómenos es:

1. Pérdida de líquido hipotónico.
2. Disminución del volumen plasmático (contracción del volumen del espacio extracelular).
3. Aumento en la secreción de aldosterona.
4. Aumento en la reabsorción de sodio.
5. Aumento de la osmolalidad del espacio extracelular.
6. Paso de agua de las células al intersticio.
7. Contracción celular.

Las causas que provocan una contracción hipertónica se pueden agrupar en:

1. Pérdida de agua “pura”: evaporación a través de la piel (fiebre, ambiente muy seco y caliente) o pérdida por la respiración (hiperventilación).
2. Pérdida de líquido hipotónico: por vía renal (diuresis osmótica del coma hiperglicémico, cetósico o no, diálisis peritoneal hipertónica, nefropatías crónicas, diabetes insípida); por vía digestiva (vómitos, diarreas, oclusión intestinal o íleo paralítico); trasudación excesiva por fiebre, golpe de calor u otras causas.
3. Ganancia de sal: en lo fundamental iatrogénica (hiperalimentación parenteral u oral con grandes cantidades de glucosa o de otros solutos, reposición de volumen con soluciones hipertónicas), por naufragio.

Los síntomas y signos físicos característicos de este cuadro clínico son la sed, la sequedad de piel y las mucosas, la aparición de pliegue cutáneo, la astenia, la oliguria y la taquicardia. En los lactantes puede constatare la depresión de la fontanela. En los casos graves puede aparecer somnolencia, excitación psicomotriz, calambres, temblores musculares y trastornos del ritmo respiratorio. El diagnóstico de laboratorio se establece por el cuadro siguiente:

1. Hematócrito elevado (por lo general, en cifras superiores a 0,50 vol).
2. Urea sanguínea elevada.
3. Sodio plasmático elevado (generalmente por encima de 150 mmol/L).

4. Osmolalidad plasmática elevada (310 mOsmol/kg o superior).
5. Osmolalidad urinaria elevada.
6. Es frecuente encontrar leucocitosis con neutrofilia.

En los casos secundarios a trastornos del metabolismo de los glúcidos, las cifras de glicemia están muy elevadas (en ocasiones, 30 mmol/L o más).

## CONTRACCIÓN HIPOTÓNICA DEL VOLUMEN DEL ESPACIO EXTRACELULAR

La contracción hipotónica del volumen del espacio extracelular es una depleción o pérdida real de sodio. Se caracteriza por una disminución de la tonicidad plasmática, secundaria a una disminución absoluta de la concentración de sodio, contracción del volumen extracelular y expansión secundaria del compartimiento intracelular, con el objetivo de equilibrar la tonicidad. La secuencia de fenómenos es:

1. Pérdida real de sodio.
2. Disminución del volumen plasmático (contracción de volumen del espacio extracelular).
3. Aumento de la secreción de ADH.
4. Mayor reabsorción de agua.
5. Disminución de la osmolalidad del espacio extracelular.
6. Paso de agua del intersticio a las células.
7. Expansión celular.

De manera secundaria, tiene lugar un aumento en la secreción de aldosterona, con una mayor reabsorción de sodio en el sistema tubular.

Las causas de pérdida real de sodio pueden ser:

1. Renales: nefritis intersticiales crónicas perdedoras de sal, tubulopatías crónicas, fase poliúrica de la insuficiencia renal aguda, uso de diuréticos.
2. Digestivas: vómitos y diarreas con reposición basados solo en soluciones glucosadas; fístula biliar o intestinal.
3. Cutáneas: sudación profusa con reposición de líquidos.

Desde el punto de vista clínico, se caracteriza por astenia, debilidad, apatía, anorexia, cefalea, náuseas, vómitos y pliegue cutáneo. En los casos más graves, colapso vascular periférico con taquicardia e hipotensión postural, estupor y coma. El diagnóstico de laboratorio se establece por el siguiente cuadro:

1. Hematócrito normal o discretamente elevado.
2. Urea sanguínea discretamente elevada.

3. Sodio plasmático bajo.
4. Osmolalidad plasmática baja (menor de 280 mOsmol/kg).
5. Ausencia de sodio en la orina (si la causa no es una pérdida renal).

## EXPANSIÓN DEL VOLUMEN DEL ESPACIO EXTRACELULAR

Existen dos variantes de expansión del volumen del espacio extracelular, una aguda (intoxicación hídrica) y una crónica (síndrome de secreción inadecuada de ADH). En ambos casos se trata de una hiponatremia dilucional con sodio corporal normal, iniciada por el incremento de líquido en el espacio extracelular, con disminución relativa en la concentración sérica de sodio y posterior expansión del espacio intracelular.

En la intoxicación hídrica aguda, la causa es una administración masiva de agua a un paciente que no puede excretarla con igual velocidad. Se produce entonces una rápida expansión del volumen del espacio extracelular, que se hace hipotónico, con pase posterior del agua al espacio intracelular, expansión celular e inhibición de los receptores de volumen, disminución de la secreción de ADH y, por tanto, de la reabsorción de agua. El cuadro clínico depende de la rapidez con que se desarrolle la hipotonicidad. En general se caracteriza por cefalea, anorexia, náuseas, vómitos y calambres. Si la situación persiste, aparece letargo, desorientación y convulsiones. La mortalidad es elevada, además de que existe el riesgo de daño cerebral irreversible. El diagnóstico de laboratorio se establece por el siguiente cuadro:

1. Hematócrito disminuido (por hemodilución).
2. Hiponatremia, de moderada a severa.
3. Osmolalidad plasmática disminuida (menor que 280 mOsmol/kg).
4. Osmolalidad urinaria disminuida.

El síndrome de secreción inadecuada de ADH es una forma de hiponatremia crónica relativa por aumento en la secreción de esta hormona, que incrementa la reabsorción de agua, con aumento del volumen plasmático y expansión extracelular; pérdida renal de sodio por inhibición de la aldosterona; disminución de la osmolalidad del espacio extracelular y paso de agua al interior de las células, con expansión celular. Puede deberse a una alteración de la regulación en la secreción de la hormona, por trastornos del SNC, infecciones pulmonares crónicas y trastornos metabólicos, o por la producción de sustancias que suplanten su función, como sucede en ciertos tumores malignos.

El cuadro clínico es, en lo fundamental, el de la enfermedad de base. Con frecuencia aparecen cefaleas, astenia, anorexia, náuseas y vómitos, así como signos neurológicos (confusión, agitación). No hay signos de insuficiencia vascular periférica. El cuadro de laboratorio se caracteriza por:

1. Hematócrito ligeramente disminuido, por hemodilución.
2. Hiponatremia moderada.
3. Osmolalidad plasmática disminuida.
4. Osmolalidad urinaria aumentada.
5. Sodio en orina aumentado.

## BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- Burtiss CA, Ashwood ER (eds.). Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. Philadelphia: WB Saunders Co., 1996.
- Fischbach F. A manual of Laboratory & Diagnostic Test. 4th ed. Philadelphia: JB Lippincott Co., Philadelphia: 1992.
- Mc Clatchey KD. Clinical Laboratory Medicine. Baltimore: William and Wilkins; MD, 1994.
- Rose BD. Clinical physiology of acid-base balance and disorders of the electrolytes. 3<sup>rd</sup> ed. New York: McGraw-Hill, 1989.

## **CONTENIDO**

---

### **Introducción/ 137**

### **Sistemas tampón y mecanismos de regulación/ 138**

Sistema tampón bicarbonato/ácido carbónico/ 138

Sistema tampón de fosfato/ 138

Sistema tampón de las proteínas del plasma/ 138

Sistema tampón de la hemoglobina/ 139

Mecanismo de regulación respiratorio/ 139

Mecanismo de regulación renal/ 139

### **Determinación de los gases en la sangre/ 139**

### **Parámetros del equilibrio ácido-básico y de los gases en la sangre/ 140**

### **Principales alteraciones del equilibrio ácido-básico: acidosis y alcalosis/ 141**

Acidosis metabólica/ 141

Alcalosis metabólica/ 141

Acidosis respiratoria/ 142

Alcalosis respiratoria/ 142

### **Ventana aniónica (anión gap)/ 142**

### **Bibliografía recomendada/ 143**

## Capítulo 15



### TRASTORNOS DEL EQUILIBRIO ÁCIDO-BÁSICO Y DE LOS GASES EN LA SANGRE

*Dr. Jorge H. Suardíaz Pareras  
Dra. Delfina N. Padrón Brito  
Dr. José Salabarría González  
Dra. Blanca Blanco Mesa*

#### RESUMEN

Este capítulo está dedicado al estudio del equilibrio ácido-básico, definido como el balance entre la producción y eliminación de hidrogeniones, con el objetivo de mantener el pH del medio interno dentro de límites muy estrechos. El pH sanguíneo es una función de dos variables independientes: la presión de  $\text{CO}_2$  ( $\text{pCO}_2$ ), regulada por el mecanismo excretor respiratorio y las bases (en exceso o defecto), reguladas por el mecanismo renal. Entre estas bases, se destaca el ion bicarbonato, el cual desempeña un papel de importancia fundamental. Así pues, se describen los sistemas tampón y mecanismos de regulación de que dispone el organismo y se resalta la importancia de la determinación de los gases en la sangre (hemogasometría) como prueba fundamental de laboratorio para el estudio de las alteraciones de los parámetros del equilibrio ácido-básico. Se estudian las principales alteraciones del equilibrio ácido-básico (acidosis y alcalosis) y el cuadro de laboratorio de cada una de ellas. Por último, se hace una mención sobre la llamada ventana aniónica (o anión gap).

#### INTRODUCCIÓN

Los procesos metabólicos que tienen lugar en el organismo, producen una cantidad considerable de ácidos, volátiles o no, es decir, sustancias capaces de liberar hidrogeniones ( $\text{H}^+$ ). Estos productos del metabolismo deben atravesar el líquido intersticial y la sangre para llegar a los órganos excretores (pulmón y riñón), sin alterar de manera sensible el pH de estos medios. Ello se logra gracias a la acción de los sistemas tampón del organismo, en combinación con los mecanismos excretores.

Se define el pH como el logaritmo inverso de la concentración de hidrogeniones en una solución (en este caso en sangre y fluidos orgánicos, incluido el interior de la célula). El pH sanguíneo es una función de dos variables independientes: la presión de  $\text{CO}_2$  ( $\text{pCO}_2$ ), regulada por el mecanismo excretor respiratorio, y las bases (en exceso o defecto), reguladas por el mecanismo renal. Entre estas bases, la concentración de

bicarbonato desempeña un papel de importancia fundamental. El balance entre la producción y la eliminación de estos compuestos, con el objetivo de mantener el pH del medio interno dentro de límites muy estrechos, recibe el nombre de equilibrio ácido-básico:

$$\text{pH del medio interno} = \text{pK} + \log \frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{H}_2\text{CO}_3]} \quad (\text{a } 37^\circ\text{C})$$

Este equilibrio mantiene una estrecha relación con el de otros iones, ya que para garantizar que la suma total de cargas negativas y positivas sea igual a cero (neutralidad eléctrica), debe existir un número igual de ambas. Por lo tanto, el aumento o disminución de la concentración de un ion, debe ir acompañado de cambios correspondientes en las concentraciones de otros iones. Los principales cationes en la sangre son:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  y los principales aniones:  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ , ácidos orgánicos y proteínas. Estas últimas se comportan

como aniones o cationes, indistintamente, según el pH del medio interno, ya sea básico o ácido y, por ello, reciben el nombre de sustancias anfóteras. En el líquido intersticial, que es un ultrafiltrado de plasma, las proteínas no están presentes en cantidad importante; en cambio, la concentración relativa de  $\text{Cl}^-$  y de ácidos orgánicos es mayor. En el caso del compartimiento celular, los cationes predominantes son el  $\text{K}^+$  y el  $\text{Mg}^{2+}$  y los aniones, el  $\text{HPO}_4^{2-}$  y las proteínas.

Entre el compartimiento celular y el extracelular debe haber también un equilibrio en la distribución iónica. Sin embargo, como algunos iones no pueden moverse de forma libre a través de las membranas, la distribución de los iones que pueden difundir es desigual y está regida por la ley de Gibbs-Donan: “El producto de la concentración de iones que pueden difundir en un compartimiento, es igual al producto de la concentración de iones que pueden difundir en el otro compartimiento” (tabla 2.8). Esto hace que la concentración de partículas en suspensión sea mayor en el compartimiento que contiene menor cantidad de iones que pueden difundir, con lo cual el agua tiende a salir de este, pues sigue el gradiente de concentración. Esta situación se resuelve mediante el mecanismo de la presión oncótica, que tiende a retener el agua (las proteínas juegan un papel esencial en el mantenimiento de este mecanismo). Las membranas celulares pueden corregir las diferencias de concentración mediante mecanismos de transporte activo de otros iones, como sucede en la bomba de sodio-potasio.

A continuación se hará una breve referencia a los sistemas tampón de que dispone el organismo para la regulación de la constancia del pH del medio interno, así como a los mecanismos respiratorio y renal.

## SISTEMAS TAMPÓN Y MECANISMOS DE REGULACIÓN

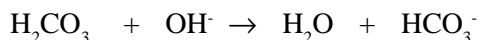
### SISTEMA TAMPÓN BICARBONATO/ÁCIDO CARBÓNICO

El sistema tampón bicarbonato/ácido carbónico es el principal sistema regulador del pH del medio interno.

Su funcionamiento se puede resumir, de forma esquemática, de la manera siguiente:



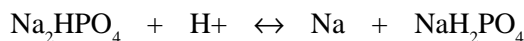
Es decir, si a la solución se añade un ácido, los iones  $\text{H}^+$  liberados serán neutralizados por el bicarbonato, lo que da lugar a la formación de ácido carbónico que, a su vez, se disocia muy rápido a  $\text{CO}_2$  y agua. Por el contrario, si se añade una base al sistema, esta reacciona con el ácido carbónico para formar bicarbonato y agua:



La posibilidad de que el  $\text{CO}_2$  pueda ser regulado con rapidez por el mecanismo respiratorio, al tiempo que el riñón puede regular de manera eficiente la reabsorción del bicarbonato, confiere a este sistema un carácter abierto y una gran efectividad.

### SISTEMA TAMPÓN DE FOSFATO

El sistema tampón de fosfato es importante, sobre todo, en la excreción (o reabsorción) tubular de hidrogeniones, pues los intercambia por sodio, que a su vez es reabsorbido o excretado. La reacción es bidireccional, según sean las necesidades:



El fosfato ácido es excretado por la orina. El sodio liberado es reabsorbido por la célula tubular y, de manera eventual, regresa al compartimiento vascular. En caso de que sea necesario retener hidrogeniones, el organismo excreta el fosfato bibásico.

### SISTEMA TAMPÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL PLASMA

Por su condición de sustancias anfóteras, es decir, capaces de modificar su pH de acuerdo con la cantidad de hidrogeniones presentes en el medio y, por tanto,

**Tabla 2.8** Distribución de los cationes y los aniones en el plasma (concentración media)

Cationes	Concentración (mmol/L)	Aniones	Concentración (mmol/L)
Sodio	140	Cloruro	102
Potasio	5	Bicarbonato	30
Calcio + magnesio	8	Otros aniones	21
Total	153	Total	153

de actuar como ácidos o como bases, según sea menor o mayor la concentración de estos (captan hidrogeniones en medio ácido y los liberan en medio alcalino), además de su papel en el mantenimiento de la presión coloidsmótica (oncótica), las proteínas constituyen un sistema regulador de la constancia del medio interno, cuya importancia no puede obviarse.

## SISTEMA TAMPÓN DE LA HEMOGLOBINA

El sistema tampón de la hemoglobina actúa solo en el eritrocito, pues es su principal sistema tampón y está muy ligado a la capacidad de disociación del oxígeno de la molécula de hemoglobina: cuando esta molécula se oxigena, se produce la liberación de hidrogeniones y cuando se desoxigena, se captan los hidrogeniones (por cada mol de oxígeno liberado, la hemoglobina capta 0,5 mol de  $H^+$ ). Por ello y por su condición de sustancia anfótera, cuando el pH sanguíneo se eleva (disminución de la  $[H^+]$  en el medio), la hemoglobina tiende a liberar iones  $H^+$  y, por lo tanto, se altera la curva de disociación, existirá tendencia a retener el  $O_2$  y se producirá así un déficit de oxigenación de los tejidos.

## MECANISMO DE REGULACIÓN RESPIRATORIO

El mecanismo de regulación respiratorio contribuye a mantener la constancia del medio interno, mediante la retención del  $CO_2$  o el aumento de su eliminación. Los cambios del equilibrio ácido-básico, debidos a factores metabólicos, provocan una respuesta casi inmediata por parte del centro respiratorio y, así, en caso de una acidosis metabólica, se incrementará la frecuencia y la profundidad de los movimientos respiratorios, con el objetivo de eliminar una mayor cantidad de  $CO_2$ , lo cual, a su vez, favorece la captación de los iones  $H^+$  en exceso, por el sistema bicarbonato/ácido carbónico. En cambio, una alcalosis metabólica provocará como respuesta una depresión respiratoria que, al retener  $CO_2$ , inhibirá de manera secundaria, la captación de hidrogeniones por este sistema. Por otra parte, una falla en este mecanismo, dará lugar a un desequilibrio ácido-básico del tipo de las acidosis o las alcalosis respiratorias.

## MECANISMO DE REGULACIÓN RENAL

El mecanismo de regulación renal consiste en la modificación de la eliminación de iones  $H^+$  por la orina, como consecuencia de la disminución o el aumento de la reabsorción tubular de estos, como respuesta

a una acidosis o a una alcalosis, respectivamente. Esto se lleva a cabo mediante la reabsorción de  $HCO_3^-$  y por el intercambio de  $Na^+$  por  $H^+$  en el sistema tubular y su posterior incorporación al sistema tampón de los fosfatos, o a la producción y excreción renal de ion amonio. El proceso de intercambio de  $Na^+$  por  $H^+$  tiene lugar por un mecanismo activo que consume energía. La incorporación de los iones  $H^+$  que pasan a la luz del tubo, al sistema tampón de los fosfatos, ya ha sido abordada en párrafos anteriores; sin embargo, la mayoría de ellos no siguen esta vía, sino que participan en la producción de ion amonio y son excretados como parte de este. El mecanismo puede ser resumido de la manera siguiente: en el interior de la célula tubular se genera amoniaco, a partir de aminoácidos; este amoniaco difunde con facilidad a través de la membrana celular hacia la luz del túbulo, donde se combina con el  $H^+$  para formar iones amonio. Estos no pueden difundir con la misma facilidad hacia el interior de la célula tubular y son excretados como parte de la orina, en forma de cloruro de amonio.

## DETERMINACIÓN DE LOS GASES EN LA SANGRE

La determinación de gases en la sangre (hemogasometría) se emplea en medicina para el estudio de alteraciones (respiratorias o no) del equilibrio ácido-básico y para establecer el estado de la ventilación y de la oxigenación del paciente, sobre todo del enfermo crítico, durante las intervenciones quirúrgicas mayores y en el período posoperatorio.

La medición de gases en sangre se efectúa, salvo algunas excepciones, en muestras de sangre arterial o de sangre capilar arterializada. Los procedimientos para la obtención de estos tipos de muestras, así como las precauciones y las causas de error, se describen en otra sección de este libro (véase el capítulo “Fase preanalítica”, en la parte I). Los motivos para escoger este tipo de muestras con preferencia a la sangre venosa, son:

1. La sangre arterial constituye una muestra representativa de sangre de distintos lugares del organismo.
2. Brinda una información más adecuada del estado de oxigenación de la sangre por el pulmón.
3. La información sobre la capacidad de los mecanismos renal y respiratorio para compensar el desequilibrio ácido-básico, es más fidedigna.

Para la medición del pH y de los gases en la sangre, se emplean equipos de inducción eléctrica muy sensibles, dotados de electrodos miniaturizados, con lectura



directa del pH, de la presión parcial de  $\text{CO}_2$  ( $\text{pCO}_2$ ) y la presión parcial de  $\text{O}_2$  ( $\text{pO}_2$ ). En la actualidad, la mayor parte de los modelos tienen incluidos electrodos ion-selectivos (ISE), para la medición de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  (a menudo también  $\text{Ca}^{++}$ ), hemoglobina y otros analitos (lactato, glucosa), así como también parámetros derivados (bicarbonato estándar, exceso de bases, saturación con  $\text{O}_2$  de la hemoglobina,  $\text{CO}_2$  y  $\text{O}_2$  total y otros). Estos electrodos son desechables y el cambio de membranas es fácil de realizar. Estos analizadores requieren pequeñas cantidades de muestra, se calibran y limpian de forma automática y diagnostican sus propias fallas.

Los tres sistemas de electrodos empleados por los analizadores de gases en la sangre para determinar el pH, la  $\text{pO}_2$  (electrodo amperométrico de Leland Clarks) y la  $\text{pCO}_2$  (electrodo de Severinghaus) están separados uno de otro. Los principios de funcionamiento de todos ellos han sido descritos en otra sección de este libro (véase el capítulo “Análisis instrumental”, en la Parte I). Los valores obtenidos se ven afectados por cambios en la temperatura, por lo que el sistema de electrodos está situado en un bloque termostatzado a  $37^\circ\text{C}$  dentro del cual es introducida la muestra de sangre. Las operaciones para el cálculo de los parámetros derivados, son efectuadas por un microprocesador incluido en el equipo. La autocalibración se basa en la medida de gases con concentración conocida (mezclas muy precisas de  $\text{O}_2$  y  $\text{CO}_2$ , balanceadas con nitrógeno) y soluciones de calibración (tampón estándar). En la “calibración de un punto” la respuesta del electrodo es probada y ajustada a un solo nivel, mientras que en la de “dos puntos” es probada a dos niveles (concentración alta y baja del gas). Otros modelos emplean para este fin, mezclas de aire ambiental con  $\text{CO}_2$  para obtener diferentes niveles de gases, lo cual resulta más práctico.

## PARÁMETROS DEL EQUILIBRIO ÁCIDO-BÁSICO Y DE LOS GASES EN LA SANGRE

**El pH.** Es el parámetro más importante para determinar el estado del balance entre ácidos y bases en el organismo, ya que expresa la concentración de iones hidrógeno. Sus valores de referencia son de 7,35 a 7,45. Por debajo de estos límites, se habla de estado de acidosis y, por encima, de estado de alcalosis. Se considera como límites extremos compatibles con la vida: 6,9 y 7,8.

**Bicarbonato estándar (BS).** Por su concentración, el  $\text{HCO}_3^-$  es el segundo anión del plasma. Su papel en la conservación del equilibrio ácido-básico ya ha

sido expuesto en párrafos anteriores, en este mismo capítulo: es el parámetro metabólico por excelencia. Se entiende por bicarbonato estándar (BS) la cantidad de iones  $\text{HCO}_3^-$  existentes en la sangre, con una  $\text{pCO}_2$  de 40 mmHg, una saturación de hemoglobina de 100 % y una temperatura de  $37^\circ\text{C}$ . Su concentración en la sangre arterial o capilar arterializada, es de 21 a 25 mmol/L. En las acidosis metabólicas existe disminución de estos valores, mientras que en las alcalosis metabólicas se presenta una elevación de estos; por el contrario, pueden aumentar para compensar una acidosis respiratoria o disminuir para compensar una alcalosis de igual origen, en ambos casos por intervención del mecanismo compensador renal.

**Bases en exceso (EB).** La suma de las concentraciones reales de los cuatro tampones aniónicos principales (bicarbonato, fosfatos, proteínas y hemoglobina), contenidos en la sangre total (plasma + eritrocitos), con una saturación de hemoglobina del 100 %, expresada en mmol/L, recibe el nombre de bases reguladoras o estabilizadoras o *buffer* (BB) y su valor oscila entre 36 y 42 mmol/L. Si estos valores se prefijan para una  $\text{pCO}_2$  de 40 mmHg y un pH de 7,40, se tendrán las bases *buffer* normales (NBB). La diferencia entre BB y NBB se conoce como exceso de bases. Su intervalo de referencia oscila entre  $\pm 2,5$  mmol/L (puede ser negativo o positivo, es decir, déficit o exceso de bases). Tanto el aumento como la disminución de las bases *buffer* acompañan al aumento y la disminución del bicarbonato y obedecen a las mismas causas. Al igual que este, las bases *buffer* constituyen un parámetro metabólico.

**Saturación de la hemoglobina con oxígeno ( $\text{HbO}_2$ ).** Es el resultado de dividir la concentración de oxihemoglobina entre la sumatoria de la oxihemoglobina y la desoxihemoglobina (es decir, entre la capacidad total de transporte de oxígeno multiplicado por la hemoglobina), y el resultado se expresa en por ciento. No refleja el contenido total de oxígeno de la sangre, pero su determinación, unida a la de la  $\text{pCO}_2$  y la de hemoglobina, indica, de manera aproximada, la capacidad de la sangre para oxigenar los tejidos. Una variante actual es la oximetría de pulso, que permite el monitoreo constante de la saturación sin emplear medios invasivos. El valor de corte para la  $\text{HbO}_2$ , es de 95 % o más; por debajo de este valor, se considera que existe una hiposaturación.

**Presión parcial de oxígeno ( $\text{pO}_2$ ).** Es la medida de la presión ejercida por el oxígeno disuelto en el plasma, a  $37^\circ\text{C}$  de temperatura y corregida para un pH de 7,40. Refleja la cantidad de oxígeno que entra en la sangre procedente del alveolo, y por lo tanto, está influenciada de manera directa por la cantidad de oxígeno

inhalado. Los valores de referencia oscilan entre 95 y 100 mmHg (12,4 a 13,3 kPa). La disminución de estos valores por debajo de 95 mmHg se denomina hipoxia. Se considera que un valor es crítico cuando se encuentra por debajo de 60 mmHg (8 kPa).

**Presión parcial de  $\text{CO}_2$  ( $\text{pCO}_2$ ).** Es la medida de la presión ejercida por el  $\text{CO}_2$  disuelto en el plasma, dentro de la mezcla de gases existentes en él, a una temperatura de  $37^\circ\text{C}$  y corregido para la presión atmosférica. Es directamente proporcional a la presión parcial de  $\text{CO}_2$  en el aire alveolar y expresa, de manera aproximada, la eficiencia del intercambio de gases entre la sangre y el alveolo pulmonar (efectividad de la ventilación alveolar). Es el parámetro respiratorio por excelencia. Su intervalo de referencia es de 35 a 45 mmHg (de 4,65 a 6,0 kPa). La disminución de las cifras por debajo del límite inferior de este intervalo (hipocapnia), aparece en la alcalosis respiratoria. La elevación por encima del límite superior (hipercapnia), se presenta en la acidosis respiratoria. Pueden encontrarse cifras elevadas en la alcalosis metabólica, o disminuidas, en la acidosis metabólica, como consecuencia de la entrada en acción del mecanismo compensador respiratorio.

## PRINCIPALES ALTERACIONES DEL EQUILIBRIO ÁCIDO-BÁSICO: ACIDOSIS Y ALCALOSIS

Clásicamente, se consideran cuatro trastornos del equilibrio ácido-básico. Sin embargo, aunque se pueden presentar aislados, lo más frecuente es observar la combinación de dos o más, ya sea de manera simultánea, o porque comienzan como un trastorno “puro” y evolucionan luego a uno mixto. A continuación se relacionan, a modo de resumen, los cuatro trastornos básicos.

### ACIDOSIS METABÓLICA

La acidosis metabólica se origina en la producción aumentada de ácidos orgánicos no volátiles, excreción disminuida de estos o pérdida excesiva del ion bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ). Cuando tiene lugar uno de estos fenómenos, disminuye la relación bicarbonato-ácido carbónico, a expensas del numerador y, con ello, disminuye el pH sanguíneo. La respuesta del mecanismo respiratorio consiste en incrementar la frecuencia y la profundidad de los movimientos respiratorios (disnea del tipo Kussmaul), con eventual disminución de la  $\text{pCO}_2$ , para restablecer el equilibrio. Por su parte, el mecanismo

renal (si la causa de la acidosis no es una falla renal) interviene también, pues elimina  $\text{H}^+$  en forma de  $\text{NH}_4^+$  o mediante el sistema de los fosfatos y retiene  $\text{HCO}_3^-$ .

Las causas más frecuentes de acidosis metabólicas, para el aumento de ácidos, son: la insuficiencia renal, la hipoxia (metabolismo anaerobio), el incremento en la producción de ácido láctico y la cetoacidosis diabética o por inanición; para las pérdidas de bases: las diarreas profusas, las fístulas del intestino delgado, biliares o pancreáticas, la acidosis renal tubular y la administración excesiva de ciertos diuréticos (antagonistas de la anhidrasa carbónica o de la aldosterona). Puede considerarse como una causa mixta, la cirugía cardiovascular con circulación extracorpórea.

El cuadro de laboratorio de una acidosis metabólica se puede resumir como sigue:

1. pH sanguíneo disminuido.
2. Bicarbonato estándar disminuido.
3. Exceso de bases disminuido (déficit de bases).
4.  $\text{pCO}_2$  normal o baja, según exista compensación respiratoria o no (entre 1,0 y 1,2 mmHg por cada mmol/L de  $\text{HCO}_3^-$  en defecto). En caso de acidosis mixta, estará elevada.
5. Potasio en el plasma elevado (excepto en la inanición o en la excesiva administración de diuréticos).
6. El cloruro puede estar aumentado o normal, en dependencia del origen de la acidosis (véase más adelante). El sodio en el plasma está disminuido.
7. Otros complementarios, en dependencia de la enfermedad causal: glicemia, búsqueda de glucosa y de cuerpos cetónicos en orina, determinación de ácido láctico, catabolitos nitrogenados, etc.

### ALCALOSIS METABÓLICA

La alcalosis metabólica puede deberse a la ganancia de bases, en lo fundamental, bicarbonato, ya sea por aumento del ingreso o por disminución de la excreción. También puede deberse a la pérdida aumentada de ácidos. Cuando tiene lugar uno de estos eventos, se altera la relación bicarbonato-ácido carbónico, a expensas de un aumento del numerador y se eleva el pH. La respuesta del mecanismo respiratorio es disminuir la frecuencia y la profundidad de las inspiraciones, lo que da lugar a una hipercapnia. Esta respuesta es más bien errática y el aumento de la  $\text{pCO}_2$  es muy variable. Por su parte, el mecanismo renal responde al disminuir la formación de ion amonio y la reabsorción de bicarbonato.

Las causas más frecuentes de alcalosis metabólica son: la pérdida de  $\text{H}^+$  por vómitos o por lavado gástrico,

la administración excesiva de bicarbonato o lactato de sodio, el envenenamiento por citratos (transfusiones múltiples con riñón insuficiente) y los diuréticos del asa (furosemida, torasemida).

El cuadro de laboratorio de la alcalosis metabólica es el siguiente:

1. pH sanguíneo elevado.
2. Bicarbonato estándar elevado.
3. Exceso de bases elevado.
4.  $p\text{CO}_2$  normal o elevada. En caso de alcalosis mixta, estará disminuida.
5. Potasio en plasma disminuido.
6. Cloruro en plasma disminuido (en las pérdidas por vómitos o lavado gástrico).
7. Sodio en plasma elevado (en la administración excesiva de bicarbonato o lactato).
8. La saturación de la hemoglobina con oxígeno está normal, pero la curva de disociación está alterada por la elevación del pH, por lo que el  $\text{O}_2$  disponible para la oxigenación de los tejidos es menor (hipoxia hística). La  $p\text{O}_2$  puede estar ligeramente disminuida por la depresión respiratoria.

## ACIDOSIS RESPIRATORIA

La causa primaria de la acidosis respiratoria es una ventilación alveolar disminuida con retención de  $\text{CO}_2$ . Ello provoca un desbalance de la relación bicarbonato-ácido carbónico, con aumento del denominador y subsiguiente disminución del pH. El mecanismo renal responde con un incremento del intercambio de sodio por hidrógeno y retención de bicarbonato. El ácido carbónico acumulado en sangre, es amortiguado por la hemoglobina y las proteínas, lo cual, a su vez, da como resultado un ligero aumento del bicarbonato.

Las causas más frecuentes son: depresión del centro respiratorio por drogas o por traumas craneoencefálicos, obstrucción de las vías respiratorias (asma, bronquitis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica [EPOC], fibrosis pulmonar, compresión extrínseca) o las lesiones graves de tórax (fracturas costales múltiples, fractura de esternón) y los trastornos circulatorios (*shock*, insuficiencia cardíaca congestiva con edema pulmonar agudo).

El cuadro de laboratorio es el siguiente:

1. pH sanguíneo disminuido.
2.  $p\text{CO}_2$  elevada.
3. Bicarbonato estándar normal o elevado, según funcionen los mecanismos de compensación. En caso de acidosis mixta, estará disminuido.

4. Exceso de bases elevado.
5. Potasio y sodio en plasma, discretamente elevados. Cloruro ligeramente disminuido.
6. La  $p\text{O}_2$  y la  $\text{HbO}_2$  están disminuidas como consecuencia de la enfermedad de base, que casi siempre compromete la ventilación, la perfusión alveolar o la transportación.
7. El resto de las alteraciones de las pruebas de laboratorio dependen de la enfermedad causal.

## ALCALOSIS RESPIRATORIA

La alcalosis respiratoria tiene su origen en una hipocapnia por hiperventilación, con depleción de ácido carbónico, lo cual altera el equilibrio de la ecuación de Henderson-Hasselbach, y se eleva el pH de la sangre. Esta es la alteración del balance ácido-básico de más frecuente observación en las salas de atención a pacientes críticos. En una primera etapa, los eritrocitos y los tejidos liberan  $\text{H}^+$  que se une al  $\text{HCO}_3^-$ ; luego entra en juego el mecanismo de compensación renal, que disminuye la reabsorción de bicarbonato e incrementa la retención de hidrogeniones.

La hiperventilación puede obedecer a trastornos psiquiátricos, intoxicación por salicilatos, fiebre sostenida y hemorragia cerebral; pero la causa más frecuente es la aplicación de ventilación asistida en pacientes críticos, seguida de cerca por la insuficiencia pulmonar progresiva (distrés respiratorio del adulto).

El cuadro de laboratorio se resume como sigue:

1. pH sanguíneo elevado.
2.  $p\text{CO}_2$  disminuida.
3. Bicarbonato estándar normal o disminuido, según exista o no la compensación metabólica. En caso de alcalosis mixta, estará elevada.
4. Exceso de bases normal o disminuido.
5. Potasio en plasma discretamente disminuido, con aumento moderado del cloruro.
6. La  $p\text{O}_2$ , por lo general, está normal o ligeramente elevada, con saturación normal; pero existe una alteración de la curva de disociación del  $\text{O}_2$  igual a la descrita para la alcalosis metabólica.
7. El resto de las alteraciones de las pruebas de laboratorio dependen de la enfermedad causal o de las que integran el resto del cuadro (falla multiorgánica, por ejemplo).

## VENTANA ANIÓNICA (ANIÓN GAP)

El llamado anión gap o ventana aniónica es la diferencia que existe entre la suma de aniones no medidos y la de cationes no medidos. Los cationes séricos incluyen al  $\text{Na}^+$  y al  $\text{K}^+$  y a varios cationes no medidos, tales como

calcio, potasio y magnesio. Los aniones séricos incluyen al  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ , y a varios aniones no medidos, tales como: fosfato, sulfatos, aniones orgánicos y proteínas. En condiciones habituales, los aniones no medidos exceden a los cationes no medidos. En la práctica se obtiene mediante la ecuación:

$$[\text{Na} + \text{K}] - [\text{Cl} + \text{HCO}_3^-]$$

Esta diferencia es lo que se conoce como anión gap o factor R y es de 16 mmol/L o menos. Se emplea para estimar las concentraciones elevadas de otros iones distintos del  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{HCO}_3^-$  y se basa en la ley de neutralidad eléctrica, a la cual se ha hecho referencia con anterioridad.

Los valores del anión gap pueden estar elevados debido a la retención de uno o más de los aniones no medidos, que provocan disminución del  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$  o de ambos. También pueden mostrar un aumento aparente, en caso de disminución en la concentración de cationes no medidos (hipocalcemia, hipomagnesemia). La disminución en los valores del anión gap se debe a una disminución en la concentración de aniones no medidos (hipoalbuminemia, por ejemplo) o al aumento de la concentración de cationes no medidos. A pesar de ser un parámetro inespecífico, es útil para la detección de acidosis orgánicas, en las cuales ocurre una elevación de algunos aniones que, de manera usual, no se determinan en condiciones de urgencia.

En general, resulta útil calcular el anión gap en todos los casos sospechosos de trastorno ácido-básico, porque puede identificar la presencia de una acidosis metabólica subyacente, incluso cuando el pH sanguíneo es normal. Sin embargo, el anión gap tiene limitaciones, y la distinción entre acidosis metabólica con anión gap elevado y anión gap normal no siempre está clara. Además, un anión gap normal no excluye la presencia de un anión no medido (lactato, por ejemplo). No obstante, la elevación significativa del anión gap debe investigarse con rapidez.

Las principales causas de acidosis metabólica se agrupan en dos categorías generales:

1. Con anión gap elevado: que se subdivide, a su vez, en:
  - a) Acidosis con una fuente orgánica (acidosis láctica, cetoacidosis diabética, alcohólica, o por inanición y falla renal): se cree que la acidosis láctica es la causa más común de

acidosis metabólica entre los pacientes hospitalizados. Se define como una concentración de lactato en el suero de, al menos, 5 mmol/L en presencia de acidosis metabólica, y representa la ruptura del equilibrio normal entre la producción del lactato y su utilización. La hipoxia hística, producto de una demanda aumentada de oxígeno o de un aporte disminuido de este, es la causa más común de acidosis láctica significativa desde el punto de vista clínico. Los rasgos clínicos incluyen: signos de *shock* e hipoperfusión de órganos (taquicardia, taquipnea, hipotensión, oliguria, disminución de la actividad mental).

- b) Acidosis resultante de la ingestión de un tóxico (como el metanol, el etilenglicol y el salicilato): el metanol (alcohol de madera) es un componente de varios productos comunes de la casa (laca, barniz, fluidos automotores). Este metaboliza y da lugar al formaldehído y al ácido fórmico, este último se disocia en  $\text{H}^+$  y un anión no medido (formato). El etilenglicol, por su parte, es un componente anticongelante de algunos solventes. Sus metabolitos tóxicos incluyen el ácido glicólico y el ácido oxálico; ambos se disocian en  $\text{H}^+$  y aniones no medidos.
2. Con anión gap normal: las causas más comunes incluyen diarreas, acidosis tubular renal e hiperalimentación. El anión gap urinario puede ser útil en la evaluación de estos trastornos. Como sucede con el anión gap plasmático, la ley de la neutralidad eléctrica se aplica al anión gap urinario, así que los aniones deben igualar a los cationes en la orina.

## BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- Burtiss CA, Ashwood ER (eds.). Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. Philadelphia: WB Saunders Co., 1996.
- Fischbach F. A manual of Laboratory & Diagnostic Test. 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: JB Lippincott Co., 1992.
- Ishihara K, Szerlip HM. Anion gap acidosis. Semin Nephrol, 1998;18(1):83-97.
- Mc Clatchey KD. Clinical Laboratory Medicine. Baltimore: William and Wilkins, 1994.
- Rose BD. Clinical physiology of acid-base balance and disorders of the electrolytes. 3<sup>rd</sup> Ed. New York: McGraw-Hill; 1989.

## **CONTENIDO**

---

**El laboratorio clínico en el diagnóstico de las enfermedades respiratorias/ 145**

**El laboratorio clínico en el diagnóstico de las enfermedades cardiovasculares/ 146**

Infarto agudo del miocardio/ 146

Algunas consideraciones sobre el diagnóstico enzimático. Indicación e interpretación de las pruebas de laboratorio en el infarto agudo del miocardio/ 146

Enfermedad aterosclerótica/ 148

**Bibliografía recomendada/ 149**

### Capítulo 16



## ALTERACIONES DE LABORATORIO EN LAS ENFERMEDADES RESPIRATORIAS Y CARDIOVASCULARES

*Dr. Celso Cruz Rodríguez*

### RESUMEN

En este capítulo se hace un somero estudio de las alteraciones de laboratorio en las enfermedades del aparato respiratorio. A continuación, se revisan las enzimas séricas que se han empleado para el diagnóstico del infarto agudo del miocardio, los fundamentos bioquímicos de las técnicas más avanzadas para la determinación de los marcadores cardíacos (proteínas cardíacas) y los marcadores utilizados hoy para la detección temprana del riesgo ateroesclerótico cardiovascular.

### EL LABORATORIO CLÍNICO EN EL DIAGNÓSTICO DE LAS ENFERMEDADES RESPIRATORIAS

El diagnóstico de las enfermedades respiratorias se basa en los aspectos siguientes:

1. Cuadro clínico.
2. Estudios imagenológicos.
3. Estudios hemogasométricos, electrolíticos y pruebas funcionales respiratorias.
4. Estudio de líquidos orgánicos: exudados y trasudados.
5. Marcadores de la inflamación.
6. Estudios bioquímicos y enzimáticos en el suero.
7. Marcadores tumorales.

Los estudios electrolíticos y gasométricos se tratan en los capítulos anteriores. Los marcadores de la inflamación y los exudados y trasudados se describen en los capítulos correspondientes al estudio de los reactantes de la fase aguda y de otros líquidos orgánicos, respectivamente.

Los estudios microbiológicos y parasitológicos, importantes en el diagnóstico de muchas enfermedades respiratorias, no son parte de los objetivos de estudio en este libro.

### Determinaciones bioquímicas

Las determinaciones bioquímicas en las enfermedades respiratorias, se indican ante la sospecha o la evidencia de otros procesos morbosos concomitantes como: tromboembolismo pulmonar, neoplasias de pulmón, insuficiencia cardíaca congestiva, cirrosis hepática y nefrosis, por citar solo algunas.

Las enzimas tienen su principal indicación en la enfermedad tromboembólica pulmonar, por la liberación de algunas de ellas, al producirse la necrosis hística causada por el compromiso del suministro sanguíneo. En esta afección, sobre todo cuando el embolismo es masivo (más del 50 % de los casos), se produce la muerte del paciente en las primeras dos horas. La enzima deshidrogenasa láctica (LDH) es la que alcanza mayor elevación, acompañada de sus isoenzimas LDH 1 y LDH 2, debido a la gran cantidad de eritrocitos que se degradan. La fosfatasa alcalina también se eleva, al igual que la aspartato aminotransferasa (ASAT).

Los marcadores tumorales se exponen en otro capítulo de esta misma sección.

## **EL LABORATORIO CLÍNICO EN EL DIAGNÓSTICO DE LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES**

Las enfermedades cardiovasculares ocupan el primer lugar entre las causas de muerte en casi todo el mundo. El infarto agudo del miocardio (IMA) y el choque cardiogénico, constituyen la principal causa de muerte prematura. Aproximadamente el 50 % de los pacientes que solicitan atención médica en hospitales y consultorios sufren de alguna enfermedad cardiovascular: cardiopatía isquémica, hipertensión arterial, miocardiopatías dilatadas idiopáticas y alteraciones de la conducción.

La prevención de este grupo de afecciones está dirigida a la eliminación de los factores de riesgo: hipercolesterolemia, hábito de fumar, hipertensión arterial no tratada, obesidad, sedentarismo y antecedentes familiares positivos (véase el capítulo siguiente).

### **INFARTO AGUDO DEL MIOCARDIO**

El IMA es la necrosis del miocardio, originada por la interrupción brusca de la circulación de la sangre en una de las arterias coronarias. Tiene como causa más frecuente la aterosclerosis de estas arterias.

El cuadro clínico, cuando es típico, se acompaña de dolor opresivo retroesternal, que se irradia a otras zonas como el brazo y antebrazo izquierdo, cuello, mandíbula y espalda. En ocasiones se localiza en el epigastrio o en el abdomen. El dolor aparece, por lo general, en reposo aunque también puede presentarse durante o después del ejercicio físico.

El dolor puede estar ausente (infartos silentes o con muy bajo ruido) en los ancianos y diabéticos. La disnea, arritmias e hipotensión pueden formar parte del cuadro clínico.

## **ALGUNAS CONSIDERACIONES SOBRE EL DIAGNÓSTICO ENZIMÁTICO. INDICACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LAS PRUEBAS DE LABORATORIO EN EL INFARTO AGUDO DEL MIOCARDIO**

Las enzimas son utilizadas cada día más en el diagnóstico de las enfermedades de los seres humanos. En el año 1955, ya se utilizaban algunas de ellas como la amilasa, la lipasa y las fosfatasa ácida y alcalina. En ese mismo año, Karmen, Wroblewsky y La Due, reportaron un aumento en la actividad de las transaminasas (ASAT y ALAT) en varias enfermedades.

En el laboratorio, las enzimas son determinadas por los métodos siguientes:

1. Cinéticos.
2. Masa molecular (antígeno-anticuerpo).
3. Electroforesis de zona.
4. Electroenfoque.

Los métodos cinéticos miden la actividad total de una enzima. Tienen dos variantes:

1. Una lectura en tiempo fijo.
2. Varias lecturas en tiempos fijos.

En ambas, se forman cantidades crecientes de un producto en el tiempo. La segunda variante es superior, pues permite demostrar la linealidad de la reacción durante el período fijado.

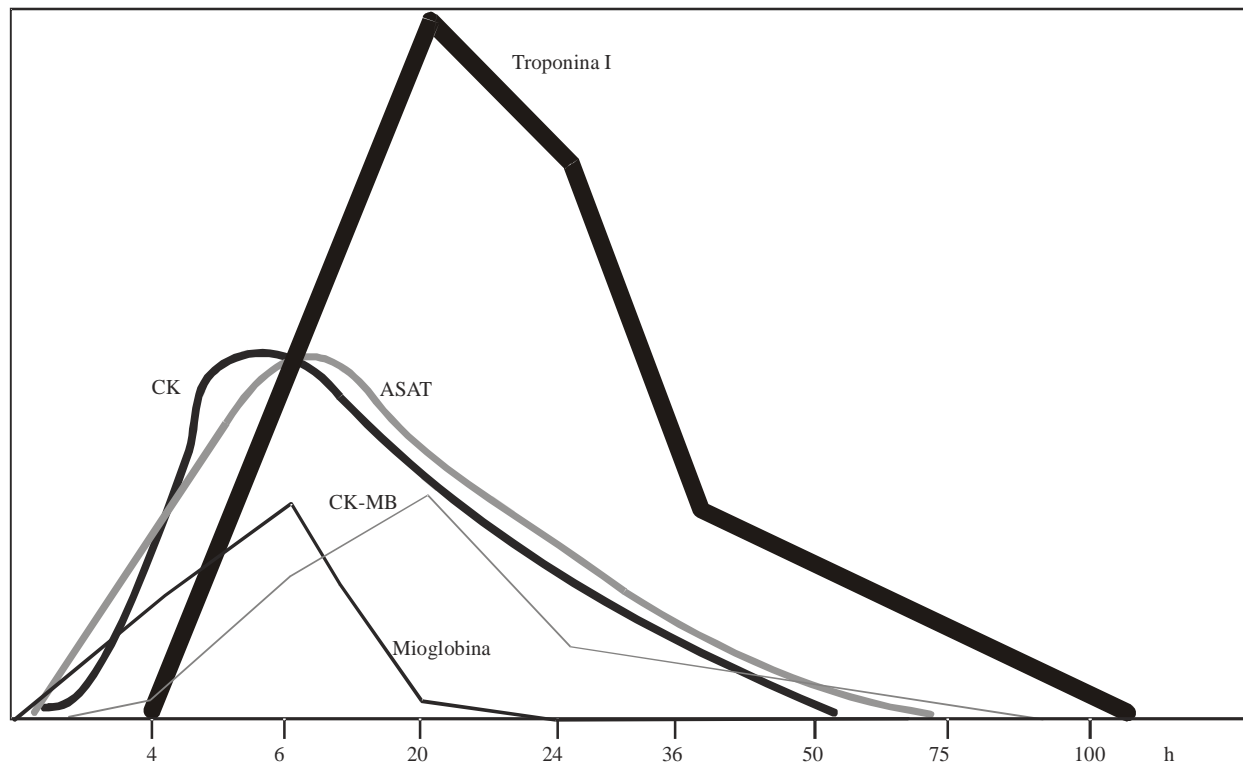
Los métodos cinéticos se mantienen vigentes y se han automatizado. Requieren del control estricto de algunas variables para lograr una buena reproducibilidad. Estas variables son: pH, tampones, temperatura de incubación y concentración del sustrato.

Las técnicas basadas en la concentración de masa (masa molecular) utilizan la alta especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo, por lo cual son métodos muy exactos. Estos se utilizan para la determinación de enzimas e isoenzimas.

La electroforesis de zona, descrita en el año 1954, utiliza como soporte el gel de agarosa, y las demás variables como pH, voltaje y amperaje se mantienen igual. Después de efectuada la corrida, las fracciones son cuantificadas con la ayuda de un densitómetro. El electroenfoco se aplicó en sus inicios al estudio de proteínas y glicoproteínas. En la actualidad se emplea para identificar enzimas que se hallan en todos los tejidos del cuerpo humano.

El IMA se encuentra dentro de un grupo de enfermedades en las cuales el diagnóstico enzimático soporta la carga principal. Las primeras enzimas utilizadas fueron las aminotransferasas o transaminasas: aspartato aminotransferasa (ASAT) y la alanina aminotransferasa (ALAT). Ambas están presentes en el músculo cardíaco y esquelético en una proporción de 100 a 10, respectivamente. La baja concentración de ALAT en el

miocardio y, por lo tanto, su respuesta nula en el IMA, excepto en los pacientes con lesión hepática concomitante, motivó que su uso en esta afección fuera eliminado. La ASAT pasó entonces a formar un dúo con la lactato deshidrogenasa (LDH). Luego, se introdujo la creatinquinasa (CK), la que se asoció más tarde a una de las isoenzimas de la LDH, la LDH 1 (hidroxibutiril deshidrogenasa o alfa HBDH). La ASAT, aunque se utiliza todavía en algunos lugares, ha sido desplazada por una de las isoenzimas de la CK: la CK-MB. La década de los 80 del siglo xx comenzó con esta enzima convertida en el estándar dorado para el diagnóstico del IMA, por lo general asociada a la LDH y a la alfa HBDH. En la actualidad, la CK-MB no se informa en unidades de actividad enzimática, sino en unidades de masa, y su medición se realiza por métodos inmunoquímicos (figura 2.8).



**Figura 2.8** Las enzimas y las proteínas cardíacas en el infarto agudo del miocardio.



En 1998, después de varios estudios importantes, pasaron a ocupar el lugar de la CK-MB, como marcadores para el IMA, las troponinas T e I. Cuando estas se comparan con la CK-MB, ofrecen muchas ventajas para el diagnóstico temprano de la necrosis del músculo cardíaco, pues se destacan por su sensibilidad y especificidad y su alto valor predictivo, de IMA y de muerte súbita, en pacientes que solicitan atención médica urgente por dolores anginosos. Este poder predictivo de ambas troponinas, es el que permite tomar una conducta agresiva (angioplastia, *bypass*) cuando sus valores sugieren la posibilidad de IMA y de muerte súbita. A este grupo de marcadores, se había incorporado años antes la mioglobina, proteína muscular encargada del transporte del oxígeno en este tejido. Su valor diagnóstico en el IMA se debe a que dos horas después del infarto, su elevación duplica el intervalo de referencia en el 85 % de los pacientes afectados, tiempo en el que los valores de CK total y CK-MB se mantienen todavía dentro del intervalo de referencia respectivo. Es importante señalar, para evitar confusiones, que las troponinas y la mioglobina se conocen hoy con el nombre de “proteínas cardíacas” (tabla 2.9).

## ENFERMEDAD ATEROSCLERÓTICA

La aterosclerosis es una enfermedad progresiva, multifactorial y compleja, caracterizada por el depósito en la íntima arterial, de lípidos de estructura compleja como lipoproteínas y colesterolos. Esta afección, que se extiende por todo el árbol arterial, hace su debut a través de un órgano que ha escogido como diana. De esta forma, las complicaciones pueden tener un origen cardíaco, cerebral o renal. También la diana puede estar constituida por las arterias que irrigan otras partes del cuerpo humano como las extremidades inferiores. Los factores de riesgo, a los cuales se ha hecho referencia en más de una ocasión en este libro, están constituidos por diferentes hábitos y por algunas enfermedades como la diabetes mellitus y la hipertensión arterial. El médico que atiende al paciente es el encargado de realizar el diagnóstico clínico de la enfermedad de base y que es la causa de la enfermedad aterosclerótica. En la actualidad, a los factores de riesgo mencionados, se deben sumar tres componentes que han demostrado su utilidad en estudios científicos derivados de datos epidemiológicos y experimentales: la proteína C reactiva, la lipoproteína (a) y la homocisteína. Esta última contiene sulfuro y se produce en el transcurso del metabolismo intracelular de la

**Tabla 2.9** Propiedades de los marcadores cardíacos

Marcador	Especificidad cardíaca	Comienzo de la elevación (h)	Tiempo en que alcanza el valor máximo (h)	Tiempo que se mantiene elevado (h)
Mioglobina	No	1 - 3	6	16 - 24
CK total	No	4 - 8	6	36 - 48
CK-MB (masa)	++	3 - 4	12	24 - 36
Troponina T	++++	3 - 4	20	10 - 14
Troponina I	++++	4 - 6	20	4 - 7

metionina. Sobre este compuesto, existen datos irrefutables que relacionan su concentración elevada con el aumento en la incidencia de aterosclerosis y enfermedad cardiovascular.

Para su óptimo metabolismo, la homocisteína precisa de tres vitaminas: B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> y folato, y tiene como característica *sui generis*, que cuando sus valores se desplazan hacia cifras más elevadas, aun dentro del intervalo de referencia, indican que el portador presenta un aumento en el riesgo de aterosclerosis y de trombosis venosa profunda.

La proteína C reactiva es conocida desde hace décadas como marcador inflamatorio (reactante de la fase aguda). Con el advenimiento de las técnicas muy

sensibles para su determinación, se han detectado valores elevados en la aterosclerosis, enfermedad que se acompaña siempre de un componente inflamatorio.

La lipoproteína (a) es una lipoproteína de baja densidad (LDL) unida a la apolipoproteína (a) y que se ha demostrado que está implicada en la patogénesis de la enfermedad arterial coronaria.

## **BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA**

Apple FS. Measurement of cardiac Troponin I in serum for the detection of myocardial infarction. JIFCC 1986;8:148-150.

Gambino R. Troponin T Med Care Int 1993; Sept.

Petterson KS. Rapid and quantitative determination of myoglobin in whole blood C. Care Int 1996; Nov-Dic.

## **CONTENIDO**

---

### **Introducción/ 151**

### **Pancreatitis aguda/ 151**

Indicación e interpretación de los análisis de laboratorio/ 152

### **Pancreatitis crónica/ 152**

Indicación e interpretación de los análisis de laboratorio/ 152

### **Síndrome de malabsorción/ 153**

Indicación e interpretación de los análisis de laboratorio/ 153

### **Hepatitis viral aguda/ 153**

### **Hepatitis viral crónica/ 154**

### **Cirrosis hepática/ 154**

Indicación e interpretación de los análisis de laboratorio/ 155

### **Bibliografía recomendada/ 157**

### Capítulo 17



## ALTERACIONES DE LABORATORIO EN LAS ENFERMEDADES DEL APARATO DIGESTIVO

*Dr. Celso Cruz Rodríguez*

### RESUMEN

En este capítulo se describe el papel que juega el laboratorio médico en el diagnóstico de las enfermedades del aparato digestivo. Se hace especial referencia a las enzimas más utilizadas y se describe, en detalles, la importancia de la elastasa en el diagnóstico de las pancreatitis. También se hace referencia, por su vigencia actual, al diagnóstico de las hepatitis agudas y crónicas.

### INTRODUCCIÓN

El aparato digestivo comprende un conjunto de órganos que intervienen de manera directa en el proceso de digestión y absorción de sustancias nutritivas. Por la función que realiza, consta de un conducto principal (tubo digestivo) que adopta diferentes nombres en la medida en que desciende hasta terminar en el ano. En todo su trayecto, se comunica, ya sea de forma directa o a través de conductos más pequeños, con otros órganos de vital importancia como son el estómago, el hígado y el páncreas, para llevar a cabo sus dos principales funciones: la digestión de los alimentos y la posterior absorción de los nutrientes.

Una estructura tan compleja, con funciones altamente especializadas y un largo trayecto en el interior del cuerpo humano, no es extraño que sea susceptible a múltiples enfermedades agudas y crónicas, benignas y malignas, parasitarias, virales e infecciosas, que se agrupan y constituyen temas de estudio de la gastroenterología. Como no es posible exponerlas todas en este capítulo, por razones de espacio, se describirán solo algunas de las más frecuentes.

### PANCREATITIS AGUDA

La pancreatitis aguda se caracteriza por la destrucción difusa del tejido pancreático por la acción de

enzimas proteolíticas, producidas en las células acinares del páncreas. Cuando estas células se lesionan, las enzimas se vierten sobre el tejido pancreático, y producen su autodigestión, seguida de necrosis hemorrágica.

La fisiopatología de esta enfermedad está representada por la proteólisis, la lipólisis y las hemorragias que provocan la autodigestión. La forma activa de la tripsina es un factor importante en el daño hístico, pero no es la única enzima involucrada. Junto a ella actúan las fosfolipasas A y B, la elastasa y la lipasa. No se ha detectado que la amilasa tenga igual comportamiento que las anteriores.

Las causas más frecuentes de pancreatitis aguda son:

1. Alcoholismo.
2. Colecistitis aguda con coledocolitiasis o sin esta.
3. Úlcera péptica penetrante.
4. Secuelas de la colangiopancreatografía retrógrada, en especial cuando la inyección del contraste radiológico alcanza las células acinares, debido a un exceso en la presión o en el volumen inyectado durante la administración de este.
5. Traumatismos abdominales.
6. Enfermedades infecciosas y virales.

## INDICACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS ANÁLISIS DE LABORATORIO

El diagnóstico bioquímico de la pancreatitis aguda, se basa sobre todo en diferentes enzimas que se sintetizan en este órgano. Algunas, como la amilasa y la tripsina, se utilizan hace más de cuatro décadas en el diagnóstico de esta enfermedad.

La amilasa es una enzima que se sintetiza en las glándulas salivales, el páncreas, el hígado y las trompas de falopio, y su función es hidrolizar el almidón y el glucógeno ingerido con la dieta. Cuando el tejido pancreático se inflama, la amilasa penetra en el torrente circulatorio y sus valores en sangre se elevan. A través de los años, los métodos para su determinación han sido perfeccionados. Hoy día, se dispone de métodos para determinar la actividad total de la enzima y de sus isoenzimas: pancreática y salival. Esta última se utiliza para el diagnóstico diferencial entre pancreatitis y parotiditis, pero quedan algunas enfermedades en las cuales la amilasa se encuentra elevada en ausencia de daño pancreático. Este comportamiento de la amilasa señala su gran sensibilidad que, a su vez, se acompaña de una limitación: su baja especificidad. Otro inconveniente de la amilasa es que su molécula es muy pequeña, por lo cual el riñón la depura muy rápido. Esta es la causa de que sus valores en sangre no se mantengan elevados por encima de 24 a 48 horas. Su determinación también se puede realizar en la orina.

La lipasa, enzima lipolítica pancreática, se asocia con la anterior (amilasa) para el diagnóstico de la pancreatitis, pues ambas se elevan siempre que las secreciones pancreáticas son bloqueadas. Alcanza sus valores más elevados de 24 a 36 horas luego del comienzo de la enfermedad, un poco después que la amilasa (16 a 24 horas). Sin embargo, su elevación se mantiene por más tiempo (14 días), debido a que su molécula es de mayor tamaño y no es depurada tan rápido por el riñón. Su especificidad es superior a la de la amilasa, por lo cual se presentan menos resultados positivos falsos. Tiene también la ventaja de que sus valores no se elevan en la parotiditis. Las isoenzimas de la lipasa: L1, L2 y L3, se han utilizado también para el diagnóstico de las pancreatitis. La más estudiada ha sido la L2, pero su uso no se ha extendido, pues tiene iguales sensibilidad y especificidad nosológicas que la lipasa.

A fines de la década de los 80 del siglo xx, se introdujo en el diagnóstico de las pancreatitis una nueva enzima que ha ocupado el primer lugar entre las demás: la elastasa 1. Esta es una proteasa humana específica, sintetizada por las células acinares pancreáticas

junto a las enzimas digestivas: amilasa, lipasa y tripsina. Entre sus características se destacan las siguientes:

1. Especificidad pancreática absoluta.
2. Sensibilidad y especificidad mayor que 90 %.

Además, constituye una prueba no invasiva y que tiene una óptima correlación con la prueba invasiva de la secretina-pancreozimina, considerada el “estándar dorado” en el estudio de la función pancreática. La determinación de la elastasa se realiza con métodos inmunoenzimáticos (ELISA), lo cual fortalece su exactitud. Los materiales biológicos para su determinación pueden ser el suero o las heces fecales, en los cuales su comportamiento es muy estable por su resistencia a la degradación por otras proteasas y a la proteólisis por la flora intestinal.

Los niveles de la elastasa 1 en la pancreatitis aguda, se mantienen elevados por varios días, por lo cual el diagnóstico de esta afección puede realizarse después de que los valores de la lipasa y la amilasa se han normalizado. Según la evolución clínica de la pancreatitis aguda, cuando aparecen complicaciones, son necesarias otras pruebas de laboratorio como son: hemograma, urea, creatinina, glucosa y los iones calcio y magnesio. En esta enfermedad se produce la precipitación del calcio ionizado en las zonas de necrosis grasa. La hipocalcemia (menor que 2,0 mmol/L) debe ser controlada, al igual que la hipomagnesemia (menor que 0,8 mmol/L), pues ambas pueden dar origen a manifestaciones clínicas.

## PANCREATITIS CRÓNICA

La pancreatitis crónica aparece cuando la lesión estructural pancreática se ha hecho permanente y se mantendrá aun cuando no estén presentes las causas que la originaron. El alcoholismo es una de las principales causas (representa del 40 al 60 %), seguido por las enfermedades de las vías biliares. Estas últimas, raras veces originan fibrosis parenquimatosa y destrucción celular, salvo en pacientes que también son alcohólicos. Otras causas menos frecuentes son el hiperparatiroidismo, las dislipidemias, los traumatismos y la pancreatitis hereditaria con aminoaciduria o sin ella.

## INDICACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS ANÁLISIS DE LABORATORIO

Las enzimas amilasa y lipasa con frecuencia presentan valores normales o discretamente elevados. El cuadro clínico, los antecedentes patológicos y la determinación de la elastasa 1, constituyen los datos más importantes

para el diagnóstico. Investigaciones recientes han demostrado que las llamadas pruebas especiales para el estudio de la función pancreática, tienen muchos inconvenientes:

1. Son invasivas (secretina-pancreozimina).
2. Su realización consume mucho tiempo.
3. Requieren de la recolección de heces fecales por períodos de 72 horas para determinar el contenido de grasas.
4. Son poco sensibles y poco específicas.
5. Son rechazadas por los pacientes.

La comparación de los resultados obtenidos en grupos de individuos normales y pacientes con enfermedades pancreáticas, indica que la elastasa constituye un método nuevo, no invasivo, que puede realizarse en suero o en una muestra aislada de heces fecales, en adultos con afecciones agudas y crónicas del páncreas, y en los niños después del primer mes de vida.

## SÍNDROME DE MALABSORCIÓN

Como su nombre indica, el síndrome de malabsorción se manifiesta por un defecto en la absorción de nutrientes en el intestino delgado, como son las grasas, los carbohidratos y las proteínas. Desde el punto de vista técnico, el término malabsorción se refiere al transporte anormal en la mucosa, de una o más sustancias específicas.

Las causas de la malabsorción son multifactoriales. En ese sentido, el estudio de todas las variedades de esta enfermedad es extenso. A continuación, a modo de ejemplo, se expone la variante de la malabsorción de las grasas. En este caso la afección puede ser provocada por una disminución de la enzima lipasa, como ocurre en la insuficiencia de la función pancreática. Al inicio, los síntomas son difusos, no específica, hasta que la enfermedad avanza más. Entonces aparecen las deposiciones abundantes, fétidas, con gran contenido de grasas, pérdida de peso, debilidad y fatiga.

## INDICACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS ANÁLISIS DE LABORATORIO

El síndrome de malabsorción, como enfermedad multifactorial, se acompaña de muchas pruebas de laboratorio cuyos resultados están fuera de los límites de referencia. Con frecuencia se presentan valores disminuidos de hemoglobina, índice hematócrito, albúmina sérica, vitamina B<sub>12</sub>, calcio y colesterol. Antes de acometer la indicación de análisis, se debe trazar una secuencia lógica para no solicitar pruebas cuyos valores, de antemano, se conoce que pueden estar fuera del intervalo de referencia, y no aportarán ningún beneficio al

diagnóstico. Se indicarán entonces las pruebas especiales y, entre ellas, la primera debe ser la determinación cuantitativa de grasas en heces fecales recogidas durante un período de 72 horas. De manera previa, se puede realizar como pesquisa, una determinación cualitativa en una muestra aislada de heces fecales. La prueba cuantitativa se considera el “estándar de oro” para el diagnóstico de esta enfermedad (comprobación de la esteatorrea).

La prueba de la D-xilosa se utiliza para evaluar la integridad de la mucosa, al estudiar la absorción de los carbohidratos. La excreción normal de xilosa, en una muestra de orina recolectada 5 horas después de la administración oral de este glúcido, debe estar por encima de 5 g. Si se mantiene por debajo de 2,5 g, en ausencia de insuficiencia renal y ascitis, se considera positiva e indica que existe daño mucoso difuso en el duodeno y yeyuno proximal.

La prueba de Schilling, que utiliza vitamina B<sub>12</sub> marcada con un isótopo radiactivo, se utiliza para estudiar la malabsorción de esta vitamina y también sus causas. Al paciente se le administra, por vía oral, la vitamina sin marcar y, luego, la vitamina marcada. La primera ocupa los depósitos, y la marcada, al encontrarlos ocupados, se excreta con la orina. Por lo general, más del 7 % de la vitamina marcada administrada, se elimina con la orina en un período de 24 horas.

## HEPATITIS VIRAL AGUDA

La hepatitis viral aguda es una enfermedad inflamatoria y difusa del hígado, causada, como su nombre indica, por virus. En la actualidad, las hepatitis virales se clasifican de acuerdo con el agente causante, en A, B, C, D, E y F (tabla 2.10).

El cuadro clínico de estas afecciones varía según el virus que la origine: discreta toma del estado general, anorexia, febrícula, ausencia de íctero (anictéria) o, por el contrario, pueden evolucionar de forma fulminante al coma hepático. Por lo general, los pacientes desarrollan un íctero después de un período prodrómico que puede durar días o semanas, caracterizado por anorexia, náuseas y fiebre. Los pacientes también refieren sentir la pérdida del deseo de fumar o de ingerir bebidas alcohólicas. Hay signos acompañantes que tienen gran importancia en el diagnóstico como son la eliminación de orinas oscuras (marrón oscuro) debido a la presencia de bilirrubinas y de heces pálidas (hipocólicas) o incoloras (acólicas). En años recientes, se han logrado grandes avances en el diagnóstico de las enfermedades hepáticas, en especial en las virales. A las pruebas bioquímicas y enzimáticas utilizadas durante décadas, se han añadido otras que tienen como base la biología molecular. La

**Tabla 2.10** Características de las hepatitis por virus A, B, C, D, E y F

Virus	Incubación (días)	Comienzo de la enfermedad	Cronicidad (%)	Mortalidad (%)
A	15 - 60	Brusco	Rara	0,6
B	30 - 150	Lento	30	1,4
C	8 - 365	Lento	> 80	1 - 2
D	12 - 120	Lento	8 - 20	30
E	12 - 60	Brusco	Se desconoce	1 - 2 *
F	Se desconoce	Se desconoce	Se desconoce	Se desconoce

**Leyenda**

\* Alto índice de mortalidad en pacientes embarazadas.

hepatitis A (HVA), causada por un virus ARN que sigue la ruta heces fecales → boca, está muy diseminada por el mundo, en países que mantienen condiciones sanitarias deficientes. La hepatitis B (HVB), es causada por un virus ADN; se transmite por vía sanguínea y sexual, y es bastante contagiosa. En la actualidad existe una vacuna para su prevención. La hepatitis C (HVC) es causada por un virus ARB y se transmite igual que la HVB. No existe vacuna para su prevención. La hepatitis D (HVD), o hepatitis delta, la produce un virus ARN y en el hombre su padecimiento está supeditado a la infección previa con el virus de la HVB. Por lo general, aparece en personas que están sometidas a tratamiento con sangre total o sus derivados (hemofilia) y también en los drogadictos que comparten agujas contaminadas. La variante E (HVE) tiene como causa la infección con un virus ARN y es endémica en el mundo subdesarrollado, donde alcanza el 20 % de mortalidad en el grupo de mujeres embarazadas que padecen la enfermedad. La hepatitis G (HVG) no ha sido asociada con ninguna de las anteriores y se considera que es provocada por un agente viral desconocido al que se le atribuye ser el causante de una afección en la cual del 10 al 20 % de los pacientes desarrolla luego una hepatitis crónica de causa desconocida.

**HEPATITIS VIRAL CRÓNICA**

La hepatitis viral crónica es una afección de causa y patogenia diversas. Su diagnóstico se basa en un grupo de pruebas de laboratorio, pero el carácter definitivo de este, lo ofrecen la observación laparoscópica del hígado y la toma de un cilindro de tejido para su observación anatomopatológica. El cuadro clínico está dado por un proceso inflamatorio hepático que se extiende durante un período mayor de 6 meses y se acompaña de cambios en diferentes componentes bioquímicos e

histopatológicos (biopsia). Esta enfermedad puede progresar muy rápido hacia la cirrosis hepática o hacia una necrosis hepática aguda que, por lo general, conduce a los pacientes a la muerte, debido a los profundos trastornos metabólicos que se producen.

Entre las afecciones que dan lugar a una hepatitis crónica se encuentran la HVB y la HVC. En la HVB son frecuentes las infecciones subclínicas (anictéricas), el riesgo de pasar a la cronicidad y la posterior evolución hacia el carcinoma hepático (hepatoma).

La indicación e interpretación de los análisis de laboratorio de la hepatitis viral aguda y de la hepatitis viral crónica se exponen junto a las de la cirrosis hepática.

**CIRROSIS HEPÁTICA**

La cirrosis hepática es una enfermedad crónica del hígado, caracterizada por una fibrosis difusa del tejido hepático que da origen a la desaparición de su estructura normal, la cual se convierte en nodular. La causa más frecuente de cirrosis es el alcoholismo (50 %) seguida por las hepatitis B y C (33 %) (tabla 2.11).

El cuadro clínico de esta afección puede ser muy pobre en síntomas y signos, como ocurre en los pacientes cirróticos compensados, o acompañarse de síntomas muy floridos cuando están descompensados. La depresión de las funciones hepáticas de síntesis proteica, metabólicas, de desintoxicación, secreción y excreción, traen al organismo graves consecuencias. Entre las secuelas más importantes de esta enfermedad, se destacan las siguientes:

1. Hipertensión portal: producida por la resistencia al paso de la sangre a través de la vena porta con el consiguiente aumento de la presión en el sistema venoso portal. Esto provoca la aparición de esplenomegalia, ascitis y la dilatación del sistema venoso colateral del esófago, de la pared abdominal y del recto, lo cual trae como consecuencia hemorragias y el paso de sustancias no metabolizadas por el hígado, del intestino a la

Tabla 2.11 Clasificación histológica de las hepatitis crónicas

Nombres		Características anatomopatológicas
Anterior	Actual	
Hepatitis crónica activa	Hepatitis crónica	Leve: poca actividad, fibrosis leve o moderada Moderada: actividad moderada, fibrosis leve, moderada o grave Grave: actividad marcada, fibrosis leve, moderada o grave
Hepatitis crónica persistente	Hepatitis crónica	Actividad mínima o baja, fibrosis leve
Hepatitis crónica lobulillar	Hepatitis crónica	Actividad baja, moderada o alta, sin fibrosis

circulación general. Este paso abreviado de diferentes componentes, como son: bacterias, fármacos y neurotoxinas, trae como secuelas, otras graves complicaciones.

2. Encefalopatía hepática: en su origen desempeña un papel de primer orden el ion amonio, al actuar de manera directa sobre la neurotransmisión inhibitoria y excitatoria.
3. Ascitis: se caracteriza por la acumulación de líquido en el interior de la cavidad peritoneal y que se explica por la acción combinada de los mecanismos siguientes:
  - a) La disminución del volumen efectivo que aparece al aumentar la presión hidrostática (hipertensión portal) y la disminución de la presión coloidal, debido a la hipoalbuminemia causada por la imposibilidad del hígado para sintetizarla. Tanto una como otra conducen a la acumulación de la linfa en la cavidad abdominal. También intervienen en este mecanismo la hipernatremia, la hipofosfatemia y la retención de agua.
  - b) La teoría del “hiperflujo”, que responsabiliza a la retención de sodio y a la expansión del volumen plasmático.

INDICACIÓN E INTERPRETACIÓN  
DE LOS ANÁLISIS DE LABORATORIO

En la actualidad, los especialistas que trabajan en el laboratorio clínico tienen a su disposición una gran variedad de pruebas para el diagnóstico de las enfermedades hepáticas agudas y crónicas: las determinaciones de enzimas, proteínas, carbohidratos y lípidos, unidos a otros componentes cuyo metabolismo se altera, como es el caso de las bilirrubinas, hierro, ácidos biliares, las llamadas pruebas funcionales, las nuevas técnicas de biología molecular incorporadas en años recientes, y la ampliación de los métodos para el estudio de la

hemostasia. Cada una de las pruebas que se describirán a continuación, tienen su sensibilidad y especificidad nosológicas propias y, cuando se utilizan de manera racional, se obtienen los mejores resultados desde el punto de vista diagnóstico.

Análisis bioquímicos

**Enzimas.** Dos enzimas ocupan el primer lugar para el diagnóstico desde mediados del siglo xx: la ALAT y la ASAT. La primera se encuentra en el citoplasma de los hepatocitos periportales y tiene un elevado grado de especificidad hepática. La segunda, además de encontrarse en el citoplasma y en las mitocondrias, también está presente en otros tejidos como el músculo cardíaco, donde alcanza su mayor concentración, y en el cerebro, los riñones y el músculo esquelético. Ambas elevan sus niveles en el suero en casi todas las afecciones hepáticas, pero alcanzan su mayor concentración en las hepatitis virales agudas. En esta enfermedad, la ALAT puede elevar hasta 35 veces su valor normal y la ASAT, unas 15 veces. Esta última, por su ubicación mitocondrial, es un signo de mal pronóstico (necrosis celular) cuando sus valores están por encima de los de la ALAT. La relación ASAT/ALAT recibe el nombre de cociente de Rittis, al cual se le daba un gran valor como índice pronóstico. En la actualidad, su importancia ha sido puesta en duda por algunos investigadores. Estas enzimas son muy sensibles y constituyen un valioso marcador para controlar el progreso y la remisión de la enfermedad.

La fosfatasa alcalina (FAL) se encuentra presente, sobre todo, en el tejido hepático y en el óseo. Sus valores se muestran elevados normalmente en toda la etapa que dura el crecimiento y durante el primer trimestre del embarazo, por lo que en estos períodos se sustituye con la determinación de la enzima 5’ nucleotidasa, cuyos valores no se modifican. Los niveles de



la FAL aumentan en muchas enfermedades hepáticas y tiene un uso específico en las obstrucciones biliares intrahepáticas o extrahepáticas, por cualquier causa (cálculos, neoplasias). La FAL es un marcador para la colestasis.

La gammaglutamiltranspeptidasa (GGT) es otra enzima que se encuentra en varios tejidos, además del hepático: corazón, cerebro, riñón, páncreas y bazo. En el hígado está ubicada en las células epiteliales de los conductos biliares y sus concentraciones séricas se correlacionan muy bien con las de la FAL. Se utiliza cuando es necesario determinar si la elevación de la fosfatasa alcalina se debe a una enfermedad hepática u ósea. En la primera, las dos están elevadas, en la segunda solo la FAL. La GGT constituye otro marcador de colestasis junto a la FAL, y en los adictos al alcohol, sus valores se elevan, por lo cual se utiliza como marcador para el alcoholismo.

La 5' nucleotidasa se usa, sobre todo, en pediatría cuando la FAL se encuentra elevada, por causas extrahepáticas (crecimiento). En estos pacientes, comparte su valor diagnóstico con la GGT.

Las enzimas descritas antes, también tienen valor en el diagnóstico y control de las enfermedades hepáticas crónicas.

La determinación de la ALAT ha sido empleada como pesquisa para los donantes de sangre, pues los valores en este grupo de personas se correlacionan muy bien con la posibilidad de transmitir al receptor el virus de la hepatitis B y el de la hepatitis C.

**Bilirrubinas.** A diario se producen 300 mg de bilirrubina en el cuerpo humano. Más del 80 % proviene de la degradación de la hemoglobina que se lleva a cabo en el sistema reticuloendotelial. La bilirrubina que se forma allí, viaja al hígado transportada por la albúmina (bilirrubina no conjugada) y en este órgano, en los hepatocitos, se une al ácido glucurónico y forma el glucurónido de bilirrubina (bilirrubina conjugada).

Las bilirrubinas forman parte del grupo de pruebas diagnósticas de las enfermedades hepáticas. Su indicación no está justificada si no se ha detectado desde el punto de vista clínico, la presencia de íctero, por lo que su valor como pesquisa es nulo. Los ícteros enzimáticos constituyen una excepción; más que hiperbilirrubinemia, en ellos se trata de encontrar diferencias en las concentraciones de la bilirrubina no conjugada y la conjugada, pero con valores dentro del intervalo de referencia para ambas.

La fracción indirecta aumenta en los ícteros prehepáticos, que por lo general obedecen a una destrucción excesiva de eritrocitos, como ocurre en las afecciones que se acompañan de hemólisis. La fracción directa se eleva en las afecciones hepáticas parenquimatosas, constituidas por las hepatitis o la cirrosis. En tales casos, la fracción directa, unida al ácido glucurónico, atraviesa la barrera glomerular y aparece en la orina, lo que da lugar a la bilirrubinuria (coluria). En los ícteros obstructivos, el comportamiento de las bilirrubinas es igual al que se observa en el daño hepatocelular o parenquimatoso. Sin embargo, el urobilinógeno en la orina se comporta de manera diferente: está presente en los parenquimatosos y está ausente en los obstructivos.

**Ácidos biliares (cólico y quenodeoxicólico).** Son indicadores de la capacidad excretora del hígado, más específicos que las bilirrubinas, y son más sensibles a los daños discretos.

**Albúmina sérica.** La concentración de la albúmina en el suero disminuye cuando su síntesis se afecta ante la presencia de enfermedades hepáticas, sobre todo crónicas. La hipoalbuminemia, aunque no es la causa principal, es un factor contribuyente en la aparición de la ascitis.

**Tiempo de protrombina.** El grupo de proteínas sintetizadas por el hígado incluye algunas que participan en el proceso de la coagulación; además, la disminución de los ácidos biliares en la llegada al intestino, es también causa de interferencia en la síntesis de estas proteínas o factores. En este caso se encuentra la protrombina (factor II), cuyo déficit puede causar trastornos de la coagulación. De esta forma, la determinación del tiempo de protrombina constituye un importante índice de deterioro de la función hepática.

**Marcadores tumorales.** En las enfermedades hepáticas, la alfafetoproteína (AFP) se utiliza desde el año 1963, en que fue descubierta. Es una alfa globulina sintetizada por las células del saco vitelino y por el hígado, así como por los intestinos fetales. La AFP es un marcador tumoral para el carcinoma hepatocelular y para neoplasias que implican elementos del saco vitelino. Las determinaciones seriadas de esta proteína, incrementan su utilidad, aunque igual que los demás marcadores tumorales, se utiliza como factor pronóstico y para controlar la evolución de la enfermedad.

**Análisis inmunológicos.** Las pruebas inmunológicas han contribuido de manera importante al diagnóstico de

las causas de las enfermedades hepáticas como las hepatitis virales agudas y, en específico, la HVA. En esta afección, la detección de anticuerpos contra el virus causante, se convirtió en el principal soporte para su diagnóstico. Los anticuerpos IgM contra el virus están presentes en más del 99 % de los pacientes cuando se inicia la enfermedad, y alcanza sus valores más elevados durante el primer mes, los que luego disminuyen hasta no ser detectables, a partir de los 4 a 6 meses.

En la HVB, el marcador serológico está representado por el antígeno viral, conocido por antígeno Australia o por las iniciales de su nombre en inglés: HbsAg. Este se detecta de 2 a 12 semanas de iniciada la infección viral y desaparece a las 12 a 20 semanas después del comienzo de los síntomas o del aumento de las enzimas ALAT y ASAT. Luego de 2 semanas de detectarse el HbsAg, hace su aparición el anticuerpo IgM contra el antígeno core viral (anti HbcIgM) que permanece detectable hasta 6 meses después de desaparecido el HbsAg. El anticuerpo IgM representa una gran ayuda diagnóstica cuando los niveles de HbsAg están por debajo de los niveles de detección del método de ensayo que se utiliza para su determinación.

La HVC se detecta a través de la presencia de antígenos del virus C. Los métodos para el diagnóstico de la HVC no se han perfeccionado como los de HVA y HVB.

**Métodos biomoleculares.** El impacto de la biología molecular en el diagnóstico de las enfermedades hepáticas ha sido grandioso. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y las pruebas basadas en antígenos proteicos recombinantes, han abierto las puertas para la producción de drogas y vacunas con la tecnología del ADN recombinante y la terapia génica. Estos avances repercuten de manera positiva en el diagnóstico de la hepatitis C, B y G, y en las enfermedades hepáticas autoinmunes como la cirrosis biliar primaria, las enfermedades hereditarias como la deficiencia de alfa 1 antitripsina, la enfermedad de Wilson, la hemocromatosis hereditaria y las hiperbilirrubinemias hereditarias como el síndrome de Crigler-Najjar, el de Gilbert y el de Dubin-Johnson.

## BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- Bongiovanni GL. Essentials of clinical gastroenterology. New York: Mac Graw Hill Book Comp., 1988.
- Gambino R. Elevated serum alkaline phosphatase in liver diseases. Labmedica 1988; June-July.
- Sachar DB. Pocket guide to Gastroenterology. New York: Williams and Wilkins, 1991.
- Stein J, Jung M, Sziegoleit A: Immunoreactive elastase 1: Clinical evaluation of a new noninvasive test of pancreatic function. Clin Chem 1996; 42:222-6.
- The Twentieth Annual Arnold O. Beckman Conference in Clinical Chemistry. Liver diseases and the clinical laboratory Clin Chem 1997;43:8 (B).
- Zilva JF. Bioquímica clínica en el diagnóstico y tratamiento. Barcelona: Salvat Editores, 1979.

## **CONTENIDO**

---

**Breve resumen de la fisiología renal/ 159**

**Insuficiencia renal aguda/ 160**

Indicación e interpretación de los análisis de laboratorio/ 161

**Insuficiencia renal crónica/ 162**

Indicación e interpretación de los análisis de laboratorio/ 162

**Glomerulonefritis aguda/ 162**

Indicación e interpretación de los análisis de laboratorio/ 163

**Síndrome nefrótico/ 163**

**Bibliografía recomendada/ 163**

### Capítulo 18



## ALTERACIONES DE LABORATORIO EN LAS ENFERMEDADES DEL APARATO UROGENITAL

*Dr. Celso Cruz Rodríguez*

### RESUMEN

En este capítulo se describen las funciones fundamentales del riñón y la indicación e interpretación de los análisis de laboratorio para el estudio de las enfermedades del aparato urogenital. Se definen las indicaciones para instituir el tratamiento dialítico y se señalan las causas más importantes de proteinuria.

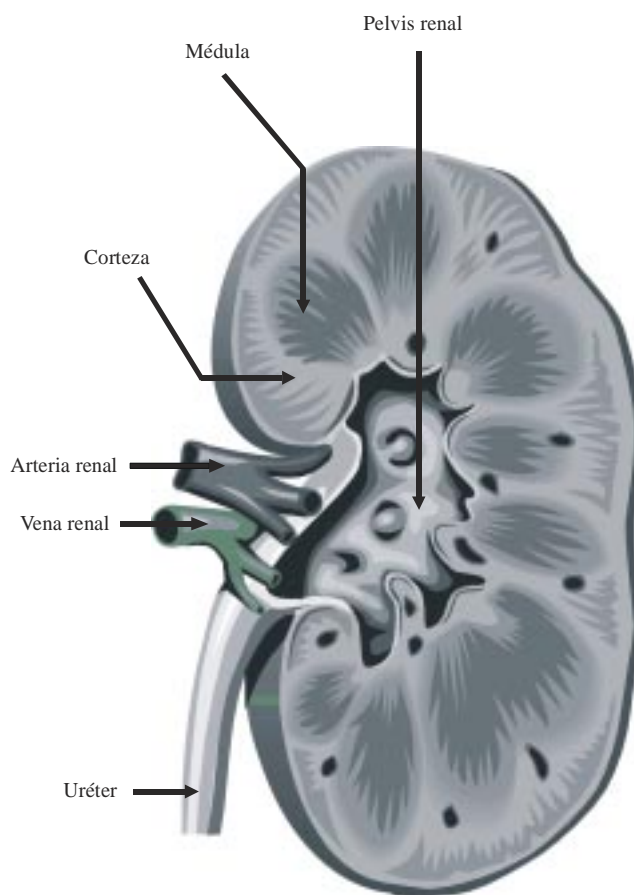
### BREVE RESUMEN DE LA FISIOLÓGÍA RENAL

El riñón realiza cinco funciones fundamentales:

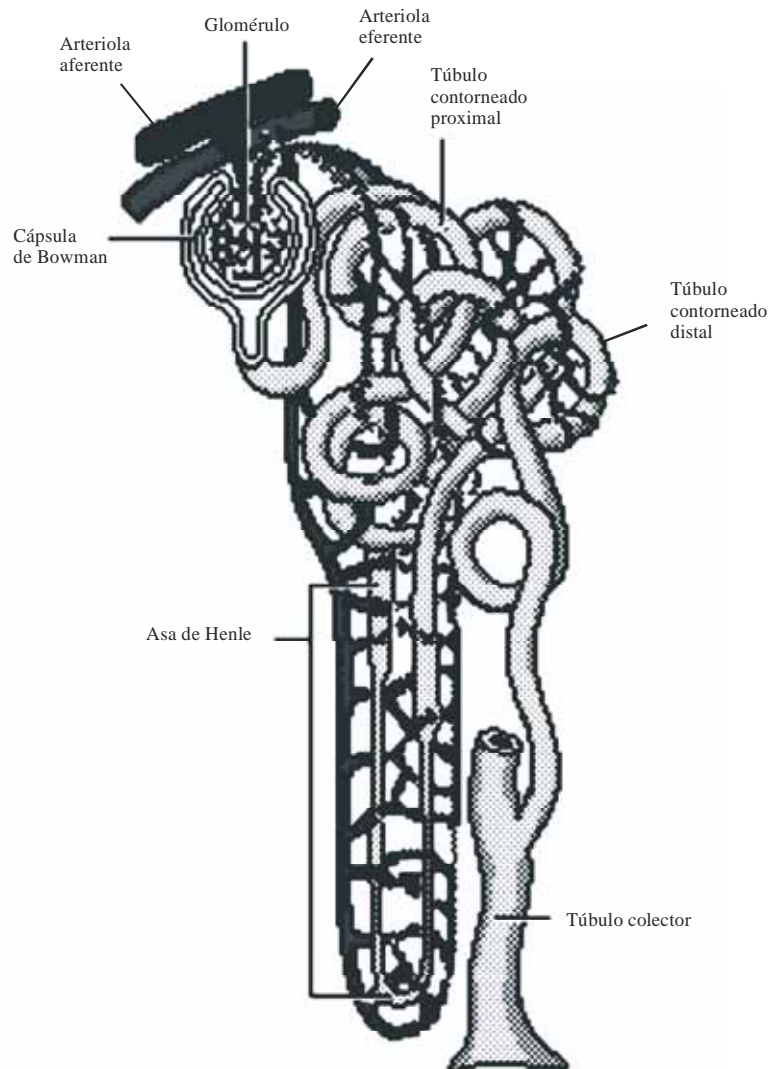
1. Excreción de productos de deshecho (compuestos nitrogenados y ácidos).
2. Regulación del equilibrio hidromineral.
3. Regulación del equilibrio ácido-básico.
4. Retención de nutrientes (electrolitos, proteínas, agua y glucosa).
5. Síntesis de hormonas (eritropoyetina, renina y vitamina D).

La orina es un ultrafiltrado del plasma, casi exento de proteínas. Después de formada, se modifica en el interior de los túbulos renales hasta que se convierte en la orina definitiva. En el túbulo proximal se reabsorbe el 90 % de la que atraviesa el filtro glomerular, y arrastra con ella, el 40 % de la urea, toda la glucosa, el calcio, el fósforo, los aminoácidos, el ácido úrico y el 70 % del potasio.

En el asa de Henle, en su porción delgada descendente, se reabsorbe el 20 % del cloruro y del sodio, filtrado, y 15 % más de agua. En la porción gruesa del asa, en su unión con el túbulo distal, está la bomba de cloruro, en la cual se reabsorben agua y cloruro. El magnesio se reabsorbe a todo lo largo del asa de Henle. En el túbulo distal, y por acción de la aldosterona, se intercambia el sodio de la luz tubular por potasio e hidrógeno (figuras 2.9 y 2.10).



**Figura 2.9** Riñón.



**Figura 2.10** Nefrona.

## INSUFICIENCIA RENAL AGUDA

Esta enfermedad se produce por la falla renal repentina que provoca la retención de desechos nitrogenados (azoemia).

Aproximadamente 2/3 de los pacientes presentan oligoanuria (excreción diaria de orina por debajo de 400 mL/día) y 1/3 pueden presentar poliuria (excreción diaria por encima de 800 mL/día). La azoemia está dada, en lo fundamental, por la elevación de la urea, de la creatinina y del ácido úrico. A estos componentes se suman los iones fosfato y sulfato. Según la dieta que ingiere el paciente, los iones sodio y magnesio también pueden retenerse y, por último, como consecuencia

directa, se produce una acidosis metabólica con valores elevados de la potasemia. Cuando la falla renal se presenta de súbito, en un período de días a semanas, la insuficiencia renal es aguda. Cuando el deterioro de la función renal es paulatino y se extiende por meses o años, la insuficiencia renal es crónica.

La azotemia o uremia puede tener origen prerrenal, renal o posrenal (tabla 2.12).

La uremia prerrenal, por lo general, se asocia con una perfusión renal disminuida (hipotensión arterial, obstrucción de arterias y venas) y responde en pocas horas al tratamiento, si la causa sistémica de la hipoperfusión se corrige.

**Tabla 2.12** Índices para diferenciar la insuficiencia prerrenal aguda de la insuficiencia renal

Índice	Unidades y fórmulas	Prerrenal	Renal
Osmolalidad urinaria	mOsmol/kg	> 500	< 350
Sodio en orina	mmol/L	< 20	> 40
Urea en orina / urea en suero	$\frac{o \text{ urea}}{s \text{ urea}}$	> 8	< 3
Creatinina en orina / creatinina en suero	$\frac{o \text{ creatinina}}{s \text{ creatinina}}$	> 40	< 20
Índice de la falla renal	$\frac{o \text{ Na}}{o \text{ creatinina} / s \text{ creatinina}}$	< 1	> 1
Excreción fraccionada del sodio filtrado	$\frac{o \text{ Na} / s \text{ Na}}{o \text{ creatinina} / s \text{ creatinina}} \times 100$	< 1	> 1

**Leyenda**

o: orina

s: suero

La uremia posrenal es originada por la obstrucción mecánica a distancia (litiasis, neoformaciones, hipertrofia prostática, prostatitis y tumores de vejiga) y en las obstrucciones venosas (trombosis de la vena renal). La función renal se restaura cuando la obstrucción se elimina.

Las uremias renales se presentan cuando la falla está en el propio riñón, y sus causas pueden ser múltiples: vasculitis, hipertensión arterial maligna, eclampsia, estados de hiperviscosidad, tóxicos exógenos, glomerulonefritis aguda, riñón isquémico y por el depósito de proteínas en el interior de los túbulos renales. La causa más frecuente de falla renal aguda es la necrosis tubular aguda, provocada por la isquemia renal mantenida, que se produce en las hemorragias graves, el choque cardiogénico y la insuficiencia cardíaca.

Las causas más frecuentes de insuficiencia renal aguda están dentro del grupo de las prerrenales (del 70 al 80 % de los casos). Las posrenales no rebasan el 10 %.

## INDICACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS ANÁLISIS DE LABORATORIO

El diagnóstico de la insuficiencia renal aguda se basa en varias pruebas de laboratorio, cuyos resultados se suman a la evaluación clínica exhaustiva. De esta forma, se podrá realizar un correcto diagnóstico diferencial entre las causas prerrenales, renales y posrenales. La retención de sustancias nitrogenadas, así como los trastornos electrolíticos y los del equilibrio ácido-básico, obligan al constante apoyo del laboratorio clínico para evitar las complicaciones irreversibles.

El grado de la retención nitrogenada se controla con las determinaciones de urea y de creatinina. Los

trastornos electrolíticos y del equilibrio ácido-básico, exigen de la determinación del ion sodio para detectar, de forma temprana, la hiponatremia o hipernatremia del ion potasio, para evitar las hiperpotasemias (mayor que 7 mmol/L) y del ion bicarbonato para mantener sus valores entre 15 y 20 mmol/L y el pH por encima de 7,20. Es necesario también, controlar los valores de fosfato y de calcio en el suero, para controlar la hiperfosfatemia y la hipocalcemia.

A las anteriores pruebas se suman las siguientes:

1. Osmolaridad urinaria.
2. Concentración del ion sodio en la orina.
3. Relación de urea en orina/urea en suero.
4. Relación creatinina en orina/creatinina en suero.
5. Índice de la falla renal.
6. Excreción fraccionada del ion sodio.

El examen de la orina ofrece gran ayuda diagnóstica (véase el capítulo: “Examen de la orina, del líquido cefalorraquídeo y de otros líquidos orgánicos”). Si el sedimento contiene escasos elementos organizados y se trata, sobre todo, de cilindros hialinos, sugiere una falla renal aguda funcional. La presencia de cilindros granulados y células epiteliales, señalan hacia una necrosis tubular aguda; y los cilindros hemáticos, hacia una glomerulonefritis. Los cilindros leucocitarios y la piuria, hacia la nefropatía tubulointersticial.

El cuadro clínico de la insuficiencia renal aguda puede tornarse severo y prolongado. En estos enfermos está indicado el tratamiento dialítico con el principal objetivo de obtener una depuración plasmática más rápida y evitar la hiperpotasemia (cuadro 2.2).

**Cuadro 2.2** Indicaciones para la diálisis

Pericarditis urémica  
Tiempo de sangrado prolongado  
Hiperpotasemia  
Acidosis metabólica severa  
Sobrecarga hídrica que provoca edema pulmonar o hipertensión severa  
Valor de potasio en suero: 7 mmol/L o más  
Uremia sintomática  
Sobredosis de medicamentos  
Valor de urea en suero: 35 mmol/L  
Valor de creatinina en suero: mayor que 700 mmol/L

## INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA

La insuficiencia renal crónica es la disminución progresiva de la función renal, caracterizada por la disminución progresiva del filtrado glomerular y causada por la pérdida funcional de las nefronas.

Las principales causas que llevan al persistente deterioro de la función renal son la hipertensión arterial y la diabetes mellitus.

El paciente, por lo general, se mantiene asintomático hasta que la tasa de filtración glomerular se reduce entre el 25 y el 35 % de lo normal. Aparece entonces la uremia, a la cual se debe el cuadro clínico y humoral de esta enfermedad, con manifestaciones dermatológicas, cardiovasculares, gastrointestinales, neurológicas, genitourinarias y neuromusculares (cuadros 2.3 y 2.4).

**Cuadro 2.3** Causas de la insuficiencia renal crónica en el adulto

Nefropatía diabética  
Hipertensión (nefrosclerosis)  
Glomerulonefritis  
Enfermedades renales hereditarias: riñón poliquístico  
Enfermedades urológicas obstructivas  
Nefritis intersticiales

**Cuadro 2.4** Síntomas clínicos en la insuficiencia renal crónica

Dermatológicas: prurito, equimosis espontáneas, edema  
Cardiovasculares: disnea, dolor retroesternal al inspirar (pericarditis)  
Gastrointestinales: anorexia, náuseas, vómitos  
Genitourinarios: nicturia, impotencia  
Neuromusculares: sensación de hormigueo y calambres en miembros inferiores  
Neurológicas: irritabilidad, dificultad para concentrarse, disminución de la libido

## INDICACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS ANÁLISIS DE LABORATORIO

Los análisis de laboratorio en la insuficiencia renal crónica (IRC) son los siguientes:

1. Hematológicos: para el diagnóstico de la anemia, frecuente en estos pacientes y que puede ocasionar descensos del índice hematocrito por debajo de 0,30 vol. De acuerdo con el cuadro clínico y ante la sospecha de una enfermedad hematológica concomitante, los estudios pueden ampliarse hasta la observación microscópica del contenido medular óseo (medulograma).
2. Hemostáticos: para el estudio de los trastornos de la coagulación que acompañan a esta enfermedad como, por ejemplo, la prolongación del tiempo de sangrado que se produce en el 50 % de los pacientes, acompañada de trombocitopenia (disminución de las cifras de plaquetas circulantes) o no.
3. Bioquímicos: estudio de las proteínas plasmáticas (electroforesis) para detectar cualquier anomalía en las fracciones proteicas del suero, como la hipopalbuminemia o la presencia de alguna proteína anormal que señale la presencia de otra afección concomitante.

En este grupo se incluyen también los componentes que permiten la evaluación de la función renal como: la urea, la creatinina, los uratos, los fosfatos, el calcio, el magnesio y los electrolitos como los iones de sodio y de potasio.

4. Equilibrio ácido-básico: se incluyen los estudios del pH y del ion bicarbonato  $\text{CO}_2$  total, por la tendencia a la acidosis que acompaña a los pacientes con esta enfermedad:
  - a) Urianálisis: con el objetivo de detectar la presencia de proteinuria, hematuria y cilindruria.
  - b) Pruebas funcionales renales: para conocer el grado de compromiso de las funciones glomerular y tubular.

A las pruebas señaladas, se añadirán otras para llegar al diagnóstico de varias enfermedades sistémicas que comprometen al riñón: lupus eritematoso sistémico (LES), vasculitis, poliarteritis nodosa, microangiopatía trombótica, mieloma múltiple y amiloidosis.

## GLOMERULONEFRITIS AGUDA

La glomerulonefritis aguda, en su forma típica, sucede a las infecciones estreptocócicas. Se produce entonces una estimulación multifactorial del sistema inmune, que repercute en el glomérulo y en otras zonas del

tejido renal, lo que produce su inflamación. Dicha estimulación inmunológica parece obedecer a antígenos (incluye al ADN), virus, bacterias o proteínas de otros tejidos. La respuesta a tales antígenos puede estar dada por la formación de anticuerpos que actuarían contra el tejido glomerular o por la formación de inmunocomplejos y su posterior depósito en la nefrona. Hay varias formas clínicas de la enfermedad; pueden padecerlas los niños y los adultos (cuadro 2.5).

## INDICACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS ANÁLISIS DE LABORATORIO

El urianálisis constituye la base para el control evolutivo de las nefritis. El estudio de la proteinuria y de la depuración de la creatinina permite conocer la función residual renal. Los estudios bioquímicos como proteínas, albúmina, colesterol y electrolitos, debe realizarse de forma periódica desde el comienzo de la enfermedad. Con vistas a caracterizar las causas de la enfermedad, es obligatoria la indicación de las pruebas siguientes:

1. Componentes del complemento sérico: C3, C4, CH50.
2. Anticuerpos antinucleares (ANA), factor reumatoideo y velocidad de sedimentación eritrocitaria (VSG).
3. Título de anticuerpos antimembrana basal glomerular.
4. Estudios serológicos para hepatitis (B y C).
5. Anticuerpos anticitoplasma de los neutrófilos (ANCA) y título de antiestreptolisina O (TASO).

En los pacientes adultos con proteinuria por encima de 1 g/24 h, deben añadirse la inmunolectroforesis del suero y la electroforesis de proteínas en la orina para descartar la presencia de proteínas anormales.

## SÍNDROME NEFRÓTICO

El síndrome nefrótico es una enfermedad renal que se define por las alteraciones en tres componentes bioquímicos, cuyo hallazgo tiene carácter diagnóstico:

1. Proteinuria por encima de 35 g/24 h.
2. Hipoalbuminemia por debajo de 35 g/L.
3. Hipercolesterolemia por encima de 7 mmol/L.
4. Hipertrigliceridemia por encima de 3,5 mmol/L.

### Cuadro 2.5 Formas clínicas de la glomerulonefritis

Enfermedad de cambios mínimos
Glomerulonefritis membranosa
Glomerulonefritis mesangial IgA (enfermedad de Berger)
Glomerulonefritis membranoproliferativa
Glomerulonefritis segmentaria focal
Glomerulonefritis progresiva rápida
Glomerulonefritis aguda posinfecciosa

A las alteraciones lipídicas señaladas, se añaden el aumento de las VLDL y LDL, y la disminución de las HDL. Esta hiperlipidemia condiciona la aparición de lipiduria en forma de cilindros grasos y cuerpos ovales grasos y de células epiteliales cargadas de lípidos (Cruz de Malta).

El síndrome nefrótico puede constituir una afección primaria o tratarse de un trastorno secundario a otra enfermedad subyacente: enfermedades glomerulares primarias y secundarias, enfermedades metabólicas y hereditarias, infecciones, fármacos y neoplasias. En los trastornos secundarios se realizan las mismas pruebas que en las nefritis, con excepción de los ANCA y de los anticuerpos antimembrana basal glomerular.

La velocidad de sedimentación eritrocitaria (VSE) tiene gran valor en estas enfermedades. Se eleva marcadamente por el aumento del fibrinógeno, y su descenso constituye un índice de remisión de la fase aguda de la enfermedad.

La electroforesis de proteínas es muy típica, y muestra un patrón constituido por una marcada disminución del pico de la albúmina, así como de las gammaglobulinas, y un aumento marcado del pico correspondiente a las alfa globulinas.

## BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- Romero GR. Esquemas clínico-visuales en Patología Renal. Barcelona: Mosby, 1996.
- Siroki MB. Manual of Urology N. York: Little Brown and Comp., 1990.
- Speicher CE. Choosing effective laboratory tests Chicago: WB Saunders Comp., 1983.



## CONTENIDO

---

### **Hipófisis/ 165**

- Resumen de su anatomía y fisiología/ 165
- Estudio de los trastornos en la secreción de la hormona del crecimiento/ 166
- Estudio de los trastornos en la secreción de prolactina/ 166
- Estudio de los trastornos en la secreción de corticotrofina/ 167
- Estudio de los trastornos en la secreción de gonadotrofina/ 167
- Otras hormonas hipofisarias/ 167

### **Tiroides/ 167**

- Resumen de su anatomía y fisiología/ 167
- Metabolismo de las hormonas tiroideas/ 168
- Efectos específicos de las hormonas tiroideas/ 168
- Control de la secreción de las hormonas tiroideas: eje hipotálamo-hipófisis-tiroides/ 169
- Estudio de los trastornos de la función tiroidea/ 169
- Pruebas de la función tiroidea/ 171

### **Glándulas suprarrenales/ 172**

- Resumen de su anatomía y fisiología/ 172
- Trastornos de la función suprarrenal/ 173

### **Gónadas/ 177**

- Gónadas masculinas/ 177
- Trastornos testiculares/ 177
- Gónadas femeninas/ 177
- Hirsutismo/ 178
- Hiperandrogenismo e hiperinsulinemia/ 178
- Tumores productores de andrógenos/ 178
- Hirsutismo idiopático/ 179
- Hipogonadismo femenino/ 179
- Polisomía gonosómica X/ 180
- Síndrome de los ovarios resistentes/ 180
- Hipogonadismos primarios asociados con otros síndromes raros/ 180
- Exámenes complementarios/ 180

### **Bibliografía recomendada/ 181**

### Capítulo 19



## ALTERACIONES DE LABORATORIO EN LAS ENFERMEDADES DEL SISTEMA ENDOCRINO

Lic. Celia A. Alonso Rodríguez  
† Dr. Ph. Santiago Hung Llamas

### RESUMEN

Este capítulo está dedicado al estudio de las alteraciones del sistema endocrino. Se presenta un resumen de la anatomía y fisiología de la hipófisis, la tiroides, las glándulas suprarrenales y las gónadas; las alteraciones patológicas de la función de estas glándulas y el diagnóstico de ellas por el laboratorio clínico, basado en las determinaciones hormonales. No se incluye en este capítulo el estudio de los trastornos del páncreas endocrino, pues aparece en otro acápite de esta misma sección, dedicado al metabolismo de los carbohidratos.

### HIPÓFISIS

#### RESUMEN DE SU ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA

La glándula hipófisis está situada en la base del cráneo, mide 1 cm o menos, y pesa alrededor de 500 mg. Desde el punto de vista anatómico, está dividida en adenohipófisis y neurohipófisis, que también se conocen como los lóbulos anterior y posterior, respectivamente. Está irrigada por la arteria hipofisaria superior. La sangre venosa que traen las hormonas neurosecretores del hipotálamo, alcanza la hipófisis por la vía del sistema venoso portal. Estas hormonas hipotalámicas estimulan o inhiben la liberación de hormonas de la adenohipófisis.

La adenohipófisis sintetiza y segrega: la hormona del crecimiento (GH), la prolactina (PRL), la tirotropina (TSH), la adrenocorticotropina (ACTH), la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH). Todas ellas son proteínas o péptidos. También segrega  $\beta$ -lipotropina ( $\beta$ -LPH) y pequeños péptidos de significado aún indeterminado. La GH y la PRL actúan de forma primaria en tejidos blancos, mientras las otras hormonas trópicas actúan de forma primaria sobre glándulas endocrinas específicas.

La neurohipófisis produce y segrega la hormona antidiurética (ADH o vasopresina) y la oxitocina. La primera, responsable del control de la diuresis, y la pérdida o retención de líquidos y sales minerales por el riñón; mientras que la segunda ejerce un papel central en las contracciones uterinas durante el parto.

La secreción adenohipofisaria está controlada por el hipotálamo. Este sintetiza pequeños péptidos, que fueron llamados *factores liberadores o inhibidores de las hormonas trópicas*, pero que en la actualidad se denominan hormonas hipotalámicas. Ellos son: la hormona liberadora de corticotropina (CRH), la hormona liberadora de tirotropina (TRH), la hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH), la somatostatina u hormona inhibidora de la hormona del crecimiento (GHIH), la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), también llamada hormona liberadora de luteotropina (LHRH), y el factor inhibidor de prolactina, el cual se piensa que es la dopamina.

La CRH, la GHRH y la TRH se utilizan en pruebas de reserva hipofisaria, para determinar fallas de esta glándula. También se ha utilizado la GnRH en forma pulsátil para iniciar la pubertad, y para inducir la ovulación y la espermatogénesis en pacientes con infertilidad. Se han utilizado antagonistas de la GnRH para tratar pacientes

cuya pubertad sea precoz, o con endometriosis, fibrosis uterina y carcinoma prostático. La GHRH ha sido utilizada en el tratamiento de pacientes con deficiencia de la GH por defectos hipotalámicos.

Las neuronas que elaboran las hormonas hipofisiotropas, están ellas mismas influenciadas por los neurotransmisores, tales como: dopamina, norepinefrina, serotonina, acetilcolina y endorfinas, que también modifican la actividad secretora de las hormonas adenohipofisarias. Las secreciones basales y episódicas, el ritmo circadiano y la liberación nocturna de las hormonas hipofisarias, son consideradas secundarias a la actividad del sistema nervioso central (SNC), que son mediadas por las hormonas hipotalámicas.

El control de la relación funcional entre la glándula hipofisaria y sus células blanco está basado, en principio, en una retroalimentación negativa de las glándulas blanco sobre la hipófisis y el hipotálamo. El efecto del retrocontrol negativo es opuesto al estímulo inicial, y lo anula. La importancia de este retrocontrol negativo radica en el mantenimiento de una concentración óptima de hormonas en la sangre, bajo una gran variedad de circunstancias fisiológicas.

La mayoría de las hormonas son medidas por radioinmunoensayo u otros inmunoensayos similares, puesto que todas se encuentran en muy pequeñas concentraciones en la sangre.

## ESTUDIO DE LOS TRASTORNOS EN LA SECRECIÓN DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO

La hormona del crecimiento (GH) tiene un importante papel en el crecimiento y el desarrollo de los seres humanos, pero también en el metabolismo intermedio. Se libera de manera secundaria a estímulos como el ejercicio físico, el sueño profundo, la hipoglicemia y la ingestión de proteínas. También estimula la producción de ARN, moviliza los ácidos grasos de los adipocitos, y está interconectada con la acción insulínica en el metabolismo de los carbohidratos.

Los principales trastornos asociados con las alteraciones de la secreción de esta hormona, son la acromegalia y el gigantismo; ambas debidas a un exceso de la hormona, por lo general de origen tumoral. La primera se presenta en la edad adulta, cuando los huesos no aumentan en largo, y crecen sobre todo las extremidades (manos y pies) y la mandíbula, así como las partes cartilaginosas (nariz, arcos superciliares, entre otras). El gigantismo es el exceso de la GH en la edad juvenil o adolescencia, y este estímulo exagerado de hormona lleva a un crecimiento exagerado de los huesos.

Los valores de referencia en adultos son: menor que 5 ng/mL en hombres, y menor que 10 ng/mL en mujeres.

Existen pruebas de estimulación (ya se hizo referencia a la GHRH) para evaluar la deficiencia de la GH. Se utilizan, además, pruebas de ejercicios físicos, monitoreo durante el sueño, evaluación de la respuesta a la insulina, de la prueba de tolerancia a la glucosa, a la estimulación con glucagón, L-Dopa, clonidina, diazepam y pentagastrina, entre otras. Todas ellas para evaluar el incremento de respuesta de la GH a los estímulos.

Se han descrito interferencias asociadas con el tratamiento con estrógenos (niveles aumentados) y con corticoides (niveles disminuidos), así como con la obesidad (concentraciones séricas menores de GH).

La dosificación de somatomedina C es poco utilizada en la práctica diaria. Más bien se utiliza para confirmar o para negar una hipofunción hipofisaria con respecto a la hormona del crecimiento.

Los valores esperados en adultos oscilan entre 42 y 110 ng/mL, y el rango superior puede ser hasta el doble en los jóvenes y adolescentes.

Los niveles altos se asocian con acromegalia, y los disminuidos con enanismo, hipopituitarismo, hipotiroidismo, malnutrición y cirrosis hepática.

## ESTUDIO DE LOS TRASTORNOS EN LA SECRECIÓN DE PROLACTINA

La prolactina (PRL) es similar a la GH en su estructura, así como en la particularidad de actuar sobre tejidos y no sobre otras glándulas endocrinas. Su secreción se encuentra bajo el control hipotalámico, y estimulada por la TRH e inhibida por la dopamina. Esta secreción es episódica y varía de manera predecible durante el día, con valores inferiores hacia el mediodía, y los más altos, en la etapa de sueño profundo.

El mayor estímulo para la secreción de PRL es la succión del pezón mamario de la mujer. Muchos otros estímulos inducen la liberación de PRL, probablemente por la supresión de la secreción de dopamina del hipotálamo: el estrés es uno de los más importantes. Otro estímulo importante es la hiperosmolalidad plasmática, mientras que la hiposmolalidad reduce la concentración de la PRL. También parece existir una autorregulación de la secreción de la PRL, el llamado lazo corto de la regulación, relacionado con su acción y degradación intracelular.

La significación clínica de los valores elevados de prolactina está relacionada, sobre todo, con la infertilidad, y esta se discute en la sección de gónadas; por tanto, en esta ocasión solo se hará referencia a las enfermedades hipofisarias.

La hiperprolactinemia está presente en muchos trastornos, tales como: galactorrea, amenorrea, trastornos de la comunicación hipotálamo-hipófisis, tumores secretores de PRL, acromegalia, producción de tumores malignos ectópicos, hipotiroidismo, insuficiencia renal y anorexia nerviosa, entre otros.

Los valores de prolactina esperados en el hombre son de menos de 20 ng/mL y en la mujer, de menos de 40 ng/mL. La embarazada presenta valores aumentados de menos de 400 ng/mL en el tercer trimestre.

Existen factores fisiológicos que interfieren en sus valores, como el nacimiento, el embarazo, tras el parto, el estrés, el ejercicio físico, el sueño, la lactancia y la estimulación de los pezones. También algunas drogas pueden aumentar los valores, como el uso de estrógenos, metildopa, antidepresivos tricíclicos, fenotiazinas y antihipertensivos, mientras que otras drogas pueden inhibir la secreción de esta hormona.

## ESTUDIO DE LOS TRASTORNOS EN LA SECRECIÓN DE CORTICOTROFINA

La dosificación de corticotrofina (ACTH) se utiliza para confirmar la hipersecreción cuando se sospecha de síndrome de Cushing de origen hipofisario, o de su deficiencia en una insuficiencia adrenal, de posible causa secundaria. Es mucho más utilizada como estímulo para evaluar la secreción de cortisol.

## ESTUDIO DE LOS TRASTORNOS EN LA SECRECIÓN DE GONADOTROFINA

Las gonadotrofinas FSH y LH son secretadas por las células gonadotropas del lóbulo anterior. En las mujeres, la FSH estimula el crecimiento de los folículos ováricos y, en presencia de LH, promueve la secreción de estrógenos por los folículos maduros. La LH provoca la salida del óvulo del folículo ovárico, antes estimulado por la FSH. Tras la ovulación, también la LH influye en la transformación del folículo roto en el cuerpo lúteo y en su secreción de progesterona.

En los hombres, la FSH estimula la espermatogénesis, y la LH es responsable de la producción de testosterona en las células de Leydig de los testículos. La regulación de la LH y la FSH en los trastornos reproductivos se discute en el acápite sobre las gónadas.

## OTRAS HORMONAS HIPOFISARIAS

La TSH o tirotropina es secretada por las células tiotropas. Es una glicoproteína como la FSH y la LH,

y su función principal es regular la función tiroidea: la síntesis y la secreción de sus hormonas. Su dosificación y significado clínico se trata en el acápite sobre la tiroides.

Las hormonas de la neurohipófisis rara vez se utilizan en la rutina. En el caso de la ADH, se utiliza para confirmar un diagnóstico de diabetes insípida, debida a un defecto de ADH. Este trastorno ocurre, por lo general, secundario a enfermedades neoplásicas, a neurocirugías, a traumas craneales, a desórdenes hipóxicos o isquémicos, a infecciones graves o a enfermedades autoinmunes. La oxitocina es utilizada como agente terapéutico inductor del trabajo de parto. Su dosificación no se emplea en la rutina.

Las  $\beta$ -endorfinas, así como la lipotropina son también poco usuales en la rutina del laboratorio. Más bien se utilizan con fines investigativos en experimentos con animales: las  $\beta$ -endorfinas, para evaluar medicamentos con acción neurotrópica, y la lipotropina, para los lipolíticos.

## TIROIDES

### RESUMEN DE SU ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA

La tiroides es una glándula que pesa de 15 a 20 g en adultos normales, con gran capacidad de crecimiento potencial. Está constituida por dos lóbulos, unidos por una banda llamada istmo. Ambos lóbulos están situados en las caras laterales del cartílago tiroideo.

La tiroides se origina como un brote en el piso de la faringe, que crece hacia abajo en dirección a la tráquea, se bifurca y forma varios cordones celulares. La estructura histológica básica de la tiroides es el folículo, cuya pared está constituida por una sola capa continua de células epiteliales de altura variable, según la situación funcional. Cada folículo puede representar un clon individual de células, que se hacen columnares cuando son estimuladas por la TSH y se aplanan cuando están en reposo.

El folículo es también la unidad funcional tiroidea. Sus células tienen un altísimo grado de diferenciación funcional, pues son capaces de concentrar yodo e incorporarlo a una proteína específica: la tiroglobulina, la cual es sintetizada por el propio folículo y se acumula en su interior en forma de coloide.

La función principal de la glándula tiroides es secretar L-tiroxina (T4) y 3,5,3'-triyodo-L-tironina (T3), aminoácidos yodados que son las hormonas tiroideas activas y que influyen en varios procesos metabólicos.

En la tiroides hay también un grupo celular llamado células parafoliculares o células C, que sintetizan la hormona calcitonina, la cual es importante en la homeostasia del calcio.

El coloide folicular que contiene moléculas de tiroglobulina, es incorporado al interior de la célula por un fenómeno de endocitosis, que ocurre en el polo apical de la célula folicular. Se transporta por microtúbulos y microfilamentos hacia el polo basal, y durante este transporte ocurre la hidrólisis, que da lugar a la formación de monoyodotirosina (MIT), diyodotirosina (DIT), T4 y T3. En condiciones normales, las yodotirosinas se desyodan para reutilizar el yoduro, y las yodotironinas, T4 y T3, se liberan a la circulación.

## METABOLISMO DE LAS HORMONAS TIROIDEAS

La producción diaria de T4 es de 80 a 100  $\mu\text{g}$  y se deriva de la secreción tiroidea. La síntesis diaria de T4 es del orden del 10 % de las hormonas producidas en la tiroides; por tanto, la T4 permanece disponible durante varios días aun en ausencia de una nueva secreción. Aproximadamente el 80 % de T4 se metaboliza por desyodación, el 50 % lo hace a T3 y el otro 50 % a T3 reversa (rT3).

La T3 es producida sobre todo (80 %) por desyodación extratiroidea de T4; el otro 20 % es segregado de manera directa por la tiroides. La síntesis diaria de T3 es de 30 a 40  $\mu\text{g}$ . La T3 es degradada mucho más rápido que la T4, y su recambio diario es de 75 %, aproximadamente.

Casi todos los tejidos son capaces de transformar T4 a T3 en el propio tejido, factor más importante en la acción local de las hormonas tiroideas. La producción de rT3 en su mayoría es también extratiroidea, por lo que constituye más del 90 % de los 30 a 40  $\mu\text{g}$  que se producen cada día de esta manera. La rT3 desaparece muy rápido de la circulación y se degrada también con rapidez en los tejidos.

Cuando penetran en la sangre, casi toda la T4 y la T3 se combinan de inmediato con varias proteínas plasmáticas: dos tercios con globulina fijadora de T4 que es una glucoproteína, la cuarta parte con prealbúmina fijadora de T4 y la décima parte con albúmina. La cantidad de globulina fijadora de T4 en la sangre solo es de 1 a 1,5 mg/dL de plasma, pero su afinidad por las hormonas tiroideas es tan grande que todavía fija la mayor parte de las hormonas. Su afinidad (y la de otras proteínas del plasma) es 10 veces mayor para la T4 que para la T3. Debido a esta diferencia y a que

la concentración de T4 en el plasma es mucho mayor que la de T3, la cantidad de T4 unida a proteínas es 60 veces mayor que la de T3 unida a proteínas.

Dada la gran afinidad de las proteínas plasmáticas fijadoras para las hormonas tiroideas, estas sustancias –en particular la T4– se liberan hacia las células hísticas con gran lentitud. La mitad de la T4 de la sangre pasa a las células hísticas cada 6 días, mientras que la mitad de la T3 –por su menor afinidad– es liberada hacia las células en 1,3 días. Al penetrar en las células, ambas hormonas vuelven a fijarse a proteínas intracelulares: la T4 con más fuerza que la T3. Como consecuencia, vuelven a quedar almacenadas, pero esta vez en las propias células funcionales, y se utilizan en forma lenta durante días o semanas.

La T4 y la T3 entran en las células para ser metabolizadas y efectuar en ellas sus acciones biológicas. Parece que el paso al interior celular ocurre primero por difusión o por difusión facilitada, pues aunque no se ha podido demostrar la existencia de receptores específicos en la membrana citoplasmática, sí hay proteínas que se unen de manera selectiva a estas hormonas. La T3 que se produce en las células de los tejidos periféricos, puede ser exportada a la circulación o ligarse al receptor nuclear para iniciar su acción biológica.

Dado que la T3 se produce, en lo fundamental, en tejidos periféricos, se liga con menor intensidad a proteínas transportadoras séricas, y se une, en cambio, con mayor afinidad, a receptores intracelulares. Se puede considerar que la T3 es una hormona de predominio intracelular si se compara con la T4.

## EFFECTOS ESPECÍFICOS DE LAS HORMONAS TIROIDEAS

De manera resumida, los efectos específicos de las hormonas tiroideas son:

1. Aumentan el tamaño y número de las mitocondrias.
2. Aumentan la cantidad de ATP, ajustan el acople entre la peroxidación oxidativa y la cadena de transporte electrónico.
3. En el crecimiento, estimulan la proliferación de células óseas y la maduración de los huesos.
4. Estimulan el metabolismo de los carbohidratos, ya que aumentan la síntesis de enzimas glucolíticas y la secreción de insulina.
5. En el metabolismo lipídico, facilitan la movilización de los lípidos en el tejido adiposo, aumentan el número de ácidos grasos libres en el plasma y aceleran la degradación de estos ácidos grasos.

6. En el metabolismo de vitaminas, aumentan la necesidad vitamínica de forma indirecta, porque se estimula la síntesis de enzimas que requieren vitaminas.
7. Aumentan el metabolismo basal, ya que estimulan los procesos metabólicos.
8. Influyen sobre el peso corporal: si existe un desbalance en la secreción hormonal, el individuo puede aumentar o bajar de peso, como es el caso de los hipotiroides e hipertiroides.
9. Actúan sobre el corazón y el sistema vascular: al aumentar el consumo de oxígeno, aumentan las concentraciones de  $\text{CO}_2$  intracelular, el cual es removido. Esto provoca vasodilatación y un aumento del flujo sanguíneo.
10. Actúan sobre el sistema respiratorio: al aumentar las concentraciones de  $\text{CO}_2$ , disminuye el pH de los fluidos extracelulares (aumento de los iones bicarbonatos), y esto provoca un aumento en el ritmo respiratorio.
11. Actúan sobre el sistema nervioso central, ya que aumentan la transmisión de los estímulos nerviosos.
12. Actúan sobre el sistema gastrointestinal, al aumentar la motilidad y la secreción de los jugos gástricos.
13. Aumentan el tono muscular, ya que aumentan la estimulación por sinapsis.

Como puede verse, estas hormonas intervienen en el crecimiento y maduración de los tejidos, en el gasto de energía y en el metabolismo de casi todos los sustratos, vitaminas y hormonas, y de las propias hormonas tiroideas. Aún son dudosos los mecanismos por los que se inician estos efectos; pero parecen actuar de manera coordinada en el núcleo, donde alteran la expresión del genoma; en las mitocondrias, donde influyen en el metabolismo oxidativo; y en la membrana, donde afectan el flujo transcelular de sustratos y cationes.

### CONTROL DE LA SECRECIÓN DE HORMONAS TIROIDEAS: EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-TIROIDES

El eje hipotálamo-hipófisis-tiroides es el único en el que intervienen tres niveles hormonales sucesivos. El hipotálamo, por la secreción de transtiretina (TRH), activa la liberación de tirotropina (TSH), la cual estimula las células foliculares, para sintetizar hormonas tiroideas (T3 y T4). Estas ejercen sus acciones biológicas en los tejidos periféricos del organismo y cierran el circuito al inhibir la liberación de TSH en la hipófisis. La administración intravenosa de TRH, provoca una

respuesta secretoria de TSH significativa, que indica que las células tireotropas funcionan de manera normal. Las concentraciones elevadas de hormonas tiroideas intervienen, en la hipófisis, con la secreción de TSH: primero la bloquean, y luego inhiben la secreción hipotalámica de TRH.

Este es un modelo característico de sistema de autorregulación negativa (*negative feedback*), en el que el factor principal que el sistema intenta mantener son los niveles de hormonas tiroideas (L-tiroxina o T4 y L-triyodotironina o T3). Los componentes fundamentales del sistema son: la tiroides, capaz de segregar estas hormonas tiroideas; la hipófisis, responsable de la secreción de TSH; y el hipotálamo y áreas cerebrales, que regulan la secreción de TSH hipofisaria y segregan péptidos como TRH y somatostatina, que regulan la TSH y, a través de esta, la función de la tiroides. El nivel predominante de regulación es la TSH, sobre cuya síntesis y liberación, las hormonas tiroideas tienen un efecto inhibitorio, y el TRH hipotalámico, un efecto estimulador. También la somatostatina hipotalámica tiene alguna acción inhibitoria sobre la secreción de TSH.

### ESTUDIO DE LOS TRASTORNOS DE LA FUNCIÓN TIROIDEA

Las enfermedades de la glándula se manifiestan por alteraciones cualitativas o cuantitativas de secreción hormonal, aumento de tamaño (bocio), o ambos. La secreción insuficiente de hormona produce hipotiroidismo o mixedema, y tiene como característica principal un gasto calórico disminuido (hipometabolismo). A la inversa, la secreción excesiva de la hormona produce hipermetabolismo y otras manifestaciones de un síndrome denominado hipertiroidismo o tirotoxicosis.

**Hipertiroidismo.** En un paciente con hipertiroidismo aparece el tiroides hiperplásico aumentado hasta el doble o el triple de su volumen normal y la secreción de hormonas tiroideas aumenta con un ritmo de 5 a 15 veces mayor que el normal. Las concentraciones de TSH están disminuidas y a veces son casi nulas. En la sangre de muchos pacientes hipertiroides aparecen otras sustancias con acción similar a la TSH. Son globulinas con acción de anticuerpos, que se unen con los receptores de TSH de las membranas tiroideas e inducen la activación continua de los tirocitos. Esta anomalía también puede presentarse por la presencia de un adenoma hiperfuncionante localizado, que se desarrolla en el tejido tiroideo y secreta grandes cantidades de hormonas.

**Hipotiroidismo.** Muchas anomalías estructurales y funcionales pueden ser la causa de una producción deficiente de hormonas: pérdida o atrofia del tejido tiroideo (hipotiroidismo tiroprivo o primario), estimulación deficiente de una glándula intrínsecamente normal (hipotiroidismo hipofisario o secundario), y enfermedad de naturaleza bioquímica (hipotiroidismo bocioso).

En el hipotiroidismo, las concentraciones de T3 y T4 son bajas. En el hipotiroidismo primario, la concentración de TSH circulante es elevada en un intento por estimular la glándula tiroidea hipoactiva. En el secundario, las concentraciones de TSH son bajas.

**Síndrome de T3 baja.** El término hipotiroidismo denota el síndrome que se produce por un inadecuado aporte de hormonas tiroideas activas, a los tejidos periféricos. El término indica una falla de la producción de hormonas dentro de la glándula tiroidea. Sin embargo, en los individuos eutiroides, la hormona T3 más activa es, en lo fundamental, generada por enzimas en los tejidos periféricos. Este proceso se inhibe en muchas situaciones anormales designadas de manera genérica como síndrome de la T3 baja. Por eso, es posible que en estas circunstancias, el aporte de hormonas tiroideas activas a los tejidos sea inadecuado, y las funciones dependientes de ellas se depriman, a pesar de que no haya una lesión en el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides.

El máximo interés actual de algunos estudios está centrado en la amplia variedad de circunstancias en las que la conversión de T4 en T3 y la concentración plasmática de T3 están disminuidas, debido a una disminución de la actividad de 5' monodeshidrogenasa para la T4, por lo menos en ciertos tejidos. Todas ellas se agrupan bajo el nombre genérico de *síndrome de T3 baja*, caracterizado por concentraciones bajas de T3, en presencia de niveles normales o ligeramente elevados de T4 total y libre, lo cual indica que existe una disminución en la producción total de T3. Este síndrome se asocia con desnutrición, pérdida de carbohidratos, diabetes no controlada, enfermedad hepática crónica, enfermedades sistémicas agudas y crónicas, traumatismos, cirugía o anestesia. Algunos agentes farmacológicos afectan también la conversión periférica de T4 en T3 y producen el síndrome, entre ellos: el PTU, corticoides a dosis altas, propranolol, amiodarona y ciertos contrastes radiológicos como el ácido yopanoico. En el caso del PTU y del propranolol, este efecto puede contribuir a su acción beneficiosa, en el tratamiento del hipertiroidismo y, por razones similares, los corticoides y los contrastes yodados pueden ser útiles en las mismas circunstancias.

A menudo, aunque el nivel sérico de T3 está dentro de los límites hipotiroideos, la presentación clínica

del mixedema no es inmediata, requiere tiempo. Como por lo general en estos pacientes el nivel sérico de T4 es normal o ligeramente elevado, esto puede ser lo que impida las manifestaciones clínicas de hipotiroidismo. Los niveles séricos de TSH (que pueden ser normales o elevados) no tienen correlación aparente con las concentraciones séricas de T4 o de T3. El significado de estos cambios de la circulación hormonal todavía no está aclarado y es necesario esperar a que aparezcan nuevos estudios.

Desde el punto de vista del diagnóstico clínico, la categoría más importante de las alteraciones que inhiben la T3-neogénesis es la comprendida bajo el nombre de enfermedad sistémica. De todas maneras, es muy probable que cualquier enfermedad aguda o crónica de suficiente intensidad, así como los traumatismos accidentales o quirúrgicos, produzcan este efecto: disminuyan la concentración sérica de T3 y aumenten la de rT3.

**Bocio simple, difuso y multinodular.** Se trata de un agrandamiento de la glándula tiroidea; es decir, un excesivo crecimiento y la transformación estructural y funcional de una o de varias áreas dentro del tejido tiroideo normal. Pueden distinguirse dos tipos: en el primero, la tiroides contiene un solo nódulo o varios nódulos similares; en el segundo, toda la glándula está alterada y se aprecian muchos nódulos de diversos tamaños y estructuras.

El bocio no tóxico es una respuesta compensatoria a factores que afectan la eficacia de la tiroides, para producir cantidades adecuadas de hormonas. Su acción provoca la estimulación del crecimiento tiroideo. Las manifestaciones clínicas son escasas: la mayoría de las veces los efectos son estéticos y también pueden producir una sensación de estrechez traqueal.

**Cáncer de la tiroides.** Las neoplasias de la glándula tiroidea son potencialmente letales. Por esa razón, están justificados todos los esfuerzos encaminados a proporcionar un diagnóstico definitivo de cualquier lesión que pueda sugerir el tratamiento apropiado.

El comportamiento de estos tipos histológicos es distinto y también lo es la terapéutica. Aproximadamente el 90 % de los carcinomas tiroideos son diferenciados. La diseminación de las neoplasias tiroideas depende de su anatomía. Las neoplasias papilares o papilofoliculares bien diferenciadas, de bajo grado de malignidad, tienden a diseminarse hacia los ganglios linfáticos regionales, pero rara vez presentan metástasis a distancia. En las lesiones papilofoliculares en las que puede demostrarse la presencia de invasión vascular, en especial en el tipo folicular puro, son comunes las metástasis a distancia.

En la mujer, la incidencia del cáncer de tiroides es más del doble (0,7 %) que en el hombre (0,2 %). En casi todos los casos aparece entre los 25 y los 65 años de edad.

La mayoría de los tumores tiroideos malignos derivan de las células foliculares y parafoliculares. El carcinoma que se origina de las células parafoliculares es el medular y los que se originan de células foliculares son de dos tipos: tumores diferenciados de las glándulas (que son el carcinoma folicular, el adenocarcinoma papilar y el carcinoma de células de Hurtle) y los indiferenciados o anaplásicos.

## PRUEBAS DE LA FUNCIÓN TIROIDEA

La forma más directa de evaluación del estudio funcional de la tiroides, es la medida en plasma de las concentraciones de las hormonas secretadas por la glándula: T3 y T4, así como de la hormona contrarreguladora TSH. Ante una duda en el diagnóstico, pueden realizarse también pruebas funcionales como la estimulación con TRH, para medir la secreción de TSH, y la captación de  $^{131}\text{I}$  por la glándula, para medir la incorporación del radiofármaco a esta.

**Dosificación de T4.** Por lo general se realiza por radioinmunoensayo o técnicas afines. Es el primer análisis indicado en la evaluación de la función tiroidea, pues con frecuencia esta simple dosificación responde a la incertidumbre diagnóstica.

Los valores de referencia para adultos sanos, oscilan entre 70 y 150 nmol/L; en niños, el rango es de 90 a 190 nmol/L.

Los factores que interfieren son:

1. Los niveles de tiroxina aumentan a partir del segundo o tercer mes del embarazo, como resultado del incremento en la producción de estrógenos.
2. También aumentan con el uso de drogas como los estrógenos y los anovulatorios.

Se presentan valores aumentados en:

1. Hipertiroidismo.
2. Tiroiditis aguda.
3. Tiroiditis subaguda.
4. Hepatitis (al comienzo de la enfermedad).

Se presentan valores disminuidos en:

1. Cretinismo.
2. Mixedema.
3. Hipotiroidismo.
4. Tiroiditis crónica.
5. Tiroiditis subaguda.
6. Enfermedad de Simmonds.
7. Nefrosis.
8. Cirrosis hepática.
9. Hipoproteinemia.
10. Malnutrición.

**Dosificación de T3.** Esta hormona también se dosifica por inmunoensayos. Los valores de referencia son de 1,86 a 3 nmol/L para adultos; y en niños, de 1,4 a 3,7 nmol/L.

Los valores aumentados están asociados con:

1. Hipertiroidismo.
2. T3 tirotoxicosis.
3. Administración de la hormona.
4. Tiroiditis aguda.
5. Elevación idiopática de la TBG.
6. Administración de gran dosis de tiroxina.

Los valores disminuidos se asocian con:

1. Hipotiroidismo (sin embargo, algunos pacientes presentan valores normales).
2. Estado crítico.
3. Decrecimiento idiopático de la TBG.
4. Enfermedades agudas.

Los factores que interfieren son:

1. Los valores se incrementan en el embarazo y con el uso de hormonas tales como: estrógenos y compuestos anovulatorios.
2. Los valores aparecen deprimidos con el uso de drogas como: esteroides anabolizantes, andrógenos, grandes dosis de salicilatos y fenitoína.

**Dosificación de TSH.** Esta técnica también se realiza por inmunoensayos. Los valores esperados para adultos son de 0,8 a 4 mU/L, y en los niños pueden estar ligeramente más elevados.

Los factores que interfieren son:

1. Los valores son altos en los neonatos, y vuelven a ser valores normales hacia las 2 semanas de vida.
2. Los valores aparecen suprimidos durante el tratamiento con T3, aspirina, corticoesteroides y heparina.
3. Están elevados de manera anormal en la terapia con litio, yoduro de potasio o en el uso de TSH inyectable.

Las implicaciones clínicas son:

1. Los valores incrementados se observan en adultos y en neonatos con hipotiroidismo primario.
2. Los valores disminuidos se asocian con hipertiroidismo o con hipotiroidismo secundario o terciario.

**Pruebas dinámicas.** La prueba de TRH puede ser utilizada cuando hay valores bajos de TSH, con síntomas de hipotiroidismo, para descartar si existe hipotiroidismo secundario o terciario. Luego de haber extraído 5 mL de sangre para el valor basal, se inyectan



de 200 a 400 µg de TRH por vía intravenosa, y luego se procede a realizar extracciones cada 30 minutos, hasta las 2 horas, y se dosifican todas las muestras para TSH.

Si los valores de TSH no aumentan o muestran un pequeño incremento, es indicativo de un hipertiroidismo. Un aumento de 5 a 10 veces el valor basal, y si se alcanza de nuevo este valor a las 2 horas, se considera una respuesta normal. Si el aumento de TSH a los 30 minutos es inferior a 5 veces el valor basal, se considera una respuesta disminuida, que indicaría un hipotiroidismo secundario; y si fuera superior a 10 veces el valor basal, se considera una hiperrespuesta, lo que demostraría un hipotiroidismo terciario.

**Captación de yodo  $^{131}\text{I}$ .** Es un complemento necesario para medir la fisiología glandular, pues cuando se mide la captación del radiofármaco, se puede evaluar la capacidad de captación del yodo y su internalización normal en el tiroides. Los valores de referencia son del 5 al 15 % de la dosis recibida a las 2 horas, y hasta el 45 %, a las 24 horas. En los pacientes que presentan una captación aumentada, se les calcula la vida media del radiofármaco, y se evalúa la captación de la glándula durante 2, 3 y 4 días consecutivos.

#### Otras pruebas para comprobar la función tiroidea

**Dosificación de TBG.** Esta proteína es la transportadora principal de las hormonas tiroideas. Su dosificación pudiera eliminar el factor genético de un exceso o déficit de proteínas transportadoras, expresado en un aumento o disminución de la tiroxina total en el plasma, sin síntomas clínicos de hipotiroidismo o de hipertiroidismo. Los valores de referencia en adultos son de 15 a 34 mg/L.

**Dosificación de tiroglobulina.** Esta proteína es exclusivamente intratiroidea. Su dosificación sirve, por tanto, para dos fines principales: en los casos de tiroiditis, como expresión del nivel de daño glandular, y cuando se ha realizado una tiroidectomía total por un carcinoma diferenciado de la tiroides, en que se procede a medir la tiroglobulina para detectar la posible presencia de metástasis. Está también aumentada en pacientes con grandes bocios y con hipertiroidismo. Los valores de referencia en adultos son menores que 50 ng/mL.

**Dosificación de calcitonina.** Este ensayo se usa en el diagnóstico diferencial del cáncer de tiroides. Los valores están elevados en el carcinoma medular (tumores malignos de las células C) y, de manera ocasional, en pacientes con otros tumores, y en algunos estadios de la insuficiencia renal. Los valores de referencia en adultos son: menores que 19 ng/L o pg/mL en hombres, y menores que 14 ng/L o pg/mL en mujeres.

## GLÁNDULAS SUPRARRENALES

### RESUMEN DE SU ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA

Las glándulas adrenales o suprarrenales, en número de dos, localizadas a la izquierda y a la derecha de la línea media, sobre los polos superiores renales, están compuestas por dos estructuras, diferentes desde el punto de vista embriológico: la corteza, originada del mesodermo y la médula, del ectodermo. La capa cortical, ya identificable de la cuarta a la sexta semana de vida fetal, está constituida por una camada de células inmaduras en plena actividad mitótica. Cerca de la séptima semana, este córtex primitivo o fetal ya muestra una diferenciación bioquímica, capaz de garantizar la captación de colesterol o su síntesis a partir del acetato y la formación de algunos esteroides. En este período predomina la actividad de la vía dependiente de 17 hidroxilasa, y es muy poca la actividad de las vías dependientes de la 21 y 11 hidroxilasas.

La corteza adulta está desarrollada del todo en el tercer año de vida. Desde el punto de vista histológico y funcional, está dividida en tres zonas, cada una especializada para la síntesis de un grupo de esteroides: capa glomerular, más externa, constituye el 15 % de la corteza, responsable de la síntesis de los mineralocorticoides, de los cuales el más importante es la aldosterona; la capa fascicular, intermedia, que ocupa el 78 % de la corteza, especializada en la síntesis y secreción de los glucocorticoides, de los cuales el cortisol es el principal; y la capa reticular, más interna, que corresponde al 7 % de la corteza, responsable de la síntesis de dos andrógenos adrenales: la dehidroepiandrosterona (DHEA) y su forma sulfatada (DHEAS).

La corteza adrenal tiene su función controlada por el eje hipotálamo-hipofisario, a través de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y la corticotropina (ACTH), por lo que mantienen una retroalimentación negativa. Este control es de suma importancia para la secreción de cortisol: el único esteroide endógeno que tiene influencia directa sobre el aumento de la retroalimentación. El control de la síntesis de esteroides, por parte de las otras capas, en particular la síntesis de aldosterona, depende de un conjunto de factores, de los cuales el conjunto CRH-ACTH es, tal vez, de los de menor importancia.

Las células de la médula adrenal, a pesar de haber sido separadas del desenvolvimiento neuronal, y que se diferenciaron como células endocrinas, poseen estrecha relación con el sistema nervioso central, por medio de las fibras simpáticas preganglionares, provenientes de neuronas localizadas en

las columnas intermediolaterales de la médula espinal, al nivel de T10 a L1-L2.

En esencia, la médula adrenal es un ganglio simpático, cuyas células posganglionares pierden sus axones y se especializan en secretar sus productos de manera directa a la circulación sanguínea. De conjunto con el sistema nervioso simpático, la médula adrenal compone, desde el punto de vista anatómico y funcional, la unidad simpático-adrenomedular.

Las adrenales normales contienen cerca de 6 mg de catecolaminas; es decir, el 85 % de estas, representado por la adrenalina. A partir de su origen, la adrenalina y la noradrenalina son detectables en la sangre y en la orina del ser humano.

## TRASTORNOS DE LA FUNCIÓN SUPRARRENAL

**Síndrome de Cushing.** Es el conjunto de manifestaciones clínicas originadas por el exceso crónico de glucocorticoides de origen endógeno, conocido como yatrógeno, debido al tratamiento con corticoides.

En la anamnesis y la exploración física es característica la existencia de cara de “luna llena”, hirsutismo y obesidad truncal. La fragilidad capilar, las estrías cutáneas típicas, la miopatía y los efectos androgénicos son los síntomas más sugestivos del síndrome de Cushing. Se instaura de forma progresiva, excepto en el caso del carcinoma adrenal y de la producción ectópica de ACTH, en que el desarrollo es rápido y grave. Existen datos clínicos que sugieren causas específicas, por ejemplo, la hiperpigmentación presente en el caso de la producción ectópica de ACTH.

### Pruebas complementarias

1. Diagnóstico sindrómico: entre los datos de laboratorio, la analítica de rutina rara vez es de utilidad; aunque algunas anormalidades pueden sugerir el diagnóstico, tales como: hiperglucemia, hipopotasemia, hipernatremia y alcalosis metabólica. Más útiles para el diagnóstico son determinadas pruebas de detección inicial:

a) Prueba de Nugent o supresión con 1 mg de dexametasona (DXM): en sujetos con normalidad funcional del eje hipófisis-suprarrenal, la DXM suprime la liberación de la hormona corticotrópica (ACTH) y, de manera secundaria, la secreción de cortisol. Se administra 1 mg de DXM por vía oral a las 23 horas y se mide el cortisol plasmático a las 8 horas del día siguiente. Si es menor que 5 µg/dL, existe

supresión y, por tanto, se excluye el síndrome de Cushing. Presenta sensibilidad del 98 % y existen falsos positivos (del 20 al 30 %): obesidad, alcoholismo, depresión o anorexia nerviosa, fármacos (difenilhidantoína, fenobarbital), estados de hiperestrogenismo (gestación, terapia con estrógenos y anticonceptivos orales), hipertiroidismo, enfermedad crónica o aguda grave e insuficiencia renal crónica.

b) Cortisol libre en orina de 24 horas (CLU): cuando es mayor que 200 µg/24 h indica exceso de cortisol. Existen falsos positivos (del 20 al 30 %) como: estrés físico y psíquico, depresión y alcoholismo, y también falsos negativos (del 5 al 10 %). Ambas pruebas positivas proporcionan el diagnóstico del síndrome de Cushing. Si los resultados son dudosos se deben emplear:

c) Prueba de Liddle débil o supresión con dosis baja de DXM: se administran 0,5 mg/6 h de DXM por vía oral durante 2 días. Se miden los 17 hidroxicorticosteroides (17-OH) en orina de 24 horas (normal: menor que 4 µg/24 h), el CLU (normal: menor que 20 µg/24 h) y el cortisol plasmático (normal: menor que 5 µg/dL). Los falsos positivos son los mismos que en la prueba de Nugent.

d) Ritmo de cortisol: se considera normal un valor de 5 a 25 µg/dL a las 8 horas, 5 µg/dL a las 23 horas y un ritmo de secreción mayor del 50 %. Aunque la falta de ritmo es una característica del síndrome de Cushing, también suele ocurrir en estados de “seudocushing”, como estrés físico y psíquico, enfermedad orgánica o psíquica, infecciones y alcoholismo, entre otros.

### 2. Diagnóstico de las causas:

a) ACTH plasmática basal: se puede determinar por RIA o por IRMA (más sensible y específico, pues no se detectan moléculas ACTH-like). Su valor normal es de 20 a 80 pg/mL por RIA o de 10 a 50 pg/mL por IRMA. Unos niveles bajos o indetectables indican hipersecreción adrenal, y si son normales o elevados, sugieren síndrome de Cushing ACTH-dependiente (enfermedad de Cushing si la ACTH está elevada de forma moderada, y producción ectópica si la ACTH es mayor que 200 pg/mL).

b) Prueba de Liddle fuerte o supresión con dosis alta de DXM: se basa, al igual que la prueba de metopirona, en la integridad del eje hipotálamo-hipofisario en la enfermedad de Cushing, a diferencia de los tumores suprarrenales y el tumor ectópico productor de ACTH.

Se administran 2 mg/6 h de DMX por vía oral, durante 2 días. Se miden los 17-OH en orina de 24 horas, el CLU y el cortisol plasmáticos, basales y tras la administración de DXM. Existe supresión si disminuyen el 50 % de su valor basal, lo que indica que hay enfermedad hipofisaria (persistencia del *feedback*). Si no se suprimen, indica una afección adrenal primaria o secreción ectópica de ACTH. Otra forma de realizarlo es administrando 8 mg de DXM en dosis única a las 23 horas, y valorar el cortisol plasmático de la mañana siguiente. Este método tiene la ventaja de que se puede realizar de manera ambulatoria. La sensibilidad y especificidad son del 92 y 94 %, respectivamente.

- c) Prueba de metopirona: la metopirona inhibe la 11-beta-hidroxilasa que convierte el 11-desoxicortisol en cortisol. La disminución de cortisol estimula la liberación de ACTH y se produce un aumento de los precursores del cortisol. Se administran 750 mg/4 horas de metopirona por vía oral durante 48 horas. Se miden: cortisol plasmático (pues confirma el bloqueo de su producción), ACTH, dehidroepiandrosterona (DHEA-S), delta-4 androstendiona y testosterona plasmáticas y 17-OH en la orina de 24 horas. Las determinaciones se realizan el día anterior y el posterior al tratamiento. En sujetos normales y en el 80 % de los pacientes con enfermedad de Cushing, la respuesta es positiva. Cuando hay ausencia de respuesta, es sugestivo de tumor ectópico o adrenal. La sensibilidad y especificidad son del 89 y 100 %, respectivamente. Los efectos secundarios son: náuseas, dolor abdominal, mareo, cefalea, hipotensión y erupción cutánea.
- d) Prueba de estimulación con hormona estimuladora de corticotropina (CRH): se administra 1 µg/kg (o 100 µg como dosis estándar) de CRH por vía intravenosa y se miden el cortisol y la ACTH plasmáticos a los 30 y a los 60 minutos. La respuesta es positiva si hay un aumento de ACTH mayor de 50 % o del cortisol mayor de 20 %, lo que indica que existe enfermedad hipofisaria.
- e) Cateterización simultánea bilateral de ambos senos petrosos inferiores (IPSS): se utiliza cuando se sospecha enfermedad de Cushing, pero el diagnóstico no está claro. Permite distinguir el síndrome de Cushing de origen hipofisario de la producción ectópica de ACTH.

- f) DHEA-S y testosterona: es útil determinarlas cuando se sospecha patología adrenal primaria, porque si los valores son normales o bajos, puede significar que hay adenoma, y si son elevados, que hay carcinoma.

3. Diagnóstico de la localización: se realiza una vez que se ha realizado el diagnóstico sindrómico y orientada la causa.

- a) Sospecha de patología adrenal primaria: el mejor método es la tomografía axial computarizada (TAC) abdominal con cortes finos. Los tumores menores entre 3 y 6 cm, sugieren adenoma adrenal (sobre todo si se acompañan de DHEA-S normal o suprimida), mientras que los mayores de 6 cm (con aumento de andrógenos), indican carcinoma adrenal. La gammagrafía suprarrenal con iodo-colesterol o selenio-colesterol puede diferenciar, mejor que la TAC, los carcinomas adrenales (que no captan el isótopo), de los adenomas y de la hiperplasia. Puede ser útil para localizar tejido adrenal ectópico o remanente, que pueda causar hipercortisolismo recurrente tras una adrenalectomía. Las dos pruebas presentan una sensibilidad del 100 %.
- b) Sospecha de enfermedad hipofisaria: el método de elección es la RMN hipofisaria con gadolinio. Existen falsos positivos (quistes hipofisarios, adenomas hipofisarios no funcionantes, síndrome de la silla turca “vacía”) y falsos negativos (tumores menores de 5 mm). Cuando la RMN no es diagnóstica o no concuerda con los hallazgos clínicos o bioquímicos, está indicado hacer cateterización de senos petrosos inferiores.
- c) Síndrome de Cushing por ACTH ectópica: se debe buscar el tumor mediante radiografía de tórax y TAC toracoabdominal, como pruebas iniciales. Se identifica en dos tercios de los pacientes.

**Insuficiencia suprarrenal (ISR).** Es el trastorno por el que existe una secreción de glucocorticoides suprarrenales inferior a las necesidades del organismo. Se puede clasificar en: ISR primaria, en la que el trastorno reside en ambas glándulas suprarrenales, y existe déficit de glucocorticoides, mineralocorticoides y andrógenos; e ISR secundaria, que consiste en la producción deficitaria de ACTH por un defecto hipotálamo-hipofisario, y no existe déficit mineralocorticoideo.

En la anamnesis y la exploración física, en una situación de reserva suprarrenal disminuida, el enfermo

puede referir pocos síntomas; pero sometido a estrés se desencadena una ISR aguda. Como mismo progresa la destrucción de la glándula, emergen los síntomas clásicos de ISR crónica. Por tanto, las manifestaciones clínicas de la ISR dependen de la forma de presentación, aguda o crónica; del origen, primario o secundario (en este último caso no existe déficit de aldosterona, por lo que la hipotensión arterial es más leve y no existe hiperpotasemia, aunque se pueden dar alteraciones derivadas del déficit de otras hormonas hipofisarias); y de las manifestaciones propias de enfermedades intercurrentes, que pueden desencadenar una crisis addisoniana.

### Pruebas complementarias

1. Diagnóstico sindrómico: junto a los datos de laboratorio orientadores, mediante hemograma, bioquímica y gasometría, son útiles las siguientes pruebas de detección inicial:

a) Cortisol plasmático basal: niveles inferiores a 3 µg/dL sugieren ISR. Niveles superiores a 19 µg/dL excluyen el diagnóstico, salvo en el caso de pacientes muy graves en los que se requieren cifras mayores. Valores entre 3 y 19 µg/dL no son concluyentes.

b) Estimulación rápida con ACTH: se administran 250 µg de ACTH sintética por vía intramuscular o intravenosa. Se mide el cortisol plasmático basal, a los 30 y a los 60 minutos: se considera normal si es mayor que 19 µg/dL (en cualquier extracción). Si no lo es, se confirma el diagnóstico de ISR; sin embargo, si es normal se excluye la ISR primaria, pero no la alteración de la reserva hipofisaria de ACTH.

2. Diagnóstico de las causas:

a) ACTH plasmática: en la ISR primaria la ACTH está muy elevada, por lo general mayor que 200 pg/mL (por RIA), mientras que en la de origen secundario es baja o dudosamente normal.

b) Prueba de hipoglucemia insulínica: en individuos sanos la hipoglucemia produce un aumento de la ACTH, lo que provoca la elevación del cortisol. Se administran de 0,1 a 0,15 U/kg de insulina de acción rápida, con lo que debe aparecer hipoglucemia clínica y bioquímica. Se extrae sangre basal, a los 30, 60 y 90 minutos. Se considera normal si el cortisol plasmático es mayor que 18 µg/dL.

c) Prueba de metopirona: se administran 30 mg/kg a las 23 horas y se extrae una muestra a las 8 horas del día siguiente. Se considera valorable si el cortisol es mayor que 8 µg/dL. La respuesta es normal si el 11-deoxicortisol es mayor

que 7 µg/dL; patológica, si es menor que 5 µg/dL; e indeterminada, con valores entre 5 y 7 µg/dL. Las dos últimas pruebas pueden resultar peligrosas porque reducen la reserva de cortisol en un paciente en el que se sospecha que ya la tiene alterada. Para evitarlo, se puede administrar dexametasona, que no interfiere en la determinación de cortisol.

d) Otras pruebas pueden tener importancia para el diagnóstico:

- Pruebas de imagen (RMN hipofisaria y TAC abdominal).
- Despistaje de tuberculosis.
- Anticuerpos antiadrenales.
- Valoración del eje hipotálamo-hipofisario, en la ISR secundaria.
- Valoración de posibles trastornos autoinmunes asociados, en la ISR primaria de origen autoinmune.

### Hiperplasia suprarrenal de comienzo tardío.

Por lo general, no está asociada con un aumento importante de la DHEA-S. Esta hormona se puede encontrar ligeramente elevada en pacientes anovulatorias con ovarios poliquísticos. Un valor de DHEA-S superior a 700 mg/dL ha sido propuesto como el marcador para la función anormal de la suprarrenal. En la práctica clínica, este valor se encuentra en muy pocas oportunidades y no cambia la conducta que se debe seguir con el paciente. En los trastornos suprarrenales, el punto final es el aumento en la concentración de testosterona, ya sea por producción directa o por conversión periférica de DHEA; por lo tanto, en ausencia de síndrome de Cushing se considera que la medición de testosterona es suficiente para descartar una patología suprarrenal y que, al parecer, no justificaría medir en forma rutinaria la DHEA-S.

**Glándula suprarrenal y anovulación.** Siempre ha existido la duda del compromiso de la glándula suprarrenal en pacientes con anovulación. La primera pregunta es si la anovulación es secundaria al aumento de producción de andrógenos en la suprarrenal. Una posibilidad es que el aumento en la actividad de la suprarrenal, marcado por la mayor producción de DHEA, se deba a una insuficiencia de la 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa inducida por los estrógenos. Se llegaría a un estado similar al de la suprarrenal fetal: disminución de esta enzima por el alto contenido de estrógenos. Un dato inconsistente con esta explicación es que los niveles de ACTH no se elevan. Podría explicarse porque la actividad de esta enzima es inhibida tanto por los andrógenos como por los estrógenos en concentraciones esperadas en el interior de la suprarrenal, pero

difíciles de alcanzar con la administración exógena. Por lo tanto, los cambios en la secreción adrenal pueden mostrar acciones variables de los esteroides, en especial, de los estrógenos, en capas diferentes de la corteza suprarrenal, sin que induzcan cambios en la ACTH.

Sin que haya diferencias en cuanto al peso, la dieta, la raza o los factores ambientales, la actividad androgénica suprarrenal está aumentada en las dos terceras partes de las mujeres anovulatorias, y la hiperinsulinemia se puede encontrar en el 70 % de ellas. Parece que existe alguna modulación, por parte de los factores de crecimiento, tanto en la suprarrenal como en las células del ovario. Las mujeres con ovario poliquístico e hiperinsulinemia tienen una mayor respuesta esteroidogénica a la ACTH que aquellas mujeres anovulatorias con insulina normal. Tanto los receptores para insulina como para IGF-I, están presentes en las células de la glándula suprarrenal. Al parecer la infusión de insulina induce una disminución en la producción de DHEA-S y la hiperinsulinemia inhibe la actividad de la 17,20-liasa (P450c17), lo que sugiere que la insulina reduce la producción de este andrógeno adrenal.

**Feocromocitoma.** Es un tumor derivado de células cromafines, que producen catecolaminas. Se origina en el 90 % de los casos en las glándulas suprarrenales y, en el resto, en los ganglios simpáticos (feocromocitoma extrarrenal o paraganglioma). Puede aparecer aislado o como parte de las neoplasias endocrinas múltiples (MEN) tipo IIa (cáncer medular de tiroides, hiperparatiroidismo y feocromocitoma) y IIb (cáncer medular de tiroides, neurinomas mucosos y feocromocitoma). La mayoría son benignos. A pesar de que constituye una causa poco frecuente de hipertensión arterial (HTA) (0,1 %), es importante su diagnóstico, ya que es curable en más del 90 % de los casos y, sin tratamiento, puede llevar a la muerte.

En la anamnesis y la exploración física, la manifestación clínica más frecuente es la HTA, ya sea en forma mantenida pero con grandes oscilaciones y de difícil control, o en forma de crisis acompañadas de cefalea, sudación, palpitaciones, debilidad y palidez, con pocos minutos de duración, aunque en algunos casos pueden durar más de una hora. Otras alteraciones menos frecuentes son la intolerancia al calor, la pérdida de peso y la intolerancia a los hidratos de carbono.

#### Pruebas complementarias

1. Determinación de catecolaminas: el diagnóstico se establece cuando se demuestra el aumento de catecolaminas o de sus metabolitos en la orina de 24 horas o en el plasma. Lo habitual es que se

midan: adrenalina, noradrenalina, dopamina y diversos metabolitos (ácido vanilmandélico). La determinación se interfiere con diversos fármacos y alimentos.

2. Estudios de imagen: permiten la localización del tumor. La TAC abdominal identifica la mayoría de los feocromocitomas. La RMN es superior a la TAC solo cuando se trata de localizar recidivas y metástasis. La gammagrafía con metayodobencilguanidina (MIBG) tiene la ventaja de que aporta una visión más funcional que morfológica y permite caracterizar los feocromocitomas extrarrenales.
3. Otras pruebas: la prueba de clonidina es útil cuando la determinación de catecolaminas no resulta concluyente. Se suministra este fármaco por vía oral y se mide la respuesta de catecolaminas en la sangre. Las pruebas de provocación están obsoletas y son peligrosas, por lo que no deben ser utilizadas.

**Nódulo suprarrenal.** El hallazgo casual de un nódulo suprarrenal ocurre en el 0,5 % de las TAC abdominales. La mayoría son benignos y no secretores (adenomas, quistes, lipomas y miolipomas, entre otros), aunque el 4 % son malignos (carcinoma adrenal, tumor metastásico y neuroblastoma). La actitud que se debe seguir es:

1. Estudio de la función hormonal: se debe excluir una insuficiencia suprarrenal y descartar una hiperfunción (aun sin la clínica). Debe realizarse una prueba de Nugent. Hay que medir sodio y potasio en sangre y orina, con dieta rica en sal. Si hay HTA o hipopotasemia se deben determinar: aldosterona y actividad de renina plasmáticas, luego de 2 horas de bipedestación, y DHEA-S y catecolaminas en orina de 24 horas.
2. Descartar malignidad: la incidencia de nódulo maligno es 2 veces mayor en varones y más frecuente en edades avanzadas. Las características de la imagen que orientan a malignidad son: por TAC, tamaño mayor que 6 cm, presencia de calcificaciones, bordes irregulares, consistencia sólida; y por RMN, mayor intensidad en T2. En la gammagrafía suprarrenal, los adenomas adrenales captan el isótopo, a diferencia de los carcinomas y de otras lesiones. La punción (PAAF) guiada por TAC puede ser útil en pacientes con neoplasias extrarrenales y riesgo de metástasis suprarrenales y en el diagnóstico diferencial de un quiste, pero no en tumores secretores ni para distinguir adenomas de carcinomas adrenales.
3. Manejo: los tumores funcionantes independientemente del tamaño, las masas sólidas mayores

que 6 cm y los quistes de contenido hemorrágico (benigno o maligno) deben extirparse. Los quistes de contenido claro y los tumores sólidos no funcionantes menores que 6 cm se deben seguir con TAC anuales y, si crecen, realizar la intervención quirúrgica.

## GÓNADAS

Las gónadas o glándulas sexuales son dos: ovarios en la mujer, y testículos en el hombre. En ellas ocurre la síntesis de esteroides sexuales femeninos y masculinos, responsables del establecimiento y mantenimiento de la función sexual, y con otros importantes papeles en el metabolismo. La producción de hormonas sexuales masculinas y femeninas está bajo estricto y complejo retrocontrol del eje hipotálamo-hipofisario.

## GÓNADAS MASCULINAS

Los testículos están localizados en la parte inferior del abdomen, en el escroto, y contienen una red de túbulos para la producción y transporte de espermatozoides, y el sistema de las células de Leydig que contiene las enzimas sintéticas para la producción de los esteroides sexuales masculinos, conocidos como andrógenos.

Los andrógenos son esteroides C19, que causan masculinización del aparato genital y el desarrollo y mantenimiento de las características sexuales secundarias. También contribuyen al crecimiento muscular de la masa ósea, a la conducta sexual y al desempeño sexual en los hombres. En las mujeres, sirven como precursores de los estrógenos. Los andrógenos activos desde el punto de vista biológico, incluyen: testosterona, dihidrotestosterona (DHT), androstenediol y androstanediol. Otros andrógenos secretados por las gónadas son: androstenediona y dehidroepiandrosterona, que pueden ser metabolizados a testosterona y DHT en tejidos periféricos. El androstenediol es producido a partir de la testosterona en tejidos periféricos y pasa a la sangre. La testosterona y la androstenediona son los mayores precursores para el estradiol y la estrona, respectivamente.

El control de la secreción de andrógenos ocurre a través de la secreción pulsátil de FSH y de LH. Existe una variación circadiana con altos valores de FSH y de LH en las horas tempranas de la mañana y valores bajos, tarde en la noche. Los esteroides sexuales y otras sustancias producidas por los testículos, proveen el control para la retroalimentación negativa de la secreción de LH y de FSH, respectivamente.

La FSH puede estar elevada en desórdenes en los cuales se encuentra reducido el número de células de Sertoli, la masa de los túbulos seminíferos, o ambos. Si la reducción es en el número de células de Leydig o en la secreción de testosterona, se produce una elevación de la concentración de LH.

## TRASTORNOS TESTICULARES

La mayoría de los trastornos testiculares se presentan en la pubertad, por tanto, rara vez aparecen hipofunciones en el adulto, a menos que sean de origen traumático.

**Hipogonadismo masculino.** Está presente una disminución de los caracteres sexuales secundarios. Si es de causa primaria (ausencia o involución testicular), los valores de LH y FSH son elevados y la testosterona está ausente o en valores muy reducidos; si es de causa secundaria (hipofisaria), los valores de testosterona pueden estar bajos o ausentes, y la FSH y LH disminuidas o ausentes, según el grado de gravedad del trastorno hipofisario. Por lo general, corresponde con: ausencia de la apetencia sexual, poco desarrollo muscular, lento desarrollo pondoestatural, y demás signos de retardo del desarrollo puberal.

Existen diferentes causas de hipogonadismo: genéticas y enzimáticas, entre otras. Pero, de modo general, el comportamiento de las dosificaciones hormonales es el mismo, independientemente de estas.

El hipogonadismo masculino en la edad adulta se observa en pacientes sometidos a orquidectomía o a terapia con estrógenos (ambos tratamientos frecuentes en los carcinomas de próstata avanzados). Entonces la medición de los andrógenos se utiliza como indicador de la eficacia del tratamiento.

También con frecuencia se observan alteraciones en la secreción de testosterona (valores bajos) en presencia de masas obstructivas en los testículos, como ocurre con la presencia de varicocele. En estos pacientes puede observarse, con frecuencia una alteración de las concentraciones de FSH y de LH, aunque nunca llega a valores como los del hipogonadismo primario.

## GÓNADAS FEMENINAS

Los ovarios en la mujer adulta poseen la capacidad de sintetizar todos los esteroides conocidos, aun en cantidades mínimas. Cada compartimiento es responsable por una vía de biosíntesis. El folículo ovárico maduro produce estradiol, estrona, androstenediona

y 17- $\alpha$ -OH-progesterona, mientras el cuerpo lúteo en la segunda fase del ciclo ovárico, produce además, progesterona. El estroma es el que realiza la secreción de androstenediona y de testosterona.

La secreción de los esteroides en el ovario varía de forma considerable durante el ciclo menstrual. En la primera fase del ciclo, el estímulo de FSH y de LH sobre las células que componen el folículo en desarrollo, promueve un aumento de la síntesis celular de esteroides. Las células de la teca producen andrógenos que se convierten en estrógenos en las células granulosas. Bajo la influencia de las gonadotropinas, las concentraciones de estradiol comienzan a aumentar a partir del octavo día y alcanzan el máximo un día antes del pico de LH, en el medio del ciclo. En ese momento ocurre una disminución de los niveles de estradiol en la circulación, que se hace acompañar de un pulso de gonadotrofinas de elevadas proporciones. Ello determina la ruptura del folículo maduro (ovulación) y una alteración de la división funcional de las células de la teca interna y de la granulosa. Estas se organizan para formar el cuerpo lúteo, productor de progesterona durante la segunda fase del ciclo ovárico. Es probable que las acciones tróficas de LH y de FSH sobre los receptores de las células que componen el folículo, determinen las alteraciones de las vías enzimáticas que proporcionan la síntesis de progesterona, estradiol y 17- $\alpha$ -OH-progesterona, en cantidades aun mayores durante la segunda fase del ciclo.

El ciclo termina con la pérdida de la función secretora del cuerpo lúteo. Este evento tiene relación con los pulsos de gonadotropinas que en esta etapa alcanzan una menor frecuencia. Para la producción de esteroides por el cuerpo lúteo, los niveles de estas hormonas disminuyen en la circulación, y se origina una *insuficiencia ovárica* transitoria, como causa de la descamación del endometrio por la falta de acción trófica de estradiol. Ocurre entonces el sangrado genital (menstruación), con renovación del epitelio endometrial y reinicio de la pulsatilidad de FSH y de LH, propias de la primera fase del ciclo menstrual.

## HIRSUTISMO

La evaluación paraclínica inicial del hirsutismo consiste en medir los niveles séricos de testosterona, DHEAS y 17-hidroxiprogesterona (17-OHP). Como parte de la valoración de la anovulación se debe realizar la medición de PRL y TSH.

Es necesario pensar siempre en la posibilidad de la hiperinsulinemia. Como se ha mencionado en capítulos anteriores, las pacientes con aumento de andrógenos

pueden tener amenorrea por pseudodecidualización del endometrio. En este caso puede estar ausente el sangrado después de una prueba progestacional. Una de las posibilidades que hay que descartar es la del síndrome de Cushing.

## HIPERANDROGENISMO E HIPERINSULINEMIA

Este tema ha sido tratado antes, al hacer referencia a la anovulación. Como existe similitud entre los receptores para insulina y para IGF-I, la hiperinsulinemia puede conducir a un aumento en la producción de andrógenos en las células de la teca. La hiperinsulinemia contribuye al hiperandrogenismo, pues inhibe la síntesis hepática de SHBG y de IGFBP-1, acciones que aumentan los niveles de testosterona libre e incrementan la estimulación del IGF-I sobre las células tecales, lo que provoca una mayor producción de andrógenos. Además, se cree que tanto la insulina como el IGF-I pueden tener un efecto estimulador sobre la actividad de la 5 $\alpha$ -reductasa.

El único tratamiento que ha mostrado algún efecto benéfico en la hiperinsulinemia es la reducción de peso corporal. Es de lamentar que hasta el momento el laboratorio clínico no cuente con unos exámenes confiables que permitan comprobar el diagnóstico de hiperinsulinemia. No existen guías precisas que permitan analizar los resultados de insulina basal y su respuesta a la estimulación con glucosa. Se acepta que una proporción glucosa en ayunas/insulina en ayunas menor que 3 puede ser útil para identificar a las pacientes con hiperinsulinemia significativa. Como la única medida terapéutica es la disminución de peso corporal, no hay justificación para hacer este examen de laboratorio en la rutina, ya que no cambiaría la conducta que se debe seguir.

## TUMORES PRODUCTORES DE ANDRÓGENOS

Se debe sospechar la presencia de un tumor productor de andrógenos en dos situaciones. La primera es cuando ocurre masculinización de progresión rápida. La segunda, cuando se encuentra la testosterona total por encima de 200 ng/dL.

La mayoría de los tumores ováricos funcionales son palpables. En esos casos se recomienda la laparotomía con extirpación quirúrgica de la masa. Se debe tener en cuenta siempre que los tumores pequeños localizados hacia el hilio pueden secretar testosterona. De manera ocasional, se puede encontrar virilización con tumores no funcionales, debido a la estimulación de la secreción de andrógenos por las células del estroma que están alrededor del tumor.

Cuando se sospecha un tumor productor de andrógenos en ausencia de una masa ovárica palpable, se recomienda utilizar técnicas de imágenes diagnósticas de los ovarios y de las glándulas suprarrenales, así como ecografía y TAC. La imagenología de la suprarrenal es bastante sensible para pequeñas masas que producen síndrome de Cushing y adenomas virilizantes.

El tumor primario de la suprarrenal por lo general está asociado con una secreción excesiva de glucocorticoides y de andrógenos. El tamaño de la lesión es significativo, ya que está relacionado de manera directa con la posibilidad de malignidad: cuando mide 2 cm de diámetro, la probabilidad de malignidad es del 20 %, mientras que si tiene 8 cm, su probabilidad es del 80 %. Las lesiones bilaterales menores que 3 cm, casi siempre se deben a enfermedades metastásicas. En la actualidad se recomienda explorar las masas unilaterales mayores que 3 cm. La aspiración con aguja fina se prefiere para aquellas masas suprarrenales unilaterales. El seguimiento se hace con imágenes diagnósticas a los 3, 9 y 18 meses. Cualquier masa que no haya sufrido cambios en este lapso, puede dejarse en observación.

El hallazgo incidental de una masa suprarrenal requiere investigación bioquímica. La presencia de hipertensión debe hacer sospechar síndrome de Cushing, hiperaldosteronismo o feocromocitoma. La evaluación debe incluir pruebas para tamizar de feocromocitoma como: catecolaminas plasmáticas después de la administración de clonidina, electrolitos, actividad de renina, cortisol libre en orina de 24 horas y niveles de andrógenos (cuadro 2.6).

**Cuadro 2.6** Causas neoplásicas de hiperandrogenismo

#### Causas ováricas

Tumores de la granulosa-teca corresponden al 15 y 20 %  
Tumores gonadales estromales (arrenoblastomas)  
Tumores de Sertoli-Leydig  
Tumores de células del hilio  
Tumores de restos adrenales  
Disgerminomas  
Gonadoblastomas  
Luteoma del embarazo  
No funcionales  
Metastásicos

#### Causas adrenales

Adenoma: produce DHEA-S  
Adenoma "puro": secretor de testosterona  
Adenoma-ganglioneuroma

#### Otras

## HIRSUTISMO IDIOPÁTICO

Hay pacientes que presentan hirsutismo, pero tienen ovulación regular; no hay tumores ni alteraciones suprarrenales. Este se ha llamado: *hirsutismo idiopático familiar*, y es el más marcado en algunas zonas geográficas. La única explicación hasta el momento es el aumento en la actividad de la 5a-reductasa. Incluso en estos casos, el hirsutismo responde a la supresión ovárica con anticonceptivos orales o al uso de espirolactona. La respuesta clínica al tratamiento se ha relacionado con los niveles de 3a-androstenediol glucoronido, la cual confirma el diagnóstico del problema al nivel del órgano blanco.

## HIPOGONADISMO FEMENINO

En la ovaritis autoinmune se han detectado autoanticuerpos contra el tejido ovárico y contra los receptores de la FSH. La irradiación, los quimioterápicos usados en el tratamiento de las enfermedades malignas y la ovaritis urliana son capaces de producir una falla ovárica prematura (tabla 2.13).

**Tabla 2.13** Síndromes asociados con hipogonadismos hipergonadotróficos

Síndrome	Cuadro clínico
Bloom	Enanismo autosómico recesivo, telangiectasia facial y sensibilidad al sol
Leopard	Lunares pardos generalizados con herencia autosómica dominante, baja talla ligera, estenosis pulmonar e hipertelorismo
Louis Barr	Síndrome de ataxia telangiectasia, ataxia y coreoatetosis autosómica recesiva, telangiectasia conjuntival, retardo mental e infecciones respiratorias
Rothmund-Thomson	Catarata hereditaria recesiva, telangiectasia de la piel, atrofia dérmica y pigmentación bronceada
Smith-Lemli-Opitz	Síndrome cerebro-hepatorrenal, baja talla autosómica recesiva, retardo mental, microcefalia, disgenesia de los conductos biliares intrahepáticos y anomalías renales
Sohval-Soffer	Deficiencia testicular familiar congénita, retardo mental, hipogonadismo, anomalías esqueléticas y diabetes mellitus



## POLISOMÍA GONOSÓMICA X

Algunas pacientes con más de dos gonosomas X, por lo general 47,XXX, pueden presentar una falla ovárica prematura. Otras pueden tener función gonadal normal. El fenotipo es normal, pero el retardo mental es frecuente. Se han descrito casos con déficit de inmunoglobulinas, y no puede descartarse la posibilidad de trastornos inmunológicos en estas pacientes.

## SÍNDROME DE LOS OVARIOS RESISTENTES

También conocido como síndrome de Savage, el síndrome de los ovarios resistentes está comprendido entre los llamados síndromes de resistencia hormonal de la glándula diana y su diagnóstico es cada vez más frecuente. Produce un cuadro clínico de hipogonadismo hipergonadotrófico con folículos ováricos normales. Sin embargo, los folículos no maduran por ausencia de respuesta a las gonadotrofinas, debido a un defecto en el receptor y en el posreceptor de estas hormonas. Se caracteriza por niveles elevados de gonadotrofinas, folículos primordiales normales que no maduran, cariotipo normal, desarrollo sexual completo, amenorrea primaria o secundaria y resistencia o hiposensibilidad a las gonadotrofinas exógenas. Algunos casos pueden ovular y embarazarse de forma espontánea.

## HIPOGONADISMOS PRIMARIOS ASOCIADOS CON OTROS SÍNDROMES RAROS

En el hipogonadismo primario también han sido individualizados varios síndromes raros que pueden asociarse con este y modificar de modo substancial el cuadro clínico.

### **Características clínicas que dependen de otras enfermedades y alteraciones asociadas con el hipogonadismo**

En todo paciente hipogonádico es necesario buscar otras enfermedades y alteraciones que se le asocian con frecuencia. Entre las más frecuentes que están asociadas con hipogonadismo de causa genética son: diabetes mellitus, bocio eutiroideo, tiroiditis de Hashimoto, anomalías esqueléticas, renales y cardiovasculares.

En la ovaritis autoinmune, el hipogonadismo puede formar parte de un cuadro clínico mucho más complejo y quedar enmascarado o solaparse a este. Puede asociarse con trastornos endocrinos autoinmunes, como: hipofisitis autoinmune, bocio tóxico difuso, tiroiditis autoinmunes, hipotiroidismo, hipoparatiroidismo, insuficiencia suprarrenal primaria y diabetes mellitus.

También, se asocia con otras enfermedades autoinmunes no endocrinas, como: miastenia gravis, anemia perniciosa, alopecia, vitiligo, hepatitis crónica, síndrome de malabsorción, mieloma y conectivopatías, entre otras.

## EXÁMENES COMPLEMENTARIOS

Además de los exámenes rutinarios, deben realizarse determinaciones hormonales, pruebas dinámicas de exploración funcional y otros estudios anatómicos hipotálamo-hipofisario y ováricos, para precisar el grado de afectación gonadal y la causa que lo produce:

1. Determinaciones de FSH y LH: los valores de estas hormonas pueden variar en diferentes laboratorios y en las diferentes fases del ciclo menstrual. En sentido general, los valores plasmáticos preovulatorios de FSH son de 5 a 20 U/L y los de LH, de 5 a 25 U/L. Los valores ovulatorios de FSH: de 12 a 30 U/L y los de LH, de 25 a 100 U/L. Los valores posmenopáusicos de FSH y de LH son mayores que 50 U/L. Los valores aumentan en los hipogonadismos hipergonadotróficos y son bajos en los hipogonadotróficos. En las pacientes amenorreicas con valores normales de gonadotrofinas, deben realizarse pruebas dinámicas para precisar el diagnóstico.
2. Determinación de prolactina: los valores normales de PRL son menores que 20 ng/mL (de 90 a 850 pmol/L, factor de conversión: 44,4). Los valores mayores que 100 ng/mL son sugestivos de un prolactinoma y los mayores que 300 ng/mL, de macroprolactinoma. Los valores mayores que 20 ng/mL y menores que 100 ng/mL son propios de hiperprolactinemias no tumorales. La determinación de PRL está indicada, sobre todo, en los casos con síndrome de galactorrea-amenorrea.
3. Determinación de estradiol o de estrógenos totales en la orina: los valores de estradiol plasmático varían durante el ciclo menstrual. En la fase folicular varían de 194 a 334 pmol/L y en la fase luteal de 260 a 735 pmol/L. En el pico ovulatorio son mayores que 735 pmol/L. En las pacientes hipogonádicas, el estradiol plasmático está disminuido, habitualmente, a valores menores que 100 pmol/L. Lo mismo sucede con los estrógenos totales en la orina y con la estrona.
4. Pruebas dinámicas de exploración funcional:
  - a) Prueba de estimulación ovárica con gonadotrofina menopáusica humana (hMG): se indica cuando los niveles de gonadotrofinas no son orientadores y es preciso conocer la respuesta ovárica. Se toman muestras de sangre o de orina de 24 horas para determinar la cantidad de

estrógenos en condiciones basales y luego se administran 225 U de FSH por vía intramuscular durante 3 días consecutivos. Se toman nuevas muestras de sangre u orina, el cuarto y quinto días para determinar la cantidad de estrógenos. En la falla ovárica secundaria se produce un incremento de los estrógenos a 2 veces los valores basales. En el hipogonadismo hipergonadotrófico no se produce esta respuesta.

- b) Prueba de estimulación hipofisaria con hormona liberadora de gonadotrofinas (Gn-RH): se toma una muestra de sangre en condiciones basales para la determinación de FSH y LH y se inyectan 200 µg de Gn-RH por vía intravenosa. Se toman nuevas muestras de sangre para determinaciones de FSH y de LH, por lo general, a los 15, 30, 60 y 90 minutos o una única muestra a los 30 minutos después de la administración de la Gn-RH. La prueba está indicada en pacientes con hipogonadismo hipogonadotróficos, para precisar el origen hipotalámico o hipofisario de la lesión. Cuando la falla es hipotalámica, se produce un incremento de 2 o 3 veces los valores hormonales basales. La respuesta de la FSH es menor que la de la LH. En las pacientes con falla hipofisaria, no se produce este incremento. Algunas pacientes con daño hipotalámico de largo tiempo de evolución no responden en un primer intento, por lo que es recomendable repetir la prueba antes de concluir sus resultados.
- c) Prueba de estimulación con citrato de clomifeno: es una prueba de menor utilidad que las anteriores, de aceptación discutida, en la que se mide la FSH y la LH, para valorar la respuesta hipotálamo-hipofisaria, o se miden los estrógenos para valorar la respuesta global del eje. Se toma una muestra de sangre para la FSH y la LH basal, y se administran 100 mg de citrato de clomifeno por vía oral durante

5 días. Se toma de nuevo una muestra de sangre para FSH y LH el día 6, al terminar la administración del citrato de clomifeno. Puede medirse también el estradiol en sangre o los estrógenos en muestras de orina de 24 horas, recogidas los mismos días.

El citrato de clomifeno, por su estructura química parecida a los estrógenos, se une a los receptores estrogénicos hipotalámicos y bloquea el efecto de retroalimentación negativa de estas hormonas. Por tanto, se produce un aumento de la liberación de FSH y de LH, pero solo si el hipotálamo y la hipófisis son capaces de responder. En individuos normales, ocurre un incremento de 2 veces los valores hormonales basales. En hipogonádicos secundarios, con lesión hipotalámica o hipofisaria, las respuestas son subnormales. En hipogonadismos primarios o hipergonadotróficos, la prueba es de menor utilidad, los valores de FSH y de LH están aumentados y se incrementan con la prueba. Los estrógenos, por el contrario, están disminuidos y no se incrementan con citrato de clomifeno. En individuos prepuberales y peripuberales puede producirse una caída paradójica de la FSH y de la LH.

## BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- Casanueva F, Vázquez JA. *Endocrinología Clínica*. Barcelona: Ed. Salvat, 1995.
- Findling JW, Doppman JL. *Biochemical and radiologic diagnosis of Cushing's syndrome*, New York: Stockton Press, 1994.
- González JM, de Buitrago y col. *Bioquímica Clínica*, Amsterdam: Elsevier Publisher, 1998.
- Jubiz W. *Endocrinología Clínica*, Barcelona, Ed. Salvat, 1996.
- Pickup S. *Diabetes*. Amsterdam: Stockton Press, 1998.
- Tietz NW (ed.). *Clinical Guide to Laboratory Tests*, 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders, 1990.
- Tietz NW. *Fundamentals of Clinical Chemistry*. Philadelphia: WB Saunders; 1996.

## **CONTENIDO**

---

### **Introducción/ 183**

Indicación e interpretación de los análisis de laboratorio/ 184

### **Bibliografía recomendada/ 185**

### Capítulo 20



## ALTERACIONES DE LABORATORIO EN LAS ENFERMEDADES DEL SISTEMA OSTEOMIOARTICULAR

*Dr. Celso Cruz Rodríguez*

### RESUMEN

En este capítulo se exponen las indicaciones y la interpretación de los análisis de laboratorio en las enfermedades osteomioarticulares, en específico, en la artritis reumatoide, en el lupus eritematoso sistémico y en la osteoporosis. Además, se hace alusión a los marcadores óseos incorporados recientemente para su diagnóstico.

### INTRODUCCIÓN

Las estructuras óseas y musculares convergen en las articulaciones diartroidales, reforzadas por ligamentos y recubiertas en su interior por la membrana sinovial. En el espacio interior se encuentra el líquido sinovial. Este tiene una función lubricante de las superficies articulares y suministra los nutrientes necesarios al cartílago óseo epifisario.

Las enfermedades articulares se agrupan según su forma de presentación. Estas pueden producir daño solo en las articulaciones, extenderse a estructuras extraarticulares o tratarse de enfermedades sistémicas que se acompañan de compromiso articular. Muchas de las afecciones que se incluyen en este grupo, están constituidas por enfermedades autoinmunes. Por ello, la reacción inflamatoria que las acompaña tiene su expresión en los reactantes de la fase aguda y en los trastornos autoinmunes, así como en la aparición de inmunocomplejos y de autoanticuerpos. Estos últimos

son los responsables de las lesiones hísticas que se producen en el transcurso de estas alteraciones.

La siguiente clasificación muestra las afecciones más frecuentes del sistema osteomioarticular (SOMA):

1. Enfermedades difusas del tejido conjuntivo:
  - a) Artritis reumatoide.
  - b) Lupus eritematoso sistémico (LES).
  - c) Esclerodermia.
  - d) Síndrome de Sjögren.
2. Artritis asociadas con espondilitis:
  - a) Espondilitis anquilosante.
  - b) Síndrome de Reiter.
  - c) Artritis psoriásica.
3. Osteoartritis:
  - a) Primarias y secundarias.
4. Enfermedades metabólicas:
  - a) Asociadas con depósitos de cristales.
5. Neoplasias.
6. Alteraciones neurovasculares:
  - a) Articulación de Charcot.

- b) Síndrome por compresión.
- c) Enfermedad de Raynaud.
- 7. Alteraciones de huesos y cartílagos:
  - a) Osteoporosis.
  - b) Enfermedad de Paget ósea.
- 8. Trastornos extraarticulares:
  - a) Alteraciones de disco intervertebral.
  - b) Dolor lumbar idiopático.
  - c) Reumatismo polindrómico.
  - d) Hidrartrosis.

## INDICACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS ANÁLISIS DE LABORATORIO

El laboratorio clínico dispone de un arsenal de análisis o pruebas para el diagnóstico de este grupo de enfermedades, lo cual constituye una limitante para su total descripción en este libro. Por lo tanto, se exponen aquellos análisis que intervienen, de manera directa, en el diagnóstico de las enfermedades difusas del tejido conectivo, como la artritis reumatoide y el LES, y en el diagnóstico de las alteraciones de huesos y cartílagos: en especial, la osteoporosis. Para el resto de las enfermedades, solo serán mencionados algunos de los métodos de diagnóstico.

La frecuencia de las llamadas *enfermedades reumáticas* y su estrecha relación con los trastornos del tejido conjuntivo que afectan de forma grave a sistemas importantes, como el sistema cardiovascular, el renal, el nervioso y el osteomioarticular, han llevado a la conformación de perfiles de pruebas, cuyo uso está encaminado al diagnóstico temprano de estas afecciones.

Siempre que las pruebas diagnósticas se utilicen sobre la base de los síntomas y signos encontrados por el médico de asistencia tras el interrogatorio y el examen físico, y que los resultados obtenidos sean interpretados de manera correcta, estas pruebas serán suficientes para un diagnóstico correcto.

A continuación se relacionan algunas de ellas:

1. Hemograma completo: con frecuencia señala la presencia de una anemia normocítica y normocrómica en los pacientes portadores de artritis reumatoide o de LES. A estas alteraciones pueden sumarse la trombocitopenia y la leucopenia por los trastornos autoinmunes asociados, que acompañan a estas enfermedades.
2. Algunos componentes de la química clínica pueden alcanzar valores por encima de los normales. Tal es el caso de la creatinina, la urea, los uratos y las enzimas hepáticas ASAT y ALAT, cuando órganos como el riñón y el hígado están comprometidos.
3. Un grupo importante de las pruebas que se deben indicar, está compuesto por los marcadores de inflamación o reactantes de la fase aguda: velocidad de sedimentación eritrocitaria (VSG), proteína C reactiva y el factor reumatoideo (véase el capítulo correspondiente a los reactantes de la fase aguda).
4. Los análisis especiales para el diagnóstico de las enfermedades autoinmunes, entre las cuales se encuentra el LES, se describen en la sección correspondiente a inmunología.

La osteoporosis (por citar un ejemplo) representa el mayor problema de salud después de las enfermedades cardiovasculares, según la Organización Mundial de la Salud. Cuando ocurre un desequilibrio entre la formación y la reabsorción óseas, se producen alteraciones irreversibles del tejido óseo. Estas aumentan la sensibilidad a las fracturas en personas a partir de su cuarto o quinto decenio de vida y en las mujeres menopáusicas.

Hace más de cuatro décadas, para el estudio de las enfermedades óseas, el laboratorio clínico se limitaba a la búsqueda de defectos en el metabolismo del calcio y del magnesio. Para ello los investigadores se valían de sus determinaciones en suero y de algunas hormonas. Estas pruebas carecen de valor diagnóstico en la actualidad, pues con ellas la concentración del calcio en suero se mantiene dentro del intervalo normal de referencia, aun cuando el tejido óseo del paciente ya no lo contenga. La fosfatasa alcalina, el magnesio sérico y la electroforesis de proteínas juegan un papel fundamental cuando se utilizan para descartar otras enfermedades que invaden el tejido óseo, como ocurre en los pacientes portadores de mieloma múltiple.

Hoy los métodos disponibles para el diagnóstico de los trastornos del metabolismo óseo —entre los que se encuentra la osteoporosis— incluyen la densidad ósea y las biopsias para estudios histomorfométricos. Aunque estos no son temas de estudio en este curso de laboratorio clínico, vale la pena mencionar que desde hace poco tiempo se han incorporado tres marcadores óseos

agrupados en enzimas de formación y reabsorción óseas: la osteocalcina (OC), la fosfatasa alcalina osteoespecífica y los productos del metabolismo de la matriz ósea (colágeno tipo I) como son: deoxipiridinolinas, N-telopéptidos (NTX-1) y colágeno tipo 1 alfa 1 (Col 1A1).

Algunos de ellos se determinan en la orina, y su uso comienza a generalizarse: la deoxipiridonolina y los telopéptidos C y N. Estos marcadores, aunque no son específicos, son lo suficientemente sensibles para detectar las enfermedades que afectan el tejido óseo.

El grupo de los NTX-1 se forma como resultado del aumento de la reabsorción ósea y constituye productos directos de la actividad osteoclástica asociada con diferentes trastornos óseos como la osteoporosis. Los niveles de NTX pueden determinarse en la orina o en el suero del paciente y permiten conocer la respuesta ante la terapia antirreabsortiva, el control evolutivo de los pacientes sometidos a tales medidas

terapéuticas y el nivel de riesgo para la pérdida de hueso en el comienzo de la menopausia.

Todo lo referido anteriormente en relación con los marcadores óseos y su elevado potencial teórico para el seguimiento de la curación de las fracturas, no se ha acompañado de su uso en la rutina diagnóstica en los últimos años. Por el elevado número de marcadores disponibles, los estudios que se han realizado no son concluyentes para cada uno de ellos, a lo cual se une que los valores de los diferentes marcadores varían con la edad de los pacientes, lo que hace difícil el establecimiento de los intervalos de referencia (valores normales) confiables.

## **BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA**

- Bettica P. Biochemical markers of bone metabolism in the assessment of osteoporosis. JIFCC 1995;7:16-21.  
Price Ch P. Case studies in metabolic bone diseases; assessing the potencial for biochemical markers. Lab Med Int 1996; Jan-Feb.

## **CONTENIDO**

---

**Introducción/ 187**

**Breve historia de los marcadores tumorales/ 188**

**Clasificación de los marcadores tumorales/ 188**

**Métodos de ensayo para determinar la concentración de los marcadores tumorales/ 188**

**Características de los principales marcadores tumorales/ 189**

Alfafetoproteína/ 189

Antígeno carcinoembrionario/ 189

Gonadotropina coriónica humana/ 190

Antígeno prostático específico/ 190

CA 19-9/ 191

CA 15-3/ 191

CA 125/ 191

Tiroglobulina/ 191

**Bibliografía recomendada/ 191**

### Capítulo 21



## MARCADORES TUMORALES

Dr. Celso Cruz Rodríguez

### RESUMEN

**En nuestro planeta, las enfermedades malignas constituyen una de las principales causas de muerte e invalidez en el ser humano. La prevención y el diagnóstico acertado de estas afecciones son decisivos, pues permiten su curación mediante la resección quirúrgica o la aplicación de un tratamiento lo menos agresivo posible, que permita mantener una buena calidad de vida para el paciente. Como ejemplo se refiere el antígeno prostático específico (PSA) total y libre, cuyo valor se ha demostrado durante la última década del siglo xx, para la detección del cáncer de próstata.**

### INTRODUCCIÓN

El interés por conocer las enfermedades que afectan al ser humano, sus causas y la manera de combatirlas, ha logrado que las ciencias médicas alcancen niveles no imaginados a comienzos del siglo xx. Hoy, la situación es diferente, pues ya se conocen las causas, el cuadro clínico y el tratamiento para eliminar la mayoría de las enfermedades o para frenar su evolución. En algunas se desconoce, sin embargo, cómo prevenirlas o diagnosticarlas de manera precoz, para evitar daños irreversibles. Tal es el caso de las enfermedades neoplásicas malignas, que causan la muerte a miles de personas en el mundo cada año.

Las enfermedades neoplásicas malignas o cáncer se caracterizan por un crecimiento anormal de los tejidos, de carácter autónomo, y que no se detiene, aunque desaparezca el estímulo que lo originó. Este crecimiento provoca la aparición de una masa tumoral que comprime estructuras vecinas, las invade y es capaz de suscitar la proliferación de células tumorales a distancia, que originan las metástasis. La diseminación de las células tumorales, de manera descontrolada, termina por causar la muerte del hospedero. El tumor canceroso o neoplasia producirá cambios en el perfil bioquímico del paciente, tanto por las células del tumor, que se propagan a través de diferentes fluidos corporales, como por sustancias producidas por el propio

tumor o por el propio paciente (tejidos), en respuesta al desarrollo del proceso neoplásico. Estas sustancias, que se denominan *marcadores tumorales* pueden aparecer en la sangre, en el líquido cefalorraquídeo, en la orina y en otros fluidos.

Durante más de tres décadas, el uso de estos marcadores ha constituido una potente herramienta en el diagnóstico y establecimiento de pronósticos, en el paciente con enfermedades neoplásicas.

Estas sustancias son muy valiosas para el seguimiento de la enfermedad, y su determinación persigue los fines siguientes:

1. Evolución durante la instauración del tratamiento.
2. Detección temprana de las recaídas.
3. Respuesta a una nueva conducta terapéutica cuando ha fracasado la que se estaba aplicando.

Los marcadores tumorales no deben utilizarse como rutina en los pacientes con cáncer, a menos que los resultados tengan un impacto beneficioso en la evolución de la enfermedad. Este beneficio puede expresarse de diferentes formas:

1. Establecimiento de la estadificación de la enfermedad, de la manera más correcta posible, para aplicar el tratamiento más apropiado.
2. Descontinuar una terapia que no es efectiva en la enfermedad avanzada.
3. Detectar de forma temprana una recaída, para aplicar las medidas terapéuticas requeridas.



El empleo sistemático y científico de los marcadores tumorales, conduce a una atención médica de más calidad. Si este es un uso indiscriminado, aumentará los costos y no redundará en beneficios para el paciente.

### BREVE HISTORIA DE LOS MARCADORES TUMORALES

El primer marcador tumoral identificado fue la proteína de Bence Jones, hace más de 150 años. Su descubrimiento se debió al Dr. McIntire, quien envió una muestra de orina de uno de sus pacientes al Dr. Bence Jones, especialista en bioquímica, pues había observado que la orina tenía una gravedad específica alta y se enturbiaba ligeramente cuando se sometía a ebullición. Bence Jones encontró que la acidificación de la orina producía un precipitado abundante. El paciente fue diagnosticado como portador de morbilidad ósea o reblandecimiento de los huesos, enfermedad que se conoce hoy como mieloma múltiple, y que se caracteriza por la proliferación de células plasmáticas malignas en la médula ósea. Esta proliferación desordenada, infiltra diferentes órganos, y las células plasmáticas aparecen en la sangre periférica. Después se descubrieron otros marcadores que también demostraron su utilidad en el diagnóstico individual de tumores, hasta que en el año 1963, G. I. Abelev descubrió la alfafetoproteína (AFP) en la ex Unión Soviética. Dos años después, Gold y Freeman descubrieron otra proteína: antígeno carcinoembrionario (CEA). Ambos hallazgos señalaron la apertura a la era moderna, de los marcadores tumorales y de su aplicación en el estudio de los pacientes con cáncer (tabla 2.14).

### CLASIFICACIÓN DE LOS MARCADORES TUMORALES

Los marcadores tumorales pueden clasificarse según sus características. Por ejemplo, una clasificación

Tabla 2.14 Breve historia de los marcadores tumorales

Año	Descubridores	Marcadores
1846	H. Bence Jones	Proteína de Bence Jones
1930	B. Zondek	Gonadotrofina coriónica humana (HCG)
1963	G. I. Abelev	Alfafetoproteína (AFP)
1965	Gold y Freeman	Antígeno carcinoembrionario (CEA)
1969	Heubner y Todaro	Oncogenes
1970	Hara	Antígeno prostático específico (PSA)
1975	Kohler y Milstein	Anticuerpos monoclonales
1981	Bast	CA 125
1984	Kufe	CA 15-3

muy simple es la que describe el lugar en que se producen, ya sea por el tumor o por los tejidos del hospedero como respuesta al proceso tumoral. Otra clasificación es la que los divide en tumores que están presentes en el individuo sano, cuya concentración aumenta al hacerse presente el cáncer, y en tumores que se vuelven detectables solo después que se desarrolla el proceso neoplásico. Algunos marcadores tumorales como la AFP están presentes en el período de crecimiento fetal y después sus valores no son dosificables. Cuando se presenta de nuevo, este aumento responde a la presencia del proceso tumoral que ha causado el descontrol de la transcripción genética del ADN del gen que la produce. Los marcadores tumorales se clasifican también desde el punto de vista bioquímico (tabla 2.15).

Esta clasificación no resulta completa, pues la estructura bioquímica de algunos marcadores se desconoce; solo pueden ser detectados por sus propiedades antigénicas. A pesar estas limitaciones, la clasificación bioquímica será utilizada en las páginas siguientes para describir las aplicaciones clínicas de los marcadores.

Tabla 2.15 Clasificación bioquímica de los marcadores tumorales

Características bioquímicas	Marcadores
Proteínas	CEA AFP
Hormonas	HCG
Enzimas	Fosfatasa ácida prostática
Antígenos	CA 125
asociados con tumores	CA 15-3 CA 19-9 PSA

### MÉTODOS DE ENSAYO PARA DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN DE LOS MARCADORES TUMORALES

Los métodos de ensayo cualitativos y semicuantitativos han sido sustituidos por los cuantitativos. El conocimiento exacto de los valores de estos componentes en los diferentes fluidos biológicos, ofrece datos de gran interés para la pesquisa de la población general, el diagnóstico diferencial de los pacientes sintomáticos, la estadificación clínica de los procesos malignos, la estimación del tamaño del tumor, los pronósticos de la progresión de la enfermedad, la evaluación del tratamiento y la detección temprana de recaídas. Los métodos cuantitativos se basan en los siguientes principios:

1. Cinética enzimática.
2. Ensayos inmunoenzimáticos.
3. Técnicas citogenéticas.

Las características bioquímicas del marcador (enzimas, proteínas, oncogenes) y el rango de concentración, determinan la metodología que se debe seguir para su determinación. Este grupo de métodos está liderado por los ensayos inmunoquímicos, y dentro de ellos, el RIA fue el primero que se utilizó para la determinación de estos componentes. Esta técnica requiere del uso de isótopos radiactivos para cuantificar la asociación antígeno-anticuerpo. Por las regulaciones que conlleva la manipulación de estos isótopos, por la protección que requieren los manipuladores y por la corta vida media de los isótopos, se han introducido nuevos procedimientos que tienen los siguientes principios:

1. Enzimoimmunoensayos.
2. Fluorescencia.
3. Fluorescencia polarizada.
4. Luminiscencia.
5. Electroquimioluminiscencia.

Con cualquiera de ellos se cuantifica la asociación antígeno-anticuerpo.

## CARACTERÍSTICAS DE LOS PRINCIPALES MARCADORES TUMORALES

Antes de describir los principales marcadores tumorales, es oportuno mencionar algunas características que son comunes para todos ellos y que tienen importancia para su uso en la práctica clínica diaria. Ningún marcador tumoral alcanza una sensibilidad y especificidad nosológica del 100 %. Para cada uno de ellos existe un valor de corte, por encima del cual sus valores se consideran positivos. Este valor se calcula para asegurar la eficiencia de los resultados en cada situación clínica, lo cual constituye el principal objetivo del laboratorio clínico en el análisis de cualquier componente. La mayoría de las determinaciones de estos marcadores, carece de la sensibilidad y especificidad nosológicas para ser utilizados en pesquisas. Por los estudios, el PSA parece constituir una excepción (tabla 2.16).

**Tabla 2.16** Uso clínico de algunos marcadores tumorales

Uso	Marcadores	Enfermedad
Pesquisas	PSA	Cáncer prostático
Estadios	Ca 19-9	Neoplasia de páncrea
Pronóstico	CEA	Cáncer colorrectal
Diagnóstico	Beta HCG	Enfermedad gestacional trofoblástica (embarazo molar)
Detección de la enfermedad residual	CA 125	Cáncer ovárico
Detección de recaídas	PSA	Cáncer prostático
Control terapéutico	CA 15-3	Cáncer de mama

## ALFAFETOPROTEÍNA

La alfafetoproteína (AFP) es una glicoproteína que se produce durante la vida fetal. Fue identificada en el año 1963, y puede considerarse como equivalente a la albúmina, pues existe homología de los genes codificantes de ambas proteínas. En el feto es sintetizada por el saco vitelino, el hígado y el aparato intestinal. Está presente en el suero sanguíneo de las embarazadas y ausente en el adulto normal. La concentración de esta proteína fetal se eleva en los pacientes con neoplasias hepáticas, pancreáticas, gástricas, bronquiales, colónicas y en el teratocarcinoma del testículo. En enfermedades no neoplásicas como la hepatitis viral y la cirrosis biliar primaria, se percibe una elevación no tan marcada de esta glicoproteína.

El principal uso de este marcador tumoral es en los tumores malignos de células germinales que se originan en las gónadas. Se presenta con más frecuencia en el testículo que en el ovario. En la práctica clínica, la AFP se asocia con otro marcador, la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG). El uso de ambos posibilita una mejor definición de los tumores de células germinales, un mejor seguimiento de las medidas terapéuticas, así como la detección de recaídas o de aparición de metástasis.

La AFP se determina en el laboratorio por inmunoensayos radiactivos o enzimáticos, de forma manual o automática.

## ANTÍGENO CARCINOEMBRIONARIO

El antígeno carcinoembrionario (CEA) es una glicoproteína que forma parte de una gran familia de proteínas, relacionadas con la superficie celular del tejido fetal embrionario. Su función bioquímica se desconoce. Este marcador tumoral, que es considerado por muchos como un marcador prototipo junto a la AFP, no es un producto específico del tumor. En este sentido, sus valores pueden encontrarse elevados en enfermedades benignas como: cirrosis, colitis ulcerativa y enfermedades pulmonares crónicas. Su valor se eleva en los adictos al tabaco. En cuanto a enfermedades malignas y debido a que su síntesis se realiza en el tracto gastrointestinal, tanto del feto como del adulto, su elevación se asocia con el cáncer colorrectal, con el gástrico, el hepático y con las vías biliares. Su sensibilidad aumenta de acuerdo con el estadio de la enfermedad, aunque es poco sensible al inicio del proceso tumoral, por lo que no es útil en la pesquisa del cáncer colorrectal. Se utiliza para el control de los pacientes después del tratamiento quirúrgico, con vistas a detectar las recurrencias. El 20 % de los cánceres colorrectales evolucionan sin expresión del CEA.

Por ello, es obligatoria la inmunohistoquímica del tumor resecado, para así suplir la indicación de este marcador que se encuentra ausente. En el control del carcinoma pulmonar de células pequeñas, el CEA es muy útil también.

## HORMONA GONADOTROPINA CORIÓNICA HUMANA

La hormona gonadotropina coriónica humana (hCG) es una glicoproteína segregada por las células sincitiotrofoblásticas de la placenta normal. Su molécula está constituida por dos subunidades diferentes: alfa y beta. La subunidad alfa la comparte con otras hormonas como la LH, la FSH y la TSH. La subunidad beta es propia de la hCG, y su secuencia del extremo C es diferente a la de la subunidad alfa. Su concentración se eleva en el embarazo, en enfermedades trofoblásticas y en algunos tumores de células germinales, en los cuales alcanza sus valores más elevados. Es el marcador ideal para la enfermedad trofoblástica gestacional: mola hidatiforme, mola invasiva o cáncer coriónico. Después de la evacuación del embarazo molar, la beta hCG, muy elevada en el suero y en la orina, disminuye de forma drástica, y alcanza cifras normales después de 21 días, aunque la etapa de descenso de los valores puede abarcar de 8 a 12 semanas, al final de las cuales sus valores se normalizan. Si la concentración permanece elevada o la etapa de normalización de sus valores se prolonga demasiado, es una señal de que la paciente es portadora de una mola invasiva o cáncer coriónico, y de que es preciso comenzar la quimioterapia. La hCG es también detectable en el suero del 70 % de los pacientes con tumores de células germinales no seminomatosos. En estos enfermos, la combinación de los marcadores AFP y hCG hace posible la estadificación de la enfermedad. Después de la orquiectomía, sus valores deben disminuir. Si esto no ocurre, es un índice de diseminación (metástasis) del tumor.

Las determinaciones de la hCG, específicamente su fracción beta y sin reacciones cruzadas con las hormonas LH, FSH y TSH, se encuentran disponibles en el mercado desde la década del 70 del siglo xx. Por su frecuente uso para el diagnóstico de embarazo, en algunos países existen métodos sencillos y rápidos, cuya adquisición es posible en las farmacias y pueden ser utilizados por las mujeres cuando sospechen que están embarazadas. Estas pruebas de fácil evaluación de los resultados (positivo o negativo) se conocen como *home test* y se agrupan bajo el principio de la química seca. Los métodos cuantitativos que

se utilizan en los laboratorios son del grupo de los inmunoensayos que utilizan anticuerpos para las subunidades alfa y beta.

## ANTÍGENO PROSTÁTICO ESPECÍFICO

Otro marcador tumoral es el antígeno prostático específico (PSA). Es una glicoproteína cuyas funciones bioquímicas se desconocen. En el año 1979, Wang y sus colaboradores purificaron una proteína del tejido prostático y la identificaron como PSA. Se conoce con estas iniciales que derivan del nombre en inglés: *Prostate-Specific Antigen*.

En la sangre existe en dos formas: como un componente mayor de carácter complejo, del cual forma parte un inhibidor de las proteinasas representado por la alfa 1 antiqumiotripsina (PM 80 000-90 000) o por la alfa 2 macroglobulina, y como un componente menor (PM 30 000), que no está unido a ninguna proteína y que constituye la fracción libre.

El PSA está presente en la hiperplasia prostática benigna, que comienza en el hombre sano después de los 50 años y también está presente en el tejido prostático maligno.

Desde su descubrimiento, este marcador ha sido uno de los más utilizados. Por esa razón, se plantea que el drástico aumento en la incidencia del cáncer prostático, se puede atribuir al uso de este marcador como pesquisa.

Durante años ha sido demostrada la utilidad del PSA en el control de pacientes con cáncer prostático, pues modifica positivamente la evolución de este. Este antígeno hace posible:

1. La detección temprana del cáncer de próstata.
2. Una mayor exactitud en la estadificación de los pacientes antes del tratamiento quirúrgico.
3. El control de la respuesta de los pacientes a la terapéutica aplicada.

Los resultados falsos positivos que ocurren en la hiperplasia prostática benigna, pueden reducirse si se aplica la siguiente estrategia diagnóstica:

1. Cálculo de la concentración del PSA por unidad de volumen de la glándula prostática (densidad del PSA).
2. Cambios en el tiempo de la concentración del PSA en suero (velocidad del PSA).
3. Relación PSA total - PSA libre.

La concentración del PSA puede estimarse después de calcular el volumen de la próstata con un ultrasonido transrectal. Para cualquier concentración de PSA en suero, en la hiperplasia prostática benigna, las

dimensiones de la glándula siempre serán mucho mayores que las alcanzadas en el cáncer prostático. Por el contrario, las concentraciones de PSA en la hiperplasia prostática benigna siempre estarán por debajo de las encontradas en el cáncer de próstata para cualquier volumen glandular.

Los cambios en el tiempo de la concentración del PSA tienen gran importancia diagnóstica. Una elevación rápida de sus valores, por lo general se debe a la presencia de un proceso tumoral maligno.

La relación del PSA total y del PSA libre se ha convertido en un instrumento diagnóstico muy valioso para el número de falsos positivos que aparecen en la hiperplasia prostática benigna. La fracción compleja o PSA total se eleva en el cáncer prostático, mientras que la fracción libre se eleva en la hiperplasia prostática benigna. El cálculo del porcentaje de la fracción libre en relación con la total, es de gran ayuda diagnóstica. Como ejemplo se puede señalar que cuando la relación porcentual está por debajo del 10 %, la presencia del cáncer prostático es 8 veces más frecuente. Si se usa como valor de corte el 23 %, los estudios por biopsias pueden disminuirse de manera considerable.

Los métodos utilizados para la cuantificación de ambos PSA en el suero, están representados por el radioinmunoensayo, los ensayos inmunoenzimáticos y la electroquimioluminiscencia.

### CA 19-9

El marcador CA 19-9 es una glicoproteína cuya función fisiológica es desconocida, y se encuentra en la superficie de las células carcinomatosas. Sus valores se elevan en las neoplasias pancreáticas, colorrectales y gástricas. Su cuantificación se realiza en forma similar al resto de los marcadores glicoproteicos.

### CA 15-3

El marcador tumoral CA 15-3, identificado en el año 1984 en el suero de mujeres con cáncer de mama metastásico, es también una glicoproteína. Se origina en los alvéolos y conductos de las glándulas mamarias. Ninguno de los marcadores disponibles en la actualidad, tienen la sensibilidad requerida para la pesquisa de los tumores mamarios en la población femenina adulta. En la clínica, se usa sobre todo en el control de las pacientes que han necesitado de mastectomía. Los avances logrados en la detección temprana de estos tumores, con un diámetro inferior a 1 cm, se deben a la gran sensibilidad y expansión de la mamografía. La positividad de los resultados en este marcador no

siempre indica la presencia de cáncer. Puede mostrarse positivo en enfermedades benignas como: hepatitis crónica, cirrosis, sarcoidosis, tuberculosis, lupus eritematoso sistémico (LES), y en enfermedades malignas como: cáncer de pulmón y cáncer ovárico, además del mamario. Su cuantificación, al igual que el resto de los marcadores tumorales, se realiza con ensayos radioinmunoenzimáticos e inmunoenzimáticos.

### CA 125

El CA 125 es una glicoproteína de gran masa molecular, reconocida por el anticuerpo monoclonal OC 125. Se produce en las células epiteliales de los ovarios y su función fisiológica es desconocida. Su concentración aumenta en el cáncer ovárico. Debido a la baja incidencia relativa de este tumor, no se utiliza para pesquisas de la población general. Sus valores se elevan también en los tumores ováricos benignos, en el primer trimestre del embarazo, durante la menstruación y cuando existe endometriosis, salpingitis y pleuritis. En mujeres con historia familiar de cáncer ovárico, es útil su indicación, acompañada del estudio con ultrasonido. Su principal uso es en el control de las pacientes sometidas a ooforectomía y pueden encontrarse valores normales, a pesar de existir residuos tumorales microscópicos. Su cuantificación se realiza con ensayos inmunoradiométricos, inmunoenzimáticos y electroquimioluminiscentes.

### TIROGLOBULINA

La tiroglobulina es un marcador del grupo de las glicoproteínas. Se localiza en la glándula tiroidea y es la principal yodoproteína del ser humano. Lo producen las células neoplásicas tiroideas, al igual que las células tiroideas normales. Se utiliza en pacientes con tumores bien diferenciados, funcionales o no. Ante la presencia de un nódulo solitario, la elevación de este marcador sugiere el diagnóstico del carcinoma tiroideo. Por lo general se cuantifica por RIA y por métodos inmunoenzimáticos.

### BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- Bidart JM. Kinetics of serum tumor markers concentrations and usefulness in clinical monitoring. Clin Chem 1999; 45:10 1695-1707.
- Douglas CA. Clinical use of tumour markers based on outcome analysis I. Lab Med 1996;27:760-4.
- Douglas CA. Clinical use of tumour markers based on outcome analysis II. Lab Med 1996;27:817-21.

## **CONTENIDO**

---

### **Conceptos básicos/ 193**

Objetivos de la cuantificación de los medicamentos en la sangre/ 194

Nociones de farmacocinética/ 194

Criterios de selección/ 196

### **Métodos analíticos/ 196**

Métodos cromatográficos/ 197

Métodos no cromatográficos/ 197

### **Interpretación de los resultados/ 198**

### **Bibliografía recomendada/ 199**

### Capítulo 22



## MONITOREO DE LOS NIVELES DE MEDICAMENTOS EN LA SANGRE

*Dr. Jorge H. Suardíaz Pareras*

### RESUMEN

La determinación de los niveles de medicamentos en la sangre, resulta imprescindible para un tratamiento eficaz y para minimizar el riesgo de aparición de manifestaciones tóxicas, ya que la eficacia terapéutica de muchas drogas depende de su concentración hística y en la sangre. Esta, a su vez, no depende solo de la dosis administrada, sino de factores que determinan una variabilidad interindividual. El objetivo de este capítulo es iniciar al estudiante en el tema del monitoreo de los niveles de medicamentos en la sangre. Desde su aparición, este monitoreo puso en manos de los facultativos una poderosa arma para lograr un tratamiento racional, que ajuste las dosis de acuerdo con las características individuales de cada paciente. Por este motivo, constituye una actividad de importancia creciente en el laboratorio clínico. Se ofrecen, además, nociones de farmacocinética clínica, criterios de selección para que un medicamento sea monitoreado y se hace una revisión de los métodos analíticos para la determinación de los niveles de drogas en la sangre. Por último, se presentan los factores que se deben tener en cuenta para una correcta interpretación de los resultados.

### CONCEPTOS BÁSICOS

El desarrollo de la farmacocinética, a partir de los años 60 del siglo xx, representó una verdadera revolución en el campo de la farmacología e hizo aparecer nuevos métodos de análisis para la determinación de los niveles de medicamentos en la sangre, cada vez más sensibles y específicos, y con el empleo de volúmenes de muestra cada vez menores. En la actualidad resulta inconcebible comenzar a emplear un nuevo fármaco sin haber investigado antes sus propiedades farmacocinéticas; y no se puede hablar de una correcta posología, si no se realiza de manera periódica el monitoreo de los niveles de la droga en la sangre y, en algunos casos, de sus metabolitos.

La cuantificación de los niveles de medicamentos en la sangre, como estudio de rutina, fue introducida en el laboratorio médico por Ch. Pippenger, hace poco tiempo: su desarrollo y difusión abarca el último tercio del siglo xx. Hoy se sabe que la eficacia terapéutica de muchas drogas depende de su concentración

sanguínea e hística. Esta no depende solo de la dosis administrada, sino de varios factores que determinan una amplia variabilidad interindividual. Por ello, la determinación de los niveles de medicamentos en la sangre, resulta imprescindible para garantizar un tratamiento eficaz y minimizar el riesgo de aparición de manifestaciones tóxicas.

La introducción del monitoreo de los niveles de medicamentos en la sangre, en la práctica médica habitual, obedeció a un conjunto de factores como: el surgimiento de nuevas drogas, farmacológicamente muy activas, y muchas de ellas con estrecho margen toxicoterapéutico; el desarrollo de metodologías analíticas con suficiente sensibilidad, precisión y especificidad como para detectar, de manera confiable, los niveles de drogas presentes en la sangre; y la introducción de la computación en el trabajo del laboratorio clínico, que permite realizar, de forma rápida y segura, el análisis de los datos obtenidos. Desde su aparición, este tipo de

monitoreo puso en manos de los facultativos una poderosa arma para lograr tratamientos racionales, y ajustar las dosis de acuerdo con las características individuales de cada paciente. Por este motivo, constituye una práctica, cuyo valor crece dentro de la actividad del laboratorio clínico.

La importancia de lograr una adecuada interpretación de los resultados, le otorga al monitoreo de los niveles de medicamentos en la sangre, tal vez más que a ninguna otra actividad del laboratorio, un carácter interdisciplinario: involucra al laboratorista, al médico de asistencia, al farmacólogo, al farmacéutico y a la enfermera.

## OBJETIVOS DE LA CUANTIFICACIÓN DE LOS MEDICAMENTOS EN LA SANGRE

El objetivo que se persigue con la cuantificación de los medicamentos en la sangre es optimizar el tratamiento, mediante la individualización de las dosis. Esto quiere decir que los niveles de una determinada droga en la sangre, serán mantenidos en un intervalo, que es individual para cada paciente, pero que se encuentra, a su vez, dentro de ciertos límites que constituyen el *intervalo terapéutico*. El límite inferior de este intervalo, es el nivel más bajo con el cual puede lograrse algún resultado terapéutico y el límite superior es el nivel más alto por debajo del cual rara vez se observan manifestaciones de toxicidad.

Sin embargo, no debe inferirse que la concentración de una droga en la sangre equivale a su concentración en el sitio de acción (*receptor farmacológico*): solo la refleja, pues está demostrado que para muchas de las drogas de uso común, existe una estrecha correlación entre ambas concentraciones. Por tanto, resulta ocioso decir que la medición de los niveles de droga en el sitio de acción, es técnicamente imposible.

## NOCIONES DE FARMACOCINÉTICA

La farmacocinética incluye todos los procesos por los que pasa una droga desde que es introducida al organismo hasta que es eliminada de él. Estos procesos son:

1. Liberación.
2. Absorción.
3. Distribución.
4. Metabolismo.
5. Excreción.

Las variaciones que se observan en estos procesos, pueden obedecer a múltiples causas que, a su vez,

dependen de las características de la droga, del individuo o de ambos. Entre los que dependen de la droga están: la vía de administración, la forma farmacéutica empleada y las características específicas del medicamento (pK, coeficiente de partición lípido/agua, efecto de primer paso). Entre los que dependen del individuo se incluyen: factores genéticos, superficie corporal y composición del organismo, edad, estado nutricional, presencia o no de algún proceso patológico concomitante, embarazo, administración simultánea de otra (s) droga (s), etc.

**Liberación.** Es el proceso de separación del principio activo de los excipientes que lo contienen, en las formas farmacéuticas administradas por la vía oral. En el caso de las formas sólidas, debe ir precedida por su desintegración. Este proceso puede alterarse por factores propios del proceso tecnológico de elaboración del medicamento, pero también por características específicas del tubo digestivo del paciente o por la presencia de alimentos o de otras drogas en él. En la actualidad se producen tabletas de liberación sostenida, que permiten espaciar las dosis en el caso de ciertos medicamentos cuya vida media en el organismo es muy corta (como la teofilina o la nifedipina, por ejemplo).

**Absorción.** Es el proceso que ocurre cuando la droga administrada se integra al torrente sanguíneo (este paso no ocurre cuando se emplea la vía intravenosa). También el medicamento se modifica por factores que dependen de él o del paciente. Entre los primeros, el más importante es el *efecto de primer paso*, que es la degradación de una cantidad significativa de la droga en el hígado o, incluso, en las células de la pared intestinal, antes de alcanzar la circulación general. Entre los que dependen del paciente, el estado funcional del tubo digestivo (pH, motilidad, riego sanguíneo intestinal e integridad de las vellosidades) y la ingestión concomitante de alimentos o de otras drogas que interfieren o estimulan la absorción, son los factores que mayor influencia ejercen sobre el intervalo transcurrido entre el momento de administrar el fármaco y aquel en que se alcanza su máxima concentración en sangre ( $t_{\text{máx.}}$ ). La fracción de la droga que alcanza el torrente sanguíneo, se expresa como la biodisponibilidad de esta.

**Distribución.** En la medida que la droga comienza a penetrar en el torrente sanguíneo, de manera simultánea se inicia su distribución por todos los tejidos, aunque es necesario tener en cuenta que la fracción del medicamento unida a las proteínas plasmáticas no saldrá del compartimiento vascular: solo lo hará la fracción libre. Por lo tanto, es esta la fracción farmacológicamente activa, es decir, la que atraviesa las membranas celulares e interactúa con el receptor. Las drogas ácidas y

neutras se unen a la albúmina, mientras que las básicas lo hacen a las globulinas, sobre todo a la alfa-1 glicoproteína ácida; algunas pueden unirse tanto a la albúmina como a las globulinas. El porcentaje de unión a las proteínas es una característica intrínseca de cada droga. Es elevado en algunos casos, como la ciclosporina A, cuyo porcentaje de unión es del 98 %, o el propranolol, la fenitoína y el valproato de sodio, que se aproximan al 90 %. Esto debe tenerse en cuenta siempre en el momento de interpretar resultados, pues tanto en los estados de hipoproteinemia como en las situaciones en que el medicamento puede ser desplazado en mayor o menor medida de su unión a la albúmina (uremia, hiperbilirrubinemia, presencia de otras drogas con mayor afinidad por los sitios de unión a las proteínas) aumentará la fracción libre y, con ello, su efecto farmacológico y su toxicidad, a pesar de que los niveles sanguíneos de la droga total se mantengan en el intervalo terapéutico o, incluso, ligeramente por debajo de este.

El volumen de distribución de una droga es la relación que existe entre su contenido total en el organismo y su concentración en sangre. Sin embargo, este volumen de distribución siempre es aparente, pues ningún medicamento se distribuye de manera uniforme por el organismo (por ejemplo, solo las drogas liposolubles atraviesan con facilidad la barrera hematoencefálica). Además, si se tiene en cuenta que solo la fracción libre sale del compartimiento vascular para pasar a los tejidos, resulta que las drogas con elevado porcentaje de unión a las proteínas tienen elevados volúmenes de distribución aparente.

**Metabolismo.** El metabolismo de la mayoría de las drogas tiene lugar en el hígado. Las principales vías metabólicas son, en una primera fase, oxidación, reducción o hidrólisis y, en una segunda fase, acetilación, metilación o unión al ácido glucurónico. Por lo general, los metabolitos son más polares que la droga madre (más hidrosolubles). Muchos de ellos son inactivos, pero otros poseen actividad farmacológica o tóxica importante y, a veces, mayor aún que la del fármaco original (constituyen buenos ejemplos la desipramina y la nortriptilina, que son metabolitos de los antidepresivos tricíclicos imipramina y amitriptilina, respectivamente). Algunas drogas no sufren degradación metabólica (tal es el caso de penicilina G, methotrexate y litio).

La eficiencia de la biotransformación de una droga por el hígado, dependerá de la capacidad funcional de este, pero siempre deben tenerse en cuenta factores como la inducción de la actividad metabólica de algunas drogas que poseen esta capacidad (el fenobarbital y la fenitoína, por ejemplo) o por el contrario, la inhibición

de la actividad enzimática microsomal hepática de otros fármacos (como el ketoconazol). Esto se debe a que las enzimas metabolizadoras de drogas no poseen una especificidad significativa y, por lo tanto, interactúan con sustancias exógenas y endógenas. Estas interacciones entre drogas pueden ser del tipo de inhibición competitiva o no competitiva. La influencia de otros factores, como la disminución del flujo sanguíneo al hígado, la desnutrición o el alcoholismo, es esencial. También debe tenerse en cuenta la inducción metabólica por los hidrocarburos policíclicos presentes en el humo del cigarro, que afectan la vida media de drogas como la teofilina. Por último, es necesario recordar que pueden existir marcadas diferencias entre individuos en cuanto a la velocidad de los procesos metabólicos, determinada por la genética (acetiladores lentos o rápidos, por ejemplo). Lamentablemente, este último aspecto, rara vez se tiene en cuenta y constituye un campo de investigación apasionante.

**Excreción.** En lo fundamental, la excreción se realiza por la vía hepatobiliar (con las heces) o por la vía renal (con la orina, en el caso de los compuestos hidrosolubles). En ambos casos se produce un grado de reabsorción parcial, por medio de la circulación enterohepática o a través del túbulo contorneado distal, respectivamente. Siempre debe tenerse en cuenta la vía principal de eliminación, tanto para evitar el riesgo de toxicidad en caso de que esa vía no funcione de manera adecuada, como para no limitar de forma innecesaria un tratamiento (la vida media de la digoxina, por ejemplo, se eleva hasta 2,5 veces en la insuficiencia renal, pero no se afecta en la insuficiencia hepática; por lo tanto, es imprescindible ajustar las dosis o el intervalo entre ellas, en el primer caso y no se requiere modificación en el segundo). No debe perderse de vista que el íctero obstructivo afecta la excreción de compuestos por la vía biliar, incluso en ausencia de compromiso de la función hepática. La disminución del gasto cardíaco también limita la excreción, por disminución del flujo sanguíneo al órgano correspondiente.

La leche materna es también una vía importante de excreción, sobre todo de drogas básicas con elevada fracción libre, que conviene tener en cuenta. La saliva es otro líquido orgánico en el cual están presentes las drogas administradas. En ella se encuentra la fracción libre del medicamento, lo cual la convierte en una alternativa interesante como muestra para el monitoreo, en especial, porque para su obtención no se requieren procedimientos invasivos y porque no ofrece riesgo de contaminación con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o el de la hepatitis B o C para



el que la manipule. En los últimos tiempos, esto ha cobrado fuerza en los estudios relacionados con su utilización como muestra, para el diagnóstico de enfermedades por el laboratorio médico.

El llamado *estado de equilibrio* (o *estado estacionario*) se alcanza cuando se han equilibrado la absorción y la excreción de una droga por el organismo, al administrar dosis repetidas del medicamento. El tiempo necesario para ello, desde el comienzo del tratamiento, depende, en lo fundamental, de la vida media ( $t_{1/2}$ ) de la droga. Es el tiempo requerido para reducir a la mitad la concentración de la droga en el organismo, después que la fase inicial de distribución se ha completado, y está determinada por su constante de eliminación. Después de transcurrida una  $t_{1/2}$ , la concentración de la droga en la sangre equivale al 50 % de la cantidad absorbida; después de dos  $t_{1/2}$ , la concentración remanente será del 75 %; después de tres  $t_{1/2}$ , del 87,5 %; después de cuatro  $t_{1/2}$ , del 93,75 % y, transcurridas cinco  $t_{1/2}$ , el organismo retiene casi el 97 % de la droga administrada. Por ello, a partir de ese momento, la diferencia entre la concentración sanguínea máxima y la mínima será muy pequeña y los valores obtenidos reflejarán, de manera aproximada, la concentración media. Este proceso es el que permite fijar el intervalo entre las dosis y es decisivo para determinar en qué momento, a partir del inicio del tratamiento, se debe comenzar el monitoreo: por lo general, los valores obtenidos antes de que hayan transcurrido cinco vidas medias a partir del inicio del tratamiento, no brindan una información adecuada.

El momento inmediato anterior a la administración de una dosis, en un tratamiento crónico, se denomina *valle* (algunos autores le llaman *nadir*). Representa el instante en que el fármaco alcanza la más baja concentración en la sangre y es el más indicado para la toma de la muestra para el monitoreo de rutina, en la mayoría de los medicamentos. Si el régimen de dosis es el adecuado, el resultado obtenido no debe encontrarse por debajo de la concentración efectiva mínima, ni mucho menos por encima del nivel tóxico.

## CRITERIOS DE SELECCIÓN

No todas las drogas son candidatas para el monitoreo sistemático de sus niveles en la sangre. En realidad, solo una parte pequeña del arsenal terapéutico de la medicina actual, se selecciona para ello. Esto se debe a que en muchas ocasiones, la simple determinación de su concentración en la sangre, además de ser compleja, engorrosa y cara, no brinda una información adecuada, como sucede con la mayoría de los fármacos hipotensores y

con los antidiabéticos orales: resulta más práctico (y más barato) monitorear de manera periódica las cifras de tensión arterial o los niveles de hemoglobina glicada, respectivamente. En muchos casos, ocurre también que no está del todo clara la correlación entre los niveles de la droga en la sangre y sus efectos farmacológicos o tóxicos, o no es necesaria la individualización del tratamiento. En general, resulta importante el monitoreo de los niveles de aquellos medicamentos:

1. Que poseen un estrecho margen de seguridad toxicoterapéutico, con efectos tóxicos frecuentes y graves.
2. Que se emplean en tratamientos muy prolongados (o *de por vida*).
3. Que se emplean en enfermedades que hacen peligrar la vida del paciente o en las cuales es necesario mantener los niveles elevados para garantizar su recuperación.
4. Y cuando no exista ningún parámetro indirecto que permita evaluar, de manera confiable, los efectos del tratamiento.

Entre los medicamentos que cumplen estos parámetros, se encuentran los anticonvulsivantes: fenobarbital, primidona, etosuximida, fenitoína, carbamazepina, valproato y clonazepam; la digoxina, la teofilina, la ciclosporina A, el tacrolimus y el methotrexate; los antidepresivos tricíclicos: imipramina y amitriptilina y sus metabolitos: desipramina y nortriptilina (en la actualidad desplazados por medicamentos recientes en el mercado, con menor número de efectos adversos); el acetaminofén, las sales de litio, algunos antibióticos del grupo de los aminoglicósidos: kanamicina, amikacina, gentamicina, tobramicina, y algunos antiarrítmicos como: la lidocaína y la procainamida. No están de acuerdo los autores, en cuanto a la utilidad de monitorear, de manera sistemática, los niveles de otros antibióticos, de drogas neurolépticas, o de los ansiolíticos del grupo de las benzodiacepinas.

## MÉTODOS ANALÍTICOS

Los métodos analíticos para la determinación de los niveles de drogas en la sangre, requieren ser muy sensibles, específicos, exactos y reproducibles, además de rápidos (para la actuación en situaciones de emergencia, como la intoxicación con digitálicos o con teofilina) y brindar la posibilidad de automatización, que permita resolver la creciente demanda. Estos son los factores que han determinado, en gran medida, su evolución a lo largo de los últimos treinta años del siglo xx.

Durante algunas décadas, el método más empleado fue la espectrofotometría ultravioleta, ya casi abandonada.

Su principal ventaja radicaba en que estaba al alcance de cualquier laboratorio que contara con un espectrofotómetro, capaz de leer en longitudes de onda situadas en la región ultravioleta lejana del espectro. Los principios y las leyes que la rigen, ya han sido tratados en un capítulo anterior (véase el capítulo: “Análisis instrumental”). Este método tiene como inconvenientes la escasa sensibilidad y la relativa falta de especificidad, lo que obliga a un engorroso y largo proceso de extracción previo, y la cantidad de muestra que se necesita (por lo general mayor que 1 mL) limita su empleo en pediatría. A pesar de ello, algunos de estos procedimientos han mantenido su vigencia en la medicina forense, sobre todo por su bajo costo. Algo similar puede decirse de las técnicas fluorimétricas, aunque la sensibilidad de estas es superior a la de la espectrofotometría UV.

En general, los métodos empleados en la actualidad se pueden dividir en: cromatográficos y no cromatográficos.

## MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

La cromatografía de capa fina (TLC) se reserva para la identificación cualitativa y, por lo tanto, su empleo está vinculado más bien con la toxicología. Para los fines de identificación y cuantificación de medicamentos en la sangre, se emplean la cromatografía gas-líquido (GLC) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Las características generales de ambos métodos y sus principios de funcionamiento, han sido descritos con anterioridad. Sin embargo, es imprescindible reiterar que su especificidad, sensibilidad y elevada precisión, unidas a la posibilidad de separar la droga madre de los metabolitos, los convierte en métodos de referencia, con los cuales se comparan todos los demás procedimientos analíticos. La GLC se emplea en toxicología y en la pesquisa de dopaje entre los atletas. Por su parte, el método HPLC ofrece las ventajas de una mayor versatilidad, necesidad de menor volumen de muestra y de un procesamiento menos complejo. El empleo de rutina de los métodos cromatográficos para el monitoreo de medicamentos en la sangre, está limitado por su baja productividad. Ambas variantes son, en general, engorrosas y consumen mucho tiempo; aunque esto se ha modificado con la introducción de equipos robotizados, que realizan todas las operaciones sin intervención humana y cuyos resultados se analizan por un ordenador que, además, controla todo el proceso. En el caso de la GLC, los volúmenes de muestra requeridos también constituían un inconveniente, que se ha resuelto con la introducción de las columnas capilares y de detectores muy sensibles, como

el de nitrógeno-fósforo. Sin embargo, el costo de esta tecnología, de los consumibles, de los patrones y de los componentes de la fase móvil, es muy elevado, sin tener en cuenta el salario de los operadores, que debe ser un personal calificado, debido a la complejidad de la instrumentación. Estos factores imposibilitan que esos equipos se encuentren en todos los laboratorios e influyen para que su uso de rutina sea, hasta cierto punto, restringido.

## MÉTODOS NO CROMATOGRÁFICOS

Con la excepción del litio, que se determina con el empleo de la fotometría de llama, de absorción atómica o de electrodos selectivos, los métodos no cromatográficos son en la actualidad de tipo inmunoquímico. El principio en el cual se basan estos procedimientos analíticos, así como sus numerosas variantes, es objeto de estudio en la parte I. Por ello, en este acápite solo se exponen las posibilidades que ofrece cada una de estas variantes para el monitoreo sistemático de los niveles de medicamentos en la sangre.

El radioinmunoensayo (RIA) inició, hace casi medio siglo, la era del inmunoensayo en el laboratorio y sirve de paradigma a todas las demás metodologías de este tipo. En el caso de la determinación de medicamentos, se emplea como antígeno marcado, la droga que se desea investigar, unida a un isótopo (el más frecuente es el  $^{125}\text{I}$ ). El empleo de anticuerpos monoclonales ha conferido a este método una especificidad comparable a la de la cromatografía, lo cual, unido a su elevada sensibilidad y a su sencillez, le hace superior a esta para el empleo de rutina. Sin embargo, las limitaciones que posee el uso de sustancias radiactivas hacen que se prefieran los métodos alternativos. En el mercado existen estuches comerciales para la determinación por el RIA de digoxina, ciclosporina A, gentamicina, teofilina, methotrexate y neurolépticos.

En cuanto a la determinación por inmunoensayos enzimáticos, se emplean dos variantes: la homogénea (EMIT) y la unida a sorbente (ELISA). La más empleada para el monitoreo de medicamentos es la primera que, en las últimas dos décadas del siglo xx, se ha adaptado a diversos analizadores automáticos. Su metodología es muy rápida, sencilla, con altos niveles de sensibilidad y especificidad. En la actualidad, se acerca a treinta la cifra de los medicamentos que se pueden cuantificar por este método, sin contar los metabolitos de drogas de abuso, como la metadona, los cannabinoides o la cocaína. Su sencillez y rapidez, lo hacen

también muy apropiado para determinaciones de urgencia, en el caso de que estas se requieran (en especial en casos de intoxicación por digoxina o teofilina, además de la detección en orina de drogas de abuso).

La inmunofluorescencia polarizada (FPIA) ha alcanzado una amplia difusión y se aproxima a cuarenta la cifra de los medicamentos, metabolitos y sustancias de abuso que pueden determinarse por este método. Presenta como ventajas fundamentales la gran estabilidad de los reactivos y de la curva de calibración, su rapidez y sencillez, así como su alta sensibilidad y precisión.

También se emplean para la determinación de los niveles de medicamentos en la sangre, la inmunonefelometría (NIIA), el inmunoensayo fluorescente unido a sustrato (SLFIA) y a distintas variantes de la luminiscencia. Todos estos métodos están automatizados.

La introducción de los métodos de inmunoensayo puso al alcance de casi todos los laboratorios clínicos, el monitoreo de rutina de los niveles de medicamentos en la sangre.

## INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

De lo antes expuesto se desprende que está indicado el monitoreo de los niveles de un medicamento en la sangre, cuando se necesita mantenerlos en un intervalo establecido (*ventana terapéutica*), ya sea por el escaso margen de seguridad de la droga, o porque las características de la enfermedad así lo requieren: cuando se introduce un cambio en el régimen de dosificación o se altera el estado fisiológico del paciente; cuando se administran varias drogas de manera simultánea, y ocurre una interacción entre ellas; y cuando circunstancias patológicas modifican la absorción y la excreción del medicamento.

Para una correcta interpretación de los resultados, es preciso tener en cuenta los factores ya mencionados, en especial la coexistencia de otros estados de enfermedad del paciente o de perturbaciones fisiológicas (el embarazo es un ejemplo, pero se pueden citar: la desnutrición, la ancianidad, los bebés

prematurados y los pacientes sometidos a régimen dialítico), así como la administración conjunta de otras drogas. Pero el momento crucial de la evaluación de los resultados es el momento escogido para la toma de la muestra. No puede establecerse un seguimiento adecuado, si este momento no se ha estandarizado (el inmediato anterior a la primera dosis del día o *valle*), en el cual se obtiene la mínima concentración sanguínea. En algunos casos, puede ser conveniente conocer el *valor pico*, sobre todo cuando se sospecha que hay toxicidad, como sucede con alguna frecuencia en el tratamiento con teofilina o con aminoglicósidos. De todas formas, es importante saber que nunca serán comparables los resultados obtenidos en muestras tomadas en distintos momentos del proceso farmacocinético. Incluso, la concentración sanguínea de algunas drogas está sometida a fluctuaciones en el transcurso del día, independientemente del momento de ingestión de la dosis (*ritmo circadiano*). La droga anti-rechazo ciclosporina A es un ejemplo: debe tenerse en cuenta esto en el instante de programar la toma de muestras y al interpretar los resultados. También deben verse con reserva los valores obtenidos en la etapa inicial del tratamiento, en la cual aún no se ha alcanzado el estado de equilibrio. No resulta ocioso insistir en que, a pesar de que existen intervalos terapéuticos, los niveles de un medicamento en la sangre en un paciente en particular, se mueven en un intervalo que es específico para él, en un momento determinado de su evolución. La necesidad de individualizar el tratamiento y de ajustar las dosis de acuerdo con los resultados del monitoreo y con la respuesta clínica, es significativa en medicamentos tales como: la digoxina, los anticonvulsivantes y los antidepresivos tricíclicos, cuyas concentraciones *nadir*, en estado de equilibrio, pueden variar de un paciente a otro en diez veces, aun cuando se empleen dosis similares.

A continuación se resumen algunos parámetros farmacocinéticos importantes de un grupo de medicamentos, que suelen ser monitoreados con frecuencia. Esta tabla puede ser útil para interpretar los resultados (tabla 2.17).

**Tabla 2.17** Parámetros farmacocinéticos de algunos medicamentos monitoreados con frecuencia

<b>Drogas</b>	<b>Intervalo terapéutico</b>	<b>Nivel potencialmente tóxico</b>	<b>Vida media (h)</b>	<b>Principal vía de excreción</b>
Amikacina y kanamicina	1 a 4 µg/mL	> 8 µg/mL	3 a 15 (aumenta con la edad)	Renal
Amitriptilina y nortriptilina	80 a 200 ng/mL (suma de ambas)	Dentro del intervalo terapéutico	12 a 24	Hepática
Carbamazepina	4 a 10 µg/mL	> 10 µg/mL	6 a 20	Renal
Ciclosporina (según el tipo de trasplante)	100 a 400 ng/mL	> 400 ng/mL	10 a 12	Hepática
Digoxina	0,8 a 2 ng/mL	> 2 ng/mL	± 40	Renal
Fenitoína	10 a 20 µg/mL	> 30 µg/mL	8 a 36	Renal
Fenobarbital	15 a 40 µg/mL	> 60 µg/mL *	± 90	Renal
Gentamicina y tobramicina	0,5 a 2 µg/mL	> 2 µg/mL	3 a 15 (aumenta con la edad)	Renal
Imipramina y desipramina	180 a 240 ng/mL (suma de ambas)	Dentro del intervalo terapéutico	12 a 24	Hepática
Litio	0,6 a 1,2 mmol/L	> 2 mmol/L	20 a 30	Renal
Teofilina	10 a 20 µg/mL	> 20 µg/mL	6 a 8 (disminuye en fumadores)	Renal
Valproato	50 a 100 µg/mL	100 µg/mL	8 a 12	Renal

**Leyenda**

\* Se desarrolla tolerancia con el tratamiento crónico.

**BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA**

Burtis C, Ashwood E. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. Philadelphia: WB Saunders Co., 1996.

Hardmann JG. Goodman and Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics. New York: Mc Graw-Hill, 1995.  
Kaplan LA, Pesce AJ (eds.). Clinical Chemistry: Theory, Analysis and Correlation. 3<sup>rd</sup> ed. St. Louis: CV Mosby Co., 1996.

## **CONTENIDO**

---

### **Introducción/ 201**

- Anatomía de la médula/ 201
- Organización funcional. Compartimientos/ 202
- Regulación de la hematopoyesis/ 202

### **Eritropoyesis/ 205**

- Progenitores eritroides/ 205
- Factores de crecimiento para las células eritroides/ 206
- Precursores eritroides/ 206
- Eritrocitos/ 206
- Hemoglobina. Estructura y función/ 207
- Mecanismos de destrucción de los eritrocitos/ 210
- Sítios de destrucción de los eritrocitos/ 210

### **Trombopoyesis/ 210**

- Progenitores/ 210
- Megacariocitos/ 211
- Plaquetas/ 211
- Regulación de la trombopoyesis/ 212

### **Granulopoyesis/ 212**

- Secuencia de maduración de la serie granulopoyética/ 212
- Polimorfonuclear neutrófilo/ 213
- Eosinófilos/ 213
- Basófilos y mastocitos/ 214

### **Monocitopoyesis/ 214**

- Progenitores/ 214
- Secuencia de maduración de la serie monocítica/ 214
- Cinética y funciones de los monocitos/ 214

### **Linfopoyesis/ 214**

- Maduración y funciones de los linfocitos B/ 215
- Maduración y funciones de los linfocitos T/ 215
- Características morfológicas de los linfocitos maduros/ 215

### **Bibliografía recomendada/ 215**

### Capítulo 23



## HEMATOPOYESIS

*Dra. Tania I. Carballo Treto  
Dr. Ariel de J. Collina Rodríguez*

### RESUMEN

El proceso encargado de la producción de todas las células sanguíneas se denomina hematopoyesis. Se inicia con la embriogénesis y se mantiene durante toda la vida del individuo. El organismo realiza procesos que incluyen la autorrenovación de las células madres, la proliferación y el comprometimiento hacia una línea celular de las células progenitoras y la diferenciación de las células precursoras, para dar lugar a las células maduras, con funciones biológicas específicas (eritrocitos, leucocitos y plaquetas). En la regulación de la hematopoyesis participan factores estimuladores e inhibidores, algunos de los cuales se han obtenido de forma recombinante, lo que ha permitido su empleo como agentes terapéuticos en diferentes situaciones clínicas, como son: trasplante de médula ósea, anemia aplásica, insuficiencia renal, en los pacientes con inmunodeficiencias congénitas y adquiridas, entre otras. También desempeña una función muy importante el microambiente medular, definido como la red local de células estromales, células accesorias (linfocitos T y monocitos) y sus productos (matriz extracelular y citoquinas).

### INTRODUCCIÓN

La hematopoyesis (HTP) es el proceso de producción de todas las células sanguíneas, desde las primitivas (células madres o *stem cells*) hasta las maduras, que tienen funciones biológicas específicas. Comienza durante la embriogénesis (tercera semana) en el saco vitelino, y aparecen primero los eritrocitos nucleados con las hemoglobinas Gower I ( $\zeta_2\epsilon_2$ ), Gower II ( $\alpha_2\epsilon_2$ ) y Hb Portland ( $\zeta_2\gamma_2$ ). Esta etapa vitelina se mantiene durante las primeras 6 a 8 semanas de gestación. Alrededor de las 6 semanas se inicia la hematopoyesis hepática, el órgano principal durante la mitad de la gestación (entre 10 y 24 semanas), en que participa también el bazo. Los eritrocitos del hígado fetal son anucleados y tienen hemoglobina fetal predominante ( $\alpha_2\gamma_2$ ) y, en menor cantidad, Hb A ( $\alpha_2\beta_2$ ). Aunque los progenitores comprometidos para otras líneas son abundantes en esta fase de la hematopoyesis, se observan pocas células maduras. El último período es el medular, se aprecia

eritropoyesis aproximadamente a las 11 semanas y se convierte en el principal sitio hematopoyético desde las 24 semanas. Al concluir la gestación, la médula es un órgano exclusivo de producción de células sanguíneas, bajo condiciones normales.

### ANATOMÍA DE LA MÉDULA

Para el estudio de la médula, se divide en:

1. Sistema vascular: la sangre que irriga al hueso proviene de la arteria nutriente, la cual penetra la corteza y da lugar a la arteria central; luego se bifurca en las arterias medulares, de donde salen ramas que llegan hasta capilares que se unen a otras, y entra de nuevo en la cavidad medular hasta formar una red sinusoidal.

La hematopoyesis se produce en el espacio extravascular entre los senos venosos, los cuales están formados por una capa de células endoteliales que desempeñan una función en la salida selectiva de células maduras desde la

médula hasta el torrente sanguíneo y también en el movimiento de las células precursoras circulantes desde la sangre hasta el estroma medular.

2. Estroma medular: está constituido por:

- a) Células: fibroblastos, células endoteliales, macrófagos y adipocitos.
- b) Matriz extracelular: sus componentes principales son: colágeno, fibronectina, laminina y proteoglicanos.

El microambiente medular se define como la red local de células estromales, células accesorias (linfocitos T y monocitos) y sus productos (matriz extracelular y citoquinas), capaces de influenciar la autorrenovación, proliferación y diferenciación de las células progenitoras hematopoyéticas.

3. Células hematopoyéticas: se encuentran en cordones entre los senos venosos. Los eritroblastos se ubican cerca de la pared endotelial del seno venoso, al igual que los megacariocitos, mientras que las células precursoras y granulopoyéticas se ubican más alejadas. Los linfocitos y macrófagos se encuentran cerca de los vasos sanguíneos arteriolares.

## ORGANIZACIÓN FUNCIONAL. COMPARTIMIENTOS

El primer compartimiento está representado por las *stem cells* y las células progenitoras. Las primeras tienen dos propiedades fundamentales:

1. Autorrenovación: asegura que su número se mantenga constante a lo largo de la vida normal del individuo, regenerando nuevas células.
2. Pluripotencialidad: puede originar todas las líneas hematopoyéticas.

Como respuesta a diferentes estímulos, estas *stem cells* dan origen a células progenitoras multipotentes, las cuales se nombran de acuerdo con la progenie que producen: UFC-GEMM (unidad formadora de colonias gránulo-eritroide-monocítica-megacariocítica) y UFC-linfoide. Estas células pierden gradualmente su multipotencialidad y su capacidad de proliferación, y dan lugar a células progenitoras bipotentes o monopotentes comprometidas hacia 1 o 2 líneas hematopoyéticas (segundo compartimiento). Tienen gran capacidad de proliferación y capacidad de renovación muy limitada.

En la actualidad, se plantean 3 modelos para explicar el proceso de compartimiento celular:

1. Teoría del microambiente inductor: se propone que los diferentes nichos anatómicos dentro del microambiente inducen la diferenciación.
  2. Modelo competitivo: el control de la diferenciación está ejercido por factores humorales.
  3. La restricción del potencial de diferenciación de una célula madre está determinada de manera intrínseca, lo que puede ser un proceso estocástico (al azar) o de expresión secuencial.
- Este compartimiento da lugar a las células precursoras, reconocibles en la médula ósea, las cuales sufrirán cambios nucleares y citoplasmáticos, para formar el tercer compartimiento, constituido por las células maduras: eritrocitos, leucocitos (monocitos, granulocitos, linfocitos) y plaquetas (figura 3.1).

## REGULACIÓN DE LA HEMATOPOYESIS

La hematopoyesis es regulada por procesos de estimulación e inhibición.

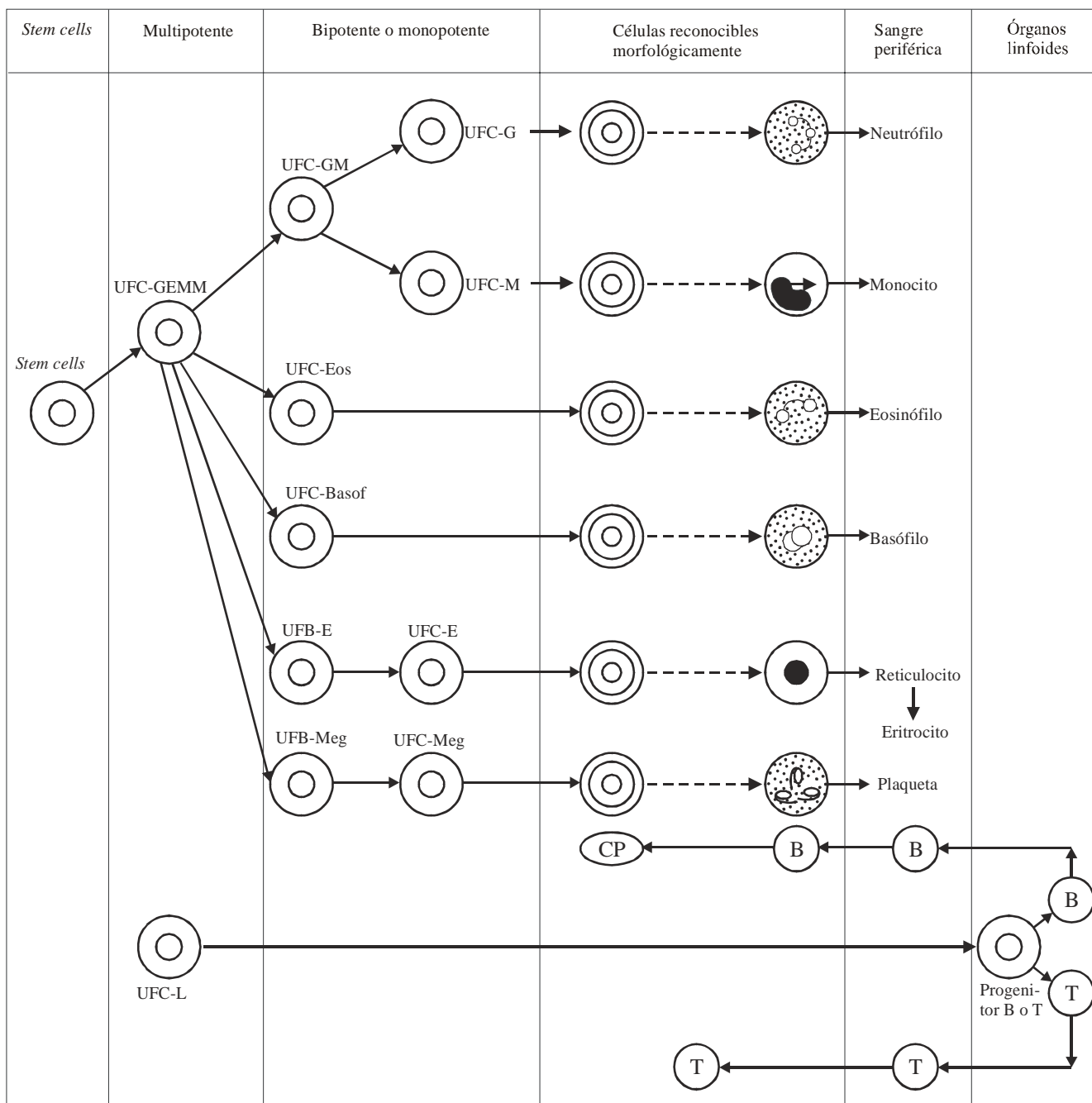
**Estimulación.** Se realiza por las glicoproteínas reguladoras que estimulan la proliferación celular, las actividades específicas de las células y su supervivencia. Las glicoproteínas reguladoras son factores estimuladores del crecimiento (FEC), que guardan relación con la colonia que estimulan y las interleucinas, que por lo general tienen una acción menos específica.

Estos factores realizan su función cuando se unen a receptores de membranas específicos y es posible que en muchas instancias causen proliferación en un tipo particular de progenitor, mientras que en otras actúan para prevenir la apoptosis o muerte celular programada.

Se plantea que el grado de desarrollo de la célula puede determinar su respuesta ante los factores estimulantes y que sea necesaria la combinación de estos factores para que una célula lleve a cabo una respuesta determinada:

1. Multipoyetinas: actúan sobre la *stem cell* y los progenitores de linaje múltiple, por ejemplo: IL-3, FEC-GM, ligando *kit*.
2. Factores de linaje restringido: actúan sobre líneas específicas, por ejemplo: FEC-G, FEC-M, FEC-Eos, EPO, TPO.
3. Factores de linaje promiscuo: incluye las diferentes interleucinas.

**Inhibición.** Los factores no son reguladores específicos del tejido hematopoyético. Entre ellos se describen: lactoferrina, prostaglandina E, factor de crecimiento



**Figura 3.1** Esquema de la hematopoyesis.

y transformación  $\beta$ , factor plaquetario 4, interferones y factor de necrosis tumoral. En la tabla 3.1 se exponen algunas de las acciones de estos factores sobre sus células diana.

Muchas de estas moléculas han sido obtenidas de forma recombinante, lo que ha permitido su empleo como agentes terapéuticos en diferentes situaciones clínicas, como son: el trasplante de la médula ósea, la anemia aplásica, la insuficiencia renal, las inmunodeficiencias congénitas y adquiridas, entre otras. Ade-

más, la determinación de los niveles de estos factores en sangre y otros líquidos biológicos tiene valor en la evaluación de múltiples procesos fisiológicos y fisiopatológicos (figura 3.2).

Las células estromales pueden interactuar con las *stem cells* por vía directa o por la matriz extracelular. Además, producen citoquinas que actúan sobre las células diana de la hematopoyesis. Las células accesorias también producen citoquinas y estas, a su vez, regulan las células estromales y accesorias.



**Tabla 3.1** Hematopoyesis. Factores estimuladores e inhibidores

<b>Factor</b>	<b>Célula de origen</b>	<b>Célula diana</b>	<b>Efectos sobre la célula diana</b>
IL-1	La mayoría de las células	Célula T Célula endotelial y fibroblasto Hipotálamo Hígado	Proliferación Induce la expresión de FEC Fiebre Induce la síntesis de proteínas de fase aguda
IL-2	Linfocitos T	Linfocito T Células NK Linfocito B	Crecimiento y producción de citoquinas Crecimiento y activación Crecimiento y síntesis de anticuerpos
IL-3	Linfocitos T y mastocitos	Es una multipoyetina que actúa sobre diferentes colonias y células y en la proliferación de células T	Estimula el crecimiento y diferenciación de colonias de diferentes linajes. Estimula la diferenciación de linfocitos B
IL-4	Linfocitos T	Células B activadas Células T UFC-GM	Cambio de isotipo para Ig Crecimiento y proliferación Crecimiento junto a otros FEC
IL-5	Linfocitos T	Eosinófilos Linfocitos B Linfocitos T citotóxicos	Producción y activación Crecimiento Activación
IL-6	Macrófagos	Célula T Célula B Hígado Megacariocitos Célula plasmática	Proliferación Coinduce la diferenciación Induce la síntesis de proteínas de fase aguda Estimula la megacariopoyesis Estimula el crecimiento de plasmocitoma
FEC-GM	Mastocitos, linfocitos T, células endoteliales, fibroblastos, células del timo	Célula progenitora hematopoyética. Multilínaje. Colonias granulocíticas, monocíticas y eosinófilas	Linfocitos T Estimula el crecimiento Crecimiento y funcionamiento de células maduras Coestimula su proliferación
Factor Steel (ligando <i>kit</i> )	Fibroblastos, células endoteliales, estromales de médula ósea, hepatocitos, tejidos embrionarios	UFC-GEMM, BFU-E y UFC-Meg Precursores de mastocitos	Crecimiento, actuando junto a otros FEC Proliferación y diferenciación
Interferón 8	Células T y NK	Macrófagos, células endoteliales y NK	Activación
Factor de crecimiento y transformante $\beta$	Células T y macrófagos	Células T y macrófagos	Inhibe la activación y la proliferación
Factor de necrosis tumoral	Macrófagos, células B y células NK	Neutrófilos Hipotálamo Hígado Músculo Linfocitos y progenitores hematopoyéticos	Activación (inflamación) Fiebre Induce la síntesis de proteínas (fase aguda) Catabolismo Inhiben la proliferación

**Tabla 3.1** Continuación

<b>Factor</b>	<b>Célula de origen</b>	<b>Célula diana</b>	<b>Efectos sobre la célula diana</b>
IL-7	Células estromales de médula, bazo y tejido del timo	Células pre-B Células pre-T Célula de Sézary	Induce crecimiento clonal Estimula el crecimiento Estimula el crecimiento
IL-8	Macrófagos, neutrófilos, fibroblastos, células endoteliales	Neutrófilos Linfocito T Basófilo Células endoteliales	Activación de sus funciones Quimiotaxis Liberación de histamina y leucotrienos Estimula la angiogénesis
IL-9	Linfocitos T	BFU-E Célula T activada UFC-GM	Crecimiento clonal junto a la eritropoyetina Proliferación Crecimiento
IL-10	Linfocitos T Macrófago Célula B activada	Células B Macrófagos Célula T	Coestimulador de su proliferación Inhibe la producción de especies reactivas de O <sub>2</sub> Inhibe la proliferación
IL-11	Fibroblastos Células estromales de médula ósea	Progenitores HTP primitivos BFU, UFC-E y BFU-Meg Hígado	Acorta la duración de la fase <i>G<sub>0</sub></i> del ciclo celular Estimula el crecimiento clonal Induce la síntesis de proteínas de fase aguda
IL-12	Macrófagos	Célula T Célula NK	Crecimiento y diferenciación Activación

**Leyenda**

IL: interleucina.

FEC: factor estimulante del crecimiento.

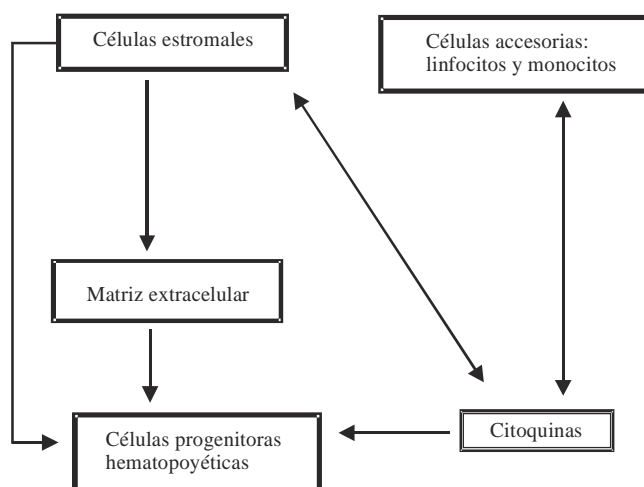
NK: *natural killer* o células asesinas naturales.

UFC-GM: unidad formadora de colonias granulomonocíticas.

UFC-MEG: unidad formadora de colonias megacariocíticas.

UFC-GEMM: unidad formadora de colonias gránulo-eritro-monocítica-megacariocítica.

BFU-E: unidad formadora de colonias eritroides explosivas.



**Figura 3.2** Regulación de la hematopoyesis por el microambiente medular.

## ERITROPOYESIS

### PROGENITORES ERITROIDES

La eritropoyesis es el proceso por el cual la médula ósea produce eritrocitos. Se denomina eritrón al conjunto de células eritroides, desde las progenitoras hasta el eritrocito maduro.

Se han identificado 2 tipos de progenitores eritroides:

1. Unidad formadora de colonias eritroides “explosivas” o iniciadoras (UFB-E):

a) Características:

- Originan colonias de más de 30 000 células que contienen hemoglobina.
- Constituyen una reserva quiescente (solo el 10 % se encuentra en el ciclo celular).
- Capacidad autolimitada de renovación.

## 2. Unidad formadora de colonias eritroides (UFC-E):

### b) Características:

- Son más diferenciadas que las anteriores.
- Forman colonias eritroides pequeñas (de 8 a 65 células).
- Potencial proliferativo limitado.
- No se autorrenuevan.

## FACTORES DE CRECIMIENTO PARA LAS CÉLULAS ERITROIDES

El regulador fisiológico de la producción eritrocítica es la eritropoyetina (EPO), glicoproteína que se produce en los riñones, en las células peritubulares de la corteza, y en el hígado en menor proporción, cuando aumentan las demandas de oxígeno en el organismo: la glicoproteína se transporta por el torrente sanguíneo hasta la médula, donde se une a receptores que presentan los progenitores eritroides, en lo fundamental, UFC-E. Los eventos intracelulares que ocurren después de esta unión no se conocen por completo, pero parece que la EPO estimula todos los procesos que caracterizan a estas células (síntesis de hemoglobina, globina y proteínas del citoesqueleto).

Estudios recientes plantean que la EPO modula la apoptosis en progenitores tardíos, lo cual es indispensable para su supervivencia y progresión a eritrocitos maduros. Otros factores que se requieren son:

1. Ligando *kit*: presenta receptores en UFB-E que persisten en las células hasta el estadio de proeritroblasto.
2. IL-3 y FEC-GM: tienen efecto estimulante sobre UFB-E.

## PRECURSORES ERITROIDES

Los precursores eritroides se reconocen por su morfología y presentan la siguiente secuencia de maduración (figura 3.3 del anexo):

**Proeritroblasto → eritroblasto basófilo → eritroblasto policromatófilo → eritroblasto ortocromático → reticulocito**

**Proeritroblasto.** De tamaño grande: de 20 a 25  $\mu\text{m}$ . Tiene un núcleo redondo, central, que ocupa la mayor parte de la célula. Presenta cromatina clara y homogénea, con cierto aspecto granuloso y de 1 a 2 nucléolos. Posee citoplasma: escaso, basófilo, con halo perinuclear. Tiene polirribosomas en elevada concentración, aparato de Golgi, gránulos de naturaleza lisosomal y ferritina en pequeñas invaginaciones en la superficie o difusa en el citoplasma.

**Eritroblasto basófilo.** De tamaño menor que el proeritroblasto: de 16 a 18  $\mu\text{m}$ . Posee un núcleo central con cromatina que tiene algunas condensaciones y donde no se observan nucléolos. El citoplasma es más abundante y de color azul marino.

**Eritroblasto policromatófilo.** Constituye la expresión de síntesis de la hemoglobina. El tamaño es de 8 a 12  $\mu\text{m}$ . Posee un núcleo central y redondo, cromatina densa y condensada. Su citoplasma tiene un color que va desde azul pálido al gris, homogéneo por completo. Es la última célula con capacidad mitótica.

**Eritroblasto ortocromático.** Tamaño: de 7 a 10  $\mu\text{m}$ . Núcleo pequeño con cromatina muy condensada y a veces intensamente picnótica, el cual será expulsado. Citoplasma: su color varía desde el gris oscuro hasta el rosa, idéntico al del eritrocito. No tiene capacidad mitótica, puede todavía sintetizar proteínas y hemoglobinas.

**Reticulocito.** Tamaño: de 8 a 9  $\mu\text{m}$ . Es anucleado, aunque persisten algunas mitocondrias, ribosomas y restos del retículo endoplasmático. Se tiñe con coloración supravital, que precipita el material ribosomal. Pasa de la médula a la sangre periférica y en 24 horas finaliza en ella la maduración, y da lugar al eritrocito maduro.

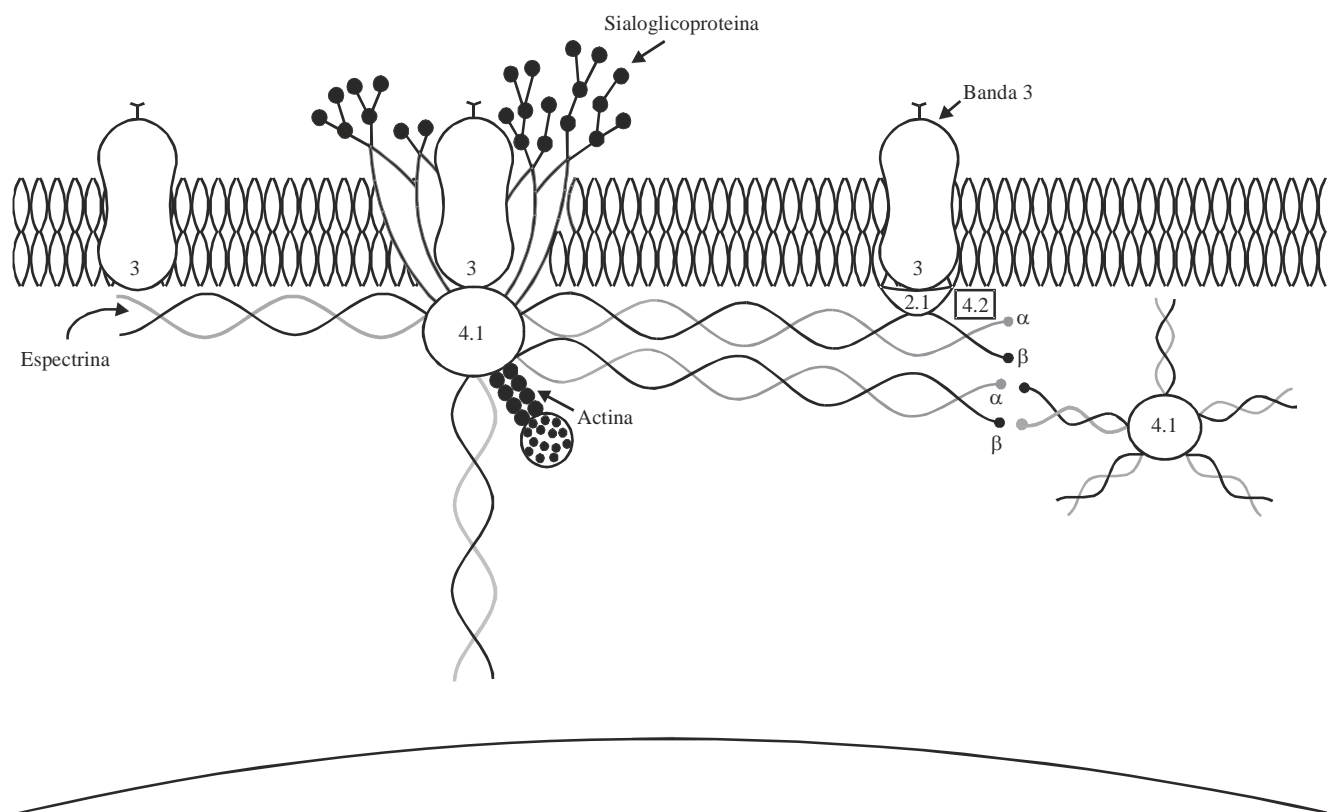
## ERITROCITOS

El eritrocito constituye la célula madura de la serie. Tiene forma de disco bicóncavo y su tamaño es de 8  $\mu\text{m}$ . Su vida media es de 120 días, durante los cuales debe cumplir su funcionamiento de transportar oxígeno. Para ello tiene una propiedad importante que es la deformidad que le permite atravesar capilares de solo 2 a 3 mm, repetidamente. Esta propiedad tiene relación con 3 factores:

1. Geometría de la célula: disco bicóncavo.
2. Viscosidad: debida al contenido de hemoglobina.
3. Componentes de la membrana celular y el citoesqueleto.

La membrana está compuesta por una bicapa lipídica, en la que predominan los fosfolípidos y el colesterol, por proteínas integrales de membrana y por proteínas periféricas:

1. Proteínas integrales: banda 3 y glicoforina.
2. Proteínas periféricas: espectrina, ankirina (banda 2.1, 2.2, 2.3 y 2.6), banda 4.1, banda 4.2, banda 4.9, anquína y banda 7. Se establecen interacciones horizontales y verticales:
  - a) Horizontales:
    - Dímero espectrina-dímero espectrina.
    - Espectrina-4.1-actina.
  - b) Verticales:
    - Espectrina-bicapa lipídica.
    - Espectrina-2.1-banda 3.
    - Espectrina-4.1-glicoforina (figura 3.4).



**Figura 3.4** Membrana eritrocitaria.

### Bioquímica del eritrocito

El eritrocito no tiene fosforilación oxidativa, sistema de citocromo, ni ciclo de Krebs, no puede sintetizar lípidos ni proteínas. La vía de producción de energía es la glicolítica anaerobia donde se forman 3 importantes productos: el NADH (cofactor en la reacción de reducción de metahemoglobina), el ATP (principal nucleótido de fosfato de alta energía) y el 2,3 difosfoglicérico (un regulador en la función de la hemoglobina y de la reserva energética, formado en el cortocircuito de Rapoport Luebering) (figura 3.5).

### Cortocircuito hexosa-monofosfato o vía de las pentosas

El cortocircuito hexosa-monofosfato o vía de las pentosas se ramifica de la principal vía glicolítica. El primer paso de esta vía es catalizado por la enzima glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G 6 PD), reacción en la que se reduce el NADP a NADPH, cofactor requerido para la reducción del glutatión oxidado a glutatión reducido (GSH), el cual se requiere para proteger a las células contra el estrés oxidativo.

### Formación y reducción de metahemoglobina

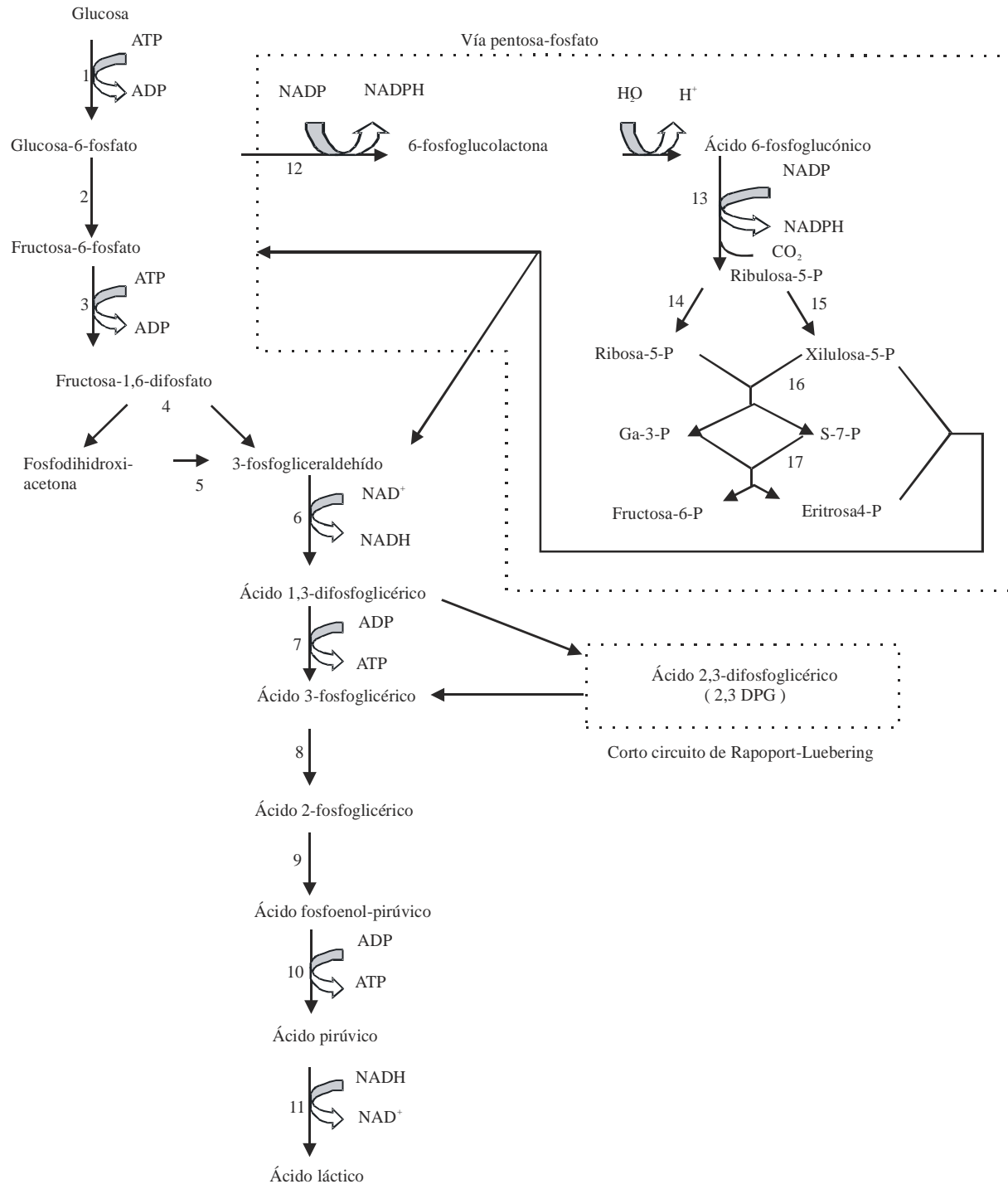
La metahemoglobina es la forma de la hemoglobina en la cual el hierro del hem ha sido oxidado a forma

férrica ( $\text{Fe}^{+3}$ ). Esta forma no es funcional, ya que no se puede unir al oxígeno. Aunque de manera constante se producen pequeñas cantidades, existen potentes sistemas enzimáticos y no enzimáticos que reducen la metahemoglobina, y convierten el hierro al estado ferroso ( $\text{Fe}^{+2}$ ).

## HEMOGLOBINA. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

### Estructura de la hemoglobina

La hemoglobina (Hb) está constituida por una parte proteica llamada globina y una parte prostética llamada hem, en cuyo centro se localiza un átomo de hierro. Cada molécula de hemoglobina contiene 2 pares de cadenas polipeptídicas (las  $\alpha$  con 141  $\alpha\alpha$  y las  $\beta$  con 146  $\alpha\alpha$ ). Cada una de las cadenas está unida a un grupo hemo. Las cuatro subunidades están unidas por medio de enlaces débiles de tipo salino de hidrógeno e interacciones no polares de Van der Waals, que forman una estructura tridimensional con la característica de que los grupos polares se sitúan hacia el exterior y los no polares, en el interior, y el grupo hem se encuentra contenido en una bolsa no polar y forma varios contactos con la cadena polipeptídica (figura 3.6).



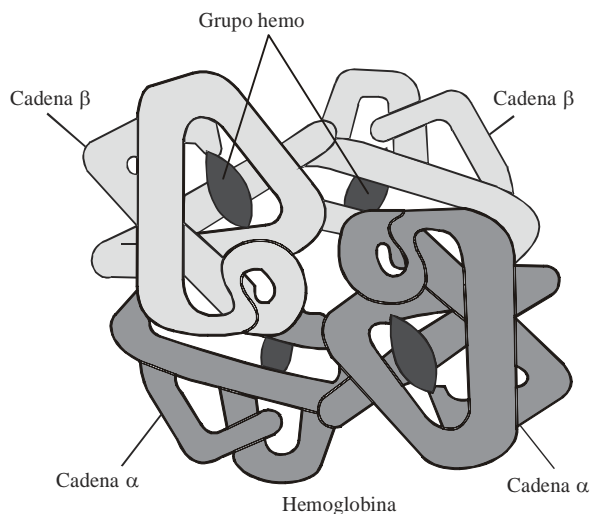
### Leyenda

1. Hexoquinasa
2. Glucosafosfatoisomerasa
3. Fosfofructoquinasa
4. Aldolasa
5. Triosafosfatoisomerasa

6. Fosfogliceraldehído-deshidrogenasa
7. Fosfogliceratoquinasa
8. Fosfogliceromutasa
9. Enolasa
10. Piruvatoquinasa
11. Láctico deshidrogenasa

12. Glucosa-6-P-deshidrogenasa
13. 6-fosfogluconato-deshidrogenasa
14. X-5-P epimerasa
15. R-5-P isomerasa
16. Transquetolasa
17. Transaldolasa

**Figura 3.5** Vías metabólicas de la glucosa en el eritrocito.



**Figura 3.6** Estructura de la hemoglobina.

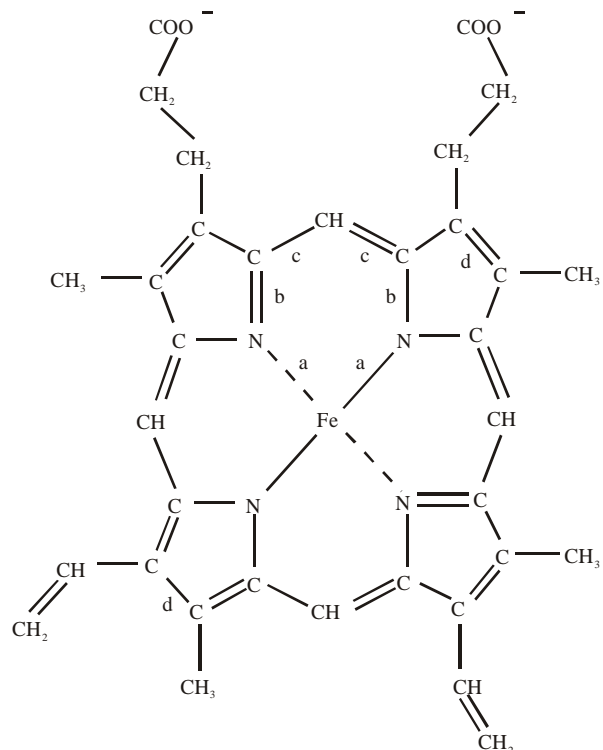
El grupo hemo está formado por un anillo porfirínico que contiene 4 grupos pirrólicos unidos entre sí por puentes metenos (CH). En medio de este anillo se sitúa un átomo de hierro (figura 3.7).

Cada grupo pirrólico se sintetiza a partir de la glicina y el ácido succínico (intermediario del ciclo de Krebs), los cuales se unen por medio de la enzima para formar el ácido  $\delta$ -aminolevulínico. En este proceso ocurren varias reacciones enzimáticas hasta la producción de protoporfirina. Por medio de la enzima hemosintetasa se une un átomo de hierro a la protoporfirina para formar el hem (figura 3.8).

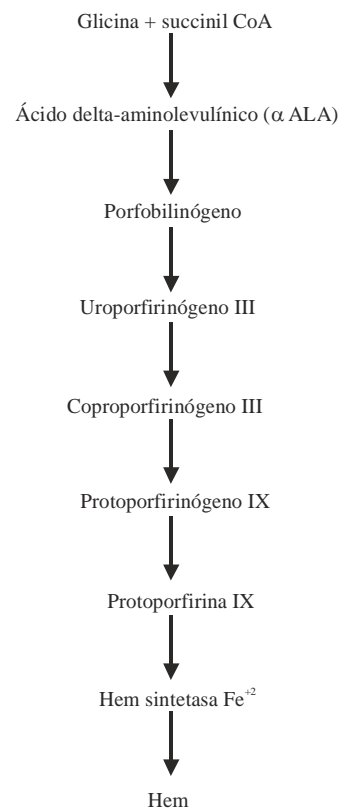
Las cantidades y tipo de las hemoglobinas humanas producidas a cualquier edad, están determinadas, primero, por la expresión selectiva de los genes individuales (genes globínicos) que codifican cada cadena de globina. Estos genes se localizan en 2 bloques ( $\alpha$  y  $\beta$ ), dentro de los cromosomas 16 y 11, respectivamente, y se disponen de acuerdo con la secuencia de expresión ontogenética. El bloque  $\alpha$  ocupa una región de 35 kb aproximadamente, y en él se localizan 3 genes que se expresan ( $\xi$ ,  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ ) y 3 genes que no se expresan ( $\Psi\xi_1$ ,  $\Psi\alpha_1$  y  $\Psi\alpha_2$ ). El bloque  $\beta$  ocupa una región de 70 kb y en él se localizan 5 genes que se expresan ( $\epsilon$ ,  $\gamma^A$ ,  $\gamma^G$ ,  $\delta$  y  $\beta$ ) y un pseudogen situado entre  $\gamma$  y  $\delta$ .

### Función de la hemoglobina

La función de la hemoglobina consiste en transportar oxígeno ( $O_2$ ) desde los pulmones hasta los tejidos y el dióxido de carbono ( $CO_2$ ) (que es un producto de los procesos metabólicos), en sentido inverso.



**Figura 3.7** Esquema del hem.



**Figura 3.8** Síntesis de hem.

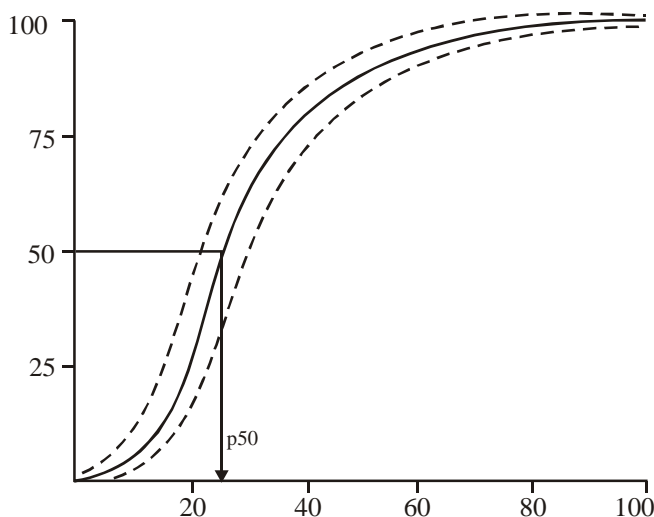
Una de las propiedades más importantes de la hemoglobina es su elevada afinidad por el oxígeno en presencia de cantidades moderadas de gas (pulmones), y su baja afinidad en lugares donde apenas hay gas (tejidos).

La interacción entre Hb y  $O_2$  se caracteriza por la curva de disociación del  $O_2$  que se obtiene cuando el porcentaje de Hb saturado con  $O_2$  se relaciona en una gráfica con la presión parcial de  $O_2$ . Esta curva es sigmoide y sus características se relacionan con las propiedades de la hemoglobina y el medio, dentro del eritrocito: pH, temperatura y concentración del 2,3 difosfoglicérido (2,3 DPG) (figura 3.9).

La oxigenación de un grupo hem produce un cambio espacial intermolecular que facilita la oxigenación de los grupos hem restantes, con un incremento más bajo de la presión parcial de  $O_2$ . Este proceso se denomina: interacción hem-hem.

La disminución del pH reduce la afinidad (efecto Bohr), lo que facilita la entrega de  $O_2$  a los tejidos.

La última reacción está dada por su capacidad para combinarse con los intermediarios glucolíticos fosforilados (2,3 DPG), que tienen preferencia por la Hb reducida y facilita la disociación del  $O_2$ .



**Leyenda**  
p50: presión parcial de oxígeno a la cual la hemoglobina está saturada al 50 %.

**Figura 3.9** Curva de disociación del oxígeno.

## MECANISMOS DE DESTRUCCIÓN DE LOS ERITROCITOS

Se postulan 4 mecanismos de destrucción de los eritrocitos:

1. Lisis osmótica.
2. Eritrofagocitosis.
3. Citólisis inducida por el complemento.
4. Fragmentación.

## SITIOS DE DESTRUCCIÓN DE LOS ERITROCITOS

Los sitios de destrucción de los eritrocitos son:

1. Extravascular: sobre todo en macrófagos del bazo y el hígado.
2. Intravascular: del 10 al 20 % de destrucción del eritrocito es intravascular y utiliza el sistema de la haptoglobina.

**Haptoglobina.** Glicoproteína sintetizada en el hígado que forma un complejo con la hemoglobina. Este complejo es removido por el sistema mononuclear fagocítico hepático en un tiempo rápido.

La hemoglobinuria se presenta cuando la cantidad de hemoglobina intravascular supera el poder de unión a la haptoglobina y la capacidad de absorción de los túbulos renales.

**Hem, hemopexina y metahemalbúmina.** La hemoglobina libre en el plasma es oxidada rápidamente a metahemoglobina, la cual se disocia en hem y globina. El hem se une a una globulina  $\beta$  del suero, llamada hemopexina y forma un complejo que sufre endocitosis en el hígado. Una parte de los grupos hem de la Hb libre circulante se une también a la albúmina y produce metahemalbúmina, que se observa solo cuando existe hemólisis intensa.

**Catabolismo de la hemoglobina.** Los eritrocitos senescentes son removidos de la circulación por los macrófagos del bazo, del hígado y de la médula. La globina se separa y es catabolizada muy rápido, en aminoácidos. El complejo de porfirina restante es dividido por la enzima hem-oxigenasa, y da lugar a la formación de una molécula de  $CO_2$  y, al mismo tiempo, la molécula de hierro de la Hb es liberada para su reutilización. La molécula resultante, llamada biliverdina, es reducida de manera enzimática en bilirrubina libre o no conjugada, la cual es conducida al hígado a través del plasma, y unida a la albúmina. Luego se conjuga en las células parenquimatosas con ácido glucurónico y, así, es excretado en la bilis y luego en el duodeno. Una pequeña cantidad es reabsorbida en la sangre (circulación enterohepática). La bilirrubina intestinal recibe la acción de bacterias y se forman urobilinógenos que se eliminan en los excrementos, y una pequeña cantidad es reabsorbida de los intestinos y excretada en la orina.

## TROMBOPOYESIS

### PROGENITORES

**Células progenitoras.** Son las encargadas de la expansión del número de megacariocitos y proliferan como respuesta a un grupo de factores de crecimiento.

**UFB-Meg.** Unidad formadora de colonias megacariocíticas explosivas; tiene un alto potencial proliferativo, por lo general, de 100 a 5 000 megacariocitos por célula.

**UFC-Meg.** Tiene un potencial proliferativo muy limitado. Genera de 4 a 32 megacariocitos por célula. No es el primero en responder a la trombocitopenia.

## MEGACARIOCITOS

La secuencia de maduración de los megacariocitos (figura 3.10 del anexo) es:

**Promegacarioblasto → megacarioblasto → promegacariocito → megacariocito**

**Megacariocitos inmaduros (promegacarioblasto).** Se identifican por la expresión de marcadores específicos: peroxidasa plaquetaria, glicoproteína II<sub>b</sub>-III<sub>a</sub>, factor von Willebrand. Cesan de proliferar, pero continúan aumentando su ADN. Son muy sensitivos a la demanda de trombopoyetina.

**Megacarioblasto (estadio I).** Tamaño menor. Núcleo único con nucléolos. Citoplasma basófilo.

**Promegacariocito (estadio II).** Célula grande. Núcleo multilobulado. No tiene nucléolos. Citoplasma ligeramente basófilo con granulaciones azurófilas.

**Megacariocitos.** Tienen la propiedad de sintetizar ADN sin sufrir mitosis y son los encargados de producir las plaquetas.

**Megacariocito maduro granular (estadio III).** Tamaño entre 15 y 56 µm. Citoplasma rosado y granular.

**Megacariocito maduro formador de plaquetas (estadio IV).** Citoplasma más extenso, repleto de granulación azurófila. Contiene zonas internas delimitadas por membranas que se forman por invaginaciones de la membrana externa durante el proceso de maduración de la célula. El citoplasma tiene diversos organelos que formarán parte de las plaquetas generadas por la fragmentación de las zonas demarcadas. Los principales organelos son: aparato de Golgi, mitocondrias, ribosomas, microtúbulos y microfilamentos. Además, tienen diferentes tipos de gránulos que se dividen en: gránulos α, gránulos densos, lisosomas y microperoxisomas.

**Megacariocitos extramedulares.** Megacariocitos o sus fragmentos se encuentran, en ocasiones, en la circulación, asociados con algunas enfermedades como: síndromes mieloproliferativos crónicos, enfermedad de Hodgkin, después de las cirugías y en los leucocitos, por infección. Se observan, además, en número significativo, en los vasos pulmonares y el bazo; en estos sitios producen del 7 al 15 % de las plaquetas.

## Proliferación de los megacariocitos

**Maduración del núcleo.** Ocurre por mecanismos denominados endomitosis. El material nuclear se reduplica, pero el núcleo no se divide, más bien se forma en un núcleo poliploide.

**Maduración del citoplasma.** Manifestado por el progresivo incremento en su cantidad y granularidad con pérdida de la basofilia; ocurre sin división. Tanto la maduración del núcleo como la del citoplasma aumentan el tamaño celular.

**Producción plaquetaria.** La formación comienza con el desarrollo por el megacariocito de proyecciones citoplasmáticas largas dentro de los espacios medulares extravasculares. Estos penetran la membrana del sinusoides por ruptura de la célula endotelial y, al fragmentarse, dan lugar a las plaquetas. También pueden formarse por demarcación simultánea de grandes porciones del citoplasma de los megacariocitos.

## PLAQUETAS

Las plaquetas son células de tamaño heterogéneo, al igual que su densidad y características tintoriales. Tienen forma redonda u oval, citoplasma azul claro con gránulos azurófilos y no tienen núcleo.

**Ultraestructura.** Las plaquetas presentan una membrana trilaminar compuesta por lípidos, carbohidratos, glicoproteínas y receptores. Estas células tienen forma discoide en reposo, y están soportadas por una banda de microtúbulos que está situada debajo de la membrana. El sistema tubular denso constituye un almacén de calcio, mientras que el canalicular es una vía de acceso al exterior para la liberación de sustancias. Los gránulos densos tienen serotonina, nucleótidos de adenina y calcio y en los gránulos α se encuentran: factor plaquetario 4, β-tromboglobulina, factor V, trombospondina, fibrinógeno, factor von Willebrand, factor de crecimiento derivado de plaquetas.

**Otros organelos.** Lisosoma, peroxisomas, aparato de Golgi.

**Distribución de las plaquetas.** Hay  $\frac{2}{3}$  en la circulación,  $\frac{1}{3}$  en el bazo u otro sitio extravascular. La mezcla esplénica es intercambiable con la circulante.

**Vida media plaquetaria.** Por estudio *in vitro* con  $^{51}\text{Cr}$  se estima que sea de 7 a 11 días.

**Producción diaria.**  $35 \times 10^9 \pm 4,3 \times 10^9$  plaquetas.

**Metabolismo energético de las plaquetas.** La energía plaquetaria es derivada del metabolismo de la glucosa, y proveída por la glicólisis y el ciclo del ácido tricarboxílico. La reserva de energía es aportada por la



mezcla metabólica de los nucleótidos plaquetarios. Toda la energía se utiliza para mantener la integridad de la estructura plaquetaria y en las reacciones que se producen cuando estas células responden a estímulos.

**Funciones de las plaquetas.** Tienen una función muy importante en la hemostasia primaria. Como respuesta al daño vascular, las plaquetas se adhieren muy rápido a la matriz subendotelial. Los contactos iniciales se realizan entre el complejo de glicoproteínas Ib/IX/V de las plaquetas y el factor von Willebrand de la matriz subendotelial y de otras glicoproteínas plaquetarias y sus ligandos en la matriz subendotelial (colágeno, fibronectina y laminina).

Las plaquetas ofrecen una superficie lipídica para la interacción de los factores de la coagulación; participan en las primeras reacciones de la fase intrínseca, promoviendo la activación de los factores XI y XII; protegen a los factores de coagulación activados de los inhibidores naturales y forman una barrera protectora de plaquetas agregadas.

## REGULACIÓN DE LA TROMBOPOYESIS

La trombopoyesis es regulada por un mecanismo humoral, en el cual el rango de producción plaquetario responde al número de masa de plaquetas circulantes.

El principal factor regulador es la trombopoyetina (TPO), la cual se caracterizó y purificó años después de conocerse su actividad biológica, que consiste en estimular la proliferación de progenitores megacariocíticos y la diferenciación de los megacariocitos, evidenciado por un aumento en el tamaño y ploidía. Existe una hipótesis que plantea que los niveles plasmáticos de TPO varían como resultado de su unión a receptores sobre las plaquetas circulantes, de manera que los niveles elevados de plaquetas inhiben la acción de la TPO sobre las células diana de la médula y los niveles bajos de plaquetas traen como consecuencia que la TPO no pueda aumentar y se una a precursores.

Acerca del sitio de producción de TPO se plantea que los niveles de la proteína en diferentes tejidos no han sido todavía determinados. Se han realizado estudios de ARNm en los que se ha detectado que sus niveles son elevados en el hígado y los riñones.

Otras citoquinas implicadas son: IL-6, IL-3, IL-11, IL-9, ligando C-kit y FEC-GM.

## GRANULOPOYESIS

Las unidades formadoras de colonias granulocítica-monocitarias (UFC-GM) constituyen las primeras células, identificadas en cultivos medulares, con la capacidad de formar colonias en presencia de factores estimuladores del crecimiento. Se plantea que a concentraciones elevadas del FEC-GM, la vía granulocítica es favorecida; mientras que a concentraciones bajas ocurre la diferenciación de la línea monocítica-macrofágica.

## SECUENCIA DE MADURACIÓN DE LA SERIE GRANULOPOYÉTICA

La secuencia de maduración de la serie granulopoyética (figura 3.11 del anexo) es:

**Mieloblasto → promielocito → mielocito → metamielocito → *stab* o banda o cayado → segmentado**

### Características de las células

**Mieloblasto.** Tamaño: grande, de 15 a 20 µm, forma redonda u oval, núcleo con cromatina finamente reticulada, y 3 o 5 nucléolos, citoplasma escaso y con basofilia menor que el proeritroblasto (figura 3.12 del anexo).

**Promielocito.** Tamaño: de 15 a 25 µm, núcleo algo excéntrico, cromatina más densa y se observa algún nucléolo; citoplasma amplio con gránulos primarios (azurófilos), distribuidos alrededor del núcleo pero que deja una zona clara que corresponde a la zona centrosómica (figura 3.13 del anexo).

**Mielocito.** Tamaño: de 12 a 18 µm, núcleo redondo con cromatina condensada; no se observa nucléolo; en el citoplasma aparecen los gránulos secundarios (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) (figura 3.14 del anexo).

**Metamielocito.** Tamaño: de 10 a 15 µm. Se diferencia del mielocito por un núcleo reniforme (figura 3.15 del anexo).

***Stab* o banda o cayado.** Núcleo en forma de banda con una relación núcleo-citoplasmática a favor del citoplasma. En condiciones normales solo hay entre 2 y 5 % (figura 3.16 del anexo).

**Segmentado.** Incluye las células siguientes:

1. Neutrófilo: células redondas, de 12 a 15 µm. Núcleo con lobulaciones (de 2 a 5) unidas por finos puentes de cromatina. Citoplasma con 80 % de gránulos secundarios y 20 % de gránulos primarios.

2. Eosinófilo: núcleo con 2 lóbulos. Citoplasma con gránulos eosinófilos.
3. Basófilo: núcleo de cromatina muy densa con 2 o 3 lóbulos. Citoplasma con granulación basófila, de color rojo violeta oscuro, repartido por toda la célula (figura 3.17 del anexo).

## POLIMORFONUCLEAR NEUTRÓFILO

El polimorfonuclear neutrófilo (PMN) permanece de 6 a 7 días en la médula, circula durante un corto tiempo en la sangre periférica y vive en los tejidos pocos días. Es necesario destacar que existe una reserva medular grande y una mezcla marginal en equilibrio con el circulante, que se movilizará según las necesidades.

### Funciones del polimorfonuclear neutrófilo

La principal función de polimorfonuclear neutrófilo es la fagocitosis de bacterias, hongos, micoplasmas y la ingestión de remanentes nucleares, productos de la degradación del fibrinógeno y de la fibrina, partículas de hierro y otras sustancias.

El proceso fagocítico comprende los siguientes pasos: quimiotaxis, formación de una vacuola fagocítica donde el microorganismo queda atrapado y muere por peroxidación y digestión.

### Sistemas antimicrobianos del neutrófilo

Los sistemas microbianos del polimorfonuclear neutrófilo son:

1. Dependientes de oxígeno:
  - a) Mieloperoxidasa-peróxido de hidrógeno-yoduro.
  - b) Mieloperoxidasa-peróxido de hidrógeno-cloruro.
  - c) Peróxido de hidrógeno.
  - d) Radical hidroxilo.
  - e) Anión superóxido.
  - f) Oxígeno simple.
2. Independientes de oxígeno:
  - a) pH ácido.
  - b) Proteínas catiónicas.
  - c) Lisozima.
  - d) Lactoferrina.

Los sistemas dependientes del oxígeno inducen un efecto oxidativo directo que inhibe un grupo de enzimas microbianas y destruye procesos oxidorreductores microbianos.

**Metabolismo energético del PMN.** En reposo, la glicólisis es el principal modo de producir energía intracelular. Durante la fagocitosis hay un aumento en el metabolismo de la glucosa, causado por procesos respiratorios, producción de ácido láctico y aumento del metabolismo en el ciclo de las pentosas. La mayor producción intracelular de energía es la ruptura de 6-fosfoglucosa, en que queda metabolizado el 90 % del PMN en el ciclo de Meyerhof, y el 2 % en el ciclo de las pentosas.

**Contenido lipídico del PMN.** Aproximadamente el 10 % de colesterol y el 35 % de fosfolípidos.

**Proteínas del citoesqueleto.** Actina y miosina.

**Moléculas de adhesión.** En los sitios de daño hístico o de infección, el neutrófilo rueda primero, sobre las células endoteliales en las vénulas poscapilares. Esta interacción entre las dos células es mediada por la expresión sobre las células endoteliales de selectinas E o P que se unen a sus ligandos (carbohidratos) sobre los neutrófilos. A su vez, la selectina L sobre PMN se une a carbohidratos de las células endoteliales. El rodamiento es activado por mediadores inflamatorios locales que incrementan la afinidad de  $\beta$  integrinas para receptores similares a inmunoglobulina como el ICAM-1 sobre el endotelio. La migración requiere la formación de nuevas uniones entre integrinas, PECAM-1, y sus respectivos ligandos.

## EOSINÓFILOS

Los eosinófilos presentan los mismos estadios morfológicos que los neutrófilos hasta que sus gránulos se hacen aparentes en el estadio de mielocito. Derivan de la unidad formadora de colonias gránulo-eritromonocito-megacariocítica (UFC-GEMM) y proliferan y maduran dentro de la médula. Para ello requieren de factores estimulantes como IL-3, FEC-granulocítico, así como de linaje específico o IL-5.

### Sustancias producidas por los eosinófilos

Las sustancias que producen los eosinófilos son:

1. Proteína básica mayor.
2. Peroxidasa eosinofílica.
3. Proteína eosinofílica catiónica.
4. Derivado eosinófilo neurotóxico.
5. Lisofosfolipasa (cristal proteico de Charcot Leydin).

### Funciones de los eosinófilos

Los eosinófilos participan en la fagocitosis, en las reacciones de hipersensibilidad, en respuesta inflamatoria no inmunológica, y presentan actividad helmintotóxica. Muchas enfermedades se asocian con eosinófilos incrementados como: infecciones parasitarias, estados alérgicos, vasculitis, enfermedades del colágeno y condiciones paraneoplásicas.

## BASÓFILOS Y MASTOCITOS

Los basófilos y mastocitos se derivan de UFC-GEMM, y requieren de factores que influyen en su diferenciación:

1. Basófilos: IL-10, IL-4, IL-3.
2. Mastocitos: IL-3 y ligando *kit*, el cual influye además en la liberación de histamina. Estas células comparten con el basófilo un progenitor mieloide común, pero está demostrado que no existe transformación del basófilo en la célula cebada hística. Esta última se distribuye de manera perivascular en: piel, tejido digestivo, respiratorio, ganglios linfáticos y médula.

### Funciones de los basófilos y los mastocitos

Los basófilos y los mastocitos generan sustancias que modulan la inflamación y la hipersensibilidad inmediata. Estos materiales incluyen sustancias de reacción lenta de la anafilaxia, tripsina y factores quimiotácticos para eosinófilos. Tienen un elevado contenido de histamina y se sabe que participan en reacciones inmunes retardadas.

## MONOCITOPOYESIS

### PROGENITORES

Es común a la serie granulopoyética (UFC-GM), de la cual deriva la UFC-monocítica.

### SECUENCIA DE MADURACIÓN DE LA SERIE MONOCÍTICA

La secuencia de maduración de los monocitos (figura 3.18 del anexo) es:

**Monoblasto → promonocito → monocito → macrófago**

**Monoblasto.** Difícilmente identificable en la médula de sujetos normales. Su tamaño es de 15 a 25  $\mu\text{m}$ . El núcleo es redondo, con cromatina laxa y numerosos nucléolos. Citoplasma: azul con cierta tonalidad plomiza.

**Promonocito.** Tamaño: de 15 a 20  $\mu\text{m}$ . Núcleo: irregular con pliegues e indentaciones, cromatina moderadamente condensada con 1 o 2 nucléolos. Citoplasma: basófilo.

**Monocito.** Tamaño: de 14 a 19  $\mu\text{m}$ . Núcleo en herradura, cromatina densa e irregular. Citoplasma: azul plomizo, en ocasiones con granulaciones azurófilas.

## CINÉTICA Y FUNCIONES DE LOS MONOCITOS

No existe reserva medular. En la médula los monocitos permanecen de 1 a 3 días; circulan en sangre periférica de 8 a 72 horas y migran a los tejidos donde se originan los macrófagos que pueden sobrevivir hasta 80 días. Estos se localizan en pulmones, bazo, piel (células de Langerhans), hígado (células de Kupffer), peritoneo, riñón, calostro, tracto reproductivo y médula (osteoclastos). Su morfología depende del lugar donde se ubiquen.

### Funciones de los monocitos

Las funciones de los monocitos son:

1. Efecto antimicrobiano: al igual que PMN, los monocitos son fagocíticos. Tienen una enzima denominada lisozima que lisa ciertas bacterias como las grampositivas.
2. Efecto antitumoral.
3. Efecto inmunorregulador: células que presentan antígenos a los linfocitos.

Para mantener la hematopoyesis, se estima que se producen a diario  $8,7 \times 10^8$  PMN/kg y  $5,7 \times 10^6$  monocitos. Entre los factores estimulantes del crecimiento de estas células se encuentran: FEC-GM, FEC-G y FEC-1, los cuales no solo inducen la proliferación y diferenciación de los progenitores, sino que estimulan la función de la fagocitosis en las células maduras.

## LINFOPOYESIS

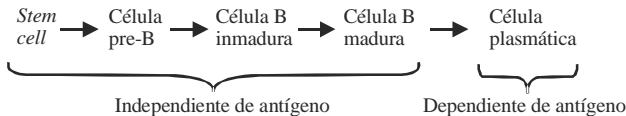
Los órganos involucrados en la linfopoyesis se dividen en 2 grupos:

1. Órganos linfoides primarios: médula y timo.
2. Órganos linfoides secundarios: ganglios linfáticos, bazo, tejido linfático del tubo digestivo y anillo de Waldeyer (amígdalas y adenoides).

En la médula ósea, las *stem cells* producen células progenitoras comprometidas con el desarrollo de las células linfoides (T y B), pero la diferenciación y maduración de estas ocurren de forma diferente.

## MADURACIÓN Y FUNCIONES DE LOS LINFOCITOS B

Después de la estimulación antigénica, los linfocitos B pueden diferenciarse en células plasmáticas que secretan inmunoglobulinas o dividirse y luego regresar a un estado de reposo (linfocitos B de memoria), en que pueden transformarse muy rápido en células plasmáticas después de una segunda exposición al mismo antígeno (figura 3.19).



**Figura 3.19** Maduración de las células B.

### Función de los linfocitos B

Los linfocitos B se encargan de la síntesis de inmunoglobulinas.

## MADURACIÓN Y FUNCIONES DE LOS LINFOCITOS T

La maduración de los linfocitos T se observa en la figura 3.20.

### Funciones de los linfocitos T

Los linfocitos T  $CD_4$  se dividen en 2 subpoblaciones: los  $TH_1$ , que tienen como función mediar las reacciones de hipersensibilidad retardada y activar los macrófagos, y los  $TH_2$  que ayudan a las células B a producir anticuerpos.

Los linfocitos T  $CD_8$  inducen la lisis de células que tienen antígeno extraño.

Las células asesinas naturales (*natural killer* o NK) representan otro tipo celular que comparten muchas características de las células T, pero maduran en la médula. Son citolíticas y no dependen de un estímulo inmune primario para esta función.

## CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LOS LINFOCITOS MADUROS

El 70 % de los linfocitos que circulan en sangre periférica son de estirpe T. Los  $CD_4$  tienen un tamaño

de 8 a 10  $\mu m$ , escaso citoplasma basófilo, alta relación núcleo-citoplasmática y cromatina densa, mientras que los  $CD_8$  tienen un tamaño de 12 a 15  $\mu m$  con citoplasma más amplio y menos basófilo, y cromatina nuclear laxa.

Los linfocitos B constituyen el 15 % de las células circulantes en sangre periférica de esta serie. Tienen un tamaño mayor que las anteriores, núcleo con cromatina menos densa y citoplasma abundante con basofilia ligera. Pueden tener algunas granulaciones en el citoplasma. Además, dan lugar a las células plasmáticas, las cuales tienen un tamaño de 15  $\mu m$ , forma ovalada, núcleos excéntricos con una cromatina que se tiene el aspecto de una rueda de carro. El citoplasma se caracteriza por su intensa basofilia.

El 15 % restante corresponde a las células NK y son linfocitos con gránulos azurófilos grandes en el citoplasma.

Se han señalado las características morfológicas de las células de esta serie, pero es necesario destacar que la distinción de la estirpe se realiza por medio de la detección de marcadores específicos sobre la superficie de las células y por estudios moleculares que detectan la expresión de genes de linaje específico.

## BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- Almagro D, González I, Cruz, Y. Fisiología plaquetaria. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter 1987;3 (3):43-67.
- Bick RL. Hematology: clinical and laboratory practice. St. Louis: Mosby, 1993.
- Colombo B, Svarch E, Martínez G. Función y estructura de la hemoglobina. En: Colombo B. Genética y clínica de las hemoglobinas humanas. 2da. ed. La Habana: Editorial Pueblo y Educación; 1993, p.57-78.
- Farreras-Rozman. Medicina Interna.13ra. ed. España: Mosby Doyma Libros, 1995.
- Hoffman R. Hematology basic: principles and practice. 2nd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1995.
- López B A. Enciclopedia iberoamericana de hematología 1. España: Universidad de Salamanca,1992.
- Mayani H, Guilbert LJ, Janowska-Wieczorek A. Biology of the hemopoietic microenvironment. Eur J Haematol 1992;49:225-33.
- Muta K, Krantz SB, Bondurant MC, Dai C-H. Stem cell factor retards differentiation of normal human erythroid progenitor cells while stimulating proliferation. Blood 1995;86:572-80.
- Raffii S, Shapiro F, Rimarachin J. Isolation and characterization of human bone marrow microvascular endothelial cells: hematopoietic progenitor cell adhesion. Blood 1994;84, 10-9.
- Silva M, Grillot D, Benito A. Erythropoietin can promote erythroid progenitor survival by repressing apoptosis through Bcl-XL and Bcl-2. Blood 1996; 88: 1576-82.
- Smith CH. Hematología Pediátrica. 3ra ed. La Habana: Editorial Científico-Técnica, 1985.
- Williams WJ. Hematology. 5 ed. New York: McGraw-Hill, 1995.
- Wintrobe MM. Clinical haematology. 10 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1998.
- Zon LI. Developmental biology of hematopoiesis. Blood 1995; 86:2876-91.

# CONTENIDO

---

## **Síndrome anémico/ 217**

- Definición de anemia/ 217
- Clasificación cinética de las anemias/ 217
- Clasificación morfológica de las anemias/ 218
- Manifestaciones clínicas de las anemias/ 218
- Diagnóstico de laboratorio de las anemias/ 218
- Estrategia para el estudio de las anemias/ 221

## **Anemia ferropénica y hemocromatosis/ 223**

- Metabolismo del hierro/ 223
- Déficit de hierro/ 226
- Hemocromatosis/ 232

## **Anemia megaloblástica/ 233**

- Clasificación de la anemia megaloblástica/ 234
- Metabolismo de la vitamina B<sub>12</sub>/ 234
- Metabolismo del ácido fólico/ 235
- Interrelación entre el metabolismo de la vitamina B<sub>12</sub> y el ácido fólico/ 236
- Patogenia de la anemia megaloblástica/ 236
- Manifestaciones clínicas de la anemia megaloblástica/ 236
- Diagnóstico de laboratorio de la anemia megaloblástica/ 237

## **Anemia aplásica/ 238**

- Concepto y causas de pancitopenia/ 238
- Concepto y causas de la anemia aplásica/ 239
- Clasificación de la anemia aplásica/ 239
- Anemia aplásica idiopática/ 239
- Diagnóstico de laboratorio de la anemia aplásica/ 240

## **Anemia de los procesos crónicos/ 240**

- Causas de la anemia de los procesos crónicos/ 240
- Patogenia de la anemia de los procesos crónicos/ 241
- Manifestaciones clínicas de la anemia de los procesos crónicos/ 241
- Diagnóstico de laboratorio de la anemia de los procesos crónicos/ 241
- Otros mecanismos de producción de las anemias secundarias a trastornos sistémicos/ 241

## **Anemia en el embarazo/ 243**

- Mecanismo de producción de la anemia en el embarazo/ 243
- Diagnóstico de laboratorio de la anemia en el embarazo/ 243

## **Síndrome hemolítico/ 244**

- Clasificación de las anemias hemolíticas/ 244
- Manifestaciones clínicas las anemias hemolíticas/ 244
- Diagnóstico de laboratorio de las anemias hemolíticas/ 245

## **Anemias hemolíticas debidas a anomalías de la membrana eritrocitaria/ 247**

- Esferocitosis hereditaria/ 247
- Eliptocitosis hereditaria/ 248
- Síndrome del Rh nulo/ 249
- Permeabilidad catiónica anormal/ 249

## **Alteraciones enzimáticas/ 249**

- Clasificación, fisiopatología y frecuencia de las alteraciones enzimáticas/ 249
- Déficit de la enzima glucosa 6 fosfato deshidrogenasa/ 250
- Déficit de la enzima piruvatoquinasa/ 251

## **Defectos en la estructura y la síntesis de la hemoglobina/ 252**

- Hemoglobinopatías/ 252
- Síndromes talasémicos/ 256
- Hemoglobinas inestables/ 259
- Metahemoglobinemias hereditarias y tóxicas/ 259

## **Hemoglobinuria paroxística nocturna/ 260**

## **Anemias hemolíticas extrínsecas no inmunes/ 262**

## **Bibliografía recomendada/ 262**

### Capítulo 24



### ESTUDIO DE LAS ANEMIAS

*Dra. Tania I. Carballo Treto  
Dr. Ariel de J. Colina Rodríguez*

#### RESUMEN

El síndrome anémico se produce cuando existe una disminución de la concentración de hemoglobina y del número de eritrocitos por debajo de los límites considerados como normales, según el sexo, la edad y la altitud del lugar de residencia. Se caracteriza por síntomas generales y específicos, relacionados con la afección subyacente, la cual puede ser de origen congénito o adquirido. Para la clasificación de la anemia se utilizan parámetros cinéticos y morfológicos: el volumen corpuscular medio es de gran utilidad para realizar una estrategia diagnóstica que permita una orientación de la causa y una conducta terapéutica rápida y precisa. El laboratorio desempeña una importante función en el estudio de este síndrome. Por ello se ha nutrido de avanzadas técnicas que permiten el diagnóstico y, en ocasiones, la prevención de las enfermedades hereditarias.

#### SÍNDROME ANÉMICO

##### DEFINICIÓN DE ANEMIA

Anemia es la reducción de la concentración de hemoglobina y del número de eritrocitos por debajo de los límites considerados como normales, según el sexo, la edad y la altitud del lugar de residencia.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) establece que existe anemia cuando la concentración de hemoglobina en sangre es inferior a los siguientes valores:

Niños de 6 meses a 6 años	11 g/dL
Niños de 6 a 14 años	12 g/dL
Varones adultos	13 g/dL
Mujer adulta, no embarazada	12 g/dL
Mujer adulta, embarazada	11 g/dL

En la prevalencia de la anemia es importante tener en cuenta el nivel socioeconómico de la región en estudio.

#### CLASIFICACIÓN CINÉTICA DE LAS ANEMIAS

Desde el punto de vista cinético, las anemias se clasifican por:

1. Trastornos en la producción de eritrocitos y de hemoglobina (disminuida o alterada):
  - a) Insuficiencia medular:
    - Anemias hipoplásticas: anemia aplástica, aplasia pura de células rojas. Ambas pueden ser congénitas o adquiridas.
    - Infiltración medular: leucemias, linfomas, mielofibrosis, carcinomas metastásicos y enfermedades de almacenamiento.
  - b) Daño en la producción de eritropoyetina:
    - Enfermedad renal crónica.
    - Hipotiroidismo, hipopituitarismo.
    - Inflamación crónica.
    - Malnutrición proteica.
    - Variantes de hemoglobina con disminución de la afinidad por el oxígeno.

2. Trastornos en la maduración eritroide:
  - a) Anomalías de la maduración nuclear: déficit de ácido fólico y vitamina B<sub>12</sub>.
  - b) Anomalías en la maduración citoplasmática: déficit de hierro, talasemias, anemias sideroblásticas, intoxicación por plomo.
  - c) Anemias diseritropoyéticas.
  - d) Anemia sideroblástica refractaria.
3. Aumento en la destrucción de los eritrocitos:
  - a) Intracorporales: déficit enzimático, hemoglobinopatía y trastornos en la membrana eritrocitaria.
  - b) Extracorporales: daños mecánicos, físicos y químicos, infecciones y de causa inmune.
4. Pérdidas agudas y crónicas de sangre.

## CLASIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS ANEMIAS

La clasificación morfológica de las anemias se realiza teniendo en cuenta las constantes corpusculares, sobre todo, el volumen corpuscular medio (VCM):

1. Anemias normocíticas: VCM entre 80 y 100 fL.
2. Anemias macrocíticas: VCM mayor que 100 fL.
3. Anemias microcíticas: VCM menor que 80 fL.

Las afecciones incluidas en cada una de ellas se relacionarán en la estrategia diagnóstica.

## MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LAS ANEMIAS

Existen manifestaciones clínicas comunes a todos los tipos de anemia:

1. Generales: cansancio, disminución del deseo sexual.
2. Cardiorrespiratorias: palpitaciones, disnea ante el esfuerzo o en reposo. Si la anemia es severa: angina, claudicación intermitente, manifestaciones de insuficiencia cardíaca congestiva.
3. Neurológicas: cefalea, mareos, vértigos, somnolencia, confusión, irritabilidad, ruidos en los oídos, pérdida de la concentración, debilidad muscular.

Los síntomas son ligeros si la instauración es lenta, como ocurre en las anemias crónicas. Si la instalación es aguda, como en las hemorrágicas, los síntomas se agravarán y pueden ir desde la hipotensión hasta el *shock*.

## DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LAS ANEMIAS

El diagnóstico de anemia se realiza a partir de tres elementos esenciales:

A. Interrogatorio: es importante conocer:

1. Edad, sexo y raza.
2. Ocupación.
3. Dieta.
4. Antecedentes de cirugía en el tracto gastrointestinal.
5. Antecedentes familiares de anemia.
6. Hábitos tóxicos.
7. Enfermedades subyacentes.

B. Examen físico:

1. Piel y mucosa: palidez, íctero, púrpuras.
2. Sistema cardiovascular: soplos, edemas.
3. Faneras: caída del cabello, fragilidad de las uñas.
4. Sistema hemolinfopoyético: adenopatías, hepatomegalia y esplenomegalia.
5. Miembros inferiores: úlceras en las piernas.

C. Estudios de laboratorio: debe estar orientado a establecer, en primer lugar, la presencia y magnitud de la anemia y, en segundo lugar, a conocer su causa. Para ello se realizan los siguientes análisis:

1. Hemograma: es un estudio complejo que incluye los siguientes parámetros:

a) Hemoglobina (Hb): se realiza de forma manual o automática, por una variedad de métodos colorimétricos y técnicas espectrofotométricas, pero el más recomendado es el de la cianometahemoglobina (CMH), ya que todas las formas de hemoglobina son convertidas en ella. Para ello se usa un reactivo apropiado, por ejemplo, el reactivo de Drabkin, que contiene cianuro de potasio y ferricianuro de potasio. La absorvancia de la CMH es medida en un espectrofotómetro a 540 nm y se determina la concentración de Hb:

– Valores de referencia:

- Hombre: de 13 a 17,5 g/dL
- Mujer: de 12 a 16,5 g/dL

b) Hematócrito (Hto): es la proporción del volumen de una muestra de sangre que es ocupada por los eritrocitos. Puede realizarse de forma manual (es recomendable el microhematócrito por ser sencillo y reproducible) o automatizado, a partir de cálculos matemáticos, teniendo en cuenta el número de eritrocitos y el volumen de estos:

– Valores de referencia:

- Hombre: de 41 a 54 L/L.
- Mujer: de 37 a 47 L/L.

c) Recuento de eritrocitos: este parámetro no debe medirse de forma manual, sino en contadores celulares automatizados, pues el error puede ser de 7 a 14 %, en dependencia de la experiencia del técnico:

– Valores de referencia:

• Hombre:  $4,8 \pm 0,6 \times 10^{12}/L$ .

• Mujer:  $4,3 \pm 0,7 \times 10^{12}/L$ .

d) Constantes corpusculares:

– Volumen corpuscular medio (VCM): se mide directamente en los contadores o se puede calcular por la fórmula:

$$VCM = \frac{Hto\ L/L \times 1\ 000}{\text{Recuento de eritrocitos (x } 10^{12}/L)}$$

• Valor de referencia: de 80 a 100 fentolitros ( $10^{-15}\ L$ ).

Es el parámetro más útil, ya que permite clasificar y desarrollar una estrategia en el diagnóstico de las anemias.

– Hemoglobina corpuscular media (HCM): es una medida del peso promedio de la hemoglobina por eritrocito. Se calcula:

$$HCM = \frac{Hb\ g/L}{\text{Recuento de eritrocitos (x } 10^{12}/L)}$$

• Valores de referencia: de 28 a 32 picogramos ( $10^{-12}\ g$ ).

– Concentración hemoglobínica corpuscular media (CHCM): es una medida de la concentración promedio de la hemoglobina en el eritrocito:

$$CHCM = \frac{Hb\ g/dL}{Hto\ (L/L)}$$

• Valores de referencia: de 32 a 36 g/L.

La HCM y la CHCM no dan información adicional de importancia, si se compara con el VCM para el diagnóstico de la anemia. Su utilidad radica en el control interno de la calidad, pues permite evaluar la estabilidad de la medición de un control por un equipo automatizado.

– Índice de distribución eritrocitario (IDE): refleja la variación del tamaño de los eritrocitos en una muestra de sangre (expresa el grado de anisocitosis), lo cual tiene valor en el diagnóstico temprano de las anemias.

• Valores de referencia: entre 11 y 15,8 %.

En la anemia ferropénica, por ejemplo, el IDE está elevado con un VCM disminuido, en cambio, en la talasemia, el VCM está también disminuido pero el IDE es normal. En la actualidad existen contadores celulares de varias firmas (Coulter, Sysmex, ABX, entre otras) que realizan las mediciones en los eritrocitos, las plaquetas y los leucocitos, y reflejan además los recuentos diferenciales, con la ventaja de que cuentan un gran número de células, y minimizan el error estadístico.

e) Recuento de reticulocitos: el reticulocito es una célula joven, inmadura, de la serie eritroide, que contiene material reticulado (ARN). Su estudio permite diferenciar anemias por falla medular de las producidas por hemorragias o hemólisis, además, se utiliza para chequear la efectividad del tratamiento en las anemias nutricionales. Para su observación se necesita una coloración supravital. Para lograr una medida más exacta de la eritropoyesis, se realiza la corrección del recuento de reticulocitos por la fórmula siguiente:

$$\text{Retículos contados (\%)} \times \frac{Hto\ \text{del paciente}}{Hto\ \text{normal}}$$

• Valores de referencia: de 0,005 a 0,015.

f) Examen de la lámina periférica: este examen permite conocer las alteraciones eritrocitarias características de cada afección (tablas 3.2, 3.3, 3.4 y 3.5), además se observan las alteraciones de los leucocitos y las plaquetas.

g) Medulograma (MO) y biopsia de médula ósea (BMO): son estudios muy relacionados con los resultados de la lámina periférica, que permiten confirmar el diagnóstico sospechado sobre ella. Las indicaciones se exponen en la tabla 3.6.



**Tabla 3.2** Alteraciones de la forma de los eritrocitos

Alteraciones de la forma	Enfermedades donde se observan
Esferocito	Esferocitosis hereditaria Anemias hemolíticas autoinmunes y con cuerpos de Heinz Transfusión de sangre incompatible Quemaduras Infecciones por <i>Clostridium</i>
Eliptocito	Eliptocitosis hereditaria Deficiencia de vitamina B <sub>12</sub> y de hierro Talasemias Mielofibrosis Metástasis Mismielopoyesis
Dianocito	Talasemias Hemoglobinopatías C, D, E Déficit de hierro crónico Enfermedades hepáticas, íctero obstructivo Posesplenectomía
Estomatocito	Estomatocitosis hereditaria Alcoholismo, drogas, neoplasias
Acantocito	Abetalipoproteinemia Fenotipo McLeod Enfermedad hepática severa Malnutrición Hipotiroidismo Posesplenectomía
Crenocito	Déficit de piruvatoquinasa Insuficiencia renal Hemólisis de los corredores de larga distancia Quemaduras Sangrados gastrointestinales Posesplenectomía
Drepanocito	Hemoglobinopatías SS, SβTal, SC
Esquistocito o fragmentocito	Anemia hemolítica microangiopática
Poiquilocito	Mielofibrosis, leucemias Anemias nutricionales graves Anemias hemolíticas

**Tabla 3.3** Alteraciones por modificaciones nucleares

Alteraciones por modificaciones del núcleo o restos nucleares	Enfermedades donde se observan
Normoblastos en periferia	Anemias hemolíticas Infiltración de médula ósea Anemia perniciosa
Corpúsculos de Jolly-Howell	Anemias hemolíticas Posesplenectomía Anemia perniciosa
Anillos de Cabot	Anemias hemolíticas Intoxicación por plomo Leucemias Posesplenectomía

**Tabla 3.4** Alteraciones debidas a granulaciones especiales

Alteraciones producidas por granulaciones especiales	Enfermedades donde se observan
Punteado basófilo	Dismetabolismo eritrocítico Anemias hemolíticas Intoxicación por plomo
Cuerpos de Heinz (se tiñen supravitalmente)	Déficit de la enzima G6PD Talasemias Metahemoglobinemia
Parásitos intracelulares	Paludismo Babesiosis

**Tabla 3.5** Alteraciones del tamaño de los eritrocitos

Alteraciones del tamaño	Enfermedades donde se observan
Microcitos	Anemias: ferripriva, de los procesos crónicos, sideroblásticas, talasemias y hemoglobinopatías C, E y Lepore
Macroцитos	Deficiencias de vitamina B <sub>12</sub> y de ácido fólico Dismielopoyesis, anemias diseritropoyéticas y hemolíticas con reticulocitosis. También en el mixedema y las hepatopatías

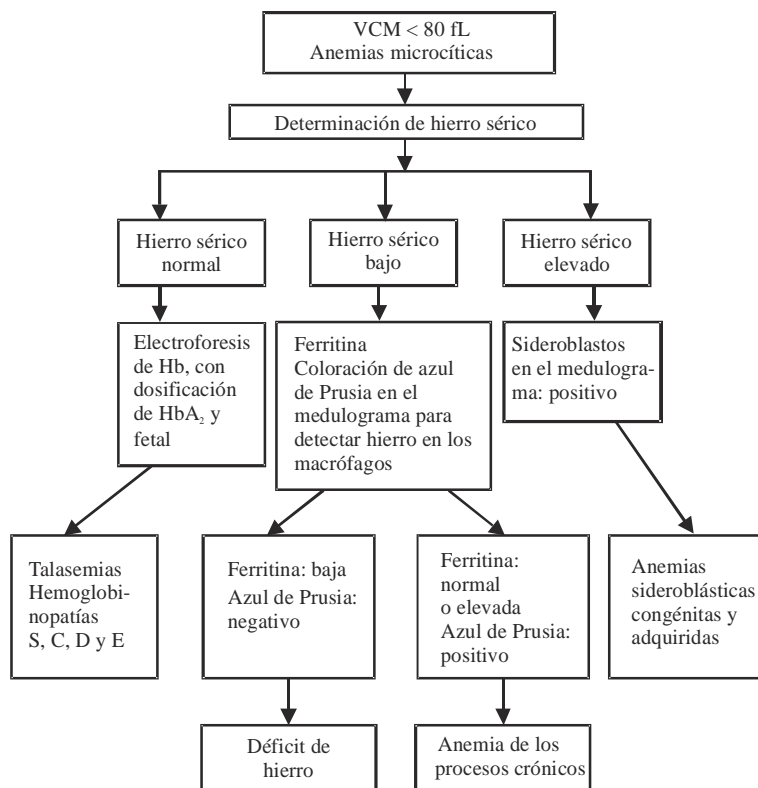
**Tabla 3.6** Indicaciones del medulograma y de la biopsia de la médula ósea

Indicaciones del medulograma	Indicaciones de la biopsia de la médula ósea
Anemias: cuando por los estudios previos no se haya podido llegar al diagnóstico	Falla al tratar de obtener, por aspiración, el material adecuado
Neutropenia	Evaluación de las citopenias
Trombocitopenia	Mielofibrosis
Fiebre de origen desconocido	Metástasis
Adenopatías, esplenomegalia	Linfomas
Sospecha de infiltración por leucemias, mieloma múltiple, metástasis	Enfermedad granulomatosa
Enfermedades de almacenamiento	Aplasia medular: la BMO tiene como ventaja que evalúa mejor la celularidad y la infiltración por tumores sólidos

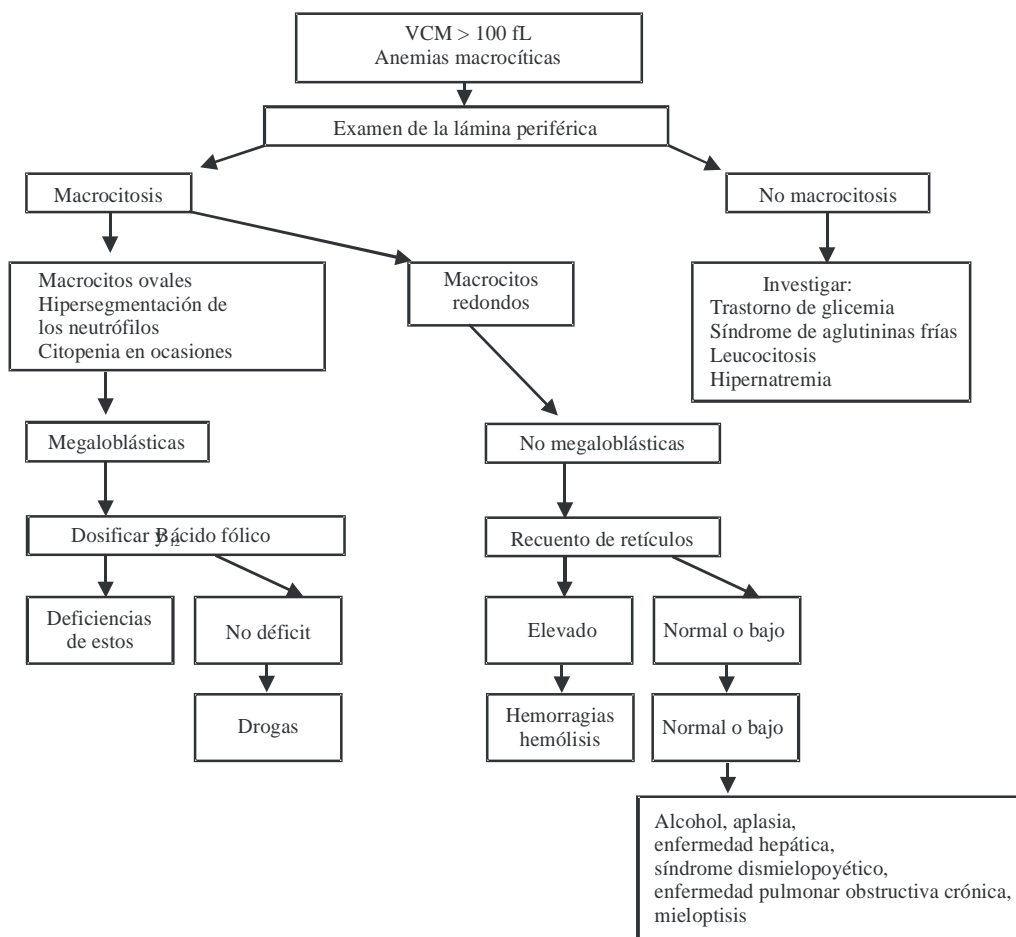
## ESTRATEGIA PARA EL ESTUDIO DE LAS ANEMIAS

Una vez confirmada la presencia de anemia, para conocer su causa en el menor tiempo posible y con poca afectación para el paciente, se deben realizar

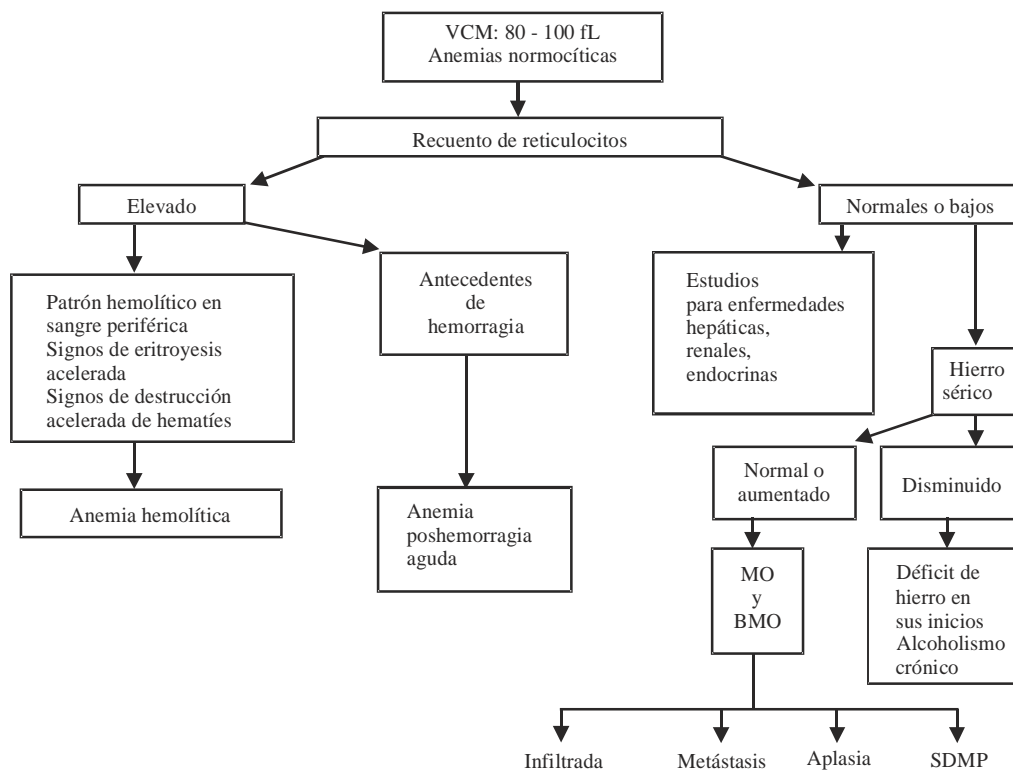
estudios de forma escalonada. El primer paso será conocer el valor del VCM y así poder clasificarla en: microcítica, macrocítica o normocítica. A continuación se presentan los algoritmos propuestos para el estudio de las anemias (figuras 3.21, 3.22 y 3.23).



**Figura 3.21** Algoritmo para el estudio de las anemias microcíticas.



**Figura 3.22** Algoritmo para el estudio de las anemias macrocíticas.



**Figura 3.23** Algoritmo para el estudio de las anemias normocíticas.

## ANEMIA FERROPÉNICA Y HEMOCROMATOSIS

El hierro es el metal más abundante en el universo, y está contenido en todas las células del organismo. Su empleo en la cura de diferentes trastornos se menciona desde la antigüedad, por ejemplo, en Grecia, el óxido de hierro se disolvía en vino y se administraba a los individuos con impotencia sexual, pero el tratamiento con sales de hierro se le acredita a Sydenham, quien en 1700 lo recomendó para el tratamiento de la clorosis. Luego, en 1832, Pierre Bland descubrió que las tabletas de sulfato ferroso eran efectivas en el tratamiento de esta enfermedad. Con el progreso del conocimiento se ha podido profundizar en el metabolismo del hierro y las consecuencias que puede provocar al organismo una inadecuada homeostasia.

### METABOLISMO DEL HIERRO

El hierro tiene propiedades químicas únicas y cumple una variedad de funciones biológicas indispensables para la vida animal y vegetal.

Los compuestos del hierro se pueden clasificar en dos categorías funcionales:

1. Función metabólica o enzimática:
  - a) Hemoglobina y mioglobina: proteínas que contienen hem y se combinan de manera reversible con el oxígeno.
  - b) Citocromos a, b y c: proteínas que contienen hem y están implicadas en el transporte de electrones.
  - c) Peroxidasas: proteínas que contienen hem y que activan el peróxido de hidrógeno para aceptar dos electrones a partir de diversos sustratos.
  - d) Catalasas: proteínas que contienen hem y que convierten el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno.
  - e) Deshidrogenasa succínica, láctica y xantino-oxidasa: flavoproteínas que están ligadas al hierro y que funcionan como receptores de electrones.
2. Función de almacenamiento y transporte: los compuestos relacionados con el depósito son la hemosiderina y la ferritina, mientras que la proteína encargada del transporte es la transferrina.

La cantidad total de hierro de un individuo depende de su peso, composición corporal, concentración de hemoglobina y volumen de los compartimientos de depósitos. Se considera normal de 40 a 50 mg/kg de peso en el hombre y 35 mg/kg de peso en la mujer.

Como aparece en la tabla 3.7, la mayoría del hierro está presente en compuestos hem (65 % en la Hb, 15 % en la mioglobina y enzimas). Solo una pequeña cantidad está en el plasma unido a la transferrina y los almacenes constituyen el 30 % del hierro del cuerpo.

En el hombre adulto se pierden a diario por el tubo gastrointestinal: 0,6 mg de hierro; en el sudor y la exfoliación de células escamosas: 0,2 mg y por el tracto urinario: 0,1 mg. En total, 0,9 mg/día que, en la mujer se incrementa en 0,4 mg/día debido al hierro que pierde por la menstruación.

La reposición de la pequeña cantidad de hierro que se pierde se realiza por la ingestión de los alimentos que lo contienen, la cual varía en diferentes partes del mundo, pero se considera como promedio entre 10 y 30 mg/día, de los cuales se absorben solo entre el 5 y el 10 %.

### Resumen de la homeostasia del hierro

La homeostasia del hierro en condiciones normales se realiza:

1. Ingestión: de 10 a 20 mg/día.
2. Absorción normal:
  - a) Hombre: 1 mg/día.
  - b) Mujer que no está menstruando: 1 mg/día.
  - c) Mujer que está menstruando: 2 mg/día.
  - d) Mujer durante el embarazo: 5 mg/día.
3. Pérdidas:
  - a) Hombre: 1 mg/día.
  - b) Mujer que no está menstruando: 1 mg/día.
  - c) Mujer que está menstruando: 2 mg/día.

**Tabla 3.7** Distribución del hierro en los diferentes compuestos proteicos en el hombre

Compuestos	Hierro (mg)	Hierro (mg/kg de peso corporal)
<b>Funcionales</b>		
Hemoglobina	2 300	31
Mioglobina	300	4
Hem enzimático	80	1
Hem no enzimático	100	1
<b>Transporte</b>		
Transferrina	5	<1
<b>Almacenamiento</b>		
Ferritina	700	9
Hemosiderina	300	4

## Ciclo del hierro

En un adulto normal, la hemoglobina contiene aproximadamente 2 g de hierro (3,4 mg/g de hemoglobina). Alrededor de 23 mg/día llegan a los fagocitos del sistema mononuclear fagocítico (SMF), debido a la destrucción de los eritrocitos, los cuales tienen una vida media de 120 días. El SMF recibe también un remanente de hierro que proviene de la eritropoyesis ineficaz (2 mg). De los 25 mg contenidos en el SMF, 2 mg se encuentran en equilibrio con el compartimiento de depósito y 23 mg son transportados por la transferrina hasta la médula ósea para la síntesis de Hb. Para cerrar este ciclo, la médula requiere a diario 25 mg, de los cuales 23 mg provienen del SMF y de 1 a 2 mg de la absorción intestinal. Aproximadamente 7 mg se mantienen en equilibrio entre la circulación y los depósitos.

## Absorción del hierro

Los compuestos de hierro pueden ser absorbidos desde casi todos los niveles del tubo digestivo, sin embargo, la absorción es más eficiente en el duodeno y disminuye, progresivamente, en las partes más distales del intestino.

Se plantea que existen dos vías para la absorción, una para el hierro ligado al hem y otra para el hierro no hemínico. El compartimiento del hierro hemínico que está constituido por la hemoglobina y la mioglobina, tiene una excelente biodisponibilidad que no se ve afectada por la presencia de otros compuestos como fitatos o tanatos. El compartimiento no hemínico está constituido por el hierro de los vegetales, la leche, el huevo y las sales solubles y su absorción dependerá de las interacciones entre sustancias inhibitoras y sustancias facilitadoras.

## Factores facilitadores de la absorción del hierro

Los factores que facilitan la absorción del hierro en el organismo son:

1. Ácidos orgánicos: ascórbico, succínico, cítrico, málico.
2. Azúcares: fructosa, sorbitol.
3. Aminoácidos: cisteína, lisina, histidina.

## Factores inhibidores de la absorción del hierro

Los factores que inhiben la absorción del hierro en el organismo son:

1. Fenoles: tanino, polifenoles.
2. Fosfatos y fitatos.
3. Fibra: salvados.
4. Proteínas: albúmina y yema de huevo; proteínas de las legumbres.
5. Otros elementos inorgánicos: Ca, Mg, Cu, Cd y Co.

En la absorción del hierro de los alimentos, también es importante tener presente la manera de prepararlos, ya que si la cocción es prolongada, se desnaturaliza una proporción alta de hierro hemínico.

## Absorción del hierro no hem

Como se explicó, en la dieta existen constituyentes que facilitan la absorción del hierro, ya que lo solubilizan, mientras que otros lo precipitan o polimerizan; por tanto, inhiben su absorción. Además existen otros factores inorgánicos.

El ácido clorhídrico del estómago solubiliza el ion férrico y lo mantiene disponible para la quelación con sustancias que aumentan la absorción.

En el intestino delgado, la mucosa parece desempeñar un papel importante en las reacciones dependientes del pH y acepta hierro unido a facilitadores de la absorción. Las enzimas intestinales forman quelatos que permanecen solubles en la luz intestinal.

La bilis aumenta la absorción, ya que contiene ácido ascórbico, mientras que el bicarbonato pancreático disminuye la absorción.

Los mecanismos descritos recientemente para la absorción del hierro inorgánico en el intestino, surgieron de diferentes investigaciones con el objetivo de encontrar las proteínas que mediaban la entrada de hierro en las células absorbivas de la mucosa intestinal, carentes de receptores de transferrina en el lado luminal. Se identificaron la mucina, la mobilferrina, la integrina  $\alpha\beta_3$  y un complejo proteico llamado paraferitina (contiene integrina  $\beta_3$ , mobilferrina, flavina-oxigenasa,  $\beta_2$  microglobulina y una proteína de unión). El hierro férrico quelado es transferido por la mucina al complejo formado por la integrina  $\beta_3$ , situado en la membrana y la mobilferrina que lo transporta al citoplasma donde es asociado con el complejo paraferitina, el cual sirve como una ferrireductasa (reduce el hierro férrico al estado ferroso).

Varios estudios apoyan la hipótesis de que el hierro ferroso utiliza otra vía, diferente, para entrar a las células absorbivas, a través de una proteína identificada hace poco que al principio fue denominada Nramp 2 (proteína macrofágica asociada a la resistencia natural), pues se pensaba que estaba asociada a las defensas del huésped, y hoy se conoce como DCT-1 (transportador catiónico divalente).

## Absorción del hierro hem

El hierro hem atraviesa la membrana celular como hemoglobina o mioglobina, una vez que las proteasas endoluminales o la membrana del enterocito hidrolizan

la globina. En el citoplasma, la enzima hemoxigenasa libera el hierro de la estructura tetrapirrólica, aunque una proporción muy pequeña del hem puede ser transferida, como tal, a la circulación portal.

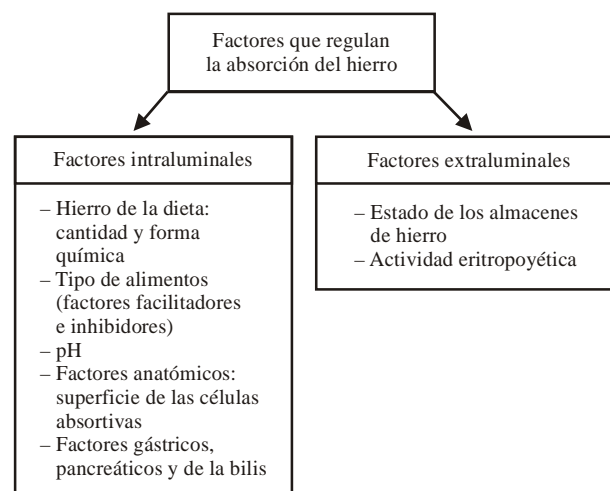
En la figura 3.24 se aprecian los factores que regulan la absorción del hierro por el organismo.

El mecanismo para la salida de hierro desde las células absortivas intestinales hacia el plasma, es menos conocido. Se plantea que estas células tienen dos tipos de receptores sobre la superficie basolateral: uno para la holotransferrina, que probablemente funcione igual que en las células no intestinales, y facilite la entrada de hierro desde el plasma hacia las células, lo cual podría servir como mecanismo para “informar” a las células absortivas del estado de hierro del organismo, y otro receptor que une apotransferrina y podría servir como vía para que el hierro entre al organismo desde las células absortivas.

### Transporte y captación celular del hierro

La transferrina media el intercambio de hierro (Fe) entre los tejidos corporales y consiste en una glicoproteína compuesta de dos lóbulos homólogos: N terminal y C terminal. Estos, a su vez, se dividen en dos dominios. Cada sitio de unión al hierro se localiza en la hendidura, entre los dominios, donde el hierro se une por dos tirosinas, una histidina y un residuo de ácido aspártico.

Como la transferrina en el plasma está saturada solo en el 30 %, pueden estar presentes cuatro especies de la molécula: apotransferrina libre de hierro, transferrina diférrica saturada por completo y las dos transferrinas monoférricas.



**Figura 3.24** Factores que regulan la absorción del hierro.

La mayoría de la apotransferrina es producida por los hepatocitos. Otros sitios potenciales de síntesis que se han identificado son: glándula mamaria, testículo, sistema nervioso central, linfocitos y macrófagos, aunque ninguno parece ser una fuente importante en vivo, desde el punto de vista cuantitativo. El total de apotransferrina en el plasma es de aproximadamente 250 mg/kg y tiene una vida media de 8 a 12 días.

### Receptor de la transferrina

El receptor de la transferrina provee el acceso a las células, del hierro unido a la transferrina y también desempeña una función importante en la liberación de hierro desde la transferrina dentro de la célula.

Es una glicoproteína transmembrana, compuesta por dos subunidades idénticas, unidas por puentes disulfuro, cada una de las cuales puede unir una molécula de transferrina. Se encuentra anclada en la membrana, por medio de un dominio transmembrana. La transferrina diférrica tiene gran afinidad por el receptor; la transferrina monoférrica intermedia y la apotransferrina, poseen muy baja afinidad.

### Captación celular

**Endocitosis mediada por el receptor.** La transferrina se une a los receptores específicos sobre la superficie celular por una interacción físico-química. Luego, por un proceso dependiente de energía y temperatura, el complejo transferrina-receptor es internalizado por las células, que lo encierran dentro de una vesícula endocítica. El hierro es liberado de la transferrina dentro de esta vesícula por un proceso de acidificación endosomal, aunque se plantea que existen otros factores. El hierro liberado forma un complejo con un ligando, todavía no identificado, y es transportado a sitios intracelulares para uso y almacenamiento como ferritina. En las células eritroides, el hierro es destinado a las mitocondrias, donde se produce el hem. La apotransferrina libre de hierro y unida al receptor retorna a la superficie celular donde es liberada.

**Proceso que no es mediado por el receptor.** El hierro unido a la transferrina también puede ser transportado dentro de la célula por un sistema de baja afinidad, que es independiente del receptor de transferrina y funciona cuando existen elevadas concentraciones de la transferrina diférrica.

### Regulación de la entrada de hierro a las células

Las IRE-BP (proteínas de unión a elementos de respuesta al hierro) son proteínas de unión al ARNm, que coordinan la expresión intracelular del receptor de transferrina, del receptor de ferritina y de otras proteínas.

La síntesis del receptor de transferrina es controlada mediante el ajuste de cantidades citoplasmáticas de su ARNm. La unión de las IRE-BP a las IRE (elementos de respuesta al hierro) en la región 3' retarda la degradación citoplasmática, y aumenta la concentración de ARNm del receptor de transferrina, el número de receptores de transferrina y la entrada del complejo hierro-transferrina a las células. Esto es lo que ocurre cuando la concentración de hierro citoplasmático es baja, por el contrario, un aumento en el hierro intracelular disminuye la proporción de IRE-BP de alta afinidad. Pocos IRE-BP son unidos a IRE, por lo que disminuye la producción de receptores de transferrina y, por tanto, la entrada de hierro a la célula.

### Depósitos de hierro

Los depósitos de hierro en el organismo se encuentran en numerosos sitios; pero los principales órganos son el hígado, la médula ósea, el bazo y el músculo esquelético. En el interior de las células, estos depósitos se encuentran en dos formas: ferritina y hemosiderina.

**Ferritina.** Es la mayor proteína de almacenamiento de hierro. Se ha detectado en casi todos los tejidos animales y vegetales, y también en hongos y bacterias. Está compuesta por 24 subunidades de dos tipos: una subunidad ligera (L) de 19 kDa y una subunidad pesada (H) de 21 kDa.

La apoferritina es una proteína esférica cubierta, que está compuesta por mezclas de subunidades H y L, cuyas proporciones dependen de los tejidos y del estado del hierro de las células. Los tejidos que funcionan como sitios mayores de depósitos de hierro: hígado y bazo, placenta y granulocitos, tienen una preponderancia de subunidades L, mientras que los que no actúan como almacén, por ejemplo, el corazón, tienen una elevada proporción de subunidades H.

Las subunidades se organizan entre sí, de manera tal que forman una estructura esférica que rodea a los cristales de hierro. Esta cubierta proteica posee en su entramado 6 poros de carácter hidrofílico y tamaño suficiente para permitir el paso de monosacaridos, ácido ascórbico o desferroxamina.

La función fundamental de la ferritina es garantizar el depósito intracelular de hierro, para su posterior utilización en la síntesis de proteínas y enzimas. Este proceso implica la unión del hierro dentro de los canales de la cubierta proteica, seguido por la entrada y formación de un núcleo de hierro en el centro de la molécula. Una vez formado un pequeño núcleo de hierro sobre su superficie, puede ocurrir la oxidación de los restantes átomos de hierro a medida que se incorporan. Cada molécula de ferritina puede almacenar, de

manera reversible, 4 500 átomos de hierro, lo que duplica su masa molecular, aunque en estado normal tiene aproximadamente 2 500 almacenados como cristales de hidróxido fosfato férrico.

**Hemosiderina.** Desde el punto de vista inmunológico, es una proteína idéntica a la anterior, aunque se diferencia por su insolubilidad en agua y alta relación hierro/proteínas. Contiene 30 % más de hierro. Puede contener una variedad de constituyentes orgánicos que incluyen proteínas. Representa una forma más estable y menos disponible de almacén de hierro.

## DÉFICIT DE HIERRO

### Prevalencia

El déficit de hierro es la deficiencia nutricional más frecuente en países desarrollados y subdesarrollados. Datos de la OMS muestran que el 30 % de la población mundial presenta anemia y la mitad se debe al déficit de hierro. No obstante, hay que plantear que se han realizado pocos estudios de valor objetivo acerca de la prevalencia del déficit, ya que se usan diferentes análisis estadísticos: desde estudios muy simples hasta algunos muy sofisticados. Otro problema en este sentido es la selección de la muestra que se va a estudiar.

### Estadios en el desarrollo de la anemia ferropénica

La anemia por déficit de hierro ocurre como evento final de un largo período de balance negativo del metal, por lo que tienen lugar eventos o fases, denominados de la manera siguiente:

1. Ferropenia prelatente o depleción de los depósitos: reducción de los almacenes sin reducción de los niveles de hierro en la sangre. Se detecta por la disminución de los niveles séricos de ferritina y la ausencia de coloración con la técnica de Azul de Prusia, realizada en el medulograma, además, hay un aumento en la absorción intestinal de hierro.
2. Déficit de hierro latente (ferropenia larvada o eritropoyesis ferropénica): los almacenes están vacíos, pero la hemoglobina permanece normal. Aparecen las anomalías bioquímicas en el metabolismo y algunos autores plantean que se manifiestan síntomas relacionados con la carencia del mineral.
3. Anemia ferropénica: la hemoglobina disminuye por debajo de límites normales, y aparecen las manifestaciones clínicas propias de la anemia, con lesiones epiteliales en fases tardías.

Los estadios en el desarrollo de la anemia ferropénica aparecen en la tabla 3.8.

**Tabla 3.8** Estadios en el desarrollo de la anemia ferropénica

Estudios	Normal	Prelatente	Latente	Déficit de hierro	
				Temprano	Tardío
Hierro en la médula	Normal	Reducido	Ausente	Ausente	Ausente
Ferritina	Normal	Reducido	< 12 ng/mL	< 12 ng/mL	< 12 ng/mL
Saturación de transferrina	Normal	Normal	< 16 %	< 16 %	< 16 %
Protoporfirina eritrocitaria libre (PEL)	Normal	Normal	Aumentado	Aumentado	Aumentado
Hemoglobina	Normal	Normal	Normal	80-120 g/L	< 80 g/L
VCM	Normal	Normal	Normal	Normal o reducido	Normal o reducido

### Causas y patogenia de la anemia ferropénica

La deficiencia de hierro puede ocurrir como resultado de una inadecuada ingestión, de malabsorción, de pérdidas crónicas, del aumento en las necesidades como en el embarazo y la lactancia, o por la combinación de estos factores.

Entre las causas de la deficiencia de hierro en el organismo están:

1. Disminución de la ingestión de hierro:
  - a) Dieta no equilibrada o prácticas alimentarias inadecuadas.
2. Disminución en la absorción:
  - a) Síndrome de malabsorción.
  - b) Aclorhidria.
  - c) Enfermedad celíaca.
  - d) Aumento del tránsito intestinal.
  - e) Cirugía gastrointestinal: gastrectomía, resección intestinal, anastomosis del intestino delgado.
3. Incremento en las pérdidas de hierro:
  - a) Sangrado gastrointestinal por:
    - Hemorroides.
    - Ingestión de salicilato.
    - Úlcera péptica.
    - Hernia hiatal.
    - Divertículos.
    - Neoplasias.
    - Colitis ulcerativa.
    - Esquistosomiasis.
    - Trichuriasis.
    - Várices esofágicas.
    - Sitios desconocidos.
    - Excesiva pérdida menstrual.
    - Donación de sangre.
    - Hemoglobinuria.
    - Hemosiderosis pulmonar.

- Insuficiencia renal crónica y hemodiálisis.
- Trastornos en la hemostasia.

4. Aumento en las necesidades de hierro:
  - a) Fases de crecimiento en la infancia.
  - b) Embarazo.
  - c) Lactancia.

**Disminución de la ingestión de hierro.** Los nutrientes de la dieta varían con el nivel socioeconómico de cada país. En los países subdesarrollados predomina el hierro de origen vegetal, que es de baja biodisponibilidad, lo cual puede contribuir al desarrollo de la anemia ferropénica.

El déficit de hierro por trastorno en la ingestión es raro en el adulto, sin embargo, es una causa importante en el niño menor de 1 año, debido al uso de leche no suplementada con insuficiente cantidad del mineral.

**Trastorno en la absorción de hierro.** Alrededor del 50 % de los pacientes a los que se les ha realizado gastrectomía subtotal, desarrollan luego anemia ferropénica. Esta se explica por reducción de la acidez gástrica, pérdida de la función de reservorio del estómago, con un rápido tránsito intestinal.

La malabsorción intestinal de hierro puede ocurrir como una manifestación de diversos síndromes.

**Incremento de las pérdidas de hierro.** Por su frecuencia es la causa más importante; puede ocurrir por:

1. Sangrado gastrointestinal: causa más común en el hombre y segunda causa en la mujer que está menstruando.
2. Menstruación: causa más común en la mujer, la cual pierde aproximadamente 35 mL de sangre por período, con límite máximo de 80 mL y cada mililitro de sangre contiene 0,5 mg de hierro. El sangrado



excesivo puede ser por fibroma uterino y neoplasias. También el uso de dispositivo intrauterino (DIU) aumenta las pérdidas.

3. Donación de sangre: cada unidad de sangre donada contiene alrededor de 250 mg de hierro. La incidencia del déficit aumenta con la frecuencia de la donación. Deben usarse suplementos de hierro en personas que donan más de 1 o 2 veces al año.
4. Hemorragia alveolar: puede provocar que la hemoglobina disminuya de 1,5 a 3 g/dL en 24 horas. Entre las causas están: hemosiderosis pulmonar idiopática y síndrome de Good Pasture.
5. Hemoglobinuria por diferentes causas como:
  - a) Hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN).
  - b) Fragmentación de eritrocitos asociados con válvulas protésicas.
  - c) Corredores de larga distancia.
6. Insuficiencia renal crónica y hemodiálisis: pérdida de sangre asociada con diálisis y con estudios frecuentes, sangrados intestinales, ingestión disminuida, malabsorción por hidróxido de aluminio.
7. Trastornos en la hemostasia: rara vez lleva a una pérdida crónica de sangre. El sangrado es agudo y el tratamiento incluye reemplazo con sangre.
8. Anemia idiopática crónica: existen pacientes en los que no se encuentran causas después de los estudios iniciales, sin embargo, desde el punto de vista evolutivo, en algunos se encuentran pérdidas sanguíneas. También puede ocurrir que la enfermedad causante esté en remisión o no sea detectable al realizar el diagnóstico.

**Aumento en las necesidades de hierro.** En varias etapas de la vida, las personas necesitan el hierro de forma primordial:

1. Infancia: el aporte de hierro por la placenta es reemplazado durante el primer año de vida por el aporte de la ingestión. Durante este período se duplica la cantidad de hierro y se triplica el peso corporal. La etapa en la que los niños son más vulnerables al déficit de hierro se enmarca entre los 6 meses y 2 años de edad.
2. Durante el resto de la infancia, las necesidades de hierro para el crecimiento son menores, pero continúan siendo muy altas, si se comparan con el adulto.
3. En la adolescencia, el crecimiento rápido aumenta las demandas, sobre todo para satisfacer la síntesis de hemoglobina. En el caso de las mujeres, las necesidades son mayores, pues se inicia la pérdida menstrual.
4. Durante el embarazo, el parto y el puerperio, la mujer pierde alrededor de 500 mg de hierro. Los

requerimientos son pequeños al inicio del embarazo y aumentan de 3 a 7,5 mg/día en el tercer trimestre, por lo que la embarazada requiere suplementos de hierro para evitar la anemia.

### Manifestaciones clínicas de la anemia ferropénica

El comienzo de la anemia ferropénica o ferripriva casi siempre es insidioso, y la progresión de los síntomas es gradual, debido a respuestas adaptativas respiratorias y circulatorias, que permiten la tolerancia a bajas concentraciones de hemoglobina hasta que esta alcanza niveles tan bajos que provoca los síntomas.

La deficiencia de hierro puede producir manifestaciones independientes de la anemia, que resultan de la depleción de compartimientos funcionales, en tejidos no eritroides:

1. Tubo gastrointestinal:
  - a) Síndrome de Plummer-Vinson.
  - b) Disfagia sideropénica.
  - c) Anillos esofágicos en la zona cricofaríngea.
  - d) Síndrome de Patterson-Kelly.
  - e) Gastritis atrófica.
  - f) Enteropatía exudativa (síndrome del intestino permeable con pérdida de eritrocitos, proteínas plasmáticas, albúmina, inmunoglobulinas).
  - g) Síndrome de malabsorción generalizada a xilosa, grasas, vitamina A.
  - h) *Pica*: derivado del latín, significa 'urraca'. Es una perversión del apetito con ingestión persistente de sustancias no comestibles: hielo (pagofagia), tierra (geofagia), almidón (amilo-fagia) o de alimentos: alimentos crocantes, papa cruda, zanahoria, galletas tostadas, semillas de tomate.
2. Alteraciones en las uñas: pueden hacerse frágiles, lo más típico es el adelgazamiento, aplanamiento y, por último, el desarrollo de coiloniquia.
3. Lengua y boca: atrofia de las papilas linguales, glositis, lengua lisa y brillante, estomatitis angular.
4. Sistema genitourinario: son comunes los trastornos durante la menstruación. Un aumento en el volumen de sangre menstrual se ha considerado tanto causa como consecuencia del déficit de hierro, pero esta observación es controversial:
  - a) Remolachiuria: excreción de pigmento rojo después de ingerir remolacha. No se ha determinado por completo su significado exacto, parece que la betanina (pigmento rojo de la remolacha) es mejor absorbida en el déficit de hierro.
5. Bazo: se ha reportado esplenomegalia en pocos pacientes. Se desconoce la patogenia.

6. Sistema esquelético: cambios similares a la talasemia o anemia hemolítica crónica se han visto en niños con déficit de hierro de larga evolución. Estos cambios pueden resultar de la expansión de la médula eritroide durante el crecimiento óseo.
7. Sistema neuromuscular: en niños se observa irritabilidad, poca atención, pierden el interés hacia lo que les rodea y presentan dificultad para la concentración. Se plantea que la ejecución del trabajo y la productividad de tareas que requieren una actividad prolongada queda afectada.
8. Déficit de hierro e infección: existen todavía discrepancias clínicas, de laboratorio y teóricas, en cuanto a la relación del déficit de hierro y las infecciones. Sin embargo, está claro que la pérdida de hierro provoca 2 anomalías en las respuestas inmunes:
  - a) Defectos en la inmunidad mediada por células.
  - b) Defecto en la muerte bacteriana por fagocitos.

En el primer caso hay una disminución del número de células T circulantes, tanto supresoras como helper. Se plantea que los niveles reducidos de enzima ribonucleótido reductasa, que contiene hierro, pueden causar un daño en la proliferación de células T. En el segundo caso hay una disminución de la enzima mieloperoxidasa de los leucocitos.

Algunos datos sugieren que el déficit de hierro y el secuestro de hierro por la transferrina, protegen contra infecciones, por depurar a los organismos invasores del mineral.

#### **Diagnóstico de laboratorio de la anemia ferropénica**

En el diagnóstico se plantea.

1. Hemograma:
  - a) Hemoglobina: es un excelente representante de los compuestos que contienen hierro funcionando. Los valores en el déficit de hierro latente son normales y pueden ser tan bajos como: de 3 a 4 g/dL en anemias crónicas severas.
  - b) Constantes corpusculares: disminuidas (anemia microcítica-hipocrómica).
  - c) Índice de distribución eritrocitario (IDE): se realiza de manera muy fácil, gracias a los modernos contadores celulares. Se reporta como el coeficiente de variación (en %) del volumen eritrocitario. Puede jugar un papel importante en la detección y diagnóstico diferencial del déficit de hierro, ya que por lo general se encuentra elevado en este, mientras que en la talasemia y en la anemia de proceso crónico tiende a ser normal.

d) Leucocitos: por lo general normales, en los casos donde exista una importante eritropoyesis ineficaz, se observará leucopenia.

e) Plaquetas: es común la presencia de trombocitosis, la cual retorna a la normalidad después del tratamiento.

Algunos pacientes con anemia ferripriva de larga evolución tienen trombocitopenia ligera, tal vez por déficit de folato o secuestro esplénico.

2. Hallazgos en sangre periférica: la anisocitosis es el primer cambio morfológico reconocible. Los eritrocitos son anormales en adultos, solo cuando la anemia es de moderada a severa (en el hombre es menor que 12 g/dL y en la mujer es menor que 10 g/dL). Se observan eliptocitos, poiquilocitos y células diana (figura 3.25 del anexo).
3. Reticulocitos: es usual que estén normales. Si existe reticulocitosis, debe estar relacionada con sangrado activo o terapia reciente con hierro.
4. Resistencia osmótica: normal o ligeramente aumentada, lo cual retorna a la normalidad con el tratamiento.
5. Medulograma: el examen de médula es necesario cuando los procedimientos menos invasivos no han sido útiles en el diagnóstico. Existe hiperplasia eritropoyética, los eritroblastos son pequeños, pueden tener citoplasma escaso, poco hemoglobinizados, a menudo con borde irregular. Sin embargo, estos cambios no son tan distintivos para ser de valor diagnóstico. La importancia, en realidad, radica en evaluar los depósitos de hierro de la médula con la coloración de Azul de Prusia: una ausencia de coloración, confirma la deficiencia; pero en los pacientes transfundidos o tratados con hierro parenteral, donde se observan cantidades de hierro coloreable normal e incluso aumentado, aunque no esté disponible para la eritropoyesis, pueden obtenerse resultados erróneos (figura 3.26 del anexo).
6. Concentración de hierro sérico: el hierro sérico está bajo en pacientes no tratados. El rango normal depende del método usado, por lo que existen diferencias entre los laboratorios. No obstante, en la mayoría está entre 13 y 31 mmol/L para el hombre, y entre 10 y 31 mmol/L para la mujer.

#### **Métodos para la determinación del hierro sérico**

Más del 90 % de las determinaciones de hierro en el laboratorio clínico son realizadas por colorimetría.

Estas determinaciones tienen en común los pasos siguientes:

1. Liberación de iones de hierro férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) desde el complejo con la transferrina. Para ello se utiliza un ácido.
2. Reducción de iones  $\text{Fe}^{3+}$  a iones  $\text{Fe}^{2+}$ : se usan agentes reductores como ascorbato, hidroquinona, tioglicolato e hidroxilamina.
3. Reacción de  $\text{Fe}^{2+}$  para formar un complejo coloreado: los únicos agentes utilizados para formar el complejo son la batofenantrolina y la ferrozina.

Los métodos de referencia han sido propuestos por el Comité Internacional para la Estandarización en Hematología (ICSH) y más recientemente por el Centro de Control de Enfermedades (CDC).

La principal limitación del uso de hierro sérico es su gran variabilidad en los valores, lo cual depende de factores técnicos, fisiológicos y patológicos.

#### Factores técnicos

Existen factores técnicos como:

1. Contaminación de tubos de vidrio y reactivos con hierro.
2. Atrapamiento del hierro en las proteínas plasmáticas durante su precipitación.
3. El uso de sueros o plasma heparinizados.
4. Hemólisis de la muestra.

#### Factores fisiológicos

Los factores fisiológicos son:

1. Las concentraciones de hierro tienen un ritmo diario, disminuye en la tarde y la noche, y tienen valores máximos entre las 7:00 a.m. y las 10:00 a.m.
2. Menstruación: los valores disminuyen en este período.

#### Factores patológicos

Entre los factores patológicos están:

1. Procesos inflamatorios o malignos: se observa disminución de los valores en los procesos crónicos.
2. Concentraciones normales o aumentadas se pueden obtener en pacientes con déficit de hierro si reciben medicación antes de realizar el análisis, aun con tabletas de 18 mg de hierro elemental y con inyecciones de hierro por varias semanas.

Los métodos para la determinación del hierro sérico son los siguientes:

1. Determinación de la capacidad total de unión al hierro (CT) y de la capacidad latente de unión al hierro (CL) se definen como:
  - a) CT: es la cantidad de hierro que puede ser unida por la transferrina en un volumen específico de suero.

- b) CL: es el resultado obtenido cuando la cantidad de hierro presente es sustraído de la CT. Representa la transferrina sin hierro.

Para medir la capacidad total: un exceso de iones de  $\text{Fe}^{3+}$  se adicionan al suero para saturar la transferrina. Los iones de  $\text{Fe}^{3+}$  no unidos son precipitados con carbonato de magnesio ligero. Después de la centrifugación, se mide el hierro en el sobrenadante:

- Valor de referencia para CT: de 45 a 72 mmol/L.
- Índice de saturación de la transferrina: se calcula a partir de la fórmula siguiente:

$$\text{Porcentaje de saturación de transferrina} = \frac{\text{Hierro sérico} \times 100}{\text{CT}}$$

- Valor de referencia (VR): de 20 a 45 %.

2. Determinación de las proteínas de unión al hierro: transferrina y ferritina. Los métodos modernos se basan en inmunoensayos:

- a) Para la determinación de transferrina, debido a su concentración relativamente alta, se utilizan los métodos de precipitación inmunológicos directos, entre ellos: inmunodifusión radial, métodos turbidimétricos y nefelométricos:

- VR: entre 2,0 y 4,0 g/L.

- b) Ferritina: la medición de ferritina en plasma provee el estimado indirecto más útil de los almacenes de hierro del cuerpo. Se han dirigido esfuerzos internacionales para estandarizar la determinación de ferritina, coordinados por la OMS, el Comité Internacional para la Estandarización en Hematología y otros. Existe un gran número de métodos comerciales, como son:

- Métodos turbidimétricos.
- Ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzima (ELISA).
- Inmunoensayo nefelométrico.
- Inmunoensayo de fluorescencia (FIA).
- Inmunoensayo con luminiscencia (LIA).
- Radioinmunoensayos (RIA).
- Electroquimiluminiscencia (ECLIA).

La selección de un método dependerá de las características del laboratorio, el tipo y número de muestras, la urgencia de la determinación, la posibilidad de automatización, el personal requerido y el costo de la determinación:

- Valores de referencia:
  - Hombres y mujer menopáusica: entre 30 y 300 ng/mL.
  - Mujer en edad fértil o menor de 50 años: entre 10 y 160 ng/mL.
  - Niños: entre 15 y 120 ng/mL.

Las dos únicas condiciones que provocan la disminución de ferritina del plasma, independientemente de la disminución en los almacenes de hierro, son el hipotiroidismo y la deficiencia de ascorbato, sin embargo, debido a que la ferritina es un reactante de fase aguda, cuando coexiste una enfermedad de proceso crónico con déficit de hierro, la concentración de ferritina está por lo general en un intervalo normal, y la interpretación de los resultados se hace difícil.

3. Medición de receptores de transferrina en el plasma: provee un medio útil para detectar el déficit de hierro, pues el receptor de transferrina soluble es una forma truncada del receptor de transferrina hística. Resulta del dominio citoplasmático N terminal, que quizás ha sido liberado desde la membrana celular. Este ensayo requiere técnicas inmunológicas cuantitativas. Los valores en pacientes con déficit de hierro están incrementados, lo que permite el diagnóstico diferencial con la anemia de proceso crónico, en que los valores no se incrementan.

Hay que señalar que determinadas observaciones preliminares de algunos grupos de trabajo, han tenido resultados contradictorios con esta técnica, en cuanto a su utilidad y especificidad para el diagnóstico de las deficiencias de hierro:

– VR: entre 8,8 y 28,1 nmol/L

4. Protoporfirina eritrocitaria libre (PEL): cuando el aporte de hierro a los eritrocitos es insuficiente para la síntesis del hem, la protoporfirina que no ha podido ser utilizada, se acumula en los eritrocitos. El aumento en la PEL es un índice muy precoz y sensible de carencia del mineral, aunque no es específico, pues también aumenta en la intoxicación por plomo y en las anemias sideroblásticas:

– VR: entre 10 y 99 mg/dL.

5. Exploración de la absorción de hierro: la disminución de los depósitos de hierro resulta en un aumento en la absorción intestinal de este.

El procedimiento tiene una aplicación práctica limitada, pues es incómodo para el paciente, exige aparatos no disponibles en todos los laboratorios y se encuentra bajo la influencia de varios factores, como puede ser, cualquier alteración en el estómago y, por otra parte, aumenta también en las anemias sideroblásticas y en las talasemias, aun con depósitos normales.

#### Diagnóstico diferencial de la anemia ferropénica

En la tabla 3.9 se resumen las principales afecciones que se deben tener en cuenta como diagnóstico diferencial y los aspectos que se necesitan evaluar.

**Tabla 3.9** Diagnóstico diferencial de la anemia ferropénica

Aspectos que se evalúan	Déficit de hierro	Anemia de proceso crónico	Talasemia	Sideroblástica
Hierro sérico	Disminuido	Disminuido	Aumentado	Aumentado
Capacidad total	Aumentado	Disminuido	Normal o disminuido	Normal o disminuido
Porcentaje de saturación	Disminuido	Normal o ligeramente disminuido	Normal	Normal
Ferritina	Disminuido	Normal o aumentado	Aumentado	Aumentado
Protoporfirina eritrocitaria libre	Aumentado	Aumentado	Normal	Aumentado
Azul de Prusia	Negativo	Débil positivo	Positivo	Sideroblastos anillados
Electroforesis de Hb	Normal	Normal	Aumentado en la Hb A <sub>2</sub> y Hb fetal	Normal
Receptores de transferrina circulante	Aumentado	Normal	Normal	Normal

## HEMOCROMATOSIS

La hemocromatosis es un síndrome anatomoclínico que consiste en una acumulación generalizada de hierro en el sistema mononuclear fagocítico y en el parénquima de distintos órganos, sobre los cuales provoca daños estructurales y funcionales.

### Patogenia de la sobrecarga del hierro

La sobrecarga de hierro puede resultar de factores hereditarios o de factores adquiridos, como se representa en la tabla 3.10.

La ferritina y la hemosiderina se acumulan en la mayoría de las células, pero en especial, en los hepatocitos y macrófagos. Los iones ferrosos pueden dañar los tejidos por peroxidación de lípidos de las membranas de microsomas, mitocondrias o de las propias células. Los iones de hierro libre generan radicales hidroxilos.

### Hemocromatosis hereditaria

Durante muchos años se investigó el trastorno genético que producía la hemocromatosis congénita, primero se descubrió un aumento en la frecuencia del alelo HLA-A<sub>3</sub> en estos pacientes, pero pasaron años

hasta que se detectó el gen responsable. Este gen se denominó HFE, el cual está ligado al complejo mayor de histocompatibilidad sobre el brazo corto del cromosoma 6 y se transmite de forma recesiva.

El papel funcional de este gen en el metabolismo del hierro permanece aún sin conocer. La estructura de la proteína HFE es similar al complejo HLA clase I, interactúa con la  $\beta_2$  microglobulina mediante un dominio  $\alpha_3$  y se une al receptor de transferrina, lo que disminuye su afinidad por la transferrina diférrica. Cuando existe la mutación puntual como la sustitución de tirosina por cisteína en la posición 282(C282Y), la HFE no se asocia con la  $\beta_2$  microglobulina y, por tanto, no se expresa sobre la superficie celular. Esto trae como consecuencia que el receptor de transferrina se encuentre libre para unirse a la transferrina. A pesar de este acierto, todavía se necesita profundizar en la regulación del transporte de hierro por la HFE.

### Manifestaciones clínicas de la hemocromatosis

Las manifestaciones clínicas de la hemocromatosis son similares en todos los pacientes, independientemente de la causa. Existe una tríada clásica: cirrosis hepática, hiperpigmentación de la piel y diabetes mellitus.

**Tabla 3.10** Patogenia de la sobrecarga de hierro

Trastorno	Mecanismo de la sobrecarga de hierro
Hemocromatosis hereditaria	Incremento en la absorción intestinal del hierro producido por defecto en el gen HFE, que se trasmite de forma recesiva
Anemias con sobrecarga de hierro Talasemias Anemias sideroblásticas Anemias diseritropoyéticas congénitas	Eritropoyesis ineficaz, con transfusión de eritrocitos o sin ella
Ingreso excesivo de hierro Transfusión de eritrocitos Hierro elemental Hierro dextrán Sobrecarga de hierro africana	Infusión de hierro hemoglobínico (20 mg por cada unidad de eritrocitos) Prolongada ingestión de hierro medicinal Prolongada terapia con hierro parenteral “Siderosis Bantu”: ingestión excesiva en la dieta más un factor genético
Defecto en el transporte y en el metabolismo del hierro Atransferrinemia hereditaria Deficiencia hereditaria de ceruloplasmina	Desvío del hierro a los tejidos no eritroides, que incrementa la absorción Trastorno en la oxidación del hierro, incremento en la absorción intestinal
Anemias hemolíticas congénitas	El proceso hemolítico contribuye a la sobrecarga de hierro
Enfermedad hepática	Incremento en la absorción intestinal de hierro de la dieta
Hemosiderosis focal Hemosiderosis pulmonar idiopática Hemosiderosis renal	Extravasación alveolar de eritrocitos Hemólisis intravascular crónica
Hemocromatosis neonatal	Desconocida

**Nota:** Tomado y modificado de: Bottomley SS. Secondary iron overload disorders. Sem Hematol 1998;35(1):77-86.

**Síntomas iniciales.** Astenia, disminución de la libido, pérdida de peso, manifestaciones articulares, sobre todo, de las articulaciones pequeñas de las manos (segunda y tercera articulaciones metacarpofalángicas), que en ocasiones alcanza grandes articulaciones.

**Manifestaciones digestivas.** Dolor abdominal, tal vez por el depósito de hierro en los plexos nerviosos abdominales.

**Examen físico.** Hepatomegalia con esplenomegalia, con desarrollo de hipertensión portal en las fases avanzadas. Las manifestaciones dependen de la existencia de cirrosis hepática, la cual puede producir, en el 35 % de los casos, carcinoma hepatocelular.

**Manifestaciones cutáneas.** Hiperpigmentación por acumulación de melanina y también por depósitos de hemosiderina. Es generalizada y más intensa en las zonas expuestas al sol, y en las axilas, la región perianal, los pezones y las cicatrices.

**Síndrome endocrino.** Los pacientes pueden presentar diabetes mellitus, hipogonadismo hipogonadotrófico con atrofia testicular, disminución de la libido e impotencia sexual. También puede aparecer hipotiroidismo, hipoparatiroidismo e insuficiencia corticosuprarrenal. Se observa retraso en el crecimiento y en la maduración sexual.

**Manifestaciones cardiovasculares.** Cardiomegalia, insuficiencia cardíaca, arritmia, trastornos de conducción y dolor torácico. Es la principal causa de muerte en la sobrecarga postransfuncional.

**Manifestaciones poco comunes.** Pérdida de la audición, ataxia, osteoporosis e infecciones.

#### Diagnóstico de laboratorio

El diagnóstico de laboratorio indica:

1. Hierro sérico: concentración elevada (mayor que 30 mmol/L o 170 g/100 mL).
2. Índice de saturación de la transferrina: mayor que 60 %.
3. Ferritina: elevada (valores mayores que 1 000 mg/L). Puede ser normal en la hemocromatosis primaria, ya que en las fases iniciales se acumula el hierro, en lo fundamental en el tejido parenquimatoso y la ferritina se relaciona más con los depósitos del sistema mononuclear fagocítico. Puede dar valores normales en las mujeres premenopáusicas a pesar de tener la enfermedad, y puede aumentar en individuos con almacenes de hierro normal que presenten leucemias, trastornos inflamatorios y linfoma de Hodgkin.
4. Prueba de la desferroxamina: se administra desferroxamina y luego se cuantifica la excreción de

hierro en la orina, que presenta valores mayores que 2,5 mg. Esta prueba tiene como desventaja que no discrimina entre las diferentes causas. En la hemocromatosis hereditaria latente podría ser normal este valor y necesita que el depósito donde se colecciona la orina esté libre de hierro.

5. Resonancia magnética nuclear: refleja el aumento de los depósitos en órganos, pero su sensibilidad disminuye en las etapas tempranas de la enfermedad.
6. Enzimas hepáticas: elevadas.
7. Glicemia: elevada.
8. Biopsia hepática: permite el diagnóstico, al observar la hemosiderina depositada en hepatocitos, conductos biliares, epitelio y pequeñas cantidades en las células de Kuffer. Permite, además, cuantificar el hierro en el tejido seco, en que se obtienen valores mayores que 1 %. Define la extensión del daño hepático (fibrosis o cirrosis).
9. El medulograma y la biopsia de médula ósea no aportan información sobre la cantidad de hierro acumulada y no son útiles en la evaluación de la sobrecarga.
10. Estudios genéticos y moleculares:
  - a) Tipificación HLA: se ha observado un aumento en la incidencia del alelo HLA-A<sub>3</sub> en estos pacientes. También se ha reportado un aumento de HLA-B<sub>7</sub> y HLA-B<sub>14</sub>, pero estos genotipos varían de familia en familia, por tanto, su utilidad está en establecer el riesgo de sobrecarga entre los parientes de primer grado (padres, hermanos gemelos, hijos) de los pacientes con hemocromatosis hereditaria.
  - b) Detección de la mutación genética: se realiza mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Este método permite la amplificación de la región que contiene la mutación seguida por digestión de endonucleasas con una enzima de restricción que distingue entre la secuencia normal y la mutada.

#### ANEMIA MEGALOBLÁSTICA

La anemia megaloblástica constituye una de las causas de las anemias macrocíticas (VCM mayor que 100 fL). Desde el punto de vista bioquímico, se caracteriza por una síntesis defectuosa de ADN, con poca afectación en la síntesis de ARN y proteínas, y desde el punto de vista morfológico, se caracteriza por una asincronía entre la maduración del núcleo y la del citoplasma de las células.

## CLASIFICACIÓN DE LA ANEMIA MEGALOBLÁSTICA

La anemia megaloblástica se clasifica como sigue:

### A. Deficiencia de vitamina B<sub>12</sub>:

1. Déficit en la ingestión.
  2. Trastorno en la absorción:
    - a) Ausencia del factor intrínseco:
      - Anemia perniciosa congénita y adquirida.
      - Cirugía gástrica.
      - Ingestión de cáusticos.
    - b) Factor intrínseco anormal desde el punto de vista funcional.
    - c) Fallas en la absorción en el intestino delgado:
      - Captación anormal en el íleon (síndrome de Imerslun-Grasbeck).
      - Enfermedades como: resección ileal, enteritis regional, tuberculosis y linfomas del íleon terminal, enfermedad celíaca, síndrome de Zollinger-Ellison, enfermedad crónica del páncreas.
      - Competencia biológica por la vitamina B<sub>12</sub>.
      - Superdesarrollo bacteriano en el intestino delgado: divertículos, anastomosis, fístulas, asas ciegas, esclerodermia:
        - Infestación por *Diphyllobothrium latum* del pescado.
        - Malabsorción inducida por drogas.
  3. Transporte defectuoso:
    - a) Déficit congénito de transcobalamina II.
    - b) Transcobalamina II defectuosa.
  4. Trastorno en el metabolismo:
    - a) Errores congénitos del metabolismo.
    - b) Exposición a drogas, óxido nítrico.
- ### B. Deficiencia de ácido fólico:
1. Déficit en la ingestión: pobreza, desnutrición extrema, ebullición mantenida, alimentación con leche de cabra, dietas especiales.
  2. Defecto en la absorción:
    - a) Congénito: malabsorción congénita de folato.
    - b) Adquirido: divertículos, resección intestinal, ileitis regional, linfomas.
    - c) Inducido por drogas.
  3. Aumento en los requerimientos: alcoholismo, cirrosis hepática, embarazo, infancia, enfermedades asociadas con una rápida proliferación celular, hemólisis crónica.
  4. Trastornos en el metabolismo:
    - a) Congénitos: errores congénitos del metabolismo (déficit enzimático).
    - b) Adquiridos: alcoholismo, enfermedades hepáticas, fármacos.

5. Aumento en la excreción: diálisis.

### C. Trastornos congénitos de la síntesis de ADN:

1. Aciduria orótica.
2. Síndrome de Lesch-Nyhan.
3. Anemia megaloblástica que responde a la tiamina.
4. Homocistinuria y aciduria metilmalónica.
5. Déficit de enzimas requeridas para el metabolismo del folato.

### D. Trastornos de la síntesis de ADN inducidos por drogas y toxinas:

1. Antagonistas del folato (methotrexate).
2. Antagonistas de las purinas (6 mercaptopurina).
3. Antagonistas de las pirimidinas (citosar).
4. Agentes alquilantes (ciclofosfamida).
5. Zidovudina (AZT, Retrovir).
6. Trimetoprim-sulfametoxazol.
7. Anticonceptivos orales.
8. Anticonvulsivantes.
9. Óxido nítrico.
10. Arsénico.

### E. Eritroleucemia.

## METABOLISMO DE LA VITAMINA B<sub>12</sub>

La vitamina B<sub>12</sub> existe en la naturaleza en diferentes formas químicas, conocidas como cobalaminas (metilcobalamina, adenosilcobalamina, hidroxilcobalamina y cianocobalamina). Es producida solo por microorganismos, de manera que el hombre la recibe únicamente por la dieta:

1. Fuentes de vitamina B<sub>12</sub>: carnes de órganos parenquimatosos, pescado, productos lácteos, yema de huevo.
2. Depósitos en el organismo: entre 2 y 5 mg.
3. Requerimientos diarios: entre 2 y 3 µg.
4. Pérdida diaria: 1,3 µg.

Se necesitan de 4 a 5 años para que se produzca anemia por déficit en su ingestión.

**Absorción de la vitamina B<sub>12</sub>.** Las cobalaminas de los alimentos se encuentran unidas a proteínas, y se liberan en el estómago mediante la proteólisis con pepsina a pH bajo. La cobalamina se une a proteínas de unión específica denominadas proteínas R. Después de la exposición a proteasas pancreáticas, la vitamina B<sub>12</sub> es liberada de las proteínas R en el duodeno y forma un complejo con el factor intrínseco (FI), la glicoproteína termolábil, que se produce en las células parietales gástricas y tiene la capacidad de unir cobalaminas con alta afinidad y especificidad. El complejo cobalamina-FI se

absorbe en el íleon por medio de receptores localizados sobre las microvellosidades de las células de la mucosa de esta región. Una vez que la vitamina es internalizada en el enterocito y liberada del FI, se une a la transcobalamina II (TC II), la cual es la encargada de llevarla a los tejidos. El complejo TC II/cobalamina es aclarado de la circulación de forma rápida, y unido a receptores de superficie específicos, presentes en muchas células. En el interior de estas células, la cianocobalamina y la hidroxicobalamina deben ser convertidas en sus formas coenzimáticas activas y, en principio, se reducen a  $\text{Co}^{2+}$  (cob[II]alamina). Luego, una parte de estas es reducida en las mitocondrias a la forma  $\text{Co}^+$  (cob[I]alamina), la cual es alquilada por el ATP para formar 5-desoxiadenosilcobalamina, cuya función es participar en el ciclo de los propionatos, e intervenir en la transformación de metilmalonilCoA a succinilCoA. El resto de la cobalamina se une a la  $\text{N}^5$  metil-tetrahydrofolato-homocisteína metiltransferasa en el citoplasma, donde es convertida a metilcobalamina, esencial para el paso de homocisteína a metionina, que cataliza la desmetilación del ácido metiltetrahidrofólico que se convierte en  $\text{FH}_4$ .

Existen otras dos formas de transcobalaminas:

1. TC I: no es una proteína de transporte y tiene un rango de aclaramiento bajo. Constituye una forma de almacenamiento de la vitamina, y se produce en los precursores granulocíticos.
2. TC III: tiene la función de transporte. Se aclara aproximadamente en 3 minutos. Se une a un amplio espectro de análogos de la cobalamina que son aclarados muy rápido por el hígado. Se produce en los gránulos específicos de los neutrófilos.

## METABOLISMO DEL ÁCIDO FÓLICO

Los folatos de la dieta están constituidos por poliglutamatos, que se encuentran en los vegetales frescos, las carnes (el hígado y el riñón), los huevos, las levaduras, las habichuelas y las frutas.

La leche tiene poca cantidad de ácido fólico, y en la cocción prolongada (mayor de 15 minutos) se pierde hasta el 95 %.

El ácido fólico en el organismo se comporta de la manera siguiente:

1. Depósitos: entre 6 y 20 mg, ubicados sobre todo en el hígado.
2. Necesidades diarias: entre 50 y 75  $\mu\text{g}$  en los adultos.
3. Aporte de dieta: entre 1 y 1,5 mg; el exceso se elimina.

La OPS recomienda una ingestión de 200  $\mu\text{g}$  en el adulto, 400  $\mu\text{g}$  en la embarazada y 300  $\mu\text{g}$  durante la lactancia.

### Absorción del ácido fólico

Se necesita la enzima conjugasa del intestino para desdoblar los poliglutamatos a monoglutamatos que se absorben de forma rápida y eficaz en el duodeno y en la primera porción del yeyuno. En el intestino, el folato es reducido a  $\text{FH}_2$  y luego a  $\text{FH}_4$  por la dihidrofolato reductasa, lo cual puede tener lugar también en el hígado u otros tejidos. Luego, se metila a  $\text{N}^5$ metiltetrahydrofolato. En esta estructura química pasa al torrente sanguíneo y se une a diferentes proteínas como la albúmina y a una proteína transportadora específica. Es aclarado del plasma muy rápido y su entrada a la célula ocurre mediante receptores específicos.

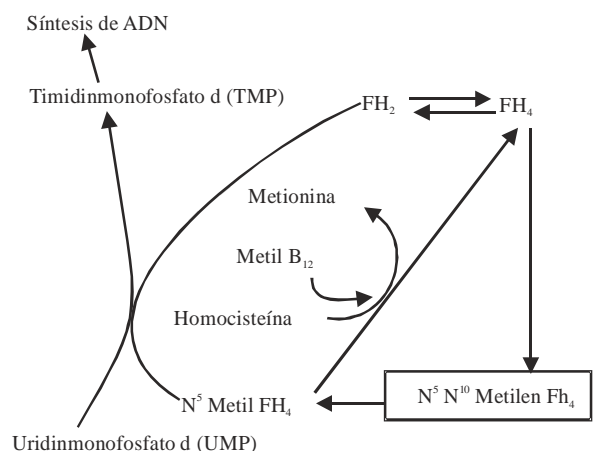
### Funciones del ácido fólico

El ácido fólico interviene en:

1. La transformación de uridinmonofosfato (UMP) a timidinmonofosfato (TMP), un nucleótido esencial para la síntesis de ADN.
2. La síntesis de purinas de novo.
3. Son capaces de aceptar varios fragmentos de un carbono.
4. Participan en la degradación del formiminoglutamato (FIGLU).

## INTERRELACIÓN ENTRE EL METABOLISMO DE LA VITAMINA $\text{B}_{12}$ Y EL ÁCIDO FÓLICO

La interrelación entre el metabolismo de la vitamina  $\text{B}_{12}$  y el ácido fólico se muestra en la figura 3.27.



**Figura 3.27** Interrelación entre el metabolismo de la vitamina  $\text{B}_{12}$  y el ácido fólico.



La cobalamina cataliza la desmetilación del metil  $\text{FH}_4$ , y la convierte en su forma activa ( $\text{FH}_4$ ). Cuando existe déficit de vitamina  $\text{B}_{12}$ , el mecanismo se interrumpe y se acumula  $\text{N}^5$  metil-tetrahidrofolato ( $\text{N}^5$ Metil  $\text{FH}_4$ ), que se continúa generando sin poder pasar a su forma activa con la disminución del resto de los intermediarios metabólicos, menor producción de purina y timina, y disminución de la síntesis de ADN.

## PATOGENIA DE LA ANEMIA MEGALOBLÁSTICA

La disminución en la síntesis de ADN afecta a todas las células en proliferación, sobre todo a aquellas de crecimiento rápido como la médula ósea y el tubo digestivo. La médula es hipercelular con hiperplasia eritropoyética. Las células, al tener interrumpida la maduración nuclear con poca afectación en la síntesis de ARN, presentan una morfología caracterizada por una asincronía en la maduración núcleo-citoplasmática (núcleos inmaduros con citoplasmas maduros por la síntesis de hemoglobina). Las células megaloblásticas acumuladas se destruyen dentro de la médula, lo que acentúa el mecanismo de eritropoyesis ineficaz con hemólisis intramedular. La alteración en la síntesis de ADN también afecta la maduración de megacariocitos y granulocitos.

### Déficit de la vitamina $\text{B}_{12}$

La causa más frecuente de déficit de cobalamina es la anemia perniciosa, en la cual se observan dos fenómenos importantes:

1. Déficit del factor intrínseco.
2. Atrofia de la mucosa gástrica.

En la anemia perniciosa del adulto se plantea la existencia de mecanismos genéticos (la enfermedad se ha asociado con haplotipos A2, A3, B7, B12) y mecanismos inmunológicos dados por una alteración en la inmunidad humoral:

1. Presencia de anticuerpos anticélulas parietales del estómago.
2. Presencia de anticuerpos antifactor intrínseco. Estos anticuerpos pueden ser bloqueadores (bloquean la unión de cobalamina al FI) o precipitantes (se unen al complejo ya formado entre cobalamina y FI, e impiden su unión al receptor en el íleon).

Se ha observado también alteración de la inmunidad celular (disminución de la subpoblación de células T supresoras).

La anemia perniciosa se asocia con otras enfermedades autoinmunes como trastornos tiroideos, vitiligo, atrofia adrenal, hipoparatiroidismo idiopático, diabetes mellitus.

## MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA ANEMIA MEGALOBLÁSTICA

El modo de comienzo de la anemia megaloblástica es insidioso. Por lo general, esta anemia es severa al diagnóstico. Existe una tríada de presentación de las manifestaciones:

1. Decaimiento.
2. Parestesias.
3. Irritabilidad lingual.

Los pacientes con anemia perniciosa presentan el cuadro clínico siguiente:

1. Pelo rubio o encanecido de manera prematura, ojos azules, cara y tórax anchos.
2. Piel: tinte amarillo-limón.
3. Temperatura corporal: si la anemia es grave, puede haber un ligero ascenso y no existir infección.
4. Sistema gastrointestinal: lengua dolorosa de color rojo fuerte, con sensación de amargura o quemadura en la región anterior, atrofia de las papilas. Estos síntomas pueden aparecer previos al desarrollo de la anemia. Los pacientes presentan pérdida del apetito, náuseas, sensación de llenura, epigastralgia y diarreas frecuentes.
5. Sistema nervioso central: las manifestaciones neurológicas pueden aparecer en etapas tempranas, incluso antes de que aparezca la anemia.

La anemia megaloblástica afecta la materia blanca de los cordones laterales y dorsales de la médula espinal y la corteza cerebral. Existe degeneración mielínica, con afectación también de los nervios periféricos.

El inicio de los síntomas es gradual con parestesias en alfiler. Continúa con hipotonía, disminución de los reflejos, incoordinación, trastornos de la sensibilidad vibratoria, ataxia con signo de Romberg positivo al examen físico. Por lesión de los cordones laterales: espasticidad, exageración de los reflejos, signo de Babinsky positivo. Menos común: hipotensión ortostática, oftalmoplegia, neuritis retrobulbar e impotencia.

Es importante tener en cuenta que estos pacientes pueden desarrollar una depresión severa por el déficit de las vitaminas.

El resto de los síntomas se debe a la presencia de anemia y a su magnitud con afectación del aparato cardiovascular.

Las manifestaciones clínicas del déficit de folato son similares al déficit de vitamina B<sub>12</sub>, excepto que no existen manifestaciones neurológicas.

## DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LA ANEMIA MEGALOBLÁSTICA

Las pruebas para diagnosticar la anemia megaloblástica deben estar encaminadas a:

1. Establecer que en realidad se trata de una anemia megaloblástica.
2. Distinguir entre déficit de vitamina B<sub>12</sub> y déficit de ácido fólico.
3. Determinar la causa del déficit.

### Estudios para establecer el diagnóstico de la anemia megaloblástica

Los estudios para establecer el diagnóstico de la anemia megaloblástica son:

1. Hemograma: anemia (entre 70 y 80 g/L), puede ser severa al diagnóstico:
  - a) VCM: entre 110 y 130 fL.
  - b) IDE: elevado.
  - c) CHCM: normal.
2. Sangre periférica: se caracteriza por la presencia de macrocitos ovals, que pueden preceder al desarrollo de la anemia. También puede observarse anisopoiquilocitosis, punteado basófilo, corpúsculos de Howell-Jolly y anillos de Cabot. Existe hipersegmentación de los neutrófilos (de 6 a 10 lóbulos o más). Puede haber leucopenia y trombocitopenia (figuras 3.28 y 3.29 del anexo).
3. Recuento de reticulocitos: bajo.
4. Medulograma: médula hiper celular global, hiperplasia eritroide con asincronía en la maduración núcleo-citoplasma:
  - a) Serie granulopoyética: se afecta también la maduración, y se observan *stabs* (bandas) y metamielocitos gigantes.
  - b) Sistema megacariopoyético: alteraciones nucleares que dan aspecto de megacariocito en rosario.
  - c) Azul de Prusia: positivo, puede haber sideroblastos anillados (figura 3.30 del anexo).
5. Enzima laticodeshidrogenosa (LDH): aumentada (LDH 1 > LDH 2).
6. Urobilinógeno urinario y fecal: aumentado.
7. Hierro sérico: aumentado con disminución de la capacidad total (excepto que exista un déficit concomitante de este mineral).
8. Bilirrubina sérica: aumentada a expensas de la fracción indirecta.

### Exámenes para distinguir entre el déficit de vitamina B<sub>12</sub> y el de ácido fólico

Los exámenes para distinguir entre el déficit de vitamina B<sub>12</sub> y el de ácido fólico son:

1. Determinación sérica de vitamina B<sub>12</sub>: los valores de referencia varían según el laboratorio y el método empleado, en general oscilan entre 200 y 900 pg/mL. Se realiza por los métodos siguientes:
  - a) Ensayos microbiológicos: se utilizan organismos dependientes de la cobalamina para su crecimiento, como *Euglena gracilis* o *Lactobacillus leishmani*. Tiene como inconveniente que se necesitan varios días para el ensayo y es afectado por la administración de antibióticos al paciente.
  - b) Métodos de dilución radioisotópica (RIA): la determinación se basa en la unión competitiva de la vitamina B<sub>12</sub> radiomarcada y la vitamina B<sub>12</sub> libre en la muestra, por el factor intrínseco. Antes de realizar la determinación, la vitamina B<sub>12</sub> es liberada de las proteínas de unión endógenas por el calor o por tratamiento con solución alcalina, lo que trae como desventajas:
    - Falsos valores normales o aumentados:
      - Artefacto del RIA.
      - Vitamina B<sub>12</sub> administrada por vía intramuscular antes de la toma de la muestra.
      - Pacientes con síndromes mieloproliferativos crónicos o enfermedades hepáticas.
    - Falsos valores disminuidos:
      - Embarazo.
      - Anticonceptivos orales.
      - Déficit de TC I.
      - Anemia aplásica.
      - Déficit de ácido fólico.
      - Drogas con antifolatos.
      - Altas dosis de vitamina C.
      - Mieloma múltiple.
      - Artefacto por radiactividad en el suero.
2. Método de electroquimioluminiscencia: inmunoensayo donde la vitamina B<sub>12</sub> de la muestra compete con la B<sub>12</sub> añadida y marcada con la biotina, para ocupar los puntos de fijación del factor intrínseco marcado con rutenio y formar un complejo que se fija a la fase sólida por la interacción de biotina y micropartículas cubiertas por estreptavidina. La mezcla de la reacción es trasladada a una célula de medición, donde las micropartículas se fijan a la superficie del electrodo por magnetismo. Al aplicar una corriente eléctrica, se produce una reacción quimioluminiscente, cuya emisión de luz se mide en un fotomultiplicador, y se obtienen los resultados a partir de una curva de calibración.

3. Prueba de Schilling: es sensible y específica. Se administra por vía oral la vitamina B<sub>12</sub> marcada radiactivamente; al cabo de 1 a 6 horas, se administra una dosis parenteral de 1 000 mg de B<sub>12</sub> para saturar los depósitos. A continuación, se determina el porcentaje de material radiactivo detectado en la orina de 24 horas. En los individuos con disminución de la absorción de vitamina B<sub>12</sub>, se observará una disminución de la excreción urinaria (con función renal normal). La prueba puede repetirse empleando cobalto radiactivo unido al factor intrínseco. Si se corrige la excreción urinaria, se concluye que la ausencia del FI es el mecanismo fisiopatológico responsable de los valores disminuidos de B<sub>12</sub>. El fracaso en corregir la excreción, sugiere otras causas de malabsorción gastrointestinal.
4. Anticuerpos anticélulas parietales: pobre especificidad y sensibilidad moderada.
5. Anticuerpos antifactor intrínseco: muy específico, pero alrededor del 50 % de los pacientes pierden el anticuerpo, lo que disminuye la sensibilidad.
6. Estudio de la secreción gastrointestinal: aclorhidria histamino resistente (sensible, pero no específica).
7. Gastroscoopia: atrofia de la mucosa gástrica.
8. Determinación del ácido fólico sérico y eritrocitario. Los métodos empleados son:
  - a) Microbiológicos: se utiliza una cepa de *Lactobacillus casei* que crece bien en ácido N<sup>5</sup> metiltetrahidrofolato. Es un método preciso y que se puede reproducir, pero muy laborioso, y se invalida por la administración de antibióticos. El valor de referencia está entre 4 y 20 ng/mL, y varía según el laboratorio.
  - b) Método de dilución radioisotópico: se basa en la unión competitiva del N<sup>5</sup> metiltetrahidrofolato marcado y el no marcado de la muestra, por proteínas de unión al ácido fólico, después de haberlo liberado de las proteínas de unión endógena. Luego de la incubación, se centrifuga, se decanta y se procede a contar, en un contador gamma. Los resultados del recuento se llevan a una curva estándar para determinar la concentración de folato.
  - c) Método de electroquimioluminiscencia: el folato de la muestra compete con el folato añadido y marcado con biotina para ocupar los puntos de fijación de la proteína de unión al folato, marcada con rutenio. El folato eritrocitario es el mejor indicador de los almacenes. El folato sérico tiende a aumentar en el 25 % de los pacientes con déficit de vitamina B<sub>12</sub> y el eritrocitario disminuye. Por tanto, lo indicado en la anemia megaloblástica es realizar las tres determinaciones.
9. Prueba de supresión de deoxiuridina: es una medida de la pérdida de N<sup>5</sup> N<sup>10</sup> metiltetrahidrofolato en

las células (en déficit de folato y de vitamina B<sub>12</sub>). Si se adiciona deoxiuridina (du) a cultivos medulares normales, este es incorporado dentro del ADN, lo que disminuye la incorporación de timidina tritriada adicionada a menos del 10 % del rango en cultivos medulares sin du. En la médula de pacientes con anemia megaloblástica, la conversión de du a deoxitimidina monofosfato (dtmp) está impedida; por tanto, se observa un menor grado de supresión (a no menos del 20 %) de incorporación de timidina tritriada por el du. La adición de N<sup>5</sup> metiltetrahidrofolato corrige solo el defecto de folato, y la adición de vitamina B<sub>12</sub> corrige solo el déficit de esta vitamina. La prueba de supresión de deoxiuridina es sensible, pero requiere equipos especiales, materiales y expertos, y no está todavía disponible para todos los laboratorios.

#### 10. Metabolitos séricos y urinarios:

- a) Metilmalonato en orina para déficit de vitamina B<sub>12</sub>: aumentada en el déficit de vitamina B<sub>12</sub>.
- b) Metilmalonato en suero: aumentada en el déficit de vitamina B<sub>12</sub>.
- c) Homocisteína en suero: aumentada en el déficit de vitamina B<sub>12</sub> y de ácido fólico.
- d) Formiminoglutamato (FIGLU) en la orina: aumentada en el déficit de B<sub>12</sub> y de ácido fólico.

#### Estudios para determinar las causas del déficit de vitamina B<sub>12</sub> y de ácido fólico

Los estudios para determinar la causa del déficit de vitamina B<sub>12</sub> y de ácido fólico son:

1. Interrogatorio adecuado: conocer si el paciente es vegetariano; si la alimentación es con leche de cabra; si existe cirugía previa o diarreas crónicas o el uso prolongado de alcohol y de determinadas drogas.
2. Biopsia de yeyuno.
3. Pruebas de absorción.
4. Tránsito intestinal para determinar enfermedades congénitas o adquiridas del intestino.

## ANEMIA APLÁSTICA

### CONCEPTO Y CAUSAS DE PANCITOPENIA

Antes de presentar la anemia aplástica, es necesario definir el término pancitopenia, muy usado en la práctica clínica y de laboratorio.

**Pancitopenia.** Es la reducción de las tres líneas celulares hematopoyéticas: leucocitos, eritrocitos y plaquetas, como consecuencia de diferentes afecciones.

Si se afectan solo dos líneas celulares, se denomina bicitopenia.

### Causas de pancitopenia

La pancitopenia aparece debido a:

1. Anemia aplásica o hipoplásica.
2. Hemoglobinuria paroxística nocturna.
3. Infiltración de la médula ósea por:
  - a) Leucemia aleucémica.
  - b) Linfomas.
  - c) Mieloma múltiple.
  - d) Mielofibrosis.
  - e) Metástasis.
  - f) Osteopetrosis.
  - g) Esplenomegalia.
  - h) Déficit de ácido fólico y de vitamina B<sub>12</sub> (causa nutricional).
  - i) Lupus eritematoso sistémico.
  - j) Infecciones por micobacterias, brucelosis.
  - k) Drogas.

### CONCEPTO Y CAUSAS DE LA ANEMIA APLÁSTICA

La anemia aplásica es un trastorno hematológico caracterizado por una pancitopenia periférica, secundaria a una falla en la producción de eritrocitos, leucocitos y plaquetas con hipoplasia o aplasia severa de la médula ósea, en ausencia de enfermedad que desplace, infiltre o suprima la actividad hematopoyética medular.

**Patogenia.** Se plantean diferentes mecanismos para explicar la falla en la producción de las células sanguíneas:

1. Defecto de la *stem cell* pluripotente común a las tres líneas hematopoyéticas: existen evidencias de alteraciones de las células precursoras:
  - a) Disminución de los precursores medulares en los cultivos realizados *in vitro*.
  - b) Aumento de la incidencia de anomalías nucleares en pacientes con anemia aplásica idiopática.
  - c) En la hemoglobinuria paroxística nocturna, los trastornos se encuentran en las tres líneas celulares, lo que sugiere defectos en la *stem cell*.
2. Defecto del microambiente medular o de los factores estimulantes del crecimiento: su papel como único mecanismo fisiológico es poco probable. Algunos autores encuentran una disminución de la capacidad de proliferación de las células estromales. Otros hallazgos:
  - a) Aumento de los factores estimulantes del crecimiento en respuesta a la pancitopenia.
  - b) Disminución en la producción de IL-1.

- c) Aumento del número de citoquinas con actividad inhibitoria de la hematopoyesis.
- d) Aumento en la producción monocitaria de IL-2, interferón  $\gamma$  y factor de necrosis tumoral  $\alpha$ .
3. Supresión inmune de los precursores hematopoyéticos: se fundamenta en la respuesta de los pacientes al suero antilinfocítico, en la supresión *in vitro* de la proliferación celular en la médula normal, por células de enfermos y la necesidad del uso de inmunosupresores, previa a la realización del trasplante de médula singénico.

### CLASIFICACIÓN DE LA ANEMIA APLÁSTICA

La anemia aplásica se clasifica en:

1. Congénita:
  - a) Con malformaciones: pancitopenia constitucional de Fanconi.
  - b) Sin malformaciones:
    - Síndrome de Shwachman-Diamond.
    - Disqueratosis congénita.
    - Defecto familiar en la captación de folato.
2. Adquiridos:
  - a) Idiopática (entre 70 y 80 % de los casos).
  - b) Secundarias a:
    - Agentes físicos y químicos:
      - Radiaciones.
      - Benceno.
      - Drogas: fenilbutasona, indometacina, ibuprofeno, cloramfenicol, sales de oro, anti-convulsivos, antipalúdicos y sulfamida.
      - Insecticidas.
    - Infecciones:
      - Hepatitis.
      - Mononucleosis infecciosa.
      - Parvovirus.
      - Virus de inmunodeficiencia adquirida.
      - Dengue.
      - Toxoplasmosis.
      - Bacterias.
    - Pancreatitis.
    - Embarazo.
    - Timomas.
    - Esclerosis del tiroides.
    - Inmunológicas.
    - HPN.

### ANEMIA APLÁSTICA IDIOPÁTICA

La idiopática es la anemia aplásica en la que no ha habido una exposición a drogas o a sustancias químicas en períodos de 3 a 12 meses antes del inicio de la enfermedad.

## Manifestaciones clínicas de la anemia aplásica

Los síntomas y signos de esta enfermedad dependen de la afectación de las tres líneas hematopoyéticas:

1. Anemia: ocasiona palidez, debilidad, fatiga, somnolencia y manifestaciones cardiorrespiratorias.
2. Leucopenia: se presenta fiebre por la sepsis y úlceras necróticas en la mucosa oral y anoperineal.
3. Trombocitopenia: hemorragias cutáneas, mucosas o viscerales en casos más severos.

Por lo general, el comienzo de la anemia aplásica es insidioso y progresa la sintomatología con la acentuación de las citopenias. En las causas secundarias, los síntomas y signos pueden desarrollarse muchas semanas o incluso meses después de la exposición al agente causal.

Se caracteriza además por la ausencia de esplenomegalia, excepto en algunos casos de envenenamiento por benceno. No existen tampoco adenomegalias, atrofia de papilas linguales ni manifestaciones neurológicas; excepto si el paciente presenta una hemorragia cerebral como consecuencia de la trombocitopenia severa.

En la aplasia constitucional de Fanconi hay múltiples anomalías esqueléticas (ausencia del pulgar, ausencia o hipoplasia del primer metacarpiano, pulgares con 3 falanges, ausencia del radio y atrofia hipotenar) y anomalías viscerales (sobre todo del sistema nervioso y del renal) que, unidas a las cutáneas (hiperpigmentación de la piel), caracterizan a esta afección.

## DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LA ANEMIA APLÁSTICA

El diagnóstico de laboratorio de la anemia aplásica indica:

1. Hemograma: hemoglobina entre 60 y 80 g/L, leucopenia y trombocitopenia.
2. Lámina periférica: a pesar de la anemia intensa, por lo general no existen alteraciones en los eritrocitos, aunque se ha reportado anisopoiquilocitosis moderada y macrocitosis.
3. Recuento de reticulocitos: disminuido.
4. Hierro sérico: aumentado.
5. Ferritina: aumentada.
6. Ferrocínética:
  - a)  $t_{1/2}$  del  $^{59}\text{Fe}$ : prolongada.
  - b) Recambio de hierro plasmático: disminuido.
  - c) Incorporación del hierro a los eritrocitos: disminuido.
  - d) Medición sobre órganos: incorporación del hierro en médula disminuida, aumentada en hígado y bazo.

7. Medulograma: médula hipocelular o acelular, casi todas las células nucleadas son linfocitos. En ocasiones se observa una médula con celularidad abundante, lo cual depende de la zona aspirada, pues en estos casos en la biopsia se comprueban zonas aplásicas junto a zonas hipercelulares.
8. Biopsia de la médula ósea: es la más indicada para evaluar la disminución de la celularidad y el aumento de la grasa.
9. Determinación de eritropoyetina: elevada.
10. Fosfatasa alcalina leucocitaria: aumentada.
11. Hemoglobina fetal: se ha reportado aumentada en niños con aplasia.
12. Resonancia magnética nuclear: define muy bien la médula hipoplástica, así como las regiones aisladas de actividad medular.
13. Cariotipo: en la anemia aplásica de Fanconi se observan anomalías cromosómicas específicas en cultivos celulares después de estrés clastogénico.
14. Estudios para detectar HPN (prueba de Ham, prueba de Crosby, prueba de la sucrosa y prueba de la insulina): deben realizarse por la relación existente entre estas afecciones (el 58 % de los pacientes con HPN pueden evolucionar hacia anemia aplásica y entre el 9 y el 13 % de los pacientes con anemia aplásica, durante la reconstitución hematopoyética, pueden desarrollar un clon HPN).

## ANEMIA DE LOS PROCESOS CRÓNICOS

La anemia de los procesos crónicos es una entidad clínica que se presenta, sobre todo, en los procesos enfermizos de larga evolución. Se caracteriza por ser una anemia con hierro sérico bajo y depósitos de hierro normales o aumentados.

## CAUSAS DE LA ANEMIA DE LOS PROCESOS CRÓNICOS

La anemia de los procesos crónicos se debe a:

1. Infecciones crónicas:
  - a) Pulmonares: tuberculosis, abscesos, enfisema pulmonar, bronquiectasia, neumonía.
  - b) Endocarditis bacteriana subaguda.
  - c) Osteomielitis.
  - d) Pielonefritis e infecciones urogenitales crónicas.
  - e) Infección crónica por hongos.
  - f) Meningitis.
  - g) VIH/SIDA.
2. Procesos inflamatorios crónicos:
  - a) Lupus eritematoso sistémico.
  - b) Artritis reumatoide.

- c) Fiebre reumática.
  - d) Traumas graves.
  - e) Abscesos estériles.
  - f) Daño térmico severo.
  - g) Vasculitis.
3. Neoplasias:
- a) Linfoma de Hodgkin y otros.
  - b) Leucemias.
  - c) Carcinomas.
  - d) Mieloma múltiple.
4. Otras causas:
- a) Enfermedad hepática por alcoholismo.
  - b) Trastornos endocrinos.
  - c) Trastornos renales.
  - d) Tromboflebitis.
  - e) Insuficiencia cardíaca congestiva.
  - f) Enfermedad idiopática.

## PATOGENIA DE LA ANEMIA DE LOS PROCESOS CRÓNICOS

En los procesos crónicos de la anemia, hay activación de los macrófagos y liberación de citoquinas e interferón  $\gamma$ , y estos a su vez, actúan sobre otras células con nueva liberación de citoquinas y mediadores, que interactúan en un mecanismo complejo, por lo que se producen diferentes acciones: la IL-1 inhibe la eritropoyesis y, por otra parte, estimula la liberación de factores estimulantes del crecimiento granulocítico y macrofágico; el interferón  $\gamma$  tiene acción inhibitoria sobre la eritropoyesis y también sobre la proliferación de los precursores mieloides. Para explicar la hipoferrremia se plantean las posibilidades siguientes: que la disponibilidad del hierro para la eritropoyesis desde los macrófagos tenga un mecanismo lento, ya que se moviliza desde los almacenes y no desde las células rojas senescentes (forma rápida). Puede que exista un exceso de apoferritina y la excedente una cantidad mayor de hierro de la habitual. Por último, la IL-1, que actúa por medio de los FEC-granulocítico y FEC-granulomacrofágico, libera lactoferrina con afinidad por el hierro superior a la transferrina, pero no lo cede a los eritroblastos, por lo que queda atrapado en la médula.

## MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA ANEMIA DE LOS PROCESOS CRÓNICOS

Las manifestaciones clínicas son variables y los síntomas y signos dependen de la enfermedad de base. La anemia de los procesos crónicos se desarrolla en el primer o segundo mes de la enfermedad y no progresa.

## DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LA ANEMIA DE LOS PROCESOS CRÓNICOS

El diagnóstico de laboratorio de la anemia de los procesos crónicos indica:

1. Hemograma: anemia ligera o moderada que no progresa. La severidad de esta anemia se relaciona con la afección que la produce. Por lo general, es normocítica normocrómica; en raros casos hay microcitosis.
2. Recuento de reticulocitos: normal, en ocasiones ligeramente aumentado.
3. Los reactantes de fase aguda como ceruloplasmina, fibrinógeno, haptoglobina y ferritina, se encuentran elevados.
4. Supervivencia eritrocitaria: ligeramente disminuida.
5. Hierro sérico: disminuido.
6. Capacidad total: normal o disminuida.
7. Saturación: disminuida, pero no alcanza valores tan bajos como en la anemia ferropénica.
8. Medulograma: no existen anormalidades significativas, excepto que el hierro en la médula se encuentra normal o aumentado.

## OTROS MECANISMOS DE PRODUCCIÓN DE LAS ANEMIAS SECUNDARIAS A TRASTORNOS SISTÉMICOS

Algunas de las enfermedades mencionadas pueden tener otras causas de anemia, las cuales serán descritas a continuación:

1. Anemia de la insuficiencia renal:
  - a) Mecanismos de producción:
    - Disminución de la producción de eritrocitos, debido al déficit de eritropoyetina por el daño renal.
    - Disminución de la supervivencia de eritrocitos. El mecanismo es extracorpúscular, debido a la retención de solutos urémicos.
    - Toxicidad asociada con diálisis: se produce fragmentación mecánica de los eritrocitos, trastornos en la hidratación celular, toxicidad por exposición al cobre, a formaldehído y a nitratos.
    - Toxicidad asociada con fármacos de elevado potencial oxidativo o capaces de producir hemólisis por anticuerpos.
    - Microangiopatía: hipertensión maligna.
    - Déficit de hierro: en las hemodíalisis se pierden entre 1,5 y 2 g de hierro por año. También se presentan pérdidas gastrointestinales y de transferrina por la orina.

- Déficit de folato: existe una disminución en la ingestión, se pierde en las diálisis y por drogas que inhiben su absorción o metabolismo.
  - Toxicidad por aluminio: la sobrecarga de aluminio puede producir una anemia microcítica hipocrómica en pacientes a los que se les realiza diálisis (por el agua empleada en estos). También se debe al uso, por tiempo prolongado, de antiácidos que lo contienen.
  - Hiperparatiroidismo secundario: puede inducir mielofibrosis y secuestro esplénico.
- b) El diagnóstico de laboratorio indica:
- Anemia (hematócrito entre 20 L/L y 30 L/L), normocromía, normocitosis. Si la uremia es significativa, se observan crenocitos leucocitos y plaquetas normales en ausencia de esplenomegalia o mielofibrosis.
  - Reticulocitos bajos.
  - Médula ósea normocelular o ligeramente hiper celular, pueden haber cambios megaloblásticos.
  - Azul de Prusia: positivo.
  - Hierro sérico: puede estar disminuido.
  - Folato sérico: puede estar disminuido.
  - Dosificación de eritropoyetina: baja.
2. Anemia de la enfermedad hepática:
- a) Mecanismos de producción:
- Dilucional: existe un aumento en el volumen plasmático en los pacientes con cirrosis hepática.
  - Déficit de ácido fólico: por una ingestión inadecuada o por bloqueo de su liberación desde los almacenes.
  - Déficit de hierro: se produce si existe pérdida gastrointestinal.
  - Disminución de la supervivencia del eritrocito por hipersplenismo (los eritrocitos quedan atrapados en el bazo, el cual ha aumentado de tamaño) o por daño de la membrana, debido al metabolismo lipídico alterado que causa anemia hemolítica.
- b) En la hepatitis viral aguda se plantean dos mecanismos:
- Hemólisis: puede ser idiopática o puede representar la exacerbación de un defecto intrínseco (por ejemplo el déficit de la enzima G6PD).
  - Anemia aplástica: puede observarse sobre todo en los pacientes con hepatitis C, y se desarrolla alrededor de los 2 meses.
- c) Pruebas de laboratorio:
- Hemograma: anemia de severidad variable.
  - VCM: entre 91 y 155 fL.
- Sangre periférica: macrocitos, dianocitos y acantocitos.
  - Médula ósea: celularidad variable, cambios megaloblásticos, puede haber disminución de los depósitos de hierro.
  - Folato sérico: disminuido.
  - Vitamina B<sub>12</sub> sérica: normal.
3. Anemia de los trastornos endocrinos:
- a) Hipotiroidismo: el mecanismo de producción de la anemia aún se desconoce; quizá esté relacionado con la disminución de los niveles de eritropoyetina, ya que existe una disminución del metabolismo basal y, por tanto, de las demandas de oxígeno. Por lo general se comporta como una anemia de los procesos crónicos, aunque se ha observado anemia ferropénica y anemia megaloblástica en algunos pacientes.
- b) Hipertiroidismo: en este caso no es común que exista anemia. Se ha reportado un déficit de vitamina B<sub>12</sub>.
- c) Hipopituitarismo: resulta de un ajuste fisiológico para los requerimientos de oxígeno, y se observan niveles de eritropoyetina disminuida. La anemia es normocítica normocrómica.
4. Anemia de las infecciones:
- a) Mecanismos de producción: pérdidas sanguíneas en diferentes órganos, por ejemplo, pérdidas sanguíneas pulmonares en la tuberculosis y genitourinarias en la esquistosomiasis.
- Disminución en la producción: en los casos de anemia aplástica y en las infecciones agudas.
  - Aumento en la destrucción: si existe parasitismo intraeritrocitario, síndrome anémico-hemolítico, CID, hipersplenismo.
  - Anemia en los pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH): es común que en estos pacientes se presente anemia de ligera a moderada, la cual se incrementará con el progreso de la enfermedad (cuando existen infecciones oportunistas, se observa anemia entre el 70 y el 95 % de los casos). Se piensa que esto se deba a un mecanismo hipoproliferativo, pero también se plantea la anemia de proceso crónico, la eritropoyesis ineficaz, la supresión de la eritropoyesis en ocasiones por parvovirus B19 o *Micobacterium avium* y poco común, producida por anticuerpos antieritrocitos (AHAI).
- b) Diagnóstico de laboratorio:
- Hemograma: anemia normocítica normocrómica. Puede observarse el fenómeno de *rouleaux*; si existe púrpura trombocitopénica

trombótica (PTT), se aprecian esquistocitos y en los pacientes tratados con zidovudina se observa macrocitosis.

- Recuento de retículos: bajo (indicador de eritropoyesis deprimida o ineficaz).
- Medulograma y biopsia de médula ósea: la médula puede ser hiper celular, normocelular o hipocelular. Los precursores eritroides son normales e incrementados con grado variable de diseritropoyesis. Se han reportado cambios megaloblásticos cuando se usan tratamientos con zidovudina, sulfaprim y dapsone. En las infecciones por *Micobacterium avium* o parvovirus B19 hay supresión de la eritropoyesis:
  - Sistema megacariopoyético: íntegro o hiperplástico con cambios dismórficos.
  - Sistema granulopoyético: íntegro, eosinofilia y displasia mieloide.
  - Se observa un aumento de las células plasmáticas, histiocitos y agregados de linfocitos benignos. La BMO es útil para el diagnóstico de los linfomas no Hodgkin con infiltración de médula.
- Estudio de hierro: hierro sérico disminuido, ferritina elevada, coloración de Azul de Prusia en el medulograma: positivo.
- Vitamina B<sub>12</sub>: puede disminuir en el 7 al 20 % de los pacientes.

#### 5. Anemia en el alcoholismo:

##### a) Mecanismo de producción:

- Déficit de ácido fólico: por déficit en la ingestión o por efecto del etanol en el metabolismo del folato.
- Déficit de hierro: por pérdidas gastrointestinales.
- Disminución de la supervivencia del eritrocito por efecto directo del alcohol.
- Anemia sideroblástica: efecto tóxico directo sobre el metabolismo mitocondrial. Se observa en los alcohólicos malnutridos con déficit de folato.
- Acción del exceso de alcohol sobre la médula:
  - Vacuolización de los precursores hematopoyéticos.
  - Cambios megaloblásticos en ausencia de déficit de folato.
  - Cambios sideroblásticos.
  - Hipocelularidad.
  - Aumento del número de células plasmáticas.

## ANEMIA EN EL EMBARAZO

Durante el embarazo se pueden presentar alteraciones hematológicas. La anemia es la más frecuente de ellas.

### MECANISMOS DE PRODUCCIÓN DE LA ANEMIA EN EL EMBARAZO

**Anemia dilucional.** Ocurre un aumento del volumen plasmático de 40 a 60 %, aproximadamente, en la gestación normal. Aunque la masa eritrocitaria también aumenta, es en menor proporción, y ocurre la hemodilución fisiológica.

El criterio de anemia en el embarazo es: Hb menor que 110 g/L en cualquier momento de la gestación.

El déficit de hierro es la causa más frecuente de anemia. Los requerimientos de hierro aumentan de manera progresiva hasta 6 o 7 mg/día en el último trimestre. También ocurre un déficit de folato, pues las necesidades diarias aumentan.

**Anemia hemolítica asociada a preeclampsia.** Se caracteriza por la presentación de hemólisis, un aumento en las enzimas hepáticas y trombopenia. La lesión del endotelio vascular y el aumento de la adhesión plaquetaria llevan a la formación de trombosis en la microcoagulación y a la aparición de anemia microangiopática.

**Anemia aplástica.** Es una causa infrecuente de anemia durante la gestación. Puede producirse una aplasia pura de células rojas, relacionada sobre todo con la infección por parvovirus en mujeres con enfermedad hemolítica.

### DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LA ANEMIA EN EL EMBARAZO

El diagnóstico de laboratorio de la anemia del embarazo indica:

1. Hemograma: hemoglobina menor que 110 g/L.
2. VCM: puede estar disminuido por el déficit de hierro; pero si está normal, se recomienda la observación de la lámina periférica para detectar la población microcítica hipocrómica.
3. Ferritina: es la recomendada para el diagnóstico de la deficiencia de hierro.
4. Dosificación de folato sérico: baja.
5. Dosificación de vitamina B<sub>12</sub>: generalmente normal por amplias reservas maternas y escasos requerimientos del feto.



## SÍNDROME HEMOLÍTICO

En el síndrome hemolítico se incluyen varias afecciones que tienen como característica común la disminución de la supervivencia de los eritrocitos en la circulación y la aparición de la anemia cuando la destrucción de los eritrocitos excede la capacidad de síntesis medular.

## CLASIFICACIÓN DE LAS ANEMIAS HEMOLÍTICAS

Las anemias hemolíticas se clasifican en:

1. Anemias hemolíticas intracorpúsculares (intrínsecas), debidas a un defecto del eritrocito:
  - a) Defectos de la membrana eritrocitaria:
    - Esferocitosis hereditaria.
    - Eliptocitosis hereditaria.
    - Estomatocitosis.
    - Enfermedad por Rh.
    - Fenotipo McLeod.
    - Abetalipoproteinemia.
  - b) Alteraciones de las enzimas:
    - Enzimopatías de la vía glucolítica:
      - Hexoquinasa (HK).
      - Glucosa fosfato isomerasa (GPI).
      - Fosfofructoquinasa (PKF).
      - Aldolasa (ALD).
      - Triosa fosfato isomerasa (TPI).
      - 2,3 difosfogliceratomutasa (DPGM).
      - Fosfogliceratoquinasa (PGK).
      - Piruvatoquinasa (PK).
    - Enzimopatías de la vía de las pentosas y del metabolismo del glutatión:
      - Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD).
      - $\gamma$  glutamilcisteil sintetasa.
      - Glutathion sintetasa.
    - Enzimopatías del metabolismo nucleotídico:
      - Adenilatociclase (AK).
      - Adenosindeaminasa (ADA).
      - Pirimidina 5' nucleotidasa (P5'N).
  - c) Defectos en la estructura y síntesis de la hemoglobina:
    - Hemoglobinopatías: S, C, D y otras.
    - Talasemias.
    - Hemoglobinas inestables.

2. Anemias hemolíticas extracorpúsculares (extrínsecas) secundarias a alteraciones del medio que rodea al eritrocito:

- a) Inmunes:
    - Transfusión de sangre incompatible.
    - Enfermedad hemolítica del recién nacido.
    - Anemia hemolítica autoinmune.
    - Asociada con fármacos.
  - b) Traumática y microangiopática:
    - Prótesis valvulares.
    - Síndrome urémico-hemolítico.
    - Púrpura trombocitopénica trombótica.
    - Coagulación intravascular diseminada.
  - c) Infecciones:
    - Protozoos: paludismo, toxoplasma, tripanosoma.
    - Bacterias: cólera, fiebre tifoidea.
  - d) Sustancias químicas: drogas, venenos y tóxicos.
  - e) Agentes físicos: calor, quemaduras.
  - f) Hiperesplenismo.
  - g) Déficit de vitamina E en el recién nacido.
3. Mixtas: HPN.

Por lo general las anemias intrínsecas son de origen congénito, mientras que las extrínsecas son adquiridas; aunque existen excepciones como la HPN, que es una enfermedad adquirida en la que solo una porción de eritrocitos está afectada, y se presenta una sensibilidad anormal a la lisis mediada por el complemento.

Desde el punto de vista patogénico, la hemólisis extravascular es la más frecuente. Se localiza en el sistema mononuclear fagocítico de bazo, hígado y médula. La hemólisis intravascular es rara. Se caracteriza por hemoglobinemia y hemoglobinuria cuando se agota la capacidad de saturación de la haptoglobina plasmática. La mayor parte de la hemoglobina filtrada por el glomérulo es reabsorbida en el túbulo proximal donde el hierro se transforma en hemosiderina. Esta puede observarse en el epitelio tubular, mediante la coloración de Azul de Prusia.

## MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LAS ANEMIAS HEMOLÍTICAS

Las principales manifestaciones clínicas de las anemias hemolíticas son: anemia, ictericia y esplenomegalia,

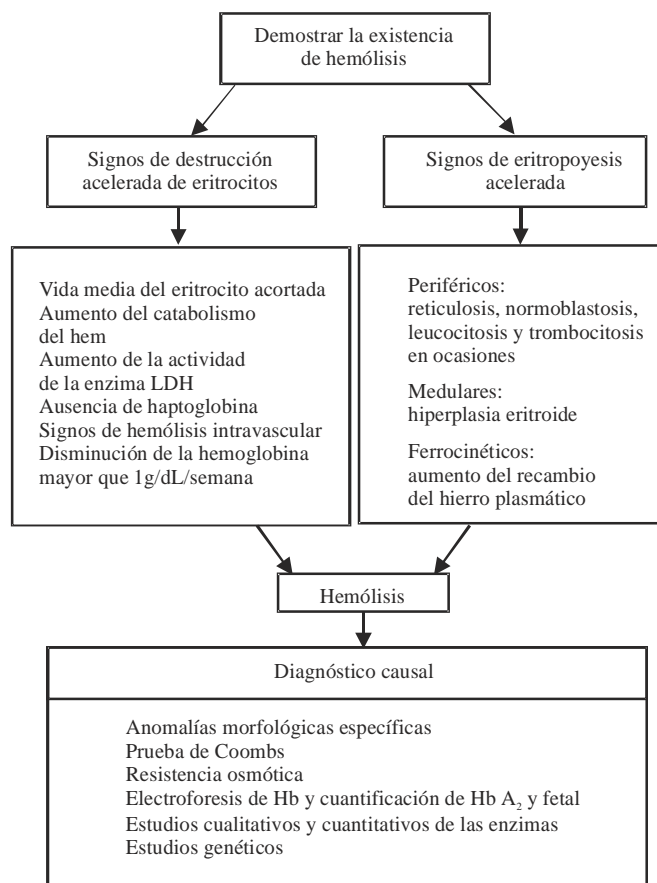
las cuales dependen del grado de hemólisis y de la forma de aparición: aguda, crónica o episódica:

1. Hemólisis aguda: es poco frecuente, fundamentalmente aparece en procesos adquiridos. El paciente puede presentar fiebre, escalofríos, dolor lumbar y/o abdominal, cefalea, vómitos, íctero, hemoglobinuria y llegar al *shock*, oliguria y anuria si la hemólisis es grave.
2. Hemólisis crónica o episódica: el cuadro clínico es variable, puede ser asintomático o presentar anemia importante con astenia, palpitaciones, cefalea y disnea. Se presenta en las de origen congénito donde aparecen de forma característica:
  - a) Íctero.
  - b) Esplenomegalia.
  - c) Colelitiasis.
  - d) Úlceras en las piernas.
  - e) Anomalías esqueléticas.

- f) Evolución por crisis, dentro de las que se encuentran las crisis aplásticas, comunes a todas y relacionadas con infección por parvovirus.

## DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LAS ANEMIAS HEMOLÍTICAS

Para realizar un diagnóstico adecuado de las anemias hemolíticas, sin pérdida de tiempo ni de recursos, el primer paso siempre deberá estar encaminado a demostrar la existencia de la hemólisis. Después de confirmada, el segundo paso será establecer su causa (figura 3.31 y tablas 3.11 y 3.12). En las figuras 3.32 a la 3.36 del anexo, se observan diferentes alteraciones eritrocitarias periféricas características de las anemias hemolíticas y el medulograma de un paciente con esta afección.



**Figura 3.31** Algoritmo para el estudio de las anemias hemolíticas.

**Tabla 3.11** Signos de destrucción acelerada de los eritrocitos

Prueba de diagnóstico	Valor de referencia normal en el adulto	Comportamiento en la hemólisis	Observaciones
Vida media eritrocitaria por medio del marcaje con <sup>51</sup> Cr	28-30 días	Acortada	Engorrosa, costosa y demorada. Se emplea cuando existe dificultad para el diagnóstico con el resto de las pruebas
Aumento del catabolismo del hem: Medición de la bilirrubina sérica	Bilirrubina total: 3,4-7,1 mmol/L Bilirrubina directa: 0,0-3,4 mmol/L Bilirrubina indirecta: 3,4-13,68 mmol/L	Aumentada Normal Aumentada	En ocasiones cae dentro del rango normal, a pesar de existir hemólisis, ya que depende de la síntesis y excreción hepática. Otras enfermedades se asocian con aumento de bilirrubina indirecta.
Medición del urobilinógeno fecal	11-21 mg/día/100 g de Hb	Aumentada	Valores falsos negativos en pacientes con tratamiento antibiótico
Medición sérica de la enzima láctico deshidrogenasa (LDH)	230-460 U/L	Aumentada. Predomina la isoenzima LDH <sub>2</sub>	No es específica, se observa también aumentada en síndromes linfoproliferativos agudos y crónicos, infarto agudo del miocardio, insuficiencia renal, <i>shock</i>
Signos de hemólisis intravascular: Determinación de Hb libre en el plasma	< 1 mg/dL	Aumentada	Aumenta en relación con la intensidad de la hemólisis
Determinación de Hb en la orina	No detectable	Detectable	Se detecta cuando la hemólisis intravascular es de gran intensidad (descartar hematuria, ingestión de drogas, porfirinuria y mioglobinuria)
Detección de hemosiderina en la orina	No detectable (<0,1 mg/día)	Detectable	Indica la presencia de Hb libre en el plasma durante un tiempo prolongado
Determinación de la hemopexina en el suero	60-100 mg/dL	Disminuida	Indica que la anemia hemolítica es severa
Determinación de la metahemalbúmina	No detectable	Detectable	Solo se detecta en la hemólisis intravascular intensa
Haptoglobina	20-165 mg/dL	Muy disminuida	Es una reactante de fase aguda (aumenta cuando hay tumor, infección e inflamación). Puede disminuir por trastornos en la síntesis hepática

**Tabla 3.12** Signos de eritropoyesis acelerada

Prueba de diagnóstico	Valor de referencia normal	Comportamiento en la hemólisis	Observaciones
Periféricos			
Reticulocitos	0,005 - 0,015 (0,5-1,5 %)	Aumentados	Puede haber errores estadísticos. Excepcionalmente disminuidos en pacientes con anemias hemolíticas crónicas e infecciones por parvovirus
Lámina periférica			
Normoblastos	No se observan	Se observan	La leucocitosis y trombocitosis son más pronunciadas en anemias hemolíticas agudas. Si disminuyen, se debe pensar en HPN, LES y AHAI
Leucocitos	4,5 - 11 x 10 <sup>9</sup> /L	Pueden estar aumentados	
Plaquetas	150 - 450 x 10 <sup>9</sup> /L	Pueden estar aumentados	
Medulares			
Examen morfológico de la médula ósea	Integridad del sistema eritropoyético	Hiperplasia eritropoyética	Representa solo una muestra pequeña de la médula
Ferrocinéticos			
Recambio de hierro plasmático	70 - 140 mmol/L/día	Aumentado	Es innecesaria para la mayoría de los pacientes

## ANEMIAS HEMOLÍTICAS DEBIDAS A ANOMALÍAS DE LA MEMBRANA ERITROCITARIA

Las anemias hemolíticas por anomalías de la membrana eritrocitaria se clasifican en:

1. Congénitas:
  - a) Esferocitosis hereditaria.
  - b) Eliptocitosis hereditaria.
  - c) Síndrome del Rh nulo.
  - d) Permeabilidad catiónica anormal (xerocitosis o hidrocitosis).
  - e) Anemia diseritropoyética congénita tipo II.
2. Adquiridas:
  - a) Hemoglobina paroxística nocturna.

### ESFEROCITOSIS HEREDITARIA

La esferocitosis hereditaria se caracteriza por:

1. Herencia: autosómica dominante en el 75 % de los pacientes y autosómica recesiva en el 25 %.
2. Frecuencia: afecta entre 1 por cada 4 000 y 1 por cada 5 000 habitantes.
3. Fisiopatología: se produce por defectos en las proteínas de la membrana, cuantitativas (deficiencias) o cualitativas (disfunción), con alteraciones en las interacciones verticales y desestabilización de la bicapa lipídica, lo que trae como consecuencia la formación de esferocitos. Cuando estos atraviesan

repetidamente por el bazo, donde existen condiciones de hipoxia, acidez e hipoglicemia, presentan un daño adicional, que facilita su remoción por los macrófagos del sistema mononuclear fagocítico.

Las principales proteínas afectadas son: la espectrina, la proteína 4.1 y la anquirina.

#### Cuadro clínico de la esferocitosis hereditaria

La expresión clínica de la esferocitosis hereditaria es muy variable: desde una condición asintomática hasta anemia hemolítica severa, dependiente de transfusiones que solo se corrigen parcialmente con la esplenectomía.

Las manifestaciones pueden presentarse a cualquier edad de la vida y se inician con la tríada característica: anemia, íctero y esplenomegalia.

Las complicaciones que presentan estos pacientes son comunes a todas las anemias hemolíticas.

#### Diagnóstico de la esferocitosis hereditaria

En la esferocitosis hereditaria se plantea:

1. Hemograma: anemia de severidad variable. Leucocitos y plaquetas normales.
  - a) VCM: disminuido.
  - b) CHCM: aumentada.
2. Sangre periférica: anisocitosis, policromatofilia, punteado basófilo y la presencia de esferocitos, los cuales pierden el área central clara.

3. Retículos: aumentados.
4. Resistencia osmótica: disminuida.
5. Prueba del glicerol: consiste en medir el tiempo necesario para que una suspensión eritrocitaria, tratada bruscamente con glicerol acidificado, experimente hemólisis mensurable por la disminución de la densidad óptica (DO) de la suspensión, al 50 % de su valor inicial. Intervalo normal: mayor que 1 800 s. En la esferocitosis, el tiempo está entre 25 y 142 s.
6. Fijación de glutaraldehído: marcada microcitosis y esferocitosis.
7. Estudio de los padres:
  - a) Si el patrón de herencia es autosómico dominante, uno de los padres tiene las pruebas alteradas.
  - b) Si el patrón de herencia es autosómico recesivo, la resistencia osmótica está disminuida en ambos padres.
8. Detección del defecto molecular:
  - a) Electroforesis de las proteínas en gel de poliacrilamida, seguida por cuantificación densitométrica.
  - b) Cuantificación de las proteínas de membrana por radioinmunoanálisis (es más sensible).
  - c) Técnicas de escaneo de las mutaciones:
    - Polimorfismo conformacional.
    - Secuenciación del segmento anormal del ADN genómico.
9. Técnicas que miden la deformación del eritrocito (ektacitometría) y la permeabilidad pasiva de la membrana al sodio.

## ELIPTOCITOSIS HEREDITARIA

En los síndromes eliptocíticos se agrupan todos los trastornos de los eritrocitos de causa genética, caracterizados por la presencia de eliptocitos de la circulación. La eliptocitosis hereditaria se caracteriza por:

1. Herencia: el patrón es autosómico dominante, excepto la piropoiquilocitosis hereditaria (PPH) que se transmite de forma autosómica recesiva.
2. Frecuencia: afecta entre 1 por cada 2 000 y 1 por cada 4 000 habitantes.
3. Fisiopatología: se produce por trastornos cuantitativos o cualitativos de las proteínas de la membrana (espectrina, proteína 4.1, glicoforina C) que afecta las interacciones horizontales y desestabiliza el esqueleto, con la consecuente formación del eliptocito. En la PPH se añade un defecto en interacciones verticales con formación de microesferocitos.

## Clasificación de la eliptocitosis hereditaria

La eliptocitosis hereditaria se clasifica en:

1. Eliptocitosis común: se divide en nueve subtipos:
  - a) Portador asintomático.
  - b) Eliptocitosis sin anemia hemolítica.
  - c) Eliptocitosis con hemólisis esporádica.
  - d) Eliptocitosis con hemólisis ligera o moderada.
  - e) Eliptocitosis con hemólisis crónica.
  - f) Eliptocitosis con hemólisis severa.
  - g) Eliptocitosis con poiquilocitosis infantil.
  - h) Eliptocitosis con piropoiquilocitosis.
  - i) Eliptocitosis con diseritropoyesis.
2. Eliptocitosis esferocítica.
3. Eliptocitosis estomatocítica.

**Eliptocitosis común.** Tiene gran variabilidad clínica. Los subtipos: poiquilocitosis infantil y PPH debutan al nacimiento del individuo con cuadros clínicos de hemólisis severa, íctero del recién nacido y requerimientos transfusionales. La primera afección mejora al año de vida; mientras que la segunda, presenta una hemólisis importante durante toda la vida, que mejora con la esplenectomía.

**Eliptocitosis esferocítica.** Es una condición rara, que produce hemólisis severa en los homocigóticos.

**Eliptocitosis estomatocítica.** Es una variante del sudeste asiático y del sur del Pacífico, en que la hemólisis es ligera o está ausente.

## Diagnóstico de laboratorio de la eliptocitosis estomatocítica

El diagnóstico de la eliptocitosis hereditaria plantea:

1. Hemograma: los valores de hemoglobina varían de acuerdo con el tipo de eliptocitosis.
2. Sangre periférica (también guarda relación con el tipo): en la eliptocitosis común, los eliptocitos son bicóncavos, y en el subtipo piropoiquilocitosis, están disminuidos o ausentes, y predominan los microesferocitos; en la eliptocitosis esferocítica, los ovalocitos son más esferocitos; y en la eliptocitosis estomatocítica se aprecian estomatocitos (células redondas con hendidura longitudinal o transversa).
3. Resistencia osmótica: disminuida o normal en pacientes con eliptocitosis común ligera sin poiquilocitos en sangre periférica.
4. Fijación de glutaraldehído: más del 15 % de los eliptocitos.
5. Resistencia térmica eritrocitaria: es una técnica que refleja la inestabilidad térmica de la proteína mutante, característica de la PPH. Los eritrocitos se incuban a 47 °C, mientras que los normales solo se

fragmentan a 49 °C. Los eliptocitos se fragmentan entre 46 y 47 °C, y más del 5 % de la población sufre fragmentación. El valor de la prueba es limitado, puede ser normal a pesar de la anomalía.

6. Separación electroforética de las proteínas de membranas: se observan proteínas de movilidad anormal, cuyo origen puede ser identificado luego, usando técnicas de *Western blotting*.
7. Mapeo del péptido triptico de espectrina y detección del defecto de ADN de base: las mutaciones en la espectrina se asocian con una formación de péptidos tripticos de tamaño y movilidad anormales, que son generadores en lugar del dominio normal.
8. Estudios moleculares a través de la reacción en cadena de la polimerasa para detectar el defecto genético, ya que permite la amplificación y secuenciación de la región respectiva del ADN genómico.
9. Estudio sobre los padres.

## SÍNDROME DEL Rh NULO

En el síndrome del Rh nulo no existe expresión antigénica del Rh en la membrana eritrocitaria y la frecuencia es de 1 en 6 000 000 habitantes (alta incidencia de consanguinidad).

Los pacientes con este síndrome presentan anemia hemolítica ligera a moderada:

1. La hemoglobina varía de 8 a 13 g/dL.
2. Retículos: elevados.
3. Sangre periférica: estomatocitos y esferocitos.
4. Resistencia osmótica: disminuida.
5. Vida media eritrocitaria con  $^{51}\text{Cr}$ : disminuida.

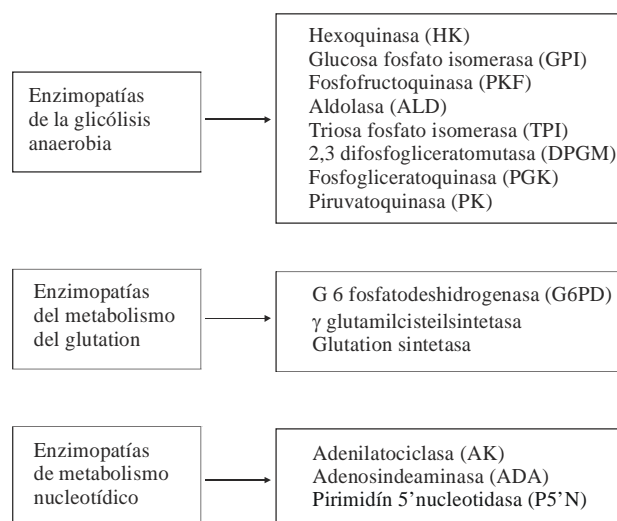
## PERMEABILIDAD CATIÓNICA ANORMAL

La hemólisis es secundaria al aumento de la permeabilidad de la membrana a los cationes. El diagnóstico se realiza determinando el contenido iónico intracelular y especialmente la permeabilidad pasiva al Na y K. Se describen 2 afecciones: xerocitosis e hidrocitosis (tabla 3.13).

## ALTERACIONES ENZIMÁTICAS

### CLASIFICACIÓN, FISIOPATOLOGÍA Y FRECUENCIA DE LAS ALTERACIONES ENZIMÁTICAS

La clasificación de las enzimatopatías aparece en la figura 3.37.



**Figura 3.37** Clasificación de las enzimatopatías.

**Tabla 3.13** Características de la xerocitosis y de la hidrocitosis

Xerocitosis	Hidrocitosis
Aumento de permeabilidad al K, que produce deshidratación celular	Aumento de permeabilidad al Na, que causa sobrehidratación celular
Aumento de la resistencia osmótica	Disminución de la resistencia osmótica
Aumento de la CHCM	Disminución de la CHCM (por dilución de la Hb)
Alteraciones morfológicas: poco evidentes	Abundantes estomatocitos en sangre periférica

Las alteraciones enzimáticas más frecuentes son:

1. Déficit de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD).
2. Déficit de piruvatoquinasa (PK).
3. Déficit de pirimidín 5' nucleotidasa.
4. Déficit de glucosa fosfato isomerasa.

La mayoría de las enzimopatías tiene patrón de herencia autosómico recesivo, excepto el déficit de la enzima ADA que tiene un patrón autosómico dominante, y la carencia de fosfogliceratoquinasa y de G6PD que tienen patrón ligado al cromosoma X.

Las enzimopatías se producen por alteraciones cuantitativas, con trastornos en la síntesis, o alteraciones cualitativas que afectan su eficiencia. Los dos trastornos enzimáticos más frecuentes son:

1. Déficit de G6PD.
2. Déficit de PK.

## DÉFICIT DE LA ENZIMA GLUCOSA 6 FOSFATO DESHIDROGENASA

### Función de la enzima glucosa 6 fosfato deshidrogenasa

La glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD) cataliza el paso inicial de la vía de las pentosas, y el NADP se reduce a NADPH, el cual es el cofactor para la conversión de glutatión oxidado a glutatión reducido (GSH), necesario para la protección de las células del daño oxidativo.

### Genética

El gen para la enzima G6PD se localiza en el cromosoma X (banda Xq28) y codifica para una proteína de 515 aminoácidos; por tanto, la carencia de la enzima se expresa en hombres con el gen afectado, mientras que las mujeres heterocigóticas son normales. Sin embargo, en algunas mujeres, la G6PD es similar a la de los varones y esto se explica por la teoría de Lyon, que plantea que uno de los dos cromosomas en cada célula del embrión femenino es inactivada y permanece así por medio de divisiones celulares sucesivas durante toda la vida.

### Prevalencia y distribución

El déficit de la G6PD es el trastorno metabólico del eritrocito más común que afecta a más de 200 millones de personas en el mundo. Las regiones más afectadas son las tropicales y subtropicales del hemisferio oriental.

### Fisiopatología

La capacidad de las células deficientes en la enzima G6PD de generar NADPH y glutatión reducido es limitada. Una vez que el GSH se depleta, se produce la oxidación de los grupos sulfhidrilos de la hemoglobina, la cual se desnaturaliza y forma masas insolubles que se unen a la membrana, posiblemente por puentes disulfuros, conocidos como cuerpos de Heinz. Además, la oxidación de los grupos sulfhidrilos de la membrana hace que se acumulen agregados polipeptídicos, quizás por unión de dímeros de espectrina y de espectrina con otras proteínas de membrana. El resultado de todos estos cambios es la formación de un eritrocito rígido, susceptible de ser destruido y eliminado por los macrófagos del sistema mononuclear fagocítico. La hemólisis es predominantemente extravascular, pero también ocurre de manera intravascular.

Las variantes de la enzima G6PD aparecen en la tabla 3.14.

### Síndromes clínicos

Los síndromes que se presentan por déficit de G6PD son:

1. Hemólisis inducida por estrés oxidativo. Anemia hemolítica aguda, más severa en la variante mediterránea. Se produce por fármacos, infecciones y acidosis diabética.
2. Favismo: hemólisis por sensibilidad a habas, fundamentalmente en niños de 1 a 5 años. Hemólisis aguda intravascular con íctero y hemoglobinuria. Se recupera gradualmente entre 3 y 4 días.
3. Hiperbilirrubinemia neonatal: es la más frecuente en la variante G6PD B-: necesita tratamiento eficaz para evitar daños neurológicos y la muerte.
4. Anemia hemolítica crónica no esferocítica (AHCNE): anemia e ictericia en el período neonatal. La hemólisis se produce en ausencia de factores desencadenantes, aunque se puede exacerbar por estos. Después del período neonatal, los síntomas y signos son inconstantes.

### Diagnóstico de laboratorio

El diagnóstico de laboratorio indica:

1. Hemograma: la severidad de la anemia depende de la variante de G6PD.
2. Sangre periférica: en ausencia de hemólisis es normal. En la hemólisis, se detectan excentrocitos y las llamadas células "en mordida".
3. Resistencia osmótica: normal.
4. Cuerpo de Heinz: positivo durante la crisis hemolítica.

**Tabla 3.14** Variantes de la enzima glucosa 6 fosfato deshidrogenasa

Variante	Actividad enzimática	Tipo de hemólisis	Procedencia
Clase 1: déficit acentuado con anemia hemolítica crónica no esferocítica (AHCNE)	< 30 %	Hemólisis crónica, se exagera con las infecciones y drogas oxidantes	Americanos, africanos, caucasianos
Clase 2: déficit enzimático severo B -	< 10 %	Íctero neonatal grave. Hemólisis por infección, drogas y oxidantes. Episodios severos con menor posibilidad de ser autolimitados	Mediterráneo, Italia, Alemania, Francia
Clase 3: déficit enzimático moderado A -	Del 10 al 60 % Depende de la edad celular	Hemólisis asociada con drogas o infección. Puede ser autolimitada por los reticulocitos que tienen actividad normal	Descendientes de africanos y poblaciones orientales
Clase 4: actividad normal o déficit leve A + y B +	> 60 %	No hay hemólisis	A + predomina en la raza negra (20-30 % de negros de origen africano) B + predomina en la raza blanca (caucasianos, asiáticos)
Clase 5: incremento de actividad enzimática	Aumentada	—	—

5. Signos indirectos de hemólisis: presentes en la crisis.
6. El diagnóstico se realiza mediante la demostración de la actividad enzimática:

- a) Se adiciona una cantidad determinada de hemolizado de células del paciente a una mezcla que contiene sustrato (G-6P) y cofactor (NADP) y se mide entonces en el espectrofotómetro la generación del NADPH.
- b) Prueba de la mancha fluorescente: constituye un método de detección simple y sensible. Se basa en la fluorescencia del NADPH después de adicionar G-6P y NADP al hemolizado de células examinadas.
- c) Otras pruebas: detectar indirectamente la generación del NADPH por medición de la transferencia de iones  $H^+$  desde NADPH a un aceptor. El azul de metileno es uno de los aceptores utilizados.

7. Estudio molecular: detecta la mutación.

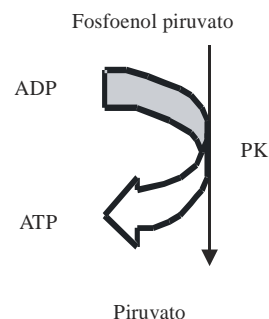
Es necesario tener en cuenta que inmediatamente después de la hemólisis, los reticulocitos y las células

más jóvenes que sobreviven, tienen una actividad enzimática mayor que puede dar resultados falsos negativos, por lo que si existe la sospecha clínica, hay que repetir el estudio a los 3 meses, aproximadamente.

## DÉFICIT DE LA ENZIMA PIRUVATOQUINASA

### Función de la enzima piruvatoquinasa

La enzima piruvatoquinasa (PK) cataliza la conversión de fosfoenol piruvato a piruvato, y participa en una de las reacciones glicolíticas que genera ATP (figura 3.38).



**Figura 3.38** Acción de la enzima piruvatoquinasa.



## Herencia

La herencia es autosómica recesiva. La mayoría de los pacientes son dobles heterocigóticos (contienen al menos dos formas de isoenzimas mutantes).

## Distribución geográfica

Su distribución es mundial, fundamentalmente en el norte de Europa y alrededor del mar Mediterráneo.

## Fisiopatología

El déficit de la enzima PK compromete la glucólisis y disminuye la capacidad de generación de ATP, por lo que las bombas de la membrana que mantienen los gradientes catiónicos fallan. Al principio la pérdida de K es mayor que la ganancia de Na con pérdida de H<sub>2</sub>O, contracción celular y formación de espículas en la superficie. Estos eritrocitos rígidos sufren una destrucción prematura, fundamentalmente en el bazo. Una característica importante es el aumento de intermediarios glicolíticos, como 2,3 DPG, con mayor tolerancia al esfuerzo que la prevista de acuerdo con el grado de anemia.

## Cuadro clínico

La expresión clínica del déficit de la enzima piruvatoquinasa es variable: desde íctero neonatal grave hasta la hemólisis compensada, detectada como hallazgos accidentales en los adultos.

La anemia es bien tolerada por el aumento del 2,3 DPG. La hemólisis puede aumentar por infecciones, anticonceptivos orales, embarazo y cirugía, y los pacientes presentan esplenomegalia. Entre las complicaciones se observa: crisis aplásica, litiasis biliar y úlceras en las piernas (aunque son raras).

## Diagnóstico de laboratorio

El diagnóstico de laboratorio plantea:

1. Hemograma: anemia variable: de 6 a 12 g/dL.
2. Sangre periférica: anisopoikilocitosis, policromatofilia, acantocitos, equinocitos y normoblastos.
3. Retículos: aumentado de 5 a 15 %, los cuales alcanzan hasta 70 % después de la esplenectomía.
4. Resistencia osmótica: normal.
5. Pruebas de diagnóstico:
  - a) Fluorescencia ultravioleta del NAD reducido (NADH): se agrega fosfoenolpiruvato, NADH y LDH a la sangre en estudio. Se colocan muestras de la mezcla incubada en papel de filtro y se examina la fluorescencia. Si existe déficit de PK, no se genera piruvato y no se utiliza el NADH; por tanto, la fluorescencia persiste de 45 a 60 minutos, mientras que en sangre normal desaparece en menos de 15 minutos.
  - b) Determinación cuantitativa de la enzima. Implica medir la conversión de NADH en NAD<sup>+</sup> por

espectrofotometría en condiciones estándares de temperatura, pH, concentración del sustrato y exclusión de los leucocitos que tienen actividad elevada de la enzima, igual que los recién nacidos y los pacientes con reticulocitosis que pueden enmascarar una deficiencia.

Las reacciones enzimáticas de la piruvatoquinasa aparecen en la figura 3.39.

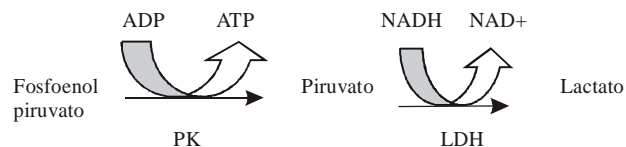


Figura 3.39 Reacciones enzimáticas.

La disminución de la DO (absorbancia) en el tiempo es el índice de actividad de la enzima. El estudio molecular se realiza para detectar la mutación.

## DEFECTOS EN LA ESTRUCTURA Y LA SÍNTESIS DE LA HEMOGLOBINA

### HEMOGLOBINOPATÍAS

Antes de comenzar el estudio de las alteraciones de la hemoglobina, es necesario recordar cuáles son las hemoglobinas normales:

1. Hb embrionarias:
  - a) Hb Gower I ( $\zeta_2 \epsilon_2$ ).
  - b) Hb Gower II ( $\alpha_2 \epsilon_2$ ).
  - c) Hb Portland ( $\zeta_2 \gamma_2$ ).
2. Hb fetales:
  - a) Hb fetal ( $\alpha_2 \gamma_2^G$ ).
  - b) Hb fetal ( $\alpha_2 \gamma_2^A$ ).
3. Hb adultos:
  - a) Hb A ( $\alpha_2 \beta_2$ ).
  - b) Hb A<sub>2</sub> ( $\alpha_2 \delta_2$ ).

En el individuo adulto normal existen las hemoglobinas siguientes:

- a) Hb A: 98 %.
- b) Hb A<sub>2</sub>: entre 1,8 y 3,0 %.
- c) Hb fetal: entre 0,3 y 1,2 %.

Los eritrocitos contienen pequeñas cantidades de derivados de la Hb A, como la Hb A<sub>1c</sub>, que se origina por la unión de una glucosa o manosa al grupo amínico del residuo N-terminal de las cadenas  $\beta$ . Se encuentra en un porcentaje de 5 %. En los pacientes diabéticos se pueden encontrar valores superiores.

## Clasificación de las hemoglobinopatías

Las hemoglobinopatías se clasifican en:

1. Hemoglobinopatías estructurales:
  - a) Hemoglobinopatías S.
  - b) Hemoglobinopatías C.
  - c) Hemoglobinas inestables.
  - d) Hemoglobina M.
  - e) Hemoglobinas alteradas con afinidad por el oxígeno.
  - f) Hemoglobinopatías estructurales asociadas con fenotipo talasémico: Hb E, *constant spring* y Lepore.
2. Hemoglobinopatías por defecto en la producción de cadenas globínicas: talasemias ( $-\alpha$ ,  $-\beta$ ,  $-\gamma$ ,  $-\delta$ ,  $-\delta\beta$ ,  $-\gamma\delta\beta$ ).
3. Persistencia hereditaria de la hemoglobina fetal.
4. Hemoglobinopatías adquiridas:
  - a) Metahemoglobinemias tóxicas.
  - b) Carboxihemoglobina.
  - c) Sulfahemoglobinas tóxicas.
  - d) Aumento de la Hb fetal debido a trastornos hematológicos como leucemias, anemia aplásica, HPN o tumores no hematológicos.

**Hemoglobinopatías S.** Las hemoglobinopatías S son anemias hemolíticas crónicas, congénitas, debidas a la herencia del gen de la hemoglobina S. Constituyen hemoglobinopatías estructurales, ya que la alteración de la molécula de hemoglobina se produce por la sustitución de un aminoácido en una de las cadenas de la globina, y tiene como base genética una mutación en el ADN.

La enfermedad puede ser el resultado de la combinación de dos variantes de hemoglobina o de una variante de hemoglobina y un gen talasémico. La más frecuente es la hemoglobinopatía SS, seguida en orden de frecuencia, de SC, S $\beta$ Tal<sup>+</sup>, S $\beta$ Tal<sup>0</sup>.

**Hemoglobinopatía SS.** Esta enfermedad se caracteriza por:

1. Modo de herencia: autosómica recesiva. Desde el punto de vista clínico, el paciente heterocigótico raramente tiene expresión fenotípica de significación, mientras que el homocigótico tiene manifestaciones clínicas de severidad variable.
2. Distribución geográfica: el 45 % de la población africana tiene rasgo de drepanocitemia. En los Estados Unidos, América Latina y el Caribe, aproximadamente el 8 % de los negros portan el gen.
3. Fisiopatología: la sustitución de la timina por la adenina en el sexto codón del gen  $\beta$ , trae como

resultado que se codifique valina en lugar de glutamina, en la sexta posición de la cadena  $\beta$ . Este cambio en la estructura es responsable, a su vez, de cambios en la estabilidad y solubilidad de la molécula de Hb S, la cual puede polimerizar, y forma un gel muy viscoso que produce cambios en las propiedades reológicas del eritrocito, lo que constituye el evento más importante de esta enfermedad.

**Polimerización de la hemoglobina S.** la unidad del polímero está formada por un filamento compuesto por anillos de 14 moléculas de hemoglobina S, superpuestas de manera que forman una estructura helicoidal. Existen diferentes variables fisiológicas que influyen en la polimerización:

1. Concentración de oxígeno: es la más importante. Durante mucho tiempo se planteó que la polimerización ocurría solo con la desoxigenación. Actualmente se conoce que no es necesario la desoxigenación de la hemoglobina S para que polimerice. La gelificación también se favorece con el aumento del 2,3 DPG y la disminución del pH, ya que disminuyen la afinidad por el oxígeno.
2. Concentración de Hb S: la gelificación ocurre si la concentración de Hb S es mayor que 20,8 g/dL.
3. Efectos de otras hemoglobinas: existe un efecto inhibidor de la gelificación al mezclar hemoglobina S con otras hemoglobinas como Hb A, Hb fetal, ya que disminuye la copolimerización de los tetrámeros híbridos, lo cual se explica por la diferencia de aminoácidos en sus estructuras.
4. Alteraciones de la membrana del eritrocito: los eritrocitos que sufren falciformación presentan daños en la membrana, inicialmente reversible, pero con ciclos repetidos. Entre el 5 y el 50 % de las células se deforman, de modo irreversible, como resultado fundamentalmente de interacciones anormales entre las proteínas del esqueleto. Además, tienen perturbaciones en la homeostasia catiónica con un aumento del calcio intracelular, pérdida de K que excede la ganancia de Na, se pierde H<sub>2</sub>O y, como consecuencia, aumenta la concentración de hemoglobina en el interior de la célula.
5. Adhesión de los eritrocitos: muestran una adherencia anormal al endotelio vascular, a los monocitos, macrófagos y a la bicapa lipídica. Entre los ligandos que median la adherencia se encuentran:
  - Factor von Willerbrand de alto peso molecular.
  - Fibronectina.
  - Fibrinógeno.
  - Trombospondina.

f) Patogénesis de la hemólisis:

- La hemólisis intravascular resulta de la lisis de los eritrocitos sensibles al complemento y de la pérdida de hemoglobina durante la falciformación.
- La hemólisis extravascular se produce debido a fagocitosis por los macrófagos de los eritrocitos que han sufrido falciformación o cambios en la membrana, inducidos por la oxidación. También se plantea el atrapamiento físico de los eritrocitos reológicamente comprometidos.

g) Patogénesis de la vasooclusión: ocasiona las crisis dolorosas y el daño a los diferentes órganos. Es un fenómeno complejo en el que intervienen múltiples factores (viscosidad sanguínea, activación de las células endoteliales y aumento de la adherencia de los drepanocitos a estas células endoteliales, polimerización de la hemoglobina S, fracción de células densas y otros, en los que participan los leucocitos, las plaquetas, así como factores locales y ambientales).

#### Cuadro clínico de las hemoglobinopatías

Las manifestaciones clínicas de las hemoglobinopatías no aparecen en el momento del nacimiento, debido al aumento de la hemoglobina fetal. El diagnóstico se establece aproximadamente al año de edad.

Los pacientes presentan anemia, íctero, esplenomegalia y hepatomegalia, la cual llega a ser pronunciada entre la tercera y cuarta década de la vida.

**Hábito corporal.** Se caracteriza por un alargamiento del segmento inferior del cuerpo, cifosis dorsal, lordosis lumbar, tibia en sable, prominencia frontal, paladar ojival y cráneo en torre. Existe un retraso en el crecimiento y el desarrollo.

La mayoría de las manifestaciones clínicas están condicionadas por la oclusión vascular. Esta puede ser aguda y dar lugar a las llamadas crisis vasooclusivas (CVO) dolorosas o a infartos en órganos, o también puede ser crónica, la cual trae como resultado las lesiones progresivas en diferentes órganos.

Las crisis vasooclusivas son las manifestaciones más frecuentes con diferentes localizaciones: osteomioarticulares, abdominales, lumbares y torácicas.

**Síndrome mano-pie.** Aparece en niños menores de 5 años. Estos presentan dolor, edema y signos inflamatorios en el dorso de las manos y de los pies, ocurre por oclusión vascular del metacarpo, el metatarso y las falanges.

**Crisis de secuestro esplénico.** Aparece en niños de 6 meses a 4 años, los cuales presentan una disminución abrupta de la hemoglobina: alrededor de 2 g/L por debajo de la cifra habitual. Existe un aumento de volumen del bazo y de los reticulocitos.

**Crisis aplásica.** Se produce por citotoxicidad del parvovirus hacia los precursores eritroides que produce la depresión de este sistema, en aproximadamente 10 días. Se caracteriza por la disminución brusca de la hemoglobina con caída de los reticulocitos.

**Crisis hemolíticas.** Aceleración brusca de la hemólisis.

**Crisis megalobástica.** Supresión de la eritropoyesis por depleción de folato.

Las hemoglobinopatías producen alteraciones de los órganos:

1. Corazón: insuficiencia cardíaca (aguda y crónica).
2. Pulmones: síndrome torácico agudo producido por infección o por obstrucción vascular. En enfermos mayores de 40 años existe hipertensión pulmonar.
3. Renales: dificultad para concentrar la orina, hematuria por necrosis papilar aguda, síndrome nefrótico, insuficiencia renal crónica, glomerulonefritis membranoproliferativa por inmunocomplejos (descrita en niños).
4. Priapismo: por falciformación y vasooclusión en cuerpos cavernosos.
5. Hepáticas: crisis hepática con aumento del íctero y hepatomegalia dolorosa, hepatitis B, litiasis vesicular.
6. Crisis de secuestro: disminución brusca de la hemoglobina, aumento del hígado y de los reticulocitos.
7. Sistema nervioso central: las CVO son las complicaciones más frecuentes, además: hemorragia intracerebral, hematoma subdural y epidural.
8. Ojos: retinitis proliferante.
9. Necrosis aséptica ósea: CVO en la cabeza de los huesos largos (fundamentalmente en la cabeza del fémur):
  - a) Características: dolor, limitación de los movimientos de la cadera, claudicación, acortamiento del miembro.
  - b) Úlceras en las piernas: más frecuentes en regiones laterales de los tobillos.
  - c) Infecciones: constituyen la primera causa de muerte en el niño pequeño:
    - Mecanismo: disminución de la función esplénica. Alteración de la vía alterativa del complemento y de la actividad de opsonización del suero.
    - Gérmenes en niños menores de 6 años: neumococo. En niños mayores: gérmenes gramnegativos.

- Localización:
  - Pulmonar.
  - Osteomielitis por salmonella.
  - Sepsis generalizada.
  - Meningitis.
  - Pielonefritis.

### Diagnóstico de laboratorio de las hemoglobinopatías

El diagnóstico de las hemoglobinopatías plantea:

1. Hemograma: hemoglobina entre 60 y 80 g/L, leucocitos: aumento moderado con desviación izquierda (entre 12 y 15 x 10<sup>9</sup> g/L), eosinofilia y monocitosis ligera, plaquetas normales o aumentadas.
2. Sangre periférica: anisopoiquilocitosis, células en diana, macrocitos, microcitos, policromatofilia, anillos de Cabot, cuerpos de Howell-Jolly, punteado basófilo y la alteración más importante son los drepanocitos, que caracterizan a la enfermedad (figura 3.40 del anexo).
3. Retículos aumentados alrededor del 6 %.
4. Electroforesis de hemoglobina: se observa la banda de la hemoglobina S. Hb fetal aumentada, aproximadamente en 5 % y Hb A<sub>2</sub> normal.
5. Prueba de solubilidad: positiva.
6. Eritrosedimentación: baja, los drepanocitos tienen dificultad para formar las pilas de monedas y la lectura puede ser 0.
7. Resistencia osmótica: aumentada.
8. Hierro sérico: normal o aumentado (en embarazadas y niños pequeños puede estar bajo).
9. Haptoglobina: disminuida.
10. Hemoglobina plasmática: elevada.
11. LDH: elevada.
12. Bilirrubina: aumentada a expensas de la indirecta.
13. Diagnóstico prenatal: se realiza primero la detección de las parejas de alto riesgo, se analiza a la embarazada, y si la electroforesis de Hb está alterada, se estudia al esposo. Luego se lleva a cabo el estudio de la sangre fetal o del ADN extraído de las células del líquido amniótico (entre las 16 y 20 semanas, o de las vellosidades coriónicas (entre las 8 y 12 semanas).

### Hemoglobinopatía S y embarazo

Puede traer complicaciones como: necrosis aséptica de la cabeza del fémur. Posparto: fiebre y CVO dolorosas. Menos frecuente, tromboembolismo pulmonar.

### Portador de hemoglobinopatía S

El diagnóstico indica:

1. Presencia de la banda de hemoglobina S (no mayor de 45 %) y hemoglobina A en electroforesis:
2. Prueba de solubilidad: positiva.
3. Hemoglobina fetal: menor que 1 %.
4. Hemoglobina A<sub>2</sub>: menor que 4 %.

El portador de hemoglobinopatía S es asintomático. Solo presenta hematuria en ocasiones. En las embarazadas hay mayor frecuencia de infecciones urinarias y en la mujer no embarazada, bacteriurias asintomáticas. Solo en circunstancias como acidosis, disminución de la tensión de oxígeno, deshidratación severa, se presentan manifestaciones clínicas.

### Otras hemoglobinopatías S

**Sβ Talasemia.** Se clasifica en Sβ<sup>0</sup> talasémica y Sβ<sup>+</sup> talasémica.

Las manifestaciones clínicas son similares a la hemoglobinopatía SS. En este caso la esplenomegalia puede presentarse hasta la edad adulta.

El diagnóstico indica:

1. Electroforesis de hemoglobina:
  - a) Patrón SS en Sβ<sup>0</sup>Tal.
  - b) Patrón SA con poca A en Sβ<sup>+</sup>Tal.
2. Sangre periférica: número variable de drepanocitos, hipocromía y abundantes dianocitos.
3. Hemoglobina A<sub>2</sub> aumentada.
4. Retículos elevados.
5. Estudio de los padres: un padre porta el gen de hemoglobina S y el otro, el gen talasémico.

**Hemoglobinopatía SD.** Se desplaza igual que la hemoglobinopatía S en electroforesis, pero la prueba de solubilidad es negativa. En el paciente homocigótico se observa una discreta anemia hemolítica e infecciones.

**Hemoglobinopatía SO.** La Hb O ocupa igual porción que la hemoglobina C. El cuadro clínico es similar al de la hemoglobinopatía SS.

**Hemoglobina SE.** El cuadro clínico es similar al de la hemoglobinopatía SS, pero menos severo. Se presenta en el sudeste asiático.

**Hemoglobinopatía C.** En la hemoglobina C, el ácido glutámico es sustituido por la lisina en la sexta posición de la cadena β.

**Hemoglobinopatía CC.** El cuadro clínico se caracteriza por molestias abdominales, artralgias, cefaleas, esplenomegalia en el 90 % de los casos sin afectación de la función esplénica. Los pacientes pueden tener colelitiasis. El diagnóstico indica que hay anemia de ligera a moderada, reticulocitos (entre 3 y 6 %), sangre periférica, dianocitos y cristales de hemoglobina C. La electroforesis de la Hb muestra que la Hb C y la Hb fetal son ligeramente aumentadas y la Hb A está ausente.

**Hemoglobinopatía AC (rasgo).** En el cuadro clínico se ha reportado hematuria y priapismo, y la hemoglobina es normal. En la sangre periférica se encuentran dianocitos en número moderado (entre 5 y 30 %); electroforesis de Hb: Hb C entre 30 y 40 %;

HbA: entre 50 y 60 %; Hb A<sub>2</sub>: ligeramente aumentada (tiene igual movilidad electroforética que Hb C).

**Hemoglobinopatía SC.** El cuadro clínico es similar pero menos severo que el de la hemoglobinopatía SS. La esplenomegalia es moderada y puede persistir en la vida adulta con alteración de su función e infecciones. Se han descrito tres complicaciones fundamentales:

1. Retinopatía proliferativa.
2. Necrosis aséptica de la cabeza del fémur.
3. Síndrome torácico agudo.

El diagnóstico de laboratorio indica:

1. Anemia ligera o no existe.
2. VCM disminuido.
3. CHCM aumentada.
4. Reticulocitos moderados.
5. En sangre periférica: dianocitos (más del 50 % de las células) con cristales de hemoglobina.

La electroforesis de las hemoglobinas indica:

1. Hb S y Hb C.
2. Hb fetal: normal.
3. No existe Hb A.

## SÍNDROMES TALASÉMICOS

Las talasemias constituyen anemias hemolíticas congénitas, heterogéneas desde el punto de vista clínico, hematológico y genético, producidas por una disminución o supresión de la síntesis de una o más cadenas globínicas.

### Clasificación de los síndromes talasémicos

Los síndromes talasémicos se denominan:

1.  $\alpha$  Talasemia y la cadena afectada es:  $\alpha$ .
2.  $\beta$  Talasemia y la cadena afectada es:  $\beta$ .
3.  $\delta$  Talasemia y la cadena afectada es:  $\delta$ .
4.  $\gamma$  Talasemia y la cadena afectada es:  $\gamma$ .
5.  $\delta \beta$  Talasemia y las cadenas afectadas son:  $\delta$  y  $\beta$ .
6.  $\gamma \delta \beta$  Talasemia y las cadenas afectadas son:  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\beta$ .

Existen formas raras de talasemia, caracterizadas por la producción de cadenas de globina anormales desde el punto de vista estructural y en menor cantidad.

Cuando se produce la delección de un gen globínico, no se sintetiza la cadena correspondiente, y se denomina talasemia de tipo 0 ( $\alpha^0$ Tal,  $\beta^0$ Tal). Si el gen está presente pero alterado, trae como consecuencia la disminución en la síntesis del ARNm normal (disminución parcial de la cadena de globina) o la presencia de un ARNm no funcional (ausencia de la cadena de globina).

### $\alpha$ Talasemia

**Distribución geográfica.** Sudeste asiático, India, Grecia, Italia, Norte de Europa y África.

**Mecanismo genético y síndromes clínicos.** La mayoría de las  $\alpha$  talasemias son producidas por delecciones genéticas. Menos frecuentes son las variantes estructurales que producen un fenotipo talasémico (ejemplo, hemoglobina *constant spring*). Las interacciones de las mutaciones producen un espectro de fenotipos que pueden ser agrupados en los síndromes clínicos siguientes:

1. Portador silente: un cromosoma con delección de un solo gen ( $\alpha\alpha$  /- $\alpha$ ).
2.  $\alpha$  Talasemia menor (rasgo talasémico): un cromosoma con delección de ambos genes ( $\alpha\alpha$ /- -).
3. Enfermedad por hemoglobina H: está presente un solo gen funcional (- -/- $\alpha$ ).
4. Hidropis fetal: todos los genes delecionados (- - /- -).

**Portador silente.** No existen manifestaciones clínicas y no hay anemia:

1. Reticulocitos: normales.
2. VCM y HCM: ligeramente disminuidos o normales, puede haber una ligera hipocromía en sangre periférica.
3. Hemoglobina A<sub>2</sub> y hemoglobina fetal: normales.
4. El diagnóstico se realiza por estudios del ADN.

**$\alpha$  Talasemia menor (rasgo talasémico).** Se presenta una anemia ligera o los portadores son asintomáticos:

1. Resistencia osmótica: aumentada.
2. En sangre periférica: microcitosis e hipocromía.
3. VCM y HCM: disminuidos.
4. Hemoglobina A<sub>2</sub> y fetal: normales.
5. Hemoglobina Bart's al nacimiento: entre el 2 y el 10 %.

**Enfermedad por hemoglobina H.** Anemia hemolítica moderada microcítica hipocrómica (entre 60 y 100 g/L). Se presenta esplenomegalia.

1. Al nacimiento: aumento de la hemoglobina Bart's (aproximadamente 20 %). Luego aparece la hemoglobina H (aproximadamente entre el 5 y el 40 %) con una movilidad electroforética más rápida que la hemoglobina A.
2. Hb A<sub>2</sub>: disminuida.
3. Hb fetal: normal.
4. Cuerpos de inclusión de hemoglobina H: positivos (entre el 30 y el 100 % de las células contienen inclusiones típicas, detectadas por la coloración supravital con azul brillante de cresil e incubación durante 2 horas a 37 °C).
5. Reticulocitos: entre 5 y 10 %.
6. Resistencia osmótica: aumentada.

**Hidropis fetal.** Incompatible con la vida. El feto nace muerto o se produce la muerte del neonato inmediatamente:

1. Anemia severa, edemas generalizados, hepatoesplenomegalia.

2. Sangre periférica: normoblastosis severa, anisopoiquilocitosis, hipocromía, punteado basófilo.
3. Electroforesis de hemoglobina: Hb Bart's aproximadamente entre 80 y 90 % y pequeñas cantidades de Hb H y Hb Portland.

### Síndromes $\beta$ talasémicos

**Distribución geográfica.** Se presenta con frecuencia en los países que bordean el mar Mediterráneo, pero es más común en Italia, Grecia, también en África, Turquía, Irán, India y Arabia.

**Fisiopatología.** En la  $\beta$  Talasemia, como la síntesis de Hb A ( $\alpha_2\beta_2$ ) está marcadamente disminuida o ausente, los eritrocitos son microcíticos e hipocrómicos. En el heterocigótico se acumula relativamente poca cantidad de cadenas  $\alpha$ ; por tanto, hay poca evidencia de anemia u otra complicación. En el paciente homocigótico, el desbalance es mayor, se acumulan muchas cadenas  $\alpha$ , debido a la capacidad limitada del eritrocito para su proteólisis. Esto trae como consecuencia que precipiten y formen cuerpos de inclusión, los cuales producen daño oxidativo de la membrana, con hemólisis extramedular e intramedular, y se destruyen los eritroblastos inmaduros (eritropoyesis ineficaz). Los eritrocitos que sobreviven tienen cuerpos de inclusión y son removidos de manera prematura por el sistema mononuclear fagocítico, lo que contribuye a la severidad de la anemia.

La anoxia existente estimula la producción de altos niveles de eritropoyetina; pero la capacidad de la médula para responder es pobre, se expande, y pocos eritrocitos se producen de forma eficiente.

Esta expansión es responsable de las alteraciones esqueléticas y del crecimiento y desarrollo del individuo, también del aumento de la absorción gastrointestinal de hierro con sobrecargas del mineral que aumenta con las transfusiones repetidas.

La anemia hemolítica resulta en esplenomegalia masiva con hiperesplenismo y el aumento del catabolismo de la hemoglobina en aumento de la bilirrubina con producción de cálculos biliares.

**$\beta$  Talasemia mayor ( $\beta$ Tal homocigótica, anemia de Cooley o anemia mediterránea).** Las primeras manifestaciones aparecen después de los 3 meses de vida. En este caso, la anemia es siempre severa, con íctero y hepatoesplenomegalia, que aumentan de tamaño progresivamente. Se presentan cambios esqueléticos con alteraciones de la estructura facial características: prominencia de los huesos frontal y

parietal y eminencias molares, depresión del puente de la nariz e inclinación mongoloide de los ojos. Se observa, además, retraso del crecimiento y del desarrollo sexual, cardiomegalia con insuficiencia cardíaca, úlceras en las piernas, litiasis vesicular, crisis aplásticas por la acción del parvovirus y orinas oscuras por la excreción de productos del catabolismo del hem.

### Diagnóstico del laboratorio

El diagnóstico de laboratorio indica:

1. Índices eritrocitarios:
  - a) Hemoglobina: aproximadamente 50 g/L.
  - b) Recuento de eritrocitos: aumentados.
  - c) VCM: disminuido.
  - d) IDE: normal.
2. Retículos: aumentados aproximadamente 5 %.
3. Sangre periférica: macrocitosis, hipocromía, poiquilocitos, dianocitos, policromatofilia, punteado basófilo, normoblastos, corpúsculos de Howell-Jolly, leucocitos y trombocitos normales o aumentados.
4. Medulograma: hiperplasia del sistema eritropoyético, cambios megaloblásticos por el consumo de folato.
5. Electroforesis de hemoglobina y cuantificación de Hb A<sub>2</sub> y fetal:
  - a) Si es un  $\beta^0/\beta^0$ : no hay hemoglobina A, la Hb fetal es de 96 a 97 % y la Hb A<sub>2</sub> es normal o ligeramente aumentada.
  - b) Si es  $\beta^0/\beta^+$ : muy poca A, la Hb fetal es de 70 a 80 %, la Hb A<sub>2</sub> es normal o ligeramente aumentada.
6. Resistencia osmótica: aumentada.
7. Hierro sérico y ferritina: aumentados.
8. Patrón ferrocinético: eritropoyesis ineficaz.
9. Vida media eritrocitaria con <sup>51</sup>Cr: de 6,5 a 19,5 días.
10. ASAT y ALAT: aumentados por daños hepáticos secundarios a hemosiderosis o hepatitis viral.
11. Inclusiones eritrocitarias (cuerpos de Fessas): prominentes después de la esplenectomía: se ven por la coloración supravital con violeta de metilo.
12. Cinc sérico, ácido ascórbico y vitamina E: disminuida.
13. Factores II, V, VII, IX, X y XI: pueden disminuir en los pacientes más viejos por sobrecarga de hierro. Se ha encontrado que existen trastornos de la agregación plaquetaria.

**$\beta$  Talasemia intermedia.** Presenta menor seve-

ridad clínica. El diagnóstico se realiza después del primer año de vida. Los pacientes presentan úlceras en las piernas, cálculos biliares, hipersplenismo y, como complicación de la hematopoyesis extramedular, pueden aparecer pseudotumores o abscesos.

La electroforesis de Hb indica:

1.  $\beta^+/\beta^+$ : Hb fetal en el 50 %, aproximadamente; el resto es Hb A y  $A_2$ .

**$\beta$  Talasemia menor.** Portador o  $\beta$ Tal heterocigótico. Se presentan manifestaciones clínicas ligeras o asintomáticas y esplenomegalia ligera.

El diagnóstico indica:

1.  $\beta^N/\beta^0$  ó  $\beta^N/\beta^+$ . Un alelo normal y otro con delección parcial o total del gen.
2. Hemoglobina:
  - a) Oscila entre 90 y 160 g/L en el hombre.
  - b) Entre 80 y 130 g/L en la mujer.
  - c) Entre 80 y 120 g/L en el niño.
3. Sangre periférica: microcitosis, hipocromía, dianocitos y punteado basófilo.
4. Electroforesis de hemoglobina: corre como AA con

Hb fetal normal o ligeramente aumentada. La Hb  $A_2$ : aumentada (entre 3,6 y 7,5 %).

5. Resistencia osmótica: aumentada.

**$\delta\beta$  Talasemia.** La  $\delta\beta$  talasemia aparece en la tabla 3.15.

**Persistencia hereditaria de la hemoglobina fetal.** La persistencia hereditaria de la hemoglobina fetal (PHHF) se muestra en la tabla 3.16.

#### Diagnóstico prenatal de las talasemias

El diagnóstico prenatal de las talasemias se realiza mediante el análisis directo del ADN: identificación del gen anormal por amniocentesis o por biopsia de las vellosidades coriónicas.

#### Detección de portadores de talasemia

Los estudios del ADN para conocer la mutación específica son costosos, por tanto, el VCM es menor que 75 fL y HCM menor que 26 pg se usan como indicadores preliminares de posibles portadores.

En la  $\alpha$  Talasemia se sugiere la afección por micro-

**Tabla 3.15** Características de la  $\delta\beta$  Talasemia

Heterocigótico $\delta^N\beta^N/\delta^0\beta^0$	Homocigótico $\delta^0\beta^0/\delta^0\beta^0$
Cuadro clínico similar a $\beta$ Tal heterocigótica	Cuadro clínico similar a $\beta$ Tal mayor, pero menos severo
Electroforesis de Hb Hb A: normal o disminuida Hb fetal: aumentada entre el 5 y el 15 % Hb $A_2$ : normal o disminuida	Electroforesis de Hb Ausencia total de A y $A_2$ Hb fetal: 100 %
Resistencia osmótica: aumentada	Resistencia osmótica: aumentada
Microcitosis, hipocromía	Microcitosis, hipocromía

**Tabla 3.16** Persistencia hereditaria de la hemoglobina fetal

Hetericigótico	Homocigótico
No alteraciones clínicas	No hay alteraciones clínicas
Normocitosis, normocromía	Normocitosis, normocromía
Resistencia osmótica: normal	Resistencia osmótica: normal
Electroforesis de Hb: Hb A y Hb fetal: entre el 15 y el 35 % Hb $A_2$ normal o disminuida	Electroforesis de Hb: Hb fetal: 100 %

citosis e hipocromía familiar con disminución de la hemoglobina A<sub>2</sub> y cuando no existen evidencias de déficit de hierro. El diagnóstico preciso requiere la demostración de la delección del gen de  $\alpha$  globina.

## HEMOGLOBINAS INESTABLES

Las hemoglobinas inestables constituyen hemoglobinopatías estructurales que producen disminución de la estabilidad de la molécula, la que puede precipitar en el eritrocito y formar cuerpos de inclusión (cuerpos de Heinz).

La causa más común de la inestabilidad son los cambios estructurales en la región de unión con el grupo hemo o en la región de contacto entre las subunidades y las alteraciones conformacionales producidas por la inserción de una prolina en regiones de  $\alpha$ -hélice.

Los cuerpos de Heinz interactúan con componentes de la membrana eritrocitaria, y producen una disminución de la deformabilidad, por lo que son atrapados en la microcirculación esplénica. El daño de los eritrocitos se agrava por la liberación del hem dentro de ellos, lo cual genera especies reactivas del oxígeno, y se produce la anemia hemolítica.

### Herencia

Generalmente, las hemoglobinas inestables se heredan de forma autosómica dominante.

### Cuadro clínico

Las hemoglobinas inestables producen anemia hemolítica de severidad variable, puede haber íctero transitorio con hepatoesplenomegalia, úlceras en las piernas, litiasis vesicular y coloración oscura de la orina, que se observa durante las crisis hemolíticas por la excreción de dipirroles.

La anemia hemolítica provocada por las hemoglobinas inestables se asocia con la ingestión de drogas y con infecciones.

### Diagnóstico de laboratorio

El diagnóstico de las hemoglobinas inestables plantea:

1. Hemograma: anemia variable que aparece al nacimiento si la cadena  $\alpha$  se afecta y, después, si la alteración se encuentra en la cadena  $\beta$ .
2. Bilirrubina: aumentada.
3. Haptoglobina: disminuida.
4. Sangre periférica: punteado basófilo, hipocromía, policromatofilia.
5. Resistencia osmótica: ligeramente aumentada.

6. Cuerpos de Heinz: positivos con coloración supravital. Puede que sean negativos si la hemólisis es ligera y son removidos por el bazo.

7. Prueba de estabilidad: se realiza calentando el hemolizado a 50 o a 37 °C en presencia de isopropanol, lo cual precipita la Hb inestable.

## METAHEMOGLOBINEMIAS HEREDITARIAS Y TÓXICAS

La metahemoglobina es el derivado de la hemoglobina, y en ella, el hierro del hem se encuentra en forma férrica ( $\text{Fe}^{3+}$ ), la cual es incapaz de unirse de manera reversible con el oxígeno y, por tanto, no puede transportarlo.

Las metahemoglobinemias hereditarias se presentan por 2 mecanismos:

1. Disminución de la reconversión de metahemoglobina en hemoglobina, debido al déficit de la enzima NADH-metahemoglobina reductasa (diaforasa). Alteración de una cadena globínica que impide la conversión del hierro a la forma ferrosa.
2. Déficit de diaforasa.

### Herencia

La herencia es autosómica recesiva.

### Frecuencia

Es una enfermedad rara, se ha reportado de 100 a 200 casos.

### Cuadro clínico

Las metahemoglobinemias hereditarias se caracterizan por presentar diferentes formas clínicas:

1. Tipo I: eritrocitario (déficit de la enzima solo en el eritrocito):
  - a) Cianosis variable, generalmente bien tolerada y disnea de esfuerzo.
  - b) Las manifestaciones neurológicas con retraso mental no se producen si el diagnóstico se realiza de forma temprana.
2. Tipo II: generalizado:
  - a) Cianosis asociada con encefalopatía y retraso mental.
3. Tipo III: híbrido entre las dos anteriores, déficit enzimático en eritrocitos y leucocitos, pero no en el sistema nervioso central:
  - a) Retraso mental no asociado con encefalopatías.



### Diagnóstico de laboratorio

El diagnóstico de laboratorio de las metahemoglobinemias hereditarias indica:

1. Dosificación de metahemoglobina en sangre: elevado, entre 8 y 40 % (valor normal: entre 0 y 2 %).
2. Actividad de la enzima diaforasa: menos del 20 % de la normalidad.
3. Prueba terapéutica con azul de metileno por vía intravenosa (i.v.): desaparece la cianosis.
4. Estudio familiar: los padres tienen niveles normales de metahemoglobina en sangre (excepto que tengan una metahemoglobinemia tóxica). La actividad enzimática en ellos será del 50 %.

### Hemoglobina M

La hemoglobina M se produce por una alteración estructural de la hemoglobina, en la cual, una de las dos cadenas no puede transportar oxígeno, porque la mutación mantiene el hierro en forma férrica.

### Herencia

La herencia es autosómica dominante.

### Cuadro clínico

Los individuos con hemoglobina M parecen tener cianosis, sin embargo, los valores de  $\text{PaO}_2$  son normales. Generalmente son asintomáticos.

### Diagnóstico de laboratorio

El diagnóstico de la hemoglobina M indica:

1. Concentración de metahemoglobina: normal.
2. Electroforesis: componente anormal.
3. Ensayo terapéutico con azul de metileno (por vía i.v.): no desaparece la cianosis.
4. Estudio molecular: detecta la mutación.

### Metahemoglobinemia tóxica

Se produce por la ingestión de medicamentos o tóxicos que oxidan el hierro y lo llevan al estado férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Entre ellos se encuentran los nitritos, los cloratos, los derivados de la anilina y las sulfamidas.

En el recién nacido hay déficit fisiológico transitorio de la diaforasa, que se normaliza aproximadamente a los 8 meses, por lo que son susceptibles a sustancias tóxicas.

### Cuadro clínico

En la metahemoglobinemia tóxica, la metahemoglobina se acumula. Si tiene un valor de menos del 30 % de la Hb total, el paciente presentaría coloración cianótica; si supera el 50 %, hay colapso vascular, coma y muerte.

### Diagnóstico de laboratorio

El diagnóstico de laboratorio indica:

1. Metahemoglobina en sangre: aumentada.
2. Actividad de la enzima diaforasa: normal. En niños menores de 8 meses es necesario realizarle un estudio a los padres, y caracterizar la enzima.
3. Antecedentes de exposición a tóxicos.

## HEMOGLOBINURIA PAROXÍSTICA NOCTURNA

La hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) es una enfermedad adquirida de la *stem cell* hematopoyética, de comienzo insidioso que evoluciona con hemólisis crónica intravascular, debido a la sensibilidad anormal de los eritrocitos a la lisis mediada por el complemento.

### Patogenia de la hemoglobinuria paroxística nocturna

En esta enfermedad se distinguen tres poblaciones celulares con diferente sensibilidad al complemento:

1. Células HPN-I: reaccionan normalmente con el complemento.
2. Células HPN-II: tienen una sensibilidad intermedia 3 o 5 veces mayor que las células normales.
3. Células HPN-III: son de 15 a 25 veces más susceptibles a la lisis.

La mayoría de los pacientes tienen una mezcla de estas poblaciones y la intensidad de la hemólisis se relaciona con el tamaño de la población de células HPN-III (si es mayor que 50 %, la hemoglobinuria es constante).

En la HPN se observa una deficiencia en las proteínas de la membrana del eritrocito como:

1. Acetilcolinesterasa.
2. *Decay accelerating factor* (DAF) o CD48.
3. Inhibidor de membrana de la lisis reactiva (MIRL) o CD59.
4. Factor de restricción homólogo (inhibidor del C8).

Todas las proteínas tienen en común que están ancladas a la membrana del eritrocito por medio de una estructura glicolípida compleja llamada glucosilfosfatidilinositol (GPI), para la cual codifica un gen localizado en el cromosoma X denominado fosfatidilinositolglican A (PIG-A). Cualquier tipo de mutación, inserción, de delección, de mutaciones puntuales, da lugar a un PIG-A anormal con pérdida de la función parcial o total, lo cual trae como resultado un déficit de grupos GPI, que impide que la membrana tenga inhibidores de las fracciones activadas del complemento.

#### Cuadro clínico

El cuadro clínico es el siguiente:

1. Edad de presentación: entre la tercera y quinta décadas de la vida.
2. Afecta a uno y otro sexos por igual.
3. Comienzo insidioso y evolución crónica.

La anemia es de intensidad variada, y puede acompañarse de leucopenia y trombocitopenia.

La hemoglobinuria se presenta desde el inicio en aproximadamente el 25 % de los pacientes. Los episodios hemolíticos agudos se caracterizan por dolor lumbar y abdominal. Pueden tener eventos trombóticos fundamentalmente del sistema portal, del cerebro y de los miembros inferiores. En algunos casos, hay daño renal con hipostenuria, disminución del aclaramiento de creatinina y función tubular anormal. Las infecciones

se deben a la leucopenia y también a trastornos de la función leucocitaria.

El pronóstico es variable, puede mejorar progresivamente o sufrir transformación aguda hacia leucemia y síndrome dismieloproliferativo (SDMP).

#### Diagnóstico de laboratorio

El diagnóstico de la HPN indica:

1. Hemograma: anemia severa (menos de 6 g/dL). En sangre periférica se observa anisocitosis con microcitos e hipocromía, si existe ferropenia. Leucocitos y plaquetas normales o disminuidos.
2. Recuento de reticulocitos: aumentados de forma ligera o moderada.
3. Resistencia osmótica: normal.
4. Haptoglobina: disminuida.
5. Bilirrubina indirecta: aumentada.
6. LDH: aumentada.
7. Urobilinógeno urinario: aumentado.
8. Hierro en orina: positivo.

Las técnicas para el diagnóstico señalan:

1. Prueba de Ham: los eritrocitos de los pacientes con HPN son lisados cuando se colocan en suero acidificado (pH: entre 6,5 y 7). Se preparan 7 tubos. La hemólisis que se aprecia en los tubos 2 y 5 y, ligeramente, en los tubos 1, 3 y 4 sugiere HPN. La desventaja de esta prueba es que no es suficientemente sensible para detectar la afección en todos los pacientes (tabla 3.17).

**Tabla 3.17** Prueba de Ham

Tubos	1	2	3	4	5	6	7
Suero del paciente	0,5	0,5	-	-	-	0,5	0,5
Suero control	-	-	0,5	0,5	0,5	-	-
HCl0,2N	-	0,05	0,05	-	0,05	-	-
Glóbulos del paciente diluidos al 50 % en solución salina	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	-	-
Glóbulos del control diluidos al 50 % en solución salina	-	-	-	-	-	0,05	0,05

2. Prueba de sucrosa: la sucrosa facilita la fijación del complemento, y disminuye la fuerza iónica del medio. Es una prueba sensible, pero poco específica.
3. Prueba de inulina: fundamento de la prueba: los eritrocitos de pacientes con HPN son sensibles a la hemólisis inducida por el complemento. La inulina activa el proactivador C3 del complemento; por tanto, si hay hemólisis en el tubo que contiene sangre del paciente con inulina, la prueba es positiva para HPN.

Los resultados de estas pruebas están muy relacionados con la experiencia del técnico que las realiza.

El diagnóstico de laboratorio indica:

1. Medulograma: hiperplasia eritroide.
2. Azul de Prusia: negativo. Hay pacientes en los que se observa aplasia medular o hipoplasia.
3. Estudio citogenético: ningún estudio puede precisar el diagnóstico. Se ha reportado pérdida del cromosoma Y, así como trisomía 9.
4. Análisis de la expresión de GPI-AP sobre las células hematopoyéticas con el uso de anticuerpos monoclonales y citometría de flujo.
5. Sospecha de HPN:
  - a) Pancitopenia y reticulocitosis.
  - b) Pancitopenia, anemia hemolítica y hierro sérico bajo.
  - c) Pancitopenia y episodios trombóticos repetidos.

## ANEMIAS HEMOLÍTICAS EXTRÍNSECAS NO INMUNES

Las anemias hemolíticas extrínsecas no inmunes se producen por anomalías en el ambiente en el cual circulan los eritrocitos.

### Causas

Las anemias hemolíticas extrínsecas no inmunes tienen las causas siguientes:

1. Mecánicas:
  - a) Anemia hemolítica microangiopática: los eritrocitos se fragmentan al pasar por capilares donde existen depósitos de fibrina, como ocurre en la coagulación intravascular diseminada (CID), el síndrome urémico hemolítico (SUH), la púrpura trombocitopénica trombótica (PTT), en las anomalías de los vasos (hemangiomas cavernosos) y en las lesiones vasculares cardíacas (figura 3.41 del anexo).

- b) Hemólisis del ejercicio físico: se comprimen los eritrocitos por los músculos en continuo ejercicio físico, por ejemplo: soldados después de largas marchas, karatecas, corredores de largas distancias.
- c) Agentes físicos: calor y quemaduras. En casos aislados se ha identificado la temperatura elevada como causa de hemólisis.
- d) Infecciones por protozoos o bacterias. Los mecanismos propuestos son:
  - Parasitación directa del eritrocito como la malaria.
  - Mecanismo inmune en el síndrome de aglutinina fría, que sigue a la mononucleosis infecciosa.
  - Inducción de hiperplenismo en la malaria y en la esquistosomiasis.
  - Liberación de toxinas y enzimas que dañan la membrana del eritrocito.
- e) Sustancias químicas: drogas, venenos y tóxicos:
  - Los venenos de serpiente o arañas producen una toxina lipolítica muy potente con hemólisis intravascular.
  - Cobre y arsénico: posiblemente fijan grupos sulfidrilos a la membrana del eritrocito.
  - Plomo: interfiere en la síntesis del hem.
  - Drogas: causan daño oxidativo: nitrofurantoína, sulfas, dapsone.
- f) Hiperesplenismo: todas las actividades del bazo se acentúan cuando este aumenta de tamaño.

## BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- Andrews NC, Levy JE. Iron is hot: An update on the pathophysiology of hemochromatosis. *Blood* 1998;92(6):1845-51.
- Beguin Y, Clemons GK, Pootrakul P, Fillet G. Quantitative assessment of erythropoiesis and functional classification of anemia based on measurements of serum transferrin receptor and erythropoietin. *Blood* 1993;81:1067-76.
- Bick RL. Hematology: clinical and laboratory practice. St. Louis: Mosby, 1993.
- Bottomley SS. Secondary iron overload disorders. *Sem Hematol* 1998;35(1):77-86.
- Brigden ML. Macrocytosis in Adults: Why it is important to consider a spectrum of causes. *Lab Med Intern* 1998;15 (6):23-7.
- Carmel R, Sinow RM, Siegel ME, Samloff M. Food cobalamin malabsorption occurs frequently in patients with unexplained low serum cobalamin levels. *Arch Intern Med* 1988;148:1715-9.

- Conrad ME, Umbreit JN, Moore EG. Iron Absorption and Transport. *Am J Med Sci* 1999;318(4):213-29.
- De Castro del Pozo, S. Metabolismo del hierro normal y Patológico. 2<sup>da</sup> ed. Barcelona: Masson, S.A., 1995.
- Edwards CQ, Griffen LM, Ajioka RS, Kushner JP. Screening for hemochromatosis: phenotype versus genotype. *Semin Hematol* 1998;35(1):72-6.
- Farreras-Rozman. *Medicina Interna*. 13<sup>ra</sup> ed. España: Mosby Doyma Libros, 1995.
- Hoffman R. *Hematology basic*, 2<sup>nd</sup> ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1995.
- Machín S, Svach E, Dorticós E. Aplasia medular. Actualización. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 1999;15(2):79-90.
- McCord JM. Iron, free radicals and oxidative injury. *Semin Hematol* 1998;35:5-12.
- López Borrascas A. *Enciclopedia iberoamericana de hematología*. España: Universidad de Salamanca, 1992.
- Ponka P, Beaumont C, Richardson D. Function and regulation of transferrin and ferritin. *Semin Hematol* 1998;35(1):35-54.
- Ponka P. Tissue-specific regulation of iron metabolism and heme synthesis. Distinct control mechanisms in erythroid cell. *Blood* 1997;89:1-25.
- Rakel RE. *Conn's Current Therapy* 2000, 52<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders, 2000.
- Savage DG, Ogundipe A, Allen RH, Stabler SP, Lindenbaum J. Etiology and Diagnostic Evaluation of Macrocytosis. *Am J Med Sci* 2000;319(6):343-52.
- Skikne BS, Flowers CH, Cook JD. Serum transferrin receptor: A quantitative measure of tissue iron deficiency. *Blood* 1990;75:1870-6.
- Smith CH. *Hematología Pediátrica*, 3<sup>ra</sup> ed. La Habana: Editorial Científico-Técnica, 1985.
- Umbreit JN, Conrad ME, Moore EG, Latour LF. Iron absorption and cellular transport. The Mobilferrin / Paraferitin Paradigm. *Semin Hematol* 1998;35(1):13-26.
- Uzel C, Conrad ME, Umbreit JN. Absorption of heme iron. *Semin Hematol* 1998;35:27-34.
- Valcour AA, Krzymowski G, Onorowski M. Proposed reference method for iron in serum used to evaluate two automated iron methods. *Chin Chem* 1990;36:1789-92.
- Wick M, Pinggera W, Lehmann P. *Ferritin in Iron Metabolism. Diagnosis of Anemias*. 2 ed. New York: Springer-Verlag Wien, 1995.
- Williams WJ. *Hematology*. 5 ed. New York: McGraw-Hill, 1995.
- Wintrobe MM. *Clinical haematology*. 10 ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 1998.

## **CONTENIDO**

---

### **Alteraciones leucocitarias/ 265**

Alteraciones cuantitativas de los leucocitos/ 265

Alteraciones morfológicas de los leucocitos/ 272

Reacción leucemoide/ 273

Reacción leucoeritroblástica/ 273

### **Síndrome adenosplénico/ 274**

Ganglios linfáticos/ 274

### **Bazo/ 276**

Hiperesplenismo/ 278

Conducta que se debe seguir ante un paciente con síndrome adenosplénico/ 278

### **Bibliografía recomendada/ 279**

## Capítulo 25



### ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES LEUCOCITARIAS Y DEL SÍNDROME ADENOSPLÉNICO

*Dra. Tania I. Carballo Treto  
Dr. Ariel de J. Collina Rodríguez*

#### RESUMEN

Los leucocitos circulantes están constituidos por varios tipos de células: neutrófilos, monocitos, basófilos, eosinófilos y linfocitos, las cuales son heterogéneas en relación con su morfología y funciones. Se originan de la *stem cell* pluripotencial y tienen características cinéticas específicas; se mantienen en sangre periférica con determinados rangos. Las alteraciones cuantitativas y cualitativas de estas células son expresión de un gran número de procesos patológicos, congénitos o adquiridos. Los ganglios linfáticos y el bazo son órganos linfoides con importantes funciones. En ocasiones existe un aumento del volumen de estas estructuras, de forma aislada o al unísono, que se denomina síndrome adenosplénico, el cual es causado por varias enfermedades, entre las que se destacan las infecciones inmunes, las de almacenamiento y los procesos tumorales malignos. Para su diagnóstico se necesitan estudios citológicos, serológicos, histológicos y de imágenes.

#### ALTERACIONES LEUCOCITARIAS

En el capítulo 23 se explica el origen de los leucocitos o glóbulos blancos de la sangre y las características de las células en todos sus estadios, hasta llegar a las maduras que circulan en la sangre periférica con funciones biológicas específicas (figura 3.42 del anexo). Estas células pueden presentar alteraciones cuantitativas (aumento o disminución de los recuentos normales periféricos) o alteraciones cualitativas

por modificaciones nucleares o citoplasmáticas, las cuales se describen en este capítulo.

#### ALTERACIONES CUANTITATIVAS DE LOS LEUCOCITOS

Ante todo, es necesario recordar los valores de referencia del leucograma normal (recuento global y diferencial) (tabla 3.18).

**Tabla 3.18** Valores de referencia del leucograma normal en el adulto

Leucocitos: recuento global: 4,5 - 11 x 10 <sup>9</sup> /L		
Diferencial	Valor relativo (%)	Valor absoluto (x 10 <sup>9</sup> /L)
Polimorfonuclear neutrófilo (PMN)	50 - 70	1,8 - 7,5
Linfocito	20 - 40	1,5 - 4
Monocito	2 - 8	0,2 - 1
Eosinófilo	1 - 4	0,04 - 0,4
Basófilo	0,5 - 1	0,01 - 0,2

Algunos autores plantean que el término *leucocitosis* se refiere al aumento del recuento global de leucocitos por encima de  $11 \times 10^9/L$ . Otros lo definen como un aumento del recuento global de leucocitos mayor de 2 desviaciones estándar por encima de la media, que en la mayoría de los laboratorios es mayor de  $20 \times 10^9/L$ ; puede incluir uno o más de los subtipos de leucocitos circulantes, los cuales deben valorarse siempre teniendo en cuenta sus recuentos absolutos.

La fórmula para calcular el recuento absoluto (CAL) de un tipo determinado de leucocito es:

$$\text{CAL} = \% \text{ de la célula} \times \text{recuento global de leucocitos} \times 0,01$$

### Neutrofilia

El recuento periférico de los neutrófilos refleja el equilibrio entre varios compartimentos: en médula, el mitótico, el de maduración y el de almacenamiento; y en sangre periférica, el marginal y el circulante. El recuento de leucocitos total y diferencial solo mide los neutrófilos circulantes.

La producción diaria es de  $1,5 \times 10^9$  granulocitos/kg/día. En la médula permanecen 9 días; en la sangre periférica, de 3 a 6 horas; y en los tejidos, de 1 a 4 días.

Los neutrófilos varían en el período neonatal con un rango de 6 a  $26 \times 10^9/L$ . A la semana, el recuento es parecido al del adulto con el 60 % de los neutrófilos. Desde la primera semana de vida hasta los 5 o 6 años predominan los linfocitos; a partir de ahí los valores son iguales a los del adulto.

Los mecanismos de la neutrofilia son:

1. Aumento en la producción o en la liberación de células a la sangre.
2. Demarginación.
3. Reducción del consumo hístico.

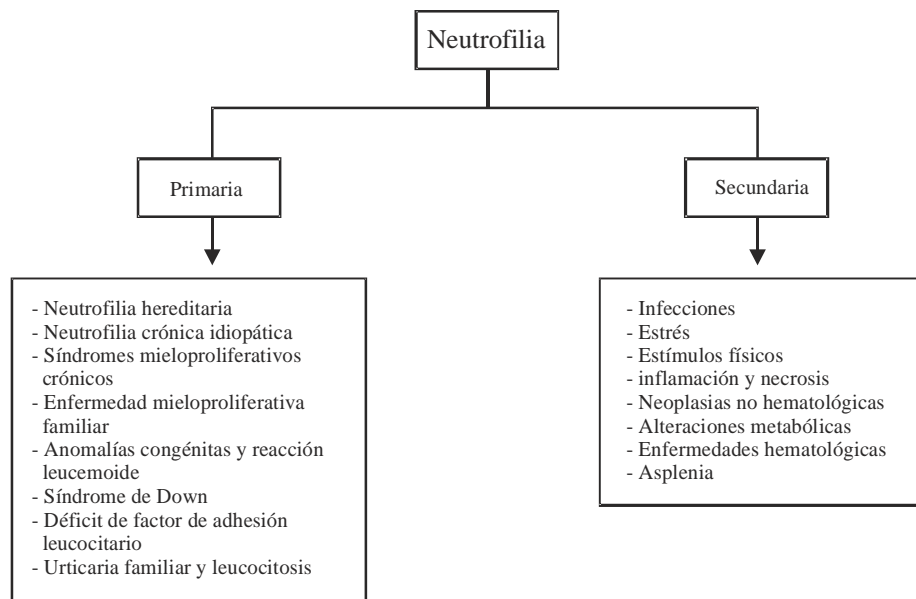
Las causas de la neutrofilia (figura 3.43) son:

#### 1. Neutrofilias primarias:

- a) Neutrofilia hereditaria: los pacientes presentan leucocitosis y esplenomegalia, pero la función leucocitaria es normal, por lo que no existe predisposición a las infecciones.  
– Herencia: autosómica dominante.
- b) Neutrofilia crónica idiopática: los pacientes presentan, ocasionalmente, leucocitos y trombocitos; medulograma normal. Son pacientes asintomáticos.
- c) Enfermedad mieloproliferativa familiar: presentan retardo en el crecimiento; hepatoespleno-

megalia, anemia y leucocitosis. La fosfatasa alcalina leucocitaria está disminuida.

- d) Anomalías congénitas y reacción leucemoide: la reacción leucemoide se ha asociado con trombocitopenia amegacariocítica y deformidades congénitas, como tetralogía de Fallot, dextrocardia y ausencia de radios.
  - e) Síndrome de Down: en el período neonatal pueden presentar reacción leucemoide transitoria.
  - f) Déficit del factor de adhesión leucocitaria: los pacientes presentan una leucocitosis persistente, caída tardía del cordón umbilical, infecciones recurrentes y defectos en la activación de los neutrófilos dependientes de estímulos. Existe trastorno en la quimiotaxia de los neutrófilos, incapacidad para fagocitar partículas opsonizadas y defectos en la adhesión. Los neutrófilos pierden el receptor de superficie para el C3bi del complemento.  
– Recuento de leucocitos: entre  $10$  y  $150 \times 10^9/L$ .  
– No existen alteraciones morfológicas específicas.
  - g) Urticaria familiar y leucocitosis: se presenta leucocitosis, fiebre, urticaria y enrojecimiento cutáneo tras la exposición al frío.  
– Herencia: autosómica dominante.
- #### 2. Neutrofilias secundarias a:
- a) Infecciones: en lo fundamental bacterianas y, menos frecuentes, por hongos, espiroquetas y virus.
  - b) Estrés: elevación ligera por ejercicio físico, inyección de epinefrina, tensión emocional, posconvulsión y menstruación.
  - c) Estímulos físicos: frío, calor, choque eléctrico, radiaciones, trauma, cirugía.
  - d) Inflamación y necrosis: quemaduras, infarto agudo del miocardio, pancreatitis, tiroiditis, colagenosis y colitis.
  - e) Drogas: adrenalina, serotonina, histamina, esteroides, andrógenos, digital.
  - f) Neoplasias no hematológicas de mama, riñón, hígado, pulmón, páncreas, estómago, útero, neuroblastomas en niños.
  - g) Alteraciones metabólicas: acidosis diabética, tirotoxicosis, eclampsia, aumento en la producción de ACTH.
  - h) Enfermedades hematológicas: hemólisis, hemorragias, trombocitopenia inmune.
  - i) Asplenia: quirúrgica o asociada con enfermedades como la sicklemlia.



**Figura 3.43** Causas de la neutrofilia.

### Eosinofilia

Las causas de la eosinofilia son:

1. Trastornos alérgicos: rinitis alérgica, asma, dermatitis atópica, urticaria aguda.
2. Enfermedades parasitarias: helmintiasis, esquistosomiasis, estrongiloidiasis, triquinosis, toxocariasis, ascariasis, fasciola.
3. Enfermedades dermatológicas: pénfigo, herpes, dermatitis por contacto, escabiosis, pitiriasis rosada, hiperplasia angiolinfoide subcutánea.
4. Enfermedades pulmonares: síndrome de Loeffler, aspergilosis broncopulmonar alérgica, eosinofilia tropical, bronquiectasia.
5. Vasculitis y colagenosis, síndrome de Churg-Strauss, artritis reumatoide severa, fascitis eosinofílica, síndrome de Sjögren, poliarteritis nodosa.
6. Neoplasias: carcinoma de pulmón, ovario, estómago.
7. Inmunodeficiencias: deficiencia selectiva de IgA, síndrome de Wiskott-Aldrich.
8. Enfermedades intestinales: gastroenteritis eosinofílica, enfermedad celiaca, hepatitis crónica activa.
9. Drogas: digital, pilocarpina, sales de oro, ampicilín.
10. Enfermedades hematológicas: leucemia mieloide aguda, linfomas, anemia perniciosa, leucemia mieloide aguda (LMA-M<sub>4</sub>Eo), mieloma múltiple, síndrome hipereosinofílico:
  - a) Síndrome hipereosinofílico primario: síndrome clínico caracterizado por eosinofilia mayor que  $1,5 \times 10^9/L$  mantenida (más de 6 meses), sin

que se pueda demostrar una causa secundaria y con manifestaciones en múltiples órganos.

El daño que producen los eosinófilos se debe a la infiltración hística y a la liberación de productos de sus gránulos, como son: proteína básica mayor, peroxidasa eosinofílica, proteína catiónica eosinofílica y neurotoxina derivada de los eosinófilos, las cuales causan daño orgánico.

Las manifestaciones clínicas son:

1. Edad de presentación: entre los 20 y 50 años. Es más frecuente en los varones.
2. Formas de presentación:
  - a) Los pacientes se muestran asintomáticos.
  - b) Síntomas inespecíficos como astenia, fiebre, prurito, mialgias.
  - c) Afectaciones en órganos:
    - Piel: prurito, urticaria, dermatografismo positivo, angioedema, *rash*, erupción papulosa.
    - Sistema osteomioarticular: mialgias, tumefacción, debilidad muscular.
    - Sistema respiratorio: tos, disnea, broncospasmo, infiltrado pulmonar, serositis.
    - Sistema cardiovascular: angina, arritmias, insuficiencia cardíaca.
    - Sistema digestivo: náuseas, vómitos, dolor abdominal, diarreas, malabsorción, hepatoesplenomegalia.
    - Sistema nervioso central: signos motores, encefalopatías y síntomas sensitivos.



El diagnóstico de laboratorio indica:

1. Hemograma: en sangre periférica se observa eosinofilia. Los eosinófilos son maduros con morfología típica, aunque se ha reportado hipogranulación y vacuolización. Recuento de leucocitos: entre 10 y 30 x 10<sup>9</sup>/L (de ellos 30 al 70 % son eosinófilos). En ocasiones, se observan precursores eosinofílicos. Puede existir trombocitosis y anemia.
2. Medulograma: médula hiper celular. Eosinofilia: entre el 25 y el 75 % de las células. La fibrosis es rara. Se utiliza para excluir otros diagnósticos que producen eosinofilia secundaria.
3. Cariotipo: no existen alteraciones características de esta afección.

El manejo clínico está encaminado a controlar la eosinofilia y evitar el daño hístico.

### Monocitosis

Las causas de la monocitosis son:

1. Infecciones bacterianas:
  - a) Tuberculosis.
  - b) Endocarditis bacteriana subaguda.
  - c) Brucelosis.
  - d) Sífilis.
2. Infecciones virales:
  - a) Mononucleosis infecciosa.
  - b) Sarampión.
  - c) Rubéola.
  - d) Papera.
  - e) Hepatitis.
  - f) Infección por citomegalovirus.
3. Infección por protozoarios y rickettsias: tripanosomas, paludismo, tifus.
4. Granulomas: sarcoidosis, colitis ulcerativa, enteritis regional.
5. Colagenosis.
6. Enfermedad de Gaucher.
7. Cuando existe neutropenia y en la fase de recuperación de la agranulocitosis.
8. Posesplenectomía.
9. Hematológicas:
  - a) Linfoma de Hodgkin.
  - b) Linfoma no Hodgkin.
  - c) Leucemia mielomonocítica crónica.
  - d) Anemia hemolítica.
  - e) Púrpura trombocitopénica inmunológica (PTI).
  - f) Leucemias monocíticas M<sub>4</sub> y M<sub>5</sub>.
  - g) Histiocitosis.
10. Tumores malignos:
  - a) Carcinoma de pulmón.
  - b) Ovario.
  - c) Estómago.

### Basofilia

Las causas de la basofilia son:

1. Hipersensibilidad crónica en ausencia de alergias.
2. Enfermedad sistémica de los mastocitos.
3. Artritis reumatoide.
4. Colitis ulcerativa.
5. Insuficiencia renal crónica.
6. Neoplasia de pulmón.
7. Diabetes mellitus.
8. Mixedema.
9. Enfermedades virales.
10. Posradiación.
11. Enfermedades hematológicas:
  - a) Linfoma de Hodgkin.
  - b) Leucemia mieloide aguda.
  - c) Policitemia vera.
  - d) Anemia hemolítica crónica.
  - e) Posesplenectomía.

### Linfocitosis

Las causas de la linfocitosis son:

1. Infecciones:
  - a) Virales:
    - Mononucleosis infecciosa.
    - Hepatitis.
    - Varicela.
    - Rubéola.
    - Infección por citomegalovirus.
  - b) Bordetella pertusis.
  - c) Toxoplasma.
  - d) Sífilis.
  - e) Fiebre tifoidea.
  - f) Brucelosis.
2. Linfocitosis infecciosa aguda.
3. Estrés: trauma, cirugía, infarto del miocardio, *status* epiléptico.
4. Linfocitosis persistente:
  - a) Enfermedades autoinmunes.
  - b) Neoplasias.
  - c) Tabaco.
  - d) Inflamación crónica.
  - e) Sarcoidosis.
  - f) Timoma.
5. Enfermedades hematológicas:
  - a) Leucemia linfocítica crónica.
  - b) Linfoma en fase leucémica.
  - c) Leucemia linfocítica aguda.
  - d) Macroglobulinemia de Waldenström.

### Plasmocitosis

Las células plasmáticas no se observan en la sangre periférica de los individuos sanos. En circunstancias

normales, ellas se encuentran en la médula, los ganglios linfáticos, el bazo, el tejido gastrointestinal y el tejido conectivo.

Condiciones asociadas con plasmocitosis en sangre periférica:

1. Causas benignas:
  - a) Mononucleosis infecciosa.
  - b) Infecciones bacterianas, virales y por protozoos.
  - c) Enfermedad hepática alcohólica.
  - d) Enfermedades inflamatorias del intestino.
  - e) Antitoxinas para el tétano y la difteria.
  - f) Drogas: sulfas, penicilinas.
  - g) Hiperinmunización.
  - h) Otras: traumas, transfusión, colagenosis.
2. Causas malignas:
  - a) Hematológicas: leucemia de células plasmáticas.
  - b) No hematológicas: carcinoma de pulmón, próstata.

### Mononucleosis infecciosa

La mononucleosis infecciosa es una enfermedad sistémica provocada por el virus de Epstein-Barr (VEB). La patogenia de esta afección consiste en que el virus (VEB) penetra en las células epiteliales de la orofaringe o en los linfocitos B del anillo de Waldeyer. Todos los linfocitos B tienen receptores para este virus. A continuación se produce una respuesta policlonal B con producción de inmunoglobulinas, seguida por la activación de los linfocitos T, por lo que existe un balance entre los linfocitos T *helper* y los T supresores. En la mayoría de los casos, la infección es autolimitada.

Las manifestaciones clínicas son:

1. Edad de presentación: es frecuente en adolescentes y adultos jóvenes, aunque puede aparecer a cualquier edad.
2. Período de incubación: de 30 a 50 días.
3. Existe una tríada clásica constituida por fiebre más adenopatías y faringitis.

Otros síntomas y signos que se presentan son:

1. Cefalea retroorbital.
2. Hepatoesplenomegalia.
3. Adenopatías cervicales, inguinales y axilares.
4. Faringitis con exudado.

En los mayores de 40 años, las manifestaciones son atípicas con fiebre prolongada, disfunción hepática, íctero, efusión pleural y, en ocasiones, anemia.

El diagnóstico de laboratorio indica:

1. Hemograma: hemoglobina normal, puede existir hemólisis por anticuerpos contra grupos sanguíneos (i, I, N), pero la anemia es significativa, desde

el punto de vista clínico, solo en el 1 al 32 % de los pacientes.

Leucocitosis: entre  $10$  y  $20 \times 10^9/L$ , con linfocitos: más de  $4,5 \times 10^9/L$  y la presencia, en sangre periférica, de linfocitos atípicos, denominados células linfomonocitarias o células de Downey (figura 3.44 del anexo), las cuales se describen a continuación:

- a) Célula Downey tipo I: linfocito grande granular. Núcleo excéntrico, dentado, con cromatina parcialmente condensada; citoplasma basófilo con gránulos azurófilos y vacuolas.
  - b) Célula Downey tipo II: células grandes de  $18$  a  $25 \mu m$ ; citoplasma grande basofílico, agranular; cromatina parcialmente condensada; en ocasiones se observan nucléolos. Se denominan linfocitos blastoides.
  - c) Célula Downey tipo III: célula de gran tamaño, con citoplasma abundante que adopta una estructura ameboide.  
Debe existir más del 10 % de las células linfomonocitarias para poder establecer el diagnóstico.
2. Detección de anticuerpos heterófilos:
    - a) Prueba de Paul Bunnell: detecta, en el suero de los pacientes, los anticuerpos heterófilos IgM que reaccionan con eritrocitos de carnero. Estos aparecen alrededor de la segunda semana y persisten 4 meses. La prueba es positiva cuando el título es mayor de 1:64.
  3. Detección serológica de anticuerpos dirigidos contra el virus (VEB). Existen 4 tipos de anticuerpos:
    - a) Anticuerpo IgM contra el antígeno de la cápside viral: es el primero en aparecer y dura pocos meses.
    - b) Anticuerpo contra el antígeno de la cápside viral IgG: aparece en la enfermedad aguda, a continuación del anterior, y dura toda la vida.
    - c) Anticuerpo contra el antígeno temprano IgG: dura pocos años.
    - d) Anticuerpo contra el antígeno nuclear IgG: se desarrolla después de la fase aguda, pero persiste toda la vida.
  4. Detección del VEB por la reacción en cadena de la polimerasa: para detectar el ADN del virus en los linfocitos de sangre periférica y en biopsias hísticas.
  5. Detección del VEB por hibridación *in situ*: permite la visualización de ácidos nucleicos virales con sondas radiomarcadas en los tejidos.

**Leucopenia.** Existencia en la sangre periférica de un recuento global de leucocitos menor que  $4,5 \times 10^9/L$ .

Por lo general afecta una de las dos líneas más abundantes: neutrófilos o linfocitos.

**Neutropenia.** Recuento absoluto de neutrófilos (CAN) menor de  $1,5 \times 10^9/L$ , el cual se obtiene con la fórmula:

$$CAN = \text{recuento global de leucocitos} \times (\% \text{ de stabs} + \% \text{ de neutrófilos maduros}) \times 0,01$$

La neutropenia se clasifica en:

1. Ligera: entre  $1 \text{ y } 1,5 \times 10^9/L$ .
2. Moderada: entre  $0,5 \text{ y } 1 \times 10^9/L$ .
3. Severa: menor que  $0,5 \times 10^9/L$ .
4. Muy severa: menor que  $0,2 \times 10^9/L$ .

Las causas de la neutropenia son:

1. Defectos intrínsecos:
  - a) Agranulocitosis infantil severa.
  - b) Mielocatexis.
  - c) Neutropenia cíclica.
  - d) Síndrome de Shwachman-Diamond.
  - e) Síndrome de Chediak-Higashi.
  - f) Disgenesia reticular.
  - g) Disqueratosis congénita.
2. Adquirida:
  - a) Posinfecciosa.
  - b) Producida por drogas.
  - c) Neutropenia benigna familiar.
  - d) Neutropenia benigna crónica de la infancia.
  - e) Neutropenia crónica idiopática.
  - f) De causa inmune: autoinmune e isoimune.
  - g) Asociado con trastornos metabólicos.
  - h) Por aumento de la marginación.
  - i) Deficiencia nutricional.
  - j) Defectos intrínsecos: agranulocitosis infantil severa (síndrome de Kostman).

La neutropenia tiene las características siguientes:

1. Neutropenia crónica.
2. Infecciones piógenas severas: piel, estomatitis, abscesos perirectales, peritoneo, meningitis.
3. Muerte temprana, aproximadamente a los 2 años.
4. Afecta a todas las razas, patrón de herencia: autosómico recesivo.
5. El 50 % de los niños son sintomáticos en el primer mes de vida y el 90 %, a los 6 meses.

El diagnóstico de laboratorio indica:

1. Neutropenia marcada entre  $0 \text{ y } 0,2 \times 10^9/L$ .
2. Eosinofilia y monocitosis.
3. Medulograma: celularidad normal, ausencia o disminución marcada de los precursores mieloides.

4. Detención de la maduración en mielocitos y promielocitos.

### Mielocatexis

La mielocatexis presenta:

1. Neutropenia moderada.
2. Infecciones recurrentes severas.
3. Alteraciones morfológicas en neutrófilos: núcleos anormales y vacuolización.
4. Se asocia con hipogammaglobulinemia.
5. Medulograma: médula hiperplástica con alteraciones dismielopoyéticas en granulocitos.

### Neutropenia cíclica

La neutropenia cíclica se manifiesta con:

1. Oscilaciones periódicas regulares de neutropenia (cada 15 a 35 días).
2. Patrón de herencia: autosómico dominante.
3. Infecciones: faringitis, mastoiditis, neumonías, úlceras en las mucosas oral y anal; peritonitis.
4. Medulograma: durante la neutropenia se observa hiperplasia del gránulo con detención en la maduración.
5. Puede mejorar con el crecimiento.

### Síndrome de Schwachman-Diamond-Oski

El síndrome de Schwachman-Diamond-Oski se caracteriza por:

1. Neutropenia asociada con displasia metafisial e insuficiencia pancreática.
2. Infecciones severas o fatales en la mitad de los pacientes.
3. Corta estatura, estrabismo, sindactilia, microcefalia.

### Displasia metafisial

El diagnóstico de laboratorio indica:

1. Recuento absoluto de neutrófilos menor que  $0,5 \times 10^9/L$ .
2. Defecto en la quimiotaxis.
3. Trombocitopenia en el 70 % de los casos.

### Síndrome de Chediak-Higashi

El síndrome de Chediak-Higashi se caracteriza por:

1. Herencia: autosómica recesiva.
2. Los pacientes presentan albinismo oculocutáneo, mayor susceptibilidad a las infecciones, disfunción neurológica y, en ocasiones, diátesis hemorrágica.

El cuadro clínico culmina con una fase de pancitopenia y hepatoesplenomegalia.

El diagnóstico de laboratorio indica:

1. Granulación azurófila gigante en neutrófilos, linfocitos y monocitos.
2. Neutropenia con alteración en sus funciones.

#### **Disgenesia reticular**

La disgenesia reticular se caracteriza por:

1. Neutropenia severa y linfopenia con disminución de IgM e IgA. Infecciones bacterianas o virales fatales.
2. Sobrevida: 4 meses.
3. Medulograma: médula hipoplástica con disminución de los precursores mieloides y linfoides.

#### **Disqueratosis congénita**

La disqueratosis congénita se caracteriza por:

1. Trastorno recesivo ligado al cromosoma X.
2. Distrofia de las uñas, hiperpigmentación cutánea, retardo mental, detención del crecimiento.
3. Larga sobrevida.
4. Medulograma: médula hipoplástica.

#### **Neutropenias adquiridas**

**Neutropenias posinfecciosas.** Las causas más comunes son las infecciones virales. La neutropenia se desarrolla en las primeras 24 a 48 horas de la enfermedad y puede persistir de 3 a 6 días. Se debe a una redistribución de los neutrófilos, secuestro, aumento de la utilización o disminución de la producción.

El medulograma indica: médula hiper celular con una detención de la maduración mieloide.

**Neutropenias producidas por drogas.** Provocadas por antimetabolitos, barbitúricos, antibióticos, anticonvulsivantes, quimioterápicos, antiinflamatorios, analgésicos y otros.

El mecanismo más frecuente es por supresión medular directa, aunque también puede ser mediada por anticuerpos contra precursores mieloides o por destrucción periférica.

La recuperación comienza en pocos días después de detener la droga y es precedida por la aparición de monocitos y neutrófilos inmaduros en periferia.

**Neutropenia benigna familiar.** Esta afección se caracteriza por:

1. Recuento de neutrófilos entre 2 y  $2,6 \times 10^9/L$ .
2. Herencia autosómica dominante.
3. No existe predisposición a las infecciones.
4. Medulograma: médula normocelular.

**Neutropenia crónica idiopática.** Esta enfermedad muestra las características siguientes:

1. Estado crónico de depleción de neutrófilos maduros.
2. Comienza en la infancia o en la adultez.
3. Se han reportado infecciones piógenas de piel, úlceras orales, otitis, sinusitis, pero no son comunes.
4. Diagnóstico de laboratorio: recuento de neutrófilos: entre  $0,2$  y  $0,5 \times 10^9/L$ .

**Monocitosis.** Muestra el siguiente diagnóstico:

1. Medulograma: celularidad normal.
2. Detención tardía en la maduración mieloide.

#### **Neutropenia inmune**

Presenta los cuadros clínicos siguientes:

1. Isoinmune: neutropenia severa secundaria a anticuerpos IgG transferidos de la madre al niño. Aparece en el 3 % de los neonatos, los cuales pueden presentar fiebre, sepsis en la piel, neumonía, infecciones urinarias.

El diagnóstico de laboratorio indica:

- a) En la sangre periférica: neutropenia con monocitosis y eosinofilia.
- b) Medulograma: hiperplasia con depresión de los neutrófilos maduros. El resto de las series son normales.

2. Autoinmune: puede ser secundaria a otras enfermedades autoinmunes, a infecciones, drogas, o aparecer como fenómeno aislado.

El diagnóstico de laboratorio indica: neutropenia moderada a severa.

Medulograma: hiper celular, con detención de la maduración mieloide tardía.

#### **Infecciones según el grado de neutropenia.**

Se detectan anticuerpos antineutrófilos NA1, NA2, ND2, NB1 y anticuerpos contra antígenos compartidos con eritrocitos y el sistema HLA.

**Neutropenia asociada con trastornos metabólicos.** Los trastornos más frecuentes son: hiperglicemia, aciduria propiónica y metilmalónica, enfermedades de almacenamiento de glucógeno.

La neutropenia es menor de  $0,5 \times 10^9/L$  con trastornos en la función.

El medulograma es normal o hiper celular.

**Deficiencia nutricional.** Se produce la neutropenia por granulopoyesis ineficaz, en el déficit de vitamina B<sub>12</sub> y de ácido fólico. El diagnóstico de laboratorio indica:

1. En la sangre periférica: neutropenia con monocitosis.
2. Medulograma: médula megaloblástica.

### Eosinopenia

Las causas de la eosinopenia son:

1. Hiperactividad de la corteza suprarrenal.
2. Granulocitosis infecciosa severa.
3. Estrés: parto con eclampsia; después de cirugías extensas y de tratamiento por *shock* eléctrico.
4. Mononucleosis infecciosa.
5. Drogas: ACTH, epinefrina, prostaglandinas.

### Monocitopenia

Las causas de la monocitopenia son:

1. Tratamiento esteroideo.
2. Leucemia de células peludas.
3. Infección por VIH.
4. Artritis reumatoide.

### Linfopenia

Las causas de la linfopenia son:

1. Inmunodeficiencia congénita.
2. Inmunodeficiencia adquirida: tratamiento inmunosupresor e infección por VIH.
3. Hiperactividad suprarrenal.
4. Enfermedades graves caquetixantes.
5. Insuficiencia cardíaca, tuberculosis, insuficiencia renal.

6. Linfangiectasia intestinal.

7. Lupus eritematoso sistémico.

8. Linfoma de Hodgkin.

9. Infecciones piógenas agudas.

10. Después de quemaduras o traumas.

11. Uremia crónica.

12. Anemia aplástica.

### Basofilopenia

Las causas de la basofilopenia son:

1. Reacciones alérgicas.
2. Hipertiroidismo.
3. Estrés: infarto del miocardio, sangrado de úlcera péptica.
4. Terapia con esteroides prolongada.

## ALTERACIONES MORFOLÓGICAS DE LOS LEUCOCITOS

Las alteraciones morfológicas de los leucocitos se encuentran en el núcleo o en el citoplasma de las células y se deben a alteraciones congénitas o adquiridas (tablas 3.19 y 3.20). En las figuras 3.29, 3.45, 3.46 y 3.47 del anexo se muestran las alteraciones leucocitarias en láminas periféricas.

**Tabla 3.19** Alteraciones nucleares de los leucocitos

Denominación	Características	Semiología
Anomalía de Pelger-Huët	Disminución o ausencia de la segmentación nuclear en los neutrófilos (unibolado o bilobulado), los cuales no presentan alteraciones funcionales. Puede asociarse con anomalías óseas en los homocigóticos	Anomalía congénita que se trasmite de forma autosómica dominante
Seudopelger adquirido	Generalmente bilobulado	Infecciones agudas, leucemias agudas y crónicas, mielofibrosis, síndromes mieloproliferativos, síndromes dismielopoyéticos, mixedema grave
Hipersegmentación de los neutrófilos	Hereditaria: 80 % de los neutrófilos con 4 o 5 lóbulos. No asociado con enfermedad clínica  Adquirida: aumento de las lobulaciones nucleares, asociado con macrocitosis periférica	Anomalía congénita con patrón de herencia autosómico dominante  Anemia megaloblástica
Hipersegmentación de los eosinófilos	Trastorno hereditario donde se observa aumento en las lobulaciones de los eosinófilos. No asociado con enfermedad	Anomalía congénita
Seudomaduración degenerativa	Núcleo lobulado con cromatina inmadura, masa nuclear aumentada con respecto al citoplasma	Leucemias mieloides

**Tabla 3.20** Alteraciones citoplasmáticas de los leucocitos

Denominación	Características	Semiología
Granulación tóxica	Gránulos que contienen enzimas anormalmente activadas. Tienen una coloración azurófila intensa	Infecciones bacterianas graves Inflamación crónica Inflamación aguda Quemaduras graves
Vacuolización tóxica	Vacuolas en el citoplasma de neutrófilos y monocitos	Infecciones graves Tratamiento con sales de oro, fenilbutazona, propil-tiuracilo y quimioterapia
Ausencia total o parcial de granulación	No se observan o están muy disminuidos los gránulos en los neutrófilos	Infecciones graves Leucemias mieloides
Cuerpos de Döhle	Masa de ARN persistentes en el citoplasma, de color azul pálido	Infecciones graves Escarlatina Quemados Púrpura trombocitopénica trombótica
Bastones de Auer	Cuerpos alargados de color rojo en el citoplasma de granulocitos y monocitos. Constituyen agregados de lisosomas	Desorden mielóide maligno con maduración anormal
Anomalía de Alder-Reilly	Granulación azurófila grosera o gruesa, parecida a los gránulos tóxicos. Afecta todas las células	Anomalía congénita con patrón de herencia autosómico recesivo
Anomalía de Chediak-Higashi	Granulación azurófila gigante en neutrófilos, linfocitos y monocitos Neutropenia con trastornos en su función e infecciones frecuentes Albinismo, adenopatías y hepatoesplenomegalia	Anomalía congénita con patrón de herencia autosómico recesivo
Anomalía de May-Hegglin	Inclusión de color azul pálido (2-5 mm) que constituyen residuos de ARN Plaquetas grandes Leucopenia	Anomalía congénita con patrón de herencia autosómico recesivo

Existen dos cuadros clínicos morfológicos en la sangre periférica, de los cuales deben conocerse su concepto y semiología, pues se presentan en la práctica diaria.

### REACCIÓN LEUCEMOIDE

La reacción leucemoide es una elevación del recuento global de leucocitos por encima de  $50 \times 10^9/L$ .

La reacción leucemoide neutrofílica es la más común, y se caracteriza por un aumento significativo de los precursores neutrofílicos en sangre periférica. El recuento diferencial tiene una marcada desviación izquierda, y se observan promielocitos y blastos en las reacciones severas. Debe realizarse el diagnóstico diferencial con la leucemia mielóide crónica (LMC) (tabla 3.21).

### REACCIÓN LEUCOERITROBLÁSTICA

La reacción leucoeritroblástica se define como la presencia en la sangre periférica de células nucleadas eritroides junto con células mieloides inmaduras. Se pueden observar también eritrocitos en lágrimas.

#### Causas de la reacción leucoeritroblástica

Las causas que producen esta reacción son:

1. Infiltración medular.
2. Hemorragias.
3. Infecciones.
4. Hemólisis.
5. Insuficiencia renal.
6. Síndrome mieloproliferativo crónico.
7. Leucemias.

8. Linfomas.
9. Mieloma múltiple.
10. Enfermedades granulomatosas.
11. Enfermedad de Gaucher.
12. Fibrosis medular.
13. Carcinoma de pulmón, mama, próstata, con metástasis ósea.
14. Hiperesplenismo.

## SÍNDROME ADENOSPLÉNICO

### GANGLIOS LINFÁTICOS

Los ganglios linfáticos son órganos linfoides secundarios, de pequeño tamaño (entre 2 mm y 1 cm), distribuidos por todo el organismo, a lo largo de los vasos linfáticos, en regiones superficiales o profundas.

Estructura histológica: presenta 3 zonas anatómicas:

1. Corteza: contiene linfocitos B, organizados en forma de nódulos o folículos; algunos de estos tienen centros germinales.
2. Zona paracortical: situada entre los folículos, consta de varias capas de linfocitos T.
3. Médula: ubicada en la zona central, los linfocitos se ordenan en los cordones medulares que convergen en el hilio; contiene células plasmáticas, linfocitos B, macrófagos y, en menor cantidad, linfocitos T.

Los vasos linfáticos aferentes entran en el ganglio, perforan la superficie de la cápsula y drenan en los

senos subcapsulares; de ahí, la linfa fluye al interior y sale del ganglio por el hilio a través de un vaso linfático eferente (figura 3.48).

### Funciones de los ganglios linfáticos

En los ganglios linfáticos se produce el procesamiento de antígenos con la activación, diferenciación y proliferación de los linfocitos B y T y la subsiguiente producción de inmunoglobulinas, citoquinas y linfocitos T citotóxicos.

### Síndrome adénico

Consiste en el aumento de volumen de los ganglios linfáticos, acompañado de síntomas y signos.

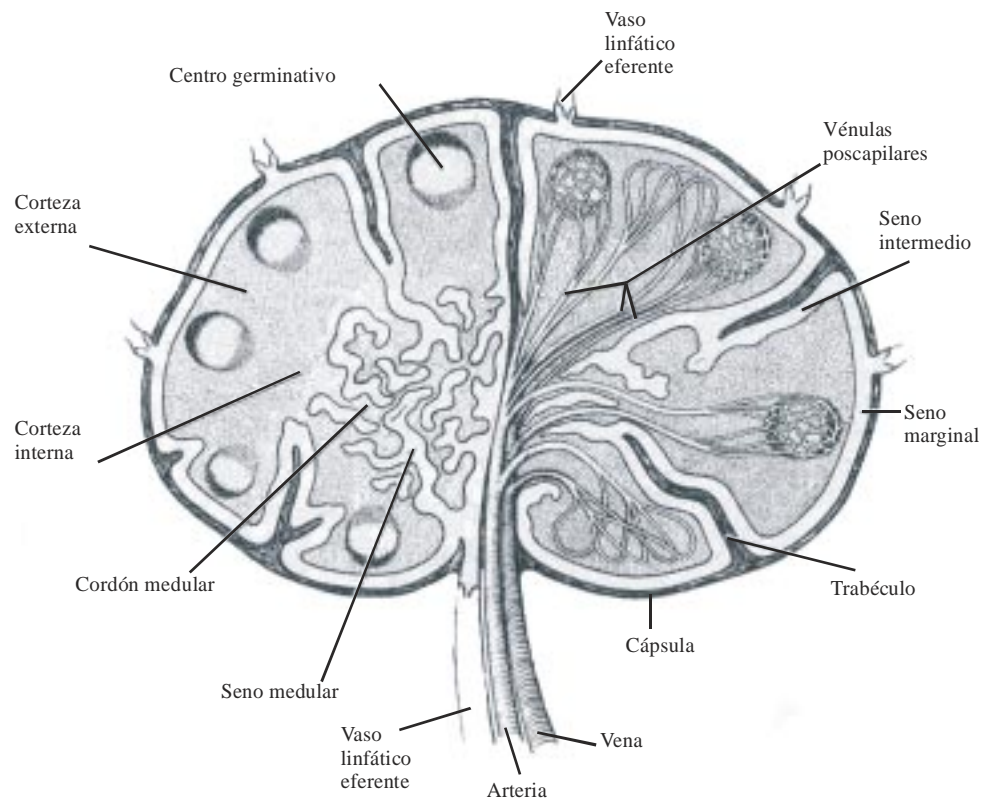
### Causas del síndrome adénico

Las causas del síndrome adénico son:

1. Infecciosas:
  - a) Bacterianas: estreptococo, estafilococo, brucela, salmonella, lepra, micobacterias.
  - b) Virales: virus de Epstein-Barr, citomegalovirus, VIH, varicela, rubéola.
  - c) Espiroquetas: sífilis, leptospirosis.
  - d) Micóticas: histoplasmosis, coccidiomicosis.
  - e) Protozoarios: toxoplasmosis, filarias, toxoplasmas.
2. Inmunológicas:
  - a) Colagenosis.
  - b) Reacciones a drogas: hidantoína.
  - c) Enfermedad del suero.

**Tabla 3.21** Diagnóstico diferencial de la reacción leucemoide

Reacción leucemoide neutrofílica	Leucemia mieloide crónica
Se puede identificar la causa (infecciosa o inflamatoria)	No se identifica ninguna causa
Generalmente no existe esplenomegalia	Esplenomegalia casi siempre presente
Conteo de leucocitos menor que $100 \times 10^9/L$	Conteo de leucocitos mayor que $100 \times 10^9/L$
Fosfatasa alcalina leucocitaria (FAL): aumentada	FAL: disminuida
Puede haber monocitosis y eosinofilia en sangre periférica, pero la basofilia es rara	Basofilia frecuente
Patrón séptico, se conservan el resto de las series	Se acompaña de alteraciones de eritrocitos y plaquetas
Cromosoma de Filadelfia (Ph) no existe	Presencia del cromosoma de Filadelfia (Ph+)
Médula reactiva	Médula: hiperplasia granulopoyética severa, que puede acompañarse de fibrosis medular



**Figura 3.48** Estructura del ganglio linfático.

3. Enfermedades de almacenamiento:
  - a) Gaucher.
  - b) Nieman Pick.
4. Procesos malignos hematológicos: leucemias (LLC), linfomas, histiocitosis maligna.
5. Procesos malignos no hematológicos: neuroblastoma, carcinoma de tiroides, mama, pulmón, próstata, riñón, ovario, testículo.
6. Otros: sarcoidosis, enfermedad de Kawasaki, amiloidosis, histiocitosis X, hiperplasia angiofolicular linfoide.
7. Endocrinas:
  - a) Hipertiroidismo.
  - b) Enfermedad de Addison.

#### Diagnóstico del síndrome adénico

El diagnóstico se realiza teniendo en cuenta:

1. Antecedentes: por el interrogatorio, se debe conocer: edad, modo de comienzo, síntomas acompañantes (fiebre, pérdida de peso, anorexia, astenia, prurito, sudaciones nocturnas, artralgias, mialgias) y actividad profesional.
2. Examen físico: precisar las características de las adenopatías.

#### Localización del síndrome adénico

La localización es:

1. Cervical: se observa en infecciones de las vías respiratorias altas y de la piel facial y cervical, además, en las leucemias agudas y los linfomas.
2. Submaxilar: en infecciones de los dientes, encías, paladar, zona anterior de la lengua y en el acné facial.
3. Preauricular: en inflamación de los ojos y anexos.
4. Occipital: en la dermatitis seborreica, piodermitis, heridas leves y pediculosis del cuero cabelludo.
5. Supraclavicular: están relacionados con procesos malignos intratorácicos o intraabdominales.
6. Axilar: en las lesiones inflamatorias, infecciosas o tumorales de las axilas y las regiones torácicas (sobre todo de las mamas).
7. Mediastínica: en las enfermedades pulmonares crónicas, micobacterias atípicas, aspergilosis y sarcoidosis, fibrosis quística y en procesos malignos que incluyen las leucemias y los linfomas.
8. Iliaca, pélvica y abdominal: en las enfermedades infecciosas y tumorales de órganos pélvicos, abdominales y de las extremidades inferiores.



9. Inguinales: en lesiones infecciosas de los miembros inferiores, de las zonas genital y perineal, sobre todo.
10. Poplíteas: en infecciones de rodilla, pierna y pie.
11. Epitroclear: en lesiones infecciosas o inflamatorias de las manos.

#### Tamaño de las lesiones

Las lesiones más importantes son las mayores de 2 cm o que tengan un crecimiento continuo; las de consistencia pétrea, indoloras y no móviles se encuentran en los carcinomas metastásicos; las elásticas, simétricas, móviles y no dolorosas se observan en los procesos linfoproliferativos, mientras que las dolorosas, de consistencia blanda y asimétricas, se relacionan con procesos infecciosos.

#### Estudios complementarios

Los estudios indican:

1. Hemograma: es muy útil, pues orienta hacia la causa, por ejemplo:
  - a) Neutrofilia: indica la presencia de infecciones bacterianas.
  - b) Linfocitos atípicos: indica la presencia de virus.
  - c) Células linfomonocitarias: indica la presencia de síndrome mononucleósido.
  - d) Blastos en periferia: indica la presencia de leucemias agudas.
  - e) Reacciones leucoeritroblásticas: indica la presencia de tumores hematológicos y no hematológicos.
2. Pruebas adicionales:
  - a) Pruebas serológicas para virus (VEB, CMV, VIH), toxoplasma.
  - b) Estudios inmunológicos: ANA, anti-ADN, factor reumatoideo.  
Estas pruebas son costosas e innecesarias si no existen elementos previos que sospechen el diagnóstico, por lo tanto, se deben realizar de forma selectiva.
3. BAAF de ganglios: es poco molesto para el paciente, pero no siempre permite el diagnóstico de certeza.
4. Biopsia de ganglio: cuando se sospecha una causa tumoral, la biopsia de ganglio es un estudio imprescindible y debe realizarse sin pérdida de tiempo, ya que, además del examen histopatológico, permite estudios citoquímicos, marcadores de superficie y cultivos para bacterias, micobacterias, hongos. Es importante la selección del ganglio al que se le va a

realizar la biopsia; los más indicados son los que se encuentran en las regiones supraclaviculares y laterocervicales, ya que los inguinales, femorales o cervicales posteriores no suelen ser útiles, pues a menudo presentan hiperplasia reactiva causada por procesos infecciosos repetidos.

5. Medulograma y biopsia de médula ósea: permite el diagnóstico de los tumores hematológicos y las enfermedades de almacenamiento.
6. Técnicas de diagnóstico por imágenes:
  - a) Ultrasonido: es útil para buscar ganglios en localizaciones profundas, difíciles de palpar; además, permite realizar el diagnóstico diferencial con quistes del conducto tirogloso.
  - b) Rayos X de tórax: define las lesiones pulmonares y mediastinales.
  - c) Tomografía axial computadorizada (TAC): útil en el diagnóstico de adenopatías en mediastino, retroperitoneo y pelvis. Brinda mayor información de los ganglios abdominales y detecta las alteraciones en órganos extranodales.
  - d) Resonancia magnética nuclear: puede detectar ganglios anormales y afectación esplénica.
  - e) Linfografía: es un estudio muy útil, pues detecta cambios mínimos en la arquitectura ganglionar (alta sensibilidad) y permite el seguimiento de la enfermedad después del tratamiento. Tiene como inconvenientes las reacciones alérgicas en algunos pacientes y el embolismo graso. Además, no detecta áreas ganglionares como mesenterio, hilio hepático y esplénico, y los celiacos.

#### BAZO

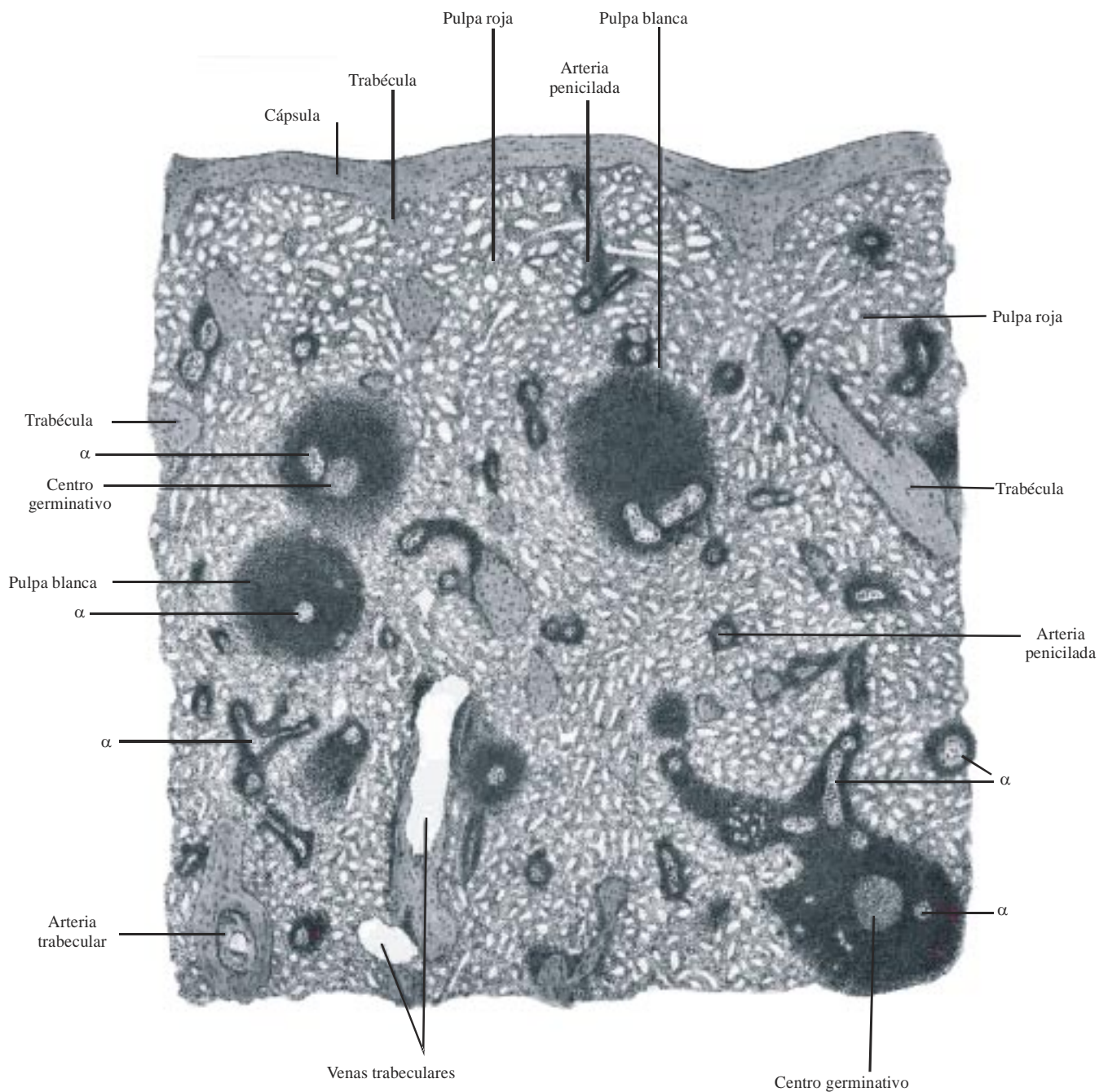
El bazo es un órgano ubicado en el cuadrante superior izquierdo de la cavidad abdominal; pesa 150 g y mide 12 cm de largo, 7 cm de ancho y 3 cm de grosor. Si se realiza un corte transversal, se observan las siguientes estructuras histológicas:

1. Pulpa blanca: la arteria central está rodeada por linfocitos T en la llamada vaina linfática periarteriolar. Estas vainas se expanden y forman nódulos linfoides compuestos, sobre todo, por linfocitos B. El sistema arterial termina en finas arteriolas que al principio están encerradas en el manto de los linfocitos, pero después penetran en la pulpa roja.
2. Pulpa roja: atravesada por numerosos sinusoides vasculares de pared delgada, separados por los cordones esplénicos (cordones de Billroth), el revestimiento endotelial de los sinusoides es discontinuo y

permite que las células sanguíneas pasen a través de los sinusoides y cordones, los cuales están formados por un laberinto de macrófagos unidos por extensiones dendríticas, que crean un verdadero filtro.

3. Zona marginal: es una región transicional entre la pulpa roja y la blanca; contiene elementos linfocíticos y mononucleares.

El bazo, a semejanza de los ganglios linfáticos, presenta una cápsula colágena con trabéculas que se extienden hacia el interior del órgano. Esta cápsula se encuentra engrosada en el hilio, lugar por donde se insertan los ligamentos peritoneales y por el que penetran las arterias y nervios y salen las venas y los vasos linfáticos (figura 3.49).



**Figura 3.49** Estructura del bazo.

## Funciones del bazo

Las funciones de este órgano son:

1. Función de filtro del organismo:
  - a) El bazo filtra la sangre circulante a razón de 2 L/s. En esta función se describen 2 mecanismos importantes:
    - Culling: renovación selectiva de los eritrocitos anormales desde el punto de vista morfológico.
    - Pitting: remoción de inclusiones eritrocitarias (corpúsculos de Howell Jolly, cuerpos de Heinz, inclusiones sideróticas) sin destruir la célula que la contiene.
2. Función hematopoyética: sitio de hematopoyesis durante la vida fetal.
3. Función inmunológica: debido a la presencia de macrófagos y linfocitos en este órgano. Los macrófagos eliminan las partículas antigénicas de la sangre y la presencia de linfocitos facilita la iniciación y amplificación de la respuesta inmune.
4. Reservorio: para eritrocitos, plaquetas y leucocitos.

## Causas de esplenomegalia

Las causas de la esplenomegalia son:

1. Infecciones:
  - a) Virus: hepatitis, virus de Epstein-Barr, citomegalovirus, VIH.
  - b) Bacterias: endocarditis, brucelosis, tuberculosis, sífilis, abscesos.
  - c) Parásitos: toxoplasmosis, paludismo, esquistosomiasis.
  - d) Hongos: histoplasma, *Candida*.
2. Congestivas:
  - a) Hepatopatías: cirrosis hepática, enfermedad de Wilson, atresia de vías biliares, hemocromatosis.
  - b) Obstrucción vascular: trombosis de las venas porta, esplénica y suprahepática.
  - c) Insuficiencia cardíaca congestiva.
3. TumORAles:
  - a) Hematológicas:
    - Síndromes mieloproliferativos crónicos, síndromes linfoproliferativos, histiocitosis maligna.
  - b) No hematológicas:
    - Fibrosarcomas, teratomas, metástasis epiteliales, quistes, angiosarcomas, leiomiomas.
4. Anemias hemolíticas: esferocitosis, talasemias, hemoglobinopatías.

## 5. Inmunes:

- a) Enfermedad del suero.
- b) LES, fiebre reumática.
- c) Síndrome de Felty.

## 6. Enfermedades de depósito:

- a) Gaucher.
- b) Nieman-Pick.

## HIPERESPLENISMO

En el hiperesplenismo, la esplenomegalia se acompaña de citopenia en sangre periférica (anemia, leucopenia o trombocitopenia, o combinadas). La actividad de la médula es normal (integridad de los sistemas) y se logran corregir las anomalías hematológicas por la esplenectomía.

Cualquier enfermedad de las mencionadas puede producirla, pero la esplenomegalia no siempre se acompaña de hiperesplenismo.

## CONDUCTA QUE SE DEBE SEGUIR ANTE UN PACIENTE CON SÍNDROME ADENOSPLÉNICO

Si la esplenomegalia se acompaña de adenopatías la conducta que se debe seguir para realizar el diagnóstico es igual a la referida en el síndrome adénico. Si el aumento del bazo es un hallazgo aislado se realizará:

1. Historia clínica detallada para conocer: elementos epidemiológicos que ayuden en el diagnóstico de los procesos infecciosos.
2. Historia familiar de anemias hemolíticas congénitas o trastornos metabólicos congénitos.
3. Síntomas acompañantes: pérdida de peso, fiebre, astenia, artralgias, manifestaciones cardiovasculares y otros.
4. Hemograma: es de gran utilidad porque permite una orientación diagnóstica en la mayoría de los casos, por ejemplo, la presencia de linfocitos reactivos en periferia con el resto de las series normales; se relaciona con procesos infecciosos virales y más del 10 % de las células linfomonocitarias se encuentran en los síndromes mononucleósidos. Los síndromes linfoproliferativos y mieloproliferativos modifican el hemograma normal. Se observarán citopenias si existe hiperesplenismo y patrón

hemolítico con alteraciones eritroides específicas en las anemias hemolíticas.

5. Pruebas funcionales hepáticas: para descartar hepatopatías.
6. Rayos X de tórax: para definir lesiones pulmonares y mediastinales.
7. Ultrasonido y TAC abdominal: se utiliza en la búsqueda de masas ocultas, que pueden presentarse en las enfermedades malignas.
8. Gammagrafía con coloide marcado con tecnecio: permite identificar el bazo y detectar la existencia de una afección intraesplénica.
9. Resonancia magnética nuclear: aporta datos similares a la TAC y también define los patrones de flujo sanguíneo. Útil en la detección de trombosis venosa portal o esplénica.
10. Biopsia de médula: descarta procesos linfoides malignos, enfermedades de depósito, la existencia de hiperesplenismo.
11. Estudio de anemia hemolítica: se realiza cuando los antecedentes, cuadro clínico y alteraciones en el hemograma lo sugieran.

## BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- Álvarez C, Marrero G, Montalvo L, Pernas N, Medina E. La biopsia por aspiración con aguja fina en el diagnóstico de las adenopatías. *Acta Méd* 1989;3(1):187-193.
- Bick R L. *Hematology: clinical and laboratory practice*. St. Louis: Mosby, 1993.
- Carnot J, Muñio J, De Castro R, Travieso J, Rodríguez I, Torres W. La enfermedad de Hodgkin: Aspectos clínicos biológicos y terapéuticos (Revisión). *Acta Méd Hospital* 1989;3(1):96-135.
- Farreras-Rozman. *Medicina Interna*. 13 ed. España: Mosby Doyma Libros, 1995.
- Fischbach FT. *A Manual of Laboratory & Diagnostic Test*. 4 ed. Philadelphia: J.B. Lippincott Co., 1988.
- Hoffman R. *Hematology basic: principles and practice*. 2 ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1995.
- López Borrascas A. *Enciclopedia iberoamericana de hematología*. España: Universidad de Salamanca, 1992.
- Robbins. *Patología Estructural y Funcional*. 6 ed. España: McGraw-Hill, 2000.
- Tortajada JF, Castell JG, Barberá Domingo MP, López Andreu JA, Guillén FE, Gisbert Aguilar FJ. Semiología de las adenopatías en pediatría. *Revista Española de Pediatría* 1998;54(4):277-87.
- Williams WJ. *Hematology*. 5 ed. New York: McGraw-Hill, 1995.
- Wintrobe MM. *Clinical haematology*, 10 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1998.

## CONTENIDO

---

### **Leucemias agudas/ 281**

- Patogenia de las leucemias agudas/ 281
- Manifestaciones clínicas de las leucemias agudas/ 282
- Clasificación de las leucemias linfoides agudas según los criterios del grupo cooperativo Franco-Americano-Británico/ 282
- Clasificación de las leucemias mieloides agudas según los criterios del grupo cooperativo Franco-Americano-Británico/ 283
- Clasificación de las leucemias agudas según la Organización Mundial de la Salud/ 284
- Diagnóstico de las leucemias/ 284

### **Síndromes dismielopoyéticos/ 288**

- Clasificación de los síndromes dismielopoyéticos según los criterios del grupo cooperativo Franco-Americano-Británico/ 288
- Clasificación de los síndromes dismielopoyéticos según la Organización Mundial de la Salud/ 288
- Manifestaciones clínicas de los síndromes dismielopoyéticos/ 288
- Diagnóstico de los síndromes dismielopoyéticos/ 289
- Factores pronósticos de los síndromes dismielopoyéticos/ 290

### **Síndromes mieloproliferativos crónicos/ 291**

- Clasificación de los síndromes mieloproliferativos crónicos/ 291
- Leucemia mieloide crónica/ 291
- Policitemia vera/ 293
- Mielofibrosis/ 295
- Trombocitemia esencial/ 297

### **Síndromes linfoproliferativos/ 298**

- Clasificación de los síndromes linfoproliferativos según la REAL/ 298
- Patogenia de los síndromes linfoproliferativos/ 299
- Manifestaciones clínicas de los síndromes linfoproliferativos/ 299
- Diagnóstico de los síndromes linfoproliferativos/ 299

### **Discrasias de las células plasmáticas/ 301**

- Clasificación de los trastornos proliferativos de las células plasmáticas/ 301
- Mieloma múltiple/ 302
- Variantes del mieloma múltiple/ 305
- Macroglobulinemia de Waldeström/ 305

### **Bibliografía recomendada/ 306**

### Capítulo 26



## ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS DE LOS TEJIDOS HEMATOPOYÉTICOS

*Dra. Tania I. Carballo Treto  
Dr. Ariel de J. Colina Rodríguez*

### RESUMEN

En las neoplasias del tejido hematopoyético se incluye un conjunto de hemopatías de naturaleza clonal, cuya transformación maligna constituye un proceso multipasos de daños en el ADN. Como causas, se refieren factores genéticos, infecciosos (virus), físicos y químicos. Las manifestaciones clínicas están relacionadas con el grado de afectación de las 3 líneas hematopoyéticas: la invasión de estructuras extramedulares (ganglios, hígado, bazo) y de órganos no hematopoyéticos. Se clasifican según criterios de grupos expertos, los cuales han tenido en cuenta criterios morfológicos, citoquímicos, inmunológicos, y los avances en la citogenética y la biología molecular, lo que ha permitido un diagnóstico preciso y el establecimiento de factores pronósticos en cada afección.

### LEUCEMIAS AGUDAS

Las leucemias constituyen una proliferación neoplásica clonal de las células hematopoyéticas, las cuales invaden la médula ósea, la sangre periférica y, en ocasiones, los sitios extramedulares. Esta proliferación incontrolada desplaza la hematopoyesis normal, lo que trae como consecuencia la disminución de las células maduras (eritrocitos, leucocitos y plaquetas). De manera general se diagnostican, aproximadamente, de 3 a 6 casos por cada 100 000 habitantes al año. La leucemia linfoide es más frecuente en niños y la mieloide es más frecuente en adultos, y aumenta su incidencia con la edad. No hay diferencias en relación con el sexo, la raza o con el área geográfica.

### PATOGENIA DE LAS LEUCEMIAS AGUDAS

Los agentes que ocasionan la transformación leucémica no se conocen, pero se invocan algunos factores que predisponen su aparición:

1. Factores genéticos: existe mayor incidencia en los hermanos gemelos univitelinos de pacientes con

leucemias agudas, en pacientes con enfermedades congénitas donde existen alteraciones cromosómicas como la anemia de Fanconi, el síndrome de Down y el síndrome de Wiskott-Aldrich.

2. Agentes físicos: radiaciones ionizantes por exposición accidental o terapéutica.
3. Agentes químicos: derivados del benceno, agentes alquilantes o nitrosureas.
4. Virus: se ha correlacionado el virus del Epstein-Barr con leucemias linfoides.

La transformación leucémica se origina por un daño en el ADN de las células. Mediante múltiples investigaciones se han podido conocer muchas de las alteraciones citogenéticas y moleculares que se presentan en esta enfermedad, y entre las más frecuentes están las translocaciones cromosómicas, las cuales alteran las funciones de genes celulares normales que realizan importantes funciones relacionadas con el crecimiento y la diferenciación de las células. Se ha planteado que la transformación maligna es un proceso multipasos en el que la lesión citogenética requiere la coincidencia de

varias alteraciones adicionales para que se produzca el clon leucémico. Este clon tiene una ventaja de crecimiento, y suprime la hematopoyesis normal, lo que explica las manifestaciones características de esta afección.

## MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LAS LEUCEMIAS AGUDAS

El comienzo de la enfermedad es abrupto y las manifestaciones, debido a la infiltración medular con caída de los sistemas hematopoyéticos, se instauran muy rápido. Los síntomas dependientes de la anemia varían con los niveles de hemoglobina, la edad del paciente y la enfermedad de base. Las infecciones se presentan del 30 al 50 % de los casos, localizadas en orofaringe, piel, pulmones y en formas de bacteriemias. Los gérmenes más comunes son los grampositivos, seguidos por los gramnegativos y los hongos.

Las hemorragias más frecuentes son las púrpuras cutáneas y los sangrados mucosos:

1. Manifestaciones extramedulares: ocurren con mayor frecuencia en las leucemias linfoides, en las que del 30 al 40 % tienen hepatoesplenomegalia y el 50 %, adenopatías; mientras que en las leucemias mieloides, la afectación es poco frecuente (10 %).
2. Manifestaciones por infiltración del sistema nervioso: pueden presentar signos de hipertensión endocraneana, signos meníngeos o parálisis de los nervios craneales (5 % de los pacientes).
3. Infiltración de piel en forma de nódulos rosados o violáceos e hipertrofia gingival: se observa con fre-

cuencia en las leucemias mieloides agudas [LMA ( $M_4$  ó  $M_5$ )].

4. En ocasiones se presentan masas tumorales de estirpe mieloide, en diferentes localizaciones, llamadas cloromas.
5. Rara vez, la infiltración difusa de órganos (corazón, riñón, serosas) provoca signos o síntomas importantes con afectación de sus funciones.
6. Dolores óseos: en el 40 % de los pacientes con leucemias linfoides agudas (LLA) y en el 25 % de los pacientes con LMA, por expansión del espacio intramedular o por invasión del periostio.
7. Síndrome de lisis tumoral: se observa en los pacientes que tienen recuentos de blastos mayores de  $100 \times 10^9/L$ , y existe un aumento de la viscosidad, lo que dificulta la circulación sanguínea. Se caracteriza por rápido desarrollo de hiperuricemia, hiperpotasemia, hiperfosfatemia e hipocalcemia. Los órganos más afectados son el sistema nervioso central, los pulmones y los riñones.
8. Coagulación intravascular diseminada: frecuente en la LMA promielocítica.

## CLASIFICACIÓN DE LAS LEUCEMIAS LINFOIDES AGUDAS SEGÚN LOS CRITERIOS DEL GRUPO COOPERATIVO FRANCO-AMERICANO-BRITÁNICO

En la tabla 3.22 se resume la clasificación de las leucemias linfoides agudas. En las figuras 3.50 y 3.51 del anexo puede verse la leucemia linfoide aguda  $L_2$ .

**Tabla 3.22** Clasificación de las leucemias linfoides agudas según los criterios del grupo cooperativo Franco-Americano-Británico

Característica	$L_1$	$L_2$	$L_3$
Tamaño celular	Predominan las células pequeñas	Células heterogéneas en tamaño	Células grandes homogéneas
Cromatina	Homogénea	Variable, heterogénea	Homogénea, punteado fino
Forma nuclear	Regular, ocasional hendidura o indentación	Irregular, hendidura e indentación común	Regular, oval o redonda
Nucléolo	No visible	Uno o más, a menudo grandes	Prominente (uno o más)
Citoplasma	Escaso	Variable	Moderadamente abundante
Basofilia citoplasmática	Ligera	Variable, a veces intensa	Muy intensa
Vacuolización citoplasmática	Variable	Variable	Prominente

## CLASIFICACIÓN DE LAS LEUCEMIAS MIELOIDES AGUDAS SEGÚN LOS CRITERIOS DEL GRUPO COOPERATIVO FRANCO-AMERICANO-BRITÁNICO

Según los criterios del grupo cooperativo Franco-Americano-Británico (FAB), las LMA se clasifican en:

1. LMA ( $M_0$ ): LMA mínimamente diferenciada.
2. LMA ( $M_1$ ): LMA sin maduración.
3. LMA ( $M_2$ ): LMA con maduración.
4. LMA ( $M_3$ ): leucemia promielocítica aguda (LPA).
5. LMA ( $M_4$ ): leucemia mielomonocítica aguda.
6. LMA ( $M_5$ ): leucemia monocítica aguda.
  - a)  $M_{5a}$ .
  - b)  $M_{5b}$ .
7. LMA ( $M_6$ ): eritroleucemia.
8. LMA ( $M_7$ ): leucemia megacariocítica aguda.

**LMA ( $M_0$ ).** Representa el 3 % de las LMA.

El diagnóstico no puede realizarse por morfología y citoquímica debido a la inmadurez de los blastos, los cuales son grandes, con cromatina abierta, nucléolos visibles, citoplasma agranular y sin bastones de Auer. Menos del 3 % de las células son mieloperoxidasa y Sudán positivos.

Se necesita el inmunotipaje, con el que más del 20 % de las células expresan antígenos mieloides (CD13, CD14, CD33).

Mediante la citoquímica ultraestructural o el uso de anticuerpos monoclonales se demuestra la positividad de la mieloperoxidasa. Con frecuencia, las LMA presentan cariotipo complejo.

**LMA ( $M_1$ ).** Representa del 15 al 20 % de los casos de LMA. Más del 90 % de las células son mieloblastos sin evidencia de maduración. Al menos el 3 % de los blastos son mieloperoxidasa y Sudán positivos. Los blastos expresan antígenos mieloides (CD13, CD14, CD33).

Debe ser distinguida de LLA ( $L_2$ ), LMA ( $M_{5a}$ ) y LMA ( $M_7$ ).

**LMA ( $M_2$ ).** Representa del 25 al 30 % de las LMA.

Se observa mayor maduración granulopoyética. Los mieloblastos tienen gránulos azurófilos y pueden presentar bastones de Auer (1 por célula). Los promielocitos constituyen del 3 al 20 % de las células de esta serie (figura 3.52 del anexo).

El componente monocítico representa menos del 20 % de las células no eritroides.

Casi la mitad de los pacientes presentan la translocación: t(8; 21)(q22; q22).

**LMA ( $M_3$ ).** Representa el 10 % de los pacientes con LMA.

Posee las características siguientes:

1. Pacientes jóvenes.
2. La mayoría presenta la translocación recíproca t(15; 17)(q22; q21).
3. Cuadro de coagulación intravascular diseminada al diagnóstico.
4. Morfología característica dada por los promielocitos patológicos.

Existen 2 variantes:

- a) Hipergranular (80 %): los promielocitos (constituyen más del 30 % de las células mieloides) tienen gránulos prominentes, que pueden oscurecer el núcleo y bastones de Auer abundantes. Existe leucopenia.
- b) Microgranular (20 %): los promielocitos tienen un núcleo irregular plegado o bilobulado semejante al precursor monocítico y un citoplasma con gránulos muy pequeños para ser reconocidos por el microscopio de luz. Se necesita microscopía electrónica o coloraciones citoquímicas para su identificación. Bastones de Auer aislados. Existe leucocitosis ( $50-200 \times 10^9/L$ ) (figuras 3.53 y 3.54 del anexo).

**LMA( $M_4$ ).** Combinación de blastos mieloides y células monocíticas tumorales. Es característica la toma extramedular. Similar a la LMA( $M_2$ ) desde el punto de vista morfológico, excepto que existe monocitosis mayor del 20 % en periferia, médula o ambos (figura 3.55 del anexo).

**LMA ( $M_4$  con eosinofilia).** Se presenta en 1/3 de los pacientes con LMA ( $M_4$ ), tienen precursores eosinófilos con morfología anormal: núcleo monocitoide y mezcla de gránulos eosinófilos y basófilos. Desde el punto de vista clínico, la edad de presentación es de 40 a 45 años. Existe organomegalia e hiperleucocitosis. En el estudio citogenético se encuentra inversión del cromosoma 16.

**LMA ( $M_5$ ).** Representa del 2 al 9 % de los casos. Se caracteriza por leucocitosis, toma extramedular, lisozima elevada en sangre y orina, y los pacientes pueden presentar cuadros de CID. Se subdivide en  $M_{5a}$  y  $M_{5b}$ :

1.  $M_{5a}$ : pobremente diferenciada, más del 80 % son monoblastos grandes con citoplasma basofílico, a veces vacuolado. Los pacientes son jóvenes, presentan leucocitosis al diagnóstico y tienen un peor pronóstico.
2.  $M_{5b}$ : bien diferenciada, el 80 % de las células son promonocitos y monocitos (figura 3.56 del anexo).



**LMA (M<sub>6</sub>).** Representa entre el 3 y el 5 % de los casos.

Las características morfológicas son: más del 50 % de los eritroblastos en médula junto al 30 % o más de blastos mieloides (blastos tipo I más blastos tipo II). Los eritroblastos tienen gran tamaño, con núcleos multilobulados o fragmentados, y vacuolización citoplasmática.

Las características clínicas y de laboratorio son: pacientes de 50 años o más, con frecuentes dolores óseos, pueden presentar hipergammaglobulinemia, factor reumatoideo (+), anticuerpos antinucleares (+) y prueba de Coombs (+) (figura 3.57 del anexo).

**LMA (M<sub>7</sub>).** Representa entre el 3 y el 12 % de los casos.

Desde el punto de vista morfológico se confunde con la LLA (L<sub>2</sub>) y con la LMA (M<sub>1</sub>).

El diagnóstico depende de la expresión de antígenos plaquetarios CD41, CD42<sub>b</sub>, CD61, o antígenos relacionados con el factor VIII sobre las células leucémicas. Los megacarioblastos son heterogéneos y varían desde células redondas pequeñas hasta células grandes con proyecciones citoplasmáticas y vacuolas, pueden estar rodeados de plaquetas. En sangre periférica, el recuento de plaquetas es variable y pueden observarse fragmentos de megacariocitos.

## CLASIFICACIÓN DE LAS LEUCEMIAS AGUDAS SEGÚN LA ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD

Según la Organización Mundial de la Salud, las LMA se clasifican en:

1. LMA con translocaciones citogenéticas recurrentes:
  - a) LMA con t (8; 21) (q22; q22).
  - b) LPA aguda con t (15; 17) (q22; q21).
  - c) Variante de LPA aguda con t (v; 17).
  - d) LMA con eosinófilos anormales en médula ósea, inv (16) (p13; q22) o t (16; 16) (p13; q22).
  - e) LMA con anomalía 11q23.
2. LMA con displasia multilineal.
  - a) Con síndrome mielodisplástico previo.
  - b) Sin síndrome mielodisplástico previo.
3. LMA y síndrome mielodisplástico relacionado con terapia:
  - a) Agentes alquilantes.
  - b) Inhibidor de la topoisomerasa II.
  - c) Otros tipos.
4. LMA no categorizada de otro modo:
  - a) LMA mínimamente diferenciada.
  - b) LMA sin maduración.

- c) LMA con maduración.
- d) Leucemia mielomonocítica aguda.
- e) Leucemia monocítica aguda.
- f) Leucemia eritroide aguda.
- g) Leucemia megacariocítica aguda.
- h) Leucemia basofílica aguda.
- i) Panmielosis aguda con mielofibrosis.

### 5. LMA inclasificable.

Según la Organización Mundial de la Salud, las leucemias linfoides agudas se clasifican en:

1. LLA de precursores de células B (subgrupos citogenéticos):
  - a) t (9;22) (q34; q11).
  - b) t (v;11) (v; 23).
  - c) t (1;19) (q23; p13).
  - d) t (12;21) (p12; q22).
2. LLA de precursores de células T:
  - a) Leucemia de células de Burkitt.

## DIAGNÓSTICO DE LAS LEUCEMIAS

El diagnóstico de las leucemias indica:

1. Hemograma: anemia normocítica-normocrómica menor que 11 g/dL en la mayoría de los pacientes. Por lo general hay trombocitopenia menor que  $50 \times 10^9/L$  y, con frecuencia menor que  $20 \times 10^9/L$ . El recuento de leucocitos es variable, más de la mitad de los casos tienen leucocitosis, lo cual constituye un índice de mal pronóstico; otros presentan cifras normales o inferiores a  $5 \times 10^9/L$  y en el diferencial aparecen blastos. En ocasiones no se detectan blastos en periferia, a pesar de la intensa infiltración medular, lo que se denomina leucemia aleucémica.
2. Medulograma: es hiper celular por la infiltración tumoral, con depresión de las líneas hematopoyéticas. El diagnóstico se establece por el recuento de blastos mayor que el 30 % (blastos tipo I + blastos tipo II). En la LMA (M<sub>7</sub>) no se obtiene material medular en el aspirado (aspiración blanca), debido a la fibrosis medular.
3. Biopsia de médula: confirma el diagnóstico realizado en el medulograma y es muy útil cuando el aspirado medular ha sido escaso o nulo.
4. Coagulograma: trombocitopenia. Alteraciones características de la CID en la LMA (M<sub>3</sub>) y en ocasiones en la LMA (M<sub>5</sub>).
5. Estudios bioquímicos:
  - a) LDH: aumentada.
  - b) Ácido úrico: aumentado.
  - c) Potasio, magnesio y calcio: disminuidos.

6. Coloraciones citoquímicas: son reacciones que utilizan reactivos químicos para detectar y localizar, de manera topográfica, determinadas sustancias enzimáticas y no enzimáticas. Tienen gran utilidad en el diagnóstico y clasificación de las leucemias. Esta técnica consta de 3 pasos consecutivos:
  - a) Fijación: preserva las estructuras celulares.
  - b) Incubación: se ponen en contacto las células con el medio de reacción, lo que provoca un precipitado en el lugar de la reacción.
  - c) Contraste: resalta el producto de la reacción.

La citoquímica se realiza sobre las muestras extendidas de la médula ósea, pues en ella existe mayor representación de la población tumoral, pero puede utilizarse la periferia si el recuento de blastos es elevado.

A continuación se explica el fundamento de las principales técnicas utilizadas y su comportamiento en las leucemias agudas:

1. Reacción de la mieloperoxidasa: la demostración citoquímica de esta enzima se basa en la acción oxidante de la peroxidasa sobre un sustrato, en presencia de peróxido de hidrógeno: aparece un precipitado en el citoplasma, en el lugar de la reacción. Se localiza, sobre todo, en los gránulos primarios de los neutrófilos y precursores, así como en los gránulos de los eosinófilos y monocitos (figura 3.58 del anexo).
2. Negro Sudán: es una coloración no enzimática. Tiñe los fosfolípidos y otros lípidos, colorea los gránulos azurófilos y específicos de los granulocitos, y tiene la ventaja de que con el tiempo no disminuye la actividad (figura 3.59 del anexo).
3. Reacción del ácido peryódico de Schiff (PAS): la reacción se basa en la acción oxidante del peryódico sobre los carbohidratos: se liberan grupos aldehídos que al combinarse con el Schiff provocan una coloración roja o rosada intensa. Su utilidad está limitada a las LLA ( $L_1$ ) con positividad en mazacote sobre fondo claro. En la LMA ( $M_4E_0$ ), los gránulos de los eosinófilos, a diferencia de los normales, son positivos, y en la LMA ( $M_7$ ) la reacción es positiva con gránulos gruesos en la periferia de las células tumorales. En el resto de las leucemias su comportamiento es variable (figura 3.60 del anexo).
4. Esterasas: son enzimas lisosomales presentes en cantidades variables en muchas células sanguíneas. Ellas hidrolizan ésteres orgánicos, y liberan el alcohol (naftol), el cual se acopla a una sal de diazonio para formar un azocolorante que se deposita sobre el sitio de actividad enzimática o cerca de este. Las esterazas específicas (cloroacetato esterasa o CAE) usan el sustrato naftol AS-D cloroacetato, y

su actividad se atribuye a las isoenzimas 1, 2, 7 y 8. Las esterazas inespecíficas representan las isoenzimas 3, 4, 5 y 6, y pueden usar varios sustratos: naftol AS-D acetato, alfa naftil acetato y alfa naftil butirato. El fluoruro de sodio es un potente inhibidor de las esterazas monocíticas.

5. Fosfatasa ácida: enzima hidrolítica que actúa sobre ésteres del ácido fosfórico a un pH entre 4,7 y 5,5. Ubicación: lisosómica  
Fundamento: provoca hidrólisis del sustrato naftol-AS-Bi-fosfato, y libera productos que al combinarse con una sal diazoica dan un precipitado rojo-naranja en el citoplasma. Se utiliza para demostrar la isoenzima 5 en el tricoleucito, el cual es tartrato resistente.
6. Muramidasa: enzima hidrolítica. Es una aminopolisacaridasa que degrada la pared celular y causa la lisis de bacterias sensibles.  
Utilidad: en el diagnóstico de las leucemias monocíticas, en las que aumenta su valor de manera considerable.  
La citoquímica de las leucemias agudas aparece en las tablas 3.23 y 3.24.
7. Inmunotipaje: para la definición de línea en las leucemias agudas se debe utilizar un panel de marcadores donde se enfrenten anticuerpos con sus antígenos. El objetivo es identificar la línea celular implicada: mielóide o linfóide:
  - a) Clasificación inmunológica de las leucemias linfoblásticas agudas (LLA) (tabla 3.25).
  - b) Clasificación inmunológica de las leucemias mieloides agudas:
    - No existe una clasificación aceptada del todo, y el inmunotipaje no tiene un papel relevante en estas leucemias, pues existen marcadores citogenéticos eficaces. A continuación se exponen algunos de los marcadores inmunológicos utilizados:
      - CD 33, CD 13, CD 14, CD 15: se coexpresan en los precursores mieloides.
      - CD 61, CD 41, CD 42<sub>b</sub>: importantes en el diagnóstico de la LMA( $M_7$ )
      - Glicoforina A: importante en el diagnóstico de LMA ( $M_6$ ).
      - CD 34: se expresa entre el 40 y el 60 % de los casos de LMA.
8. Alteraciones citogenéticas y moleculares: con el desarrollo de técnicas novedosas, hoy se conocen numerosas alteraciones cromosómicas y anomalías moleculares que se presentan en las leucemias (tabla 3.26).

**Tabla 3.23** Citoquímica de las leucemias mieloides agudas

Citoquímica	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>	M <sub>6</sub>	M <sub>7</sub>
Peroxidasa	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Débil positivo	Positivo	Negativo
Negro Sudán	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Débil positivo	Positivo	Negativo
Ácido peryódico de Schiff (PAS)	Débil positivo	Débil positivo	Positivo	Positivo	Débil positivo	Positivo	Débil positivo
Cloroacetato esterasa específica (CAE)	Débil positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Naftol-AS-D-acetato esterasa (NASDA)	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Alfa naftil acetato esterasa (ANAE)	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Alfa naftil butirato esterasa (ANBE)	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
Muramidasa	Variable	Variable	Variable	Elevada	Elevada	Variable	Negativo
Fosfatasa ácida	Débil positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo

**Tabla 3.24** Citoquímica de las leucemias linfoides agudas

Citoquímica	B	T
Peroxidasa	Negativo	Negativo
Negro Sudán	Negativo	Negativo
Ácido peryódico de Schiff (PAS)	Positivo	Débil positivo
Fosfatasa ácida	Negativo	Positivo (focal)
Naftol-AS-D-acetato esterasa (NASDA)	Débil positivo o débil negativo	Positivo
NASDA + fluoruro	No se inhibe	No se inhibe
Alfa naftil butirato esterasa (ANBE)	Negativo	Positivo
Alfa naftil acetato esterasa (ANAE)	Negativo	Positivo

**Tabla 3.25** Clasificación inmunológica de las leucemias linfoblásticas agudas (tomado de: Hernández JM, Almeida J, García R, San Miguel JF. Aplicación de las investigaciones y de la genética molecular al estudio de las leucemias. En: Leucemias. Progresos biológicos y Terapéuticos. Valencia: You & Us, 1999.)

LLA-B [expresión de CD79 $\alpha$ y/o CD22 citoplasmáticos (cy) y/o CD19]	
B I (Pro-B)	CD19+ y/o CD79a+ y/o CD22+
B II (común)	CD10- y cyIg- y slg-
B III (pre-B)	CD10+ y cyIg- y slg-
B IV (B madura)	cyIg m+ y slg+
LLA-T (expresión de CD3 citoplasmático/membrana)	
T I (pro T)	CD7+
T II (pre T)	CD2+ y/o CD5+ y/o CD8+
T III (cortical)	CD1a+
T IV (T madura)	CD1a- y CD3 de membrana+

**Leyenda**

cyIg: inmunoglobulina citoplasmática.

slg: inmunoglobulina de superficie.

**Tabla 3.26** Alteraciones citogenéticas y moleculares en las leucemias

Tipo de leucemia	Alteración citogenética	Anomalia molecular
LMA (M <sub>2</sub> )	t(8;21)(q22;q22)	AML1-ETO
LMA (M <sub>4</sub> E <sub>0</sub> )	Inv(16)(p13;q22)	CBFb-MYH11X
LMA (M <sub>3</sub> )	t(15;17)(q22;q21)	PML-RARa
LMA (M <sub>2</sub> y M <sub>4</sub> )	t(6;9)(p23;q34)	DEK-CAN
LMA (M <sub>5</sub> )	t(9;11)(p22;q23)	MLL-AF9
M <sub>1</sub> , M <sub>2</sub> bifenotípicas	t(9;22)(q34;q11)	BCR-ABL
LMA M <sub>3</sub>	t(11;17)(q23;q21)	PLZF-RARa
LMA M <sub>7</sub>	t(1;22)(p13;q13)	-
LMA M <sub>6</sub>	t(3;5)(q25;q34)	MPM-MLF1
LLA-B	t(12;21)(p12;q22) t(9;22)(34;q11) t(8;14)(p24;q32) t(2;8)(p12;q24) t(8;22)(q24;q11)	AML1-TEL BCR-ABL (p190) MYC-IgH IgK-MYC MYC-IgL
LLA-T	t(1;14)(p34;q11) t(11;14)(p15;q11) t(7;9)(q35;q34)	TAL1-TCRa RHOM2-TCRd TCRB- TAL2

## SÍNDROMES DISMIELOPOYÉTICOS

Los síndromes dismielopoéticos (SDMP), también conocidos como síndromes mielodisplásticos o preleucemias, conforman un grupo heterogéneo de trastornos hematológicos de naturaleza clonal, que tienen como característica fundamental una diferenciación celular ineficaz, lo que trae como consecuencia citopenias en sangre periférica con una médula ósea hiper celular, con cambios displásticos en la mayoría de los casos.

Estos síndromes pueden ser de causa primaria o secundaria (tratamiento citostático o radioterapia) y se presentan casi siempre en adultos mayores de 60 años.

### CLASIFICACIÓN DE LOS SÍNDROMES DISMIELOPOYÉTICOS SEGÚN LOS CRITERIOS DEL GRUPO COOPERATIVO FRANCO-AMERICANO-BRITÁNICO

En 1982, el grupo cooperativo Franco-Americano-Británico (FAB) clasificó las alteraciones de la hematopoyesis en 5 grupos (tabla 3.27).

### CLASIFICACIÓN DE LOS SÍNDROMES DISMIELOPOYÉTICOS, SEGÚN LA ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD

Los avances en la inmunología, la biología molecular y la citogenética promovieron la necesidad de redefinir

y clasificar los trastornos hematológicos malignos. Es por esto que, en 1995, la Organización Mundial de la Salud asignó a la Sociedad de Hemopatología y a la Asociación Europea para la Hemopatología crear una nueva clasificación de los síndromes dismielopoéticos, la cual se presenta a continuación:

1. Anemia refractaria (AR):
  - a) Con sideroblastos anillados.
  - b) Sin sideroblastos anillados.
2. Citopenia refractaria (síndrome mielodisplástico) con displasia multilineal.
3. Anemia refractaria (síndrome mielodisplástico) con exceso de blastos.
4. Síndrome 5q-.
5. Síndrome mielodisplástico inclasificable.
6. Síndromes mielodisplásticos/síndromes mieloproliferativos:
  - a) Leucemia mielomonocítica crónica.
  - b) Leucemia mielóide crónica atípica.
  - c) Leucemia mielomonocítica juvenil.

### MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LOS SÍNDROMES DISMIELOPOYÉTICOS

Las principales manifestaciones de los síndromes dismielopoéticos (SDMP), en su comienzo, están relacionadas con las citopenias periféricas. Muchos pacientes pueden parecer asintomáticos al diagnóstico. El síndrome anémico es el primero en presentarse, con sus síntomas característicos de fatiga, intolerancia al ejercicio físico, angina, pérdida del bienestar y, de manera excepcional, disnea. Una proporción menor de pacientes (alrededor de 1/3) tiene infecciones debido a la granulocitopenia o, por defecto, en la función de los

**Tabla 3.27** Clasificación FAB de los síndromes dismielopoéticos

Variantes	Sangre periférica (% de blastos)	Médula ósea (% de blastos)	Sideroblastos anillados (%)
Anemia refractaria (AR)	$\leq 1$	$< 5$	$< 15$
Anemia refractaria con sideroblastos anillados (ARSA)	$\leq 1$	$< 5$	$> 15$
Anemia refractaria con exceso de blastos (AREB)	$< 5$	5-20	$< 15$
AREB en transformación (AREB-t)	$\geq 5$	20-30	$< 15$
Leucemia mielomonocítica crónica (LMMC) con monocitosis absoluta ( $> 1 \times 10^9/L$ ) en S/P	$< 5$	5-20	$< 15$

neutrófilos; y los signos de sangrados son menos comunes por las petequias, el sangrado gingival o los hematomas por traumas leves. Menos del 10 % de los pacientes tienen sangrados más severos de órganos. Otras manifestaciones que pueden presentarse en ellos son episodios de oligoartritis o poliartritis.

Las complicaciones que los pueden llevar a la muerte son las infecciones y las hemorragias, las cuales pueden deberse a la propia falla medular o a una transformación leucémica.

## DIAGNÓSTICO DE LOS SÍNDROMES DISMIELOPOYÉTICOS

El diagnóstico de los síndromes dismielopoyéticos indica:

1. Hemograma: se caracteriza por la presencia de citopenias (una o más). La mayoría de los pacientes presentan anemia macrocítica, que puede acompañarse de leucopenia y trombocitopenia. Las evidencias morfológicas de dismielopoyesis se observan en la tabla 3.28 y en la figura 3.61 del anexo.
2. Medulograma: médula por lo general hipercelular global, con cambios dismórficos en las 3 líneas hematopoyéticas (figuras 3.62 y 3.63 del anexo).
3. Biopsia de médula ósea: permite una mejor valoración de la celularidad (hipercelular en el 80 % de los casos e hipocelular del 7 al 19 %), así como del grado y tipo de fibrosis medular. Se observan los cambios dishematopoyéticos descritos en las 3 líneas celulares y un fenómeno denominado LAPI o ALIP (en inglés), que consiste en la localización anormal de los precursores inmaduros (mieloblastos y promielocitos), los cuales forman agregados en la parte central de la médula, lo que constituye un factor pronóstico adverso que afecta la supervivencia y se asocia con una transformación leucémica.
4. Citogenéticos: en los SDMP primarios, las anomalías del cariotipo se pueden demostrar del 50 al 70 % de los pacientes, entre las más frecuentes se encuentran:
  - a) Síndrome 5q-: ocurre, sobre todo, en mujeres de edad avanzada. Se caracteriza por delección del brazo largo del cromosoma 5, asociado con anemia macrocítica, recuento de plaquetas normal o aumentado, depresión del sistema eritroide, presencia de megacariocitos con núcleo no lobulado. Tiene una evolución ligera y la progresión a la leucemia es menos frecuente.

- b) Monosomía 7: es la anomalía más común en niños. Se asocia con trastornos de la quimiotaxis de granulocitos y monocitos con frecuentes infecciones.

- c) Otras: trisomía 8, isocromía 17q, delección de parte del cromosoma 12.

Las alteraciones cariotípicas en los SDM secundarios ocurren en el 90 % de los casos:

- Pérdida parcial o completa de los cromosomas 5 y 7.
- Delección del brazo corto del cromosoma 17, pérdida del cromosoma 18, anomalías de los cromosomas 12 y 21.

5. Biología molecular: se han encontrado mutaciones de la familia del gen ras: la mutación en el N-ras es de 2 a 3 veces más frecuente que las mutaciones en K-ras o H-ras, y consisten en mutaciones puntiformes en los codones 12, 13 y 61.

Mutaciones del gen fms: se observa aproximadamente del 20 al 30 % de los pacientes con LMMC, en otros con SDM se aprecia en alrededor del 10 % de los casos.

La t (6;9) (p23;q34) incluye dos genes: el gen DEK en la banda 6p23 y el gen CAN en la banda 9q34. Las mutaciones del antioncogen p53 se detectan con una frecuencia baja.

6. LDH: puede estar aumentada.

7. Cultivos celulares: el crecimiento se caracteriza por presentar 2 patrones:

- a) Patrón leucémico: crecimiento muy reducido de colonias, abundantes microagregadas o macroagregadas con maduración defectuosa.

- b) Patrón no leucémico: formación de colonias de manera persistente, aunque su presencia puede estar reducida.

En la anemia refractaria y en la anemia refractaria con sideroblastos anillados se observa un crecimiento normal de UFC-granulomonocitarias.

En las variantes AREB y AREB-t existe una disminución del número de colonias con predominio de agregados pequeños.

8. Estudios inmunológicos:

- a) Linfocitos B: disminución de receptores para el virus del Epstein-Barr.

- b) Linfocitos T: disminución de CD4+ y poca respuesta a mitógenos.

- c) Linfocitos NK: disminuidos con trastornos en su función (falla en la producción de interferón).

- d) Inmunoglobulinas: hipergammaglobulinemia o hipogammaglobulinemia, anticuerpos antieritrocitarios.

**Tabla 3.28** Criterios morfológicos de dismielopoyesis

Denominación	Sangre periférica	Médula ósea
Diseritropoyesis	Macroцитos Anisocitosis Poiquilocitosis Punteado basófilo Normoblastos Células fragmentadas	Cambios megaloblásticos Multinuclearidad Cariorexix Fragmentación nuclear Sideroblastos anillados Disociación en la maduración núcleo-citoplasmática Intensa basofilia citoplasmática Vacuolización
Disgranulopoyesis	Anomalías nucleares Neutropenia Seudo Pelger-Huet Hipogranulación o hipergranulación  Monocitos Núcleos en anillo Distribución irregular de la cromatina nuclear	Hipogranulación Granulaciones mixtas Anomalías nucleares Presencia de blastos con alteraciones nucleares o sin estas Vacuolización Fenómeno de LAPI en la BMO
Dismegacariopoyesis	Trombocitopenia Plaquetas gigantes Hipogranulación Hipergranulación Micromegas circulantes	Micromegacariocitos Megas pequeños con núcleos bilobulados Megas grandes y mononucleares Megacariocito agranular

## FACTORES PRONÓSTICOS DE LOS SÍNDROMES DISMIELOPOYÉTICOS

Para identificar a los pacientes que tienen un alto riesgo de transformación leucémica, varios grupos de investigadores han desarrollado sistemas basados en la

obtención de parámetros clínicos y hematológicos, entre ellos Bounemouth, Düsseldorf, Spanich, Greenberg y otros, cada uno con características propias.

En la tabla 3.29 se exponen algunos de los parámetros que se tienen en cuenta como factores pronósticos desfavorables.

**Tabla 3.29** Factores pronósticos en los síndromes dismielopoyéticos

Parámetros	Criterios de mal pronóstico
Categoría FAB	AREB, AREB-t, LMMC
Características clínicas	Edad avanzada, presencia de esplenomegalia
Sangre periférica	Hemoglobina < 100 g/L Neutrófilos < 2,5 x 10 <sup>9</sup> /L Plaquetas < 100 x 10 <sup>9</sup> /L
Medulograma y biopsia de médula ósea	Aumento del porcentaje de blastos y fenómeno de LAPI
Cariotipo	Anomalías de los cromosomas 7 y 5. Cariotipo complejo. Trisomía 8
Oncogenes	Presencia de la mutación N-ras
LDH	Aumentada
Variantes	Mielofibrosis SDMP secundarios

### Leyenda

AREB: anemia refractaria con exceso de blastos.

AREB-t: anemia refractaria con exceso de blastos en transformación.

LMMC: leucemia mielomonocítica crónica.

LDH: enzima láctico-deshidrogenada.

LAPI: localización anormal de los precursores inmaduros.

## SÍNDROMES MIELOPROLIFERATIVOS CRÓNICOS

Los síndromes mieloproliferativos crónicos (SMPC) constituyen un conjunto de hemopatías de naturaleza clonal, que afectan a la *stem cell* pluripotente y que están muy relacionadas. Presentan características comunes tanto clínicas como hematológicas.

Se denominan de acuerdo con la línea hematopoyética afectada de manera predominante, aunque existan evidencias de incremento del resto de las series en cada una de ellas. En ocasiones existe la transformación de una entidad en otra.

### CLASIFICACIÓN DE LOS SÍNDROMES MIELOPROLIFERATIVOS CRÓNICOS

A continuación se expone la clasificación de los síndromes mieloproliferativos crónicos:

1. Leucemia mieloide crónica Ph+, BCR+.
2. Leucemia neutrofilica crónica.
3. Leucemia eosinofílica crónica/síndrome hipereosinofílico.
4. Mielofibrosis idiopática crónica.
5. Policitemia vera.
6. Trombocitemia esencial.
7. Síndromes mieloproliferativos inclasificables.

### LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA

La leucemia mieloide crónica (LMC) es una de las enfermedades mejor definidas dentro del grupo de los síndromes mieloproliferativos crónicos. Se caracteriza por una proliferación granulocítica anormal e incontrolable en la médula ósea y otros tejidos hematopoyéticos extramedulares. Representa aproximadamente el 15 % de las leucemias del adulto y tienen su mayor incidencia entre la tercera y la sexta décadas de la vida.

#### Afección molecular

Las células hematopoyéticas de la mayoría de los individuos con LMC (95 %) contienen una translocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22, denominada t(9;22) (q34;q11).

En estos cromosomas están mapeados 2 oncogenes: el C-ABL en el cromosoma 9 y el C-SIS en el 22. Ambos se intercambian de manera recíproca, por translocación, y crean 2 genes nuevos: BCR-ABL sobre el cromosoma 22q- o Ph+ y el recíproco ABL-BCR en el cromosoma 9q+. El punto de ruptura sobre el cromosoma 22 puede variar. Esto ocurre, sobre

todo, en el sitio de mayor ruptura o M-BCR (*break point cluster region*), lo que da origen al gen quimérico, híbrido BCR-ABL. La transcripción de este gen produce una molécula de ARN mensajero quimérico BCR-ABL, que codifica la síntesis de una proteína con actividad tirosinquinasa anómala (p 210<sup>BCR-ABL</sup>). Esta proteína de 210 kDa es la responsable de la transformación maligna de las células hematopoyéticas.

El 5 % de los pacientes con LMC no presentan el cromosoma de Filadelfia. En la mitad de ellos es posible demostrar la existencia del reordenamiento BCR-ABL (Ph-; BCR-ABL+). Solo del 2 al 3 % son Ph-; BCR-ABL- y se denomina LMC atípica. Esto tiene un comportamiento clínico y un perfil hematológico diferente a los anteriores, con una supervivencia más corta.

#### Características clínicas y de laboratorio

En las LMC se pueden considerar 3 fases, aunque la historia de la enfermedad no sigue, de forma obligatoria, esta secuencia:

1. Fase crónica: existe un elevado incremento de granulocitos maduros y de precursores con predominio de mielocitos. Tiene una duración media de 3,5 años.
2. Fase acelerada: se considera cuando hay cualquier variación de la fase anterior, ya sea clínica, morfológica, bioquímica o molecular. Se presenta en el 40 % de los pacientes, intercalada entre las otras fases. Precede en pocos meses a la fase terminal.
3. Fase de crisis blástica: presenta las características de una leucemia aguda con pronóstico desfavorable por su evolución agresiva y resistencia al tratamiento.

A continuación se describen las principales manifestaciones clínicas y los criterios diagnósticos de cada fase:

#### FASE CRÓNICA

Las LMC suelen mostrar:

1. Manifestaciones clínicas: el paciente puede estar asintomático o presentar síntomas inespecíficos como astenia, anorexia, pérdida de peso, febrícula, sudores nocturnos y disminución de la tolerancia al ejercicio físico.
2. Otras manifestaciones:
  - a) Malestar abdominal con sensación de repletez posprandial, dolor agudo en hipocondrio izquierdo y diarreas.
  - b) Urticaria.
  - c) Dolores óseos, crisis aguda de gota, tal vez relacionada con la hiperuricemia.



- d) Debido al aumento de los leucocitos: cefalea, obnubilación, vértigos y taquipnea.
- e) Al examen físico: el hallazgo común es la esplenomegalia.

Del 10 al 15 % de los casos, el diagnóstico es casual, al realizar un hemograma o detectar la esplenomegalia en un examen físico de rutina.

#### **Criterio morfológico**

Desde el punto de vista morfológico, las LMC muestran:

1. En la sangre periférica: anemia normocítica-normocrómica: leucocitos entre 100 y 300 x 10<sup>9</sup>/L, con presencia de granulocitos en todas las etapas de maduración, predominan los mielocitos. El porcentaje de blastos es escaso (de 0 a 8 %). Se observan basofilia y eosinofilia:
  - a) Hay normoblastos circulantes.
  - b) Plaquetas: por lo general, trombocitosis, la trombocitopenia no es frecuente al inicio de la enfermedad (figura 3.64 del anexo).
2. Medulograma:
  - a) Médula hipercelular con disminución de la grasa.
  - b) Sistema granulopoyético: hiperplástico. Eosinofilia y basofilia.
  - c) Sistema megacariopoyético: deprimido.
  - d) Relación M/E: 10:30.
  - e) Blastos menor que 5 %.
  - f) Presencia de histiocitos azul marino y células tipo Gaucher (figura 3.65 del anexo).
3. Biopsia de la médula ósea: hipercelular con una importante disminución de la grasa. Puede verse mielofibrosis inicial en el 25 % de los casos, casi siempre reticulínica, pero puede ser colágena.

#### **Criterio bioquímico**

El criterio bioquímico indica:

1. Fosfatasa alcalina leucocitaria (FAL): disminuida, puede llegar a tener un valor de 0.
2. Ácido úrico: elevado.
3. Vitamina B12: elevada.
4. Transcobalaminas I y III: aumentadas.
5. Enzima LDH: aumentadas.

#### **Criterio citogenético**

Desde el punto de vista citogenético está presente el cromosoma de Filadelfia (Ph) aproximadamente en el 95 % de los pacientes.

#### **Criterio molecular**

El criterio molecular indica un reordenamiento BCR/ABL.

#### **FASE ACELERADA**

#### **Criterio clínico**

Desde el punto de vista clínico, las LMC provocan:

1. Pérdida de peso variable, superior al 10 % del peso corporal sin otra causa que lo justifique.
2. Fiebre de 38 °C o más, que dure no menos de 2 semanas y de origen no infecciosa.
3. Aparición de lesiones osteolíticas, dolores óseos o ambos.
4. Esplenomegalia progresiva, rebelde al tratamiento.

#### **Criterio morfológico**

Desde el punto de vista morfológico se aprecia:

1. Sangre periférica: anemia, trombocitopenia y leucocitosis progresivas, no secundarias al tratamiento.
2. Basofilia mayor que el 10 %, si no existía al diagnóstico.
3. Medulograma y biopsia de médula: aumento del porcentaje de blastos entre el 10 y el 30 %. Desarrollo de la fibrosis.
4. Recuentos en periferia y médula:
  - a) 10 % de blastos en periferia o médula.
  - b) 20 % de blastos más promielocitos en periferia o médula.
  - c) 20 % de basófilos más eosinófilos en periferia.

#### **Criterio bioquímico**

Desde el punto de vista bioquímico hay un aumento de la FAL no secundaria a infecciones ni al uso de medicamentos.

#### **Criterio citogenético**

Desde el punto de vista citogenético hay una duplicación del cromosoma de Filadelfia, aneuploidía, trisomía 7 o isocromía 17 y pérdida del cromosoma sexual.

#### **Criterio molecular**

Desde el punto de vista molecular se percibe:

1. Aumento de la p210.
2. Disminución o ausencia de la p53 (gen supresor de la transformación leucémica).

#### **FASE DE CRISIS BLÁSTICA**

Esta es la expresión de la fase terminal de la enfermedad. Los blastos son de estirpe mieloide del 50 al 60 % de los casos, linfoides del 25 al 30 % y mixtas en el 5 %.

### Criterio clínico

Desde el punto de vista clínico se aprecian las manifestaciones características de las leucemias agudas.

### Criterio morfológico

Desde el punto de vista morfológico, se aprecia:

1. Blastos en médula ósea igual al 30 % o más.
2. Blastos más promielocitos en médula igual al 50 %.
3. Blastos más promielocitos en periferia igual al 30 %.
4. Infiltración blástica extramedular: ganglios, periostio, SNC, piel y pleura.

### Criterio bioquímico

Desde el punto de vista bioquímico, hay:

1. Aumento de TC II y disminución de la TC I.
2. El resto, igual a la fase acelerada.

### Criterio citogenético

El criterio citogenético es igual al de la fase acelerada.

### Pronóstico de la enfermedad

La LMC, en la fase crónica, es un período en el cual el paciente se encuentra en buen estado clínico pero, al entrar a la fase aguda, la supervivencia es pobre (pocos meses). Varios grupos de investigadores han asignado parámetros para clasificar a los pacientes en: bajo, intermedio o alto riesgo. Entre ellos: edad, tamaño del bazo, recuento de plaquetas, porcentaje de blastos al diagnóstico, posición del punto de ruptura dentro del cromosoma 22 y respuesta al tratamiento inicial.

### Enfermedades relacionadas

Las enfermedades que se realacionan con las LMC son:

1. LMC juvenil.
2. Leucemia mielomonocítica crónica.
3. LMC Ph-.
4. LLA Ph+ cerca del 20 % de los adultos y del 2 al 3 % de los niños con LLA tienen la translocación. Esta afección no presenta características clínicas ni hematológicas iguales a la LMC.

Los pacientes que se recuperan de la quimioterapia con una lámina periférica que tiene un patrón morfológico igual a la LMC en fase crónica, se presume que han tenido una crisis blástica de la enfermedad.

### POLICITEMIA VERA

La policitemia es un aumento en el número de eritrocitos circulantes, superior a los valores de referencia

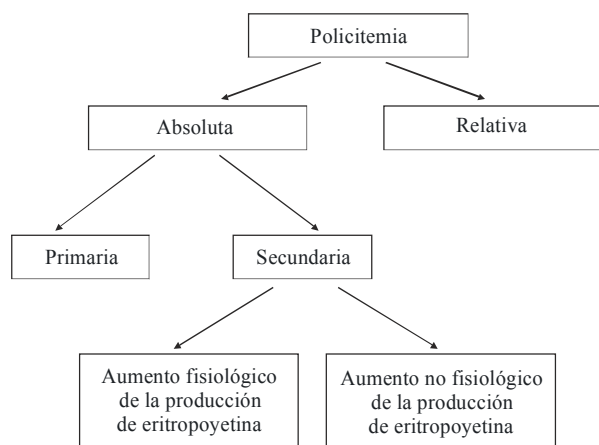
normales. Este término se utiliza para todo tipo de incremento, ya sea absoluto o relativo.

La policitemia vera es un trastorno hematopoyético de la *stem cell* pluripotente, incluido dentro de los SMPC, que se caracteriza por una proliferación excesiva de la eritropoyesis, con aumento absoluto de la masa de eritrocitos circulantes, aunque también afecta las otras líneas hematopoyéticas.

### Clasificación de las policitemias

Las policitemias se clasifican de la manera siguiente (figura 3.66):

1. Absolutas: aumento absoluto de la masa globular sin incremento de la eritropoyetina (EPO):
  - a) Primarias: policitemia vera (adquirida): eritrocitosis primaria congénita por mutación en el gen del receptor de la EPO.
  - b) Secundarias: aumento de la masa globular como respuesta a un exceso de eritropoyetina:
    - Aumento fisiológico de la producción de EPO (hipóxica o compensadora):
      - Altura.
      - Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).
      - Síndrome de Pickwick.
      - Disminución congénita del 2,3 DPG.
      - Aumento de la carboxihemoglobina.
      - Hemoglobinopatía con alta afinidad por el oxígeno.
      - Enfermedades cardíacas congénitas con corto circuito de derecha a izquierda.
    - Aumento no fisiológico:
      - Tumores: hepatoma, carcinoma renal, ovárico, prostático, pulmonar, de mama, adenoma rectal, feocromocitoma, fibroma uterino, hemangioblastoma cerebelar.
      - Trastornos renales: quistes, hidronefrosis, estenosis de la arteria renal y trasplante renal.
      - Otros: trastornos endocrinos (enfermedad de Cushing).
2. Relativas: volumen globular normal con disminución del volumen plasmático:
  - a) Policitemia de estrés o síndrome de Gaisböck: la mayoría son pacientes varones obesos, de mediana edad, hipertensos y fumadores.
  - b) Tratamiento con diuréticos.
  - c) Deshidratación.
  - d) Quemaduras.



**Figura 3.66** Clasificación de las policitemias.

### Manifestaciones clínicas

Las policitemias provocan los síntomas siguientes:

1. Edad de presentación: mayor incidencia entre los 50 y 70 años. El comienzo puede ser insidioso. Los síntomas se deben a la hiperviscosidad secundaria, al aumentar la masa globular, lo cual lleva a un enlentecimiento del flujo sanguíneo e hipoxia hística. Entre ellos se encuentran:
  - a) Cefaleas, vértigos, visión borrosa, escotomas y diplopía.
  - b) Cardiovasculares: angina de pecho y claudicación intermitente.
  - c) Digestivas: dolor abdominal, plenitud gástrica y sangrado digestivo alto por úlcera péptica.
  - d) Prurito de causa incierta. Algunos plantean que se debe a la liberación de histamina.
  - e) Cólicos renales, dolor óseo gotoso por la hiperuricemia.
  - f) Alteraciones neurológicas: ocurren del 60 al 80 % de los casos: ataques transitorios de isquemia, infartos, hemorragias y estados confusionales.
  - g) Trombosis: es la causa de muerte del 30 al 40 % de los pacientes. Pueden ser cerebrales, coronarias o de las extremidades inferiores. También ocurren en las venas mesentéricas, porta, esplénica y hepáticas.
  - h) Hemorragias: es causa de muerte del 5 al 10 % de los pacientes, desde epistaxis hasta hemorragias cerebrales.
  - i) Trombosis y hemorragias posquirúrgicas.
2. Examen físico:
  - a) Plétora fascial, congestión conjuntival.
  - b) Hipertensión.
  - c) Esplenomagalia en el 75 % de los casos.
  - d) Lesiones urticarianas en piel.

### Diagnóstico de la policitemia vera

El diagnóstico de la policitemia vera indica:

1. Hemograma:
  - a) Hemoglobina y hematócrito: aumentados.
  - b) Sangre periférica:
    - Eritrocitos: al inicio no existen alteraciones consistentes, excepto la eritrocitosis característica. Si existe pérdida del hierro, se observan microcitosis e hipocromía. Al progresar la enfermedad, puede apreciarse anisocitosis, poikilocitosis, eliptocitosis y normoblastos.
    - Leucocitos: leucocitosis ligera con neutrofilia.
    - Plaquetas: trombocitosis en aproximadamente el 50 % de los casos al diagnóstico, con macroplaquetas.
2. Medulograma: hiperplasia global eritroide, megacariopoyética y granulopoyética. Azul de prusia: negativo. En la evolución de la enfermedad puede aparecer mielofibrosis y en la fase leucémica se observará un aumento del porcentaje de blastos.
3. Biopsia de la médula ósea: superior al medulograma para evaluar la celularidad y la presencia de fibrosis. Hay hiperplasia trilineal con dismorfia megacariopoyética.
4. Saturación arterial de oxígeno: normal (igual a 92 % o más).
5. Dosificación de eritropoyetina sérica por métodos de RIA y ELISA: normal o disminuida.
6. Citogenética: un cariotipo anormal adquirido en médula, confirma la presencia de un trastorno clonal. Los cariotipos más comunes son: 20q-, trisomía 8, trisomía 9 y 13 q-.
7. Cultivos de médula: los cultivos de células mononucleares en medios libres de eritropoyetina, llevan al crecimiento de colonias endógenas eritroides. También se ha observado que la unidad formadora de colonias eritroides explosivas es más sensible a los factores estimuladores del crecimiento. Estos cultivos son laboriosos, pobremente estandarizados y no están disponibles en todos los laboratorios para el diagnóstico de la enfermedad.
8. Alteraciones bioquímicas:
  - a) Ácido úrico: elevado.
  - b) Calcio: aumentado.
  - c) Muramidasa sérica: aumentada.
  - d) Vitamina B<sub>12</sub>: mayor que 900 pg/mL.
  - e) TC I y TC III: aumentados.
  - f) Fosfatasa alcalina leucocitaria (FAL): aumentada.
9. Función plaquetaria: trastornos en la agregación.
10. Estudios ferrocinéticos:
  - a) Vida media de eritrocitos con <sup>51</sup>Cr: normal o acortada.

- b) Tiempo medio del  $^{59}\text{Fe}$ : disminuido.
- c) Recambio de hierro plasmático: acelerado.
- d) Incorporación del hierro al eritrocito: próximo a lo normal.
- e) Captación sobre órganos: aumento del sacro y luego del bazo.

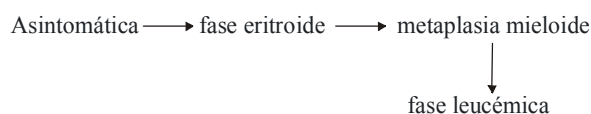
En estado avanzado, se establece el patrón ferro-cinético de la mielofibrosis.

### Criterios propuestos para el diagnóstico de la policitemia vera

Los criterios propuestos para el diagnóstico de la policitemia vera aparecen en el cuadro 3.1.

### Evolución y pronóstico de la policitemia vera

La evolución de esta enfermedad se caracteriza por las siguientes fases:



La leucemia es, en lo fundamental, mieloide, pero se han reportado leucemias linfoides y bifenotípicas.

La supervivencia media es corta, si el paciente no es tratado. En los pacientes tratados, la supervivencia es de 10 a 15 años.

El diagnóstico diferencial de las poliglobulias aparece en la tabla 3.30.

## MIELOFIBROSIS

Las condiciones asociadas con la mielofibrosis son:

1. Condiciones no malignas:
  - a) Infecciones.
  - b) Deficiencias de vitamina D.
  - c) Alteraciones en la paratiroides.
  - d) Colagenosis.
  - e) Enfermedad de Paget.
  - f) Enfermedad de Gaucher.
  - g) Exposición a radiaciones y benceno.
2. Condiciones malignas:
  - a) Metaplasia mieloide agnogénica.
  - b) Otros síndromes mieloproliferativos crónicos.
  - c) Leucemia linfoblástica y no linfoblástica aguda.
  - d) Mielofibrosis aguda asociada a LMA ( $M_7$ ).
  - e) Leucemia de células peludas.
  - f) Linfomas.
  - g) Síndrome dismielopoyético (mielofibrosis aguda con mielodisplasia trilineal).
  - h) Mastocitosis sistémica.
  - i) Mieloma múltiple.
  - j) Carcinoma de próstata, pulmón, gástrico y mama.

La metaplasia mieloide agnogénica constituye una enfermedad hematopoyética clonal, caracterizada por diversos grados de fibrosis medular, hematopoyesis extramedular (sobre todo en el hígado y en el bazo) y cambios leucoeritroblásticos en sangre periférica.

**Cuadro 3.1** Criterios propuestos para el diagnóstico de policitemia vera

Criterios	
A <sub>1</sub> : volumen de los glóbulos rojos: aumentado (> 25 % por encima del valor predictivo normal medio o Hto $\geq 0,60$ en el hombre y 0,56 en la mujer)	B <sub>1</sub> : trombocitosis (recuento de plaquetas $> 400 \times 10^9/\text{L}$ )
A <sub>2</sub> : ausencia de causas de eritrocitosis secundaria	B <sub>2</sub> : leucocitosis con neutrofilia. Recuento de neutófilos $> 10 \times 10^9/\text{L}$ y $> 12,5 \times 10^9/\text{L}$ en los fumadores
A <sub>3</sub> : esplenomegalia palpable	B <sub>3</sub> : esplenomegalia demostrada por estudios isotópicos o por ultrasonido
A <sub>4</sub> : marcador de clonalidad: por ejemplo, cariotipo anormal adquirido en médula ósea	B <sub>4</sub> : crecimiento de las BFU-E característico o disminución de la eritropoyetina sérica
A <sub>1</sub> + A <sub>2</sub> + A <sub>3</sub> o A <sub>4</sub> establecen policitemia vera	
A <sub>1</sub> + A <sub>2</sub> + 2 de los B establecen policitemia vera	

**Tabla 3.30** Diagnóstico diferencial de las poliglobulias

Aspectos	Policitemia vera	Policitemia relativa	Policitemia secundaria	
			Hipóxica	No hipóxica
Volumen globular	Aumentado	Normal	Aumentado	Aumentado
Volumen plasmático	Normal	Disminuido	Normal	Normal
Saturación arterial de oxígeno	Normal	Normal	Disminuido	Normal
Leucocitos y plaquetas	Aumentados	Normal	Normal	Normal
Dosificación de eritropoyetina	Normal o disminuida	Normal	Aumentada	Aumentada
Fosfatasa alcalina leucocitaria	Aumentada	Normal	Normal	Normal
Vitamina B <sub>12</sub>	Aumentada	Normal	Normal	Normal
Biopsia de médula ósea	Panmielosis	Normal o hiperplasia eritroide	Hiperplasia eritroide	Hiperplasia eritroide

Existen varios estudios que apoyan la idea de que la fibrosis de médula representa una reacción no neoplásica secundaria de las células estromales de la médula ósea. La megacariopoyesis infectiva consiste en la liberación de cantidades excesivas de factores de crecimiento fibroblástico como: el factor de crecimiento derivado de plaquetas, el factor de crecimiento transformante  $\beta$ , el factor de crecimiento epidérmico, contenidos en los gránulos  $\alpha$  de plaquetas y megacariocitos.

#### Manifestaciones clínicas

Las manifestaciones clínicas que se presentan son:

1. Edad de presentación: mayores de 50 años, aunque se ha reportado en niños. Afecta ambos sexos.
2. Los pacientes pueden estar asintomáticos o con síntomas inespecíficos (debilidad, taquicardia, anorexia y pérdida de peso). Pueden presentar molestias en hipocondrio izquierdo por la esplenomegalia o dolor más intenso, ocasionado por un infarto esplénico.
3. Otros síntomas: dolores óseos, sobre todo en miembros inferiores, y sangrados.

#### 4. Examen físico:

- a) Hepatoesplenomegalia, sensibilidad ósea a la palpación en miembros inferiores.
- b) Palidez, íctero.
- c) Por hipertensión portal: ascitis, várices esofágicas y sangrado digestivo.
- d) Presencia de tumores extramedulares, focos de hematopoyesis en diferentes localizaciones: glándulas suprarrenales, riñón, pulmón, mediastino, mesenterio, timo, intracraneal, serosas de pulmón y corazón.

#### Diagnóstico

El diagnóstico plantea:

##### 1. Hemograma:

- a) Anemia, anisopoikilocitosis, eritrocitos en lágrimas asociados con normoblastos, lo que constituye un patrón característico de mielofibrosis.
- b) Leucocitos: variable, por lo general existe leucocitosis ligera con desviación izquierda, y puede observarse del 1 al 5 % de blastos.

- c) Plaquetas: recuentos variables. Puede existir trombocitosis severa y micromegas en sangre periférica.
- 2. Medulograma: aspiración blanca, no se obtiene material por la fibrosis medular.
- 3. Biopsia de médula ósea: hiperplasia megacariocítica y granulocítica, fibrosis reticulínica y colágena, y osteoesclerosis.
- 4. Citogenética: alteraciones inespecíficas de los cromosomas 1, 5, 7, 8, 9 y 20.
- 5. Estudio de la función plaquetaria: trastorno en la agregación con epinefrina y colágeno.
- 6. Estudio de la función de los neutrófilos: deterioro de la fagocitosis.
- 7. Estudios bioquímicos en plasma:
  - a) Ácido úrico: aumentado.
  - b) LDH: aumentado.
  - c) FAL: aumentado.
  - d) ASAT, ALAT: aumentado si hay metaplasia hepática.
  - e) Albúmina y colesterol: disminuidos.
- 8. Vitamina B<sub>12</sub>: aumentada.
- 9. Estudios de coagulación: puede haber déficit de factores por disfunción hepática, secundario a la metaplasia.
- 10. Biopsia de ganglio, hígado, bazo: presencia de metaplasia.
- 11. Estudio ferrocínético:
  - a) Tiempo medio del <sup>51</sup>Cr: acortado.
  - b) Tiempo medio del <sup>59</sup>Fe: acortado.
  - c) Recambio de hierro plasmático: aumentado.
  - d) Incorporación de hierro al eritrocito: acortado.
  - e) Recuento en órganos: aumento de captación en hígado y bazo.
- 12. Estudios inmunológicos: con frecuencia se detectan:
  - a) ICC: presentes.
  - b) Prueba de Coombs: positiva.
  - c) Crioaglutininas: positiva:
    - Evolución y pronóstico: supervivencia de 5 años, aproximadamente, muerte por infección, hemorragia y accidentes vasculares, evolución a leucemia aguda (del 10 al 15 % de los casos).

## TROMBOCITEMIA ESENCIAL

La trombocitemia es el desorden clonal en la producción plaquetaria, originada en la *stem cell* hematopoyética.

### Cuadro clínico

La edad media de presentación es a los 50 años, aunque se han descrito casos en niños. Afecta uno y otro sexos.

- Las manifestaciones se pueden dividir en 2 grupos:
1. Las ocasionadas por las hemorragias.
  2. Las ocasionadas por la vasooclusión microvascular.

Las hemorragias son similares a las que se observan en la disfunción plaquetaria: sangrados nasales, gingivales y equimosis. Los pacientes no presentan hemorragias importantes, excepto los que están sometidos a cirugías o tienen traumatismos.

La manifestación característica de la vasooclusión se denomina eritromelalgia, la cual surge por efectos tóxicos directos de metabolitos del ácido araquidónico en las arteriolas. Se caracteriza por dolor, rubor, calor y ardor en la porción distal de las extremidades, que puede progresar a cianosis o necrosis.

Los pacientes pueden presentar cuadros de isquemia cerebral transitoria, disturbios visuales, cefaleas, mareos y, con menos frecuencia, infartos del miocardio, así como accidentes vasculares encefálicos.

Algunos refieren prurito generalizado (del 10 al 15 % de los casos). Desde el punto de vista del sistema genitourinario, se han detectado abortos recurrentes y priapismo en el hombre.

En el examen físico puede detectarse esplenomegalia moderada al inicio y luego, por trombosis de la microcirculación esplénica, ocurre atrofia del órgano.

### Diagnóstico

El diagnóstico de laboratorio indica:

1. Hemograma:
  - a) Plaquetas: trombocitosis mayor que  $600 \times 10^9/L$ , gigantes dismórficas, en grandes cúmulos, micromegas circulantes.
  - b) Leucocitosis ligera (del 10 al  $15 \times 10^9/L$ ).
2. Medulograma: hiperplasia global, sobre todo del sistema megacariopoyético; es característico el fondo del medulograma lleno de plaquetas. Azul de Prusia: por lo general es negativo, aunque no parece indicar ferropenia, ya que el hierro sérico es normal.
3. Biopsia de médula ósea: hipercelular con hiperplasia de megacariocitos, los cuales son dismórficos con múltiples lobulaciones nucleares, citoplasma voluminoso y granular, y tienden a agruparse. Fibrosis reticulínica.
4. Sobrevida plaquetaria: disminuida.
5. Función plaquetaria: disminución de la agregación con ADP y epinefrina.
6. Cariotipo: ausencia del cromosoma Ph, y alteraciones inespecíficas en el 5 % de los pacientes: aneuploidía, 1q-, 20q-, 21q-, 1q+.

El diagnóstico se realiza por la exclusión de otras causas de trombocitosis.

### Criterios de trombocitemia

Existe trombocitemia cuando:

1. Recuento de plaquetas mayor que  $600 \times 10^9/L$  en 2 ocasiones diferentes, separadas por intervalo de un mes.
2. Ausencia de causa identificable de trombocitosis.
3. Volumen de los eritrocitos normales.
4. Ausencia de fibrosis significativa en la médula ósea.
5. Ausencia del cromosoma de Filadelfia.
6. Presencia de esplenomegalia.
7. Hiper celularidad en la médula.
8. Ausencia de déficit de hierro.
9. Demostración de hematopoyesis clonal en las hembras por medio del polimorfismo de los fragmentos de restricción.
10. Presencia de células progenitoras hematopoyéticas medulares anormales, determinadas por la formación de colonias endógenas eritroides/megacariocíticas.
11. Estudios de agregación plaquetaria anormal en respuesta a la epinefrina y al ADP (si el paciente no está tomando drogas que afecten su función).

Se considera que los pacientes con criterios del 1 al 5, y 3 o más de los criterios del 6 al 11, presentan la enfermedad.

**Evolución.** Sobrevida casi normal, en dependencia de los cuadros hemorrágicos o trombóticos. Menos del 5 % de ellos pueden sufrir una transformación hacia la leucemia aguda. En ocasiones, la trombocitemia evoluciona a mielofibrosis con metaplasia agnógena.

## SÍNDROMES LINFOPROLIFERATIVOS

El síndrome linfoproliferativo (SLP) es un grupo de trastornos de origen clonal, que afecta a las células linfoides, con características heterogéneas desde el punto de vista clínico, histológico y molecular.

### CLASIFICACIÓN DE LOS SÍNDROMES LINFOPROLIFERATIVOS SEGÚN LA REAL

Según los criterios de la *Revised European-American Classification of Lymphoid neoplasm* (REAL), los SLP se clasifican en:

#### A. Neoplasias de precursores B:

1. Leucemia/linfoma linfoblástico.

#### B. Neoplasias de células B periféricas:

1. Leucemia linfocítica crónica B/leucemia prolinfocítica/linfoma linfocítico de células pequeñas.
2. Linfoma linfoplasmocitoide/inmunocitoma/enfermedad de Waldenström.
3. Linfoma de células del manto.
4. Linfoma del centro folicular: grado I (celularidad pequeña), grado II (celularidad pequeña y grande) y grado III (célula grande). Linfoma difuso de célula pequeña predominante.<sup>1</sup>
5. Linfoma B de zona marginal.
6. Extraganglionar (tipo MALT).
7. Ganglionar (+/- células B monocitoides).
8. Linfoma marginal de zona esplénica (+/- linfoma de linfocitos vellosos).<sup>1</sup>
9. Leucemia de tricoleucocitos.
10. Mieloma.
11. Linfoma difuso de células grandes.<sup>2</sup>
  - a) Subtipo: linfoma de célula B en el timo, de localización mediastínica.
12. Linfoma de Burkitt.
13. Linfoma no-Burkitt B de alto grado.<sup>1</sup>

#### C. Neoplasias de precursores T:

1. Leucemia/linfoma linfoblástico T.

#### D. Neoplasias de células T o NK periféricas:

1. Leucemia linfocítica crónica T/leucemia prolinfocítica.
2. Leucemia de células grandes granulares:
  - a) Tipo célula T.
  - b) Tipo célula NK.
3. Micosis fungoide/síndrome de Sézary.
4. Linfomas T periféricos no específicos.<sup>2</sup>
  - a) Linfoma hepatoesplénico  $\delta/\gamma$ .<sup>1</sup>
  - b) Linfoma tipo Paniculitis T subcutánea.<sup>1</sup>
  - c) Linfoma angioinmunoblástico.
  - d) Linfoma angiocéntrico.
  - e) Linfoma T intestinal (+/- asociado con enteropatía).
  - f) Leucemia/linfoma T del adulto.
  - g) Linfoma anaplásico de célula grande (CD30).
  - h) Tipos T y nulo.
  - i) Linfoma anaplásico de célula grande tipo Hodgkin.<sup>1</sup>

#### E. Enfermedad de Hodgkin:

1. Predominio linfocitario.
2. Esclerosis nodular.
3. Celularidad mixta.
4. Depleción linfocitaria.
5. Enfermedad de Hodgkin, clásica rica en linfocitos.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Entidades provisionales.

<sup>2</sup> Grupos que podrían incluir más de una enfermedad.

## PATOGENIA DE LOS SÍNDROMES LINFOPROLIFERATIVOS

La patogenia de los síndromes linfoproliferativos (SLP) se explica por un proceso multipasos, en el que lesiones genéticas diversas, interfieren la diferenciación normal de las células linfoides, mediante distintos mecanismos moleculares, lo que provoca su transformación en célula tumoral.

**Patogenia molecular.** La aplicación de técnicas moleculares ha permitido el entendimiento del papel de los oncogenes en el origen de las neoplasias.

La transformación maligna incluye modificaciones específicas en la cantidad o calidad de la expresión de los oncogenes celulares. Esta puede ocurrir por diferentes mecanismos, entre los que se encuentran: incorporación en el ARN viral, mutaciones somáticas y translocaciones cromosómicas que dan origen a una disregulación transcripcional.

**Apoptosis.** La apoptosis es la muerte celular como respuesta a estímulos específicos. Comprende una secuencia de eventos moleculares hasta la fragmentación del ADN. Las células hematopoyéticas son dependientes de este control; las modificaciones en el evento de muerte celular programada, pueden tener un papel crucial en la patogenia de la malignidad. Un ejemplo de ello es en el gen *bcl-2*, localizado en el punto de ruptura de la translocación (14; 18), que tiene una función bloqueadora de la apoptosis, por lo tanto, las células que lo expresen tendrán un crecimiento y una diferenciación ilimitados.

### Papel de los virus

Los virus realizan funciones diferentes:

1. Virus Epstein-Barr: es un herpes virus que afecta los linfocitos B. Se identifica en las siguientes afecciones linfoides:
  - a) Linfoma de Burkitt endémico y esporádico.
  - b) Linfoma de Hodgkin (se observa en el 50 % de las células de Reed-Sternberg).
  - c) Linfoma policlonal en pacientes con SIDA o inmunodeficientes después de TMO.
  - d) HTLV-1: asociado con la leucemia/linfoma de células T del adulto.
  - e) Herpes virus 8 (HHV-8) que se asocia con:
    - Sarcoma de Kaposi.
    - Linfoma primario de cavidades.
    - Enfermedad de Castleman.

**Moléculas de adhesión.** Las moléculas de adhesión constituyen receptores de membrana encargados de mediar las interacciones intercelulares y entre la célula-matriz extracelular por medio de la unión ligando-receptor. Entre otras funciones: regulan los fenómenos de recirculación y entrada selectiva de los linfocitos en los órganos linfoides o *homing*. Incluyen la selectina, la familia de las integrinas  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$ , CD 54 (ICAM-1), CD58 (LFA-3), CD44. La expresión diferencial de estas moléculas sobre los linfocitos neoplásicos se ha descrito en varios estudios.

## MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LOS SÍNDROMES LINFOPROLIFERATIVOS

Las manifestaciones comunes de estos síndromes son la presencia de adenopatías, hepatoesplenomegalia y toma del estado general. Existen síntomas y signos relacionados con la variedad histológica, el tamaño de la masa tumoral y la localización nodal o extranodal. Entre ellas se describen:

1. Fiebre (en ocasiones es la única manifestación).
2. Pérdida de peso mayor del 10 % en los 6 meses precedentes.
3. Infecciones.
4. Linfedema en miembros inferiores y síndrome de compresión de la vena cava superior.
5. Dolor óseo.
6. Dolor en las adenopatías con la ingestión de alcohol (se presenta en casos aislados con linfoma de Hodgkin).
7. Manifestaciones en piel: dermatitis, eritrodermia, vasculitis e infiltración nodular o en placas.
8. Manifestaciones pulmonares: derrame pleural, atelectasias y nódulos o condensaciones.
9. Manifestaciones renales: síndrome nefrótico.
10. Manifestaciones digestivas: dolor abdominal y masa palpable en el examen físico.
11. Manifestaciones neurológicas: paraparesias.

## DIAGNÓSTICO DE LOS SÍNDROMES LINFOPROLIFERATIVOS

El diagnóstico de los SLP indica:

1. Hemograma: los resultados de este estudio varían con el subtipo histológico. A continuación se presentan sus características en el linfoma de



Hodgkin (HDG), no Hodgkin (LNH) y en los linfoproliferativos crónicos que tienen expresión leucémica:

- a) HDG: se observa anemia en el 10 % de los casos al diagnóstico; el recuento de leucocitos es normal o ligeramente aumentado por neutrofilia y eosinofilia; la linfopenia es un factor pronóstico adverso. Por lo general, las plaquetas están normales, aunque puede existir trombocitosis reactiva en algunos pacientes.
- b) LNH: es variable, puede no tener expresión periférica, pero si se encuentra en fase leucémica, las características de las células dependerán del tipo histológico, desde pequeños linfocitos con núcleo excéntrico hasta células grandes con citoplasma abundante y núcleo donde se puede observar el nucléolo.
- c) Leucemia linfoide crónica: leucocitosis con linfocitosis absoluta (mayor que  $5 \times 10^9/L$ ). Las células linfoides son pequeñas con citoplasma de color azul claro, agranular. El núcleo tiene la cromatina densa y los nucléolos no son visibles. Debido a su extrema fragilidad, se observan numerosos núcleos desnudos (sombras de Gumprecht). Existe anemia y trombocitopenia en los estadios avanzados (figura 3.67 del anexo).
- d) Leucemia prolinfocítica: hiperleucocitosis con presencia de prolinfocitos, los cuales son mayores que el linfocito normal, se aprecia más citoplasma y un núcleo redondo con cromatina moderadamente condensada con un nucléolo prominente.
- e) Leucemia de células peludas: se caracteriza por la presencia de pancitopenia. La célula tumoral es grande, tiene un citoplasma basófilo abundante con proyecciones irregulares en forma de pelos. El núcleo con un patrón de cromatina finamente dispersada, y el nucléolo es pequeño o no se visualiza.
- f) Variante de la leucemia de células peludas: leucocitosis (mayor que  $100 \times 10^9/L$ ). La célula es grande con citoplasma basofílico, núcleo con cromatina más condensada y nucléolo prominente.
- g) Linfoma esplénico con linfocitos vellosos: leucocitosis (de  $10$  a  $30 \times 10^9/L$ ). La célula se caracteriza por un citoplasma moderadamente basófilo con proyecciones vellosas cortas, a menudo localizadas en un polo de la célula. El núcleo es redondo u oval con cromatina

apretada y, en la mitad de los casos, se observa un nucléolo pequeño.

- h) Linfoma linfoplasmocítico: las células en periferia tienen cierta diferenciación plasmática con un núcleo excéntrico y un citoplasma con marcada basofilia.
  - i) Leucemia/linfoma de células T del adulto: cuadro sanguíneo pleomórfico. La célula prominente se caracteriza por su núcleo polilobulado con cromatina homogénea, en el que no es frecuente observar nucléolos, y una minoría de las células son blásticas.
  - j) Síndrome de Sézary: las células poseen un núcleo cerebriforme y un citoplasma por lo general escaso, agranular, en ocasiones con vacuolas. Estas características se identifican en las células grandes, pero en las células pequeñas, las irregularidades en el núcleo son difíciles de apreciar con el microscopio óptico, por lo que es necesario utilizar la microscopia electrónica (figura 3.68 del anexo).
2. Eritrosedimentación: aumentada en el HDG, así como otras reactantes de fase aguda (ferritina, haptoglobina, proteína C reactiva, fibrinógeno).
  3. Estudios bioquímicos:
    - a) Calcio: aumentado si existe toma ósea importante.
    - b) Ácido úrico: puede estar aumentado.
    - c) Enzimas hepáticas: aumentadas si existe infiltración del órgano.
    - d) Enzima láctico deshidrogenasa (LDH): es un indicador de masa tumoral en el LNH, por lo que constituye un signo de mal pronóstico.
  4. Estudios de imágenes:
    - a) Radiografía de tórax: define si hay infiltración del parénquima pulmonar, ensanchamiento del mediastino y adenopatías hiliares.
    - b) Tomografía axial computarizada (TAC): define mejor si hay lesión en el mediastino, y precisa el diámetro de la masa tumoral.
    - c) Linfografía: estudio más sensible para detectar una afectación retroperitoneal. Tiene como ventajas su valor en el diagnóstico, en la identificación de ganglios a los que después se hará una biopsia, y en el seguimiento evolutivo de pacientes mediante radiografías seriadas del abdomen; sin embargo, no detecta ganglios celiacos, mesentéricos, periesplénicos y del hilio hepático.
    - d) Ultrasonido abdominal: su valor es similar al de la TAC, pues se utiliza para detectar adenopatías y para delimitar las masas tumorales.

- e) Gammagrafía con galio ( $^{67}\text{Ga}$ ): útil en la valoración de los estadios I y II supradiafragmáticos con masas mediastínicas tipo *bulky* en los linfomas.
- f) Tomografía por emisión de positrones: se obtienen imágenes de la distribución por el organismo de un radiotrazador, emisor de positrones. Su mayor utilidad radica en la valoración de la existencia de alguna enfermedad después del tratamiento y en el diagnóstico precoz de las recidivas.

#### 5. Histología:

- a) Biopsia de ganglio: es imprescindible para realizar el diagnóstico, por lo que debe indicarse sin pérdida de tiempo, cuando existe un alto índice de sospecha.
- b) Biopsia hepática: detecta la infiltración del órgano.
- c) Medulograma y biopsia de la médula ósea: detectan la infiltración del tejido. Son importantes en el diagnóstico y para determinar el estadio (figuras 3.69 y 3.70 del anexo).
- d) Laparotomía exploratoria: está indicada solo si sus resultados pueden determinar una diferencia en la selección del tratamiento (radioterapia sola o quimioterapia) que recibirá un paciente con diagnóstico de linfoma.

#### 6. Estudios genéticos:

- a) Citogenética convencional: estudia las alteraciones cromosómicas en la metafase de las células neoplásicas.
- b) Fluorescencia con hibridación *in situ*: se basa en la hibridación de una sonda de ADN marcada con una sustancia fluorescente sobre su secuencia complementaria del genoma, ya sea en la metafase o en el núcleo de la célula. La captación de la señal fluorescente se realiza mediante una cámara adaptada al microscopio de fluorescencia.
- c) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y *Southern Blot*: permiten el estudio del ADN y el ARN tumoral.

Ejemplos de alteraciones encontradas con estas técnicas:

- LLC de células B: trisomía 12, alteraciones en 13q. Genes de Ig pesadas y ligeras reordenados.
- Linfoma folicular: t(14; 18). Reordenamiento para el bcl-2 en el 90 % de los casos.
- Linfoma de Burkitt: t(8; 14), t(2; 8), t(8; 22) y reordenamiento del c-myc.

#### 7. Inmunofenotipo: se utilizan los anticuerpos monoclonales para identificar y tipificar los antígenos

expresados por las células tumorales (en la membrana o en su interior). Estos anticuerpos se agrupan en los llamados CD (*clusters* de diferenciación). Este estudio puede realizarse por medio de técnicas automatizadas como la citometría de flujo.

Ejemplos:

- a) Para la línea B: CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23 e Ig de superficie o citoplasmática.
- b) Para la línea T: CD3, CD4, CD8 y CD7.
- c) No específico de línea: CD5 y CD25.

Los estudios descritos permiten determinar el estadio patológico y clínico de un paciente con diagnóstico de linfoma. El estadio clínico incluye la historia y el examen físico detallado del paciente para buscar la presencia de síntomas B (fiebre, sudación nocturna y pérdida de peso por encima del 10 % del peso corporal) y de un síndrome adenoespénico, además de los estudios imagenológicos y de laboratorio. El estadio patológico se refiere a la confirmación por la biopsia de la enfermedad, e incluye: BAAF, biopsia de ganglio, biopsia hepática y biopsia bilateral de médula ósea. Ambos estadios son de extraordinaria importancia, ya que identifican la extensión de la enfermedad y permiten obtener información pronóstica y seleccionar el tratamiento más apropiado para cada paciente.

## DISCRASIAS DE LAS CÉLULAS PLASMÁTICAS

Las discrasias de células plasmáticas o gammopatías monoclonales constituyen un grupo de enfermedades caracterizadas por la proliferación de células plasmáticas, las cuales sintetizan proteínas monoclonales constituidas por una clase de inmunoglobulina pesada ( $\gamma$  en IgG,  $\alpha$  en IgA,  $\mu$  en IgM,  $\delta$  en IgD y  $\epsilon$  en IgE) y un tipo de cadena ligera ( $\kappa$  o  $\lambda$ ).

## CLASIFICACIÓN DE LOS TRASTORNOS PROLIFERATIVOS DE LAS CÉLULAS PLASMÁTICAS

Los trastornos proliferativos de las células plasmáticas se clasifican en:

1. Gammopatía monoclonal de significado indeterminado:
  - a) Primaria.
  - b) Secundaria o asociada con:
    - Enfermedades del tejido conectivo y otras enfermedades autoinmunes.

- Enfermedades dérmicas: liquen, soriasis y urticaria.
  - Enfermedades endocrinas: hipotiroidismo y hiperparatiroidismo.
  - Enfermedad de Gaucher.
  - Enfermedades neurológicas: esclerosis múltiple y neuropatía periférica.
  - Hepatopatías.
  - Enfermedades infecciosas: tuberculosis, endocarditis bacteriana y síndrome de inmunodeficiencia adquirida.
  - Neoplasias: carcinomas y síndromes mieloproliferativos.
  - Tratamiento con quimioterapia y radioterapia.
2. Gammopatías monoclonales malignas:
- a) Mieloma múltiple (IgG, IgA, IgD, IgE y cadenas ligeras):
    - Mieloma múltiple quiescente.
    - Leucemia de células plasmáticas.
    - Mieloma no secretor.
    - Mieloma IgD.
    - Mieloma osteoesclerótico.
  - b) Plasmocitoma:
    - Plasmocitoma solitario de hueso.
    - Plasmocitoma extramedular.
3. Enfermedades linfoproliferativas malignas:
- a) Macroglobulinemia de Waldeström (IgM).
  - b) Linfoma maligno.
4. Enfermedades de cadena pesada (ECP):
- a) ECP- $\gamma$ .
  - b) ECP- $\alpha$ .
  - c) ECP- $\mu$ .
5. Otros:
- a) Crioglobulinemia.
  - b) Piroglobulinemia.
  - c) Amiloidosis primaria.

## MIELOMA MÚLTIPLE

El mieloma múltiple (MM) es de causa desconocida. Se invocan varios factores:

1. Radiaciones: en los sobrevivientes de radiaciones atómicas se ha diagnosticado la enfermedad.
2. Exposición a asbesto, benceno y pesticidas.
3. Factor genético: se han observado casos de mieloma múltiple familiar.
4. Repetida estimulación antigénica del sistema mononuclear fagocítico por infecciones crónicas, enfermedades del tejido conectivo, diverticulitis y reacción alérgica.

## Aspectos biológicos y moleculares del mieloma múltiple

Después de activarse por estímulos antigénicos, las células B circulan por la sangre periférica hasta localizarse en la médula ósea, allí se diferencian en células plasmáticas bajo la influencia de interleucinas. Luego de semanas o meses, mueren por apoptosis (mecanismo de muerte celular programada).

### Citocinas

La interleucina 6 (IL-6) es el factor de crecimiento más importante de la célula plasmática. Sus niveles elevados en el mieloma parece que se deben a un aumento en la producción por los monocitos y células del estroma de la médula ósea, aunque podrían estar relacionadas con un mecanismo autocrino propio de la célula mielomatosa.

La IL-6 se une a un receptor soluble (RSIL-6), el cual consiste en una cadena  $\alpha$ . Luego este complejo se une a la otra parte del receptor que es una cadena  $\beta$  transmembrana o glicoproteína 130, el cual da lugar a la señal de transducción. Los niveles séricos elevados de IL-6 y del receptor soluble constituyen factores pronósticos desfavorables.

La IL-2 y su receptor (IL-2R): la unión de IL-2 a los receptores da lugar a la proliferación y/o diferenciación celular con producción de inmunoglobulinas.

La IL-4 tiene función supresora de la IL-6.

La IL-4 y el factor de necrosis tumoral (FNT) son mediadores de la acción del factor activador de los osteoblastos (FAO), producido por las células plasmáticas y responsable de las lesiones osteolíticas.

El inmunofenotipo indica gran heterogeneidad:

1. El 98 % de las células plasmáticas nucleomatosas son positivas para el CD38.
2. El 90 % son positivas para el PCA-1.
3. Entre el 10 y el 50 % de los pacientes, expresan el CD10.
4. Más del 55 % de los pacientes son positivos para el CD56.
5. Recientemente se ha descrito el sindecán-1, identificado por el AcMo CD 138.

La B2 microglobulina (B2M) es una proteína de membrana, que constituye la cadena ligera de la molécula HLA-clase I. Es liberada al plasma por el metabolismo celular. Se encuentra elevada en el mieloma y constituye un factor pronóstico desfavorable.

Otra proteína de membrana es la glicoproteína P o P170, detectada en células plasmáticas de pacientes con mieloma resistente a la quimioterapia. El reconocimiento de esta proteína mediante anticuerpos monoclonales permite tomar conductas terapéuticas apropiadas.

## Citogenética

No existen anomalías cromosómicas específicas.

Las alteraciones más frecuentes son: cambios numéricos complejos: trisomías de los cromosomas 3, 5, 9 y 11, o deleciones del 8, 13 y 16. Recientes trabajos demuestran que anomalías en el cromosoma 13 se asocian con una corta sobrevida.

Existen translocaciones cromosómicas en aproximadamente el 10 % de los casos. Las más frecuentes son: t (8; 14) y t (11; 14).

## Biología molecular

En 1/3 de los casos se detecta un reordenamiento de la cadena  $\gamma$  del receptor de células T.

1. Se observan mutaciones en el N-ras, asociadas, en diferentes estudios, con menor respuesta al tratamiento.
2. Elevado contenido del ARNm del c-myc.
3. Sobreexpresión de bcl-2.
4. Mutaciones puntuales y sobreexpresión del gen supresor 53.
5. Sobreexpresión de la proteína *murine double minute* (MDM2).

## Manifestaciones clínicas

Las manifestaciones clínicas ocurren como consecuencia de las acciones de las células plasmáticas tumorales:

1. Destrucción ósea: las células plasmáticas producen un factor activador de los osteoclastos (FAO).
2. Falla medular: invasión de la médula por células plasmáticas con disminución del resto de las series.
3. Síntesis de inmunoglobulina monoclonal con supresión de la producción de inmunoglobulinas normales. La proteína anómala es responsable también del daño renal, la hiperviscosidad y la predisposición a las infecciones.

## Principales manifestaciones

1. Dolor óseo: aparece de manera gradual y fluctúa en intensidad. Los movimientos exacerban el dolor y se localizan, en lo fundamental, en columna, tórax y, menos frecuente, en miembros inferiores.
2. Fracturas patológicas por lesiones líticas y osteoporosis difusa en vértebras, clavículas, costillas, pelvis y huesos largos.
3. Síndrome anémico con sus síntomas característicos.
4. Infecciones: neumonías e infecciones del tracto respiratorio superior, piel y sistema urinario. Los gérmenes más comunes son: *Staphylococcus pneumoniae*, *Haemophilus*, *Streptococcus* y el *Staphylococcus aureus* que origina el 80 % de las infecciones.

5. Hiperviscosidad: se observa en el 2 % de los pacientes con mieloma múltiple. Rara vez ocasiona problemas clínicos, a diferencia de la macroglobulinemia.
6. Hipercalcemia: provoca anorexia, náuseas, vómitos, poliuria, polidipsia, deshidratación, letargo, constipación, confusión y coma.
7. Tendencia hemorrágica: se observan púrpuras cutáneas y sangrados mucosos. En ocasiones, aparecen sangrados severos por disfunción plaquetaria o inhibición de los factores de la coagulación por la proteína monoclonal.
8. Disfunción neurológica: la radiculopatía es la complicación más frecuente, también se reportan neuropatías periféricas y la meningitis mielomatosa es infrecuente.
9. Daño renal: las dos causas más importantes de insuficiencia renal son el riñón del mieloma y la hipercalcemia. Los cilindros o moldes tubulares contienen células tubulares necróticas y cadenas ligeras rodeadas de células gigantes multinucleadas. En algunos pacientes, el daño celular tubular renal provoca defecto en la reabsorción tubular, con pérdida de aminoácidos, glucosa, fosfato y potasio.
10. Amiloidosis: se presenta en el 10 % de los casos con macroglosia, insuficiencia cardíaca rebelde al tratamiento, tumefacciones articulares, neuropatías periféricas, síndrome del túnel carpiano, y una mayor predisposición a las infecciones hemorrágicas.
11. Infiltración de órganos: excepto la afección meníngea y la leucémica, el MM extramedular es silente desde el punto de vista clínico.

## Diagnóstico

El diagnóstico de laboratorio indica:

1. Hemograma:
  - a) Anemia normocítica normocrómica, fenómeno de Rouleaux (eritrocitos en pilas de monedas).
  - b) Leucocitos y plaquetas: por lo general normales, pueden estar disminuidos por el desplazamiento de la hematopoyesis por las células tumorales. En ocasiones se observan células plasmáticas en periferia. Cuando su número es superior a  $2 \times 10^9/L$ , estamos en presencia de una leucemia de células plasmáticas (figura 3.71 del anexo).
2. Eritrosedimentación: acelerada, mayor que 100 mm/h en el 90 % de los casos.
3. Medulograma: entre el 10 y 95 % de las células de la médula se aprecian infiltradas por células plasmáticas. Es necesario recordar que puede existir

un aumento de células plasmáticas entre el 10 y el 20 %, de carácter reactivo (véanse las causas de plasmocitosis), por lo que deben explorarse las características atípicas de las células tumorales (figura 3.72 del anexo) como son:

- a) Tendencia a agruparse.
  - b) Asincronismo nucleocitoplasmático.
  - c) Núcleos inmaduros con grandes nucléolos, inclusiones nucleares de inmunoglobulinas (cuerpos de Dutcher).
  - d) Citoplasma abundante irregular deshilachado: existen alteraciones inespecíficas, entre las que se encuentran:
    - Inclusiones citoplasmáticas redondas de 2 a 3 mm de color claro o rosado, denominadas cuerpos de Russell, las cuales pueden llenar el citoplasma de las células, y dar la apariencia de racimos de uva (células de Mott).
    - Bastones azurofilicos que recuerdan los bastones de Auer.
    - Inclusiones cristalinas de inmunoglobulinas.
    - Tonalidad rojiza del citoplasma (célula flameada).
4. Biopsia de la médula ósea: infiltración por células plasmáticas con patrón nodular, intersticial, mixto, paratrabecular o difuso.
5. Electroforesis de proteínas: las proteínas son separadas según su carga eléctrica superficial. Para ello, las muestras se colocan en el origen y se separan por electroforesis. Se emplean soluciones amortiguadoras, luego se tiñen las tiras y se separan las proteínas en un densitómetro que convierte las bandas en picos (albúmina,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ). Los materiales más usados como soporte son: el acetato de celulosa y el gel de agarosa tradicional que separa las proteínas del suero en 5 fracciones, o la electroforesis en gel de agarosa de alta resolución, la cual separa de 10 a 12 fracciones, lo que permite una mejor detección del componente M que se encuentra en baja concentración y migra en regiones  $\alpha_2$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  del gel. La alta resolución se logra con modificaciones en el *buffer* y en el voltaje. El 80 % de los pacientes tiene un pico monoclonal en la región de la gammaglobulina, el 10 % evoluciona con dosificación normal e hipogammaglobulinemia, lo cual corresponde con el mieloma de Bence Jones. En ocasiones, el pico es pequeño como en el MM IgD.
6. Inmunoelectroforesis: combina la difusión por separación electroforética y la precipitación de las proteínas. Debido a que los antisueros entran al gel en un plano perpendicular a la superficie se observan solo líneas curvas o arcos. La proteína monoclonal

crea un arco o círculo que se desvía de forma diferente a la línea curvilínea normal.

7. Electroforesis por inmunofijación: tiene el mismo principio que la inmunolectroforesis. La inmunoprecipitación se realiza con antisueros específicos, aplicados sobre la superficie del gel, así, el patrón final coloreado contiene una o pocas bandas. Si el componente M está presente, aparece como una banda que coincide con la paraproteína vista en la electroforesis, puede ser caracterizada como IgG, IgM, IgA y  $\kappa$  o  $\lambda$ , en dependencia del patrón de precipitación.
8. Cuantificación de inmunoglobulinas: por métodos nefelométricos y turbidimétricos. Hay disminución de las inmunoglobulinas normales y aumento de la monoclonal.
9. Proteína de 24 horas en orina. Se observa proteinuria mayor que 4 g/24 h. Los 2 métodos más empleados para demostrar la presencia de proteína de Bence Jones son:
- a) Electroforesis de proteínas: para demostrar la excreción de cadenas ligeras.
  - b) Inmunolectroforesis: para identificar el tipo específico, su interpretación es más difícil comparada con el suero por la posible presencia de diferentes fragmentos de Igs que pueden interferir.
10. Estudios bioquímicos:
- a) Urea, ácido úrico y creatina: normal o aumentados.
  - b) LDH: aumentada en MM agresivo con masa extramedular.
  - c)  $\beta_2$  microglobulina: si está aumentada es índice de mal pronóstico.
  - d) Calcio: normal o aumentado.
11. Crioglobulina: puede estar aumentada, sobre todo en MM por la IgG.
12. Viscosidad de suero: aumentado cuando la IgG es mayor que 4 g/dL y la IgA mayor que 3 g/dL.
13. *Survey* óseo:
- a) Lesiones líticas.
  - b) Osteoporosis.
  - c) Fracturas patológicas.
  - d) Lesión localizada en el plasmocitoma solitario.
14. TAC y RMN detectan plasmocitomas extramedulares.
15. Inmunofenotipo, estudio citogenético y molecular: las alteraciones están descritas en la biología del mieloma.
16. Índice de células plasmáticas marcadas: (*labelling index*-LI): mediante autorradiografía determina la proporción de células que incorporan timidina

tritiada. Cuantifica el índice de crecimiento tumoral. Se observan valores elevados en pacientes con una supervivencia corta.

17. Citometría de flujo: al cuantificar, mediante el estudio del ADN, la proporción de células plasmáticas en fase de síntesis (S), se puede explorar la actividad proliferativa de las células plasmáticas. Los pacientes con elevado porcentaje de células plasmáticas en fase S muestran menor respuesta al tratamiento y una supervivencia más corta.
- a) Criterios diagnósticos de Salmon y Durie.
  - b) Criterios mayores:
    - Plasmocitoma en la biopsia hística.
    - Plasmacitosis en médula ósea con más del 30 % de células plasmáticas.
    - Pico monoclonal de la globulina en la electroforesis sérica:
      - IgG mayor que 35 g/L.
      - IgA mayor que 20 g/L.
      - Excreción de cadenas ligeras en electroforesis en orina igual a 1,0 g/L 24 h en ausencia de amiloidosis.
  - c) Criterios menores:
    - Plasmocitosis en médula ósea del 10 al 30 % de células plasmáticas.
    - Pico monoclonal presente, pero con valores menores que los definidos.
    - Lesiones líticas en los huesos.
    - IgM menor que 500 mg/L, IgA menor que 1 g/L o IgG menor que 6 g/L.
    - El diagnóstico de MM por lo general requiere un mínimo de 1 mayor y 1 menor, o 3 menores, que deben incluir el 1 y el 2.

## VARIANTES DEL MIELOMA MÚLTIPLE

Las variantes del mieloma múltiple (MM) son:

1. MM quiescente:
  - a) Proteínas: mayor que 3 g/dL en suero.
  - b) Médula: mayor que el 10 % de células plasmáticas
  - c) Ausencia de anemia, insuficiencia renal o lesión esquelética.
2. Leucemia de células plasmáticas: más del 20 % de células plasmáticas en sangre periférica (recuento absoluto: mayor que  $2 \times 10^9$  g/L).  
Es primaria cuando el diagnóstico se realiza en fase leucémica, y secundaria si constituye la transformación de un MM diagnosticado con anterioridad.
3. Mieloma no secretor: la proteína M debe ser identificada en las células plasmáticas por métodos de inmunofluorescencia o inmunoperoxidasa.

## 4. Mieloma osteoesclerótico (síndrome POEMS):

- a) Polineuropatía inflamatoria crónica que causa trastornos motores. Las células plasmáticas secretan Ig monoclonales tóxicas para los nervios periféricos y responsables de las anomalías endocrinas.
  - b) Lesiones óseas osteoescleróticas.
  - c) Polineuropatías, organomegalia, endocrinopatía, proteína M y lesiones en la piel.
  - d) Hemoglobina normal, trombocitosis crónica.
  - e) Medulograma: menos del 5 % de células plasmáticas.
  - f) Daño renal raro.
  - g) La mayoría de los pacientes tiene cadena ligera  $\lambda$ .
  - h) Niveles de proteína en el LCR aumentados.
  - i) Hepatoesplenomegalia, hiperpigmentación cutánea, ginecomastia, edemas, hipertrichosis, testículos atroficos e impotencia.
  - j) Diagnóstico: identificación de las células plasmáticas tumorales en biopsia de una lesión osteoesclerótica.
5. Plasmacitoma solitario de hueso:
- a) Medulograma: menor que el 5 % de células plasmáticas.
  - b) Inmunolectroforesis en suero y orina: normal.
  - c) Rayos X óseo: lesión única.
6. Plasmocitoma extramedular:
- a) Tumor de células plasmáticas que aparecen fuera de la médula ósea, localizaciones más frecuentes: tracto respiratorio superior, cavidad nasal, nasofaringe, laringe, tubo gastrointestinal, SNC, tiroides, testículos y glándulas parótidas.
  - b) Medulograma: menor que el 5 % de células plasmáticas.
  - c) Rayos X óseo: normal, aunque puede extenderse a los huesos adyacentes.

## MACROGLOBULINEMIA DE WALDENSTRÖM

La macroglobulinemia de Waldenström es el resultado de una proliferación incontrolada de linfocitos y células plasmáticas, en la cual se produce la proteína monoclonal de tipo IgM.

### Cuadro clínico

El cuadro clínico de la macroglobulinemia de Waldenström es el siguiente:

1. Es más frecuente en los hombres.
2. Edad media: 60 años.
3. Comienzo insidioso con astenia, debilidad y pérdida de peso.

4. Hemorragias: nasofaringe, hematuria, hematemesis y melena, sangrado prolongado posquirúrgico, visión borrosa en 1/3 de los pacientes, hemorragia de la retina y papiledema.
5. Neuropatía periférica.
6. Sordera repentina.
7. Infecciones recurrentes.
8. Leucoencefalopatía multifocal.
9. Disnea, insuficiencia cardíaca congestiva.
10. Derrame pleural, infiltrado pulmonar.
11. Hepatoesplenomegalia, adenopatías y lesiones retinianas.
12. Síndrome de hiperviscosidad.

### Diagnóstico de laboratorio

El diagnóstico de laboratorio indica:

1. Hemograma:
  - a) Anemia normocítica-normocrómica.
  - b) Fenómeno de Rouleaux en la periferia.
  - c) Leucocitos: normales o disminuidos, puede haber linfocitosis, plaquetas normales, pero en ocasiones puede presentarse una disminución ligera.
2. Prueba de Coombs: puede ser positiva (poco común).
3. Eritosedimentación: acelerada.
4. Médula: hipocelular, infiltrada por linfocitos plasmocitoides, a veces eosinofilia y mastocitosis.
5. BMO: infiltrado difuso por linfocitos, plasmocitos y células intermedias.
6. Coagulación: se pueden observar alteraciones de los factores I, II, V y VIII.
7. Serología: falsos positivos.
8. Orina: proteína de Bence Jones.
9. Electroforesis e inmunoelectroforesis: proteína IgM mayor que 30 g/L (3 g/L).
10. Crioglobulina: positiva en el 10 %.
11. Survey óseo: puede haber osteoporosis y lesiones líticas aisladas en menos del 5 % de los casos.
12. Viscosidad del suero mayor que 3.

### BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- Alexanian R, Weber D, Liu F. Differential diagnosis of monoclonal gammopathies. *Arch Pathol Lab Med* 1999;123: 108-13.
- Álvaro T, Bosch R, Salvadó M, Martínez S. Perfil morfológico e inmunofenotípico de los síndromes linfoproliferativos tercer curso de hematopatología tortosa. *Inst. Cat. Salvat*, 1996:111-60.
- Attaelmannan M, Levinson SS. Understanding and identifying monoclonal gammopathies. *Clin Chem*, 2000; 46:1230-38.
- Bain BJ, Catovsky D. The leukaemic phase of non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Pathol* 1995;48:189-93.
- Bataille R, Boccadoro M, Klein B. C-reactive protein and beta-2 microglobulin produce a simple and powerful myeloma staging system. *Blood* 1992;80:733-37.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT. Proposals for the classification of chronic (mature) B and T lymphoid leukaemias. French-American-British Cooperative Group. *J Clin Pathol* 1989; 42:567-84.
- Bick RL. Hematology: clinical and laboratory practice. St. Louis: Mosby, 1993.
- Bilgrami S, Greenberg BR. Polycythemia rubra vera. *Semin Oncol* 1995; 22: 307-26.
- Billadeau D, Van Ness B, Kimlinger T. Clonal circulating cells are common in plasma cell proliferative disorders: a comparison of monoclonal gammopathy of undetermined significance, smoldering multiple myeloma, and active myeloma. *Blood* 1996;88:289-96.
- Brown BA. Hematology principles and procedures. 6 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993.
- Carnot J, Muñio J, De Castro R, Travieso J, Rodríguez I, Torres W. La enfermedad de Hodgkin: Aspectos Clínico-biológicos y Terapéuticos (revisión). *Acta* 1989;3(1):96-135.
- Dewald GW, Wright P I. Chromosome abnormalities in the myeloproliferative disorders. *Semin Oncol* 1995;22:341-54.
- Faderl S, Kantarjian HM, Talpaz M, Estrov Z. Clinical significance of cytogenetic abnormalities in adult acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1998;91:3995-4019.
- Farreras-Rozman. Medicina Interna. 13<sup>ra</sup>. ed. España: Mosby Doyma Libros, 1995.
- Fernández N, Hernández P. Síndrome mielodisplástico. I. Biología y clínica. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 1999;16(1):5-20.
- García-Conde J. Biología de los linfomas. En: *Progresos biológicos y terapéuticos*. Valencia: You & Us, 1999.
- Gutiérrez EO. Enfermedad de Hodgkin y linfomas no Hodgkin. *Rev Clin Esp* 1999; 199: 44-51.
- Hayhoe FG J, Flemans RJ. A colour atlas of haematological cytology. 2<sup>nd</sup> ed. London: Wolfe Medical Publications, 1982.
- Hernández JM, Almeida J, García R, San Miguel JF. Aplicación de las investigaciones y de la genética molecular al estudio de las leucemias. En: *Leucemias. Progresos biológicos y Terapéuticos*. Valencia: You & Us, 1999.
- Hoffman R. Hematology basic. 2<sup>nd</sup> ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1995.
- Jancár J. Progress in the classification of myeloid and lymphoid neoplasms. From REAL to WHO concept. *Adv Clin Path* 2000; 4:59-76.
- Jennings C D, Foon K A. Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancy. *Blood* 1997; 90: 2863-92.

- Juliusson G, Merup M. Cytogenetics in chronic lymphocytic leukemia. *Sem Oncol* 1998;25:19-26.
- Kantarjian H (Chair), Melo JV, Tura S. Chronic Myelogenous Leukemia: Disease Biology and Current and Future Therapeutic Strategies. En: *Hematology 2000 American Society of Hematology Education Program Book* 2000. p. 90-109.
- Kishimoto T. The biology of interleukin 6. *Blood* 1989;74:1-10.
- Klein B, Zhang XG, Lu Z, Bataille R. Interleukin-6 in human multiple myeloma. *Blood* 1995;85: 863-72.
- López Borrasca. *Enciclopedia iberoamericana de hematología*. España: Universidad de Salamanca, 1992.
- Matutes E. Immunophenotype of the chronic lymphoproliferative disorders. *Haematologica* 1998;83:393-98.
- Mc Kenna RW. Multifaceted approach to the diagnosis and classification of acute leukemias. *Clin Chem* 2000; 46(8):1252-9.
- Mediavilla JD. Leucemias agudas. *Rev Clin Esp* 1999; 199: 22-7.
- Messinezy M, Westwood NB, Woodcock SP, Low serum erythropoietin a strong diagnostic criterion of primary polycythaemia event at normal haemoglobin levels. *Clin Lab Haematol* 1995;17:217.
- Pearson TC, Green AR, Reilly JT, Harrison G. Leukemic transformation in polycythemia vera. *Blood* 1998; 92: 1837.
- Pearson TC, Messinezy M, Westwood N, Green AR. A polycythemia vera update: Diagnosis, pathobiology, and treatment. *Hematology* 2000. American Society of Hematology. Education Program Book 2000:51-68.
- Rezuke WN, Abernathy EC, Tsongalis GJ. Molecular diagnosis of B-and T-cell lymphomas: fundamental principles and clinical applications. *Clinical Chem* 1997; 43:(10) :1814-23.
- Sanz MA. Leucemias. En: *Progresos biológicos y terapéuticos*. Valencia: You & Us, 1999.
- Tefferi A. Pathogenetic mechanism in chronic myeloproliferative disorders: polycythemia vera, essential thrombocythemia, agnogenic myeloid metaplasia and chronic myelogenous leukemia. *Semin Hematol* 1999;36:3-8.
- Vallespi T, Vidriales MB, Acebedo G, Blanco A, Orfao A, García Hernández JL et al. Diagnóstico y Clasificación de los síndromes linfoproliferativos B con expresión leucémica. *Haematologica* (ed. esp.) 1999;84:62-9.
- Weinstein IM. Idiopathic myelofibrosis: historical review, diagnosis and management. *Blood* 1991; 5: 90-104.
- Wintrobe MM. *Clinical haematology*. 10 ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 1998.



## **CONTENIDO**

---

**Introducción/ 309**

**Mecanismos de la hemostasia/ 310**

**Hemostasia primaria/ 310**

**Hemostasia secundaria/ 313**

**Fibrinólisis/ 318**

**Bibliografía recomendada/ 321**

### Capítulo 27



## HEMOSTASIA NORMAL

*Dr. Ariel de Jesús Collina Rodríguez  
Dra. Tania Carballo Treto  
Dr. Wilfredo Torres Iribar*

### RESUMEN

El sistema hemostático, en el que participan componentes celulares y proteínas plasmáticas solubles, mantiene la sangre en su estado fluido y detiene la pérdida de esta cuando se lesiona la pared vascular. Cuando se pierde la integridad del endotelio vascular, las plaquetas se adhieren al subendotelio expuesto, se activan, agregan y generan el trombo primario. Además, permiten el ensamblaje de complejos enzimáticos que intervienen directamente en la generación de trombina. La formación de trombina es resultado de la unión del factor VII activado con el factor hístico expuesto en la membrana de células subendoteliales y extravasculares. La trombina generada en estas condiciones corta el fibrinógeno en el plasma, lo cual forma monómeros de fibrina que, por un proceso de polimerización y estabilización, dan origen al trombo secundario, e involucra al trombo plaquetario. Este proceso es regulado por un grupo de mecanismos naturales, antitrombinas, proteína C activada e inhibidor del factor hístico, que inactivan o inhiben diferentes elementos coagulantes. Finalmente, la plasmina formada por diferentes vías provoca la destrucción del coágulo y facilita la reparación hística.

### INTRODUCCIÓN

La sangre es una variedad especial de tejido conectivo. Tiene una sustancia intercelular líquida: el plasma, formado por agua, proteínas, carbohidratos y lípidos, en el que están suspendidos los elementos formes: eritrocitos, leucocitos y plaquetas. La sangre circula dentro de un sistema cerrado, formado por el corazón y los vasos sanguíneos. Sus funciones principales se ejercen a través de su circulación por los diferentes órganos del cuerpo.

La pared de todos los vasos (arterias, venas y capilares) presenta en su superficie interna o luminal una monocapa de células endoteliales (endotelio vascular), que tiene en el adulto un área superior a 1 000 m<sup>2</sup> y que funciona dinámicamente como una interfase entre los constituyentes de la sangre y los tejidos, además de poseer una intensa actividad biológica y metabólica. En el endotelio vascular se originan sustancias tromborresistentes que inhiben la actividad plaquetaria, la generación de trombina y estimulan la fibrinólisis. El

endotelio vascular es soportado por un grupo de estructuras (subendotelio, membrana elástica interna, capa media muscular y membrana elástica externa), que varían según el tipo y calibre del vaso, y presentan sustancias trombogénicas que activan la hemostasia.

Las principales sustancias tromborresistentes creadas por el endotelio son: factor relajante vascular (óxido nítrico), prostaglandina I<sub>2</sub>, nucleótidos de adenina, glicosaminoglicanos, sulfato de heparán, trombomodulina, receptor endotelial de la proteína C, activador hístico del plasminógeno, y receptor del activador tipo uroquinasa del plasminógeno; mientras que los principales componentes trombogénicos de la pared vascular son: fibras colágenas, fibronectina, trombospondina, laminina, factor von Willebrand, factor hístico e inhibidor del activador del plasminógeno.

La pared vascular constantemente sufre lesiones más o menos extensas con pérdidas del endotelio, que deben ser reparadas mediante un proceso rápido, localizado y reversible. El sistema hemostático es el encargado de llevar a cabo este proceso. Él controla la

pérdida de sangre (hemorragia) cuando ocurre una solución de continuidad en la pared vascular, mediante complejas interacciones celulares y bioquímicas que involucran la pared vascular, las proteínas del plasma (coagulación y fibrinólisis) y las células de la sangre (plaquetas y otras).

A la vez que ocurre la lesión del vaso sanguíneo, comienza la formación de un tapón hemostático sobre el área lesionada, compuesto por plaquetas (trombo primario), al que se le añade una malla de fibrina (trombo estable secundario) que termina en la reparación de la pared vascular dañada y la disolución del trombo que formó.

La hemostasia también tiene como funciones: controlar, regular y localizar el proceso cerca del área dañada, así como mantener la fluidez de la sangre y su circulación. La extensión incontrolada o propagación del proceso de la hemostasia dentro de un vaso sanguíneo puede ocasionar una oclusión parcial o total de este, con disminución o detención del flujo de sangre (trombosis), o el desprendimiento de un fragmento del trombo que ocluye otra zona del sistema vascular (embolia).

La hemorragia y la trombosis se presentan en muchas situaciones clínicas, por lesiones vasculares o disregulaciones adquiridas o congénitas del sistema hemostático, que rompen el fino equilibrio entre los factores procoagulantes y anticoagulantes. Las pruebas de laboratorio aportan una información esencial para el diagnóstico, evolución, evaluación de riesgo, respuesta al tratamiento y seguimiento de estas enfermedades. Para utilizar de forma eficiente los estudios de laboratorio, es necesario conocer los elementos básicos de la fisiología y la fisiopatología de la hemostasia.

## MECANISMOS DE LA HEMOSTASIA

La hemostasia es un mecanismo de defensa que funciona estrechamente vinculado con los procesos de reparación hística (inflamación y regeneración hística), y protege la integridad del sistema vascular. Es un proceso complejo, en el que intervienen componentes celulares y plasmáticos con actividades procoagulante y anticoagulante, que interaccionan de forma continua desde que se lesiona el endotelio de un vaso sanguíneo. Para su estudio, se describen 4 fases (figura 3.73 del anexo):

1. Vasoconstricción localizada en el área afectada.
2. Adhesión, activación, liberación y agregación de las plaquetas sobre el sitio de la lesión (hemostasia primaria).
3. Generación de trombina y formación de una red de fibrina que estabiliza el trombo plaquetario (coagulación o hemostasia secundaria).

4. Eliminación de los depósitos de fibrina (fibrinólisis) y reparación de la pared vascular.

Inmediatamente después de una lesión de un vaso sanguíneo tiene lugar una estimulación de las terminaciones simpáticas de la musculatura lisa, por un mecanismo reflejo. Como resultado, ocurre una vasoconstricción rápida que detiene la circulación, y facilita la adhesión y agregación de las plaquetas y la formación de fibrina.

## HEMOSTASIA PRIMARIA

Las plaquetas son células anucleadas pequeñas que se originan de la fragmentación del citoplasma de los megacariocitos maduros. Los megacariocitos son las células hematopoyéticas mayores de la médula ósea, constituyen células poliploides que se desarrollan mediante un proceso de endomitosis donde sufren de 3 a 5 ciclos de duplicación cromosómica sin división citoplasmática. El proceso de liberación de las plaquetas o fragmentación aparece en los sinusoides de la médula ósea y en los capilares de la circulación pulmonar. Las plaquetas circulan de 7 a 11 días. El compartimento plaquetario periférico está formado por 2/3 de plaquetas que permanece circulando y 1/3 en el bazo. Solo una pequeña fracción de la masa de plaquetas es consumida en condiciones normales en la hemostasia; el resto, es removida al término de su vida por el sistema fagocítico mononuclear. La concentración de plaquetas en la sangre oscila entre 140 y 450 x 10<sup>9</sup>/L. La disminución del número de plaquetas estimula la trombogénesis. Este proceso es regulado por la trombopoyetina (TPO) (véase el capítulo de hematopoyesis, en esta misma sección).

Las plaquetas se observan con el microscopio óptico (figura 3.74 del anexo) en una extensión de sangre periférica coloreada con colorantes tipo Romanowsky (Wright, Giemsa, May-Grünwald, Leishman) con un diámetro de 3 a 5 mm, redondas u ovoides con un halo de citoplasma basófilo (hialómero) y con gránulos azurófilos concentrados hacia el centro de la célula (granulómero). Si la cuenta de eritrocitos es normal, de 4,5 a 6,0 x 10<sup>12</sup>/L, se observa un promedio de 1 plaqueta por cada 10 a 30 eritrocitos. Con un aumento de 1 000 X (ocular 10 X y objetivo de 100 X), se observan de 7 a 20 plaquetas por campo en el área donde la morfología de los eritrocitos es óptima. Cuando la sangre utilizada para la extensión es anticoagulada, las plaquetas están desagregadas; mientras que si se utiliza sangre no anticoagulada, capilar o venosa, normalmente se observa en las láminas que forman grumos o agregados.

La ultraestructura de las plaquetas es compleja (figura 3.75 del anexo). Las plaquetas en reposo tienen una forma discoide con bordes lisos. En cortes observados en el microscopio electrónico (ME) de transmisión se observa una zona externa, llamada glicocálix, rica en glicoproteínas integrales (tabla 3.31) y proteínas absorbidas del plasma, glicolípidos y mucopolisacáridos, con un espesor de 15 a 20 nm, que le confiere a la plaqueta en reposo una carga neta negativa en su superficie, debido a los residuos de ácido siálico sobre las proteínas y lípidos. En esta zona se encuentran múltiples receptores que median la transmisión de señales de agentes estimulantes. La membrana plasmática es una típica membrana trilaminar formada por una bicapa de fosfolípidos, colesterol y proteínas. Cuando se examinan las plaquetas en un ME de transmisión o de barrido se observan aberturas en su superficie que son parte de un extenso sistema de canales que se extiende por todo su interior e incrementa el área de contacto del interior de la plaqueta con el exterior. Esta estructura se llama sistema canalicular conectado a la superficie (SCCS). Por debajo de la membrana existe una banda de microtúbulos, los cuales brindan soporte estructural a la forma discoide de la plaqueta y otros componentes del citoesqueleto, principalmente la actina y otras proteínas asociadas

(miosina, talina, proteína que une actina, vimentina, etc.), que se extienden por todo el citoplasma de la plaqueta y tienen como función principal brindar soporte estructural a los procesos de activación, cambio de forma, liberación y agregación de la célula. Cercano al SCCS se encuentra un sistema de canales cerrados de aproximadamente 400 a 600 nm de diámetro, derivado del retículo endoplasmático liso de los megacariocitos, nombrado sistema tubular denso (STD), cuya función es almacenar y regular la concentración de calcio intracelular.

Además de mitocondrias y gránulos de glucógeno, las plaquetas tienen 4 tipos de gránulos: gránulos alfa, gránulos densos, lisosomas y microperoxisomas. Los dos primeros se identifican en el ME por sus diferentes densidades electrónicas y los otros dos requieren tinciones histoquímicas. Los gránulos alfa, son los gránulos predominantes en las plaquetas. Son redondos u ovales con un diámetro de 300 a 500 nm y contienen diferentes proteínas (tabla 3.32).

Las plaquetas tienen un papel fundamental en la hemostasia primaria y participan en la hemostasia secundaria (generación de trombina). La hemostasia primaria presenta 4 pasos críticos: la adhesión de las plaquetas al endotelio dañado, la activación y el cambio de forma, la liberación del contenido de los gránulos y la agregación de otras plaquetas (figura 3.76 del anexo).

**Tabla 3.31** Proteínas de la membrana plaquetaria. Glicoproteínas y receptores

Nombre y tipo de receptor	Ligando	Sistemas efectores
RT 7 DT	Trombina	Proteína G-fosfolipasa C / Gi-adenilato ciclase
GP Ib/IX/V	Trombina	?
R TXA2-7DT	TX A2	Proteína G-fosfolipasa C
RE-7DT	Epinefrina	Gi-adenilato ciclase
R PAF 7DT	Factor activador plaquetario	Proteína G-fosfolipasa C
R V1-7DT	Vasopresina	Proteína G-fosfolipasa C
R ADPP2Y1 7DT	ADP	Gi-adenilato ciclase
Receptores de FC	Factor de crecimiento	Tirosinaquinasas
Antígeno CD62	Selectina P (GMP 140)	?
Integrina IIb/IIIa	Fibrinógeno	Fosfolipasa A y C, tirosinaquinasas, influjo de calcio
Integrina Ia-IIa	Colágeno	?
Integrina Ic/IIa	Fibronectina	?
Gp VI (p62)	Colágeno	?
Gp IV (CD36)	Colágeno	?
Integrina $\alpha 5\beta 3$	Vitronectina	?
GP Ib/IX/V	F vW	?
Integrina IIb/IIIa	F vW	Fosfolipasa A y C, tirosinaquinasas, influjo de calcio

**Leyenda**

?: se desconoce.

**Tabla 3.32** Contenido de los gránulos de las plaquetas

Gránulos $\alpha$ de las plaquetas	Gránulos densos	Lisosomas
Factor V	ADP	Hidrolasas ácidas
Fibrinógeno	ATP	
Fibronectina	Calcio	
Tromboespondina	Magnesio	
Vitronectina	GTP	
Activador hístico del plasminógeno	GDP	
Factor plaquetario 4		
Inhibidor del activador hístico del plasminógeno		
Gp Ib/IX, IIb/IIIa, IX, V		
PECAM-1		
IgG		
FvW		
Tromboglobulina		
P-selectina		
Serotonina		
$\alpha$ 2 antiplasmina		
Albúmina		
Factor de crecimiento derivado de las plaquetas y células endoteliales		

Las plaquetas pueden desempeñar su función fisiológica en la hemostasia porque están dotadas de una extraordinaria capacidad para responder a estímulos. La interacción inicial de estos estímulos con la plaqueta tiene lugar en la membrana, donde son captados y reconocidos por diferentes receptores que continúan un proceso complejo de transmisión de los mensajes iniciados por el estímulo hacia el interior de la plaqueta, mediante reacciones bioquímicas que terminan en una respuesta biológica adecuada.

Cuando se lesiona el endotelio vascular, las plaquetas que circulan en forma aislada se ponen en contacto con la matriz subendotelial. Se inician interacciones entre proteínas adhesivas en la pared vascular (factor von Willebrand) y colágeno con receptores proteicos de la membrana plaquetaria (complejos de glicoproteínas Ib/IX/V y Ia/IIa). Las uniones mediadas por el factor von Willebrand (FvW) tienen lugar, principalmente, en condiciones de altas velocidades del flujo sanguíneo, con elevado coeficiente de cizalladura (arterias y capilares). En esta etapa comienza la interacción de las plaquetas con sustancias activadoras como el colágeno y la trombina. La activación provoca cambios estructurales en la membrana con exposición de glicoproteínas como la IIb/IIIa, que facilitan las interacciones entre plaquetas; para ello utilizan como moléculas de adhesión, al fibrinógeno y al FvW. La plaqueta cambia su forma, de discoide con bordes lisos a esférica con pseudópodos.

Conjuntamente, se inicia una secuencia de procesos bioquímicos que propician la agregación, y la liberación

de sustancias como el ADP, serotonina y tromboxano  $A_2$  ( $TXA_2$ ), que son estímulos plaquetarios que refuerzan la activación y la agregación, y promueven el reclutamiento de nuevas células al trombo en formación.

Las plaquetas activadas desarrollan una actividad procoagulante con la exposición en su membrana de fosfolípidos, como la fosfatidilserina y el ácido fosfatídico, cargados de forma negativa, que normalmente se encuentran en la parte interna de la bicapa lipídica y que en la plaqueta activada se trasladan a la capa externa. Estos sirven para el ensamblaje de los complejos formados por los factores de la coagulación VIII-IX y V-X activados; además, el factor V en la membrana plaquetaria funciona como receptor del factor X activado, y la liberación de calcio en la plaqueta activada es un proceso fundamental en la formación de los complejos coagulantes funcionales, como podrá verse posteriormente. Estos y otros elementos que se explican en la hemostasia secundaria son claves para la formación de fibrina y la consolidación del trombo.

Los agonistas fisiológicos que inducen respuestas de activación en las plaquetas (cambios de forma, reorganización estructural, secreción granular y agregación), como la trombina, epinefrina, vasopresina, el factor activador plaquetario,  $TXA_2$ , ADP y la serotonina, lo hacen a través de su unión a proteínas pertenecientes a la familia de receptores con 7 dominios transmembrana, que tienen un dominio N-terminal extracelular, el cual contiene el sitio o los sitios de unión de ligandos, 7 dominios hidrófobos transmembrana y un dominio C-terminal

intracelular que está acoplado a través de proteínas G a enzimas efectoras (fosfolipasas, adenilato/guanilato ciclasas), productoras de segundos mensajeros que inducen (inositol 1, 4, 5 trifosfato, diacilglicerol) o inhiben (cAMP, cGMP) la activación de las plaquetas.

Las rutas principales intracelulares involucradas en la transmisión de señales se muestran en la figura 3.76 del anexo. La fosfolipasa C (FLC) actúa sobre el fosfatidil inositol (4,5)-difosfato y produce inositol (1,4,5)-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). El DAG activa los procesos de fosforilación mediados por la proteína cinasa C, y el IP3 favorece la liberación de calcio del STD al citoplasma. Esto pone en marcha los procesos que dependen del calcio, uno de los cuales, la activación de la fosfolipasa A<sub>2</sub>, conduce a la liberación de ácido araquidónico (AA) de los fosfolípidos de membrana. Este ácido es metabolizado por una ciclooxygenasa y forma endoperoxidos cíclicos que en la plaqueta, por acción de la enzima tromboxano sintetasa, originan TXA<sub>2</sub>, un potente agente agregante y vasoconstrictor local, y en las células endoteliales, mediante la enzima prostaglandina sintetasa, libera prostaglandinas (PGI<sub>2</sub>) que tienen una acción antiagregante y vasodilatadora. También el AA, por acción de una lipoxogenasa, crea metabolitos de la familia de los leucotrienos, que activan los leucocitos polimorfonucleares y los macrófagos.

Las proteínas G también regulan la actividad de la adenilato ciclasa y, por tanto, la producción de AMPc. El aumento del AMPc bloquea la movilización de calcio e inhibe la función de la plaqueta. Este es el mecanismo que utilizan las prostaciclina del endotelio para inhibir la función de las plaquetas. En la transmisión de señales dentro de la plaqueta es también esencial la fosforilación de proteínas intracelulares (aminoácidos: serina, treonina y tirosina) por grupos de enzimas fosforilasas como las proteínas cinasa C, cinasas de las cadenas ligeras de la mioglobina, cinasas MAP, proteína cinasa A y las tirosinas cinasas. Estos son elementos coordinadores del tráfico de señales que llegan a la célula y diversifican adecuadamente la señal inicial de membrana para que llegue a las distintas vías metabólicas, cuya acción conjunta es necesaria para la respuesta final de la plaqueta de activación o inhibición. También integran y asocian las moléculas de señalización adecuadas en el sitio celular indicado.

Como se mencionó, además de estos receptores, las plaquetas disponen de una amplia gama de receptores adhesivos tipo integrinas (IIb/IIIa, Ia/IIa, Ic/IIa) o que pertenecen a la familia de las proteínas ricas en leucina (Ib/IX/V) que median la interacción con proteínas adhesivas o el colágeno, y participan también en la transmisión de señales para el funcionamiento celular.

Las plaquetas presentan otro grupo de receptores inmunes (FCγRIIA) que intervienen en los mecanismos de activación y en la patogénesis de las trombocitopenias a través de la unión de fragmentos Fc de Igs. También estos receptores participan en la transmisión de estímulos no inmunes como la agregación inducida por colágeno.

## HEMOSTASIA SECUNDARIA

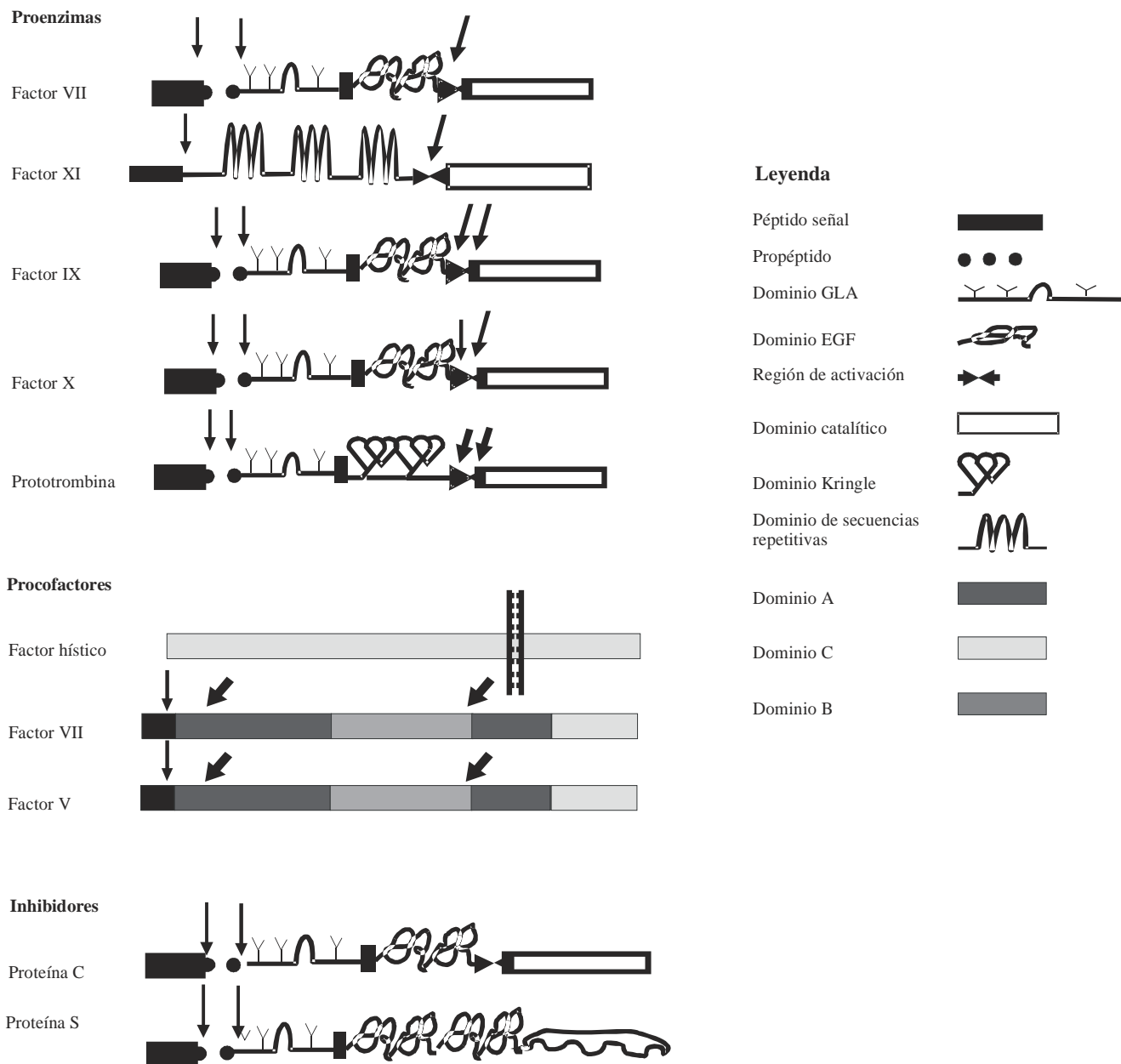
La formación de una red de fibrina en la zona de lesión vascular, es un paso fundamental en el mecanismo de defensa contra la hemorragia. El sistema de la coagulación, al igual que las plaquetas, es también activado por la ruptura del endotelio vascular que expone la sangre al tejido subendotelial y extravascular. Las respuestas del sistema de la coagulación son coordinadas con la formación del tapón plaquetario que ocluye la lesión vascular. Los mecanismos anticoagulantes naturales aseguran el control de la coagulación en la zona afectada y, en condiciones normales, prevalecen sobre los factores coagulantes. Alteraciones del balance natural de los sistemas coagulantes y anticoagulantes causados por factores adquiridos o genéticos, resultan en hemorragias o trombosis.

En este proceso intervienen un grupo de proteínas, los factores de la coagulación (tabla 3.33), que incluyen enzimas, cofactores y receptores. Las enzimas pertenecen a la familia de enzimas proteasas como la tripsina y quimiotripsina, que tienen un centro activo constituido por los aminoácidos serina, aspártico e histidina (proteasas serina). Esta porción catalítica está ubicada en la mitad carboxilo-terminal. La porción amino-terminal es única en cada proteína y le confiere su especificidad biológica. Los cofactores VIII y V presentan una estructura homóloga con 3 dominios A, 1 dominio B y 2 dominios C (AABACC) (figura 3.77). En general, las proteínas y los componentes celulares de la hemostasia están en forma inactiva. Las enzimas y los cofactores circulan en forma de proenzimas y procofactores que son activados por ruptura de enlaces peptídicos y liberación de fragmentos que los convierten en formas activas.

La trombina es la enzima clave del sistema de la coagulación, interviene en la activación plaquetaria, en la conversión del fibrinógeno en fibrina y en la amplificación de la coagulación; pero también interviene en la generación de proteínas anticoagulantes y en el control de la fibrinólisis. La generación balanceada y precisa de trombina en el sitio del daño vascular es el resultado de una serie ordenada de reacciones que se conocen como coagulación (figura 3.78 del anexo).

**Tabla 3.34** Factores que intervienen en la coagulación

Factor	Sinónimo	Síntesis	Masa (kDa)	Actividad	Concentración	Cromosoma
V	Proaccelerina	Hepatocitos	330	Cofactor	10 µg/mL	1
VIII	Antihemofílico	Hígado	330	Cofactor	0,1 µg/mL	X (26 exones)
XII	Hageman	Hepatocitos	80	Zimógeno de proteasa	30 µg/mL	5 (14 exones)
XI	–	Hepatocitos	160	Zimógeno de proteasa	5 µg/mL	4 (15 exones)
IX	Christmas	Hepatocitos	56	Zimógeno de proteasa. Vitamina K dependiente	5 µg/mL	X (8 exones)
VII	Proconvertina	Hepatocitos	50	Zimógeno de proteasa. Vitamina K dependiente	0,5 µg/mL	13 (26 exones)
Hístico	Tromboplastina hística	Muchas células	37	Cofactor, proteína transmembrana	0	1 (6 exones)
II	Protrombina	Hepatocitos	72	Zimógeno de proteasa. Vitamina K dependiente	100 µg/mL	11 (14 exones)
I	Fibrinógeno	Hepatocitos	340	Estructural	200-400 mg/mL	14 ( $\alpha 5\beta 8\gamma$ exones)
XIII	Laki-Lorand, estabilizante de la fibrina	Hepatocitos	320	Transamidasa	10 µg/mL	12 ( $\beta 1, \alpha 6$ exones)
vW	Von Willebrand	Células endoteliales y megacariocitos	220	Adhesión plaquetaria y transporta al factor VIII	10 µg/mL	12 (52 exones)
Proteína C	–	Hepatocitos	62	Regulador. Zimógeno de proteasa. Vitamina K dependiente	10 µg/mL	2 (8 exones)
Proteína S	–	Hepatocitos	80	Regulador. Cofactor. Vitamina K dependiente	25 µg/mL	3 (15 exones)
Trombomodulina	–	Células endoteliales	0	Regulador, se expresa en la superficie de las células endoteliales	0	20 (sin intrones)
Antitrombina	ATIII	Hepatocitos	60	Regulador. Forma complejo con la heparina	150 mL	1 (6 exones)
Inhibidor de la vía del factor hístico	Inhibidor de la coagulación asociado a lipoproteína, inhibidor de la vía extrínseca	Células endoteliales	33	Regulador, circula unido a la Apo aII	115 µg/mL	2 (9 exones)



**Figura 3.77** Esquema de la estructura de las principales proteínas de la coagulación.

El sistema se activa por la exposición del factor hístico (FT), expresado en la superficie de células subendoteliales (células epiteliales y fibroblastos) y en células intravasculares activadas por citoquinas inflamatorias (monocitos y células endoteliales). El FT es una proteína integral de la membrana que se une con el factor VII, tanto en su forma activa como en su forma inactiva. Una fracción del factor VII en la sangre circula como enzima activa ( $VII_a$ ) y la unión de este al FT dispara la coagulación por la activación de los factores IX y X ( $IX_a$  y  $X_a$ ). La activación del factor VII unido al FT por los factores,  $VII_a$ ,  $IX_a$  y  $X_a$  provoca una amplificación del proceso. Los

factores  $IX_a$  y  $X_a$  pueden permanecer asociados con las células que expresan el FT o difundir en la sangre y unirse a la superficie de plaquetas cercanas que han formado el coágulo plaquetario primario. Como se mencionó, las plaquetas activadas exponen en su superficie fosfolípidos aniónicos que unen los factores de la coagulación, y ensamblan complejos macromoleculares formados por enzimas, cofactores y sustratos (figura 3.79 del anexo), determinantes para la propagación y amplificación del proceso de coagulación. Estas reacciones enzimáticas involucradas en la generación de trombina ocurren también en la superficie de otras células dañadas o estimuladas por citoquinas inflamatorias,



como las células endoteliales, los monocitos, las células tumorales, además de las plaquetas.

La protrombina o factor II es activada a trombina ( $\text{II}_a$ ) por el complejo protrombinasa que está formado por el factor  $\text{X}_a$ , su cofactor el factor  $\text{V}_a$ , calcio y fosfolípidos de la plaqueta activada. El factor V es activado por el factor  $\text{X}_a$  sobre los fosfolípidos y por la trombina, tanto en solución como unido a fosfolípidos.

La trombina amplifica el sistema por la activación, no solo del factor V, sino también de los factores VIII y XI. El factor VIII circula unido al FvW que es una importante proteína adhesiva que permite la interacción de las plaquetas con el tejido subendotelial, a través de la unión con el receptor plaquetario Ib/XI/V y con otras plaquetas, mediante la interacción con el receptor IIb/IIIa. Después de la activación, el factor  $\text{VIII}_a$  se disocia del factor von Willebrand y forma un complejo sobre la superficie plaquetaria con el factor  $\text{IX}_a$  (tenasa) que activa al factor X. La activación del factor XI a factor  $\text{XI}_a$  por la trombina es otro mecanismo de amplificación que provoca cantidades mayores de factor  $\text{IX}_a$ , que activan al factor X.

La iniciación de la coagulación por la exposición del FT es la conocida vía extrínseca y el mecanismo por el que la coagulación es iniciada como respuesta a un trauma. La vía intrínseca constituye un mecanismo alternativo por el cual la coagulación puede desencadenarse. Esta involucra un grupo de proteínas: el factor XII, el kininógeno de alto peso molecular, la precalicreína y el factor XI. El papel fisiológico no es bien conocido, pero no es importante en la coagulación iniciada por traumas de los vasos sanguíneos.

El fibrinógeno es el precursor de una proteína estructural, la fibrina. La molécula está formada por un grupo duplicado de 3 cadenas polipeptídicas, unidas por puentes disulfuro ( $\text{A}\alpha$ ,  $\text{B}\beta$  y  $\gamma$ ). La trombina corta los enlaces en las uniones  $\text{A}-\alpha$  y  $\text{B}-\beta$  y libera los fibrinopéptidos A y B de la molécula nativa que forma los monómeros de fibrina, los que polimerizan rápidamente y forman una red o malla de fibrina que envuelve el tapón plaquetario.

La generación máxima de trombina ocurre después de la formación del coágulo de fibrina. Esta trombina es importante para la generación adicional de fibrina y para la activación del factor XIII ( $\text{XIII}_a$ ) y del inhibidor de la fibrinólisis, activado por la trombina. El primero es una enzima transglutaminasa que crea uniones covalentes entre los polímeros de fibrina, y estabiliza la red de fibrina y el coágulo secundario. El segundo es una enzima carboxipeptidasa que libera residuos de lisina de la región carboxi-terminal de la fibrina que son necesarios para la unión de enzimas fibrinolíticas, pues previenen el ataque fibrinolítico del coágulo.

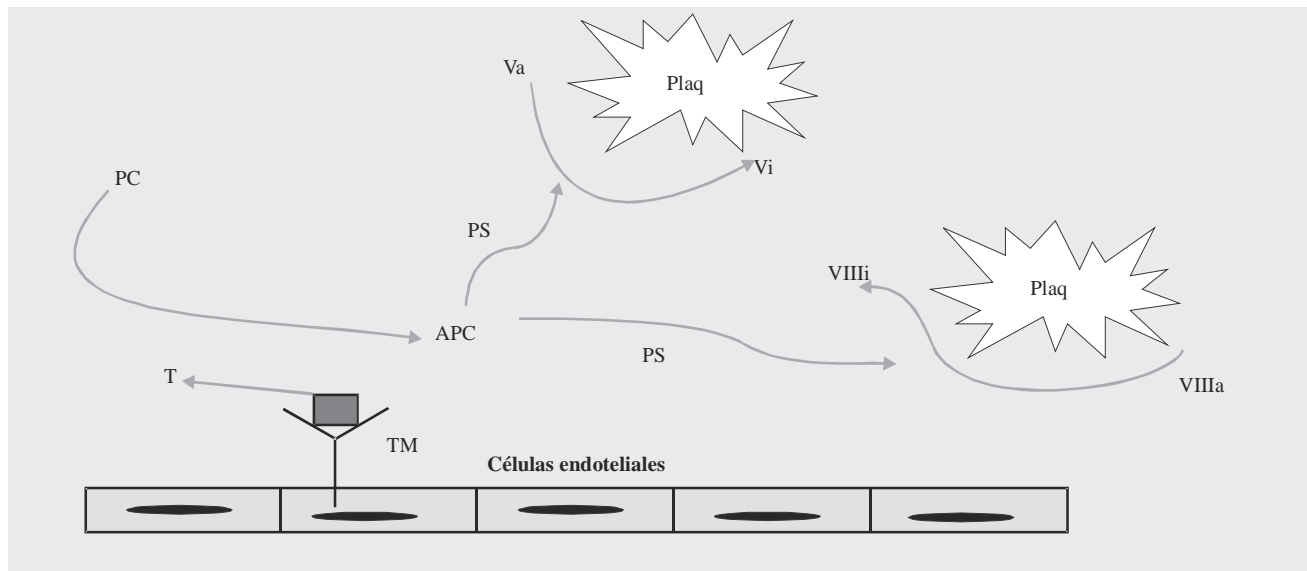
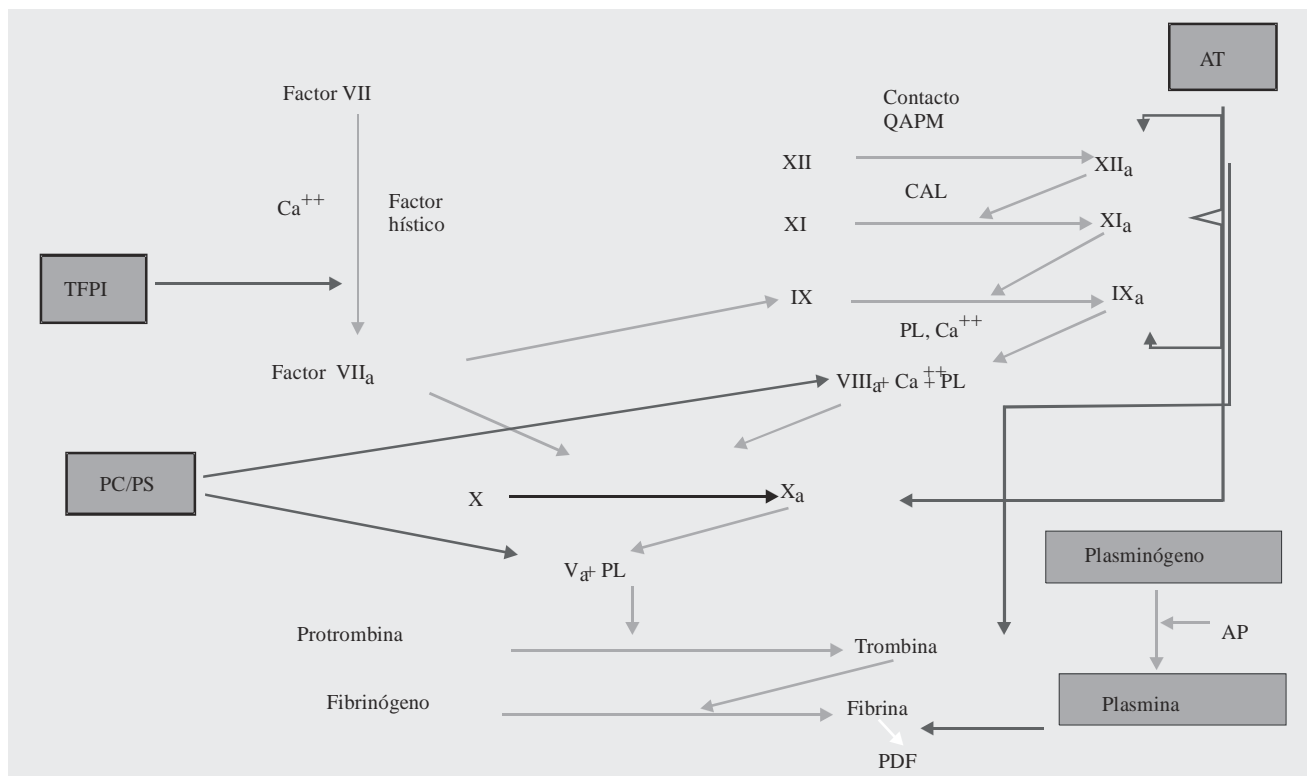
La fosfatidilserina es un fosfolípido aniónico requerido para el ensamblaje de los complejos tenasa y protrombinasa. Las plaquetas activadas intercambian fosfolípidos entre las capas interna y externa, mediante un fenómeno conocido como flip-flop y expresan la fosfatidilserina en su superficie externa. Todas las proteínas que forman estos complejos (enzimas y cofactores) tienen afinidad por los fosfolípidos con carga negativa.

Las enzimas y sustratos que intervienen en este proceso son proteínas dependientes de la vitamina K (tabla 3.34). Estas proteínas sufren un proceso de carboxilación postraduccional, en la posición gamma de los residuos de ácido glutámico, localizados en el extremo N (amino-terminal). Esta reacción es catalizada por una enzima carboxilasa del retículo endoplasmático que requiere de la vitamina K reducida ( $\text{KH}_2$ ) como cofactor (figura 3.80 del anexo). Estos residuos son necesarios para la unión con el calcio de estas proteínas, lo que ocasiona un cambio conformacional de estas que permite su unión a los fosfolípidos de las membranas, para formar los complejos coagulantes. La inhibición de la reacción de gamma-carboxilación por medicamentos antagonistas de la vitamina K resulta en una pérdida de la función coagulante de estos factores, al perder su capacidad de unirse en complejos a las membranas fosfolipídicas. Esta es la base molecular del tratamiento con anticoagulantes orales (warfarina, acenocumarol, entre otros).

La coagulación es regulada por la inhibición de las enzimas o por la modulación de la actividad de los cofactores (figura 3.81).

**Tabla 3.34** Proteínas dependientes de la vitamina K

Factores	Vida media	Concentración (nmol)	Manifestación clínica	
			Hemorragia	Trombosis
II	25	1 400	+	+
VII	0,25	10	+	+
IX	1	90	+	+
X	1,25	170	+	-
Proteína C	0,25	60	-	+
Proteína S	1,75	300	-	+



#### Complejos anticoagulantes

	Activación de la PC	Activación de APC
<b>Enzima</b>	Trombina	APC
<b>Cofactor</b>	TM	PS
<b>Superficie</b>	Endotelio	Plaqueta/endotelio
<b>Sustrato</b>	Proteína C	V <sub>a</sub> , VIII <sub>a</sub>

#### Leyenda

EPI o TFPI: inhibidor de la vía del factor hístico.

PC: proteína C.

PS: proteína S.

AT: antitrombina.

AP: antiplasmina.

APC: proteína C activa.

CAL: caliceína.

T: trombina.

PDF: productos de la degradación del fibrinógeno y de la fibrina.

QAPM: quinínogeno de alto peso molecular.

TM: trombomodulina.

**Figura 3.81** Mecanismos de inhibición de la coagulación.

El inhibidor de la vía del factor hístico inhibe las reacciones donde intervienen el factor hístico y el factor VII<sub>a</sub>. Este inhibidor es sintetizado por las células endoteliales. En el plasma, está unido a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y en el endotelio, al sulfato de heparán. El inhibidor tiene un mecanismo complejo, primero se une al factor X<sub>a</sub> y después al VII<sub>a</sub> en su complejo con el FT.

Muchas de las enzimas que se crean durante el proceso de la coagulación son inhibidas por un inhibidor de serina proteasas (serpin), llamado antitrombina III o antitrombina, que se une al centro activo de la enzima y facilita su eliminación. Este inhibidor actúa sobre los factores libres, por lo que su función es limitar el proceso de la coagulación al sitio del daño vascular. La antitrombina es solo un débil inhibidor de las enzimas, pero la heparina y las sustancias tipo heparina que están presentes en las células endoteliales, estimulan su actividad. Este mecanismo es la base molecular para el uso de la heparina como anticoagulante terapéutico.

El sistema anticoagulante de la proteína C regula la coagulación y modula la actividad de los cofactores VIII<sub>a</sub> y V<sub>a</sub>. La proteína C es la forma inactiva de una enzima proteasa dependiente de la vitamina K. Es activada sobre la superficie de las células endoteliales intactas por la trombina unida a una proteína integral llamada trombomodulina (TM). La trombina tiene, por tanto, la capacidad de expresar una actividad coagulante cuando está circulando y anticoagulante cuando está unida a las células endoteliales. En la zona de daño vascular, la trombina está en forma libre y expresa su acción procoagulante; mientras que en el sistema vascular intacto la trombina generada se une a la TM y funciona como anticoagulante al activar a la proteína C. En las células endoteliales de los grandes vasos sanguíneos existe un receptor endotelial de la proteína C que tiene como función principal facilitar la activación de la proteína C por el complejo trombina-trombomodulina, en el que la concentración de TM es baja. La proteína C puede cortar los cofactores V<sub>a</sub> y VIII<sub>a</sub> unidos a los complejos sobre las membranas fosfolípídicas, lo que resulta en una inhibición del sistema de la coagulación activado. Una proteína cofactor dependiente de la vitamina K, la proteína S, determina la actividad anticoagulante de la proteína C activada (PCA). La proteína S se encuentra en el

plasma en 2 formas, el 30 % está libre y el resto está unido a la proteína que une C4b. La PCA y la proteína S libre forman un complejo que corta e inhibe a los cofactores VIII<sub>a</sub> y V<sub>a</sub>, aun cuando estén unidos a los complejos tenasa y protrombinasa.

En vivo, la PCA no corta al factor VIII porque la unión del factor VIII al FvW previene la interacción con los fosfolípidos de membrana. En contraste, el factor V se une a los fosfolípidos igual que el factor V<sub>a</sub> y la PCA es capaz de atacar al factor V en su forma intacta. El resultado del ataque del factor V por la PCA es la formación de un factor V anticoagulante que funciona en sinergismo con la proteína S, como un cofactor de la PCA en la degradación del factor VIII<sub>a</sub>. El factor V puede funcionar como un cofactor procoagulante cuando es atacado por la trombina o el factor X<sub>a</sub>, o anticoagulante cuando es atacado proteolíticamente por la PCA. El potencial anticoagulante del factor V es importante en la regulación del complejo tenasa por la PCA y la proteína S.

## FIBRINÓLISIS

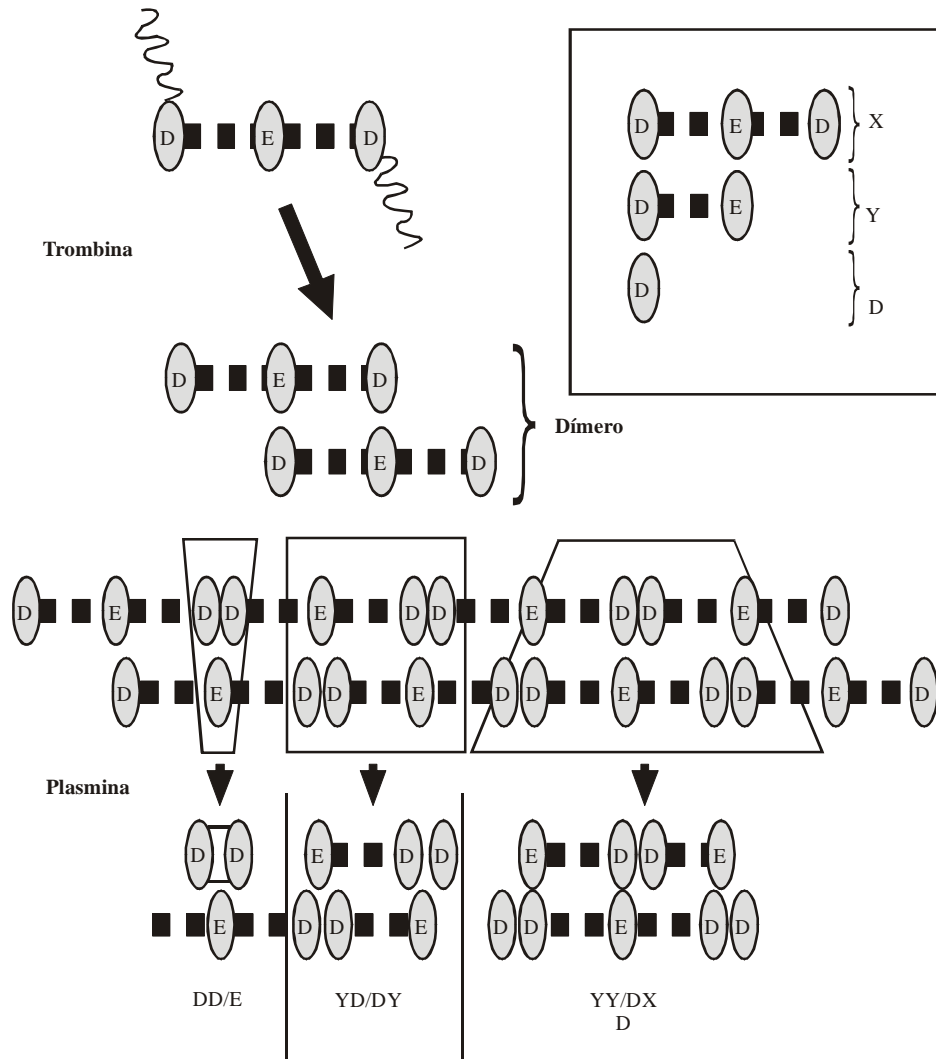
El coágulo formado cuando ocurre la lesión vascular debe ser eliminado después que se repara la pared del vaso sanguíneo, este proceso es llamado fibrinólisis. El sistema fibrinolítico o sistema del plasminógeno está formado por un grupo de proteínas proteasas serina en forma inactiva (plasminógeno y activadores del plasminógeno), por inhibidores de proteasas serina (*serpin*) y por receptores celulares (tabla 3.35).

La plasmina es una enzima proteolítica que corta una serie de uniones en la malla de fibrina, y crea unos fragmentos llamados productos de degradación de la fibrina (PDF) (figura 3.82). Esta es la enzima clave en este proceso, al igual que la trombina lo es en el proceso de la coagulación. Varios mecanismos conducen a su formación (figura 3.83 a y 3.83 b). La plasmina no solo degrada a la fibrina y a los factores de la coagulación, también activa metaloproteinasas que degradan la matriz extracelular y participan en la migración celular, la remodelación hística y la angiogénesis.

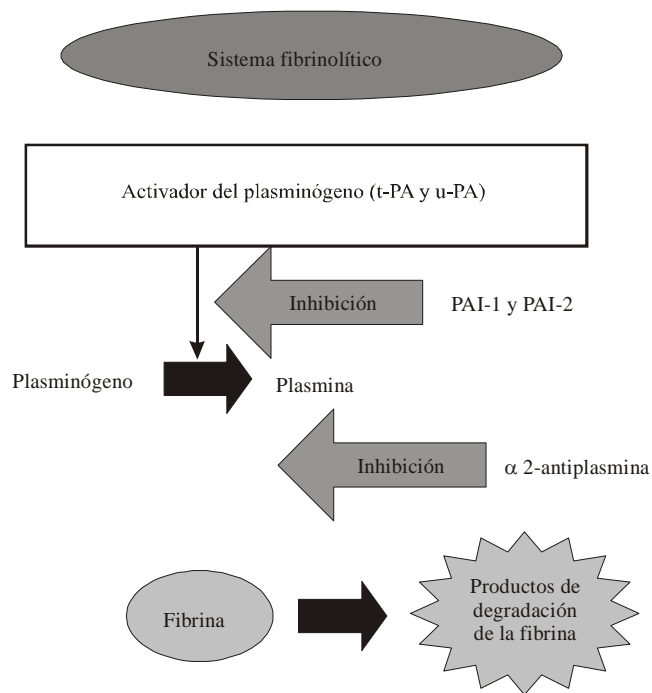
Los factores de la vía intrínseca de la coagulación o factores de contacto (XII<sub>a</sub>, calicreína, XI<sub>a</sub>) convierten el plasminógeno, que es la forma inactiva, en su forma activa, la plasmina. Esta es la llamada vía intrínseca del sistema del plasminógeno.

**Tabla 3.35** Proteínas que participan en la fibrinólisis

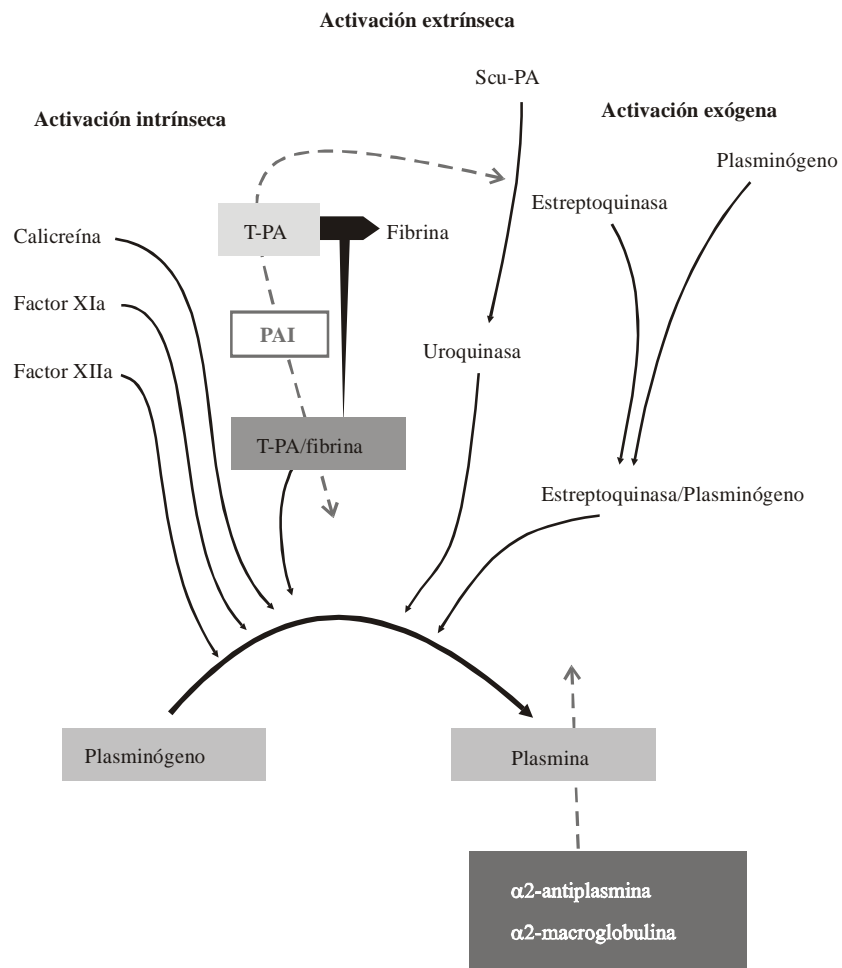
Proteína	Masa	Cadena	Concentración
Plasminogéno	88 000 Glu 83 000 Lis	Simple	2,4 µmol/L
Plasmina	88 000 Glu 83 000 Lis 38 000 Val 442	Doble	—
Activador hístico del plasminógeno (t-PA)	72 000	Simple y doble	2 µg/L
Activador del plasminógeno tipo uroquinasa de simple cadena	54 000	Simple	6,5 µmol/L
Uroquinasa de doble cadena	54 000 33 000	Doble	—
Estreptoquinasa	—	Simple	—



**Figura 3.82** Degradación de la fibrina y del fibrinógeno.



**Figura 3.83 (a)** Fibrinólisis.



**Figura 3.83 (b)** Mecanismos de activación y control de la fibrinólisis.

El plasminógeno nativo, o glu-plasminógeno, sufre una ruptura en la zona aminoterminal y forma el lis-plasminógeno que es escindido y, a su vez, forma la plasmina.

La activación extrínseca la realiza el activador hístico del plasminógeno (t-AP), una enzima que se une a la fibrina formada y provoca la activación del plasminógeno. Esta conversión ocurre solo de forma eficiente sobre la fibrina formada.

El activador del plasminógeno tipo uroquinasa (u-AP) y su precursor de simple cadena participan también en la generación de plasmina, en un proceso directamente vinculado con las células. El u-AP y su precursor tienen un receptor celular que se expresa en las membranas de diferentes tipos de células (células endoteliales, fibroblastos, monocitos, plaquetas y células tumorales), y facilita la activación del plasminógeno unido a estas.

Existen activadores exógenos como la estreptoquinasa, la estreptoquinasa recombinante, el complejo acilado estreptoquinasa-plasminógeno, la estafiloquinasa y diferentes formas recombinantes del t-AP y del u-AP, que se utilizan para provocar una fibrinólisis terapéutica durante procesos tromboembólicos arteriales y venosos.

La inhibición y regulación del sistema fibrinolítico ocurre en diferentes niveles. La alfa 2 antiplasmina

inhibe directamente a la plasmina formada y los inhibidores del activador del plasminógeno (PAI) inhiben el t-AP y u-AP. El inhibidor de la fibrinólisis que se activa por la trombina (IFAT), elimina residuos de lisina del extremo carboxilo terminal de las moléculas de fibrina e impide la unión de t-AP y plasminógeno sobre la malla de fibrina.

## BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- Collen D. The Plasminogen(fibrinolytic) System. *Thrombosis Heamost* 1999;82(2): 259-70.
- Dalbäck B. Blood Coagulation. *Lancet* 2000;355:1637-3.
- Hoffman R (ed.). *Hematology basic: Principles and Practice*. Ed 2. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1995.
- Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskeva F, Greer JP, Rodgers GM (eds.). *Wintrobe's Clinical Hematology*. 10 ed. Baltimore: Williams & Willkins, 1999.
- Lijnen HR. Elements of the Fibrinolytic System. *Ann N Y Acad Sci* 2001;936:226-36.
- Mann KG. Biochemistry and Physiology of Blood Coagulation. *Thromb and Heamost* 1999;82(2):165-74.
- Miller JL. Blood platelets. En: Henry, J B ed. *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. Ed 19. Philadelphia: EB Saunders Co.; 1996. p. 701-718.
- Miller JL. Blood Coagulations and Fibrinolysis. En: Henry JB (eds.). *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. Ed 19. Philadelphia: EB Saunders Co; 1996. p. 719-47.
- Triplett D. Coagulation and Bleeding Disorders. Review and Update. *Clin Chem* 2000;48(8):1269-1269.

## **CONTENIDO**

---

**Introducción/ 323**

**Aspectos preanalíticos generales/ 324**

**Estudios de laboratorio para explorar la hemostasia/ 325**

Pruebas de laboratorio que exploran la hemostasia primaria/ 325

Pruebas de laboratorio que exploran la hemostasia secundaria/ 327

Pruebas de laboratorio que exploran la fibrinólisis/ 329

**Bibliografía recomendada/ 333**

### Capítulo 28



## LABORATORIO CLÍNICO EN LOS TRASTORNOS DE LA HEMOSTASIA

*Dr. Ariel de Jesús Collina Rodríguez  
Dra. Tania Carballo Treto  
Dr. Wilfredo Torres Iribar*

### RESUMEN

Las pruebas de laboratorio para estudiar las enfermedades que alteran la hemostasia de forma primaria o secundaria son múltiples y de gran importancia para el diagnóstico, seguimiento y control del paciente mediante tratamientos acertados. Las pruebas básicas del coagulograma, el tiempo de sangrado, el recuento de plaquetas, el tiempo de protrombina, el tiempo de tromboplastina parcial y el tiempo de trombina son pruebas de orientación que permiten estudiar, de manera integral, los diferentes componentes y compartimientos de la hemostasia, mientras que las pruebas especiales ayudan en la evaluación, de forma selectiva y específica, de los posibles factores o elementos afectados.

Para estudiar los trastornos de la hemostasia es necesario, además, comprender la fisiología y fisiopatología del sistema, y conocer algunos aspectos básicos sobre las pruebas de laboratorio como son: los factores preanalíticos, que influyen en los resultados; el fundamento de las principales pruebas, y las diferentes estrategias que se pueden llevar a cabo para explorar de manera adecuada al paciente y obtener la información deseada, en el momento necesario.

### INTRODUCCIÓN

Las pruebas de laboratorio para estudiar pacientes con trastornos en la hemostasia que conducen a hemorragias o trombosis, se han desarrollado de manera considerable. Varios han sido los factores claves:

1. La introducción de nuevas tecnologías que utilizan sustratos sintéticos con elevada sensibilidad y especificidad para medir la actividad de enzimas involucradas en los diferentes procesos de la hemostasia (activación e inhibición de la coagulación y fibrinólisis).
2. La aplicación de técnicas inmunoquímicas que permiten medir, con alta sensibilidad, la concentración de proteínas y productos de reacciones en la hemostasia.
3. La citometría de flujo, para medir proteínas o complejos de proteínas integrados a células en reposo o activadas.
4. Los estudios de ADN y ARN, para detectar modificaciones del genoma que se traducen en alteraciones de la hemostasia.
5. La automatización y estandarización de diferentes procedimientos que incluyen las pruebas clásicas, como el tiempo de protrombina (TP), tiempo de tromboplastina parcial activado (TPTA), dosificación de fibrinógeno (Fg) y tiempo de sangrado (TS), y las pruebas especiales, así como la estandarización del proceso preanalítico (obtención, preparación y conservación de las muestras) y del reporte de los resultados.

Todos estos factores han contribuido a un mayor conocimiento de la bioquímica, fisiología y fisiopatología de la hemostasia, y hoy permiten estudiar, con profundidad, pacientes con estas alteraciones.

Los estudios de laboratorio brindan evidencias más o menos potentes para confirmar una hipótesis médica



y definir un estado clínico o molecular. Este proceso de búsqueda debe ser orientado con la integración de la información clínica y los estudios de laboratorio, lo que permite utilizar, de manera adecuada, el arsenal de pruebas de laboratorio y obtener las respuestas necesarias para tomar decisiones médicas correctas, con el menor costo posible.

La exploración biológica mediante las pruebas de laboratorio, sigue a una minuciosa exploración clínica, en la cual se investiga: episodios hemorrágicos previos, su inicio, duración, gravedad y necesidad de transfusiones; respuesta a situaciones de estrés hemostático, como extracciones dentales, traumatismos, menstruación, embarazo, operaciones; localización de los sangrados, para lo que se tiene en cuenta que las alteraciones plaquetarias se manifiestan con petequias y equimosis en lugares de microtraumatismo y por hemorragias prolongadas en caso de laceración superficial, mientras que las deficiencias de factores de la coagulación deben sospecharse ante hemartrosis o hematomas profundos. También se debe investigar la existencia de epistaxis espontánea, gingivorragia, menstruaciones abundantes o hemorragia digestiva, y el uso de fármacos (aspirina, antiinflamatorios no esteroideos, anticonceptivos orales y anticoagulantes).

En la exploración física es necesario realizar una inspección cuidadosa de la piel, mucosa oral y articulaciones. Con esto se busca información clínica sobre las características particulares de un trastorno hemorrágico o trombótico, lo que nos orienta sobre el tipo de trastorno de la hemostasia, si la afectación está en la pared vascular, plaquetas, coagulación o fibrinólisis, si el trastorno tiene un origen congénito o adquirido, y ofrece información también sobre la respuesta a un tratamiento. La exploración física define en todos los casos, cuál es la ruta que se debe seguir con las pruebas de laboratorio.

De forma general, los estudios de la hemostasia se emplean con diferentes objetivos, entre los que se pueden mencionar:

1. Diagnóstico de enfermedades agudas (urgencia): tromboembolismo pulmonar (dímeros D), coagulación intravascular diseminada (dímeros D, PDF y AT), deficiencias de factores (factores V, II, VII, IX y X) y trombocitopenias agudas (plaquetas).
2. Diagnóstico de enfermedades hemorrágicas crónicas congénitas o adquiridas: hemofilia (factor VIII), enfermedad de von Willebrand (factores VIII y FvW), trombocitopenias crónicas (plaquetas) y trombocitopatías (estudios de la función plaquetaria).
3. Control y seguimiento del paciente mediante tratamientos médicos: con anticoagulantes orales (TP),

heparinas no fraccionadas (plaquetas, TPTA, heparinemia), fibrinolíticos (TT, Fg), mielosupresión en tratamiento con citostáticos (plaquetas), cirugía de hígado [tromboelastografía (TEG), factores de la coagulación, plaquetas y AT], cirugía de corazón con circulación extracorpórea [plaquetas, TEG, heparinemia y tiempo de coagulación activado (TCA)].

4. Determinar el riesgo de hemorragia o trombosis en pacientes que serán sometidos a tratamientos médicos o quirúrgicos: riesgo de sangrado por cirugía general (TP, TPTA y plaquetas), riesgo de trombosis venosa profunda (TVP) y tromboembolismo pulmonar (TEP) en pacientes sometidos a cirugías o en pacientes que llevan tratamientos con contraceptivos orales (factores de riesgo de hipercoagulación).
5. Determinación de factores de riesgo de trombosis: adquiridos (anticoagulante lúpico) y congénitos [deficiencias de proteínas C, S y AT; resistencia a la proteína C activada (RPCA) y mutación del factor V Leiden; alelo G20210A del gen de la protrombina; hiperhomocisteinemia; e incremento de los factores VIII y IX].
6. Diagnóstico molecular de enfermedades: hemofilias A y B, enfermedad de von Willebrand, disfibrinogenemias, etcétera.
7. Diagnóstico prenatal de enfermedades: hemofilias A y B, enfermedad de von Willebrand (estudio del genoma del feto y concentración de factores en sangre fetal).

Estas y otras aplicaciones de las pruebas de laboratorio para evaluar trastornos de la hemostasia, serán estudiadas con mayor amplitud en este capítulo y en los próximos.

## ASPECTOS PREANALÍTICOS GENERALES

Los estudios de la hemostasia se realizan en muestras de sangre anticoaguladas con citrato de sodio a una concentración de 0,109 mol/L, excepto para las pruebas de función plaquetaria, en que se recomienda una concentración de 0,129 mol/L. La relación anticoagulante/sangre es de 9 partes de sangre y 1 parte de anticoagulante.

La sangre debe ser obtenida de una vena, con jeringuilla plástica. Se recomienda que la sangre para estudios de la hemostasia se obtenga en el proceso de extracción, para el que se debe utilizar una segunda jeringuilla. Es importante ocasionar el mínimo de estasis venoso durante el proceso, o sea, utilizar solo el torniquete para puncionar la vena o no utilizarlo, si fuera posible.

Los materiales empleados para realizar las pruebas: tubos, pipetas, entre otros, deben ser inertes para la activación de la hemostasia; se recomienda que sean de plástico o vidrio recubierto con silicona. Por lo general, las pruebas se hacen sobre la sangre total o sobre plasma. Este puede ser rico en plaquetas (PRP) o pobre en plaquetas (PPP), para lo que la sangre se centrifuga a bajas revoluciones por minuto por corto tiempo para el primero, y a elevadas revoluciones por mayor tiempo para obtener el segundo. La centrifugación debe realizarse de forma rápida (antes de la hora de extraída la muestra) y los tubos deben estar tapados hasta que la muestra sea analizada. El PPP se puede conservar, de forma general, por períodos largos a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

En los resultados de estos exámenes influyen muchos factores preanalíticos, además de los mencionados: el tiempo desde que se extrae la muestra hasta que se centrifuga y hasta que se realiza la prueba, la temperatura de conservación, así como los medicamentos que interfieren o afectan diferentes pruebas (la aspirina en los estudios de función plaquetaria). Todos ellos se deben tener en consideración cuando se va a realizar un estudio de la hemostasia. Existen recomendaciones internacionales para estandarizar todos estos factores, de forma que las influencias sobre los componentes de la hemostasia que se miden, sean lo más semejantes posible.

## ESTUDIOS DE LABORATORIO PARA EXPLORAR LA HEMOSTASIA

No existen estudios de laboratorio que evalúen, de manera integral, todo el proceso de la hemostasia. Solo la tromboelastografía (TEG) es capaz de registrar los cambios dinámicos en la formación, consolidación y destrucción de un coágulo, mediante la medición de los cambios de la viscoelasticidad de la sangre, y brinda una información integral del proceso e información particular de la función de sus principales componentes: las plaquetas y las proteínas de la coagulación, y la fibrinólisis en la formación y destrucción del coágulo. Este estudio es útil cuando se requiere de información y de respuestas rápidas e integrales del funcionamiento del sistema hemostático, por ejemplo: durante las cirugías de hígado y corazón (para la reposición de componentes sanguíneos). Esta tecnología no es útil para diagnosticar alteraciones vasculares y de factores específicos, vinculados con alteraciones de la hemostasia en cualquiera de sus fases.

Para estudiar la hemostasia existen diferentes pruebas. Unas exploran la integridad del sistema y orientan hacia un tipo de trastorno. Estas son las pruebas globales

o de orientación, las cuales pueden estar afectadas por varios factores dentro de cada fase: hemostasia primaria, hemostasia secundaria y fibrinólisis y, por tanto, aportan una información general y poco específica. Otras definen el sitio afectado; estas son pruebas que confirman o diagnostican, al medir de forma específica un componente del sistema hemostático.

## PRUEBAS DE LABORATORIO QUE EXPLORAN LA HEMOSTASIA PRIMARIA

Las pruebas de laboratorio para estudiar la hemostasia primaria aparecen agrupadas en la tabla 3.36.

**Estudios de resistencia capilar. Método del Lazo o Rumpel Leede.** Se somete el sistema vascular, en una zona específica, a una presión positiva (esfigmomanómetro) o negativa (ventosa). Esto provoca estasis o succión durante un período en el que se cuenta el número de petequias que aparecen. Esta prueba es positiva en las púrpuras vasculares o angiopáticas, además, en un grupo de enfermedades que se caracterizan por manifestaciones hemorrágicas y por trastornos vasculares sin alteraciones de las plaquetas o de los mecanismos de la coagulación o fibrinólisis; también es positiva en trombocitopenias severas y trombopatías.

**Tiempo de sangrado. Método de Ivy.** Se mide el tiempo de sangrado desde que se realiza una herida estándar en la piel del antebrazo, hasta que se detiene la hemorragia. Primero se incrementa la presión vascular a un valor de 40 mmHg en el adulto, con un esfigmomanómetro. Es una prueba muy útil para estudiar pacientes con sospecha de trastornos plaquetarios o del factor de Von Willebrand. Su normalidad no excluye alteraciones de la hemostasia primaria. No es una prueba útil para evaluar el riesgo de sangrado quirúrgico en pacientes asintomáticos.

**Retracción del coágulo.** La acción combinada de las plaquetas y la malla de fibrina ocasionan la formación de un coágulo retráctil. Cuando el número de plaquetas o su función están disminuidos o existen trastornos cualitativos o cuantitativos del fibrinógeno, la sangre total sin anticoagulante gelifica en un coágulo cuya capacidad de contraerse está disminuida.

**Recuento de plaquetas.** El número de plaquetas se mide en sangre total anticoagulada. Se utilizan como anticoagulantes: sal disódica, dipotásica o tripotásica del ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) a una concentración de 1,5 mg/mL de sangre. Las plaquetas se pueden medir de forma manual con una cámara contadora de células con rayado de Neubauer modificado en un

microscopio de contraste de fases, o en un microscopio de campo brillante, previa dilución de la sangre 1/100 en oxalato de amonio al 1 %. Se llena la cámara y después de un tiempo en reposo, se realiza el recuento de las células en los cuadrados centrales de ambos lados de la cámara. El número total de células contadas se divide entre 2, y el resultado es el número de plaquetas multiplicado por  $10^9/L$ . Las plaquetas también se miden con equipos semiautomáticos o automáticos (contadores de células). Estos equipos, además de medir el número de plaquetas, registran otros parámetros con utilidad clínica, como son: el volumen medio de las plaquetas (VPM), los diferentes tamaños de las plaquetas mediante su índice de distribución (IDP) y por medio de histogramas donde se muestran las frecuencias de distribución de los diferentes volúmenes detectados por el equipo, también miden el número de plaquetas en el volumen total de sangre o plaquetocrito (PTC). Estos parámetros son útiles para un análisis integral de las plaquetas circulantes además de su concentración. El número de plaquetas oscila, por lo general, entre 150 y 450 multiplicado por  $10^9/L$ . Su incremento es nombrado trombocitosis y su disminución, trombocitopenia.

**Evaluación de las plaquetas en una lámina periférica.** En la lámina periférica es necesario evaluar cualquier alteración cuantitativa de las plaquetas, detectada por una cuenta manual o automatizada. Además, el estudio morfológico permite detectar anomalías de la forma y el tamaño de ellas, de los gránulos o de otras células de la sangre que orientan hacia una enfermedad específica (véase el capítulo de hemostasia normal).

**Adhesividad plaquetaria.** Es también conocida como prueba de retención de plaquetas o método de Salzman. En la actualidad, es una prueba poco utilizada por su poca estandarización. Es anormal en la enfermedad de vW y en trastornos cualitativos de las plaquetas.

**Adhesión y agregación plaquetaria en condiciones de altas velocidades de flujo sanguíneo (PFA-100).** Permite evaluar, *in vitro*, la función plaquetaria. La sangre anticoagulada es impulsada a elevada velocidad (entre 5 000 y 6 000 dyn/cm<sup>2</sup>) por medio de una apertura de 150  $\mu$ m de diámetro en el centro de una membrana impregnada con colágeno y en presencia de epinefrina o ADP. El tiempo de detención de

**Tabla 3.36** Pruebas de laboratorio para el estudio de la hemostasia primaria

Pruebas de laboratorio	Parámetros
<b>Orientación</b>	Resistencia capilar Tiempo de sangrado Retracción del coágulo Recuento de plaquetas Evaluación de las plaquetas en lámina periférica
<b>Función de las plaquetas</b>	Adhesividad plaquetaria Agregación plaquetaria Adhesión y agregación plaquetaria en condiciones de elevadas velocidades de flujo Disponibilidad de fosfolípidos plaquetarios para la coagulación sanguínea Liberación de ATP
<b>Activación de las plaquetas</b>	Beta tromboglobulina Factor plaquetario 4 Citometría de flujo (P selectina, GPIIb/IIIa, GPIb/VIX)
<b>Enfermedad de Von Willebrand</b>	Factor VIII Factor Von Willebrand antigénico Agregación con ristocetina Cofactor de ristocetina Composición de multímeros
<b>Anticuerpos antiplaquetarios</b>	IgG asociada con plaquetas Unión de anticuerpos a glicoproteínas de la membrana plaquetaria
<b>Otros</b>	Microscopia electrónica (ultraestructura de las plaquetas) Vida media plaquetaria Captación y liberación de serotonina marcada

flujo indica la capacidad funcional de las plaquetas. Es una prueba útil para estudiar pacientes que ingieren aspirina, así como los que presentan la enfermedad de Von Willebrand y otras trombopatías.

**Agregometría.** En condiciones controladas de temperatura y de agitación se le adiciona una sustancia agregante (ADP, epinefrina, colágeno, ácido araquidónico y trombina) a un plasma rico en plaquetas (PRP) o a sangre total anticoagulada (STA), y se mide el proceso de agregación de las plaquetas que registra el cambio en la transmisión de luz del PRP o de la impedancia (STA); ambos procedimientos transcriben la cinética del proceso de agregación y el porcentaje final. El ADP y la epinefrina provocan curvas bifásicas: la primera onda es ocasionada por el agregante y la segunda por la liberación del contenido de los gránulos. Los agonistas potentes como el colágeno y el ácido araquidónico definen una onda única.

**Liberación de ATP.** El ATP liberado por las plaquetas durante la activación plaquetaria puede ser medido con un sistema que involucra el complejo enzimático luciferina-luciferasa, oxígeno y ATP liberado por las plaquetas, que aporta la energía necesaria para la emisión de luz, lo cual es registrado y relacionado con la liberación del ATP. Por lo general se evalúa de conjunto con la agregación ante diferentes agonistas.

**$\beta$ -tromboglobulina en plasma.** Mide la hiperactividad plaquetaria. Cuando las plaquetas se activan, liberan el contenido de sus gránulos. La  $\beta$ -tromboglobulina es liberada y se incrementa su concentración en el plasma.

**Disponibilidad de fosfolípidos plaquetarios para la coagulación.** Durante el proceso de activación de las plaquetas, se exponen fosfolípidos de la parte interna en la parte externa, lo que permite la formación de los complejos procoagulantes tenaza y protrombina. El tiempo de coagulación en estos sistemas está relacionado con el correcto funcionamiento de las plaquetas.

### PRUEBAS DE LABORATORIO QUE EXPLORAN LA HEMOSTASIA SECUNDARIA

Las pruebas de laboratorio para el estudio de la hemostasia secundaria aparecen la tabla 3.37.

**Tiempo de protrombina (TP).** Evalúa la función de los factores de la vía extrínseca (VII, X, V y II y fibrinógeno). Al PPP descalcificado se le adiciona tromboplastina (factor hístico) y cloruro de calcio, y se mide el tiempo en que se forma el coágulo. Esta prueba se utiliza para controlar el rango terapéutico y la dosis de anticoagulantes orales. Los anticoagulantes orales interfieren la formación de vitamina K en su forma activa y disminuyen los niveles funcionales y antigénicos de los factores de la coagulación II, VII, IX y X. Para utilizar esta prueba con este objetivo se emplea un reactivo (tromboplastina) calibrado. El proceso de calibración implica la determinación del índice de sensibilidad internacional (ISI) de la tromboplastina, para ello se utiliza un reactivo de referencia. El resultado del TP del

**Tabla 3.37** Pruebas de laboratorio para el estudio de la hemostasia secundaria

Pruebas de laboratorio	Parámetros
<b>Orientación</b>	Tiempo de tromboplastina parcial activado Tiempo de protrombina Tiempo de trombina Tiempo de coagulación activado Tiempo de reptilasa
<b>Estudio de factores e inhibidores</b>	Concentración funcional o antigénica de los factores de la coagulación (II, V, VII, VIII, IX, X, XI, XII y fibrinógeno) Actividad del factor XIII Concentración funcional y antigénica de inhibidores naturales de la coagulación (AT, CIIIH, $\alpha$ 2 macroglobulina, PC, PS, PS libre) Inhibidores adquiridos de factores coagulantes Concentración de inhibidores de los factores VIII y IX en pacientes hemofílicos Heparinemia (titración con sulfato de protamina, ensayo cromogénico antifactor Xa)
<b>Activación de la coagulación</b>	Complejos trombina-AT Fragmentos 1, 2 de la protrombina Fibrinopéptidos A y B

paciente se expresa en la razón internacional normalizada (INR), mediante la relación entre el TP del paciente en segundos (TPP) y el TP medio de 30 plasmas normales (MNPT), y se emplea como exponente el ISI del reactivo utilizado (TPP/MNPT)<sup>ISI</sup>. El resultado en la INR disminuye las variaciones que surgen por las diferentes sensibilidades de las tromboplastinas al déficit de los factores, y facilita la interpretación de los resultados obtenidos con diferentes reactivos y en diferentes laboratorios. Todo ello permite un adecuado control analítico del rango terapéutico de los pacientes tratados con anticoagulantes orales. Los resultados del TP para estudiar los factores en otras situaciones clínicas, se expresa en segundos, en porcentaje o en la razón entre el TPP y el TP de un control (mezcla de plasmas normales).

#### **Tiempo de tromboplastina parcial activado.**

Evalúa los factores de la vía intrínseca y común (XII, XI, precalicreína, kininógeno de alto peso molecular, IX, VIII, X, V, II y fibrinógeno). Es muy sensible para los factores VIII y IX. A un PPP descalcificado se le adicionan fosfolípidos (cefalina), un activador de los factores de contacto (caolín, ácido elágico o celite) y cloruro de calcio, se mide el tiempo en que el plasma coagula, y esta es la expresión de la función de los factores involucrados. En un adulto, el tiempo en segundos está entre 20 y 45 segundos. Es el método utilizado para controlar el rango terapéutico de las heparinas no fraccionadas. Este debe ser establecido para cada laboratorio y se utiliza el valor del TTPA obtenido para el rango de 0,2 a 0,4 U/mL de heparina. Es frecuente que se prolongue en los pacientes con anticoagulante lúpico (AL).

**Tiempo de trombina.** La adición de trombina a un PPP descalcificado evalúa la función del fibrinógeno y la presencia de inhibidores de la fibrina, así como el tipo de heparina.

**Determinación de la concentración de fibrinógeno.** La adición de una elevada concentración de trombina a un PPP diluido, permite determinar la concentración de fibrinógeno funcional. Se puede medir la concentración antigénica del factor, con los anticuerpos policlonales o monoclonales contra la proteína. Con ambas pruebas se determina si la alteración es cualitativa o cuantitativa.

**Determinación de la concentración funcional de los factores de la coagulación II, V, VII, VIII, IX, X, XI y XII. Métodos coagulométricos.** Se utiliza una mezcla de PPP problema y plasma sustrato que aporta todos los factores excepto el que se desea medir. Se realiza entonces un TP (II, VII, V y X) o TTPA

(XII, XI, IX y VIII) previa preparación de una curva de calibración con plasmas sustratos y plasmas normales y se expresa el nivel de actividad, en porcentaje. También se pueden emplear métodos cromogénicos, en los cuales el factor que se mide ataca a un péptido sintético (sustrato) acoplado a un cromógeno. Este último es liberado y provoca un color que se mide en un espectrofotómetro.

#### **Determinación de la actividad del factor XIII.**

Se evalúa la resistencia o insolubilidad de un coágulo de fibrina en una solución de urea 5M o ácido monocloacético al 1 %.

**Determinación de la concentración funcional y antigénica de inhibidores naturales de la coagulación (AT, CIIIH,  $\alpha$ 2 macroglobulina, PC, PS y PS libre).** La evaluación funcional se realiza mediante el uso de sustratos cromogénicos sintéticos sobre los cuales actúa, de forma específica, la proteína que se mide, o mediante métodos coagulométricos con los que la acción de la proteína se determina por la prolongación del tiempo de coagulación.

**Determinación de la presencia de inhibidores adquiridos de factores coagulantes.** Los inhibidores pueden ser específicos contra un factor (inhibidores contra el factor VIII en hemofílicos A) o inhibidores de interferencia (anticoagulante lúpico). Su estudio se inicia cuando ocurre una prolongación del TP o del TTPA, se realiza una mezcla con partes iguales de PPP del paciente y plasma normal; si la mezcla no corrige la prolongación del tiempo de coagulación o lo extiende (efecto cofactor), estamos en presencia de un inhibidor.

**Determinación de la concentración de inhibidores de los factores VIII y IX en pacientes hemofílicos.** Se mezcla PPP del paciente y plasma normal, y se determina la actividad del factor VIII o XI. Luego se compara esta con un control incubado, de manera simultánea, durante 2 horas a 37 °C. La diferencia entre ambos permite medir la concentración del inhibidor en unidades Bethesda. La disminución por el plasma problema en el 50 % de la actividad de factor VIII residual, indica la presencia de una unidad Bethesda de inhibidor.

El diagnóstico molecular forma parte de las estrategias actuales para evaluar diferentes enfermedades de la hemostasia. Los estudios de genética molecular indirectos y directos para determinar la segregación de polimorfismos, marcadores genéticos o detectar mutaciones en pacientes con alteraciones de la hemostasia (hemorrágicas o trombóticas) o en familias, forman parte de estas estrategias. Las enfermedades más frecuentes para las que se utilizan estas técnicas son las hemofilias,

enfermedad de vW, otras deficiencias de factores, factor V Leiden en pacientes con resistencia a la proteína C activada (RPCA) y polimorfismo G20210A en el gen de la protrombina.

PRUEBAS DE LABORATORIO  
QUE EXPLORAN LA FIBRINÓLISIS

Las pruebas de laboratorio para el estudio de la fibrinólisis aparecen en la tabla 3.38.

**Tiempo de lisis del coágulo de sangre total diluida.** Es una pesquisa en la cual la sangre anticoagulada se coagula con trombina y, luego, es diluida, para mantener la proporción de los factores fibrinolíticos y acortar el tiempo de lisis del coágulo. Es una prueba muy inespecífica, que se altera o acorta en estados fibrinolíticos y cuando existe una disminución de la actividad antiplasminica.

**Tiempo de lisis del coágulo de euglobulinas.** El plasma es mezclado con una solución ácida para precipitar una fracción de este llamada euglobulínica, rica en fibrinógeno, plasminógeno y activadores del plasminógeno, y pobre en inhibidores o antiplasminas. Este precipitado es redisoluto en una solución tampón y luego coagulado por recalcificación. El tiempo de lisis de este coágulo es inversamente proporcional a la actividad fibrinolítica plasmática. Un tiempo acortado indica la presencia de plasmina, de activadores del plasminógeno o ambos.

**Actividad fibrinolítica en placas de fibrina.** Se adiciona el material que se va a estudiar (plasma, euglobulina, orina, etc.) sobre la superficie de un coágulo de fibrina que recubre el fondo de una placa de Petri y se mide el área de digestión de la fibrina después de la incubación. Permite estudiar la presencia de plasmina, de activadores y de inhibidores, de manera semicuantitativa.

**Complejos solubles.** Son complejos formados por la unión de fragmentos de la degradación del fibrinógeno y la fibrina, y los monómeros de fibrina. Es un indicador de hipercoagulabilidad e hiperfibrinólisis, y también muestra el grado de inhibición de la acción de la fibrina por los PDF. Se emplean diferentes técnicas, los métodos de gelación o de paracoagulación utilizan etanol o sulfato de protamina y se basan en la capacidad de estas sustancias de modificar la solubilidad de los complejos que se agregan o precipitan. Existen métodos de aglutinación que utilizan eritrocitos tanados recubiertos con monómeros de fibrina que aglutinan ante la presencia de complejos solubles. Indica acción trombínica y plasmínica.

**Productos de degradación del fibrinógeno y la fibrina (PDF).** La acción de la plasmina sobre el fibrinógeno y la fibrina provoca una serie de fragmentos (véase el acápite sobre fibrinólisis en hemostasia normal) que circulan en el plasma del paciente y aglutinan partículas de látex recubiertas con anticuerpos antifibrina. Es un marcador importante de fibrinólisis aumentada, pero no delimita entre un proceso secundario a la generación incrementada de trombina y un proceso primario. Es de utilidad para el diagnóstico de una coagulación intravascular diseminada (CID) y también para diagnosticar procesos tromboticos agudos (tromboembolismo pulmonar (TEP) y trombosis venosa profunda (TVP).

**Dímeros D.** Cuando la fibrina estabilizada por el factor XIII es atacada por la plasmina, libera fragmentos diferentes a los liberados por el fibrinógeno y los monómeros de fibrina (véase el acápite sobre fibrinólisis en hemostasia normal). Se mide, de forma semicuantitativa o cuantitativa, mediante diferentes inmunoensayos (ELISA, nefelometría y látex) que utilizan anticuerpos monoclonales dirigidos contra el dímero D con elevada especificidad. La presencia de D-D es indicativa, en primer lugar, de trombosis (generación de trombina

Tabla 3.38 Pruebas de laboratorio para el estudio de la fibrinólisis

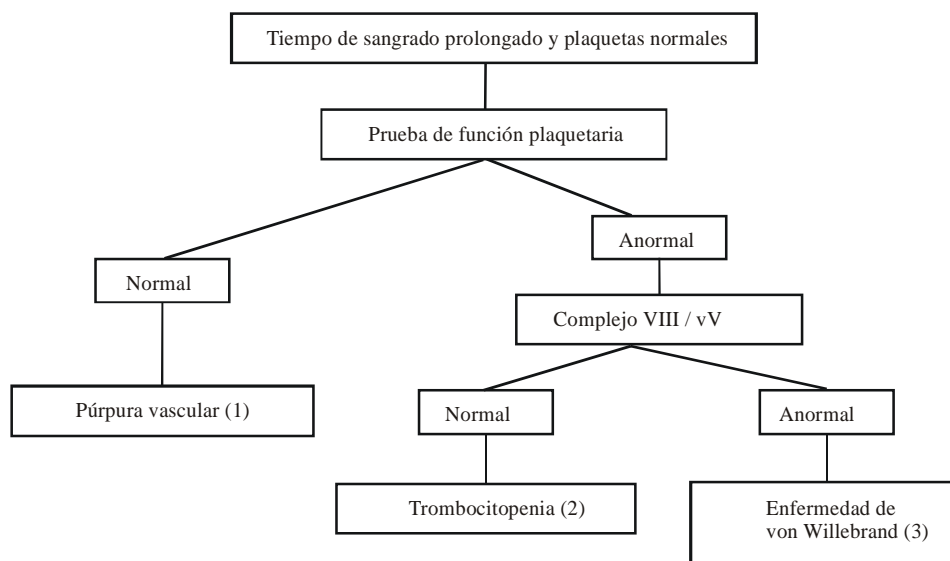
Pruebas de laboratorio	Parámetros
Orientación	Tiempo de lisis del coágulo de sangre total Tiempo de lisis del coágulo de euglobulina Complejos solubles Productos de degradación del fibrinógeno y la fibrina (PDF) Dímeros D
Estudio de factores	Plasminógeno funcional, antigénico o ambos $\alpha 2$ antiplasmina Activador hístico del plasminógeno (t-AP) Inhibidor del t-AP (PAI-1)

incrementada) y, en segundo lugar, de fibrinólisis incrementada. Es una prueba muy útil para el diagnóstico de TEP, TVP y CID. Permite definir en un proceso de hiperfibrinólisis, su origen primario o secundario a la trombosis.

En la actualidad, se pueden medir, desde el punto de vista funcional y antigénico, los diferentes componentes individuales del sistema fibrinolítico, plasminógeno, activadores (t-AP) e inhibidores (PAI).

Los resultados que se obtienen con las pruebas de orientación determinan los estudios que se deben realizar. Con el uso de estas pruebas generales, se pueden seguir diferentes esquemas de aproximación al diagnóstico:

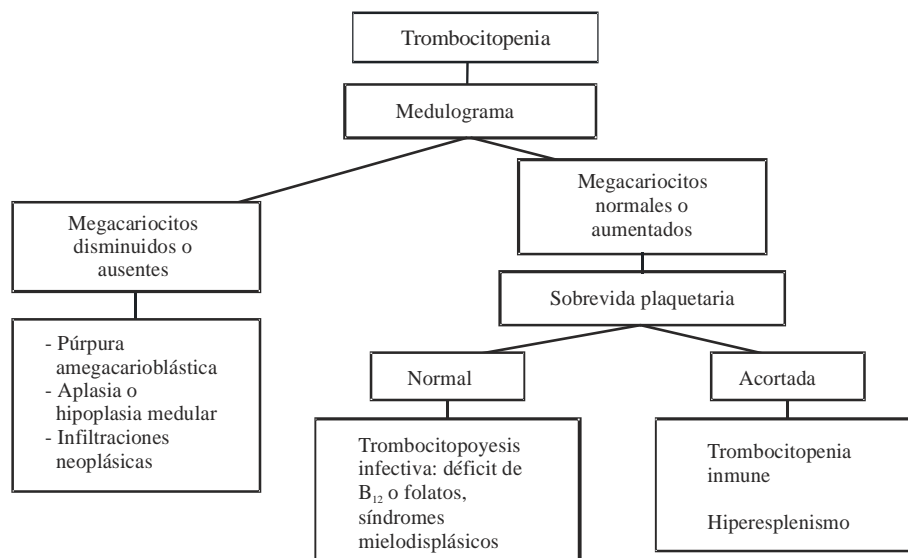
1. Si el TS está prolongado y el recuento de plaquetas es normal, deben estudiarse como posibles causas la enfermedad de vW, las trombopatías y las púrpuras vasculares (figura 3.84). Si las plaquetas están disminuidas se evalúa la producción y la supervivencia de las plaquetas (figura 3.85).



#### Leyenda

1. Comienzo temprano: síndromes de Osler-Rendu-Weber y Ehlers-Danlos. Comienzo tardío: amiloidosis y vasculitis.
2. Descartar: ingestión de aspirina, uremia o síndromes mieloproliferativos. Después, considerar causas congénitas.
3. Reconsiderar la historia familiar.

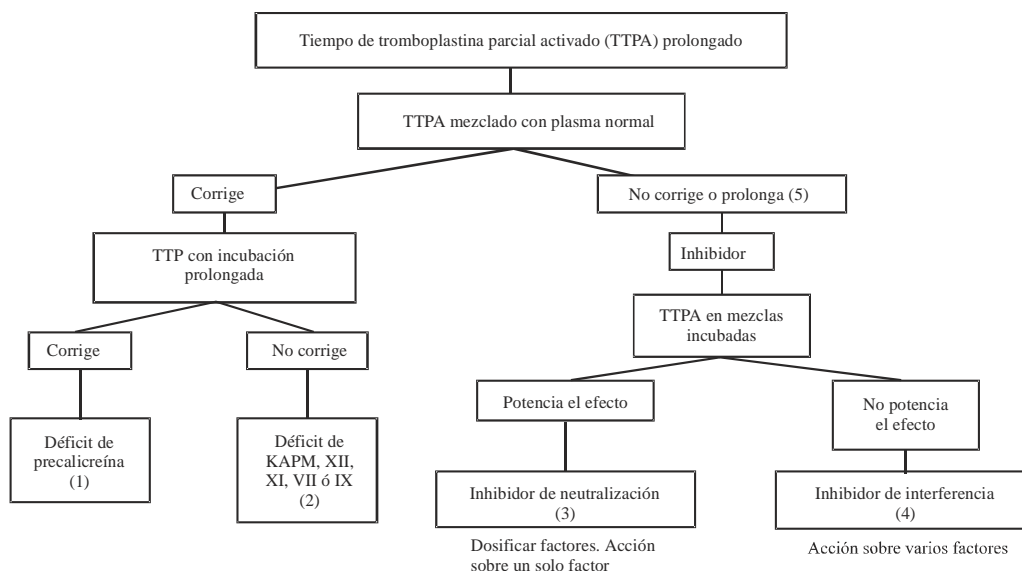
**Figura 3.84** Tiempo de sangrado prolongado y plaquetas normales.



**Figura 3.85** Trombocitopenia.

2. Cuando el TTPA está prolongado y el resto de los estudios son normales, está indicado repetir el estudio, que se mezclen a partes iguales el plasma problema (PP) con el plasma normal (PN) y se evalúen entonces los factores o inhibidores según los resultados (figura 3.86). Si solo el TP está prolongado, se sigue el mismo esquema que para el

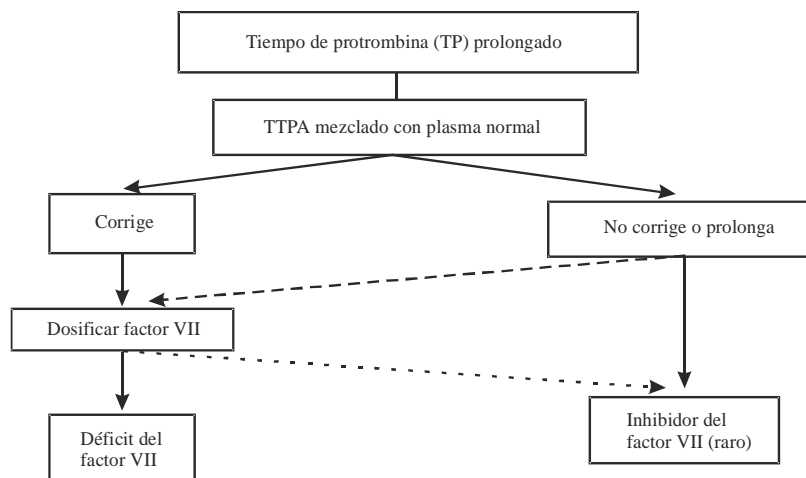
TTPA pero con el TP, y se repite el estudio con mezclas PP-PN (figura 3.87). Cuando se tienen alteraciones en el TTPA y en el TP, las causas pueden ser variadas. La más frecuente es la deficiencia por consumo de factores, como se observa en la coagulación intravascular diseminada y en las enfermedades hepáticas (figura 3.88).



#### Leyenda

1. Generalmente asintomático.
2. Los tres últimos provocan hemorragias.
3. Más frecuente: inhibidor del factor VIII.
4. Considerar: heparina contaminante.
5. Anticoagulante lúpico.

**Figura 3.86** Tiempo de tromboplastina parcial activado prolongado.

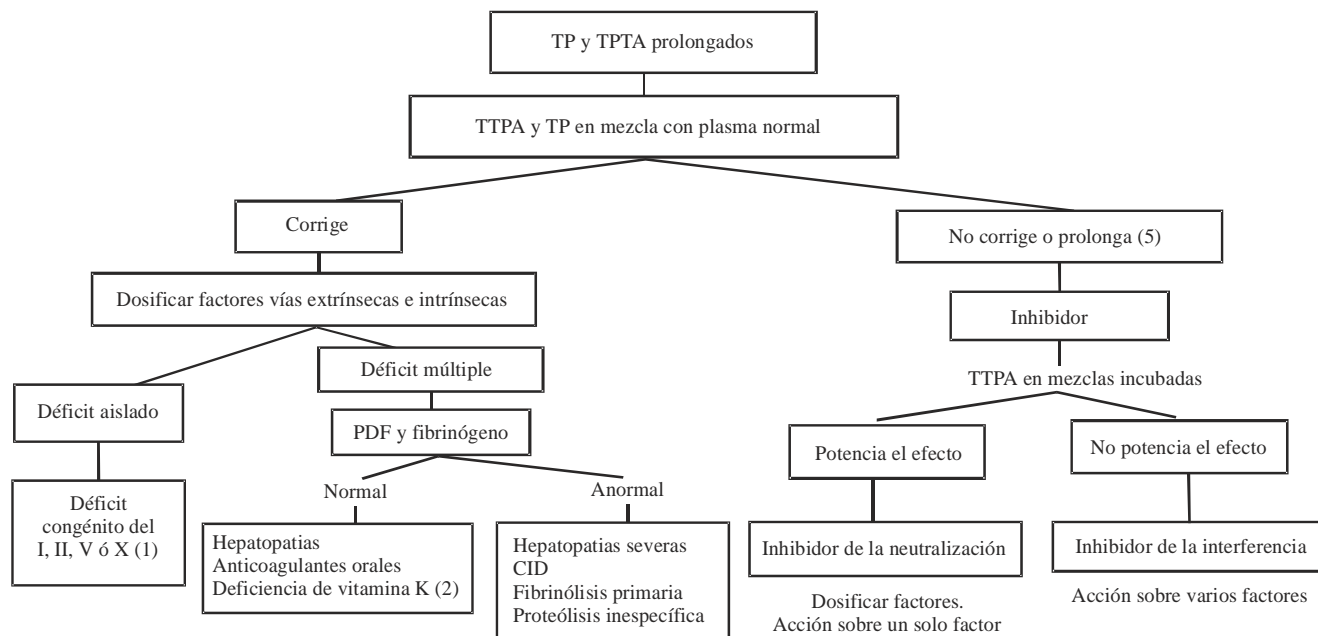


**Figura 3.87** Tiempo de protrombina prolongado.



3. Las alteraciones del TT orientan como causas más frecuentes de los problemas hemorrágicos: hipofibrinogemias, inhibidores tipo heparina u otros inhibidores (figura 3.89). Cuando es un paciente con cuadros hemorrágicos espontáneos o que, luego de traumas o cirugías, no se encuentren

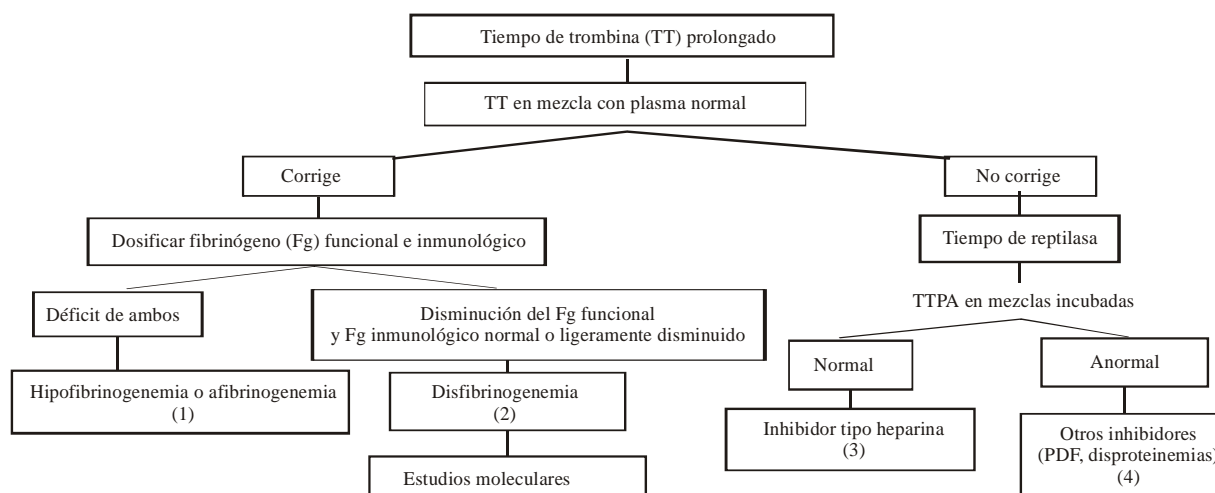
alteraciones de las pruebas mencionadas, se deben evaluar la concentración y la función del factor XIII (figura 3.90) o la hiperactividad del sistema fibrinolítico. Los estudios de los estados de hipercoagulabilidad aparecen en el capítulo sobre las trombofilias.



#### Leyenda

1. Reconsiderar historia familiar. Déficit adquirido del factor X: amiloidosis.
2. Causas múltiples.

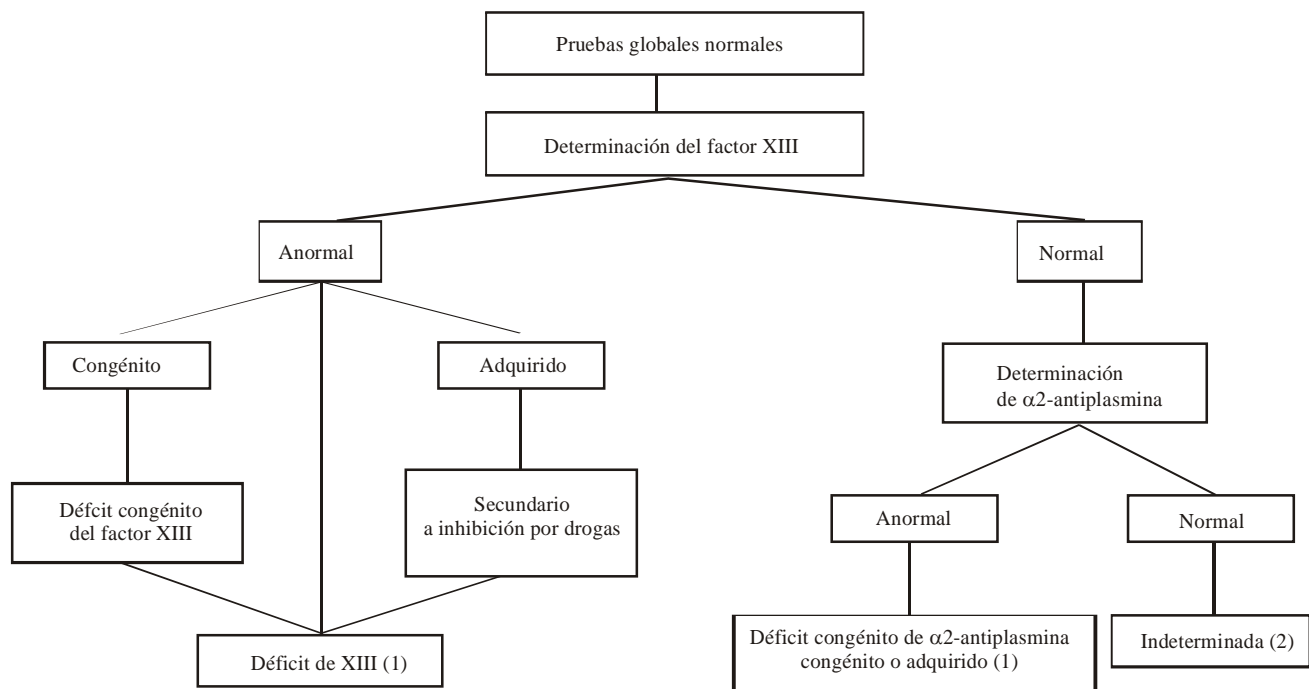
**Figura 3.88** Tiempo de tromboplastina parcial activado y tiempo de protrombina prolongados.



#### Leyenda

1. Reconsiderar la historia familiar.
2. Considerar hepatopatías.
3. Endógeno, terapéutico.
4. Considerar mieloma u otra hipergammaglobulinemia.

**Figura 3.89** Tiempo de trombina prolongado.



#### Leyenda

1. Raros.

2. Considerar causa local de sangrado.

**Figura 3.90** Pruebas normales.

## BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- Castillo R, Ordinas JC, Vicente V, Rocha E. Enfermedades de la Hemostasia. En: Rozman C ed. Medicina Interna. 13<sup>ra</sup>. ed. Madrid: Mosby-Doyma, 1995; p.1770-804.
- Hoffman R (ed.). Hematology basic: principles and practice. 2 ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1995.
- Kordich LC, Sánchez JC, De Campos C. Manual de Hemostasia y Trombosis, Grupo CLAHT. 2<sup>da</sup> ed. Argentina, 1990.
- Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskeva F, Greer JP, Rodgers GM (eds.). Wintrobe's Clinical Hematology. 10 ed. Baltimore: Williams & Willkins, 1999.

- Miller JL. Blood platelets. En: Henry JB ed Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Ed 19. Philadelphia: EB Saunders Company, 1996; p. 701-18.
- Miller, JL. Blood Coagulations and Fibrinolysis. En: Henry JB ed. Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 19 ed. Philadelphia: EB Saunders Co; 1996.p. 719-747.
- Powers LW. Diagnostic Hematology. Clinical and Technical Principles. San Luis, Missouri: The C.V. Mosby Co, 1989.
- Triplett D. Coagulation and bleeding disorders: Review and Update. Clin Chem 2000; 48(8):1269.
- Walenga JM, Fareed J. Automation and quality control in the coagulation laboratory. Clin Lab Med 1994; 14(4):709-28.

## **CONTENIDO**

---

**Púrpuras vasculares o angiopáticas/ 335**

**Trombocitopenias/ 337**

**Trombocitopatías/ 340**

**Enfermedad de von Willebrand/ 341**

**Hemofilias/ 343**

Hemofilia A/ 343

Hemofilia B/ 344

**Coagulación intravascular diseminada/ 344**

**Bibliografía recomendada/ 347**

### Capítulo 29



## ENFERMEDADES HEMORRÁGICAS

*Dr. Arlel de Jesús Collina Rodríguez  
Dra. Tania Carballo Treto  
Dr. Wilfredo Torres Iribar*

### RESUMEN

Las principales alteraciones de la hemostasia primaria ocurren por trombocitopenias, trombopatías y por la enfermedad de von Willebrand. Se clasifican en centrales y periféricas.

Las trombocitopatías son trastornos caracterizados por alteraciones de las funciones de las plaquetas, que afectan su participación en la formación del tapón hemostático primario y en la hemostasia secundaria, lo cual provoca manifestaciones hemorrágicas más o menos severas.

La enfermedad de von Willebrand es el trastorno hemorrágico congénito más frecuente. Su prevalencia está entre el 1 y el 3 % aproximadamente, pero los casos de relevancia clínica son pocos (de 100 a 200 por millón de habitantes).

Las hemofilias A y B son causadas por la ausencia o disminución de la función de los factores VIII y IX, respectivamente, y son el resultado de mutaciones en los genes que codifican estos factores. La frecuencia de la hemofilia A se estima en aproximadamente 1 paciente por 5 000 a 10 000 varones y la hemofilia B en 1/5 de la anterior.

La coagulación intravascular diseminada es un mecanismo intermedio que se desarrolla en muchas situaciones clínicas, debido a la activación incontrolada de los mecanismos de la hemostasia en conjunto con la inflamación, la isquemia y la necrosis hística, que ocasionan un daño orgánico que puede ser irreversible.

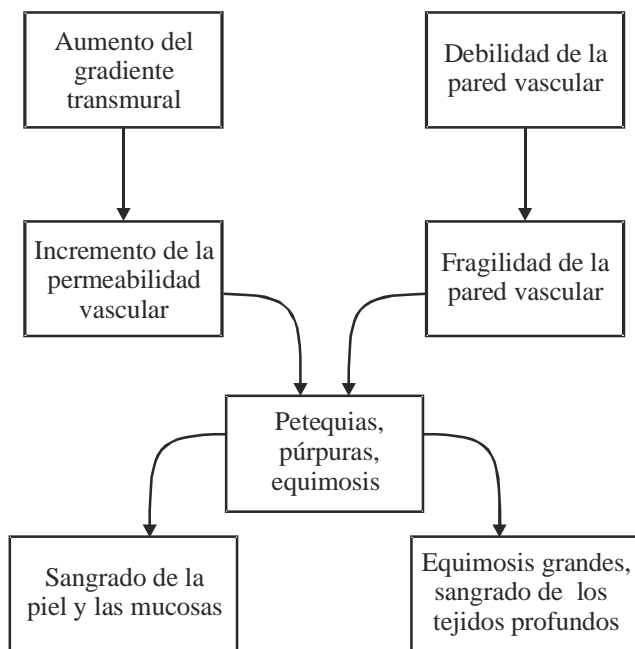
### PÚRPURAS VASCULARES O ANGIOPÁTICAS

Las púrpuras vasculares o angiopáticas son trastornos de la pared vascular que provocan hemorragias espontáneas o por traumatismos ligeros, en la piel, las mucosas y los tejidos subcutáneos. Existen varias formas de presentación: las petequias, que son lesiones menores de 2 mm de diámetro; las púrpuras, entre 2 mm y 1 cm; y las equimosis, mayores de 1 cm. Estos trastornos también se presentan con sangrados de mucosas, gingivorragias, epistaxis, hematurias, metrorragias, hematemesis, melenas, etc. Es necesario diferenciarlas de las telangiectasias, provocadas por capilares superficiales dilatados, y del eritema que es el enrojecimiento de la piel por el aumento del flujo capilar. En ambos casos, las lesiones desaparecen con la

presión, lo cual se puede demostrar al oprimirlas con una lámina portaobjeto de vidrio.

Los mecanismos involucrados en la fisiopatogenia de las púrpuras son (figura 3.91):

1. La incapacidad del sistema hemostático para reparar los daños vasculares que aparecen por traumas en la microvasculatura.
2. La debilidad estructural de la pared vascular o de los tejidos que rodean los vasos.
3. Estas lesiones también se observan cuando se incrementa el gradiente transmural. Por ejemplo, cuando aumenta la presión intratorácica durante el vómito o la tos pueden aparecer petequias en las zonas de la cara, el cuello y el tórax superior, y cuando existe una insuficiencia valvular venosa surgen estas lesiones en las extremidades inferiores.



**Figura 3.91** Mecanismos de producción de las púrpuras vasculares.

Las púrpuras pueden ser trastornos congénitos o adquiridos, los primeros son el resultado de malformaciones vasculares o alteraciones en el tejido conectivo, mientras que los segundos se pueden deber a procesos inmunológicos, afectaciones en los tejidos de soporte, causas mecánicas o pueden tener un origen no determinado.

Las causas de púrpuras por afectaciones vasculares son múltiples. Desde el punto de vista clínico se clasifican en púrpuras palpables y no palpables, por la posibilidad de determinar este signo, de manera directa, en el examen físico (cuadro 3.2). Aunque los mecanismos específicos que ocasionan este signo no están bien determinados, la asociación de una reacción inflamatoria vascular o perivascular como causa directa de un aumento de la permeabilidad vascular con salida de proteínas plasmáticas y el desarrollo de un proceso de coagulación extravascular con depósitos de fibrina, es una posible hipótesis para explicar la palpabilidad de la lesión hemorrágica.

**Cuadro 3.2** Clasificación de las púrpuras vasculares

<b>Congénitas</b>	
Malformaciones vasculares	<ul style="list-style-type: none"> <li>Telangiectasia hemorrágica hereditaria o enfermedad de Rendu-Osler</li> <li>Angiokeratoma <i>corporis diffusum</i> o enfermedad de Fabry</li> <li>Sarcoma de Kaposi</li> </ul>
Alteraciones del tejido conectivo	<ul style="list-style-type: none"> <li>Síndrome de Ehlers-Danlos</li> <li>Síndrome de Grönblad-Strandberg</li> <li>Síndrome de Marfan</li> <li>Seudoxantoma elástico</li> <li>Osteogénesis imperfecta</li> </ul>
<b>Adquiridas</b>	
Inmunológicas	<ul style="list-style-type: none"> <li>Enfermedad de Shönlein-Henoch</li> <li>Autoinmunización eritrocítica o Gardner-Diamond</li> <li>Secundaria a medicamentos</li> <li>Hiperglobulinemia de Waldeström</li> </ul>
Disminución del tejido de soporte	<ul style="list-style-type: none"> <li>Escorbuto</li> <li>Senil de Bateman y caquética</li> <li>Por glucocorticoides</li> <li>Amiloidosis</li> </ul>
Mecánicas	<ul style="list-style-type: none"> <li>Facticia</li> <li>Ortostática y mecánica</li> <li>Hematoma digital paroxístico</li> </ul>

En muchos trastornos adquiridos y hereditarios, la disminución de la integridad mecánica de la microvasculatura y de los tejidos de soporte es el mecanismo principal para el surgimiento de las hemorragias. Las púrpuras seniles, la deficiencia de vitamina C (escorbuto) y el uso excesivo de glucocorticoides, están entre los trastornos adquiridos más frecuentes que tienen esta causa; mientras que las alteraciones del tejido conectivo como el síndrome de Ehlers-Danlos y el síndrome de Grönblad-Stradberg, el síndrome de Marfan, el seudoxantoma elástico, la osteogénesis imperfecta y la amiloidosis, están entre los trastornos congénitos más frecuentes.

El síndrome de sangrado fácil que se observa en la mujer (púrpura simple) se relaciona con períodos de cambios hormonales (menstruación y menopausia) y con la ingestión de medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE).

Los traumatismos vasculares son las causas más frecuentes de las púrpuras. Estas también pueden aparecer durante procesos infecciosos y son ocasionadas por mecanismos complejos, por ejemplo, las infecciones por estreptococos, la enfermedad meningocócica con meningococemia, otras septicemias, etcétera.

Pueden aparecer púrpuras debido a embolismos y trombosis, hipercalcemia, en neoplasias que infiltran la piel, durante hemorragias intraabdominales, con la administración de anticoagulantes orales, en la hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) y en el síndrome antifosfolipídico, entre otras causas.

La púrpura facticia consiste en lesiones purpúricas que son provocadas, de manera deliberada, por autoflagelación, succión, etc. Un adecuado examen físico e interrogatorio permiten determinar la posible causa.

La púrpura de Schönlein-Henoch (anafilactoide o alérgica) es una vasculitis o endotelitis inflamatoria (alérgica o inmunológica) leucocitoclástica, de causa desconocida, que afecta los precapilares, capilares y poscapilares. Se desencadena por procesos muy diversos: infecciones, vacunas, alimentos y medicamentos, entre otras.

La telangiectasia hemorrágica hereditaria (enfermedad de Rendu-Osler) es una angiopatía neoformativa de telangiectasias circunscritas que al romperse determinan síndromes hemorrágicos locales. Las epistaxis son muy comunes, en ocasiones intensas, que surgen en la infancia temprana. Las hemorragias frecuentes llevan a la anemia ferropénica.

Las pruebas de la hemostasia ayudan al diagnóstico en estas enfermedades, por exclusión de afectaciones primarias de las plaquetas (trombocitopenias y trombopatías) y de los factores de la coagulación. La

ausencia de trombocitopenia y la normalidad de las pruebas generales de la hemostasia son fundamentales para orientar sobre alguna de estas causas de hemorragias, que se expresan en piel y mucosas y son resultado de trastornos propios de los vasos sanguíneos. En ocasiones, los trastornos vasculares se asocian también con trastornos de la función plaquetaria y con alteraciones en los mecanismos de la coagulación y fibrinólisis, como la coagulación intravascular diseminada.

La prueba de resistencia capilar (prueba de lazo o petequiómetro) solo es indicada para evaluar algunos procesos purpúricos, sobre todo en niños, cuando se sospecha una afectación de la integridad mecánica de los vasos sanguíneos y el resto de las pruebas son normales. Una vez que se establece la presencia de un trastorno vascular, los estudios indicados están fuera de los laboratorios de hemostasia (biopsias, histoquímica e inmunohistoquímica, entre otros.)

## TROMBOCITOPENIAS

La trombocitopenia es la disminución del número de plaquetas circulantes por debajo de  $100 \times 10^9/L$ . Aunque los valores de referencia de la normalidad están entre  $140$  y  $400 \times 10^9/L$ , muchos sujetos sanos tienen una concentración de plaquetas entre  $100$  y  $140 \times 10^9/L$ , por lo que cifras inferiores a  $100 \times 10^9/L$  se consideran una trombocitopenia franca. Las trombocitopenias se clasifican, según su intensidad y riesgo de sangrado, en: moderadas, cuando las plaquetas están entre  $60$  y  $100 \times 10^9/L$ ; marcadas, entre  $20$  y  $60 \times 10^9/L$ ; y graves, menos de  $20 \times 10^9/L$ .

Las trombocitopenias pueden ser agudas o crónicas y deberse a alteraciones de la médula ósea (centrales) o a afecciones de las plaquetas circulantes (periféricas), es decir, por uno o varios de los tres mecanismos siguientes: disminución de la producción en la médula ósea, incremento del secuestro en el bazo y destrucción acelerada de las plaquetas (cuadro 3.3).

Para determinar el origen de las trombocitopenias en cada paciente deben ser estudiados detenidamente: la extensión de sangre periférica, el aspirado de médula ósea y la biopsia, de conjunto con una evaluación del tamaño del bazo por palpación, ultrasonografía o tomografía axial computarizada (TAC).

Algunos pacientes tienen una seudotrombocitopenia ocasionada por aglutinación de las plaquetas o adherencia de estas a los leucocitos en sangre anticoagulada con EDTA. En estos casos, la cuenta de plaquetas es normal en extensiones preparadas con sangre capilar sin aditivo y en cuentas de sangre anticoagulada con citrato de sodio.

**Cuadro 3.3** Causas de las trombocitopenias

Trombocitopenias agudas	
Centrales	
Amegacariocíticas	Depresión medular por medicamentos y alcohol, radiaciones Infiltración de la médula ósea por células neoplásicas, leucemias, cáncer metastásico Fibrosis
Periféricas	
Inmunes	Secundaria a infecciones virales en niños Secundaria a fármacos (quinidina, sales de oro, heparinas) Púrpura trombocitopénica autoinmune (PTI) Postransfusionales Neonatales: hijos de madres con PTI Incompatibilidad fetomaterna
No inmunes	Trombosis Púrpura trombocitopénica trombótica Síndrome hemolítico urémico Coagulación intravascular diseminada (CID) Pérdida de plaquetas. Hemorragias severas Sepsis severa Hipotermia
Trombocitopenias crónicas	
Centrales	
Amegacariocíticas	Aplasia de los Radios Síndrome de Fanconi Infiltración medular Trombocitopenia cíclica Trombocitopenia hereditaria Fibrosis
Idiopática	
Megacariocíticas	Volumen plaquetario aumentado Síndrome de Bernard-Soulier Anomalía de May-Hegglin Anemia megaloblástica
Volumen plaquetario normal	Síndrome de Chediak-Higashi
Déficit de trombopoyetina	Volumen plaquetario disminuido Síndrome de Wiskott-Aldrich
Periféricas	
Inmunes	Púrpura trombocitopénica autoinmune (PTI) Lupus eritematoso Síndrome de Evans Síndrome de inmunodeficiencia adquirida Síndrome antifosfolipídico Hipertiroidismo Trasplante de células hematopoyéticas Enfermedad de injerto contra huésped Hemoglobinuria paroxística nocturna
No inmunes	CID crónica Seudo von Willebrand Hiperesplenismo Cirrosis hepática Cavernomatosis Atrapamiento en el hígado

En las trombocitopenias centrales es frecuente observar la disminución o ausencia de megacariocitos en la médula y una vida media plaquetaria normal. Esto se debe a una depresión medular por infecciones, a agentes tóxicos, medicamentos y sustancias radiactivas, también se deprime el sistema megacariopoyético por invasión de la médula por células anormales y, por último, por insuficiencias medulares. En todos estos casos ocurren alteraciones de las células progenitoras en diferentes estadios de diferenciación. Es habitual en estos pacientes encontrar también alteraciones de las líneas eritropoyéticas (eritrocitos) y mielopoyéticas (leucocitos).

Son infrecuentes las trombocitopenias centrales con presencia de megacariocitos. Estas aparecen en la anemia por deficiencias de vitamina B<sub>12</sub> y folatos, los síndromes dismielopoyéticos, los síndromes de Wiskott-Aldrich, Bernard-Soulier y en la anomalía de May-Hegglin y otros.

En las trombocitopenias periféricas, los megacariocitos de la médula ósea están normales o aumentados y la vida plaquetaria aparece acortada. Estas afecciones pueden ser resultado de:

1. Un consumo incrementado de plaquetas, como sucede en las sepsis, los procesos microangiopáticos (síndrome hemolítico-urémico, la púrpura trombocitopénica trombótica), la coagulación intravascular diseminada, las trombosis extensas, las hemorragias severas, los procedimientos médicos como la cirugía con circulación extracorpórea, la hemodiálisis, la cirugía hepática y en pacientes con válvulas cardíacas.
2. Secuestro en el bazo (hiperesplenismo): se incrementa el grupo plaquetario esplénico a expensas del grupo periférico. Las causas más frecuentes son: la hipertensión portal, secundaria a enfermedades hepáticas y por infiltración del bazo en procesos mieloproliferativos y linfoproliferativos, y en enfermedades de almacenamiento (Gaucher) (véase el capítulo de hiperesplenismo). Por lo general se asocian con hiperconsumo y destrucción inmunológica de plaquetas.

3. Destrucción inmunológica: el mecanismo es una destrucción acelerada, igual que sucede en los procesos de hiperconsumo, pero en este caso las plaquetas son cubiertas por inmunoglobulinas, complejos inmunes o complemento, y aclaradas de la circulación por fagocitos mononucleares en el bazo o en otros tejidos. Pueden ser agudas o crónicas. Las formas agudas casi siempre son secundarias a infecciones o a ingestión de medicamentos, mientras que las formas crónicas aparecen sin una causa aparente.

### Púrpura trombocitopénica inmunológica

La púrpura trombocitopénica inmunológica (PTI) presenta 2 formas clínicas: aguda, que ocurre sobre todo en la infancia; y crónica, que predomina en la edad adulta. Las características clínicas de ambas formas difieren (tabla 3.39).

En las formas agudas, por lo general existe el antecedente de una infección viral y casi siempre remiten sin tratamiento, mientras que las formas crónicas tienen un comienzo insidioso y rara vez remiten sin tratamiento. Los pacientes con ambas formas presentan púrpuras cutáneas, hemorragias en mucosas y trombocitopenias severas menores de  $20 \times 10^9/L$ . También pueden aparecer complicaciones graves como hemorragias intracraneales, aunque son poco frecuentes.

El hemograma muestra una aislada trombocitopenia, acompañada de un incremento del volumen plaquetario medio (macroplaquetas), disminución del plaquetocrito y aumento del índice de distribución de las plaquetas (anisocitosis plaquetaria). La anemia en ausencia de una pérdida importante de sangre sugiere la posibilidad de una hemólisis inmunológica concomitante (síndrome de Evans). La extensión de sangre periférica confirma la citopenia aislada y muestra macroplaquetas y formas gigantes. En un aspirado de médula ósea, los megacariocitos son normales o están incrementados con normalidad de las líneas eritroide y mieloide. En algunas situaciones clínicas específicas están indicados estudios para excluir otras causas de

**Tabla 3.39** Púrpuras trombocitopénicas inmunológicas. Formas clínicas

Parámetros	Tipo	
	Aguda	Crónica
Edad	En la infancia	En la adultez
Sexo	Uno y otro sexo por igual	Varones
Duración	Menos de 6 meses	Más de 6 meses
Remisión	Espontánea	No espontánea
Precedida	Infección viral	No
Especificidad de anticuerpos	GP IIb/IIIa	GP IIb/IIIa y Ib-IX-V



trombocitopenias. Ellos incluyen estudios de la función hepática, tiroides, síndrome de mononucleosis infecciosa (virus de Epstein-Barr, citomegalovirus), SIDA (VIH-1), estudios de la coagulación intravascular diseminada (AT, dímero D), estudios de autoinmunidad (anticuerpos antinucleares, entre otros).

Las pruebas de anticuerpos plaquetarios en la PTI son las mismas que para las trombocitopenias autoinmunes secundarias. Ellos pueden dividirse en 3 categorías:

1. Ensayos de fase I: se mezclan el suero del paciente y las plaquetas normales y se miden los efectos sobre las plaquetas como agregación, liberación de serotonina marcada, lisis plaquetaria, disponibilidad de factor 3, fijación de complemento, etc. Estas pruebas carecen de buena sensibilidad y especificidad y no se utilizan en la actualidad, excepto para el diagnóstico de la trombocitopenia inducida por heparinas.
2. Ensayos de fase II: miden la cantidad de IgG asociada con las plaquetas y se subdividen en ensayos de unión directa, que utilizan un ligando marcado (anticuerpo monoclonal o policlonal anti-IgG o proteína A estafilocócica, marcado con radioisótopo, fluoresceína o enzimas), ensayos en dos etapas e IgG total asociada con plaquetas (miden la IgG unida a la membrana y la IgG intraplaquetaria).
3. Ensayos de fase III: estudian anticuerpos unidos a glicoproteínas específicas de las plaquetas. Existen 3 tipos: ensayos de captura de antígeno, ensayos de inmunotransferencia (*immunoblotting*) y ensayos de radioinmunoprecipitación.

Los ensayos fase II y los de fase III detectan anticuerpos en plaquetas de pacientes (pruebas directas) o anticuerpos en el suero (pruebas indirectas). Es recomendable utilizar pruebas directas, pues es frecuente que los anticuerpos estén asociados con las células y que, por ello, no sean fácilmente detectados en el suero. Se recomienda utilizar una prueba de alta sensibilidad como son los ensayos de IgG asociado con plaquetas (fase II) para el cribado y una prueba de alta especificidad (ensayo de captura de antígeno) como prueba confirmatoria. Además de su utilidad para el diagnóstico, son de gran ayuda para seguir la actividad de la enfermedad.

## TROMBOCITOPATÍAS

Las funciones de las plaquetas incluyen, entre otras, la adhesión al subendotelio vascular, la formación del

coágulo plaquetario, la liberación del contenido de los gránulos plaquetarios y el suministro de fosfolípidos a las reacciones de la coagulación. Las trombocitopatías engloban un grupo de trastornos caracterizados por alteraciones de estas y otras funciones de las plaquetas, que afectan su participación en la formación del tapón hemostático primario y en la hemostasia secundaria, lo cual provoca manifestaciones hemorrágicas más o menos severas. Se clasifican en congénitas y adquiridas (cuadro 3.4).

En las trombopatías, además de la historia clínica de manifestaciones hemorrágicas, existen ocasionalmente antecedentes familiares. Mediante las pruebas de laboratorio se obtiene información objetiva acerca de las alteraciones de las plaquetas. El TS puede estar prolongado o normal, la cuenta de plaquetas es normal o puede conllevar un trastorno cualitativo con una trombocitopenia, lo cual agrava el defecto hemostático y dificulta el estudio. En la actualidad, algunos laboratorios realizan pruebas de adhesión/agregación plaquetaria

**Cuadro 3.4** Clasificación de las trombocitopatías

<b>Alteraciones de la adhesión</b>
Hereditarios Síndrome de Bernard-Soulier Asociada con la enfermedad de von Willebrand
Adquiridos Uremia
<b>Alteraciones de la agregación</b>
Hereditarios Tromboastenia de Glanzmann Afibrinogenemia
Adquiridos Aparición de productos de degradación del fibrinógeno y la fibrina Disproteinemias Ingestión de medicamentos: ticlopidina, anti IIb/IIIa
<b>Alteraciones de la liberación</b>
Hereditarios Síndrome de Hermannsky-Pudlak Síndrome de Chediak-Higashi Síndrome de Wiskott-Aldrich Síndrome de las plaquetas grises
Adquiridos Circulación extracorpórea Hemodiálisis Síndromes mieloproliferativos Ingestión de aspirina y otros antiinflamatorios no esteroideos Transfusiones múltiples

con sistemas de grandes velocidades de flujo, que simulan la circulación *in vivo* (PFA-100). En este sistema se hace pasar sangre anticoagulada a elevada velocidad por una apertura, en una membrana cubierta con colágeno y ADP, y se determina el tiempo de detención del flujo de sangre, lo que está relacionado, de manera directa, con la adhesión plaquetaria al colágeno y con la agregación de las plaquetas. De aquí que este estudio puede ser utilizado como prueba de pesquisaje de la hemostasia primaria, para estudiar disfunciones plaquetarias o enfermedad de von Willebrand (EvW), y su afectación orienta al realizar estudios que confirmen la agregación plaquetaria y liberación, de conjunto con la evaluación de la EvW. Las pruebas que evalúan el aporte plaquetario de fosfolípidos al proceso de la coagulación sanguínea, están alteradas en las trombocitopatías congénitas y adquiridas, con diferentes intensidades. Estas son pruebas poco específicas, pero con adecuada sensibilidad para detectar trombopatías y para evaluar trastornos de la coagulación concomitantes. Las pruebas de agregación plaquetaria y de liberación de ATP son las de mayor sensibilidad para estudiar disfunciones plaquetarias, se encuentran disminuciones del porcentaje de agregación del plasma rico en plaquetas (PRP) o de la sangre total, y disminución de la liberación de ATP plaquetario, en respuesta a varios agentes agonistas (ADP, colágeno, epinefrina, ácido araquidónico y ristocetina). Los patrones de agregación definen las alteraciones bioquímicas de las plaquetas y caracterizan situaciones clínicas en las que existen trastornos de la hemostasia primaria por afectaciones de las plaquetas.

La tromboastenia de Glanzmann es una enfermedad hemorrágica congénita severa. Tiene un modo de transmisión autosómico recesivo, es muy poco frecuente y es ocasionada por deficiencia funcional o antigénica del complejo GPIIb/IIIa o parte de él. Las plaquetas no agregan con ADP, colágeno, epinefrina, ni ácido araquidónico y existe una agregación normal con ristocetina. La liberación de ATP y serotonina puede estar disminuida con ADP, colágeno y epinefrina, y es normal con trombina e ionóforos de calcio. Las plaquetas se observan aisladas en las extensiones de sangre.

El síndrome de Bernard-Soulier es una enfermedad hemorrágica congénita rara, autosómica recesiva y se origina por defectos en la expresión del complejo de GPIb/IX/V. Debido a que este es el receptor del FvW, las interacciones de las plaquetas con el subendotelio vascular están alteradas. La agregación del PRP y la liberación de ATP están marcadamente

disminuidas con ristocetina, y no se corrigen con la adición de FvW. La agregación es normal con el resto de las sustancias agregantes. Se observan macroplaquetas y trombocitopenia en una extensión de sangre, lo que puede confundir con una PTI.

Los defectos de liberación y la enfermedad de la mezcla de almacenamiento, son un grupo heterogéneo de trastornos mucho más frecuentes que los anteriores, en los cuales las plaquetas son incapaces de liberar el contenido de sus gránulos cuando son activadas. De forma general, en este grupo de trastornos se encuentran dañadas las respuestas de agregación ante varias de las sustancias agregantes y la liberación de ATP.

Los trastornos adquiridos de la función plaquetaria son mucho más frecuentes dentro del grupo de las trombocitopatías. Deben sospecharse y estudiarse en todo paciente con afectaciones de la hemostasia primaria sin antecedentes familiares, ni personales, y con una situación clínica asociada. De forma general, las plaquetas pueden sufrir daños secundarios que se manifiestan por una hipoactividad (hemorragias) o, en algunos casos, por hiperactividad (hipercoagulabilidad). Los patrones de agregación o curvas de agregación en estas situaciones clínicas, son diversos; pero caracterizan cada alteración e indican el sitio de afectación molecular de las plaquetas del paciente.

## ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND

La enfermedad de von Willebrand (EvW) es el trastorno hemorrágico congénito más frecuente. Su prevalencia está entre el 1 y el 3 %, aproximadamente, pero los casos de relevancia clínica son pocos (de 100 a 200 por millón de habitantes). Es resultado de deficiencias o anormalidades del factor von Willebrand (FvW). Este es una glicoproteína adhesiva sintetizada por los megacariocitos y las células endoteliales. El FvW circula como un grupo de multímeros de diferentes tamaños (desde un dímero de 500 kDa hasta formas moleculares de más de 10 000 kDa). Esta proteína participa de forma decisiva en la hemostasia primaria y colabora en la hemostasia secundaria. Es un mediador de la adhesión de las plaquetas al subendotelio en el lugar del daño vascular. Para ello utiliza una glicoproteína de la membrana plaquetaria, la GPIb (complejo Ib/IX/V), también interacciona con el complejo GPIIb/IIIa, con colágeno y con heparinas. Los multímeros de alto peso molecular son las formas moleculares de la proteína de mayor acción en la adhesión plaquetaria, sobre todo en condiciones de

altos coeficientes de cizalladura. El FvW también transporta al FVIII, al que protege de la degradación proteolítica prematura. Los defectos del FvW en la EvW motivan la hemorragia al impedir la adhesión plaquetaria o al afectar la coagulación sanguínea.

El FvW es un reactante de fase aguda, por lo que su concentración aumenta con el ejercicio, el estrés, el tabaco, el embarazo, múltiples enfermedades y por medicamentos (esteroides y hormonas). Las personas con grupos sanguíneos O (sistema ABO) tienen niveles de FvW menores (25 %) que los de otros grupos.

### Clasificación de la EvW

La EvW se debe a mutaciones del *locus* del FvW (brazo corto del cromosoma 12, donde ocupa una longitud de 178 Kb y contiene 52 exones). Esta afección se clasifica en:

1. Tipo 1 de EvW: consiste en una deficiencia parcial cuantitativa del FvW. El tipo 2 se debe a una deficiencia cualitativa del FvW y el tipo 3 es virtualmente una deficiencia completa del factor.
2. Tipo 2A de EvW: incluye las formas con disminución de la función del FvW dependiente de plaquetas y se asocia con una ausencia de los multímeros de mayor tamaño.
3. Tipo 2B de EvW: agrupa las variantes cualitativas caracterizadas por el aumento de la afinidad del factor por la GPIb de las plaquetas.
4. Tipo 2M de EvW: agrupa las variantes cualitativas con disminución de la función del FvW dependiente de las plaquetas que no es causada por la ausencia de multímeros de mayor tamaño del FvW.
5. Tipo 2N: es una variante cualitativa con marcada disminución de la afinidad del FvW por el FVIII.

La presentación clínica de la EvW es tan variada como sus causas moleculares, existen grandes diferencias en los síntomas hemorrágicos, incluso en miembros afectos de una misma familia. La ausencia de historia de sangrado no excluye el diagnóstico. Un diagnóstico correcto precisa 3 aspectos:

1. Es un desorden hereditario (herencia).
2. Existen trastornos de la hemostasia (hemorragias).
3. Es debida a alteraciones del FvW (alteraciones cuantitativas, alteraciones cualitativas de la proteína o ambas).

Una evaluación extensa de laboratorio en el estudio de la EvW es muy costosa, por lo que hay que utilizar las pruebas disponibles, de forma ordenada.

### Procedimiento diagnóstico

El procedimiento diagnóstico se basa en:

1. Considerar el diagnóstico dentro del contexto de una apropiada historia personal, historia familiar de sangrados o ambas.
2. Excluir otros defectos comunes cuando se realice TS, cuenta de plaquetas, TTPA y TP. Una prolongación del TTPA requiere estudios de mezclas de plasma normal y de plasma de prueba (1:1), para descartar inhibidores de interferencia (anticoagulante lúpico) o contra factores específicos y en casos de corrección son necesarios ensayos de factores, primero del FVIII. Si están disponibles se pueden realizar estudios con sistemas de cierre de aperturas con elevadas velocidades de flujo (PFA-100). Esta prueba es muy sensible para detectar alteraciones de la adhesión plaquetaria por trastornos del FvW.
3. Si no se observan anomalías del TTPA y del FVIII, se debe realizar un ensayo de cofactor de ristocetina (FvW: Rco). Si este ensayo no está disponible en su laboratorio, entonces se debe realizar una determinación del FvW antigénico (FvW: Ag) o un ensayo de unión del FvW al colágeno (FvW: CB). Un FvW: Ag menor que 30 U/L sugiere una EvW tipo 3.
4. Si ninguna de las pruebas mencionadas está por debajo del rango normal para los rangos de referencia relacionados con los grupos sanguíneos ABO, es necesario reconsiderar el diagnóstico de una EvW.
5. En deficiencias moderadas se debe repetir el estudio en una segunda ocasión para corroborar el diagnóstico, o utilizar procedimientos con mayor sensibilidad, en caso de que las pruebas resulten normales, en pacientes con una elevada sospecha clínica.
6. Examinar a otros miembros de la familia con posibles historias de sangrados. Descubrir otro miembro de la familia con sangrados y niveles reducidos de FvW: Ag, confirma el diagnóstico.
7. Realizar FvW: Ag y FvW: Rco en la misma muestra para evaluar la razón reducida FvW: Rco/FvW: Ag (una razón menor que 0,7 sugiere una EvW tipo 2 o una razón FVIII/FvW: Ag menor que 0,7 sugiere una EvW tipo 2N, que debe ser confirmada con un estudio de unión de FVIII al FvW del paciente).
8. Realizar una agregación del PRP del paciente en presencia de concentraciones incrementadas de ristocetina (0,25; 0,5; 1,0 mg/mL, como concentración final). La agregación a bajas concentraciones sugiere una EvW tipo 2B.

9. El estudio de multímeros con el uso de geles de baja resolución, en el que no se observen grandes multímeros, indica la existencia de una EvW tipo 2A y 2B. La presencia de todos los multímeros sugiere una enfermedad tipo 1 (o 2N, 2M), mientras que la ausencia de multímeros indica una EvW tipo 3.

## HEMOFILIAS

### HEMOFILIA A

La hemofilia A es provocada por la ausencia o disminución de la función del FVIII de la coagulación y es resultado de mutaciones en el gen del factor. La hemofilia debe ser sospechada en cualquier niño varón con episodios recurrentes de sangrados prolongados, espontáneos o luego de lesiones o procedimientos quirúrgicos. Las investigaciones globales de la coagulación revelan una prolongación aislada del TTPA, el resto de las pruebas son normales. Aunque otras coagulopatías pueden presentar un cuadro clínico similar, el diagnóstico de la hemofilia A puede establecerse al medir la actividad del FVIII, la cual está disminuida (normal de 50 a 120 %) y el antígeno del FvW, el que es normal. Los casos leves habría que distinguirlos de la EvW con estudios funcionales como el cofactor de ristocetina y el análisis de la fijación del FVIII al FvW. Habría que descartar también una deficiencia adquirida. Un patrón de herencia ligada al cromosoma X puede ser útil, aunque no lo distinguiría de la hemofilia B. También hay que tener en cuenta que 1/3 de los pacientes presentan mutaciones de novo y tienen una historia familiar negativa. La gravedad de los síntomas, tanto en la hemofilia A como en la B, se correlaciona con los niveles de actividad coagulante de ambos factores en el plasma. Un nivel menor que 1 % se asocia con síntomas graves, entre el 1 y el 5 % son moderados y entre el 5 y el 25 % son leves. Más de la mitad de los pacientes hemofílicos se clasifican como graves, el 10 % como moderados y entre el 30 y el 40 %, ligeros. El 5 % de los pacientes tienen una proteína cuantitativamente normal, pero no funcional (CRM+ *cross-reacting material positive*).

El gen del FVIII se extiende a lo largo de 186 Kb, contiene 26 exones y se encuentra cerca del extremo del brazo largo del cromosoma X (Xq28). La proteína del FVIII circula en el plasma a muy bajas concentraciones (100 ng/mL) y es un cofactor crítico para el FIX $\alpha$ , en la activación proteolítica del factor X. El FVIII es inestable y se estabiliza al unirse al FvW, junto al cual circula y forma un complejo firme. En pacientes con

EvW grave y en los homocigóticos para la EvW tipo 2N, se encuentran disminuidos los niveles de FBI.

La frecuencia de la hemofilia A se estima que es de aproximadamente 1 de cada 5 000 a 10 000 varones en todos los grupos étnicos y una de cada 25 a 100 x 10<sup>6</sup> mujeres pudiera esperarse que fuera homocigótica para el alelo deficiente. Una inactivación extrema del cromosoma X normal puede dar lugar a valores inusualmente bajos del FVIII en mujeres portadoras. En el rango de la hemofilia leve o moderada, si la inactivación ocurre en el cromosoma X que porta la mutación, las mujeres portadoras pueden mostrar valores normales, por tanto, los datos obtenidos de estudios funcionales deben ser interpretados con cautela cuando se aplican al consejo genético. El diagnóstico de la EvW debe ser considerado en cualquier mujer con niveles bajos de FVIII.

El diagnóstico genético puede llevarse a cabo con pruebas indirectas, análisis de segregación de polimorfismos o marcadores genéticos intragénicos y extragénicos, los cuales sirven para seguir el rastro del gen defectuoso en una familia determinada. Estos análisis pueden abordarse mediante la técnica de transferencia (*southern blot*), en la que el ADN genómico, previamente digerido con las enzimas de restricción apropiadas, se somete a electroforesis y después de una transferencia a una membrana de nailon, las distintas bandas son detectadas mediante una sonda específica de ADN complementario (ADNc) marcada con radioisótopos. En la actualidad, muchos de los marcadores genéticos pueden ser analizados al amplificar un fragmento concreto de ADN genómico o de ADNc mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), después se aplican distintas estrategias para detectar los diferentes alelos en función del tipo de polimorfismo estudiado, como la digestión con enzimas de restricción y una posterior electroforesis para la visualización de las diferentes bandas (o alelos). El análisis de PCR requiere menor cantidad de muestra y los resultados se obtienen con mayor rapidez; por lo general es el método de elección. Los métodos directos se basan en la detección de la mutación que causa la enfermedad e incluyen los mencionados y otros como: análisis de heterodúplex (HA) o análisis de polimorfismos de conformaciones de cadena sencilla (SSCP) y la secuenciación directa del ADN. El diagnóstico genético directo es difícil de llevar a cabo debido al gran tamaño del gen, lo que implicaría el análisis de 26 exones. Hoy se sabe que aproximadamente la mitad de los pacientes con hemofilia A grave, presentan una inversión intracromosomal del cromosoma X en el intrón 22, con un reordenamiento o recombinación del gen por entrecruzamiento de una zona del intrón 22 (F8A)

y 2 secuencias homólogas situadas fuera del gen hacia el telómero del brazo largo del cromosoma X. El gen reordenado es interrumpido en el intrón 22, lo que origina una proteína truncada que es inestable. Estos pacientes presentan una actividad del FVIII menor que el 1 %. Debido a que la mutación puede ser demostrada por *southern blot* o PCR, es posible ofrecer un diagnóstico directo a la mitad de los pacientes con hemofilia severa (25 % de todos los hemofílicos) y a las madres portadoras. Los restantes pacientes con hemofilia A pueden tener defectos moleculares más convencionales en el gen del FVIII. El 5 % tiene deleciones que eliminan segmentos de gen de tamaño variado. El resto de los pacientes con hemofilia A presentan mutaciones puntuales en la secuencia codificante del gen.

El estudio molecular es utilizado para el diagnóstico prenatal y para analizar las madres que tienen hemofilia A. El uso de técnicas de ADN directas sobre biopsia de las vellosidades coriónicas fetales entre las 11 y 12 semanas de gestación, es el método aconsejable; los métodos indirectos son la segunda elección. En el segundo trimestre del embarazo, los estudios se realizan en células fetales obtenidas del líquido amniótico, mediante amniocentesis. En el segundo trimestre es también posible obtener sangre fetal por cordocentesis o cardiocentesis, guiadas por ultrasonido, para medir los niveles de FVIII. Los estudios prenatales deben ir precedidos del consejo genético con el fin de ofrecerle información suficiente a los padres para la toma de decisiones en relación con el estudio prenatal y la continuación del embarazo.

Entre el 25 y el 30 % (del 5 al 10 % de todos los pacientes) de los hemofílicos A severos, desarrollan inhibidores contra el FVIII (aloantígenos). La presencia de inhibidores no supone sangrados más frecuentes, pero sí más difíciles de tratar, por tanto son más graves. El tipo de concentrado del FVIII, incluido los de origen recombinante, no influye en su aparición. El surgimiento de inhibidores es más frecuente en los primeros años de la vida, cuando coincide con las primeras exposiciones a los concentrados del factor deficitario. El objetivo del tratamiento de pacientes con inhibidores es, a corto plazo, controlar los episodios hemorrágicos y, a largo plazo, eliminar el inhibidor mediante tratamientos de inmunotolerancia, con los que se busca la eliminación del inhibidor, la normalización de la vida media del factor infundido y la ausencia de respuesta anamnésica. El título de inhibidores es reportado casi siempre en unidades Bethesda: una unidad Bethesda es la capacidad del plasma del paciente de inactivar, en el 50 %, la actividad del FVIII en igual volumen de plasma normal incubados a 37 °C durante 2 horas. Los pacientes con inhibidores

del FVIII tienen una prolongación del TTPA. Esta prolongación no corrige al mezclarse con plasma normal. Si se realizan determinaciones seriadas de varios factores en el tiempo, se observa que el FVIII es el único que disminuye. El título de inhibidor es importante para el uso de protocolos de inmunotolerancia y de otros procedimientos como la plasmaféresis o inmuoabsorción extracorpórea.

## HEMOFILIA B

La hemofilia B o enfermedad de Christmas es un trastorno hemorrágico ligado al cromosoma X, causado por deficiencia del factor XI, una glicoproteína plasmática dependiente de la vitamina K que participa, de manera directa, en la coagulación al realizar el clivaje del factor II para formar la principal proteína de la coagulación, la trombina. Desde el punto de vista clínico, no puede distinguirse de la hemofilia A. Según la actividad coagulante, se aprecian formas graves, moderadas y leves, igual que en la hemofilia A. El 60 % muestra disminución de la actividad o FIX coagulante (FIX: C) y de la proteína del FIX o FIX antigénico (FIX: Ag), mientras que en el 40 % restante los valores del FIX: Ag son normales.

El gen del FIX se ha localizado en la región Xq27, tiene una extensión de 33 Kb y contiene 8 exones. Circula en el plasma a una concentración de 5 mg/L.

La hemofilia B afecta a 1 de cada 30 000 varones, aproximadamente 1/5 de la frecuencia de la hemofilia A. El diagnóstico de las que la poseen es difícil de establecer según el fenotipo, por la gran variación de los niveles de FIX: C y FIX: Ag, en la población normal. El análisis indirecto, cuando se estudia la segregación de fragmentos polimórficos intragénicos y extragénicos permite hacer el diagnóstico en familias informativas. El análisis directo es preferible o el más adecuado en esta enfermedad, por el menor tamaño del gen, grandes deleciones se presentan entre el 2 y 5 % de los casos.

Pocos pacientes (entre el 2,4 y el 2,8 %) crean anticuerpos frente al FIX exógeno. En el 12 % de los que tienen una enfermedad severa se presentan estos aloanticuerpos, y en una gran parte de estos pacientes existe una delección parcial o completa del gen.

## COAGULACIÓN INTRAVASCULAR DISEMINADA

La coagulación intravascular diseminada (CID) es un trastorno trombohemorrágico sistémico adquirido, asociado con situaciones clínicas (cuadro 3.5) bien definidas y evidencias de laboratorio de activación

procoagulante, activación fibrinolítica, consumo de inhibidores naturales y daño o falla múltiple de órganos.

La fisiopatología de la CID es compleja y diversa. Una gran variedad de anomalías fisiopatológicas no relacionadas de manera directa, originan este proceso. El daño endotelial, la formación de complejos antígeno-anticuerpos, la producción de endotoxinas, las lesiones hísticas, la activación y liberación de las plaquetas y la hemólisis, entre otros, son trastornos que cuando suceden con una intensidad suficiente, son capaces de desestabilizar el sistema hemostático. También se originan cantidades elevadas e incontroladas de trombina y de plasmita, las cuales desencadenan un grupo de respuestas fisiopatológicas, cuyo fin es ocasionar trombosis, hemorragias y daños hísticos múltiples. También la liberación de citoquinas y sustancias vasoactivas desempeña una función importante en el daño hístico y en la necrosis.

**Cuadro 3.5** Causas de la coagulación intravascular diseminada

<b>Complicaciones obstétricas</b>
Desprendimiento prematuro de la placenta
Retención de un feto muerto
Aborto séptico
Embolia de líquido amniótico
<b>Infecciones</b>
Infecciones por gérmenes gramnegativos
Meningococemia
Paludismo
Viremias
Aspergilosis
Fiebre manchada de las montañas rocosas
Histoplasmosis
<b>Neoplasias</b>
Carcinomas de páncreas, próstata, pulmón y estómago
Leucemia promielocítica aguda
<b>Lesiones hísticas masivas</b>
Traumatismos
Quemaduras
Cirugías
<b>Otras</b>
Hemólisis intravascular aguda
Mordeduras de serpientes
Hemangiomas gigantes
<i>Shock</i>
Golpes de calor
Vasculitis
Aneurismas aórticos
Hepatopatías

Cuando la trombina circula son liberados fibrinopéptidos A y B del fibrinógeno, y se forman los monómeros de fibrina que polimerizan y crean coágulos de fibrina y trombosis en la macrocirculación y microcirculación, con interferencia del flujo sanguíneo, isquemia y daño orgánico. Por otra parte, la fibrina depositada en la microcirculación atrapa plaquetas, lo que incrementa el coágulo y disminuye las plaquetas circulantes (trombocitopenia). La plasmina, que también circula libremente, corta al fibrinógeno y a la fibrina y crea los productos de degradación (PDF). La plasmina libera péptidos específicos del fibrinógeno (Bb 1-42) y de la fibrina (Bβ 15-42). Los PDF se combinan con monómeros de fibrina y forman complejos solubles que no polimerizan (estos son detectados con las pruebas de paracoagulación). Los PDF también se asocian con las plaquetas y provocan una disfunción plaquetaria importante. Los PDF y el dímero D (D-D) inducen la síntesis y liberación de interleucinas 1 (IL-1) y 6 (IL-6) de los macrófagos y de inhibidor del activador hístico del plasminógeno (PAI-1). La IL-1 y IL-6 inducen un daño endotelial vascular adicional, mientras que el incremento del PAI-1 inhibe la fibrinólisis y origina una trombosis. La trombina también induce la liberación de IL-1 y de IL-6 y del factor de necrosis tumoral (TNF), así como la liberación de trombomodulina, endotelina y selectina del endotelio vascular. Esto provoca vasoconstricción, vasospasmo, trombosis, oclusión vascular y daño hístico. La selectina E (también nombrada ELAM-1) liberada, se une a granulocitos, linfocitos y monocitos/macrófagos e induce la liberación de citoquinas y de factor activador de las plaquetas (PAF), el cual puede originarse también del daño endotelial y de otras células activadas o dañadas. El aumento del PFA induce más trombocitopenia.

La plasmina, a diferencia de la trombina, es una enzima proteolítica global y tiene igual afinidad por el fibrinógeno y por la fibrina, también biodegrada los factores V, VIII, IX, XI y otras proteínas, incluso hormonas como la ACTH, STH (GH) e insulina. También la plasmina circulante puede activar C-1 y C-3 del sistema del complemento, con la eventual activación de C-8 y C-9 y la subsiguiente lisis de eritrocitos y plaquetas. El complemento también es activado por la trombina a través del TNF. La activación del sistema de kinina por la vía del FXIIa induce un incremento de la permeabilidad vascular, hipotensión y *shock*.

La activación incontrolada de los mecanismos de la hemostasia (activación plaquetaria, coagulación y

fibrinólisis), de conjunto con la inflamación, isquemia y necrosis hística, traen como consecuencia un daño orgánico que puede ser irreversible.

El laboratorio ofrece información de gran valor, pero esta debe ser investigada dentro del contexto de una situación clínica relacionada y ante un cuadro clínico de hemorragia, trombosis o ambos. El TP se prolonga en la CID por múltiples razones. Esta prueba depende de la conversión del fibrinógeno en fibrina, y en la CID hay, por lo general, una hipofibrinogenemia: los PDF interfieren con la polimerización de la fibrina, la plasmina destruye los factores V y X, todo ello provoca la prolongación del TP entre el 50 y el 75 % de los pacientes, pero en el resto, esta prueba es normal o acortada. El acortamiento ocurre por la presencia de factores activados, tales como la trombina o el FXa, y la producción de PDF iniciales. Por todo esto, el TP es poco confiable y de poca utilidad para el diagnóstico de la CID.

El TTPA también se altera en la CID fulminante por una serie de causas, pero es aún menos confiable que el TP. La biodegradación de los factores V, VIII, IX y XI, la disminución del fibrinógeno y la presencia de PDF, son algunos de estos; sin embargo, solo el 50 % de los pacientes con CID tienen un TTPA prolongado. El resto tiene el TTPA normal o acortado por las mismas razones que el TP.

El TT se prolonga en la CID fundamentalmente por los PDF circulantes y por la hipofibrinogenemia, pero por las razones mencionadas en las pruebas anteriores, puede ser normal o acortado.

La dosificación de factores es de poca utilidad para el diagnóstico de la CID. La presencia de factores activados circulantes, principalmente el FXa, el FIXa y la trombina afectan los ensayos de factores que utilizan el TTPA o el TP con plasmas sustratos deficitarios, y los hace de poca utilidad. Por ejemplo, si se realiza un ensayo de FVIII: C con niveles elevados de FXa circulante, se encuentran niveles elevados de actividad del FVIII: C.

Los PDF están elevados entre el 85 y el 100 % de los pacientes con CID. Esto es diagnóstico de la generación de plasmina. Las pruebas de paracoagulación (gelación con etanol y sulfato de protamina) y las determinaciones de complejos solubles son, por lo general, positivas. Sin embargo, la especificidad no es buena, pues estas pruebas pueden estar elevadas por otras causas como la ingestión de contraceptivos orales, el tromboembolismo pulmonar, los tromboembolismos arteriales y venosos, el infarto del miocardio y los trastornos renales.

El dímero D (D-D) es un neoantígeno que se forma cuando la trombina convierte el fibrinógeno en fibrina y activa al factor XIII, el cual estabiliza la red de fibrina y forma uniones covalentes. La plasmina, al digerir la fibrina estabilizada, crea estos fragmentos. Por tanto, el D-D demuestra la generación incrementada de trombina y de plasmina concomitantes. Esta prueba es positiva en el 93 % de los pacientes con CID.

Durante la CID, en el proceso de hiperactivación de la coagulación, aparecen un grupo de fragmentos de activación de la coagulación que se utilizan como marcadores moleculares. La formación de trombina produce los fragmentos 1+2 de la protrombina, la trombina libera al fibrinopéptido A, también se combina con su inhibidor natural y forma el complejo trombina-antitrombina. Los niveles de AT funcionales disminuyen, de manera significativa, en el 89 % de los pacientes. La AT se utiliza para seguir la evolución de la CID. En algunos pacientes con CID por leucemia promielocítica aguda y coagulopatía severa, los niveles funcionales de AT son normales, a pesar del aumento de los complejos trombina-AT.

En el sistema fibrinolítico encontramos una disminución del plasminógeno y un aumento del complejo plasmina-antiplasmina, además del aumento de los fragmentos de la degradación del fibrinógeno y de la fibrina.

La trombocitopenia es muy frecuente en la CID, pero el rango puede variar desde 20 a 100 x 10<sup>9</sup>/L. Además de la afectación cuantitativa, la calidad de las plaquetas está alterada; las pruebas de función plaquetaria son anormales. En la lámina periférica y en el hemograma se pueden observar alteraciones celulares provocadas por la microangiopatía (anisopoiquilocitosis) y por la enfermedad de base: neutrofilia, desviación izquierda, sepsis, trofozoitos de *Plasmodium falciparum*, etc. Los niveles plasmáticos de marcadores de la activación plaquetaria como la beta-tromboglobulina y el factor plaquetario 4 están elevados.

La alteración global de la hemostasia que ocurre en la CID afecta a la mayoría de las pruebas de laboratorio, de aquí que es necesario conocer cuáles son las pruebas útiles para un diagnóstico confiable y precoz de esta afección.

El incremento de los fragmentos 1+2 de la protrombina, del D-D, la disminución de la AT y el incremento de los PDF son las pruebas más sensibles y específicas para confirmar un diagnóstico. Cuando se utilizan, en conjunto, la sensibilidad y la especificidad son muy elevadas.

## BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- Bick RL. Disseminated Intravascular Coagulation: Pathophysiological mechanisms and manifestations. *Sem Thrombosis*, 1998;24(1):3-18.
- Castaman G. Epidemiology and Diagnosis of von Willebrand' disease. *Haematologica* 2001; 86(10):1-9.
- Castillo R, Ordinas JC, Vicente V, Rocha E. Enfermedades de la Hemostasia. En: Rozman C ed. *Medicina Interna* Ed 13. Madrid: Mosby-Doyma; 1995. p. 1770-1804.
- Chong BH. Diagnosis, treatment and pathophysiology of autoimmune thrombocytopenias. *Crit Rev Oncology & Hematol* 1995;20:271-96.
- Hoffman R ed. *Hematology basic: principles and practice*. 2<sup>nd</sup> ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1995.
- Kohli A, Khan F, Snyder LM, Pechet L. Hemostais Laboratory: Assays for platelet Function and von Willebrand Disease. *J Thromb Thrombol* 1998;6:159-167.
- Kordich LC, Sánchez JC, De Campos C. *Manual de Hemostasia y Trombosis*, Grupo CLAHT. 2<sup>da</sup> ed. Argentina: 1990.
- Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskeva F, Greer JP, Rodgers GM (eds.). *Wintrobe's. Clinical Hematology*. 10 ed. Baltimore: Williams & Willkins, 1999.
- Miller JL. Blood platelets. En: Henry JB (ed.). *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 19 ed. Philadelphia: EB Saunders Co., 1996.p. 701-18.
- Miller JL. Blood Coagulations and. Fibrinolysis. En: Henry JB (ed.). *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 19 ed. Philadelphia: EB Saunders Company, 1996. p.19-747.
- Powers LW. *Diagnostic Hematology. Clinical and Technical Principles*. San Luis, Missouri: The C.V. Mosby Co., 1989.
- Triplett D. Coagulation and bleeding disorders.: Review and Update. *Clinical Chem* 2000;48(8):1269.
- Walenga JM, Fareed J. Automation and quality control in the coagulation laboratory. *Clin Lab Med* 1994;14(4):709-28.



## **CONTENIDO**

---

### **Introducción/ 349**

### **Anticoagulación fisiológica/ 350**

- Antitrombina/ 350
- Sistema de la proteína C/ 350
- Inhibidor de la vía extrínseca/ 351
- Sistema de la fibrinólisis/ 351

### **Formación del trombo/ 353**

### **Trombofilias/ 356**

- Trombofilias hereditarias/ 356

### **Síndrome antifosfolipídico/ 358**

- Definición/ 358
- Historia/ 358
- Criterio diagnóstico/ 359
- Mecanismo fisiopatológico/ 359
- Predisposición genética/ 360
- Cuadro clínico/ 360

### **Bibliografía recomendada/ 361**

### Capítulo 30

### TROMBOFILIAS

Dr. Wilfredo Torres Iribar  
Dr. Ariel Colina Rodríguez

#### RESUMEN

Las afectaciones de la hemostasia más frecuentes en la práctica clínica son las trombosis o embolias; ellas provocan una elevada morbilidad y mortalidad. Son el resultado de la detención del flujo sanguíneo en un vaso (vena, arteria o capilar) por la formación, *in situ*, de un trombo o por oclusión de un trombo formado a distancia. La trombosis es secundaria a un desbalance entre los factores coagulantes y anticoagulantes con un predominio de los primeros. Ellas pueden tener causas congénitas o ser secundarias a procesos adquiridos.

Las trombosis son, por lo general, multicausales, pues en su génesis participan diferentes factores genéticos y patológicos, que interactúan sinérgicamente, y provocan estados de hipercoagulabilidad. Las causas de las trombofilias congénitas más frecuentes son la resistencia a la proteína C activada, principalmente por el factor V Leiden, la mutación del gen de la protrombina G20210 A y la hiperhomocisteinemia. Entre las causas adquiridas, el síndrome antifosfolípido tiene un papel protagónico.

#### INTRODUCCIÓN

Casi 150 años atrás, Virchow postuló que la trombosis era causada por cambios en el flujo de la sangre, en la pared de los vasos o en la composición de la sangre. Este concepto creó las bases para nuevas investigaciones sobre estados de hipercoagulación hereditarios y adquiridos.

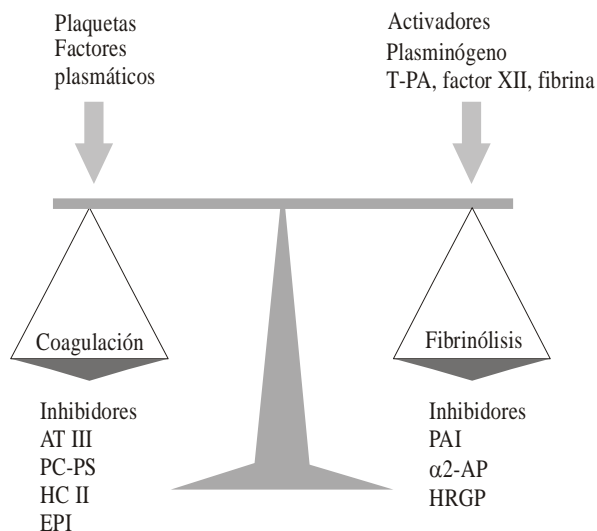
El hecho de que la trombosis venosa puede ser un rasgo hereditario no fue reconocido completamente hasta que se describió por Egeberg, en 1965, la primera familia con deficiencia congénita de antitrombina III. El cuadro clínico se caracterizaba por trombosis venosa recurrente y embolismos pulmonares. El término trombofilia fue acuñado para reflejar esta condición clínica y desde entonces muchas familias han sido reportadas con esta deficiencia y la de otras proteínas o defectos, principalmente de la anticoagulación fisiológica, que provocan un estado de hipercoagulación y, por ello, una tendencia, a la trombosis. El

concepto de protrombótica es preferible que pretrombótica para esta tendencia, ya que estas anomalías pueden presentarse sin la presencia de trombosis.

Varios componentes de la cascada de la coagulación y del sistema de la fibrinólisis han sido estudiados para determinar su posible papel en las trombosis hereditarias:

1. Resistencia a la proteína C activada (factor V Leiden).
2. Protrombina G20210A.
3. Deficiencia de proteína C.
4. Deficiencia de proteína S.
5. Deficiencia de antitrombina III.
6. Disfibrinogenemia.

En los estados hipercoagulables, el balance entre las fuerzas procoagulantes y anticoagulantes está desviado a favor de la coagulación. Esto puede ser debido a factores hereditarios y adquiridos, y en la patogenia de la trombosis. Ellos actúan a menudo simultáneamente (figura 3.92).



**Figura 3.92** Factores coagulantes y anticoagulantes.

Estos estados de hipercoagulación también se pueden encontrar acompañando a numerosas situaciones clínicas adquiridas como la inmovilización, el embarazo, el puerperio, el uso de contraceptivos orales, las enfermedades malignas, una cirugía mayor, un trauma y el síndrome antifosfolipídico.

Por ello, estas entidades pueden clasificarse en:

1. Trombofilias hereditarias.
2. Trombofilias adquiridas.
3. Estados hipercoagulables adquiridos.
4. Anomalías de la coagulación y la fibrinólisis.
5. Síndrome antifosfolipídico primario.
6. Sepsis.
7. Neoplasia.
8. Embarazo y puerperio.
9. Anticonceptivos orales.
10. Cirugía mayor.
11. Traumatismo.
12. Infusión de concentrados.
13. Síndrome nefrótico.
14. Tratamiento con L-asparaginasa.
15. Anomalías plaquetarias.
16. Síndromes mieloproliferativos crónicos.
17. Hemoglobinuria paroxística nocturna.
18. Hiperlipemia.
19. Diabetes mellitus.
20. Trombocitopenia dependiente de la heparina.
21. Anomalías vasculares y reológicas.
22. Estasis venoso.
23. Superficies artificiales.
24. Hiperviscosidad.
25. Púrpura trombocitopénica trombótica.
26. Síndrome hemolítico urémico.
27. Vasculitis.
28. Arteriosclerosis.

## ANTICOAGULACIÓN FISIOLÓGICA

El sistema de la coagulación de la sangre es un mecanismo de defensa del organismo, cuidadosamente controlado, que es activado como respuesta a un daño vascular para prevenir la pérdida de sangre y para mantener la integridad del sistema circulatorio.

El enorme potencial del sistema de la coagulación de la sangre requiere ser controlado de una forma muy estricta para evitar una coagulación inapropiada de la sangre y la formación de trombos. Para ello, existe un sistema de vigilancia cuyos 4 pilotes fundamentales, son:

1. Antitrombina.
2. Sistema de la proteína C.
3. Inhibidor de la vía extrínseca.
4. Sistema de la fibrinólisis.

## ANTITROMBINA

La antitrombina, en un inicio llamada antitrombina III, es una glicoproteína de cadena simple y peso molecular de aproximadamente 60 kDa. Es el mayor inhibidor fisiológico de la trombina y del factor Xa. También inhibe a los factores XIIa, XIa, calicreína y plasmina. Por lo tanto, inhibe la mayoría de las enzimas generadas durante la activación de la coagulación. Se sintetiza en el hígado, tiene una vida media de 55 horas y pertenece al grupo de las serpinas (*serin protease inhibitors*).

La antitrombina inhibe preferentemente enzimas libres, mientras que las enzimas que forman parte de los complejos tenasa y protrombinasa son menos sensibles a esta inhibición. El papel fisiológico de la antitrombina es limitar el proceso de coagulación en el sitio de injuria vascular y proteger la circulación de las enzimas liberadas. La antitrombina es, por sí sola, un ineficiente inhibidor de serina proteasas, pero la heparina y las moléculas tipo heparina que están presentes en la superficie de las células endoteliales, estimulan esta acción. Este mecanismo constituye la base molecular para el uso de la heparina como anticoagulante terapéutico.

## SISTEMA DE LA PROTEÍNA C

La mayoría de los defectos genéticos asociados con trombosis venosa afecta el sistema anticoagulante de la proteína C. La trombina que contacta con los vasos intactos se une en la pared endotelial a un receptor de alta afinidad que se expresa en la superficie de las células endoteliales, la trombomodulina (TM). La trombina unida a la TM pierde su actividad coagulante, no escinde al

fibrinógeno y no activa a las plaquetas, ni a los factores V y VIII y XIII. En vez de ello, activa a la proteína C, una serina proteasa con propiedades anticoagulantes, la proteína C activada (PCA), escinde e inactiva los cofactores procoagulantes Va y VIIa. La trombina tiene la capacidad de expresar tanto su función coagulante como anticoagulante, en dependencia del contexto en el cual es generada: en el sitio de disrupción vascular, el efecto procoagulante de la trombina se expresa completamente; en cambio, en un sistema vascular intacto, tiene función anticoagulante en la unión con la trombomodulina para activar la proteína C.

La actividad de la proteína C se potencia por otra proteína del plasma vitamina K dependiente, la proteína S. En el plasma humano, alrededor del 30 % de la proteína S está libre, el resto está unido a una proteína reguladora del complemento C4b (*C4b binding protein*). La PCA y la proteína S libre forman un complejo unido a la membrana, el cual puede escindir los factores Va y VIIIa, aun cuando forman parte de los complejos tenasa y protrombinasa completamente organizados.

El factor V intacto puede actuar en sinergismo con la proteína S como un cofactor de la PCA en la degradación del factor VIIIa. De esta forma, el factor V desempeña una doble función: como proteína anticoagulante en la forma intacta y una potente proteína procoagulante después de la activación.

*In vivo*, la PCA no escinde el factor VIII intacto, ya que está unido al FvW y previene al factor VIII de interactuar con los fosfolípidos de la membrana. En cambio, el factor V y el Va se unen a los fosfolípidos, y la PCA es capaz de cortar la forma intacta de factor V. La consecuencia de esta incisión es la generación de un factor V anticoagulante que funciona en sinergismo con la proteína S como un cofactor de la PCA en la degradación del factor VIIIa. Así, cuando actúa la trombina o el factor Xa sobre el factor V, se produce el factor Va por una proteólisis limitada; mientras que cuando la PCA proteolíticamente escinde el factor V, actúa como anticoagulante. Este papel anticoagulante puede ser particularmente importante en la regulación del complejo tenasa por la PCA y la proteína S.

## INHIBIDOR DE LA VÍA EXTRÍNSECA

El inhibidor de la vía extrínseca (*tissue factor pathway inhibitor* [TFPI], *extrinsic pathway inhibitor* [EPI] o *lipoprotein associated coagulation inhibitor* [LACI]) controla la disponibilidad del complejo activo factor hístico-VIIa, también es un inhibidor efectivo del factor Xa y puede estar involucrado en su catabolismo.

Este inhibidor es producido por el endotelio, secretado hacia la pared de los vasos y su concentración en plasma es de 100 ng/mL, además, su vida media es muy corta, solo unos minutos cuando se compara con otras proteinasas inhibitoras.

El EPI está distribuido en diferentes compartimientos. Una gran fracción se une a los glucosaminoglicanos del endotelio, mientras en la sangre, el 90 % del EPI circulante está unido a lipoproteínas (está principalmente unido a la LDL en el plasma o al heparán sulfato cuando está asociado con las células endoteliales). Una fracción menor de EPI (aproximadamente el 10 % del total en sangre) está asociado con las plaquetas y es liberado con la estimulación de la trombina. Esto hace muy difícil relacionar los niveles en plasma (funcional, libre o total) con la actividad. Una gran cantidad del *pool* de EPI es liberado rápidamente luego de la administración de heparina, lo que causa un incremento en sus niveles entre 2 y 10 veces.

La falta del inhibidor de la vía extrínseca parece no ser compatible con la vida, ya que no han sido descritos estados de deficiencias en seres humanos; no obstante, se ha reportado una familia con trombofilia y deficiencia parcial de EPI.

El papel fisiológico del EPI como anticoagulante es apreciado por su habilidad para inhibir la coagulación intravascular y el *shock* letal inducido por *Escherichia coli* y factor hístico, en estudios animales.

## SISTEMA DE LA FIBRINÓLISIS

La actividad normal de la fibrinólisis es necesaria para la disolución correcta de coágulos que obstruyan el árbol vascular. El sistema fibrinolítico remueve el coágulo de fibrina, una vez que se ha alcanzado la función hemostática del sistema de la coagulación. Entre los componentes moleculares de este sistema se encuentran elementos del plasma, de las plaquetas, de los tejidos y de otras células de la sangre para regular la degradación de la fibrina. Esto se alcanza por la conversión del plasminógeno (una proteína del plasma que circula como un zimógeno para la serinoproteinasa), en plasmina. La plasmina es una enzima tipo tripsina que actúa sobre una gran variedad de proteínas del plasma. Sin embargo, muchas de estas reacciones requieren niveles extremadamente altos de plasmina. La función fisiológica de la plasmina está limitada, primariamente, a la degradación del coágulo de fibrina y a moléculas de la matriz extracelular. La conversión del plasminógeno a plasmina ocurre a través de una variedad de importantes activadores del plasminógeno que incluye el activador hístico del plasminógeno y el activador tipo uroquinasa.

Quizás el aspecto más característico del sistema fibrinolítico es que el plasma normal no tiene la habilidad de lizar la fibrina, a menos que el plasma o los tejidos suministren un activador del sistema fibrinolítico.

La activación intrínseca de la fibrinólisis o activación por el sistema de contacto depende de la fase de contacto de la coagulación y es inhibida por la C1-esterasa. Cuando se activa el sistema de contacto, la calicreína activaría al plasminógeno en forma directa o mediante una etapa intermedia, como sostienen algunos autores. La calicreína parece que transforma también al scu-PA (*single chain urokinase type plasminogen activator*) en uroquinasa de 2 cadenas (tcu-PA [*two chains urokinase type plasminogen activator*]).

Es probable que este mecanismo de activación de la fibrinólisis tenga poca importancia fisiológica. Pero es interesante mencionar que los enfermos con déficit de factor XII no sangran, sino que están en riesgo trombótico.

El señor Hageman, paciente en el que por primera vez se describiera el déficit de factor XII, falleció de una embolia pulmonar.

La activación extrínseca de la fibrinólisis ocurre mediante el activador hístico (t-PA) y el activador tipo uroquinasa (u-PA).

En condiciones normales, la liberación del t-PA por el endotelio está sujeta a complejas condiciones físicas y hormonales que incluyen sustancias vasoactivas, la presión venosa y otras. Puede ser inducida por la trombina, la epinefrina, la bradiquinina, la histamina, la acetilcolina, el factor activador plaquetario (PAF), la desmopresina, el ácido nicotínico, y también por el ejercicio y por la prueba de la oclusión venosa.

En presencia de fibrina, la activación del plasminógeno por el t-PA se acelera entre 200 y 400 veces mediante la formación de un complejo plasminógeno/t-PA sobre la superficie de la fibrina, lo que explicaría la mayor especificidad por la fibrina respecto al fibrinógeno. No obstante esta especificidad, en la terapéutica trombolítica con t-PA recombinante, como con estreptocinasa recombinante, ocurre también un descenso del fibrinógeno plasmático por la lisis sistémica provocada por las altas dosis de trombolíticos que, en el caso del t-PA, son potenciados por un complejo t-PA/plasminógeno formado por la acción de PDF estabilizado (dímeros D y E), lo que potencia la activación del plasminógeno por el t-PA.

El otro activador extrínseco mayor es la uroquinasa. Fue identificado primero en la orina y seguidamente fue detectado en el medio de cultivo de células renales, endoteliales, células malignas, tumores y en el plasma.

El activador del plasminógeno tipo uroquinasa es también una serino proteinasa y es sintetizada como una molécula de una sola cadena llamada prouroquinasa o *single-chain* u-PA, además, tiene muy bajo nivel de actividad proteolítica.

Se libera en una forma inactiva (pro-uroquinasa, scu-PA) que por acción de la plasmina y la calicreína se transforma en la de 2 cadenas (el tcu-PA). Las dos formas de uroquinasa han sido aisladas y utilizadas como trombolíticos con efecto equivalente.

A diferencia del t-PA, el scu-PA no contiene el dominio tipo fibronectina o un segundo dominio: *kringle* (llamado así por su semejanza con una torta danesa de igual nombre), lo cual explica su baja afinidad relativa por la fibrina.

### Activación exógena de la fibrinólisis

Varias proteínas bacterianas han sido identificadas como activadoras de la fibrinólisis. La activación exógena (terapéutica) de la fibrinólisis no es un mecanismo fisiológico, es el que permite una activación farmacológica del sistema y está representado fundamentalmente por la estreptocinasa, la estafilocinasa y un activador exógeno llamado APSAC, que está compuesto por un complejo no covalente de una forma modificada del plasminógeno (plasminógeno acilado) con la estreptocinasa.

La estreptocinasa forma, en un inicio, un complejo estequiométrico 1:1 con el plasminógeno que expone el sitio activo del plasminógeno modificado. Este complejo estreptocinasa/plasminógeno se convierte en el complejo estreptocinasa/plasmina que, enzimáticamente, transforma el plasminógeno en plasmina. La habilidad del fibrinógeno y el fragmento D para aumentar la actividad de la estreptocinasa parece mediada por la unión del plasminógeno al dominio D del fibrinógeno. Cuando es inyectada por vía intravenosa, la estreptocinasa perdura alrededor de 30 minutos.

La administración de una dosis suficiente de estreptocinasa provoca una fuerte activación del plasminógeno con la consecuente hiperplasminemia y un estado lítico sistémico con disolución del trombo que ocluye, disminución del fibrinógeno, aumento de los PDF, disminución de factores de la coagulación por la acción de la plasmina y alteración de la función plaquetaria por la interferencia de los PDF sobre los receptores de la membrana plaquetaria, principalmente las glicoproteínas IIb-IIIa.

La estreptocinasa recombinante, obtenida y producida en Cuba por primera vez en el mundo, es utilizada en la terapéutica de procesos trombóticos, en particular en el infarto del miocardio. Ha sido comparada con las

mejores estreptocinasas de marcas reconocidas internacionalmente, obtenidas por vía natural con resultados favorables.

El APSAC (plasminógeno anisolado/estreptocinasa), es un complejo no covalente con una cantidad equimolar de estreptoquinasa. No interactúa con el lys-plasminógeno hasta que se produzca una deacilación específica de la molécula sobre la superficie de la fibrina. Como el APSAC y la estreptocinasa son productos vinculados con bacterias, potencialmente pueden generar anticuerpos neutralizantes y hay riesgo de anafilaxia.

La estafilocinasa es otra proteína bacteriana con un mecanismo de acción similar a la estreptoquinasa. Esta proteína es generada en el estafilococo dorado. No es una enzima, pero forma un complejo con el plasminógeno y lo convierte en plasmina.

Entre los inhibidores de la fibrinólisis se incluyen aquellos que inhiben los activadores, como el inhibidor del activador hístico del plasminógeno (PAI-1) y aquellos que inhiben la plasmina, como la  $\alpha_2$ -antiplasmina.

#### **Inhibidores de los activadores del plasminógeno**

Han sido identificados, al menos, 4 inhibidores del activador del plasminógeno (PAI). Se incluyen PAI-1, PAI-2, PAI-3 y nexina proteasa.

El PAI-1 representa, al menos, el 60 % del total de la actividad inhibitoria del activador del plasminógeno que existe en el plasma y desempeña una función importante.

En la regulación de la fibrinólisis, los niveles altos del PAI-1 se asocian con el riesgo de trombosis. Hasta ahora, PAI-1 y PAI-2 parecen desempeñar una función dominante en la regulación, clínicamente significativa, de la fibrinólisis. El papel exacto del PAI-3 y de la nexina-proteasa en la fibrinólisis patológica, está poco definido.

#### **$\alpha_2$ -antiplasmina**

Es una proteína de 70 kDa y constituye el principal inactivador de la plasmina, pues forma rápidamente un complejo estequiométrico con la plasmina. La  $\alpha_2$ -macroglobulina también tiene función antiplasmina, pero de menor actividad y tal vez de menor importancia en la homeostasia normal.

La proteína es sintetizada y segregada principalmente por los hepatocitos, pero también está presente dentro de los gránulos alfa de las plaquetas. La concentración local de  $\alpha_2$ -antiplasmina en el sitio del trombo plaquetario desempeña una función importante al hacer que el trombo sea resistente a la degradación de la plasmina. Ella compite con el plasminógeno en la unión con el coágulo

de fibrina y, una vez unido con este, tienen lugar uniones cruzadas con la fibrina, por la acción del factor XIII. La actividad antifibrinolítica de la  $\alpha_2$ -antiplasmina unida al coágulo permanece coágulo-específica.

#### **Glicoproteína rica en histidina**

La acción de la glicoproteína rica en histidina (HRGP) no está debidamente aclarada, pero interactúa con un grupo de proteínas *in vitro* como el fibrinógeno y la trombospondina. Inhibe la actividad fibrinolítica del plasminógeno al reducir los sitios de unión a la fibrina.

#### **Proteína C y fibrinólisis**

La proteína C activada desempeña una función importante en el incremento de la fibrinólisis, aunque el mecanismo por el cual esto ocurre está pobremente definido. La proteína C provoca inhibición del PAI-1, del t-PA y de la uroquinasa. El PAI-1 se une a la proteína C activada y este complejo interactúa con la fibrina para bloquear la liberación de PAI-1 del endotelio.

### **FORMACIÓN DEL TROMBO**

La formación del trombo o fisiopatología de la trombosis fue postulada desde el siglo XIX, en la mencionada tríada de Virchow. Esta incluía como los principales factores o causas de trombosis, anormalidades en los vasos, alteraciones en el flujo de la sangre y cambios en la composición de esta. Hoy se conoce que los mecanismos anticoagulantes regulatorios actúan para neutralizar los eventos procoagulantes en la vasculatura y que una excesiva activación de la coagulación o inhibición de los mecanismos anticoagulantes llevan a un estado de hipercoagulabilidad y trombosis.

La activación de la coagulación está relacionada estrechamente con las características del flujo y de la condiciones trombogénicas de la superficie endotelial.

#### **Papel del endotelio**

Con una extensión de más de 1 000 m<sup>2</sup>, el endotelio es un órgano que tiene múltiples funciones reguladoras relacionadas con la coagulación, la fibrinólisis, la inflamación, la proliferación celular y el flujo sanguíneo, por su capacidad de inducir contracción y relajación de los vasos, así como por la transferencia activa de sustancias metabólicas entre la sangre y el medio extravascular, entre otras.

Los cambios en la pared de los vasos constituyen, probablemente, los factores causales más comunes en la formación de trombos arteriales.

La trombosis arterial, a menudo, es el resultado de un proceso que daña la pared de los vasos como la aterosclerosis o la homocisteinemia. El colágeno puede ser expuesto por daño local en los vasos sanguíneos o por cambios vasculares inflamatorios. La hipoxia, la acidosis y el *shock* pueden dañar la pared de los vasos con exposición de colágeno subendotelial y activación de la coagulación. Comúnmente comienza con la adhesión de plaquetas a una superficie vascular anormal y la formación de un nido de plaquetas y fibrina. Este proceso puede ser potenciado por ADP u otros mediadores, que son liberados de las plaquetas activadas. La reacción de liberación de las plaquetas y la síntesis de tromboxano A<sub>2</sub> (potente agregante plaquetario, vasoconstrictor, broncoconstrictor que también incrementa la permeabilidad de las membranas), y otros agonistas de la agregación plaquetaria, inducen la agregación de más plaquetas y el crecimiento de los trombos, un proceso con frecuencia llamado reclutamiento de plaquetas.

En la trombosis venosa, la pared de los vasos usualmente es normal desde el punto de vista histológico, y factores extrínsecos a los vasos parecen desempeñar un mayor papel patológico. Una excepción de esta generalización es el trauma venoso directo o enfermedad vascular venosa. Una reducción generalizada del tono venoso puede ser un importante factor fisiopatológico en la trombosis venosa de la mujer embarazada y en mujeres que toman tabletas anticonceptivas.

La actividad del t-AP usualmente está disminuida en muchas enfermedades vasculares y es significativo que hay mucho menos t-AP en las extremidades inferiores que en las superiores, lo que puede ser la causa o, al menos contribuir, a la mayor incidencia de trombosis en las extremidades inferiores. Se ha encontrado una disminución de la actividad del activador de la fibrinólisis en alrededor del 75 % de los pacientes con trombosis venosa profunda que, a menudo, es adjudicada a un daño vascular primario.

### Flujo sanguíneo

En los vasos normales, el flujo de la sangre se ha denominado laminar, lo que refleja la tendencia de la sangre a fluir en capas cilíndricas concéntricas, en las cuales su rapidez crece del centro a la periferia. Debido a que los componentes celulares de la sangre circulante son repelidos mutuamente por sus cargas eléctricas, y tienden a separarse unos de otros y del endotelio, los hematíes van a ocupar la posición central de la luz en el flujo laminar y desplazan selectivamente a las plaquetas hacia la superficie vascular. Esto favorece la adhesión a la pared. Esta adhesión de las plaquetas

tiene relación con la velocidad del flujo sanguíneo y con el índice de cizallamiento que estima el número de veces que una plaqueta colisiona con la pared vascular por unidad de tiempo.

La trombosis arterial ocurre, en un inicio, en condiciones de flujo rápido de sangre, condición en la cual el factor de von Willebrand es crítico para la adhesión plaquetaria. La velocidad del flujo favorece la adhesividad de las plaquetas, como también lo hacen los glóbulos rojos y otros elementos formes de la sangre. La trombosis arterial está usualmente compuesta por una fuerte y coherente masa de plaquetas que contiene pequeñas cantidades de fibrina y unos pocos hematíes y leucocitos, el clásico trombo blanco que recuerda el tapón hemostático normal. Una obstrucción parcial o total del flujo puede provocar una cola de trombo rojo.

La hipertensión, el flujo de sangre turbulento y la hiperviscosidad pueden ser factores contribuyentes de la trombosis arterial.

La trombosis arterial se favorece en situaciones de fuerzas de cizallamiento elevadas, combinadas con velocidades de flujo relativamente no muy altas, y sobre todo, en un área de flujo turbulento.

La trombosis venosa se desarrolla en condiciones de flujo lento de sangre y se aumenta con un posterior retardo y estancamiento del flujo. El trombo venoso está compuesto por gran cantidad de fibrina que contiene numerosos eritrocitos. En esta masa friable, trombo rojo, las plaquetas y los leucocitos están entremezclados de una forma aleatoria. El trombo venoso recuerda el coágulo formado *in vitro* (que se forma en el tubo de ensayo cuando se extrae sangre y se deja coagular).

El trombo venoso provoca, usualmente, obstrucción del flujo de la sangre desde el principio, pero su consecuencia más drástica es la embolización. Las diferencias en la estructura entre la trombosis arterial y venosa pueden ser el resultado de la velocidad del flujo de sangre.

Los numerosos y complicados factores reológicos que pueden estar involucrados en la trombosis deben ser resaltados.

La adhesión plaquetaria en condiciones de flujo, también depende del hematócrito sanguíneo. La influencia de los glóbulos rojos en la adhesión plaquetaria se observó al emplear técnicas de perfusión continua, en que el plasma rico en plaquetas no se adhiere sobre superficies vasculares, mientras que, en la medida que se aumenta el hematócrito del volumen perfundido, aumenta de igual manera la adhesión.

El papel fisiopatológico del estasis está probablemente mediado por la afectación a los mecanismos que

remueven normalmente los factores activados de la coagulación de la sangre circulante, los cuales por lo general son eliminados en el hígado.

En la génesis de la trombosis venosa, la lentitud del flujo es el factor preponderante, aunque se requiere la presencia de plaquetas o proteínas de la coagulación activadas e injuria vascular local. En las venas, los trombos tienden a iniciarse en los fondos de saco de las válvulas venosas y en los senos venosos intramusculares de miembros inferiores, que son puntos de máximo estasis.

### **Anormalidades de la sangre o hipercoagulabilidad**

En la fisiopatología de la trombosis, las alteraciones de los componentes de la sangre desempeñan una función trascendental. Además del incremento de los elementos formes que aumentan la viscosidad y vuelven lenta la corriente sanguínea, es de particular importancia profundizar en las alteraciones de la hemostasia.

La disminución de la actividad de los inhibidores de la coagulación, bien sea de forma congénita o adquirida, así como la disminución de la actividad fibrinolítica, pueden favorecer el surgimiento del trombo, al igual que el incremento de la actividad procoagulante de la sangre con la consiguiente formación del gran coagulador, la trombina. La sangre de pacientes con trombosis activa o con alteraciones pretrombóticas puede coagular, *in vitro*, a un ritmo anormalmente rápido. El concepto de hipercoagulabilidad implica que existen cambios pretrombóticos, y que pueden ser detectados *in vitro*, además, que esas alteraciones son importantes en la patogénesis de la trombosis.

### **Plaquetas**

Aunque las plaquetas pueden ser incorporadas virtualmente en cualquier trombo, en primer lugar, parecen ser importantes en la trombosis arterial.

Un aumento del intercambio plaquetario (acortamiento de la supervivencia de las plaquetas y destrucción compensada de estas), puede encontrarse en enfermedades vasculares y trombosis, que incluyen enfermedades inmunológicas y no inmunológicas. También puede encontrarse un aumento del intercambio plaquetario en pacientes con factores de riesgo de enfermedad vascular, como el uso del tabaco, y pacientes con hiperlipidemias.

Como consecuencia de la interacción plaqueta/pared vascular en pacientes con enfermedad vascular, tiene lugar la activación de las plaquetas. Esto provoca una enfermedad del *pool* de almacenamiento adquirida y la presencia en la sangre de proteínas de los gránulos plaquetarios, como el factor 4 plaquetario y la

$\beta$ -tromboglobulina. Niveles altos de estas proteínas indican un aumento del intercambio (activación) plaquetario, pero es prudente señalar que una extracción inadecuada de sangre puede, erróneamente, dar como resultado niveles anormales, y la utilidad clínica de tales pruebas se hace incierta.

El endotelio vascular posee múltiples propiedades antiplaquetarias que pueden ser importantes para prevenir la adhesión plaquetaria, pues promueven la vasodilatación y la inhibición de la agregación plaquetaria.

### **Anormalidades de la coagulación**

Entre las anomalías de la coagulación se encuentran:

#### **Niveles elevados de factores de la coagulación.**

Se han encontrado en pacientes con trombosis y con estados pretrombóticos, niveles elevados de fibrinógeno y de los factores V, VII, VIII y X, también en el embarazo, y en mujeres que utilizan contraceptivos orales. El fibrinógeno y los factores V y VIII son reactantes de fase aguda, y los niveles en el plasma pueden aumentar virtualmente en cualquier desorden asociado con daño hístico o inflamación, incluyendo la mayoría de los procesos trombóticos. Ha sido demostrada una asociación entre niveles elevados del factor von Willebrand en plasma e infarto del miocardio recurrente, y el antígeno von Willebrand es un predictor independiente de riesgo de enfermedad arterial coronaria.

Se ha vinculado la fibrinólisis anormal con la enfermedad vascular. La actividad fibrinolítica baja se ha encontrado como determinante significativa de la enfermedad arterial coronaria, y la actividad elevada del PAI-1 ha sido asociada con eventos isquémicos mayores.

Aunque los niveles elevados de zimógenos de la coagulación pueden estar presentes en un número de alteraciones médicas como resultado de una respuesta de fase aguda, algunas proteínas de la coagulación tienen importancia predictiva cuando están elevadas en enfermedades cardiovasculares. Parecen ser especialmente útiles en este sentido: el fibrinógeno, factor VII, FVIII, PAI-1 y FvW.

**Activación de la coagulación.** La infusión en animales de laboratorio de pequeñas cantidades de suero, provoca anomalías de las pruebas de laboratorio que indican hipercoagulabilidad. Cuando el estasis o el enlentecimiento del flujo de sangre es sobrepuesto a lo anterior, consistentemente se desarrolla la trombosis venosa. Esto hace pensar que el daño a las venas es un estímulo trombogénico menos potente.

Se considera que el factor hístico (FT) es primariamente el que inicia la coagulación *in vivo* y, en ausencia



de expresión de FT, se ha observado que las células endoteliales mantienen activamente la tromborre-sistencia. El FT puede ser expresado en pequeñas trazas durante varios procesos fisiológicos como durante el parto normal y después de traumas ligeros, tales como: injuria menor de la cabeza. La injuria inmunológica al endotelio puede llevar a la exposición del FT, por ejemplo, anticuerpos formados para heparina exógena se pueden unir al heparán sulfato sobre el endotelio, lo que resulta en daño celular, expresión del FT y la iniciación de la coagulación. Igualmente, las células endoteliales pueden ser inducidas para producir FT por interleucina-1, homocisteína, factor de necrosis tumoral y endotoxina.

La activación de la coagulación puede ocurrir también sobre monocitos y plaquetas, que pueden ser activados por intermedio del factor Xa, que a su vez provoca la conversión de protrombina en trombina. Un deficiente aclaramiento hepático de factores activados de la coagulación puede representar un factor trombogénico importante en niños prematuros y en pacientes con enfermedad hepática, especialmente después de la administración de concentrados del complejo protrombínico que contiene trazas de factores de la coagulación vitamina K dependiente activados.

Ciertos adenocarcinomas pueden expresar actividad de FT, y extractos de otros tejidos tumorales activan específicamente al factor X.

El intercambio de fibrinógeno se encuentra acelerado en pacientes con trombosis venosa mayor y en diabéticos con hiperglicemia, pero no en pacientes con pequeñas lesiones trombóticas.

Un cuadro similar a los estados de hipercoagulabilidad puede ser visto en pacientes con CID crónica. El embarazo, considerado como un estado hipercoagulable, ha sido también descrito como una CID crónica fisiológica. El uso de contraceptivos orales o tratamiento con estrógenos, se ha asociado claramente con un incremento del riesgo de tromboembolismo venoso. Los estrógenos pueden inducir la activación de la coagulación con una reducción en los niveles de inhibidores de esta coagulación, tales como: la antitrombina y la proteína S. En mujeres que consumen contraceptivos orales se ha presentado resistencia adquirida a la proteína C activada.

## TROMBOFILIAS

### TROMBOFILIAS HEREDITARIAS

Los estudios de pacientes con tendencia a padecer trombosis, que puede deberse a factores genéticos y

adquiridos, han atestiguado los avances sorprendentes durante los últimos años. El hecho de que la trombosis venosa puede ser debida a un rasgo heredado, no fue completamente reconocido hasta que en 1965 Egeberg describió una pequeña familia con trombofilia asociada con deficiencia heterocigótica de antitrombina, luego identificada como antitrombina Oslo (G-A en el triplete que codifica para Ala 404).

Después del descubrimiento, en 1965, de la deficiencia de AT; en ese mismo año, de la disfibrinogenemia; la deficiencia de proteína C, en 1981; y de la proteína S, en 1984, se han logrado descubrimientos fundamentales que han revolucionado el conocimiento de los estados de hipercoagulabilidad, lo que permite hoy día conocer la causa de la afección de más del 50 % de las personas que padecen trombosis venosas, y la conciencia de que los factores genéticos conocidos en la actualidad son de igual importancia que los factores adquiridos en la patogénesis de la trombosis venosa.

Los aportes en el conocimiento sobre la resistencia a la proteína C activada entre 1993 y 1994, y el descubrimiento del alelo 20210 A de la protrombina en 1997, constituyen acontecimientos de gran importancia. Otras dos anomalías han sido descubiertas o asociadas con trombosis venosa en los últimos años, las que junto con las dos anteriores, son más comunes en la población general. Estas son: las elevadas concentraciones de factor VIII y la hiperhomocisteinemia. En este sentido, la apreciación de que la homocisteinemia, previamente asociada con la trombosis arterial, puede ser también una causa común de trombosis venosa, constituye un importante avance en el conocimiento de estas entidades.

### Factores de riesgo hereditarios de trombosis venosa

Los factores de riesgo hereditario de trombosis venosa son:

1. Deficiencia de proteína C.
2. Deficiencia de proteína S.
3. Deficiencia de antitrombina.
4. Disfibrinogenemia.
5. Resistencia a la proteína C activada (factor V Leiden).
6. Protrombina 20210 A.
7. Altas concentraciones de factor VIII.
8. Hiperhomocisteinemia.

### Prevalencia y riesgo estimado

La resistencia a la proteína C activada, causada por el factor V Leiden, ocurre en el 5 % de la población blanca, y entre pacientes con trombosis venosa alcanza el 2 %. Al parecer, este es un factor de riesgo

de más fuerza que las deficiencias de los inhibidores de la coagulación.

La protrombina 20210 A se encuentra en el 2 % de la población y, al igual que el factor V Leiden, también se presenta con diferencias regionales. Entre los pacientes con trombosis se encuentra en el 6 % y se comporta como un factor de riesgo mediano, además se ha encontrado, hasta ahora, principalmente en personas blancas.

La prevalencia de altas concentraciones de factor VIII y la hiperhomocisteinemia dependen de los valores seleccionados de corte. Concentraciones de FVIII mayores que 1 500 U/L (150 % de lo normal) se han encontrado en el 11 % de la población general y en el 25 % de los pacientes con trombosis. Esas altas concentraciones, comparadas con concentraciones bajas, menores que 1 000 U/L, fueron asociadas con un riesgo de trombosis 6 veces mayor. Teniendo en cuenta la alta incidencia y el alto riesgo relativo, los elevados niveles de FVIII pueden ser responsables de la mayoría de los eventos trombóticos que son causados por los factores de riesgos genéticos mencionados.

Las concentraciones de homocisteína mayores que 18,5 mmol/L fueron encontradas entre el 5 y el 10 % de la población general y comparadas con concentraciones por debajo de 18,5 mmol/L. Los pacientes con más de 18,5 mmol/L padecen trombosis 2,5 veces más.

### Situaciones en las que un paciente debe ser estudiado para hacer el diagnóstico de trombofilia

La trombosis en personas jóvenes (con menos de 45 años), con trombosis recurrente o con un solo evento trombótico, pero con antecedente familiar de trombosis; trombosis en sitios poco usuales como en senos cerebrales, venas de las manos, retina y venas mesentéricas; trombosis grave sin causa secundaria aparente y trombosis ante agresiones ligeras. Los pacientes que desarrollen trombosis sin tener antecedentes familiares de esta afección, deben ser evaluados para descartar las causas adquiridas, incluyendo las enfermedades vasculares, malignas, mieloproliferativas y el síndrome antifosfolipídico.

En pacientes con trombosis arterial debe investigarse homocisteinemia y deficiencia de proteína S. En casos de resistencia temprana al tratamiento con heparina se debe sospechar deficiencia de AT; en necrosis inducida por warfarina y en púrpura neonatal fulminante se debe sospechar deficiencia de proteína C o S; y en trombosis que se presenta durante el tratamiento con estrógenos o embarazo, se debe descartar resistencia a la proteína C activada.

El diagnóstico de la trombofilia hereditaria se determina a partir de las situaciones e investigaciones que aparecen en los cuadros 3.6 y 3.7 y en la tabla 3.40.

**Cuadro 3.6** Situaciones en las que un paciente debe ser estudiado por trombofilia

Situaciones
Trombosis venosa antes de los 40 a 45 años
Trombosis venosa recurrente y tromboflebitis
Trombosis en sitios inusuales (vena mesentérica y senos venosos cerebrales)
Trombosis neonatal inexplicable
Necrosis de la piel particularmente después de la administración de cumarínicos
Resistencia a la terapéutica anticoagulante
Trombosis arterial antes de los 30 años
Pacientes con historia familiar de trombosis venosa. Tiempo parcial de tromboplastina activado que no corrige con mezcla con plasma normal
Pérdida recurrente de embarazos
Púrpura trombocitopénica trombótica
Lupus eritematoso sistémico

**Tabla 3.40** Investigaciones iniciales en los pacientes con trombofilia

Investigación de laboratorio	Diagnóstico posible	Anormalidad
Hemograma y lámina de periferia	Policitemia vera Trombocitopenia esencial HPN Discrasias de células plasmáticas	Hematócrito elevado Plaquetas elevadas Anemia Rouleaux Hiperviscosidad
Tiempo de protrombina	Anticoagulante lúpico	Prolongado
TPT $\alpha$	Anticoagulante lúpico	Prolongado
Tiempo de protrombina	Disfibrinogenemia	Acortado/prolongado

**Cuadro 3.7** Investigaciones especiales en pacientes con trombofilia**Investigaciones**

Resistencia a la proteína C activada

Evaluación genética molecular del factor V Leiden

Ensayos para antitrombina (funcional e inmunológico)

Ensayos para proteína C (funcional e inmunológico)

Ensayos para proteína S libre y total (inmunológicos y funcionales)

Análisis del ADN para demostrar alelo 20210 A de la protrombina

Dosificación de factor VIII

Dosificación de homocisteína

Anticoagulante lúpico

Anticuerpos anticardiolipina

**SÍNDROME ANTIFOSFOLIPÍDICO****DEFINICIÓN**

El síndrome antifosfolipídico (SAF) es una condición que se manifiesta en pacientes con tromboembolismos o pérdida recurrente de embarazos, con evidencias de laboratorio de presencia de anticuerpos contra el complejo proteína-fosfolípido. Es una entidad autoinmune, en la cual un grupo de anticuerpos desempeña una función directa en la patogénesis de la trombosis, pérdida de embarazos y otras manifestaciones clínicas. El diagnóstico de este síndrome, también conocido como síndrome de Hughes, requiere la presencia

de eventos clínicos y la demostración inequívoca de anticuerpos antifosfolipídicos, ya sean anticuerpos anticardiolipina (aCL) por ELISA o por la prueba de coagulación positiva para anticoagulante lúpico (AL).

La presencia solo de anticuerpos en ausencia de síntomas clínicos, no es suficiente para el diagnóstico: el anticuerpo antifosfolipídico no patogénico sin el síndrome puede ser inducido por drogas o por infección.

Cuando el SAF se presenta en pacientes sin otro diagnóstico, estamos en presencia de un síndrome antifosfolipídico primario (SAFP) y cuando se presenta con lupus eritematoso o con otra enfermedad reumática, se trata de un síndrome antifosfolipídico secundario (SAFS). Unos pocos pacientes con SAF desarrollan una enfermedad multiorgánica severa aguda, que se denomina síndrome antifosfolipídico catastrófico (SAFC).

**HISTORIA**

El interés por estudiar los anticuerpos antifosfolipídicos comenzó con el descubrimiento, en 1952, del anticoagulante lúpico hasta en el 10 % de los pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES). Rápidamente se notó que la presencia del AL estaba asociada con trombosis en vez de con sangramiento. Como causa de la asociación encontrada entre el lupus, una prueba de sífilis falso-positiva y la presencia de AL, en 1983, Harris y colaboradores diseñaron una nueva prueba (primero un radioinmunoensayo y después un enzoinmunoensayo) para antifosfolipídico, en la que se utilizó como antígeno la cardiolipina. Con las modificaciones subsiguientes de esta prueba se llegó a la conocida hoy como prueba para anticuerpos anticardiolipina.

El síndrome fue propuesto primero como una entidad distinta y se llamó síndrome anticardiolipina, en 1985; más tarde fue renombrado como síndrome antifosfolipídico.

## CRITERIO DIAGNÓSTICO

Para realizar el criterio diagnóstico del síndrome antifosfolípido (SAF), véase la tabla 3.41.

Las anomalías en los resultados de las pruebas de laboratorio deben persistir al menos 2 meses.

El diagnóstico de SAF requiere un evento clínico y una prueba de laboratorio anormal que debe persistir.

Anticuerpos LA y aCL han sido reportados en una variedad de alteraciones clínicas, incluyendo LES, otras enfermedades autoinmunes y del tejido conectivo, y entidades que no están relacionadas con el LES.

**Tabla 3.41** Criterios diagnósticos en el síndrome antifosfolípido

Criterios clínicos	Criterios de laboratorio
Trombosis venosa	Anticoagulante lúpico positivo
Trombosis arterial	Anticuerpo anticardiolipina positivo (título moderado a alto de IgG)
Pérdidas recurrentes de embarazos	Trombocitopenia inmune

## MECANISMO FISIOPATOLÓGICO

El mecanismo fisiopatológico del SAF ha permanecido oscuro, resultado de una aparente multiplicidad de determinantes antigénicas reconocidas por los anticuerpos. Se han caracterizado 4 tipos de anticuerpos antifosfolípidos:

1. Prueba serológica falso positiva para la sífilis.
2. Anticoagulante lúpico.
3. Anticuerpos anticardiolipina.
4. Anticuerpos anti-B2 glicoproteína.

El resultado falso positivo en la prueba serológica contra la sífilis realizada a los pacientes, ocurre porque el antígeno de la sífilis utilizado en el ensayo está embebido en cardiolipina. Como resultado, la reacción contra esta molécula será incorrectamente interpretada como dirigida contra el antígeno treponémico. Esta prueba serológica para la sífilis no debe ser utilizada como prueba de tamizaje para anticuerpo antifosfolípido, por su baja especificidad y sensibilidad.

Los anticoagulantes lúpicos son anticuerpos dirigidos contra proteínas del plasma unidas a fosfolípidos aniónicos. El AL bloquea el conjunto del complejo protrombina, lo que provoca una prolongación *in vitro* de las pruebas de coagulación dependientes de fosfolípidos, del

tiempo parcial de tromboplastina activada, del tiempo de veneno de víbora Russell diluido, del tiempo de coagulación de caolín y raramente del tiempo de protrombina.

Se pensó, originalmente, que los anticuerpos asociados con SAA y detectados en ensayos de AL o aCL, estaban dirigidos, de forma directa, contra fosfolípidos aniónicos. Sin embargo, hace pocos años, algunas evidencias han demostrado que, por lo general, este no es el caso. Casi siempre, los anticuerpos en suero de pacientes con AAF, que son detectados con ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), no reconocen la cardiolipina, sino que se unen a la B2-glicoproteína I (B2GPI), una proteína del plasma unida al fosfolípido.

La mayoría de los anticuerpos con actividad de anticoagulante lúpico en pacientes con SAF, están dirigidos contra B2-glicoproteína o contra la protrombina. Estas observaciones claves llevan a la reevaluación de la naturaleza de los anticuerpos *antifosfolípidos* y puede aportar importantes datos en cuanto a la naturaleza de la respuesta autoinmune en el SAF.

Por unión con la fosfatidilserina externalizada sobre plaquetas activadas o apoptóticas, células endoteliales, trofoblastos u otras células, la B2-glicoproteína I y los anticuerpos antifosfolípidos, pueden funcionar como parte de un mecanismo normal, por el cual la muerte celular es inducida o las células apoptóticas son removidas.

De manera alternativa, los anticuerpos antifosfolípidos, a través de la B2-glicoproteína I, pueden activar las células endoteliales o las plaquetas, e inducir de esta forma la coagulación. Los AAF se unen a los trofoblastos y pueden activarlos. Los anticuerpos antifosfatidilserina afectan, de manera adversa, la diferenciación del trofoblasto, incluyendo la formación de sincitios, invasión, producción de hormona y actividad anticoagulante de la anexina V. Los AAF compiten con la anexina V (proteína anticoagulante de la placenta) y pueden desplazarla. Las placentas obtenidas de pacientes con SAF muestran aterosclerosis acelerada y oclusión vascular.

Se han implicado mecanismos que incluyen: inhibición de la proteína C activada, deficiencia adquirida de proteína S libre, activación de plaquetas y anomalías en los niveles de antígenos o actividad de factores hemostáticos derivados del endotelio. La trombogenicidad de los AAF puede también resultar de su interferencia con fosfolípidos-células endoteliales requerida para la actividad anticoagulante de antitrombina III y proteína C y S y la síntesis de prostaciclina y/o incremento de la expresión en células endoteliales de los siguientes procoagulantes: factor hístico, factor von Willebrand, factor activador de plaquetas e inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1.

## PREDISPOSICIÓN GENÉTICA

Los factores genéticos pueden desempeñar un papel en la predisposición individual para el desarrollo del LES. De forma similar, familiares de pacientes con SAF tienen más probabilidad de ser portadores de esos anticuerpos. Adicionalmente, hay una fuerte asociación de SAF con HLA-DR7 en pacientes canadienses, alemanes, italianos y mejicanos, y con HLA-DQ7, en pacientes americanos y españoles.

El LES está asociado con alta incidencia de resistencia a la proteína C activada, asociada con la mutación genética del factor V (factor V Leiden). No está claro si esta mutación es más común en pacientes con SAF y enfermedad tromboembólica.

## CUADRO CLÍNICO

Aunque los AL son inmunológicamente distintos a los aCL, las manifestaciones clínicas asociadas con estos anticuerpos son similares. La experiencia clínica sugiere que la trombosis venosa está probablemente más asociada con AL, y que la trombosis arterial está tal vez más asociada con altos títulos de anticuerpos aCL. El SAF se caracteriza por la tríada: pérdida fetal, enfermedad tromboembólica (arterial o venosa) y trombocitopenia inmune, aunque se puede encontrar una amplia variedad de manifestaciones clínicas. La trombosis venosa aparece con más frecuencia que la arterial y el lugar más común de presentación es la pantorrilla, pero pueden estar involucradas las venas renales, hepáticas y de la retina. El sitio en que más aparece la trombosis arterial es la circulación cerebral; pero han sido encontradas oclusiones en arterias coronarias, renales y mesentéricas, y en injertos de derivaciones arteriales.

La recurrencia de eventos trombóticos en SAF es común. Una interesante observación es que una trombosis inicial arterial tiende a ser seguida por una arterial, y una trombosis venosa inicial, por un evento venoso. Los factores que determinan la predilección por la circulación venosa o arterial no son conocidos.

Aunque se asume que la formación de trombos es la causa de muchas de las manifestaciones clínicas del SAF, diferentes estudios sugieren que factores adicionales pueden ser responsables de las pérdidas frecuentes de embarazos en las mujeres. Estas ocurren con más frecuencia en el segundo trimestre, y los AAF pueden provocar adicionalmente, un retardo en el crecimiento intrauterino.

Además de encontrarse los AL y aCL en el SAF primario, pueden ser hallados también en una variedad de enfermedades autoinmunes y reumáticas:

1. Lupus eritematoso sistémico (31 % con AL y de 40 a 47 % con aCL).
2. Anemia hemolítica.
3. Púrpura trombocitopénica idiopática (hasta el 30 %).
4. Artritis juvenil.
5. Artritis reumatoidea (del 7 al 50 %).
6. Artritis soriásica (28 %).
7. Esclerodermia (25 %), especialmente con enfermedad severa.
8. Síndrome de Behcet (20 %).
9. Síndrome de Sjögren (del 25 al 42 %).
10. Enfermedad mixta del tejido conectivo (22 %).
11. Polimiositis y dermatomiositis.
12. Polimialgia reumática (20 %).
13. Osteoartritis (menos del 14 %).
14. Ocasionalmente en gota y en esclerosis múltiple.
15. Lupus eritematoso discoide crónico.
16. Mialgia eosinofílica y síndrome de toxicidad al aceite.
17. Fenómeno Raynaud.
18. Inducido por drogas: procainamida, hidralacina, quinidina, fenotiazinas y penicilina.

Existen otras asociaciones clínicas como:

1. Enfermedades malignas:
  - a) Leucemia.
  - b) Enfermedades linfoproliferativas y plasmocíticas.
  - c) Tumores sólidos.
2. Infecciones:
  - a) Viral.
  - b) Bacteriana.
  - c) Por protozoos.
  - d) Por hongos.
3. Enfermedades neurológicas.
4. Enfermedad hepática.
5. Enfermedad arterial periférica.
6. Insuficiencia renal crónica.
7. Drepanocitosis.
8. Seudotrombocitopenia dependiente de EDTA.
9. Paciente sin enfermedad aparente.

Las manifestaciones clínicas del SAF pueden ser:

1. Paciente asintomático.
2. Tromboembolismo arterial o venoso.
3. Osteonecrosis avascular.
4. Hematológicas.
5. Citopenias: trombocitopenia, anemia hemolítica autoinmune y leucopenia.
6. Coagulopatías: disfunción plaquetaria, deficiencia de protrombina.
7. Neurológicas: isquemia aguda (accidente cerebrovascular, ataque isquémico transitorio y encefalopatía),

migraña severa, demencia por infartos múltiples, neuropatía periférica y miastenia gravis.

8. Dermatológicas: livedo reticulares, acrocianosis (isquemia cutánea distal, ulceración, gangrena y necrosis cutánea diseminada), lesiones de piel tipo piodermia gangrenosa y anetoderma en VIH-1.
9. Cardiopulmonares: endocarditis marántica, isquemia del miocardio e infarto, masa trombótica

intracardíaca, enfermedad arterial periférica, hipertensión pulmonar tromboembólica y no trombótica.

10. Obstétricas: aborto espontáneo recurrente, retardo en el crecimiento intrauterino, preeclampsia, *Corea gravidarum* y baja puntuación Apgar.

En octubre de 1998, en el Taller para Consenso Internacional, fueron propuestos algunos criterios para la clasificación preliminar del síndrome antifosfolípido primario (tabla 3.42).

**Tabla 3.42** Criterios de clasificación preliminar para el síndrome antifosfolípido primario, propuestos en el Taller para Consenso Internacional, octubre 1998

Criterio clínico	
Trombosis	Uno o más episodios de trombosis arterial, venoso o trombosis en pequeños vasos, en cualquier tejido vascular u órgano, confirmado por estudios de imagen o Doppler o con histopatología. Para la confirmación histopatológica, la trombosis debería estar presente sin evidencia significativa de inflamación de la pared de los vasos
Morbilidad en embarazo	Tres o más pérdidas consecutivas de embarazos, inexplicadas, con exclusión de causas anatómicas, genéticas u hormonales  Una o más muertes, inexplicadas, de fetos normales morfológicamente, a las 10 semanas de gestación o después, con morfología fetal documentada por examen directo del feto o por ultrasonido  Uno o más nacimientos prematuros de un neonato, morfológicamente normal, a las 34 semanas o antes de gestación, asociado con severa preeclampsia o severa insuficiencia de la placenta
Criterio de laboratorio	
Anticuerpo anticardiolipina	Isotipo IgG o IgM presente en: título medio o alto, en dos o más ocasiones, 6 semanas o más separadas, y medido por ELISA estandarizado para anticuerpo anticardiolipina B2-glicoproteína I-dependiente
Anticoagulante lúpico	Anormalidades presentes en plasma en: dos o más ocasiones, 6 semanas o más separadas, y detectar, de acuerdo con la guía del subcomité SSC sobre anticoagulante/fosfolípido-anticuerpo dependiente, en los pasos siguientes: Demostración de una prueba de tamizaje de coagulación fosfolípido dependiente prolongada (por ejemplo, tiempo parcial de tromboplastina activado), tiempo de coagulación caolín, tiempo de veneno de víbora Russell, tiempo de protrombina diluido y tiempo de textarín  Insuficiencia en corregir la prueba de tamizaje prolongada con mezcla con plasma normal pobre en plaquetas  Acortamiento o corrección de la prueba tamizaje prolongada con adición de exceso de fosfolípido  Exclusión de otras coagulopatías como está establecido clínicamente (por ejemplo, inhibidor del factor VIII y heparina)

## BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- Bernas BL, Schur PH. Pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. Up to Date. 1999;7(1).  
 Bernas BL, Schur PH, Kaplan AA. Prognosis and therapy of the antiphospholipid syndrome. Up to Date. 1999;7(1).  
 Bernas BL, Schur PH, Rose BD. Clinical Manifestations and diagnosis of the antiphospholipid antibody syndrome. Up to Date. 1999;7(1).  
 Douglas AT. Coagulation and bleeding disorders: Review and update. Clin Chem 2000; 46(8):1268-9.

- Guidelines on oral anticoagulation: Third Edition. Brit J Haematol 1988;101:374-87.  
 Lockhin M D. Pregnancy Loss in the antiphospholipid syndrome. Thromb Haemost 1999; 82(2): 641-8.  
 Ruiz-Argüelles G J, Ruiz-Argüelles. El Síndrome Antifosfolípido. Enciclopedia Iberoamericana de Hematología. España: Ediciones Universidad de Salamanca; 1992:637-45.  
 Verstraete M, Colin RM, Samana M, Verhaegh R. A European view on the north american fifth consensus on antithrombotic therapy (special report). Chest 2000;117(6): 1770-5.  
 Wintrobe's Clinical Hematology. Philadelphia: Williams & Wilkinson; 1998:1759-65.

## **CONTENIDO**

---

### **Introducción/ 377**

### **Formación de la orina/ 377**

### **Examen de la orina/ 378**

Características generales de la orina/ 378

Examen químico de la orina/ 380

Examen microscópico de la orina/ 382

Análisis cuantitativos de la orina/ 383

### **Racionalización del examen de la orina/ 383**

### **Pruebas funcionales renales/ 384**

Estudio de la función glomerular. Prueba de la depuración de la creatinina/ 384

Estudio de la función tubular. Prueba de la concentración de la orina/ 384

Prueba de la acidificación urinaria/ 384

Prueba de la eliminación fraccionada de sodio/ 385

### **Bibliografía recomendada/ 385**

## PARTE IV. EXAMEN DE LA ORINA, DEL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO Y DE OTROS LÍQUIDOS ORGÁNICOS

### Capítulo 31



## EXAMEN DE LA ORINA

*Dra. Pilar Hernández García*

### RESUMEN

El análisis de la orina (o urianálisis) es la prueba más frecuente que se realiza en los laboratorios clínicos de todo el mundo. La introducción de las tiras reactivas (química seca), para su lectura visual o con el empleo de un reflectómetro, ha permitido racionalizar este estudio y le ha aportado agilidad y calidad; además, ha abaratado su costo. En este capítulo se describen también las variedades y el uso de las llamadas pruebas funcionales renales, tanto glomerulares como tubulares.

### INTRODUCCIÓN

El análisis de la orina ocupa el primer lugar en el conjunto de solicitudes de pruebas que se realizan en el laboratorio clínico. Se le indica a los pacientes ambulatorios e ingresados, y se repite con frecuencia para evaluar el estado de salud o enfermedad. Constituye uno de los procedimientos más útiles para el diagnóstico de las enfermedades del aparato genitourinario, las enfermedades endocrinometabólicas, hematológicas y neoplásicas, y ofrece la posibilidad de detectar la presencia de elementos celulares y de sustancias que se eliminan disueltas en ella, como ocurre con las drogas terapéuticas y de abuso. Por esta vía, se realiza en las mujeres el diagnóstico de embarazo y, más recientemente, se sigue el curso evolutivo de enfermedades neoplásicas mediante el estudio de diferentes marcadores tumorales que se excretan disueltos en este líquido orgánico.

### FORMACIÓN DE LA ORINA

El riñón puede ser considerado como un órgano discriminante, que mantiene la constancia del ambiente interno mediante la selección, excreción, secreción o retención de múltiples sustancias, de

acuerdo con las necesidades específicas del medio interno corporal. La importancia que tiene la función renal para el mantenimiento de la vida, queda demostrada cuando, unos días después de perdida esta función, sobreviene la muerte (en la parte II, capítulo 18, véanse las figuras 2.10 y 2.11).

La principal unidad funcional renal es la nefrona. Cada riñón tiene aproximadamente un millón de nefronas, compuestas por dos partes principales: el glomérulo, que constituye el sistema filtrante, y un túbulo por el cual se desplaza el líquido filtrado. Cada glomérulo está formado por un ovillo capilar, rodeado por una membrana llamada cápsula de Bowman, la cual se prolonga y da origen al túbulo renal. La arteriola aferente permite que la sangre de la arteria renal llegue al glomérulo, cuyas paredes capilares son muy permeables al agua y a los componentes de bajo peso molecular que se encuentran disueltos en el plasma. Este ultrafiltrado, abandona el glomérulo a través de la arteriola eferente y llega al túbulo, en el que tiene lugar la reabsorción de algunas sustancias, la secreción de otras y, finalmente, la concentración de la orina.

La orina contiene miles de sustancias disueltas, aunque sus tres componentes principales son: agua, urea y cloruro de sodio. Su composición depende,



en gran medida, de la calidad y cantidad del volumen excretado. Algunos componentes de la sangre como la glucosa, tienen un umbral de excreción. El aparato filtrante renal no permite el escape de este carbohidrato, hasta que los valores en sangre alcanzan una concentración elevada. Tal es el caso de los pacientes diabéticos y de los hiperglicémicos, que presentan glucosuria. Muchas de las sustancias que se encuentran en la orina aparecen también en la sangre, pero en concentraciones menores.

Además de las sustancias en disolución, la orina contiene normalmente cantidades pequeñas de células y otros elementos organizados, provenientes de diferentes partes del tracto genitourinario. Estos elementos están representados por células epiteliales y cilindros procedentes de la nefrona, células epiteliales de la pelvis renal, uréteres, vejiga y uretra, *mucus* y espermatozoides de la próstata, y escasos eritrocitos y leucocitos. Cuando la orina normal se mantiene durante horas a temperatura ambiente, en ella aparecen bacterias, lo cual no tiene significado clínico.

En las enfermedades renales parenquimatosas, la orina contiene usualmente elementos organizados, los cuales ofrecen una valiosa información para el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad presente.

#### **Obtención de la muestra de orina**

En el análisis de la orina, la fase preanalítica requiere de especial atención. Aunque este tema ha sido tratado en el capítulo dedicado a esta fase, a continuación se mencionan los aspectos más relevantes:

1. Los recipientes en los que se almacena la muestra de orina, deben estar limpios y secos, y no contener restos de sustancias tales como los detergentes. Hoy se dispone de recipientes plásticos desechables o de papel reforzado. Cuando la orina se recolecta para un análisis bacteriológico, constituye un requisito indispensable el uso de envases estériles.
2. Las muestras que no se van a analizar de inmediato, requieren de la toma de algunas medidas. En la actualidad se trata de evitar el uso de preservantes, y lo que se aconseja es conservarlas en la nevera a una temperatura entre 4 y 10 °C.
3. En algunos casos, hay que mantener un pH ácido o básico durante el tiempo que dura la recolección,

para estabilizar al componente que se pretende determinar, por lo cual se añaden al frasco en que se recolectará la muestra de orina, unas gotas de un ácido o una base, diluidos.

4. Las muestras de orina, recogidas en cualquier momento del día, generalmente para análisis cualitativos, son procesadas poco tiempo después de recolectadas. No ocurre así cuando se trata de análisis cuantitativos (glucosuria, proteinuria, creatininuria, uricosuria) en los que la recolección dura hasta 24 h. En estos casos es muy importante que se preste atención al período que dura la recogida. Si el paciente está ingresado, la enfermera y el médico deben estar atentos a que toda la orina eliminada durante este período, se vierta en el frasco colector. Si se trata de pacientes ambulatorios, es necesario entregarles un volante con las instrucciones precisas.

### **EXAMEN DE LA ORINA**

Por lo general, el examen de la orina o urianálisis tiene la estructura siguiente:

1. Examen de las características generales.
2. Examen químico.
3. Examen microscópico (elementos organizados) (tabla 4.1).

#### **CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA ORINA**

##### **Aspecto**

La orina normal es transparente y su color varía desde el amarillo claro, propio de la orina diluida, hasta el amarillo intenso de la orina concentrada. Las tonalidades amarillas cambian en el transcurso del día debido a la poca ingestión de líquidos, después de las comidas, después de los ejercicios físicos intensos, durante los meses de verano y en el invierno. La coloración normal puede modificarse ante la presencia de determinados componentes químicos como la bilirrubina, la sangre total, la hemoglobina, las porfirinas, las melaninas y luego de la ingestión de algunos colorantes, alimentos y medicamentos. Se debe resaltar, por su frecuencia, la coloración amarillo carmelita o verdosa, causada por la bilirrubina; o la coloración carmelita o carmelita rojiza, propias de la sangre y la hemoglobina,

respectivamente. Por lo general, estas sustancias disueltas en la orina, producen la pérdida de su normal transparencia.

**Olor**

La orina tiene un olor característico debido a los ácidos volátiles. La presencia normal de grandes cantidades de urea, le proporcionan un olor amoniacal, sobre todo cuando se almacena durante horas a temperaturas cálidas y sin preservantes. Otros componentes modifican su olor, tal es el caso de la glucosa y de los cuerpos cetónicos en los pacientes diabéticos mal controlados, en la fenilcetonuria y después de la ingestión de algunos alimentos como los espárragos.

**Turbiedad**

La orina normal, limpia y reciente es, por lo general, clara y transparente, aunque puede mostrar un aspecto turbio, debido a la presencia de sales (fosfatos y carbonatos), sin significación clínica. Esta turbiedad desaparece de inmediato cuando se hace descender el pH urinario al añadir unas gotas de una disolución ácida. La turbiedad anormal se hará presente en los pacientes con infecciones del tracto urinario, pero por lo general se debe más a la alcalinidad que al número de bacterias o leucocitos contenidos en la muestra.

**Densidad relativa**

La densidad relativa normal de la orina oscila entre 1,005 y 1,030. El valor mayor se presenta en la primera micción de la mañana (al levantarse), cuando puede alcanzar valores de 1,020. Por medio de ella se determina el grado relativo de concentración o dilución de la muestra o, lo que es igual, la

relación entre las proporciones relativas de sólidos disueltos y el volumen total de la muestra. Es una medida de la capacidad del riñón para concentrar o diluir la orina.

La densidad relativa se determina con un densímetro o pueden utilizarse otros métodos, como son: la refractometría, osmometría y las tiras reactivas (química seca).

La densitometría se utiliza aún, por su sencillez y bajo costo: depende de la cantidad y la naturaleza precisa de las partículas disueltas por unidad de solución. Actualmente se prefiere la osmometría, que depende del número de partículas de soluto por unidad de solución, sin tener en cuenta su naturaleza precisa. De esta forma, se evita la elevación desproporcionada de la densidad relativa urinaria cuando se utiliza la densitometría en orinas que tienen en disolución moléculas grandes y densas, como son las proteínas, los carbohidratos y la hemoglobina. La osmometría es una medida de la concentración urinaria más exacta que la que aporta la densitometría. Una información más completa sobre este método, se ofrece en el capítulo acerca del análisis instrumental, en la parte I.

**pH**

Los riñones y los pulmones son los órganos principales en la regulación del equilibrio ácido-básico del organismo humano. La medida del pH urinario es una muestra de la capacidad de los túbulos renales para mantener concentraciones normales del ion hidrógeno en el plasma y en el líquido extracelular. Para lograrlo, el riñón se vale de la reabsorción del sodio y del intercambio de hidrógeno y amonio, procesos que ocurren en estos túbulos. La secreción de orina ácida o alcalina por el riñón es uno de los

**Tabla 4.1** Partes del examen de la orina (urianálisis)

Características generales	Examen químico o bioquímico	Examen microscópico (elementos organizados)
Color	Glucosa	Cilindros
Turbiedad	Sustancias cetónicas	Eritrocitos
Densidad relativa	Sangre (eritrocitos)	Cristales
pH	Proteínas Bilirrubinas Urobilinógeno Nitritos Leucocitos	Células epiteliales

mecanismos más importantes en la regulación del pH del medio interno.

La orina se vuelve ácida cuando la cantidad de sodio y compuestos ácidos se elevan en el interior del cuerpo humano y pasa a ser alcalina cuando elimina bases para compensar el aumento de ellas en el medio interno.

La determinación del pH urinario se realiza con tiras reactivas o con un medidor de pH (*peachímetro*).

### Volumen

El volumen total de orina eliminado por un adulto en un período de 24 h varía entre 750 y 2 000 mL. Como se señaló, estas cantidades pueden variar debido a factores climáticos y a la ingestión de líquidos. Se denomina poliuria a la eliminación de orina por encima del promedio normal y oliguria al caso contrario. Se conoce por anuria la falta total de la excreción urinaria.

## EXAMEN QUÍMICO DE LA ORINA

El examen químico de la orina comprende las determinaciones de los componentes que a continuación se exponen.

### Proteínas

La presencia de proteínas en la orina normal se limita a cantidades ínfimas, comprendidas entre

40 y 150 mg. Aproximadamente 1/3 de estas proteínas está representado por la albúmina; por lo cual, durante mucho tiempo se utilizó de manera incorrecta el término de albuminuria para referirse a la proteinuria. Aunque se trate de cantidades pequeñas o grandes, nunca la albúmina es la única fracción presente.

La proteinuria constituye un indicador de gran valor en el diagnóstico de las enfermedades renales, aunque puede estar en la orina como expresión de una enfermedad extrarrenal (cuadro 4.1).

En ocasiones, la presencia de proteinuria puede no tener significación clínica, como ocurre en la proteinuria postural intermitente, la cual está presente en la posición erguida y deja de estarlo cuando el paciente está descansando o tendido horizontalmente. Este tipo de proteinuria se presenta también en la lordosis. Tampoco tienen significación clínica las llamadas proteinurias funcionales, que surgen en el transcurso de procesos febriles, exposición al calor o frío, ejercicio físico excesivo o estrés emocional.

Las enfermedades renales que decursan con proteinuria, invariablemente se acompañan de daño glomerular; esta es la causa de la presencia de proteínas en la orina. El filtro glomerular se hace permeable y las deja escapar. En la medida en que la insuficiencia glomerular progresa, en la orina van apareciendo proteínas con una masa molecular relativa

**Cuadro 4.1** Causas de la proteinuria

#### Enfermedades glomerulares primarias

Proteinuria ortostática o postural (benigna)  
Glomerulonefritis membranosa  
Glomerulonefritis segmental focal  
Nefropatía por IgA  
Enfermedad de cambios mínimos  
Glomerulonefritis proliferativa

#### Enfermedades secundarias

Diabetes mellitus, sickle cell anemia  
Enfermedades autoinmunes: LES, granulomatosis, poliartritis nodosa, artritis reumatoidea  
Infecciosas: glomerulonefritis posinfecciosa, endocarditis, hepatitis B  
Drogas: heroína, mercurio  
Malignas: enfermedad de Hodgkin, linfomas, leucemias, mieloma múltiple

**Otras causas:** amiloidosis, eclampsia, hipertensión neurovascular, fiebre, ejercicios físicos

mayor, lo cual indica que la lesión ha tomado un camino irreversible. En algunas enfermedades extrarrenales, como el mieloma múltiple, en la orina se aprecian fracciones proteicas con una masa molecular relativa pequeña (cadenas ligeras) conocidas como proteínas de Bence Jones, que no reflejan exactamente un daño glomerular.

La introducción de métodos muy sensibles para las determinaciones de las proteínas como el RIA, ha hecho posible establecer las cantidades de estos componentes por debajo del límite de detección habitual y aun más allá (mayor que 200 mg/L). Además del RIA, esta sensibilidad puede alcanzarse con métodos inmunológicos muy sencillos como es el caso de las tiras reactivas. Esta es la causa de que la mal llamada prueba de la microalbuminuria en orina, se haya convertido en un marcador altamente sensible para la detección precoz de un daño renal en pacientes diabéticos e hipertensos, lo que permite que se tomen las medidas preventivas y terapéuticas necesarias para detener el avance del daño vascular renal.

### **Glucosa**

Por lo general, la cantidad de glucosa en la orina no es detectable por los métodos habituales, pues su reabsorción en el túbulo proximal, después de atravesar el glomérulo, es casi total (menos del 0,1 % del total de sustancias reductoras, expresado en glucosa). La glucosa constituye el carbohidrato que se encuentra con más frecuencia en la orina (diabetes mellitus), seguido por la lactosa, la fructosa, la galactosa y la pentosa.

La presencia de cantidades detectables de glucosa en la orina se conoce como glucosuria y ocurre cuando la concentración en sangre alcanza 10 mmol/L. La búsqueda de este carbohidrato en la orina persigue 3 objetivos principales: pesquisa, confirmación del diagnóstico y control del paciente con diabetes mellitus. A pesar del desarrollo alcanzado en la determinación de los niveles de glucosa en sangre con diminutos dispositivos (glucosímetros), que pueden ser manipulados por el propio paciente, la determinación de la glucosuria es imprescindible para el buen control del paciente diabético. Los métodos para detectar la presencia de glucosa en la orina, basados en el poder reductor de este carbohidrato sobre los iones

de cobre (Benedict de orina), han sido desplazados desde hace años por las tiras reactivas que utilizan reacciones enzimáticas específicas para medir la glucosuria.

### **Cuerpos cetónicos**

Los cuerpos cetónicos son productos intermedios del metabolismo de los lípidos que se forman en el hígado. Son metabolizados casi todos y aparecen en la orina en cantidades despreciables. Están representados por 3 componentes: ácido acetoacético o diacético, acetona y ácido betahidroxibutírico, en proporciones relativas de 20,2 y 80 %, respectivamente. Su presencia en la orina se conoce con el nombre de cetonuria. Cuando existe algún trastorno en el metabolismo de los carbohidratos, como ocurre en la diabetes mellitus, la formación de cetonas aumenta de manera considerable, debido a que la glucosa no puede ser utilizada, y entonces los lípidos y las proteínas se convierten en el combustible de primer orden para que el organismo obtenga la energía necesaria. El uso de esta vía metabólica deja libres los fragmentos carbonados provenientes de las grasas y de las proteínas, los cuales pasan a formar grandes cantidades de cuerpos cetónicos, que agotan las reservas alcalinas del medio interno, y dan lugar a la aparición de acidosis. La determinación de la presencia de cetonuria tiene su principal indicación en los pacientes diabéticos no controlados y en especial en los diabéticos tipo 1.

### **Bilirrubina**

La excreción de bilirrubina con la orina (bilirrubinuria) se produce cuando los niveles en sangre de la bilirrubina conjugada se elevan. El análisis que se realiza para su detección se conoce con el nombre de pigmentos biliares. Esta prueba es de uso habitual y tiene su principal indicación en el diagnóstico de las enfermedades hepatocelulares agudas (hepatitis) y en la obstrucción biliar intrahepática y extrahepática. La bilirrubina puede aparecer en la orina antes que otros signos de disfunción hepática, como la ictericia, y adelantarse a la instauración del cortejo sintomático que acompaña a estas enfermedades.

## Urobilinógeno

La determinación del urobilinógeno en la orina, conocida como urobilinuria, es una prueba muy sensible para el diagnóstico de los trastornos hepáticos, en los cuales su concentración se eleva. Lo mismo ocurre cuando hay destrucción excesiva de eritrocitos (hemólisis). Los valores de urobilinógeno disminuyen marcadamente en las obstrucciones parciales o completas de los conductos biliares. En estos casos se produce la ausencia total de urobilinógeno, lo cual ocasiona la eliminación de heces fecales no coloreadas (acolia).

## EXAMEN MICROSCÓPICO DE LA ORINA

El examen microscópico de la orina permite la observación de los elementos organizados, en los cuales aparecen representadas todas las partes del aparato genitourinario: cilindros y células epiteliales de la nefrona, células epiteliales de la pelvis renal, uréteres, vejiga, uretra, *mucus* y espermatozoides de la próstata. En las enfermedades parenquimatosas renales, a las que solo se puede acceder por biopsia o cirugía, la orina contiene cilindros y células que contribuyen al diagnóstico.

La orina normal tiene pocos elementos organizados: escasos leucocitos, eritrocitos y algunas células epiteliales.

### Cilindros

Los cilindros están constituidos por contenido tubular proteico coagulado. Adoptan la forma del túbulo en que se formaron y transmiten cualquier anomalía, como es el caso de los cilindros anchos. Al mismo tiempo, su contenido celular expresa los elementos celulares predominantes en el área lesionada.

Los cilindros eritrocitarios (o cilindros hemáticos), como su nombre lo indica, contienen eritrocitos. Su presencia se considera siempre un signo de enfermedad renal. Tal es el caso de la glomerulonefritis aguda, en el infarto renal y en la toma renal en el transcurso de enfermedades autoinmunes como por ejemplo, el lupus eritematoso sistémico.

Los leucocitarios son los cilindros que contienen leucocitos provenientes siempre de los túbulos renales, lo que indica la presencia de procesos infecciosos parenquimatosos como la pielonefritis. En esta afección, que puede evolucionar de manera

asintomática y causar daños irreversibles, la única expresión puede ser la presencia de estos cilindros en la orina.

Los epiteliales son los cilindros que contienen este tipo de células, que se descaman, normalmente del epitelio tubular, por lo cual pueden aparecer en la orina normal y no tienen significación clínica. Cuando su presencia se hace notar, es señal de que existe un daño del epitelio tubular, como ocurre en las nefrosis y en la necrosis tubular aguda, causada por envenenamiento debido a la ingestión de metales pesados.

Los cilindros hialinos pueden aparecer en la orina normal. Su presencia se debe a la precipitación y posterior gelificación de las proteínas dentro de los túbulos renales, como ocurre en las enfermedades renales que evolucionan con proteinurias severas.

Los céreos y los grasos son los cilindros que están asociados con procesos inflamatorios y degenerativos como la insuficiencia renal crónica, la degeneración tubular y las obstrucciones localizadas de la nefrona. La presencia de cilindros céreos se considera de muy mal pronóstico en las enfermedades renales.

De acuerdo con su grosor, los cilindros se dividen en estrechos, medianamente anchos y anchos. Los anchos, en cualquiera de sus variedades, indican una marcada reducción de la capacidad funcional de la nefrona y, por lo tanto, sugieren un severo daño renal o estadio final de la enfermedad.

### Cristales

La cristaluria se considera un hallazgo sin significación clínica en las orinas normales. El tipo y cantidad de cristales tienen relación directa con el pH urinario. En las orinas ácidas aparecen los uratos amorfos, el ácido úrico y el oxalato de calcio; y en las alcalinas, los fosfatos amorfos, el fosfato de calcio, el fosfato triple y el carbonato de calcio. Se considera como anormal la presencia en la orina de cristales de cistina, leucina o tirosina, colesteroína y los medicamentosos: sulfonamidas y ampicilina.

### Eritrocitos

La presencia de eritrocitos en la orina se denomina hematuria, la cual no es detectada a simple vista si la relación sangre-orina está por debajo de 1:1 000.

La hematuria siempre tiene significación clínica en cualquiera de sus 2 variantes: macroscópica y microscópica, y puede aparecer en múltiples enfermedades del tracto genitourinario. Según el color de la orina, que puede variar del rojo intenso al carmelita, se puede inferir en qué zona del aparato genitourinario se produjo el sangrado. Los tonos carmelitas se presentan cuando el sangrado por lo general es alto: parénquima y pelvis renal o tercio superior del uréter. Si el color no es intenso y la sangre permanece mezclada con la orina (vejiga) varias horas antes de eliminarse, los eritrocitos se destruyen y la hematuria no será detectada con ayuda del microscopio. Entonces será necesaria la presencia de hemoglobina en la orina, lo que permitirá el diagnóstico. Ante la sospecha de una hematuria, deben estudiarse ambas posibilidades: hematuria y hemoglobinuria. La primera se determina por la observación del color y el examen microscópico, y la segunda, con las tiras reactivas, las cuales son capaces de detectar la presencia de eritrocitos intactos y la hemoglobina libre. Esta última, antes de la disponibilidad de las tiras reactivas, se detectaba por medio de 2 reacciones que no se utilizan actualmente: bencidina y guayaco.

La hemoglobina en la orina puede ser una manifestación de enfermedades extrarrenales. Tal es el caso de las anemias hemolíticas, la hemoglobinuria paroxística nocturna, las reacciones ante transfusiones por administración de sangre incompatible y en las quemaduras extensas.

### **Leucocitos**

La leucocituria indica una infección bacteriana del tracto urinario. Como ocurre con las hematurias, la presencia de leucocitos en la orina puede detectarse por 2 vías: el examen microscópico y las tiras reactivas (química seca).

## **ANÁLISIS CUANTITATIVOS DE LA ORINA**

En acápites anteriores se describió el urianálisis cualitativo. Todos los resultados de los componentes de la orina se indican como: presencia o ausencia, positivo o negativo, contiene o no contiene. En este tipo de examen (cualitativos), un resultado positivo

no expresa la cantidad exacta por unidad de volumen. Por ejemplo, el grado de la positividad puede definirse utilizando unidades arbitrarias como: +, ++, +++ (cruces) o 3 leucocitos por campo, 10 eritrocitos por campo.

Los análisis cualitativos se realizan en muestras aisladas de orina, recogidas en cualquier momento del día o de la noche. Esta es la variante utilizada en los pacientes que solicitan con urgencia la ayuda del médico.

Los análisis cuantitativos tienen como finalidad la expresión de los resultados por unidad de volumen y tiempo; por ejemplo: el calcio en la orina es igual a 3,8 mmol/24 h. La cuantificación de los componentes urinarios tiene como requisito indispensable que la recolección de la muestra se realice durante un período determinado (2, 6, 8 o 24 h), lo cual debe explicarse claramente al paciente. Si el período de recolección es modificado por él, el resultado perderá su utilidad clínica.

Es frecuente en la práctica clínica diaria, la indicación de análisis cuantitativos de orina en diferentes enfermedades. Constituyen ejemplos la determinación de la glucosuria, de la proteinuria, de la fosfaturia, de la uricosuria y de la calciuria en la orina de 24 h, por citar algunas. Es importante señalar que la fuente más común de errores en la prueba de la depuración de la creatinina, es la recogida de la muestra de manera incorrecta, lo que conlleva a la obtención de resultados falsamente disminuidos y, por lo tanto, a un valor erróneo de la velocidad del filtrado glomerular.

La cuantificación de los elementos organizados de la orina (eritrocitos, leucocitos y cilindros), prueba que se conoce como recuento de Addis, es otro ejemplo de la necesidad de observar estrictamente el tiempo de recolección. No se debe olvidar que todos los componentes urinarios, tienen un ritmo circadiano, por lo cual su excreción varía en diferentes momentos del día y de la noche.

## **RACIONALIZACIÓN DEL EXAMEN DE LA ORINA**

Hace más de 3 décadas que la tecnología conocida como química seca introdujo cambios muy positivos en el campo del urianálisis. Esto se debe a que la manipulación y evaluación de los resultados

de las tiras reactivas, son extremadamente simples. Los cambios en la escala de colores que se producen al detectar la presencia de un componente, como la glucosa por ejemplo, se aprecian con facilidad. El examen tradicional, descrito en las páginas anteriores, consume mucho tiempo y exige que sea realizado por un personal con experiencia, el cual debe dedicar por lo menos 6 minutos al examen microscópico, para que los resultados sean reproducibles. Si esto se une a su frecuente indicación y al hecho, demostrado en estudios, de que solamente el 50 % de los resultados que llegan a las manos del médico son evaluados por él, la racionalización del urianálisis con las tiras reactivas es importante en los análisis de costo-efectividad. No se trata de hacer desaparecer el examen tradicional, sino de dedicarle el tiempo necesario a las muestras que lo requieren. La racionalización del urianálisis significa realizar este examen en dos etapas. En la primera, todas las muestras de orina son analizadas con las tiras reactivas y las que tengan resultados positivos, para cualquiera de los componentes principales: proteínas, glucosa, nitritos, leucocitos, eritrocitos y hemoglobina, pasan a la segunda etapa: el examen microscópico. De esta forma, los exámenes microscópicos innecesarios disminuyen entre el 30 y el 70 %.

## PRUEBAS FUNCIONALES RENALES

Las pruebas funcionales renales proporcionan información adicional sobre la dinámica del funcionamiento renal. Se dividen en glomerulares y tubulares, según la función que se estudie con ellas.

### ESTUDIO DE LA FUNCIÓN GLOMERULAR. PRUEBA DE LA DEPURACIÓN DE LA CREATININA

La creatinina se forma por la deshidratación de la creatina, en el transcurso del metabolismo energético muscular, a un ritmo constante. Esta depende de la masa molecular del individuo. Por lo tanto, la producción de creatinina endógena permanece constante mientras la masa muscular se mantenga de igual forma. Toda creatinina que se produce es filtrada por el glomérulo y se elimina disuelta en la orina. Estas características permiten utilizarla como una medida del ritmo de la filtración glomerular, a pesar de algunos

inconvenientes que afectan la reproducibilidad de los resultados, como son:

1. La secreción de una pequeña cantidad de creatinina por el túbulo, lo que provoca que los valores obtenidos en esta prueba estén discretamente por encima del caudal de líquido filtrado por los glomérulos.
2. El error introducido por las determinaciones plasmática y urinaria de la creatinina.
3. La posibilidad de introducir errores al recolectar la muestra de manera incorrecta durante un largo período (24 horas).

A pesar de lo señalado, la depuración de la creatinina se sigue utilizando, ya que no es necesaria la administración de sustancias extrañas al paciente, como ocurre con otras pruebas de depuración, en las que se requiere, por ejemplo, la administración de EDTA marcado con  $^{51}\text{Cr}$  o con insulina.

### ESTUDIO DE LA FUNCIÓN TUBULAR. PRUEBA DE LA CONCENTRACIÓN DE LA ORINA

La regulación de la concentración urinaria tiene lugar en la zona medular del riñón, donde el líquido intersticial es intensamente hiperosmolar con respecto al líquido tubular. La deshidratación estimula la producción de la hormona antidiurética para producir orina concentrada, y es esa función renal la que se explora con esta prueba. Al paciente se le suspende la ingestión de líquidos durante 14 horas; transcurrido este tiempo, se recogen muestras de orina, y se mide la densidad relativa. En alguna de las muestras recolectadas, la densidad relativa debe alcanzar un valor mayor que 1,024 y el valor de la osmolalidad ubicarse por encima de 800 mOsmol/kg. Cuando el riñón pierde su capacidad para concentrar la orina, está hipostenúrico, y cuando a este estado se suma su incapacidad para diluirla, es isostenúrico.

### PRUEBA DE LA ACIDIFICACIÓN URINARIA

Esta prueba se utiliza para el diagnóstico de la acidosis tubular renal, enfermedad metabólica que

tiene su origen en la incapacidad del riñón para excretar ácidos. Se conocen 2 tipos:

1. Acidosis tubular distal (tipo I), caracterizada por una acidosis metabólica con valores elevados del pH urinario (por encima de 7,0), ya que el riñón es incapaz de ejercer su función compensatoria.
2. Acidosis tubular proximal (tipo II), caracterizada por pérdidas excesivas de bicarbonato por la orina (bicarbonaturia) y que raramente se acompaña de acidosis metabólica. Cuando está presente, el pH urinario desciende (menor que 5,5).

Para la prueba de la acidificación se le administra al paciente, por vía oral, cloruro de amonio. Posteriormente, se recogen muestras de orina a intervalos de 2 h durante un período de 6 a 8 h, y se determina el pH a cada una de ellas. En la acidosis de tipo I, ninguna de las muestras tendrá el pH menor que 7,0. En la de tipo II, el pH urinario se comporta igual que en la de tipo I, excepto en los casos en que la acidosis metabólica está presente, y entonces el pH de alguna de las muestras de orina desciende hasta 5,5 o por debajo.

## PRUEBA DE LA ELIMINACIÓN FRACCIONADA DE SODIO

En condiciones normales, la excreción urinaria de sodio se aproxima a la cantidad ingerida con la

dieta. La determinación de la fracción de este metal que atraviesa el filtro glomerular y se excreta con la orina, es un indicador útil para evaluar a los pacientes oligúricos con valores elevados de creatinina o urea en plasma. Es un requisito indispensable que los pacientes sometidos a esta prueba, no estén recibiendo diuréticos. Si el porcentaje obtenido (véase la tabla 2.13 del capítulo 18) es menor que 3, la elevación de la creatinina en sangre se debe a causas prerrenales. Si el pH es mayor que 3, generalmente obedece a causas renales: necrosis tubular o severa obstrucción del drenaje de ambos riñones. Si la concentración del sodio en la orina es elevada y el paciente se comporta desde el punto de vista clínico como hipovolémico, las sospechas deben encaminarse hacia una insuficiencia suprarrenal.

## BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- Fischbach F. Laboratory and diagnostic tests. Philadelphia: JB Lippincott Co., 1992.
- Fuentes Arderiu X, Queraltó JM. Bioquímica Clínica: Aspectos semiológicos. Barcelona: Ediciones Mayo, 1992.
- Heiman GA, Frohlich J. Physician's response to abnormal results of routine urinalysis. CMA J 1976, 115:1094-5.
- Langlois MR. Automated flow cytometry compared with an automated dipstick reader for urinalysis. Clin 1999, 45:118-22.
- Shaw S T. Accuracy of dipstick routine urinalysis. Pathologist 1985:48.
- Tilton RC, Balows A, Hohnadel D, Reiss R. Clinical Laboratory Medicine Philadelphia: Mosby Year Book, 1992.



## **CONTENIDO**

---

### **Introducción/ 387**

### **Fisiología del líquido cefalorraquídeo/ 387**

#### **Análisis del líquido cefalorraquídeo/ 388**

Examen físico del líquido cefalorraquídeo/ 388

Examen químico del líquido cefalorraquídeo/ 388

Examen microscópico del líquido cefalorraquídeo/ 389

#### **Análisis del líquido sinovial/ 389**

Características generales del líquido sinovial/ 389

Examen químico del líquido sinovial/ 391

Examen microscópico del líquido sinovial/ 391

#### **Análisis del líquido amniótico/ 391**

#### **Análisis del líquido seminal/ 392**

Examen físico del semen/ 392

Examen químico del semen/ 392

Examen microscópico del semen/ 392

#### **Otros líquidos biológicos/ 392**

#### **Bibliografía recomendada/ 393**

## PARTE IV. EXAMEN DE LA ORINA, DEL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO Y DE OTROS LÍQUIDOS ORGÁNICOS

### Capítulo 32



## EXAMEN DEL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO Y DE OTROS LÍQUIDOS ORGÁNICOS. EXUDADOS Y TRASUDADOS

*Dra. Pilar Hernández García*

### RESUMEN

En este capítulo se describe el estudio completo del líquido cefalorraquídeo y su comportamiento en diferentes enfermedades neurológicas. Por la importancia que poseen, se hace referencia también a los exámenes del líquido sinovial y del seminal, así como de los exudados y trasudados.

### INTRODUCCIÓN

El líquido cefalorraquídeo (LCR) ha sido durante muchos años una de las fuentes de información diagnóstica en neurología. Es producido por el plexo coroideo en el cerebro y en el espacio extracelular del parénquima cerebral. Su velocidad de producción es constante (0,35 mL/min) y alcanza un volumen total diario de alrededor de 500 mL. El intercambio de iones con la sangre se lleva a cabo por el transporte secretorio activo. Las proteínas presentes en él provienen, en gran medida, del suero, a través de células endoteliales capilares. La glucosa, también del suero, llega al LCR por un mecanismo de transporte por portadores. Este líquido tiene, además, la función de “sumidero” para transportar los productos de la degradación metabólica de regreso al sistema venoso.

### FISIOLOGÍA DEL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO

El LCR actúa como elemento protector del cerebro, pues ejerce una función amortiguadora que preserva a este órgano (encerrado en una cavidad) de cualquier agresión física. Además, es un medio líquido en el que

ocurren varios cambios químicos. La composición química del LCR depende de 2 funciones: secreción y difusión. El intercambio de iones con el plasma se debe, en gran medida, al transporte secretorio activo, facilitado por el epitelio coroidal, parenquimatoso y endotelial de las células gliales. Casi todas las proteínas provienen del suero y su incorporación a este líquido se produce por el fenómeno de la pinocitosis, a través de las células capilares endoteliales del cerebro y de la médula espinal. La transferencia de glucosa entre el plasma y el LCR, por el mecanismo de transporte mencionado, explica de manera parcial, la diferencia de gradiente de este componente entre ambos, lo que parece indicar que la función suministradora de glucosa al cerebro descansa, en su mayoría, en la circulación general. La concentración de glucosa en el LCR se aproxima al 60 % de la plasmática.

El mantenimiento de la composición de este líquido es de gran importancia. Variaciones mínimas en cualquiera de sus componentes, pueden dar lugar a cambios en el funcionamiento cerebral, debido a que realiza la función de “sumidero”, al transportar desechos metabólicos que se vierten en el sistema venoso a través de las granulaciones aracnoideas.

## ANÁLISIS DEL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO

La muestra de LCR se obtiene por punción lumbar, cisternal o ventricular, y se debe realizar por un personal bien entrenado. El volumen de esta debe ser consultado antes con el laboratorio.

Las muestras de estos diferentes puntos presentan algunas diferencias en su composición. La mayoría de los estudios del LCR se basan en las muestras resultantes de una punción lumbar. Por ello, casi siempre los valores de referencia informados corresponden a estas. Las muestras deben ser entregadas de inmediato al laboratorio y en todo momento se manipularán con las medidas de bioseguridad requeridas para el material biológico contaminante.

El examen del LCR tiene la estructura siguiente:

1. Examen de las características generales.
2. Examen químico.
3. Examen microscópico.

## EXAMEN FÍSICO DEL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO

### Color

El LCR normal es incoloro y transparente como agua de roca. La presencia de sangre produce un cambio en su coloración, que puede ir del rosado al rojo en las hemorragias recientes, y se puede tornar amarilla (xantocromía) cuando el sangrado ocurre algunas horas antes de la punción. Esta coloración puede mantenerse de 2 a 4 semanas, como sucede en las hemorragias subaracnoideas, lo que las diferencia de los pequeños sangrados vasculares de las punciones traumáticas. La hiperbilirrubinemia es causa también de xantocromía en el LCR.

### Aspecto

La transparencia del LCR puede desaparecer y dar lugar a cambios que van desde la discreta opalescencia, como ocurre en las meningitis virales y tuberculosas, hasta su pérdida total, como es el caso de los líquidos purulentos, propios de las meningitis bacterianas. La pérdida de la transparencia se debe a la presencia de proteínas en cantidades excesivas, leucocitos y eritrocitos, y puede acompañarse de una

coloración xantocrómica discreta o moderada. El aumento de las proteínas puede provocar la coagulación del LCR, debido a la presencia de fibrinógeno.

## EXAMEN QUÍMICO DEL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO

### Proteínas

El estudio de las proteínas es conocido como proteinorraquia. La elevación de este grupo de componentes, aunque inespecífica, es siempre un índice de enfermedad, que responde al aumento de la permeabilidad de las células endoteliales, como ocurre en diversas afecciones del SNC: tumores, infartos, meningitis, abscesos y traumatismos. Se presenta también en los trastornos neurales periféricos, tal vez debido al compromiso de las fibras nerviosas proximales en las raíces. La proteinorraquia constituye uno de los signos diagnósticos que se investigan en la polineurorradiculitis idiopática o síndrome de Guillain-Barré.

La presencia de inmunoglobulinas se correlaciona con las enfermedades autoinmunes. Los niveles elevados de IgG, desde el punto de vista cuantitativo y cualitativo, aparecen en el LCR de este grupo de enfermedades. Aunque heterogéneas en su tipo y policlonales en su origen, estas inmunoglobulinas son homogéneas en relación con su carga y en la corrida electroforética migran en bandas oligoclonales. Las IgG provienen del tejido linfoide en el interior del SNC. La asociación clínica de valores elevados de IgG en el LCR y de bandas oligoclonales positivas, ocurre en la esclerosis múltiple. El 10 % de estos pacientes tienen niveles normales en ambas pruebas. Las anormalidades inmunoglobulínicas mencionadas acompañan a otras enfermedades como la neurosífilis y el síndrome de Guillain-Barré.

### Glucosa

Los niveles de glucosa en el LCR varían: responden a los niveles de la glucosa plasmática. La glucorraquia constituye del 60 al 70 % del valor de la glicemia. Este componente disminuye en el LCR durante las hipoglicemias sistémicas, aunque la causa más común está dada por los procesos inflamatorios meníngeos. En la meningitis aguda bacteriana, los valores de la glucosa están por debajo de 1,5 mmol/L. Descensos menos pronunciados se presentan en

procesos subagudos y crónicos, como la tuberculosis, la criptococosis y la meningitis carcinomatosa. En la meningitis viral, la glucosa puede tener valores normales o descender de manera moderada. Lo mismo ocurre en la meningitis urliana.

El mecanismo que produce el descenso de la glucorraquia no está bien definido. Durante años se pensó que se debía a su utilización por las bacterias y los leucocitos presentes. Hoy día se conoce que la presencia de ambos elementos organizados no explica del todo este descenso, que puede ser causado por una afectación del sistema de transporte de la glucosa sanguínea y un aumento de la glucólisis en el tejido nervioso adyacente, lo que da lugar al descenso de la glucorraquia.

### Otras sustancias químicas

En cuanto a las determinaciones en este líquido, hay un grupo de componentes que se han sumado a los clásicos. Muchas de ellas tienen importancia en el campo de las investigaciones. Tal es el caso de los estudios del equilibrio ácido-básico, de las aminos biogénicas, de las enzimas, de las hormonas y de los productos de degradación biológica.

Entre estos, la deshidrogenasa láctica (LDH) se ha utilizado en el diagnóstico diferencial de la meningitis bacteriana y la viral. En la bacteriana se presentan valores elevados de esta enzima y en la viral, solo en el 10 %.

## EXAMEN MICROSCÓPICO DEL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO

El examen microscópico se refiere, sobre todo, a la búsqueda de eritrocitos y leucocitos en el LCR. En su estado normal, este líquido no contiene eritrocitos. Su presencia indica que ha ocurrido una hemorragia cerebral o que se ha lesionado un vaso sanguíneo al realizar la punción del canal raquídeo.

Los linfocitos aparecen en el LCR normal en concentraciones muy bajas. Su número aumenta en las meningitis virales y en la neurosífilis, y alcanza elevaciones marcadas en la meningitis tuberculosa y en la micótica. En los pacientes infectados por VIH se observan aumentos moderados de linfocitos en el LCR, aun sin evidencias de enfermedad neurológica.

La presencia de neutrófilos sugiere que existe meningitis bacteriana, y la de eosinófilos puede

aparecer en cualquiera de las enfermedades mencionadas, en reacciones alérgicas y cuando se ha inyectado algún contraste radiológico en el canal raquídeo.

## ANÁLISIS DEL LÍQUIDO SINOVIAL

El estudio del líquido sinovial comprende 3 aspectos: características generales, examen químico e inmunológico, y examen microscópico: células y cristales.

El líquido sinovial o sinovia se obtiene mediante punción articular, la cual debe realizarla un personal especializado y en condiciones de estricta asepsia. A una porción de la muestra se le deben añadir algunas gotas de heparina para evitar la coagulación, que puede aparecer en las muestras que provienen de afecciones articulares inflamatorias. De esta forma se evita la interferencia para hacer los exámenes químicos y citológicos.

## CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL LÍQUIDO SINOVIAL

En esta parte del examen se analiza el color y la turbiedad. La sinovia normal es incolora o con discreto tono pajizo. La presencia de sangre en mínimas cantidades (punción traumática) se diferencia con facilidad de las hemartrosis traumáticas, las terapias anticoagulantes y las enfermedades que se acompañan de trastornos de la hemostasia, como las hemofilias. Después de unos días de ocurrido el sangrado, aparece un tinte xantocrómico. En ocasiones, el color de la sinovia orienta hacia un diagnóstico. Tal es el caso de los líquidos amarillo-verdosos de los derrames, en la artritis reumatoidea; o blanco-grisáceos, de la artritis séptica, debido a la presencia de gran número de leucocitos. Cuando los cristales son abundantes, el líquido tiene un color blanco-lechoso (tabla 4.2).

En condiciones normales, la sinovia es transparente. Como en otros líquidos biológicos, la turbiedad se presenta cuando existen células, cristales y otros residuos articulares, como uratos o pirofosfato de sodio. Cuando se instala un proceso inflamatorio, la turbiedad está en relación directa con su severidad.

Tabla 4.2 Características del líquido sinovial en algunas enfermedades

Enfermedades	Color	Turbiedad	Viscosidad	Coagulación con ácido acético	Enzimas	Leucocitos	Linfocitos (%)	Eritrocitos	Cristales	Bacterias	Immuno- complejos	Comple- mento
Normal	Pajizo	Claro	Alta	Normal	Normal	~ 200	~ 75	No	No	No	No	Normal
Artritis reumatoidea	Amarillo verdoso	Claro, turbio, coagulación fácil	Baja	Baja	Elevada	> 1 000	< 25	Escasos	No	No	Sí	Bajo
Espondilitis anquilosante	Amarillo	Claro	Baja	Baja	Elevada	~ 1 000	~ 50	No	No	No	No	Normal
Artritis séptica	Gris crema	Turbio	Baja	Baja	Elevada	> 20 000	< 25	Escasos	No	Abundante	No	Normal
Tuberculosis articular	Amarillo o gris amarillento	Turbio coagulable	Baja	Baja	Elevada	> 10 000	~ 50	Escasos	No	Escasas	No	Normal
Gota	Lechoso o amarillo	Turbio	Baja	Baja	Elevada	> 5 000	< 25	No	Abundantes	No	No	Normal
Condro- calcinosis	Lechoso o amarillo	Turbio claro	Baja	Baja	Elevada	> 1 000	< 50	No	Abundantes	No	No	Normal
Traumas	Amarillo o sangui- nolento	Claro o turbio	Alta	Normal	Normal	< 10 000	~ 50	Abundantes	No	No	No	Normal

**Leyenda**

~: aproximadamente.

La viscosidad del líquido sinovial es elevada y ello se debe al gran contenido de sustancias emparentadas con el ácido hialurónico. Esta viscosidad puede descender de 5 a 10 veces en los procesos inflamatorios.

## EXAMEN QUÍMICO DEL LÍQUIDO SINOVIAL

El examen químico del líquido sinovial comprende la determinación de la glucosa, la cual, al igual que en el LCR, está en equilibrio con los valores de la glicemia. Este componente disminuye en las afecciones inflamatorias e infecciosas articulares. Las proteínas alcanzan, por lo general, una concentración de 20 g/L, de los cuales el 75 % corresponde a la albúmina. Mientras más intenso es el proceso inflamatorio, más elevada será la concentración proteica de la sinovia. El fibrinógeno también estará presente, por lo cual este líquido coagulará después de recolectado y dejará de ser útil para la mayoría de los estudios.

Algunas determinaciones enzimáticas, como la fosfatasa ácida y la betaglucuronidasa, y algunos marcadores de la inflamación, como la proteína C reactiva, son buenos indicadores del grado de inflamación articular, aunque por lo general estos componentes, en los que se incluye el factor reumatoideo, dan resultados semejantes a los obtenidos en el suero del paciente.

## EXAMEN MICROSCÓPICO DEL LÍQUIDO SINOVIAL

El examen microscópico del líquido sinovial consiste, en primer lugar, del contenido celular de la sinovia. La leucocitosis, cuando está presente, guarda una relación directa con el grado del proceso inflamatorio local. En su estado normal, el líquido sinovial contiene  $0,075 \times 10^9/L$  en las artritis sépticas. Las células predominantes en la sinovia normal son los linfocitos y los monocitos. En diversas afecciones pueden aparecer otras como las serosas, las plasmáticas y las reticulares, que se encuentran aumentadas en número en la espondilitis anquilosante y en la artritis soriásica, afecciones en las cuales la reacción inflamatoria local es moderada.

Los cristales que aparecen en el líquido sinovial en diferentes enfermedades articulares, están representados por los uratos, típicos de la artritis gotosa, cuya configuración es en forma de agujas, ubicados dentro o fuera de las células. Los cristales de pirofosfato son específicos de la pseudogota: pequeños, gruesos y con una configuración romboidal. Otros pueden ser los de hidroxapatita y los debidos a la administración de medicamentos. La identificación de los cristales requiere, por lo general, del uso del microscopio de luz polarizada.

## ANÁLISIS DEL LÍQUIDO AMNIÓTICO

El origen del líquido amniótico no está dilucidado del todo. Se admite que está formado por las secreciones pulmonares, la orina y los productos metabólicos provenientes del tracto intestinal del feto. Existe un intercambio constante de este líquido en ambas direcciones (del feto a la madre y de la madre al feto), a través de la membrana placentaria.

El análisis del líquido amniótico en el embarazo temprano (de 15 a 18 semanas), tiene el propósito de caracterizar al feto desde el punto de vista genético, y detectar anomalías en su desarrollo. En el tercer trimestre (de 24 a 36 semanas), la amniocentesis constituye una valiosa herramienta para el estudio de la madurez fetal. De su resultado pueden derivarse las conductas terapéuticas siguientes:

1. Esperar la maduración fetal.
2. Realizar una operación cesárea.
3. Provocar el parto.
4. Inducción medicamentosa de la maduración fetal.

Las pruebas para conocer el grado de maduración fetal se basan en el estudio de uno o varios fosfolípidos en el líquido amniótico: índice entre las concentraciones de lecitina y esfingomielina, concentración del fosfatidilglicerol y concentración de la fosfatidilcolina no saturada. Para el estudio de las anomalías del desarrollo se estudia la concentración de la alfafetoproteína (AFP) en el líquido amniótico de la embarazada. La AFP es sintetizada en el hígado del feto y sus valores se encuentran

elevados durante todo el período que abarca el desarrollo fetal. Después del nacimiento, en las personas normales, sus valores no son detectables. Durante la vida fetal, la AFP es un indicador muy valioso para el diagnóstico de los defectos del tubo neural (malformaciones del SNC). En estos pacientes, la AFP se vierte en el líquido amniótico, por lo cual su concentración aumenta en este líquido y en la sangre materna, donde puede determinarse entre las 14 y las 16 semanas de gestación.

## ANÁLISIS DEL LÍQUIDO SEMINAL

La recolección del líquido seminal para su posterior análisis, tiene como requisito indispensable, la información al paciente de todo lo relacionado con la obtención, conservación y transportación de este líquido. La entrega de un volante, con las instrucciones bien claras, es algo que se debe tener en cuenta.

El examen del líquido seminal comprende los aspectos siguientes: características generales, examen físico, examen químico y examen microscópico.

## EXAMEN FÍSICO DEL SEMEN

El semen humano es eyaculado como un líquido viscoso de color blanco-grisáceo, que se gelifica, de manera discreta, después de su eliminación. El estado líquido se recupera en su totalidad entre 5 y 60 min después. Por lo general, las muestras llegan al laboratorio en este estado, y entonces se procede a medir su volumen, viscosidad y pH.

## EXAMEN QUÍMICO DEL SEMEN

El examen químico del semen comprende el análisis de los siguientes componentes:

1. Fructosa: constituye la fuente primaria de energía del semen. Es producida en las vesículas seminales y la testosterona estimula su formación. Su determinación tiene interés clínico en los pacientes con eyaculaciones de poco volumen y poca movilidad de los espermatozoides.
2. Ácido cítrico: constituye un marcador para la función prostática junto a la fosfatasa ácida de origen prostático.

## EXAMEN MICROSCÓPICO DEL SEMEN

Con el auxilio del microscopio se realiza el recuento de espermatozoides, se calcula el porcentaje del total de ellos que son móviles y se observa la preparación con detenimiento, para buscar si existen anomalías morfológicas. La vitalidad de los espermatozoides puede determinarse con cualquiera de los colorantes supravitales como el *trypan blue*.

## OTROS LÍQUIDOS BIOLÓGICOS

Cuando se habla de líquidos biológicos, por lo general se hace referencia a la orina y al líquido cefalorraquídeo. Se omiten otros cuya cantidad, en circunstancias normales, es mínima, como es el caso del líquido pleural y el líquido pericárdico, por citar algunos. En la cavidad peritoneal hay órganos rodeados por dos capas mesoteliales, una en contacto con dichos órganos y otra adosada a la pared abdominal. Los quistes y pseudoquistes con contenido líquido pueden aparecer en el páncreas y los ovarios en diferentes enfermedades. Varias anomalías congénitas se acompañan de quistes hepáticos, renales, pancreáticos y pulmonares.

Los líquidos serosos constituyen un ultrafiltrado del plasma que se produce en cualquier espacio potencial, como la cavidad pleural o la pericárdica. La formación y reabsorción mantienen un equilibrio, pero al fallar una de ellas, ocurre una acumulación de líquido.

Estos otros líquidos biológicos se clasifican en trasudados y exudados. Los trasudados se distinguen por su densidad relativa por debajo de 1,015 y un contenido proteico menor que 30 g/L. Los exudados tienen una densidad relativa por encima de 1,015 y un contenido proteico mayor que 30 g/L. Cuando la diferenciación entre trasudado y exudado, a pesar de las pruebas señaladas, es ambigua, se puede recurrir a determinados índices para resolverla (cuadro 4.2).

La mayoría de las características señaladas para los líquidos serosos, se aplican a los quísticos. Ambos constituyen un excelente material para el estudio citológico, en el que se buscan células neoplásicas y también para la determinación de diferentes marcadores tumorales. En algunos casos, las determinaciones de otros componentes, como la creatinina, ayudan en la identificación de la procedencia.

**Cuadro 4.2** Índices para diferenciar entre exudados y trasudados

Concentración de proteínas en el líquido	Concentración de proteínas en el suero
Actividad enzimática de la LDH en el líquido: un valor menor que 0,5 se corresponde con un trasudado, y mayor que 0,5 con un exudado	Actividad enzimática de la LDH en el suero: un valor menor que 0,6 se corresponde con un trasudado, y mayor que 0,6 con un exudado

## BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

Fuentes Arderiu X, Queraltó JM. Bioquímica Clínica: Aspectos semiológicos. Barcelona: Ediciones Mayo, 1992.  
Fischbach F. Laboratory and diagnostic tests. Philadelphia: JB Lippincott Co., 1992.

Jerret SA. Cerebrospinal fluid in clinical diagnosis. Lab medica. 1986; April-May.

Tilton RC, Balows A, Hohnadel D, Reiss R. Clinical Laboratory Medicine Philadelphia: Mosby Year Book, 1992.



## **CONTENIDO**

---

**Introducción/ 395**

**Inmunidad innata/ 396**

**Inmunidad adaptativa/ 397**

Respuesta inmune adaptativa/ 397

**Miniglosario/ 398**

**Bibliografía recomendada/ 401**

### Capítulo 33



## INMUNIDAD. RESPUESTA INMUNE

Dr. Jesús Gómez Arbesú

### RESUMEN

Este capítulo introduce el tema de la inmunología con sus conceptos fundamentales. Trata sobre la inmunidad: conjunto de mecanismos que conducen a la diferenciación entre lo que es peligroso desde el punto de vista biológico (y su destrucción) y lo que no lo es. Se explica la inmunidad innata, la inmunidad adaptativa y la respuesta inmune adaptativa. Además, el último acápite contiene un pequeño glosario con la definición de términos relacionados con la inmunología, que será útil para la comprensión de los capítulos que siguen.

### INTRODUCCIÓN

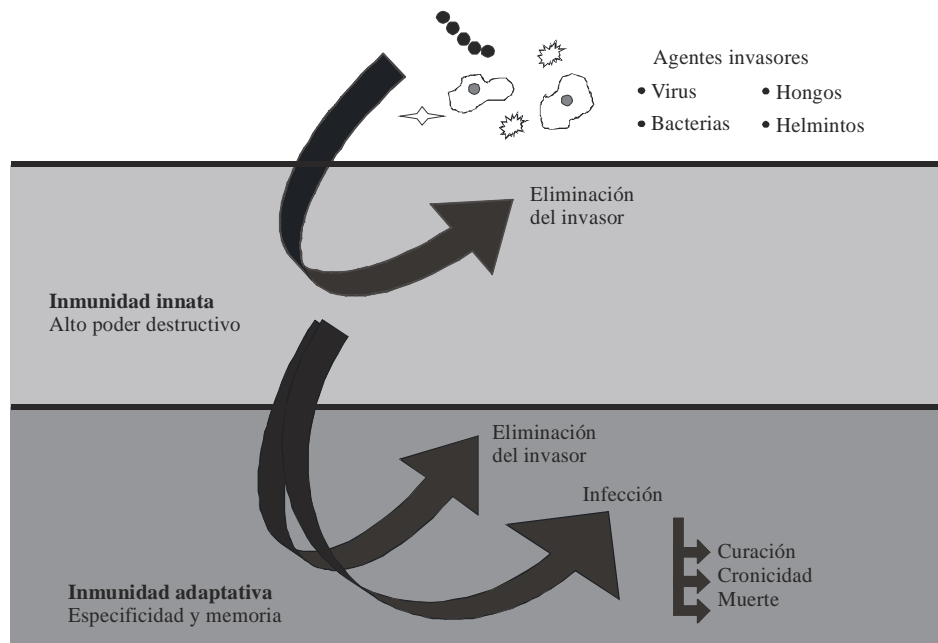
Desde que la inmunología surge como ciencia, la inmunidad, su objeto de estudio, fue considerada como el conjunto de mecanismos de defensa contra los agentes infecciosos, ya fuesen virus, bacterias, hongos e, incluso, parásitos pluricelulares.

A mediados del siglo xx, se realizaron algunos experimentos y se estudiaron algunas situaciones médicas en las cuales no estaban presentes agentes infecciosos, pero en las que sí se notaban características que hacían pensar en la participación de mecanismos inmunológicos. El estudio de los mecanismos que llevaban a la aceptación o rechazo de los órganos o tejidos trasplantados, el surgimiento de la teoría de la *vigilancia inmunológica* frente a las enfermedades malignas y el reconocimiento de la naturaleza autoinmune de algunas enfermedades, hizo que unos años más tarde se redefiniera la inmunidad como el conjunto de mecanismos cuya esencia consiste en la diferenciación entre lo propio y lo no propio. Este concepto ha sido revisado en la década de los años 90 del mismo siglo, por investigadores que sostienen que la finalidad del sistema inmune no es destruir lo extraño o lo no propio, sino aquello que se acompañe de una señal de daño o peligro. Por lo que el concepto de inmunidad queda entonces como el conjunto de mecanismos

encaminados hacia la diferenciación entre lo que es peligroso y lo que no lo es desde el punto de vista biológico, con la consiguiente destrucción de lo peligroso.

De cualquier manera, el sistema inmune ha evolucionado en su lucha contra los agentes infecciosos que de manera constante intentan atacar al ser humano y que también han evolucionado y desarrollado mecanismos cada vez más poderosos, que provocan la necesidad de que aumenten los mecanismos defensivos.

Un virus, una bacteria o un parásito no entran de forma fácil a los tejidos y fluidos del cuerpo humano. La piel, las membranas mucosas y el epitelio de los tractos respiratorio y gastrointestinal son barreras muy efectivas contra la invasión de esos agentes infecciosos extraños. Cuando esas barreras han sido dañadas, o cuando los invasores han logrado desarrollar mecanismos para abrirse paso hacia dentro y a través de esas barreras, les está esperando un arsenal defensivo. Esas armas de defensa son parte del sistema inmune innato y del sistema inmune adaptativo. Las moléculas y células del sistema inmune innato atacan a todos los invasores. Las que pertenecen al sistema inmune adaptativo son especialistas. Solo unas pocas de ellas se ocupan de un invasor específico, mientras el resto permanece esperando por otros (figura 5.1).



**Figura 5.1** Barreras que pueden burlar los agentes infecciosos: la inmunidad innata y adaptativa.

## INMUNIDAD INNATA

El sistema de la inmunidad innata está conformado por moléculas sanguíneas, que inactivan, matan y desintegran a los invasores, y por células, que pueden montar una respuesta fagocítica, citotóxica o inflamatoria contra el invasor. Virtualmente, todas estas células se originan de un tipo celular, la *stem cell* (célula madre) hematopoyética pluripotencial, y son generadas y regeneradas de manera continua en la médula ósea a lo largo de toda la vida. Los macrófagos y granulocitos ingieren bacterias por fagocitosis o por endocitosis mediada por receptores. Las bacterias también pueden activar el sistema complemento de manera directa e inespecífica por la vía alterna. Como consecuencia, puede haber lisis bacteriana, y la fagocitosis puede facilitarse por opsonización por el fragmento C3b. Una vez que la bacteria ha sido ingerida, una gran variedad de reacciones químicas opera dentro de la célula de defensa para matar y digerir al invasor. Los macrófagos y las células NK (*natural killers* o asesinas naturales) tienen contacto con el invasor o con las células del cuerpo, infestadas por virus, y les infunden moléculas citotóxicas almacenadas dentro de gránulos que matan a la célula diana.

Una ayuda adicional en el ataque contra el invasor es recibida por las células vecinas. Las actividades de las células de defensa fagocíticas y citotóxicas se incrementan por las citocinas y quimocinas producidas por los monocitos y las células dendríticas, y por las mismas células fagocíticas y citotóxicas. La secreción de moléculas líticas y citotóxicas puede estar

estimulada. La inflamación local ayuda a las actividades de ingestión y destructivas de las células en el sitio de la invasión, lo que aumenta el flujo sanguíneo y la permeabilidad de los capilares regionales. Esto permite una influencia mayor de otras células dispuestas a combatir. Al mismo tiempo, los vasos sanguíneos eferentes se cierran, e incrementan la concentración de células y proteínas citotóxicas en el sitio en que sucede la “batalla”. De nuevo, la inflamación está mediada por citocinas y quimocinas producidas por células que ayudan en la defensa contra los invasores. Aun, otra forma en que los invasores son rechazados es mediante la acción de células que pueden iniciar un tipo de reacción alérgica. Los eosinófilos, monocitos y mastocitos tienen la capacidad de segregar mediadores que incrementan la permeabilidad vascular, la cual es necesaria para la migración eficiente de los defensores al sitio de una invasión. Este proceso induce una contracción del músculo liso, de manera tal que las membranas mucosas expulsan a los invasores.

Todas las células del sistema inmune innato son de corta vida. En pocos días mueren, aunque hayan sido convocadas a la acción o no, para ser reemplazadas por otras nuevas que son generadas de forma continua por la *stem cell* pluripotencial y sus progenitores más comprometidos. En el sistema inmune innato, un gran número de células luchan contra cada invasor, y con frecuencia lo hacen con un alto poder de “fuego”. Sin embargo, ellas no pueden distinguir con precisión un invasor de otro: un virus de otro, una bacteria de otra, o un parásito de otro. Ellas no pueden adaptarse lo

suficiente a las características estructurales especiales de cada agresor para así mejorar sus respuestas hacia él. Puesto que las células del sistema inmune innato mueren tan rápido, el sistema no puede “recordar” un encuentro previo con un invasor que lo capacitaría para responder de manera más rápida y eficiente cuando ocurre una segunda invasión por el mismo invasor.

## INMUNIDAD ADAPTATIVA

Las propiedades anteriores, ausentes en la inmunidad innata: especificidad (precisión de reconocimiento y distinción, así como adaptación al invasor) y memoria de un encuentro previo, están presentes en otras células: los linfocitos, también de origen hematopoyético, los cuales constituyen el sistema inmune adaptativo. Solo de 1:1 000 a 1:100 000 de esas células reconoce a un invasor particular, pero lo hacen con precisión. Como una consecuencia de este encuentro, el linfocito se transforma en una célula de larga vida y más madura. Recuerdan al invasor de modo tal que durante una segunda invasión, la respuesta defensiva es más rápida y más eficiente. Por último, el sistema inmune adaptativo que comprende esos linfocitos tiene que adquirir la capacidad de no reaccionar a las estructuras propias del cuerpo humano: él tiene que ser tolerante a su huésped.

La médula ósea y el timo se conocen como los órganos linfoides primarios (o centrales) en el período posnatal del ser humano, debido a que proporcionan microambientes necesarios para la linfopoyesis, o sea, la producción de linfocitos a partir de la *stem cell* o célula madre no comprometida. Este proceso de diferenciación y maduración depende de citocinas y de contactos directos intercelulares y con elementos del estroma y la matriz extracelular. Los linfocitos maduros emergen entonces de los órganos linfoides primarios hacia la circulación, en un estado latente o de reposo, y colonizan varios órganos linfoides secundarios (o periféricos), como bazo, ganglios, amígdalas, adenoides y tejido linfóide asociado al aparato intestinal y respiratorio.

Las células de la inmunidad adaptativa, los linfocitos, no constituyen una población homogénea. Una vez que la célula descendiente de la *stem cell* pluripotencial se compromete como progenitora de la línea linfóide tiene 2 opciones: convertirse en una célula NK o no hacerlo. Si la célula no siguió la opción NK, podrá seguir otra vez 2 caminos: diferenciarse hacia la línea T o B.

Si el progenitor linfóide continúa hacia la línea B, seguirá un proceso de diferenciación y se moverá entre distintos microambientes internos de la médula ósea (en

las aves, por ejemplo, deberá migrar a la Bursa de Fabricio, donde completará su proceso de maduración) y emigrará hacia los órganos linfoides secundarios. En este proceso de diferenciación, el progenitor B adquiere su especificidad para el antígeno mediante un proceso de recombinación de minigenes, que permite lograr la diversidad de las cadenas pesadas y ligeras de la inmunoglobulina de superficie, IgS. Esta, junto con otras cadenas “acompañantes”, integran su receptor de membrana específico para el antígeno. Cuando el linfocito B entra en contacto con el antígeno de su especificidad junto con otras señales accesorias de activación celular, se transforma en célula plasmática, principal productora de las inmunoglobulinas (moléculas glicoproteicas con actividad de anticuerpos).

Si el progenitor linfóide continúa hacia la línea T, seguirá un proceso de diferenciación que incluirá: migrar desde la médula ósea hasta el timo y, allí, desde la corteza hasta la médula tímica, de la cual saldrá listo a colonizar los órganos linfoides secundarios. En este proceso de diferenciación, el progenitor linfóide T adquiere su especificidad hacia el antígeno también mediante un proceso de recombinación de minigenes, que permite la diversidad de las cadenas peptídicas que integran su receptor de membrana específico para el antígeno: el TCR (*T cell receptor*), que forma un complejo macromolecular con el CD3. Este complejo está integrado por otras cadenas polipeptídicas que tienen importancia para el proceso de internalización de la señal y para la activación celular. En este proceso se forman también otras 2 moléculas de membrana con función de correceptores: la CD4 y la CD8. En su proceso de maduración, el linfocito T inhibe la síntesis de una de estas 2 moléculas y, una vez maduro, expresará en membrana solo una de ambas. Esto hará que se constituya como parte de una de dos subpoblaciones: la T-CD4, cooperadora, o la T-CD8, citotóxica.

Los linfocitos T-CD4 son células reguladoras que, al entrar en contacto con el antígeno de su especificidad (y recibir señales accesorias de activación celular), pueden seguir 2 caminos de diferenciación funcional: de una célula Th0 (no comprometida) se puede transformar en una célula Th1, que estimulará a otros tipos celulares hacia el desarrollo de una respuesta inmune hasta ahora conocida como inflamatoria o celular; o se puede diferenciar en una célula Th2 que estimulará al linfocito B y a otras células hacia el desarrollo de una respuesta inmune, también denominada humoral.

## RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA

Las células de la inmunidad innata tienen mecanismos con alto poder de destrucción, pero al no diferenciar

a los invasores, reaccionan siempre igual. En cambio, las células de la inmunidad adaptativa son capaces de reconocer al agresor, aunar fuerzas y establecer una respuesta potenciada y “enfocada” hacia el agente invasor, la *respuesta inmune adaptativa*. Sin embargo, la inmunidad adaptativa evolucionó con respecto a la inmunidad innata y, por tanto, las células de la inmunidad adaptativa no operan solas. Algunas células fagocíticas han desarrollado mecanismos que las capacitan para cooperar con los linfocitos T-CD4 en el reconocimiento del antígeno. Estas células sintetizan y expresan en la membrana, las moléculas clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y las moléculas especializadas que se unen en la vía endocítica con los péptidos exógenos derivados de la digestión de proteínas, procedentes del agente fagocitado, y los presentan en membrana al linfocito T-CD4. Estas células con capacidad fagocítica y que expresan moléculas MHC-clase II en membrana, se denominan células presentadoras de antígenos (APC), y no solo le exponen los péptidos antigénicos a la célula CD4, sino que les ofrecen señales adicionales mediante otras moléculas de membrana (B7), que se unen a sus correceptores (CD28) en el linfocito CD4, y también segregan citocina sobre él, que lo conducen a su activación (figura 5.2).

El tipo de APC y la cantidad de citocina segregada en el ambiente en que se encuentre el linfocito T-CD4, lo conducirán de un Th0 a un Th1 o a un Th2, y sus células diana serán distintas.

En el caso de una respuesta Th2 se estimulan linfocitos B, mastocitos, basófilos y eosinófilos que conducen a una respuesta Th2. Los linfocitos B se activan y se diferencian en células plasmáticas con una alta producción de anticuerpos. Los anticuerpos, con una alta especificidad para el invasor, pueden operar a distancia. Al unirse al invasor, pueden facilitar su fagocitosis (opsonización), su lisis a cargo de las células citotóxicas como macrófagos y células NK, o activar el sistema complemento por la vía clásica hasta llevar a los linfocitos B a la lisis por complemento.

En el caso de una respuesta Th1 se activarán linfocitos T-CD8, macrófagos y otros con poder citolítico, lo que desarrolla una respuesta Th1 inflamatoria. Los linfocitos T-CD8 reconocen su antígeno en la membrana de la célula diana en forma de complejo macromolecular péptido/molécula MHC clase I, procedente del procesamiento interno desde el citosol de proteínas endógenas y, junto con la estimulación del Th1 y la citocina, se activan y les infunden citotoxinas a sus células diana, probablemente infestadas por un virus (parásito intracelular) o alteradas de algún modo en su medio interno.

En la actualidad se está desvaneciendo el concepto de respuesta Th1 *celular* y respuesta Th2 *humoral*. De hecho, algunos anticuerpos (como las clases IgG1 e IgG3) requieren la cooperación Th1, mientras que otros (por ejemplo, clase IgE) necesitan la cooperación Th2. Por ello es más exacto hablar de respuesta Th1 o Th2, en lugar de respuesta celular o humoral.

La interacción de las células de la inmunidad innata con las de la inmunidad adaptativa no se circunscribe a la rama aferente del desarrollo de la respuesta (presentación del antígeno al linfocito), sino que este es capaz de estimular a las células de la inmunidad innata y activar aún más sus potentes mecanismos de destrucción (activación de macrófagos, células NK y facilitación de la fagocitosis mediante anticuerpos, entre otros).

## MINIGLOSARIO

### Inmunidad

*Inmunidad innata.* Conjunto de defensas del huésped, presentes desde el nacimiento, que no dependen de la memoria inmunitaria.

*Inmunidad adaptativa.* Serie de defensas del huésped, caracterizada por una especificidad extrema y memoria, mediadas por anticuerpos o células T.

*Inmunidad humoral.* Inmunidad o respuestas inmunitarias mediadas por factores solubles, en especial moléculas de anticuerpo, en líquidos corporales.

*Inmunidad mediada por células.* Inmunidad en la que predomina la participación de linfocitos y macrófagos.

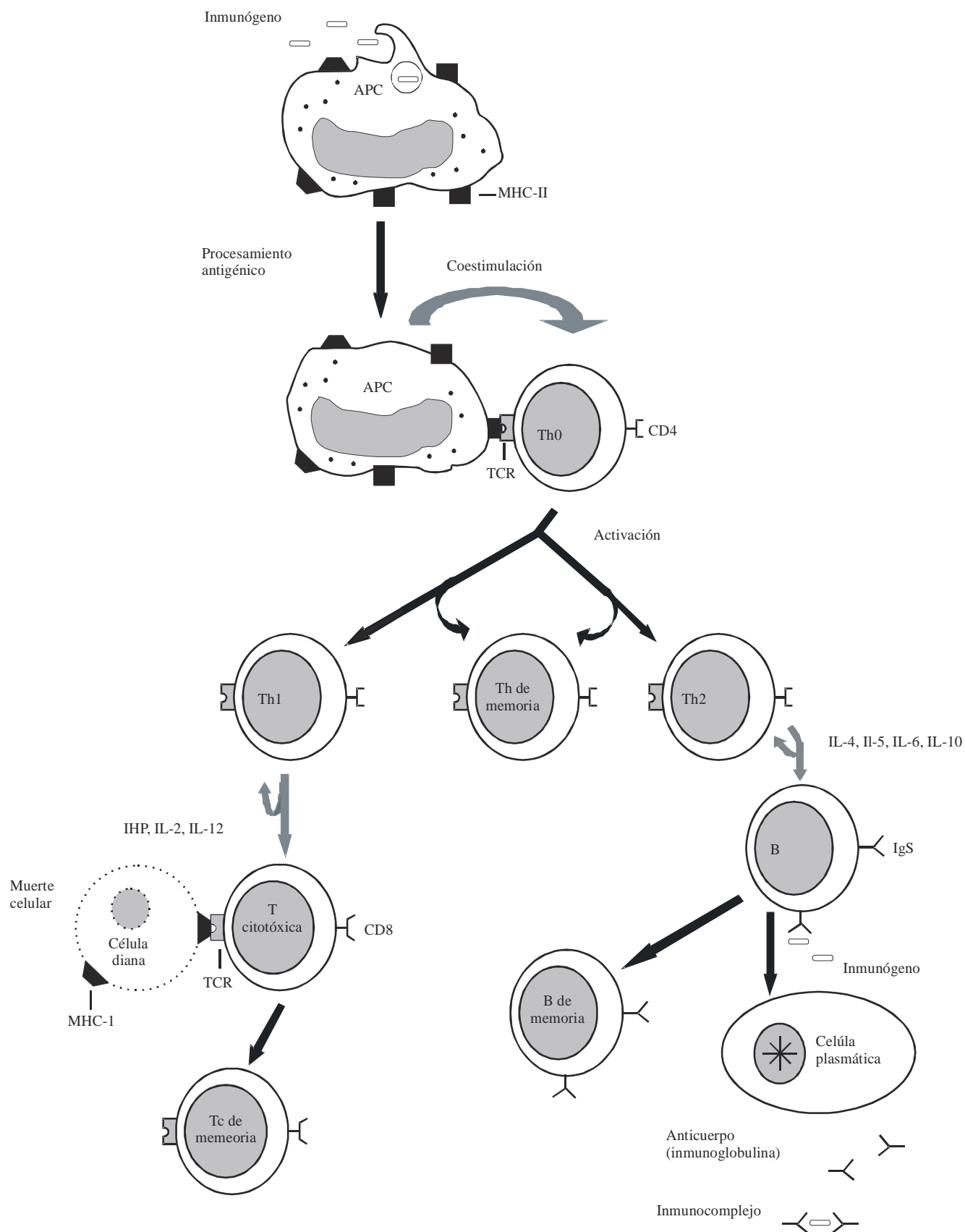
### Órganos linfoides

*Órganos linfoides centrales o primarios.* Órganos linfoides que son esenciales para el desarrollo ontogénico de los linfocitos (linfopoyesis T o B) de células precursoras indiferenciadas; estos son la médula ósea, el timo, el saco vitelino, el hígado fetal y la Bursa de Fabricio, en las aves, de donde adquiere su nombre el linfocito B.

*Órganos linfoides periféricos o secundarios.* Órganos linfoides no esenciales para la ontogenia de las respuestas inmunitarias: bazo, ganglios linfáticos, amígdalas, adenoides, placas de Peyer y el tejido linfoide asociado con el sistema gastrointestinal y respiratorio.

*Bolsa o Bursa de Fabricio.* Órgano de la porción caudal del intestino, situado en la “cloaca” de las aves, que controla la ontogenia de los linfocitos B.

*Timo.* Órgano linfoide primario situado en el mediastino anterior, donde se realiza y controla la ontogenia de los linfocitos T.



**Figura 5.2** Esquema general de la respuesta inmune adaptativa.

## Endocitosis, citotoxicidad

*Endocitosis.* Cualquier proceso en la célula, mediante el cual el material externo es captado al interior de vesículas citoplasmáticas. Los 3 tipos de endocitosis principales son: fagocitosis, pinocitosis y endocitosis mediada por receptor.

*Fagocitosis.* Tipo de endocitosis en la cual una célula engloba material en partículas.

*Pinocitosis.* Endocitosis no mediada por receptor, de materiales solubles que se efectúa por ingestión de líquido extracelular.

*Endocitosis mediada por receptores.* Endocitosis de material soluble mediada por receptores de membrana celular “diseñados” para facilitarla.

*Citotoxicidad.* Propiedad de matar células.

## Antígeno, anticuerpo

*Inmunogenicidad.* Propiedad de una sustancia para inducir una respuesta inmunitaria detectable.

*Inmunógeno.* Sustancia que al introducirse en el animal, estimula la respuesta inmunitaria. El término *inmunógeno* también puede denotar una sustancia capaz de estimular una respuesta inmunitaria, en contraste con una sustancia que solo se puede combinar con el anticuerpo.

*Antígeno.* Sustancia que reacciona con anticuerpos o receptores de células T.

*Hapteno.* Sustancia que no es inmunogénica, pero puede reaccionar con el anticuerpo de la especificidad apropiada.

*Epítipo o determinante antigénico.* La parte de un antígeno que se combina con el anticuerpo específico o el receptor de la célula T.

*Anticuerpo.* Proteína producida como consecuencia de la introducción de un antígeno, y que tiene la capacidad de combinarse con el antígeno que estimuló su producción.

*Inmunoglobulinas.* Grupo muy diverso de proteínas solubles fijadoras de antígeno, o ligadas a la membrana, producidas solo por los linfocitos B y sus descendientes, las células plasmáticas.

## Complemento

*Complemento.* Sistema de proteínas séricas que pueden inducirse para que inicien una cascada de reacciones enzimáticas, las cuales es posible que originen la lisis de células extrañas y la formación de algunas opsoninas y mediadores inflamatorios.

*Vía clásica.* Secuencia de reacciones entre proteínas séricas del complemento, que se inicia con la fijación de la proteína C1 al complejo antígeno-anticuerpo.

*Vía alterna.* Sistema de activación del complemento, que no depende de la unión antígeno/anticuerpo, y en el que participan el factor D, el factor B y el C3b. Con la activación del C3, el proceso progresa como en la vía clásica.

## Citocinas, activación

*Citocinas.* Grupo diverso de proteínas solubles, de señalización intercelular, que regulan no solo respuestas inmunitarias e inflamatorias locales y sistémicas, sino también la reparación de heridas, la hematopoyesis y muchos otros procesos biológicos.

*Quimioquina.* Cualquier citocina en un grupo de citocinas quimioatrayentes. Son reguladoras del “tráfico” celular.

*Quimioatracción o quimiotaxia.* Migración de una célula u organismo hacia concentraciones crecientes de una sustancia química.

*Activación.* Proceso mediante el cual una célula o proteína, funcionalmente en reposo, es inducida a expresar una o más propiedades biológicas latentes.

## Complejo mayor de histocompatibilidad

*Complejo mayor de histocompatibilidad (MHC).* Grupo específico de genes que codifican proteínas, muchas de las cuales son de superficie celular, que participan en la presentación de antígenos y que constituyen uno de los determinantes más importantes en la histocompatibilidad.

*Proteína (moléculas) MHC clase I.* Cualquiera de las glicoproteínas heterodiméricas de superficie celular, codificadas por el *locus* A, B o C del MHC, que funcionan, en esencia, en la presentación de antígeno a linfocitos T-CD8 (citotóxicos).

*Proteína (moléculas) MHC clase II.* Cualquiera de las glicoproteínas heterodiméricas de superficie celular, codificadas por el *locus* DR, DP o DQ del CMH, que funcionan, sobre todo, en la presentación de antígeno a linfocitos T CD4 (cooperadores).

*Proteína (moléculas) MHC clase III.* Cualquiera de las proteínas codificadas por un conjunto de genes situados entre los *loci* MHC clase I y clase II, pero que no están relacionados ni desde el punto de vista funcional ni evolutivo con los genes de clase I y II, y no desempeñan función alguna en la presentación de antígeno.

## Células, macrófagos, linfocitos (clúster de diferenciación)

*Célula madre o stem cell.* Cualquier célula progenitora, que no está diferenciada de manera completa, y puede realizar proliferación mitótica para producir células madres y descendientes diferenciados.

**Macrófagos.** Cualquiera de las células fagocíticas maduras derivadas de monocitos circulantes.

**Macrófagos activados.** Macrófago en un estado fisiológico transitorio, caracterizado, en parte, por un aumento en las actividades fagocítica, microbicida, secretora y de presentación de antígeno.

**Macrófagos armados.** Macrófagos que tienen la propiedad de generar citotoxicidad específica a antígeno, como resultado de anticuerpos citofílicos o factores armadores de células T.

**Células dendríticas.** Grupo ampliamente distribuido y heterogéneo de células presentadoras de antígeno, que incluye células de Langerhans, células interdigitantes, células dendríticas sanguíneas y otras.

**Células presentadoras de antígeno (APC).** Células con capacidad fagocítica, que expresan en membrana proteínas MHC clase II y que, por tanto, están especializadas en presentar péptidos exógenos al linfocito T-CD4.

**Célula NK (natural killer o asesina natural).** Tipo de célula linfoide que es distinta, desde el punto de vista funcional, morfológico y del desarrollo, de las células T y B. Tiene la propiedad de la citotoxicidad celular sin inmunización previa.

**Linfocito.** Célula mononuclear, de 7 a 12 mm de diámetro, que contiene un núcleo con cromosomas densamente empacados y un reborde pequeño de citoplasma.

**Linfocito B.** Célula linfoide madura que pertenece a una línea celular, que completa su desarrollo en la propia médula ósea donde se originó. Adquiere su nombre porque en las aves tiende a migrar hacia la Bursa de Fabricio para completar su maduración.

**Linfocito T.** Célula linfoide madura que pertenece a la línea celular dependiente del timo.

**Linfocito Th0.** Célula T-CD4 cooperadora, cuyo espectro de producción de citocinas combina las características de las producidas por los linfocitos Th1 y Th2.

**Linfocito Th1.** Célula T-CD4 cooperadora, que elabora citocinas (como el INF) que promueven, de manera selectiva, respuestas inmunitarias mediadas por células.

**Linfocito Th2.** Célula T-CD4 cooperadora, que elabora citocinas (incluyendo IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10) que favorecen, de forma selectiva, respuestas inmunitarias humores.

**CD (clúster de diferenciación).** Designación que se aplica, junto con un número único de identificación, a una diversidad de proteínas de superficie celular, la mayoría de las cuales se encuentra en uno o más tipos de células hematopoyéticas. Se utiliza como un sistema estándar de nomenclatura.

## BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- Abbas AK, Murphy KM, Ser A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996; 383:787-93.
- Constant SL, Bottomly K. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses-The alternative approaches. *Annu Rev Immunol* 1997; 15:297-322.
- Fearon DT, Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 1996, 272:50-4.
- Goodman JW. La respuesta inmunitaria. En: Stites D P, Terr A I, Parslow T G eds. *Inmunología Básica y Clínica*. 8<sup>va</sup>. Ed. México, D.F.: Editorial El Manual Moderno, 1996.
- Kemeny M, Peakman M. Avances Recientes: Inmunología. *BMJ* 1998; 6:127-31.
- Langman RE, Cohn M. Terra ferma: a retreat from "danger". *J Immunol* 1996; 157: 1273-6.
- Matzinger P. Tolerance, danger and the extended family. *Annu Rev Immunol* 1994; 12:991-1045.
- Roitt I, Brostoff J, Male D. *Inmunología*. 4<sup>ta</sup>. Ed. Madrid: Harcourt Brace, 1977.



## **CONTENIDO**

---

**Introducción/ 403**

**Clasificación de las inmunoglobulinas/ 404**

**Estructura de las inmunoglobulinas/ 404**

**Relación entre la estructura y la función de las inmunoglobulinas/ 406**

**Inmunoglobulinas poliméricas/ 407**

**Funciones de las inmunoglobulinas/ 408**

**Origen y diversidad de las inmunoglobulinas/ 408**

**Metabolismo y distribución de las inmunoglobulinas/ 410**

**Niveles de inmunoglobulinas en el desarrollo del individuo/ 411**

**Tecnología inmunológica/ 412**

**Bibliografía recomendada/ 413**

## Capítulo 34



### AUTOANTICUERPOS E INMUNOGLOBULINAS

*Dra. Elena Kokuina*

#### RESUMEN

Los anticuerpos son glicoproteínas, llamadas también inmunoglobulinas, producidas por las células plasmáticas y capaces de reaccionar con un antígeno. En el hombre, las inmunoglobulinas se dividen en 5 clases o isotipos: IgM; IgD; IgG, que incluyen las subclases: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4; IgA, que a su vez incluye las subclases IgA1 e IgA2; e IgE. La estructura básica de la molécula de inmunoglobulina consiste en un multímero de 2 cadenas ligeras idénticas, unidas a 2 cadenas pesadas idénticas, cuyo peso molecular duplica el de las ligeras. Cada cadena tiene una región variable, que determina la especificidad antigénica, y una región constante, que es común a las inmunoglobulinas de una misma clase, y de la cual dependen las funciones efectoras de los anticuerpos. Una vez que las inmunoglobulinas se unen al antígeno, pueden inmovilizarlo y así disminuir su capacidad invasiva. También pueden neutralizarlo, como ocurre con algunas toxinas y partículas virales, e impedir su fijación a membranas celulares; o, cuando es necesario, desencadenar reacciones biológicas encaminadas a destruirlo, como: la activación del sistema de complemento, con la consiguiente liberación de péptidos quimiotácticos, el incremento de la fagocitosis, la puesta en marcha de reacciones de citotoxicidad celular y la degranulación de mastocitos para liberar mediadores primarios de la inflamación. Las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina están codificadas por múltiples segmentos génicos, separados en el ADN de la línea germinal: V, D, J y C para las cadenas pesadas y V, J y C para las ligeras, los cuales se reordenan para formar un gen único durante la maduración de las células B. La diversidad de los anticuerpos de un individuo está dada por la recombinación entre los genes mencionados y las mutaciones somáticas. La difusión de la tecnología de anticuerpos monoclonales y los aportes de la ingeniería genética, que proporcionan formulaciones de anticuerpos específicos y reproducibles, han abierto una nueva era en el tratamiento de diversas situaciones clínicas.

#### INTRODUCCIÓN

La respuesta inmune sigue un esquema general, según el cual el reconocimiento de una sustancia “extraña”, el antígeno, desencadena procesos de activación, de proliferación y de diferenciación en las poblaciones de linfocitos y de células de inmunidad innata, que trae como consecuencias la generación de fuerzas “efectoras”, tanto de naturaleza celular, que son los linfocitos efectores o sensibilizados, como humoral, que son los anticuerpos, dirigidos a eliminar el antígeno cuando reaccionan con él. Aunque muchas veces los términos anticuerpo e inmunoglobulina se emplean indistintamente, hay matices entre uno y otro. La definición clásica de

anticuerpo hace referencia a 2 caracteres de orden funcional: son proteínas que aparecen en la respuesta a un antígeno y que son capaces de combinarse específicamente con él. El término inmunoglobulina, mucho más reciente, tiene una connotación, sobre todo, estructural: designa a una familia de proteínas, presentes en el suero y en otros muchos líquidos del cuerpo, que tienen una gran diversidad dentro de una estructura básica común. Esta estructura es la adecuada para que estas proteínas, las inmunoglobulinas, puedan funcionar como anticuerpos. Su diversidad corresponde a la necesidad del organismo de reconocer un amplísimo repertorio de determinantes antigénicos diferentes y de desarrollar múltiples

respuestas efectoras frente a los agentes patógenos. Así pues, el término anticuerpo tiene un significado funcional, mientras que el de inmunoglobulina es estructural. Muchas veces, estos 2 términos pueden emplearse sin distinción porque la estructura de las inmunoglobulinas es la que mejor se adapta al cumplimiento de su función como anticuerpos. En la estructura de las inmunoglobulinas hay un alto grado de especialización funcional: unas regiones de la molécula sirven para el reconocimiento del antígeno, mientras que otras desarrollan las funciones que resultan de la unión antígeno-anticuerpo.

Los anticuerpos pueden existir no solo como moléculas circulantes, sino también como moléculas estacionarias sobre la membrana de las células B, donde funcionan como el receptor antigénico de estas células.

## CLASIFICACIÓN DE LAS INMUNOGLOBULINAS

Entre las inmunoglobulinas se distinguen varias clases, subclases y tipos, que presentan entre sí diferencias estructurales y funcionales, y que facilitan su estudio como conjunto. La molécula básica de anticuerpo está compuesta por 2 cadenas pesadas idénticas y 2 cadenas ligeras idénticas, unidas entre sí. Las diferencias en las secuencias aminoácidas de las cadenas pesadas permiten clasificar las inmunoglobulinas humanas en cinco clases: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE, nombradas en orden decreciente de su concentración en el suero de individuos adultos normales. La IgG se subdivide, a su vez, en 4 subclases: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4; y la IgA, en otras 2: IgA1 e IgA2. Todas las inmunoglobulinas, de cualquier clase o subclase, pueden pertenecer a 1 de 2 tipos, según su cadena ligera: kappa ( $\kappa$ ) o lambda ( $\lambda$ ). Existen, pues, 18 modalidades principales de moléculas de inmunoglobulinas, según la clase, subclase y tipo al que pertenecen.

Las diferentes clases y subclases de cadenas pesadas, y los dos tipos de cadenas ligeras, constituyen los isotipos de las inmunoglobulinas, llamadas así porque están presentes por igual y en proporciones relativamente constantes, en todos los seres humanos, en condiciones normales. Se da el nombre de alotipos a otras variedades de las inmunoglobulinas, reconocibles sobre todo por sus características antigénicas, basadas en pequeñas diferencias en la secuencia de aminoácidos, y que tienen la peculiaridad de estar repartidos de manera desigual entre los individuos de una población. Son rasgos que marcan un polimorfismo genético de las inmunoglobulinas, y se transmiten de modo mendeliano, con carácter codominante. Solo existe este tipo de polimorfismo en las cadenas pesadas  $\gamma$  y  $\alpha$ , así

como en las cadenas ligeras  $\kappa$ , que constituyen los sistemas alotípicos Gm, Am y Km, respectivamente. Las moléculas de inmunoglobulina poseen un idiotipo, conjunto de caracteres antigénicos asociado con la estructura fina de sus dominios variables, y relacionado, por tanto, con su especificidad de reconocimiento antigénico. Dicho de otro modo: moléculas de anticuerpo específicas para diferentes epítomos muestran entre sí diferencias antigénicas, aunque pertenezcan al mismo isotipo y compartan idénticos caracteres alotípicos. La existencia de los idiotipos es importante en cuanto a los mecanismos de regulación de la respuesta inmune.

## ESTRUCTURA DE LAS INMUNOGLOBULINAS

La estructura básica de las moléculas de inmunoglobulina está constituida por 4 cadenas polipeptídicas, iguales 2 a 2: 2 cadenas ligeras o cadenas L, con un peso molecular próximo a 25 kDa, y 2 cadenas pesadas o cadenas H, cuyo peso molecular duplica el de las ligeras. En cada molécula de inmunoglobulina, las 2 cadenas ligeras son iguales entre sí, y lo mismo ocurre con las 2 cadenas pesadas, salvo, a lo sumo, por lo que se refiere a su grado de glicosilación. Diferencias inherentes a las cadenas ligeras forman la base de la división en tipos, mientras que la división en clases y subclases depende de caracteres propios de las cadenas pesadas. Las cadenas pesadas de cada clase se designan con la letra griega correspondiente a la letra romana que designa a la molécula entera. Así, reciben el nombre de cadenas  $\gamma$  las cadenas pesadas de la IgG, cadenas  $\alpha$  las de la IgA, cadenas  $\mu$  las de la IgM, cadenas  $\delta$  las de la IgD, y cadenas  $\epsilon$  las de la IgE.

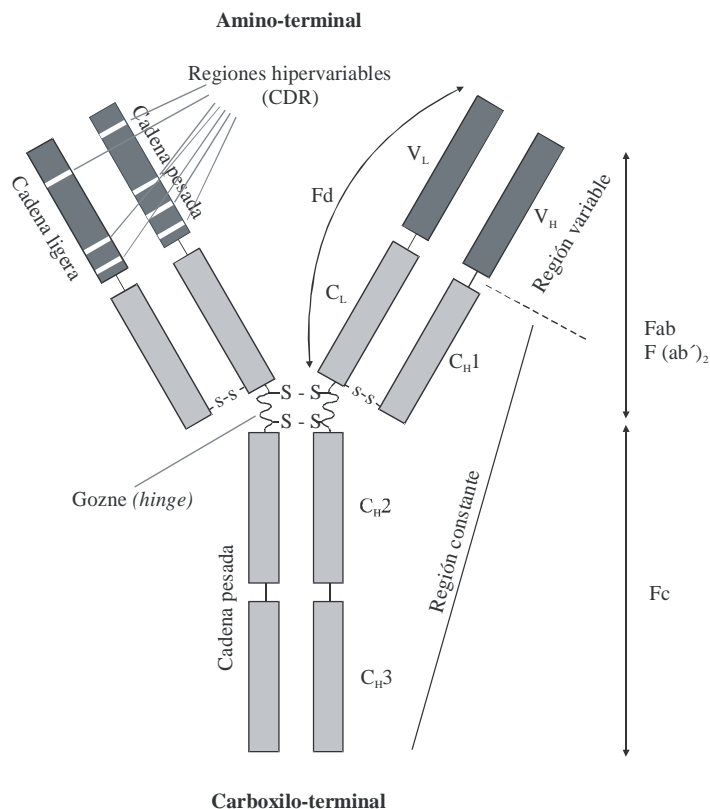
Cuando se compara la estructura primaria de un gran número de cadenas ligeras de moléculas distintas, se encuentran muchas diferencias en la secuencia de aminoácidos de su mitad amino-terminal. Esta diversidad no ocurre al azar: las sustituciones de unos aminoácidos por otros se concentran, sobre todo, en 3 pequeñas zonas que reciben por ello el nombre de regiones hipervariables, también se llaman regiones determinantes de complementariedad (CDR: *complementarity determining regions*) porque entran a formar parte del sitio de unión específica al antígeno. Estas regiones hipervariables están como engastadas en otras con mucho menor grado de variabilidad (regiones marco o *framework*) que mantienen la conformación general de esta porción de la molécula, y permiten que las secuencias hipervariables queden expuestas en la orientación espacial más adecuada para la reacción con

el antígeno. La mitad carboxilo-terminal de las cadenas ligeras muestra un grado de variabilidad mucho menor aún, que corresponde principalmente a la división en los 2 tipos,  $\kappa$  y  $\lambda$ . Se puede hablar, por tanto, de una región o dominio variable ( $V_L$ ) y de otro constante ( $C_L$ ) dentro de cada cadena ligera (figura 5.3).

Un análisis similar de las cadenas pesadas revela un dominio variable ( $V_H$ ), constituido aproximadamente por los primeros 110 aminoácidos contados desde la extremidad amino-terminal. Está dotado de tres regiones hipervariables determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas entre las regiones marco o *framework* menos variables, como en las cadenas ligeras, y de una región constante ( $C_H$ ), mucho más extensa y compleja, cuya variación refleja, entre otras cosas, la existencia de las diversas clases y subclases de las inmunoglobulinas. La región constante de las cadenas pesadas está constituida por tres dominios (en la IgG, IgA e IgD) o cuatro (en la IgM e IgE), todos ellos de tamaño similar (unos 110 residuos de aminoácidos cada uno). Se les denomina con la notación  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$  y, en su caso,  $C_{H4}$ . Muchas moléculas de inmunoglobulina presentan, entre el primero y el segundo dominios constantes ( $C_{H1}$  y  $C_{H2}$ ), una porción más extendida, a la que se da el nombre de péptido gozne o bisagra (*hinge peptide*) porque puede dotar a la molécula de cierto grado de flexibilidad. En la IgM, que no

tiene péptido bisagra, su función es sustituida por el segundo dominio constante ( $C_{H2}$ ) de la cadena pesada  $\mu$ .

Cada uno de los dominios que, en número variable (2 para las cadenas ligeras, 4 o 5 para las cadenas pesadas), constituyen las cadenas polipeptídicas de las inmunoglobulinas, es una estructura globular bastante compacta, con un tipo de plegamiento peculiar formado por 2 láminas superpuestas de estructura beta, a cuya estabilidad conformacional contribuye un puente disulfuro (S-S). Este puente está establecido entre 2 residuos de cisteína que distan de unos 60 a 65 aminoácidos en la secuencia primaria. Además de estos puentes disulfuro “intracatenarios” existen otros “intercatenarios”, que sirven para mantener unidas entre sí las 4 cadenas, 2 ligeras y 2 pesadas, de la estructura básica de la molécula. Las 2 cadenas pesadas están unidas entre sí por puentes disulfuro correspondientes a residuos de cisteína en la región gozne o equivalente. Cada cadena ligera suele estar unida a una cadena pesada por medio de un puente disulfuro que va desde la zona carboxilo-terminal de la cadena ligera a un punto de la cadena pesada situado del lado carboxilo-terminal o, de manera más frecuente, del lado amino-terminal del primer dominio constante de la cadena pesada. En una determinada modalidad de IgA2, las 2 cadenas ligeras están unidas entre sí por un puente disulfuro, mientras que el dímero de cadenas ligeras se une al de las cadenas pesadas solo por enlaces no covalentes.



**Figura 5.3** Estructura de una inmunoglobulina humana.

Todas las moléculas de inmunoglobulina están glicosiladas. El grado de glicosilación es mínimo (alrededor de 2,5 % de la masa molecular) en la IgG, y mayor (varía entre 7 y 12 %, aproximadamente) en las restantes clases. La presencia de los carbohidratos es esencial para la estructura de la molécula de anticuerpo. Los sitios de glicosilación se encuentran, sobre todo, en las cadenas pesadas y, en el caso de la IgG, en lo fundamental, en el segundo dominio de la región constante. Por esta razón, entre los segundos dominios de las respectivas cadenas no hay el grado de aposición que ocurre entre los terceros dominios. El primer dominio constante de cada cadena pesada, en todas las clases de inmunoglobulinas, está en oposición con el dominio constante de la cadena ligera correspondiente, como lo están entre sí los 2 dominios variables, uno de la cadena pesada y otro de la cadena ligera adyacente. De esta forma, como se representa en la figura 5.3, el esquema de la molécula de inmunoglobulina se puede considerar configurado como una letra Y; su tallo vertical está formado por la mayor parte de la región constante de ambas cadenas pesadas, así como cada uno de sus brazos por una cadena ligera y por los 2 primeros dominios amino-terminales (el variable y el primero de los constantes) de una cadena pesada. La separación entre las 2 ramas de la Y podría variar según el grado de flexibilidad del péptido bisagra, que en este esquema le corresponde al punto de confluencia de los 3 trazos rectilíneos de la letra Y.

## RELACIÓN ENTRE LA ESTRUCTURA Y LA FUNCIÓN DE LAS INMUNOGLOBULINAS

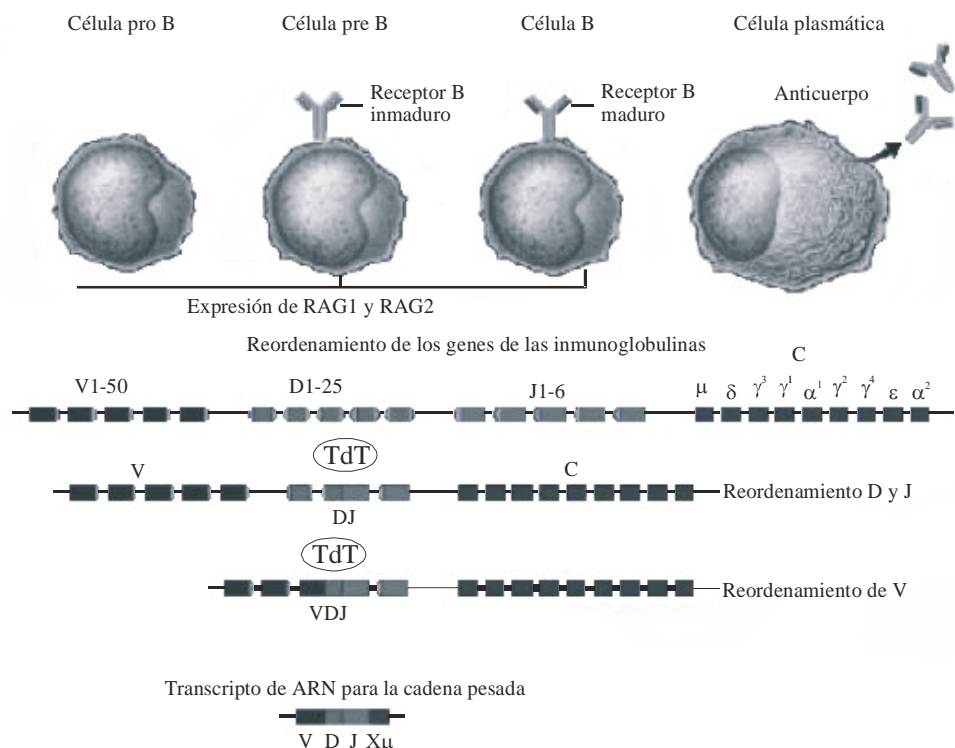
La existencia de pares de dominios en aposición tiene una significación funcional de gran importancia: cada sitio de combinación con el antígeno está formado por dos dominios variables,  $V_L$  y  $V_H$ , que hay en cada “brazo” de la molécula. Esta es, por tanto, divalente en cuanto a su capacidad de unión con el antígeno. Además, como las cadenas polipeptídicas de cada molécula son iguales 2 a 2, los 2 sitios combinantes de cada molécula de anticuerpo son específicos para el mismo epítipo antigénico. La “valencia” para el antígeno se multiplica cuando las moléculas de inmunoglobulina tienen carácter polimérico. Otras propiedades biológicas de la molécula, como la activación del sistema de complemento, la unión a receptores celulares, la regulación de las tasas

metabólicas, la distribución en el cuerpo, entre otras, tienen su sustrato estructural en los dominios constantes del “tallo” de la Y.

Muchos de nuestros conocimientos acerca de las inmunoglobulinas en lo referente a su estructura y relaciones entre esta y la función, deriva de los estudios llevados a cabo mediante la digestión enzimática controlada de la molécula de anticuerpo. La región bisagra, por ser más laxa, es más susceptible al ataque enzimático que los dominios globulares, más compactos. La papaína rompe la molécula por el lado amino-terminal de la región que contiene los enlaces disulfuro que unen entre sí las 2 cadenas pesadas, lo que da lugar a la formación de 3 fragmentos. Dos de ellos, llamados Fab, son iguales entre sí y están formados por una cadena ligera completa, más los 2 dominios amino-terminales de la cadena pesada: el variable y el primero de los constantes, que juntos forman el fragmento Fd de la cadena pesada.

Cada fragmento Fab contiene un solo sitio de unión al antígeno. Por ser monovalente tiene efecto “bloqueante”: su unión al antígeno no da lugar a precipitación, aglutinación, activación del complemento u otros efectos apreciables de manera directa; pero impide que el antígeno se pueda unir luego a moléculas completas de anticuerpo de la misma especificidad. El tercer fragmento, llamado Fc, está integrado por el péptido bisagra, y contiene los enlaces disulfuro, seguido de los restantes dominios carboxi-terminales de las 2 cadenas pesadas (figura 5.4).

La pepsina causa la rotura por el lado carboxilo-terminal de la región que contiene los puentes disulfuro que unen entre sí las 2 cadenas pesadas. Esto da lugar a un fragmento grande, llamado  $F(ab)_2$ , formado por los 2 fragmentos Fab, más la región bisagra de la molécula. Este fragmento contiene los 2 sitios de unión al antígeno, por lo que tiene un carácter divalente. El fragmento  $F(ab)_2$  puede inducir precipitación y aglutinación, pero no la activación del complemento, ya que esta requiere la presencia de estructuras en los dominios constantes de la mitad carboxilo-terminal de las cadenas pesadas. Si existen las condiciones adecuadas de la digestión enzimática, se pueden obtener otros fragmentos, como el llamado  $pFc'$ , formado, sobre todo, por los dominios carboxilo-terminales de las 2 cadenas pesadas, unidos entre sí por uniones no covalentes.



**Figura 5.4** Diversidad de los receptores antigénicos de las células B.

## INMUNOGLOBULINAS POLIMÉRICAS

De las 5 clases de inmunoglobulinas, la IgG, la IgD y la IgE se presentan siempre en forma monomérica: su molécula corresponde al patrón estructural de 4 cadenas que se ha descrito. La IgM y la IgA, por el contrario, adoptan formas poliméricas en las que este patrón se repite un cierto número de veces. La IgM se presenta de manera exclusiva en forma de pentámero (o hexámero). Cada molécula está formada por 5 o 6 subunidades, cada una de las cuales corresponde, desde el punto vista estructural, al patrón común: 2 cadenas ligeras y 2 cadenas pesadas. La valencia de esta molécula en cuanto a su unión al antígeno puede alcanzar un valor máximo de 10 en el pentámero. Habitualmente, apenas existen formas monoméricas de la IgM, pero en determinadas condiciones patológicas pueden alcanzar una proporción significativa. Cada polímero de IgM tiene, además, una pequeña cadena polipeptídica, llamada cadena J, que se sintetiza al mismo tiempo y en las mismas células que el resto de la molécula, y que parece ser importante para que se produzca la polimerización. Las 5 subunidades que forman la molécula de la IgM se unen entre sí, y con la cadena J,

mediante puentes disulfuro entre residuos de cisteína próximos a la extremidad carboxi-terminal de las cadenas pesadas. La rotura de estos enlaces con agentes reductores como el mercaptoetanol, da lugar a la completa liberación de las subunidades, al no existir entre ellas uniones no covalentes.

La mayor parte de la IgA sérica se encuentra en forma monomérica, pero alrededor del 20 % aparece en forma de polímeros de tamaños diversos, entre los que predominan los dímeros, con cantidades decrecientes de polímeros de tamaños mayores. En las secreciones mucosas, las proporciones de IgA monomérica y polimérica se invierten: la mayor parte de la IgA secretoria es dimérica. Los polímeros de IgA, tanto del suero como de las secreciones, contienen cadenas J, iguales a las que forman parte de los polímeros de IgM y, al igual que en esta, en la proporción de una sola cadena J por polímero. La IgA secretoria contiene, además, otra cadena polipeptídica, el componente S o pieza secretoria, que no se sintetiza de conjunto con el resto de la molécula, sino que se le añade en el momento del paso del medio interno al medio externo: forma parte del mecanismo de transporte a través de los epitelios de la mucosa. La

subclase IgA2, predominante en las secreciones, muestra mayor tendencia a la polimerización que la IgA1, más abundante en el suero.

## **FUNCIONES DE LAS INMUNOGLOBULINAS**

Al describir la estructura de los anticuerpos, se mencionaron algunas de sus funciones. En este acápite aparecen resumidas.

Las moléculas de anticuerpo tienen dos funciones fundamentales; la primera, localizar y fijarse a un microorganismo o a una toxina para inhibir estéricamente su unión con los receptores celulares; y, como los anticuerpos casi nunca actúan de manera aislada en la eliminación del invasor, la segunda función consiste en desencadenar reacciones biológicas encaminadas a destruirlo. La primera función la realiza la porción Fab de todo anticuerpo. La segunda función o función efectora se cumple por la fracción Fc, que controla diferentes procesos biológicos, los cuales ocurren cuando la molécula de anticuerpo se ha unido a un antígeno. Los principales procesos son:

1. La activación del complemento, ya sea por la vía clásica o por la alterna. La vía clásica de la activación del complemento se desencadena cuando su primer componente, C1q, contacta con regiones Fc, estrechamente asociadas, de la IgM o IgG sobre la superficie celular. En la IgG, las posiciones 274 a 281 de las cadenas pesadas son las importantes para iniciar la activación del complemento. La activación del complemento genera fragmentos biológicamente activos como los fragmentos C3b, los cuales facilitan la fagocitosis de microorganismos recubiertos de anticuerpos IgG e IgM.
2. En ausencia del complemento, los microorganismos recubiertos de anticuerpos IgG, IgA o IgE se pueden unir a los correspondientes receptores Fc (FcγR, FcαR y FcεR) presentes sobre las células fagocíticas. La unión de la molécula de anticuerpo con los receptores de membrana de las células fagocíticas incrementa de manera notable la fagocitosis. Además, los anticuerpos IgG e IgE pueden mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo, un proceso de muerte extracelular mediante el cual las células que expresan receptores Fc para estas clases de anticuerpos, se unen a las células “blanco”, recubiertas de anticuerpos, o parásitos. Las células asesinas naturales (NK), monocitos, macrófagos y neutrófilos pueden mediar la citotoxicidad celular dependiente del anti-

cuerpo IgG; mientras que los macrófagos, los eosinófilos y las plaquetas median la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo IgE. Estos mecanismos citotóxicos entran en juego cuando la célula “blanco” es demasiado grande para ser fagocitada, y se basan en la liberación de perforinas, granzimas y, en algunos casos, de intermediarios del oxígeno reactivo.

3. El traspaso de los anticuerpos a través de ciertas membranas o tejidos está controlado por la parte Fc de la molécula. Los adultos producen de 3 a 4 gramos de IgA secretoria a diario. Esta forma de IgA está presente en la saliva, el calostro y en otros líquidos. Estas moléculas se sintetizan por las células plasmáticas presentes debajo de las superficies mucosas y luego son transportadas a través del epitelio por el receptor Fc. En el lado luminal, los anticuerpos liberados previenen la adhesión de los microbios a la superficie de las células del huésped. Existe un segundo tipo de receptor Fc epitelial, FcRn, que desempeña numerosas funciones, incluyendo la transferencia de la IgG materna a través de la placenta. Este mecanismo protege al feto antes de que su propio sistema inmune no haya sido desarrollado. El receptor FcRn también transfiere la IgG de la leche materna (que además contiene IgA e IgM) a través del epitelio intestinal del recién nacido.
4. Cuando el antígeno es soluble, la unión antígeno-anticuerpo conduce a la formación de complejos inmunes que son precipitados o fagocitados por las células fagocíticas.
5. La degranulación de mastocitos es una acción importante dentro del proceso de inflamación, con la cual se produce la liberación de sus mediadores primarios. Depende, sobre todo, del enlazamiento o ligazón de los receptores FcεR presentes sobre las células cebadas por los anticuerpos IgE.

## **ORIGEN Y DIVERSIDAD DE LAS INMUNOGLOBULINAS**

Los anticuerpos presentes en el organismo tienen su origen en los linfocitos B, que cuando llegan a alcanzar su máxima capacidad de síntesis y secreción de inmunoglobulinas, adoptan las características morfológicas de las células plasmáticas. En condiciones normales, las inmunoglobulinas presentan una marcada heterogeneidad, manifiesta en su amplio margen de migración en el campo electroforético. Aunque predominan en las zonas de movilidad más lenta (zona γ),

se extienden hasta zonas de modo más rápido ( $\alpha 2$ ). Esta heterogeneidad es expresión de su origen policlonal: las inmunoglobulinas de un individuo normal comprenden un gran número de poblaciones de anticuerpos de muy diferentes especificidades, cada una de las cuales se origina en una línea o clon celular diferente. En situaciones patológicas se encuentran inmunoglobulinas monoclonales (“paraproteínas”), homogéneas en su movilidad electroforética y en sus caracteres isotípicos, alotípicos e idiotípicos, que sirven como marcadores de la proliferación desproporcionada de un único clon de linfocitos B. El ejemplo más característico es el mieloma múltiple, por ser un tumor de células plasmáticas.

El hecho sorprendente de que las moléculas de inmunoglobulinas poseen unas regiones muy variables, seguidas de otras mucho más constantes y conservadas en la evolución, y la observación de que a lo largo de la respuesta inmune se produce un cambio en la clase del anticuerpo sin variar su especificidad de unión al antígeno, planteó desafíos importantes para tratar de establecer la codificación genética de esta familia de proteínas. Al inicio se consideró que el antígeno permitía al organismo producir una molécula complementaria, y que servía como molde sobre el cual se formaba la cadena polipeptídica del anticuerpo. La diversidad de las regiones variables se origina en un grupo pequeño de genes que se diversifican por medio de mutaciones y recombinaciones, ocurridas durante el desarrollo del sistema inmune.

La gran diversidad de los sitios de unión al antígeno (cifrada en el orden de magnitud de  $10^9$ ) ha sido estudiada con detalles en las últimas décadas del siglo pasado. Los segmentos variables y constantes de cada molécula de inmunoglobulina son producidos por genes distintos, que están separados en la línea germinal y que deben combinarse en algún momento dentro del proceso de síntesis para formar una sola cadena polipeptídica. Esta combinación podría ocurrir en el ADN, el ARN o en los ribosomas. Los experimentos realizados hasta el presente parecen sugerir que esto ocurre en el ARN. La aproximación de los genes que deben controlar la síntesis de las regiones variables con los que van a generar la parte constante, se logra por un proceso de escisión-inserción: el gen V es extraído del cromosoma y reinsertado cerca del gen C.

Es necesario recordar que la molécula de anticuerpo es un complejo de 2 cadenas ligeras y 2 pesadas iguales. Un linfocito sintetiza la inmunoglobulina por transcripción del ARN, que lleva el código para la cadena ligera, y otro gen que transcribe el ARN, que

lleva el código para la cadena pesada. La unión de las cadenas ligeras con las diferentes clases de cadenas pesadas ya está generando diversidad, por cuanto pueden existir anticuerpos IgG, IgA, IgM, IgD e IgE que reaccionan con el mismo antígeno, por tener los mismos fragmentos variables, tanto los de las cadenas ligeras, como los de las pesadas, pero que, al tener una clase de cadena pesada diferente, poseen una función fisiológica distinta, propia de cada clase de anticuerpo.

Las inmunoglobulinas de la especie humana están codificadas por 3 complejos o grupos génicos: el grupo de genes IGK, localizado en el cromosoma 2, es el correspondiente a las cadenas ligeras  $\kappa$ ; el grupo IGL, localizado en el cromosoma 22, es el de las cadenas  $\lambda$ ; y el grupo IGH, localizado en el cromosoma 14, que es el que codifica para las cadenas pesadas. Dentro del grupo de genes IGH existen 4 tipos de segmentos génicos: los V (variables), los D (de diversidad), los J (de unión) y los C (constantes). Los grupos IGK e IGL carecen de segmentos D. Todos estos segmentos tienen múltiples genes; por ejemplo, en el grupo génico IGH existen cerca de 50 segmentos génicos V funcionales. La extraordinaria diversidad en las moléculas de reconocimiento del sistema inmune se debe a un proceso de recombinación de características únicas, mediante el cual se cortan, se empalman y se modifican los genes de las regiones variables.

La construcción de la región variable implica la recombinación de los segmentos génicos V, D y J. El proceso de recombinación une un segmento génico de cada tipo (por ejemplo, VDJC en el caso de la cadena pesada de la inmunoglobulina) para formar una unidad codificante lineal en cada cadena de la molécula de anticuerpo. Cada linfocito utiliza una combinación diferente de estos segmentos génicos para formar un código genético de sus receptores antigénicos. El proceso de recombinación está sujeto a inexactitudes del empalme, lo que provoca ligeras variaciones en los nucleótidos en las uniones VDJ. Además, la enzima desoxirribonucleotidiltransferasa terminal (TDT) puede insertar nucleótidos adicionales alrededor de las uniones VDJ, antes de que estas hayan sido enlazadas. Tanto los errores del empalme, como los nucleótidos añadidos, aumentan la diversidad y proporcionan a cada clon de células B un receptor molecular exclusivo.

Una serie de nucleasas y ligasas se encargan de cortar y pegar los segmentos génicos. Defectos en los genes activadores de la recombinación RAG-1 y RAG-2, que codifican para 2 de las enzimas que median la recombinación de los genes de la región variable, son



los responsables de una forma de inmunodeficiencia combinada severa. Los pacientes afectados no pueden producir linfocitos funcionales que expresen receptores antigénicos.

La figura 5.4 sintetiza el origen de la enorme diversidad de las especificidades de las moléculas de inmunoglobulina, que son también los receptores antigénicos de las células B. La reorganización del genoma para permitir la producción de inmunoglobulinas es un proceso que ocurre de manera paulatina durante la maduración de los linfocitos B. Los procesos de reordenamiento génico son más intensos durante las fases más tempranas del desarrollo de los linfocitos B. Primero, las células pro-B maduran en células pre-B, etapa en la que expresan los genes que activan los eventos de recombinación, que son los genes RAG-1 y RAG-2. Las recombinasas codificadas por estos genes median el ordenamiento al azar de uno de los 25 segmentos de genes de diversidad (D), próximos a un segmento de gen de los 6 de unión (J). Esto es seguido por el reordenamiento de uno de los 50 segmentos de genes variables (V) próximos al ya reordenado segmento DJ. Las diferentes células B reordenarán diferentes segmentos, y crearán un nivel de diversidad. Una mayor diversidad es proporcionada por las inexactitudes del proceso de empalme de los segmentos génicos y por la adición de nucleótidos por la TDT (mencionados antes). El transcripto de ARN primario para la cadena pesada de la inmunoglobulina es procesado en ARN mensajero (ARNm), con el empalme del segmento VDJ próximo al gen de la región constante (C), que es el gen de la cadena  $\mu$  (C $\mu$ ). Este ARNm codifica para la cadena pesada que se expresa en la superficie de las células pre-B, de conjunto con la cadena ligera sustituta, no codificada por genes que no son sometidos a procesos de reordenamiento. Cuando la célula pre-B sigue madurando, se reordenan las cadenas ligeras verdaderas, que sustituyen la cadena ligera sustituta, y producen un receptor antigénico maduro en la superficie de la célula B. Como el segmento constante que se utiliza primero es el de la cadena  $\mu$ , este anticuerpo será una IgM, lo que se acompaña de la síntesis de la IgD de la misma especificidad antigénica, producto del empalme alternativo del mismo segmento VDJ con el gen C $\delta$ , proceso que se denomina cambio o conmutación de clase. Entonces, la expresión de los genes RAG-1 y RAG-2 es “desconectada”. Después de encontrar el antígeno que estimule de manera adecuada estos receptores de membrana, y en presencia de las señales coestimuladoras, las células B se dife-

rencian en células plasmáticas, que secretan grandes cantidades de anticuerpos. En dependencia del cambio de clase, estos anticuerpos pueden ser IgM, IgG, IgA o IgE. En estos momentos entra en juego otra fuente de diversidad de los anticuerpos, que es la hipermutación somática de los genes variables. Las mutaciones en las cuales se cambia, en el ADN, un nucleótido por otro, ocurren solo una vez en  $10^8$  o  $10^9$ , pero en el transcurso de la respuesta inmune, en los linfocitos B, estas mutaciones se incrementan en 100 000 veces. En resumen, las opciones combinatorias de los segmentos V, D y J entre sí, y de los dominios variables de las cadenas ligeras con los de las pesadas (ya que entre ambas se forma un sitio de combinación), así como las inserciones y deleciones que se producen en los puntos de unión correspondientes, junto con las mutaciones somáticas sobrevenidas en el curso de la respuesta inmune, explican la singular diversidad de las inmunoglobulinas a partir de un material genómico tan poco extenso.

## **METABOLISMO Y DISTRIBUCIÓN DE LAS INMUNOGLOBULINAS**

En individuos adultos normales, los niveles que alcanzan en el suero las diferentes clases de inmunoglobulinas son los siguientes: de 800 a 1 400 mg/dL para la IgG, de 100 a 300 mg/dL para la IgA, de 80 a 250 mg/dL para la IgM, de 2 a 5 mg/dL para la IgD, y de 0,02 a 0,05 mg/dL para la IgE. Esta desigualdad corresponde a diferencias en el metabolismo y la distribución de cada una de las clases de inmunoglobulinas. Del total de IgG presente en el organismo, aproximadamente la mitad se encuentra en el compartimiento intravascular y la otra mitad en espacios extravasculares. La IgM, por el contrario, muestra una localización de predominio intravascular (más del 80 %). La IgA constituye la clase de inmunoglobulina más abundante en las secreciones externas, por lo que es la más abundante en la saliva, las lágrimas, la leche materna y en las secreciones nasales, faríngeas, bronquiales, digestivas (incluyendo la bilis), genitourinarias, etc. El traslado de la IgA desde el medio interno hasta la superficie libre de las mucosas se hace por un mecanismo activo. Este comprende la unión de la IgA dimerica a un receptor de la superficie laterobasal de las células epiteliales, selectivo para las inmunoglobulinas polimerizadas; así como el transporte del complejo receptor-IgA a través del citoplasma epitelial (transcitosis) y su exocitosis en la superficie externa, en

la que la molécula del receptor es escindida de manera enzimática, y queda su porción extracelular (el componente S) unida al dímero de IgA. La presencia del componente S confiere a la IgA secretoria una mayor resistencia frente a la digestión enzimática. De esta forma puede desempeñar su función como anticuerpo en un ambiente hostil, rico en enzimas proteolíticas, propio de las secreciones.

Existen diferencias respecto a las tasas metabólicas de las inmunoglobulinas. La vida media es de 21 días para la IgG (excepto la IgG3) y de 7 días o menos para las restantes clases y para la IgG3. Teniendo en cuenta la distribución en el cuerpo, la vida media y los niveles plasmáticos, resulta una tasa de síntesis alta (de 30 a 40 mg/kg/día) para la IgG y la IgA, media (alrededor de 7 mg/kg/día) para la IgM, y baja (menos de 1 mg/kg/día) para la IgD y la IgE. En conjunto, en un adulto de peso medio, la síntesis diaria de inmunoglobulinas sobrepasa los 5 g de proteína, lo que supone un esfuerzo importante dentro de los requerimientos nutricionales del individuo.

La producción de anticuerpos se frena una vez que se ha logrado el nivel necesario. El control de la producción de anticuerpos está regulado por medio de los receptores Fc presentes en los linfocitos B, que cuando se saturan con moléculas de inmunoglobulinas, dan señales inhibitorias que impiden la diferenciación hacia células plasmáticas.

## **NIVELES DE INMUNOGLOBULINAS EN EL DESARROLLO DEL INDIVIDUO**

Las membranas y la placenta protegen al embrión y al feto, y lo colocan en un medio casi aséptico, libre del contacto con gérmenes y proteínas extrañas. Por esta razón, el feto no recibe estímulos y apenas produce anticuerpos durante la vida intrauterina. De todas las clases de inmunoglobulinas, la IgM es la primera en sintetizarse a lo largo del desarrollo ontogénico del sistema inmune. El recién nacido a término tiene en su suero una concentración muy baja de IgM (no supera el 10 % de los niveles normales del adulto), producida por el sistema inmune del feto. Niveles elevados de IgM en la sangre del cordón umbilical, deben hacer pensar (si el embarazo no ha durado más de 40 semanas) en la posibilidad de una infección intrauterina que haya estimulado la maduración precoz del sistema inmune fetal en lo que se refiere a la producción de anticuerpos.

A pesar de que el feto casi no sintetiza inmunoglobulinas, existe en la circulación del recién nacido una concentración de IgG comparable a la de los adultos normales. Por lo general, el nivel de IgG es de 10 a 15 % más alto en la sangre del cordón umbilical que en la circulación de la madre. Esto se debe a que, por lo general, durante el último trimestre del embarazo pasan desde la circulación materna a la fetal, por un transporte activo de transcistosis, grandes cantidades de IgG que protegerán al niño de las infecciones durante los primeros meses de vida. El transporte de inmunoglobulinas a través de la placenta atañe a las 4 subclases de IgG, pero no a los restantes isotipos de inmunoglobulinas. El paso de la IgG es activo, gracias a los receptores presentes en los trofoblastos, los cuales captan las moléculas de inmunoglobulina de la circulación materna, las introducen en su citoplasma y luego las “excretan” a la circulación fetal. Cuando el nivel de la IgG en la sangre de la madre es muy alto, el mecanismo de transporte placentario puede quedar saturado y dificultar la ulterior transferencia de anticuerpos de la circulación materna a la fetal.

La IgG recibida de forma pasiva de la madre es catabolizada en el recién nacido según la tasa habitual: cada 3 semanas la cantidad restante se reduce a la mitad, de manera que al cabo de los primeros 6 meses de vida extrauterina, no queda casi nada de la IgG de origen materno. Por otra parte, poco tiempo después del nacimiento, cuando el niño queda sometido a una importante estimulación por antígenos de diversas procedencias (el ambiente, los alimentos, la flora microbiana que se va implantando en las cavidades y superficies de su cuerpo, etc.), se activa la producción de todas las clases de inmunoglobulinas, incluida la IgG. El nivel de IgG en un momento dado después del nacimiento, es la suma de la IgG que queda, de la recibida por vía placentaria, más la IgG producida por la propia síntesis: hay una disminución importante entre los 3 y los 6 meses de vida extrauterina, seguida por una recuperación gradual, hasta alcanzar, en los meses y años siguientes, los niveles del adulto. Este “bache” en los niveles de inmunoglobulinas constituye la hipogammaglobulinemia transitoria fisiológica del recién nacido.

Además del paso placentario de anticuerpos IgG, que le proporciona al recién nacido una importante inmunización pasiva y lo protege durante el tiempo que tardan en madurar sus propios mecanismos inmunitarios, también hay un mecanismo pasivo de protección de las mucosas, en especial, la del tubo digestivo, que se lleva a cabo mediante la lactancia

materna. El calostro tiene una concentración de IgA más alta que cualquier otro líquido del cuerpo humano. La leche, sin alcanzar niveles tan elevados, contiene una cantidad muy importante de IgA secretoria. De esta forma, mediante la lactancia natural llega al intestino del recién nacido una cantidad importante (aproximadamente 0,5 g de IgA secretoria al día) de la clase de inmunoglobulina que necesita para su defensa y que todavía él no es capaz de sintetizar. Esta defensa local es tanto más importante cuanto que con la alimentación comienza la penetración de microorganismos en el tubo digestivo, algunos de los cuales van a establecerse de manera persistente en él para formar parte de la flora microbiana normal. Los anticuerpos recibidos con la leche materna, que no pasan a la circulación, sino que actúan de forma local como “barniz” protector de la mucosa, desempeñan un papel muy importante en la selección de los microorganismos más adecuados. El papel protector de la lactancia natural no puede ser sustituido por ninguna fórmula artificial, ya que la composición de la leche procedente de otras especies animales es diferente y la transmisión de la inmunidad de la madre al feto se hace de manera distinta.

## TECNOLOGÍA INMUNOLÓGICA

La extraordinaria especificidad de la molécula de anticuerpo ha sido explotada en muchas áreas de la biomedicina. La utilización de la tecnología del hibridoma ha permitido la producción de distintos anticuerpos monoclonales de utilidad clínica, como es el anticuerpo monoclonal de los muridos anti-CD3, utilizado para prevenir y tratar la reacción de rechazo del órgano trasplantado. En ocasiones resulta más ventajoso emplear fragmentos de anticuerpo, como los Fab, o los bivalentes  $F(ab')_2$ , producidos por digestión proteolítica, o fragmentos variables de cadenas únicas (scFv, del inglés: *single-chain variable fragments*) generados por la tecnología del ADN recombinante. Estos fragmentos pueden resultar muy útiles si se persigue penetrar en un tumor. En general, los anticuerpos monoclonales se obtienen en roedores y, por eso, son reconocidos como extraños por el sistema inmune del hombre, lo que compromete mucho su eficacia terapéutica. Sin embargo, con la utilización de la tecnología del ADN recombinante, estos anticuerpos pueden ser “humanizados” al sustituir una gran parte de las secuencias

aminoácidas de los roedores con secuencias humanas. En este caso, se dejan solo los aminoácidos de origen roedor que entran en contacto con el antígeno.

La tecnología del ADN recombinante también permite crear una “biblioteca” de millones de bacteriófagos, que llevan, cada uno, un anticuerpo de especificidad única y diferente de los demás en su superficie, y que contienen, además, los genes para ese anticuerpo. Cuando el contenido de esa “biblioteca” se vierte en placas plásticas recubiertas de antígeno, los fagos que portan el anticuerpo relevante se unirán al antígeno, y los que no se unen, son eliminados en los lavados. Esta técnica permite que los anticuerpos de la especificidad deseada puedan seleccionarse de la “biblioteca”, y que los genes que codifican para sus regiones variables puedan utilizarse con el objetivo de producir grandes cantidades de anticuerpos recombinantes de casi cualquier especificidad (la que se desee). El empleo de “bibliotecas” de fagos, construidas a partir de los apareamientos al azar de los genes de las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas humanas, permite hacer la selección directa de anticuerpos para usos terapéuticos, como, por ejemplo, frente a antígenos tumorales y antígenos propios, como el CD4. Esas especificidades difícilmente pudieran lograrse de otro modo, producto de la selección clonal de los linfocitos con reactividades propias. Si fuera necesario, se pudieran realizar sustituciones individuales de aminoácidos en el sitio de combinación con el antígeno para aumentar la afinidad del anticuerpo.

Los anticuerpos pueden marcarse con enzimas, fluorocromos o isótopos, lo que permite utilizarlos en un amplio rango de aplicaciones clínicas, como inmunoensayos, fenotipaje diagnóstico, histoquímica, imagenología *in vivo*, e inmunoterapia. Si el blanco es la propia molécula de anticuerpo (por ejemplo, en las determinaciones de los autoanticuerpos presentes en las enfermedades autoinmunes), se necesita marcar entonces las antiinmunoglobulinas (anticuerpos secundarios). En las aplicaciones terapéuticas frente a células tumorales o células autorreactivas, los anticuerpos pueden conjugarse con moléculas citotóxicas para producir inmunotoxinas. Se ha añadido una dimensión adicional mediante el enlace de 2 anticuerpos diferentes, o fragmentos de anticuerpos, para producir anticuerpos biespecíficos inmunoterapéuticos. Sin

duda, estos enfoques han enriquecido el arsenal terapéutico, diagnóstico e investigativo de los clínicos y de los inmunólogos.

## **BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA**

- Burton DR. Immunoglobulin, functions. En: Delves PJ, Roitt IM (eds.). *Encyclopedia of immunology*. 2<sup>da</sup>. ed. Vol 3. London: Academic Press, 1998, p. 1315-9.
- Delves PJ, Roitt IM. The immune system. *N Engl J Med* 2000; 343: 37-49.
- Goding JW. *Monoclonal antibodies: principles and practice: production and application of monoclonal antibodies in cell biology, biochemistry and immunology*. 3<sup>ra</sup> ed. San Diego, Calif.: Academic Press, 1996.
- Ortiz Maslloréns F. *Iniciación a la Inmunología*. Madrid: Fundación Jiménez Díaz, 1997.
- Powers DB, Marks JD. Monovalent phage display of Fab and scFV fusions. En: Chamow SM, Ashkenazi A, (eds.). *Antibody fusion proteins*. New York: Wiley-Liss; 1999, p.151-88van de Winkel J G, Bast B, de Gast G C. Immunotherapeutic potential of biespecific antibodies. *Immunol Today* 1997;18:562-4.
- Raghavan M, Bjorkman PJ. Fc receptors and their interactions with immunoglobulins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996;12:181-220.
- Roitt IM, Brostoff J, Male DK. *Immunology*. 3<sup>ra</sup>. ed. St. Louis: Mosby, 1993.
- Rojas MW. *Inmunología*. Medellín: Corporación Para Investigaciones Biológicas, 1999.
- Schatz DG, Oettinger MA, Schlissel MSV (D) *J recombination: molecular biology and regulation*. *Ann Rev Immunol* 1992;10:359-83.

## **CONTENIDO**

---

**Introducción/ 415**

**Genes del complejo mayor de histocompatibilidad/ 415**

**Moléculas clase I y clase II/ 415**

Estructura de la grieta/ 417

**Procesamiento antigénico y presentación por las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad/ 418**

Vía endógena/clase I/ 418

Vía exógena/clase II/ 420

Reciclaje de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad II desde la membrana/ 421

**Variantes en el procesamiento y presentación de antígenos/ 421**

Péptidos endógenos/clase II/ 421

Péptidos exógenos/clase I/ 422

**Citotoxicidad del complejo mayor de histocompatibilidad no restringida.  
Moléculas CD1/ 422**

**Bibliografía recomendada/ 423**

### Capítulo 35



## PROCESAMIENTO Y PRESENTACIÓN DEL ANTÍGENO. MOLÉCULAS DEL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD

Dr. Jesús Gómez Arbesú

### RESUMEN

Este capítulo trata acerca de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA), con un enfoque sobre su papel biológico. Estas moléculas son glicoproteínas muy polimórficas, codificadas en el brazo corto del cromosoma 6 y, tanto estas moléculas como sus genes correspondientes, se clasifican en clase I y clase II. Esta división es presentada para el estudio de las características del procesamiento y la presentación de antígenos por ambas variantes de las moléculas MHC: endógenas (clase I) y exógenas (clase II).

### INTRODUCCIÓN

Desde su descubrimiento en la década del 50 del siglo xx, el conocimiento sobre las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA, *human leucocyte antigen*) ha progresado de forma notable. El enfoque sobre su papel biológico ha transitado desde su papel central en la aceptación o rechazo de los órganos trasplantados y la restricción MHC de la citotoxicidad de las células T, hasta el conocimiento actual de su función como moléculas presentadoras de antígeno (MHC es la sigla en inglés del complejo mayor de histocompatibilidad que puede aparecer también como CMH.)

Las moléculas HLA son glicoproteínas polimórficas, codificadas en el brazo corto del cromosoma 6. Estas moléculas y sus genes correspondientes se clasifican en clase I y clase II (los genes clase III codifican para algunos componentes del sistema complemento con otra estructura y función y, por tanto, no son verdaderos antígenos del sistema).

### GENES DEL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD

El complejo genético HLA tiene un tamaño aproximado de  $3,5 \times 10^6$  pares de bases. La región clase I

contiene 3 *loci* que codifica para las moléculas HLA-A, HLA-B y HLA-C, y otros genes “no clásicos” con funciones especiales, tales como: el HLA-E, HLA-F y HLA-G. En la región clase II se pueden localizar tres subregiones que incluyen genes y pseudogenes en los que están codificadas las moléculas HLA-DR, HLA-DP y HLA-DQ, más otras subregiones que codifican para otras moléculas “no clásicas” que participan en el procesamiento antigénico (figura 5.5).

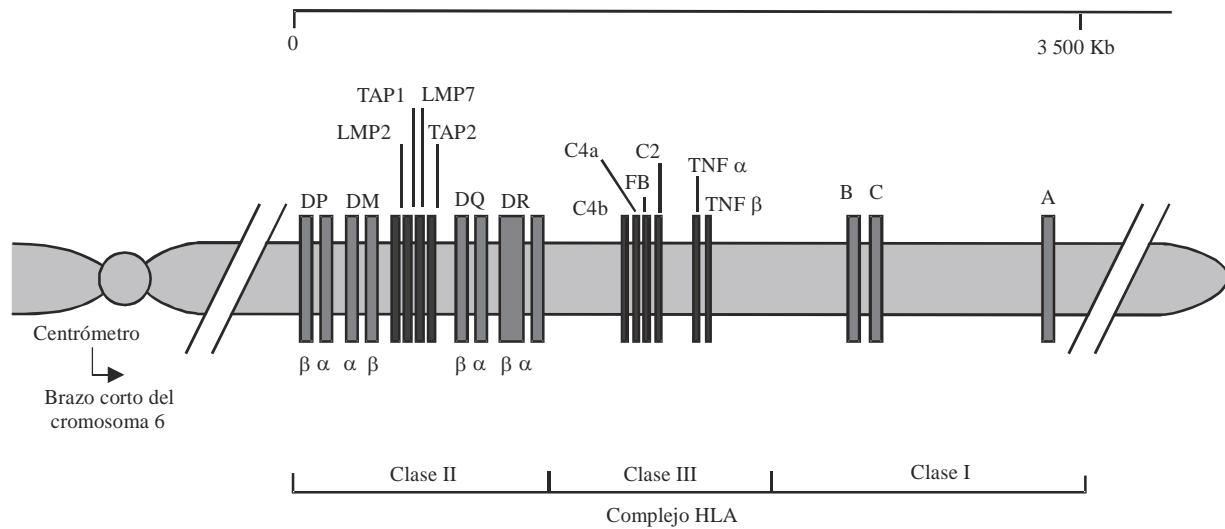
Cada persona hereda dos cromosomas 6 y, por tanto, posee dos juegos de alelos, a cada juego o combinación de alelos se le denomina haplotipo, uno es de origen paterno y el otro materno. Sus descendientes heredarán en el 98 % de los casos uno u otro, y solo en el 2 % de los casos ocurrirá un fenómeno denominado recombinación (o *crossing over*), es decir, una combinación entre fragmentos de ambos haplotipos, que origina una nueva combinación de *loci*.

### MOLÉCULAS CLASE I Y CLASE II

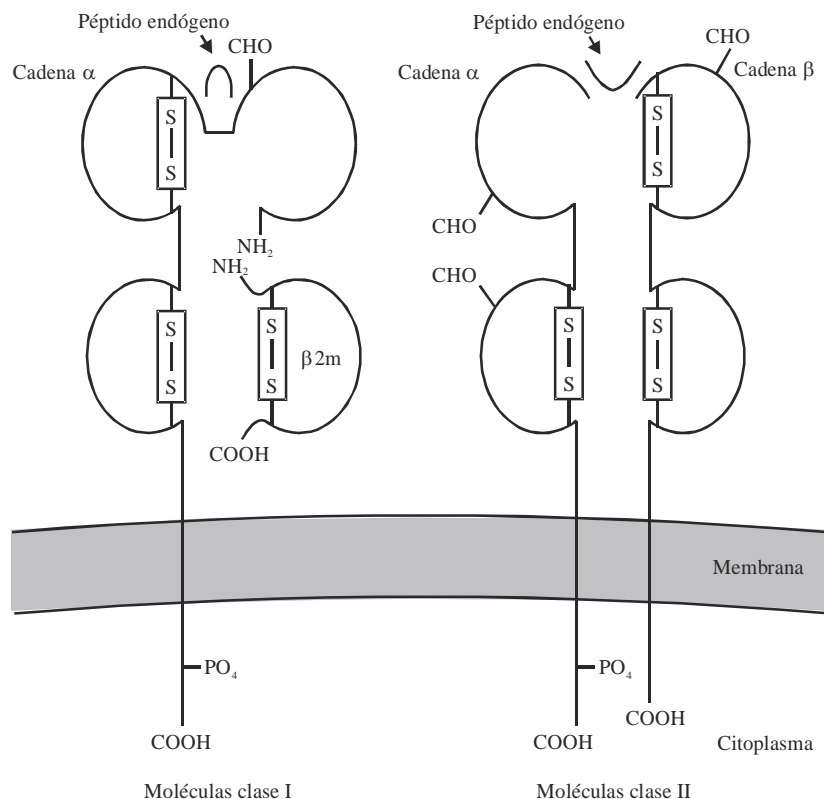
Las moléculas clase I y clase II se diferencian en cuanto a estructura, localización y función. Las clases I (A, B y C) están integradas por una cadena pesada (PM 43 000) anclada en la membrana, con una región intracelular, otra transmembranosa y 3 dominios

extracelulares ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ ), y la  $\beta 2$  microglobulina ( $\beta 2m$ ) (PM 12 000) con un solo dominio extracelular, no anclada a la membrana y unida a la cadena por fuerzas no covalentes. El polimorfismo de la molécula se halla en los dos dominios más extracelulares y amino-terminales de la cadena  $\alpha$  ( $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ ), y la  $\alpha 2m$  es monomórfica. La cadena  $\alpha$  es codificada

en la región clase I del complejo genético HLA, mientras que la  $\beta 2m$  es codificada en el cromosoma 15. Las moléculas MHC-I se distribuyen en todas las células del organismo, excepto en el trofoblasto. Su función es presentar péptidos procedentes del procesamiento interno, en el citosol, a los linfocitos T citotóxicos CD8+ (figura 5.6).



**Figura 5.5** Organización del complejo genético HLA.



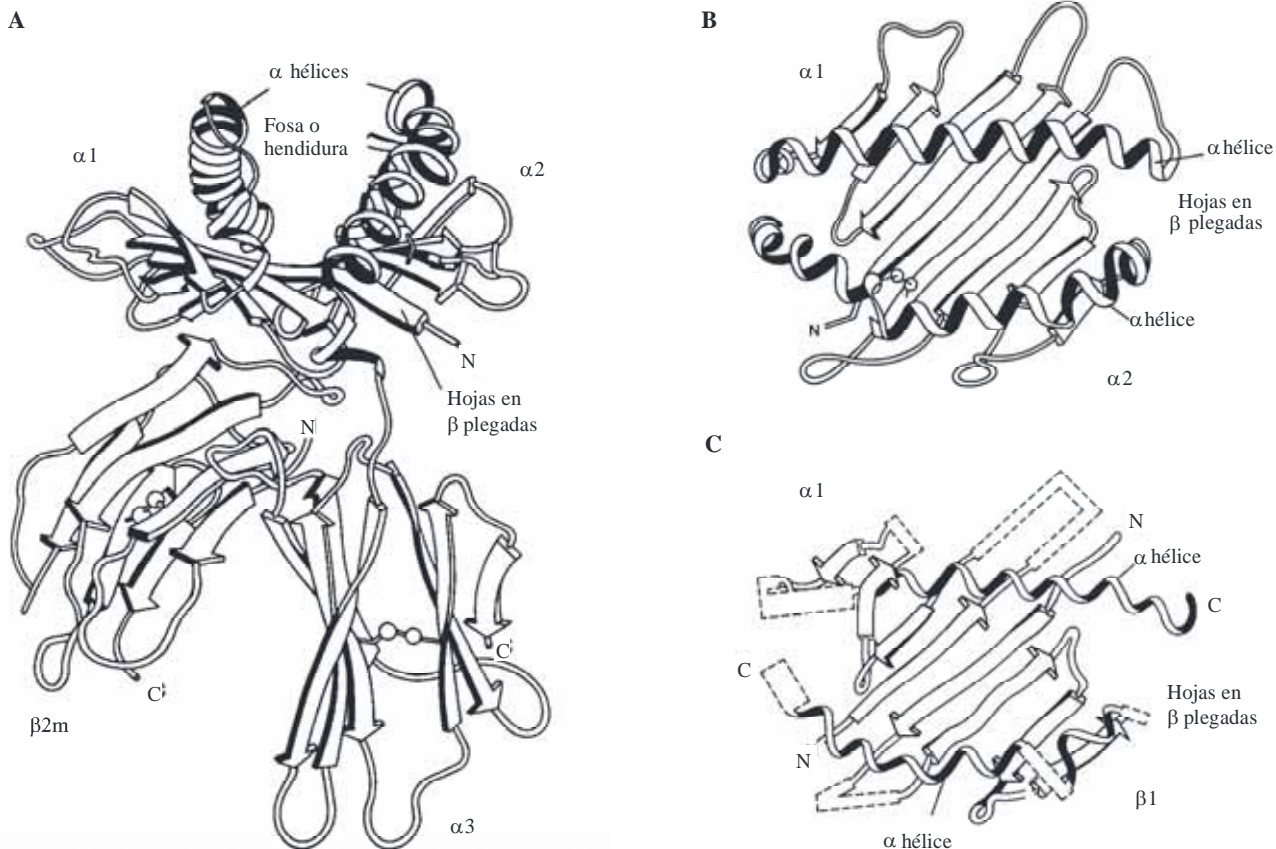
**Figura 5.6** Representación esquemática de las moléculas HLA.

De forma diferente, las moléculas clase II (DR, DP y DQ) están formadas por 2 cadenas ( $\alpha$  y  $\beta$ ) con poca diferencia en cuanto a peso molecular (34 000 y 29 000, respectivamente), ambas ancladas en la membrana y con regiones intracelulares, transmembranas y dos dominios extracelulares ( $\alpha 1$  y  $\beta 1$ ). El polimorfismo de la molécula se encuentra en el dominio más extracelular y amino-terminal de cada cadena polipeptídica ( $\alpha 1$  y  $\beta 1$ ). (El DR $\alpha 1$  tiene un polimorfismo muy limitado, no detectable por serología.) Ambas cadenas ( $\alpha$  y  $\beta$ ) son codificadas en subregiones MHC-II. La distribución de las moléculas MHC-II es mucho más restringida y se localiza solo en algunos tipos celulares, denominados células presentadoras de antígenos como monocitos, otros macrófagos, células dendríticas, linfocitos B, entre otras. Su función es, de manera resumida, presentar péptidos procesados por endocitosis por las células presentadoras a los linfocitos T CD4+.

## ESTRUCTURA DE LA GRIETA

No fue hasta finales de la década de los 80 del siglo XX que se logró la cristalización del antígeno A2 clase I. Sale a la luz por primera vez la estructura tridimensional de una molécula HLA y, a partir de esta, se deduce el modelo de la estructura tridimensional para los antígenos clase II, que más tarde se ha podido comprobar (figura 5.7).

De inmediato llama la atención la estructura que integran los dominios más externos de la cadena  $\alpha$ :  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ , caracterizada por una fosa o grieta, “diseñada” como alojamiento. La grieta está integrada por un fondo formado por 8 estructuras antiparalelas  $\beta$  plegables y bordeada por 2  $\alpha$  hélices. Existen cavidades en el piso de la grieta denominadas *pockets* o bolsillos que se designan con letras del alfabeto latino (en la molécula A2 están definidos de la A a la F). La grieta está cerrada por ambos flancos y aloja habitualmente



**Figura 5.7** Estructura diagramática de las moléculas HLA. **A:** vista lateral de una molécula HLA clase I. **B:** vista superior de la fosa o hendidura: sitio de fijación del péptido de una molécula HLA clase I. **C:** vista superior de la fosa o hendidura: sitio de fijación del péptido de una molécula HLA clase II. Nótese que el sitio de fijación del péptido es similar en ambas vistas, con la excepción de que en la clase II está formado por los dominios  $\alpha 1$  y  $\beta 1$ , y se encuentra más abierto en ambos flancos para alojar péptidos mayores.



péptidos de 8 a 11 aminoácidos. Aunque los nonapéptidos muestran mayor afinidad, los péptidos mayores son capaces de unirse a las moléculas MHC-I.

Las moléculas clase II forman también una estructura integrada, en este caso, por los dominios más externos de ambas cadenas ( $\alpha 1$  y  $\beta 1$ ) con una fosa o grieta que difiere muy poco de la correspondiente a las clase I: está abierta en sus flancos y puede alojar a péptidos mayores (tamaño promedio: 14 aminoácidos).

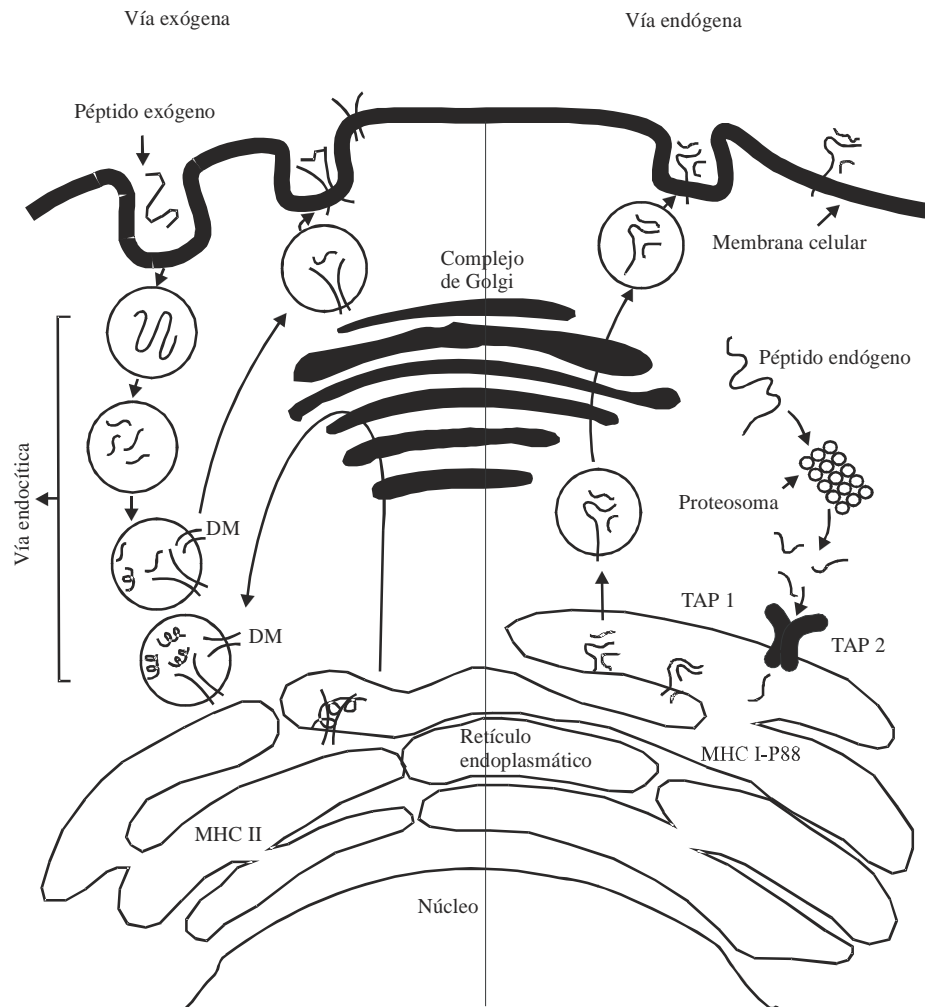
Los péptidos quedan atados a la grieta mediante puentes de hidrógeno, muchos de los cuales están conservados entre las diferentes estructuras. Esta unión es completada mediante fuerzas de van der Waals. En las uniones péptido-MHC son relevantes las interacciones que se establecen entre los residuos aminoacídicos del péptido y aquellos situados en los *pockets*; mientras que los otros residuos cobran más importancia en las interacciones péptido-TCR.

## PROCESAMIENTO ANTIGÉNICO Y PRESENTACIÓN POR LAS MOLÉCULAS DEL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD

En la figura 5.8 se aprecian las vías endógena y exógena de procesamiento antigénico que serán estudiadas a continuación.

### VÍA ENDÓGENA/CLASE I

Las moléculas clase I se caracterizan por presentar péptidos generados en el citosol. Un complejo de proteasas (proteosoma) digiere las proteínas citosólicas (muchas veces precedido y facilitado por un proceso de marcaje y reconocimiento inicial, mediado por la ubiquitina) y genera una variedad de péptidos que son



**Figura 5.8** Vía exógena y endógena de procesamiento antigénico.

seleccionados y trasladados hacia el retículo endoplasmático por 2 proteínas transportadoras: TAP1 y TAP2. Dos subunidades importantes (LMP2 y LMP7) inducidas por el IFN gamma, se adicionan al complejo de proteasas. Al igual que los transportadores, son polimórficas y se codifican en la región clase II del MHC. Al parecer, se ha aprovechado la maquinaria metabólica (antigua desde el punto de vista filogenético) que utiliza la célula para el recambio de proteínas internas, para generar péptidos endógenos que, al ser presentados en membrana por las moléculas MHC-I, permite al sistema inmune “visualizar” el medio interno de la célula.

Por su parte, en el interior del retículo endoplasmático son sintetizadas las cadenas  $\alpha$  y las  $\beta_2m$ . La cadena  $\alpha$  se une de inmediato a una molécula “chaperona”, la calnexina (p88). La  $\beta_2m$  se asocia entonces con la cadena  $\alpha$  ya unida a la p88. Otras 2 moléculas están involucradas en la vía como “chaperonas”: la calreticulina y la tapasina. La calreticulina se asocia a la molécula MHC-I y la conduce a la degradación si no existen péptidos disponibles o que interactúen con el complejo TAP + tapasina, donde carga el péptido (introducido al retículo endoplasmático procedente del citosol por los TAP), y se libera entonces la calreticulina en el retículo endoplasmático. Una vez ensamblado el complejo  $\lambda$ - $\beta_2m$ -péptido, las moléculas son liberadas del sistema de retención retículo endoplasmático/Golgi, y marcha del trans-Golgi por vía secretoria a la superficie celular. Las moléculas MHC-I cargadas con el péptido en membrana lo presentan al TCR del linfocito T-CD8, el cual reconoce tanto al péptido como a las porciones polimórficas de la molécula MHC-I; mientras que las moléculas CD8 reconocen porciones monomórficas, el linfocito T-CD8 se estimula, y se produce una expansión clonal y una citotoxicidad específica, tanto para el péptido como para la molécula MHC-I.

Se ha investigado mucho acerca de por qué es tan preferencial la talla de 9 aminoácidos del péptido presentado por las moléculas MHC-I. AL principio se planteó que la propia estructura de la grieta cerrada por los flancos determinaba el tamaño del péptido. Al conocerse el requerimiento del complejo de proteasas y de los péptidos transportadores para la presentación, se consideró la posibilidad de que estos contribuyeran a determinar la talla. Se pensó que el proteosoma pudiera generar péptidos de un tamaño predominante (al

estilo de un rebanador de pan). En la actualidad se conoce que los TAP transportan, de modo preferencial, los nonapéptidos. Además de la talla, existen residuos *motifs* en los péptidos que determinan una mejor unión con los transportadores: las primeras posiciones amino-terminales y el residuo carboxilo-terminal juegan un papel fundamental para una mejor asociación con los transportadores.

Las preferencias de los transportadores son por lo general compatibles con la mayoría de los alelos clase I (aunque representan un obstáculo para el grupo del HLA-B7). Se ha sugerido que el proteosoma, los TAP y las moléculas MHC-I están coadaptados para la generación, transporte y unión de péptidos específicos. La especificidad TAP sobre el extremo carboxilo-terminal del péptido correlaciona con las preferencias entre las moléculas MHC-I por los extremos carboxilo-terminales de los diferentes péptidos. Por otra parte, se ha descrito un nuevo agrupamiento de los alelos HLA-A y HLA-B en 4 mayores supertipos definidos por sus especificidades de unión a los péptidos; por lo que, teniendo en cuenta el gran polimorfismo MHC-I, no debe suponerse la existencia de una gran variedad de especificidades de unión con los péptidos.

Las moléculas MHC-I solo son liberadas hacia la membrana cuando se encuentran ocupadas con un péptido. Sin embargo, se han encontrado moléculas “vacías” en membrana, así como cadenas  $\alpha$  no asociadas con la  $\beta_2m$ . Una hipótesis podría ser que algunas moléculas pudieran ser enviadas a la membrana celular sin necesidad del péptido; pero mucho más probable es que aquellas moléculas cargadas con péptidos de baja afinidad, cuando llegan a la membrana disocien el péptido y queden vacías. En estas condiciones, la unión con la  $\beta_2m$  se debilita y puede quedar solo la cadena  $\alpha$ . El dímero  $\alpha$ - $\beta_2m$  sería entonces capaz de unir péptidos del fluido extracelular. Esta unión sería un contrasentido, puesto que las células no infestadas, al presentar en las MHC-I péptidos extracelulares, quedarían a merced de la citotoxicidad de los linfocitos T-CD8+. Sin embargo, la unión de péptidos extracelulares es muy poco probable por varias razones: hay muy pocos péptidos del tamaño requerido en el fluido extracelular, las moléculas desocupadas son muy inestables y pierden la  $\beta_2m$  muy rápido y, por tanto, la estructura tridimensional, que les permite unir péptidos. Las cadenas  $\alpha$  pueden reasociarse de nuevo con la  $\beta_2m$  y unir péptidos del medio,

pero si no lo logran muy rápido, son degradadas. De esta forma se evitan muertes celulares innecesarias.

## VÍA EXÓGENA/CLASE II

Por su parte, las moléculas MHC-II se encargan de presentar péptidos generados en el compartimiento endocítico/lisosomal. Los antígenos extracelulares particulados o no, son internalizados por cualquier variante de endocitosis: fagocitosis o pinocitosis, y son digeridos por enzimas. Esto genera una variedad de péptidos que, en algún lugar de la vía endocítica, compiten entre sí por la unión con las moléculas MHC-II que, una vez cargadas de péptidos, pueden ser trasladadas hacia la membrana.

Inmediatamente después de sintetizadas en el retículo endoplasmático, las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de las moléculas MHC-II se unen a una glicoproteína tipo II (su extremo amino-terminal es su cola citosólica): la cadena invariante (Ii), y se forma un heterotrímero ( $\alpha$ - $\beta$ -Ii). Tres cadenas invariantes se agrupan en un homotrímero y se forma como un andamio alrededor del cual están unidos 3 dímeros  $\alpha$ - $\beta$ . De esta forma, las moléculas MHC-II son transportadas desde el retículo endoplasmático al trans-Golgi y, de ahí, hacia la ruta endocítica.

La cadena Ii es codificada en un gen no polimórfico, localizado en el cromosoma 5 en el ser humano y en el 18 en el ratón. Sin embargo, a pesar de estar codificada en un cromosoma diferente, la expresión de los genes Ii y clase II  $\alpha/\beta$  está regulada de manera coordinada y, al igual que  $\alpha$  y  $\beta$ , está expresada constitutivamente solo en las células presentadoras de antígeno. No es tan invariante como su nombre sugiere, puesto que se han hallado 4 isoformas (p31, p33, p35 y la p41) que están relacionadas con diferencias en el tráfico MHC-II.

Esta cadena Ii tiene papel de “chaperona” y realiza varias funciones:

1. Estabiliza el complejo  $\alpha$ - $\beta$  hasta su unión con el péptido.
2. Como su unión es mutuamente exclusiva de la unión del péptido, previene su adquisición prematura en el retículo endoplasmático, por bloqueo de la grieta.
3. Dirige el tráfico de las moléculas MHC-II a Ii-p35, y las desvía a las vesículas endocíticas, ricas en péptidos. Por tanto, incrementa la probabilidad de que sean expuestas a péptidos antigénicos y a

la Ii-p33, y las dirige hacia los endosomas tempranos, directamente del trans-Golgi o después de la internalización desde la membrana celular.

Una vez que el trímero  $\alpha$ - $\beta$ -Ii alcanza los compartimientos endocítico-lisosomales, ocurre la proteólisis de la cadena invariante. Un fragmento de esta, el CLIP (*class II-associated invariant peptide*), permanece aún unido de manera temporal con MHCII- $\alpha/\beta$  y su remoción final es facilitada por las moléculas DM. Las moléculas DM son codificadas en la región HLA-II. Su expresión está regulada junto a las moléculas clase II y a la Ii, por el mismo transactivador, y no se expresan en la membrana celular. Las moléculas DM facilitan el cambio del CLIP por el péptido mediante un mecanismo, al parecer, de naturaleza catalítica. En este mecanismo, cuando las moléculas DM se unen a las moléculas MHC-II, favorecen, de manera transitoria, un estado conformacional “abierto” de la grieta, lo que facilita la eliminación del CLIP y, por tanto, propicia la unión del péptido. Este mismo mecanismo también actuaría en la eliminación de ciertos péptidos ya unidos a la grieta en una unión de baja estabilidad. La unión del DM/MHC-II facilita su liberación y, por tanto, la unión de péptidos de alta estabilidad. Un efecto adicional de esta interacción DM/MHC-II es que facilita la unión de péptidos superiores a 12 aminoácidos, pues favorece la liberación de péptidos menores (entre 7 y 10 aminoácidos). Otro aspecto interesante es que no todas las variantes alélicas MHC-II requieren, en igual medida, de las moléculas DM para la remoción del CLIP; por ejemplo, las moléculas DR1 y DR2 estarán siempre ocupadas por el CLIP, mientras no esté disponible el DM; mientras que las DR3, DR4 y DR11 pueden encontrarse unidas tanto al CLIP como a ciertos péptidos propios en ausencia de DM.

Ha sido muy estudiado el lugar exacto en que se produce el intercambio del CLIP por el péptido en las moléculas clase II. Muchos investigadores han considerado que se trata de un compartimiento especializado (más probable en relación con los endosomas tardíos), rico en DM y moléculas clase II, y que ha sido denominado MIIC (*MHC class II compartment*). Sin embargo, parece claro que estos compartimientos son heterogéneos y no siempre distinguibles de los

endosomas convencionales y los lisosomas. Los compartimientos MIIC, en los que se produce de manera preferencial la carga del péptido, parecen ser diferentes para distintas células presentadoras e incluso para antígenos diferentes.

Después de cargado el péptido, el complejo MHC-II  $\alpha/\beta$  + péptido es dirigido a la membrana por medio de vesículas exocíticas y es presentado al receptor del linfocito T-CD4+, el cual reconoce las secuencias aminoacídicas del péptido y de las porciones polimórficas cercanas a la grieta del MHC-II; mientras que las moléculas CD4 reconocen porciones monomórficas. Las características cualitativas y cuantitativas de las señales recibidas por el linfocito T, determinarán si la unión al receptor resultará en activación o en muerte celular, o en la inducción de la capacidad de no responder, específica del antígeno.

Hay muchos factores que influyen en el tipo de péptido que, por último, se une con las moléculas MHC-II. Entre ellos:

1. La concentración proteica en la célula presentadora de que se trata y el pH en las vesículas endosomales.
2. La organización de los compartimientos endocíticos y sus propiedades funcionales en las diferentes células presentadoras de antígeno.
3. El nivel de moléculas MHC-II y DM disponible en los diferentes compartimientos endocíticos.
4. El modo en que el antígeno llega a la vía endocítica.
5. Endocitosis de fase fluida, internalización por vía de las inmunoglobulinas o receptores Fc, junto con fragmentos de proteínas del sistema complemento (C3 y C4), fagocitosis o autofagia.
6. Antígeno que forma inmunocomplejos.

Las células B captan de modo eficiente los antígenos exógenos por medio de la IgM de superficie. Los antígenos captados mediante esta inmunoglobulina son presentados por una vía distinta a la de los antígenos tomados mediante la endocitosis no específica.

También se ha reportado el papel de la IgE en el mantenimiento de las reacciones de hipersensibilidad inmediata. La IgE puede estar envuelta en la captación y procesamiento de alérgenos, y conducir a una continua sobreestimulación del sistema inmune, debido a altos títulos de IgE, lo cual facilita aún más la síntesis de IgE.

## RECICLAJE DE LAS MOLÉCULAS DEL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD II DESDE LA MEMBRANA

Las moléculas MHC-II de la membrana pueden ser internalizadas y pasar, de manera directa, a los endosomas tempranos desde la membrana. Tanto en membrana como dentro de la vía endocítica, los complejos MHC-II + péptidos de alta afinidad no se pueden disociar con facilidad. Sin embargo, una fracción de moléculas MHC-II ocupadas con péptidos de baja afinidad, con la cadena Ii o con los CLIP pueden intercambiar con otros péptidos después de la internalización. El compartimiento para esta nueva carga de las moléculas MHC-II recicladas es tal vez distinto de aquel al que son transportadas las moléculas sintetizadas *de novo*. Al parecer, el reciclaje de las moléculas MHC-II pudiera ser de utilidad para la presentación de antígenos que son degradados muy rápido al ser endocitados por las células presentadoras de antígeno. De cualquier forma, se ha reportado que el reciclaje directo de la membrana de complejos MHC-II+Ii no conduce tan rápido a la proteólisis de la cadena Ii, y es necesario el paso subsecuente a endosomas más tardíos.

## VARIANTES EN EL PROCESAMIENTO Y LA PRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS

### PÉPTIDOS ENDÓGENOS/CLASE II

De manera habitual, los péptidos unidos a las moléculas MHC-II son obtenidos primariamente de fuentes extracelulares. Las proteínas sintetizadas por vía endógena entran con facilidad en la vía de presentación MHC-I, y por lo general son excluidos de la vía MHC-II. Sin embargo, hay datos que demuestran la presentación de péptidos derivados de proteínas endógenas por las moléculas MHC-II. Estos péptidos se unen a las moléculas MHC-II, quizá en la vía endocítica, a donde llegan “arrastrados” como proteínas de fusión con la Ii o, como caso especial, incluidos en autofagosomas, generados a partir de un proceso denominado autofagia, el cual permite la globalización de material citosólico o, incluso, de organelos completos. De todas formas, aún no se ha dilucidado bien el mecanismo.

Esta vía de presentación, inhabitual para los péptidos endógenos, puede jugar un papel necesario en la fisiología inmune, dado que la citotoxicidad de los linfocitos T-CD8+ que reconocen péptidos endógenos, necesita señales auxiliaadoras provenientes de los linfocitos T-CD4+ activados.

## PÉPTIDOS EXÓGENOS/CLASE I

Por lo general, las células presentadoras de antígeno captan, procesan y presentan los antígenos vía moléculas MHC-II. Sin embargo, reportes recientes han evidenciado que los macrófagos y monocitos son capaces de presentar péptidos extracelulares, generados en sus compartimientos endosomales, también en moléculas MHC-I (lo cual también ha sido reportado en otras células presentadoras de antígeno, aunque al parecer con menor relevancia). Los péptidos generados por proteólisis en la vía endocítica pueden “escapar” y alcanzar el citosol. En él pueden pasar, por vía transportadores o quizás de manera directa, al retículo endoplasmático y unirse a las moléculas MHC-I.

En un subgrupo de macrófagos se ha reportado que los péptidos exógenos pueden ser recanalizados al citosol desde los compartimientos endosomales por una molécula que actuaría como “chaperona”. Se trata de una HSP (*heat shock protein*). Este mecanismo es importante para entender la inmunogenicidad específica para tumor y virus.

Aunque desde el punto de vista fisiológico parezca menos importante que esta vía “citosólica”, existe otra vía “no citosólica” de unión entre péptidos exógenos y moléculas MHC-I: en el interior de las vacuolas endocíticas, donde las moléculas MHC-I pueden llegar, mediante su endocitosis desde la membrana y perder sus péptidos quizás por los cambios de pH o por ser estos inestables, o de manera ocasional, unidas y arrastradas por la cadena invariante Ii desde el retículo endoplasmático) o en la membrana por regurgitación (en que los péptidos ya generados por vía endocítica son regurgitados al exterior de la célula, donde pudieran unirse a algunas moléculas MHC-I “vacías” o intercambiar con aquellas ocupadas con péptidos en una unión inestable).

En la actualidad, esta vía de procesamiento MHC clase I/antígenos exógenos se ha reportado mucho más generalizada en monocitos, que lo que al principio se pensaba, y puede tener importancia en la respuesta inmune frente a parásitos intravacuolares, como las micobacterias.

## CITOTOXICIDAD DEL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD NO RESTRINGIDA. MOLÉCULAS CD1

La CD1 es una familia heterogénea de moléculas (CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, CD1e) no polimórficas, que son codificadas en el cromosoma 1. A pesar de su estructura general, similar a las moléculas MHC-I (una cadena  $\alpha$ , con 3 dominios extracelulares, una región transmembranosa y una cola citoplasmática, unida a la  $\beta 2m$ , al menos en la mayoría de los casos) muestran, en cuanto a secuencias aminoacídicas, una homología remota con las moléculas MHC. Esta homología radica en su dominio  $\alpha 2$  y, en menor medida, en el dominio  $\alpha 1$ . Se les han detectado funciones en el procesamiento y presentación antigénica, similares a aquellas de las moléculas MHC, aunque el conocimiento sobre las moléculas CD1 es aún menor.

Las moléculas CD1 son capaces de levantar respuestas citotóxicas MHC-no restringidas, específicas a los antígenos presentados. Ellas están especializadas en un grupo de antígenos. Al igual que las moléculas MHC-I, serían presentadas a los linfocitos T CD8+, y también requieren de moléculas “chaperonas” como la BiP, caracterizada por su hidrofobia generalizada.

Estas moléculas CD1 pueden presentar péptidos un poco más largos e incluso proteínas intactas o desnaturalizadas, pero están especializadas en la presentación de compuestos no peptídicos, procedentes de parásitos intracelulares (micobacterias), como ácidos micólicos y lipoglicanos.

Entonces, las moléculas CD1 constituyen otra vía adicional de procesamiento y presentación de antígenos de significación inmunológica, puesto que están especializadas en péptidos y otros compuestos no peptídicos, procedentes de parásitos intracelulares, como las micobacterias, y desarrollan una citotoxicidad MHC-no restringida.

## BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- Beckman EM, Brenner MB. MHC class I-like, class II-like and CD1 molecules: distinct roles in immunity. *Immunol Today* 1995; 16(7): 349-52.
- Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett W S, Strominger JL, Wiley DC. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 1987; 329(6139): 506-12.
- Brown JH, Jardetzky T, Saper MA, Samaraoui B, Bjorkman PJ, Wiley DC. A hypothetical model of the foreign antigen binding site of class II histocompatibility molecules. *Nature* 1988; 332(6167): 845-50.
- Elliott T: How does TAP associate with MHC class I molecules? *Immunol Today* 1997; 18(8):375-9.
- Goodman, JW. Presentación de antígeno y complejo mayor de histocompatibilidad. En: Stites DP, Terr AI, Parslow TG (ed.). *Inmunología Básica y Clínica*. 8<sup>va</sup>. Ed. México, DF: Editorial El Manual Moderno; 1996:75-84.
- Monaco JJ. A molecular model of MHC class-I-restricted antigen processing. *Immunol Today* 1992;13(5):173-9.
- Neeffjes JJ, Momburg F. Cell biology of antigen presentation. *Curr Opin Immunol* 1995; 5(1): 27-32.
- Neeffjes JJ, Ploegh HL. Intracellular transport of MHC class II molecules. *Immunol Today* 1992; 13(5):179-84.
- Pinet V, Vergelli M, Martin R, Bakke O, Long E O. Antigen presentation mediated by recycling of surface HLA-DR molecules. *Nature* 1995; 375(6532): 603-6.
- Robbins NF, Hammond C, Denzin LK, Pan M, Cresswell P. Trafficking of major histocompatibility complex class II molecules through intracellular compartments containing HLA-DM. *Hum Immunol* 1996; 45(1):13-23.
- Roitt I, Brostoff J, Male D. *Inmunología*. 4<sup>ta</sup>. Ed. Madrid: Harcourt Brace, 1997.
- Sanderson F, Thomas C, Neeffjes J, Trowsdale J. Association between HLA-DM and HLA-DR in vivo. *Immunology* 1996; 4(1):87-96.
- Saper M A, Bjorkman P J, Wiley D C. Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 Ångström resolution. *J Mol Biol* 1991; 219(2):277-319.
- Sidney J, Grey H M, Kubo R T, Sette A. Practical, biochemical and evolutionary implications of the discovery of HLA class I supermotifs. *Immunol Today* 1996; 17(6):261-6.
- Sieling PA, Chatterjee D, Porcelli SA, Prigozy TI, Mazzaccaro RJ, Soriano T, et al. CD1-restricted T cell recognition of microbial lipoglycan antigens. *Science* 1995; 269(5221):227-30.

## **CONTENIDO**

---

**Introducción/ 425**

**Linfocitos. Sus receptores de antígenos/ 426**

**Receptor de antígeno de los linfocitos B/ 426**

**Receptor de antígeno de los linfocitos T/ 427**

**Polipéptidos que componen el receptor de antígenos de las células T/ 428**

**Otras proteínas del complejo del receptor de antígenos de las células T: CD3,  $\xi$  y  $\eta$ / 428**

**Moléculas correceptoras CD4 y CD8/ 429**

**Células asesinas naturales/ 429**

Identificación morfológica de las células asesinas naturales/ 430

Identificación fenotípica de las células asesinas naturales/ 430

Funciones de las células asesinas naturales/ 430

Mecanismo de citotoxicidad de las células asesinas naturales/ 431

Activación e inhibición de las células asesinas naturales por receptores del complejo mayor de histocompatibilidad clase I/ 431

**Bibliografía recomendada/ 431**

## Capítulo 36



### RECONOCIMIENTO ANTIGÉNICO DE LINFOCITOS. CÉLULAS ASESINAS NATURALES

*Dra. María Eugenia Alonso Biosca*

#### RESUMEN

La naturaleza de los receptores para el antígeno en la superficie de los linfocitos, es distinta según los linfocitos: B o T. En el caso de los linfocitos B, el receptor para el antígeno (BCR) está constituido por inmunoglobulinas (Ig) de membrana, las cuales pueden reconocer al antígeno en su forma nativa. Las Ig de membrana están asociadas con otras dos proteínas de membrana, las cadenas Ig- $\alpha$  e Ig- $\beta$ , que tienen, cada una, un dominio extracelular homólogo a los dominios inmunoglobulínicos, y que se presume son las que trasladan las señales recibidas por el receptor al interior de la célula. El receptor para el antígeno de los linfocitos T (TCR) está formado por un heterodímero transmembrana  $\alpha\beta$  distribuido por los clones. Ambas cadenas tienen dominios homólogos a las Ig y están unidas por un enlace disulfuro. El heterodímero  $\alpha\beta$  se asocia de forma no covalente a un complejo de proteínas de membrana diferentes, incluidas las proteínas CD3,  $\xi$  y  $\eta$ , que actúan como componentes de transducción de la señal del complejo del TCR. También en los linfocitos T  $\alpha\beta$  aparecen otras moléculas de superficie importantes para la activación, que se conocen como moléculas accesorias. De ellas, las moléculas CD4 y CD8 son las más estudiadas. Se les denomina correceptores, ya que interactúan con las moléculas del MHC durante el reconocimiento del complejo péptido-MHC por el TCR y pueden transducir señales activadoras o reguladoras. Las moléculas CD4 y CD8 son marcadores poblacionales, debido a que se encuentran expresadas discretamente: CD4, en poblaciones de linfocitos T auxiliares, y CD8, en poblaciones de linfocitos T citotóxicos.

#### INTRODUCCIÓN

La respuesta inmune específica se inicia a partir del reconocimiento de antígenos extraños por linfocitos específicos. Estos linfocitos responden proliferando y diferenciándose en células efectoras, cuya función es eliminar al antígeno, así como generar células de memoria, capaces de responder en un próximo encuentro, con el mismo antígeno, de un modo mucho más efectivo. Para explicar esta propiedad del sistema inmune, que implica la capacidad del sistema de generar y mantener un inmenso y diverso repertorio de receptores de antígeno sobre los linfocitos, los inmunólogos propusieron 2 hipótesis mutuamente excluyentes. Según la teoría instructiva, las células inmunocompetentes adquieren sus especificidades después del contacto con el antígeno, y cambian la configuración de los receptores que se unen

a este. De esta manera, se capacitan para reconocer al antígeno. La teoría alternativa, reconocida hoy como correcta, fue sugerida por primera vez por Niels Jerne (1955) y modificada por Macfarlane Burnet, en 1957. Esta hipótesis ha sido probada y es conocida como teoría de la selección clonal. En ella queda enunciado que cada individuo posee numerosos clones de linfocitos, cada uno de ellos procedente de un solo precursor, y capaz de reconocer y responder frente a un determinante antigénico definido. El desarrollo de clones de linfocitos específicos para un antígeno dado, ocurre antes e independientemente de la exposición al antígeno. Las células que pertenecen a un clon poseen idénticos receptores antigénicos, que son distintos a los receptores que expresan las células de todos los demás clones. Esta teoría también presupone que es el antígeno el que selecciona el clon específico preexistente, y de este modo lo activa,



así como provoca su proliferación y diferenciación en células efectoras y de memoria. Para una mejor comprensión de la teoría de la selección clonal es necesario explicar también cómo es posible que el sistema inmune sea capaz de reconocer virtualmente cualquier patógeno existente o por aparecer. La ingeniosa solución genética a este problema de anticipar un futuro impredecible, implica generar millones de diferentes receptores de antígenos, lo cual es probable que sea superior a lo que necesite el individuo en toda su vida. Puesto que el ADN necesario para ello supera el número de genes del organismo, debe haber una solución mejor para generar toda esa diversidad, sobre todo ahora que se conoce que el número de genes involucrados en codificar los receptores de las células B y T no excede de 103. La ingeniosa solución evolutiva del problema de generar un amplísimo repertorio de receptores, a partir de un pequeño número de minigenes, será tratada más adelante, pues es necesario conocer la estructura molecular de estos receptores, para luego estudiar su control genético.

## LINFOCITOS. SUS RECEPTORES DE ANTÍGENOS

Los linfocitos B y T casi no presentan diferencias morfológicas apreciables. Solo a través de sus moléculas de superficie se logran distinguir las poblaciones y subpoblaciones de estas células. Unas de las moléculas más relevantes para estos fines, resultan ser los receptores para el antígeno, los cuales marcan las poblaciones de linfocitos B y T.

Los receptores para el antígeno de los linfocitos B, también denominados BCR (*B cell receptor*) son moléculas de inmunoglobulinas (Ig) de la superficie celular, idénticas en especificidad a los anticuerpos que serán secretados por esa misma célula, luego de los procesos de activación y diferenciación guiados por el antígeno.

Las células T tienen su propio tipo de receptor, el TCR (*T cell receptor*) que, si bien tiene alta homología con las Ig por su estructura y presenta una vía semejante de generarse, no enlaza de manera directa al Ag, como sí lo hacen los linfocitos B. Los linfocitos T con receptores del tipo  $\alpha\beta$  (tipo II) solo reconocen péptidos, derivados de antígenos proteicos procesados y enlazados a una molécula del MHC, como se estudió en el capítulo anterior. Sin embargo, existe otra subpoblación de linfocitos, con otro tipo de receptor, conocido como receptor de células T  $\gamma\delta$  (tipo I) que no requieren del procesamiento del antígeno. Ellos no están, por tanto, restringidos por el MHC: esta población de linfocitos aparece primero durante el desarrollo de las células T. De ahí que se denominen tipo I. Además, en los adultos se encuentra

asociada al epitelio del intestino. Una comprensión más completa del reconocimiento del Ag por los linfocitos, requiere el análisis de la estructura y especificidad de las moléculas que participan en él.

## RECEPTOR DE ANTÍGENO DE LOS LINFOCITOS B

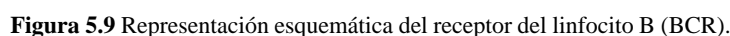
Los anticuerpos fueron descubiertos en su forma secretada, como proteínas que aparecen en el plasma a continuación de una inmunización o durante un proceso infeccioso. Sin embargo, antes de que los anticuerpos puedan producirse, una molécula de inmunoglobulina, con el mismo reordenamiento de minigenes, debe funcionar como receptor de antígeno de los linfocitos B. Así, el término receptor de antígeno de células B (BCR), inmunoglobulina de membrana o inmunoglobulina de superficie, son sinónimos. El antígeno enlazado a esas inmunoglobulinas de membrana, inicia el proceso de expansión y diferenciación de los linfocitos B a células secretoras de anticuerpos (figura 5.9).

Anticuerpos de todos los isotipos de cadenas pesadas, pueden existir, tanto en forma secretada como en forma de receptor enlazado a la membrana. Así, la molécula de inmunoglobulina enlazada a la membrana, tiene una región hidrófoba transmembrana que la ancla a la superficie del linfocito B. Esta región está ausente en la forma secretada. Además, las moléculas de inmunoglobulina de la superficie de una célula aparecen acompañadas de un heterodímero unido a ellas por enlaces no-covalentes. La función biológica de este heterodímero es transmitir la señal dada por el Ag, desde la superficie de la célula hacia el interior de esta. Ello es necesario debido a que las colas citoplasmáticas de las inmunoglobulinas son muy cortas para interactuar con las proteínas que participan en la transmisión de las señales intracelulares.

El heterodímero acompañante consta de 2 cadenas polipeptídicas invariantes y glucosiladas, denominadas  $Ig\alpha$  e  $Ig\beta$ , con pesos moleculares de 47 kDa y 37 kDa, respectivamente. Estas cadenas, junto al BCR, se conocen como complejo receptor para antígeno del linfocito B. Las cadenas  $Ig\alpha$  e  $Ig\beta$  son necesarias, además, para la expresión de todas las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas, cuando aparecen en la superficie de la célula, lo que a su vez depende del estado de diferenciación celular. Así, las células B inmaduras expresarán en su superficie cadenas  $\mu$ ; las células B maduras expresarán cadenas  $\mu$  y  $\delta$  y las células de memoria, expresarán cadenas de cualquier clase. La función del BCR es recibir una señal a través de la unión del Ag con su sitio de combinación antigénico, y transmitirla al interior de la célula. El tipo de respuesta de la célula B a ese

ambas cadenas de proteínas pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Esas características compartidas entre las proteínas Ig $\alpha$  e Ig $\beta$  y las del CD3, sugieren que hubo un ancestro común en sus orígenes.

Los receptores de antígenos de las células T fueron primero identificados con anticuerpos monoclonales contra clones individuales de líneas de células T. Algunos de esos anticuerpos reaccionaron solo con el clon con el que se inmunizó, lo que sugirió que ellos habían detectado un receptor único sobre la superficie de las células. Esto se demostró al observar que esos anticuerpos clonotípicos podían inhibir específicamente el reconocimiento del antígeno. También estos anticuerpos clonotípicos se utilizaron para demostrar que cada célula T lleva en su superficie aproximadamente  $10^4$  moléculas de TCR, y que cada receptor está compuesto por 2 cadenas de proteínas



transmembrana denominadas  $\alpha$  y  $\beta$ . Este heterodímero solo se expresa sobre los linfocitos T y se une específicamente a complejos péptido-MHC de la superficie de la APC o célula diana. Como es de suponer, las proteínas del TCR difieren en las distintas células T con diferentes especificidades para el antígeno. El TCR se expresa en membrana en asociación con un complejo de varias proteínas invariables, denominado CD3, que transducen las señales del TCR al interior de la célula, para desencadenar el proceso de activación del linfocito. Además, las células T expresan otras proteínas en su membrana, que en conjunto se denominan moléculas accesorias. Algunas de estas moléculas accesorias tienen funciones tan importantes como: transducir señales que refuercen o modulen la señal dada a través del TCR, cooperar en la adhesión de la célula T a otras células y participar como señales en el control de la migración de los linfocitos T hacia diferentes localizaciones anatómicas.

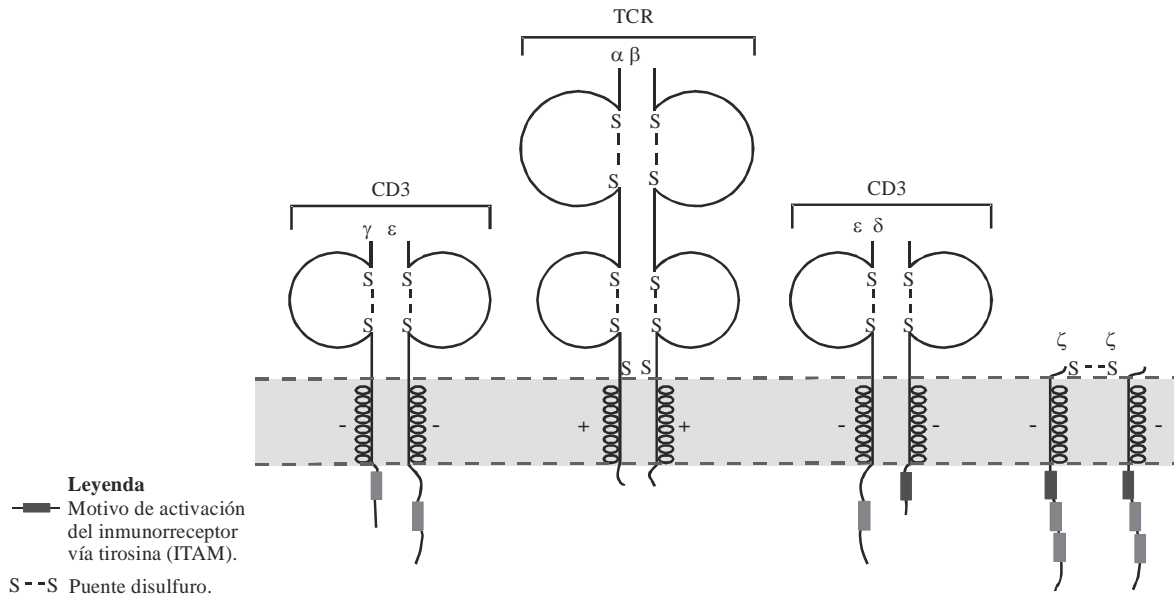
## **POLIPÉPTIDOS QUE COMPONEN EL RECEPTOR DE ANTÍGENOS DE LAS CÉLULAS T**

El TCR consiste en un heterodímero formado por 2 subunidades glucosiladas y unidas de manera covalente, denominadas  $\alpha$  y  $\beta$  que tienen pesos moleculares de 43 kDa y 49 kDa, respectivamente. El estudio de secuencia de estos polipéptidos demostró que había un alto grado de diversidad entre los heterodímeros aislados de diferentes células T, y que diferían en su especificidad antigénica, lo que sugería que esas moléculas de reconocimiento del antígeno eran muy semejantes a las inmunoglobulinas. De hecho, desde el punto de vista estructural, la porción extracelular de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  pueden considerarse homólogas al fragmento Fab de las Ig, pues presentan un dominio variable (V) que tiene el grupo N-terminal y una región constante (C) citoplasmática, que presenta el carboxilo-terminal. Los dominios V de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  tienen estructuras terciarias similares a los dominios V de las Ig, y el dominio C de la cadena  $\beta$  es similar a un dominio C de Ig. En otro capítulo se estudiarán las características de los dominios de las Ig. En la actualidad, a las proteínas de membrana que contienen dominios estructurales homólogos a los dominios C y V de las Ig, se les incluye en una familia de moléculas, denominada superfamilia de las Ig. Se piensa que esta superfamilia ha evolucionado a partir de un gen ancestral, y muchas de estas proteínas tienen papeles importantes en las interacciones célula-célula. Sin embargo, el dominio C de la cadena  $\alpha$  del TCR, no exhibe esta estructura de dominio de Ig, debido a que la separación entre sus aminoácidos, en el plegamiento espacial, no le permite establecer los enlaces de hidrógenos típicos de las estructuras de las Ig.

Las regiones V de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del TCR poseen secuencias que son muy variables entre los distintos clones de células T, lo que refleja su papel en el reconocimiento del antígeno. Además, ambas cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  se encuentran codificadas desde el punto de vista genético, de modo similar a las Ig, y por mecanismos muy similares generan su diversidad. A diferencia de las Ig, que presentan varias regiones constantes, las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del TCR solo presentan un dominio C cada una, el cual continúa con una corta región bisagra que se encuentra cercana a la cara exterior de la membrana citoplasmática. Un residuo de cisteína en cada región bisagra contribuye a formar el enlace disulfuro que une a ambas cadenas. Hay otras fuerzas no-covalentes que participan en mantener las cadenas del TCR unidas. Los residuos aminoacídicos hidrófobos que comprenden la región transmembrana de ambas cadenas, presentan una característica poco común en proteínas transmembrana: la presencia de residuos aminoacídicos cargados positivamente en estas regiones. Entre ellos, un residuo de lisina en la cadena  $\beta$  y un residuo de lisina o arginina en la cadena  $\alpha$ , lo que se explica por el hecho de que, tanto la cadena  $\alpha$  como la  $\beta$  tienen colas citoplasmáticas muy cortas de 5 a 12 aminoácidos. Regiones citoplasmáticas tan pequeñas no muestran actividad enzimática intrínseca, y de hecho, para la transmisión de la señal se requieren otras moléculas, físicamente asociadas al TCR, que funcionen como transductoras de señales. Este papel lo asumen otras proteínas que se estudiarán a continuación (figura 5.10).

## **OTRAS PROTEÍNAS DEL COMPLEJO DEL RECEPTOR DE ANTÍGENOS DE LAS CÉLULAS T: CD3, $\xi$ Y $\eta$**

El receptor para el antígeno de los linfocitos T está formado por el heterodímero  $\alpha\beta$ , el cual posee la capacidad de reconocer antígenos peptídicos unidos a moléculas MHC; pero, tanto la expresión en la superficie celular del heterodímero como su función en la activación de células T, dependen de otras cinco proteínas transmembrana que se asocian de manera no covalente con este heterodímero. En conjunto, estas proteínas forman el complejo TCR funcional. Tres de estas proteínas componen la molécula de CD3, considerada un excelente marcador de todas las poblaciones de células T, aun antes de reconocer su papel como parte del TCR. Estas tres proteínas son miembros de la superfamilia de las Ig, presentan gran homología entre sí y se denominan:  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ . Además, los complejos del TCR presentan, asociado también, un dímero compuesto por 2 cadenas de una proteína denominada  $\xi$ ; estas cadenas van a estar unidas de forma covalente y no pertenecen a la



**Figura 5.10** Representación esquemática del receptor del linfocito T (TCR).

superfamilia de las Ig. Hay células que no presentan este homodímero. En su lugar, hay un heterodímero que consta de una cadena  $\xi$  y una cadena  $\eta$  que es producto del procesamiento alternativo del gen  $\xi$ . Las asociaciones físicas entre todas estas cadenas y el heterodímero  $\alpha\beta$  quedaron demostradas cuando, al utilizar anticuerpos monoclonales contra el heterodímero  $\alpha\beta$ , coprecipitaban también las moléculas del CD3 y del dímero  $\xi\xi$ .

## MOLÉCULAS CORRECEPTORAS CD4 Y CD8

Los linfocitos T pueden ser clasificados en 2 grandes poblaciones, según a las moléculas de superficie CD4 y CD8. Estas moléculas son glucoproteínas transmembrana y se consideran miembros de la superfamilia de las Ig, pues presentan algunos dominios semejantes a dominios de Ig. La población de linfocitos T CD4 se encuentra restringida por las moléculas MHC de tipo II, y desde el punto vista funcional son células auxiliaoras que secretan citocinas; mientras que los linfocitos T CD8 se encuentran restringidos por las moléculas del MHC tipo I, y funcionalmente se comportan como células citotóxicas. Tanto las moléculas CD4 como las CD8, llevan a cabo una combinación de funciones de adhesión y señalización, que estimulan de manera extraordinaria la sensibilidad de las células T al antígeno. Además, ellas se asocian con el TCR y se unen a las moléculas del MHC sobre las APC o las células dianas en el momento del reconocimiento del antígeno, por lo que con

frecuencia se les denomina correesceptores. Aproximadamente el 65 % de las células T  $\alpha\beta$  periféricas expresan CD4 y el 35 % expresan CD8.

La molécula CD4 es una cadena simple que presenta cuatro dominios extracelulares semejantes a los dominios de las Ig. El dominio citoplasmático interactúa con una tirosina quinasa, lo que la hace capaz de participar en la transmisión de la señal. La molécula CD8 es un heterodímero compuesto por 2 cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ , unidas por un enlace disulfuro; ambas presentan dominios homólogos a dominios Ig. Tanto CD4 como CD8 enlazan débilmente a las moléculas del MHC correspondientes, y presentan colas citoplasmáticas, capaces de enlazar proteínas quinasas.

El resultado de la unión del TCR de las células T con el complejo péptido-MHC, es una cascada de eventos intracelulares denominados: activación de la célula T, que comienzan con la generación de segundos mensajeros, y termina con la proliferación y diferenciación de los linfocitos, de cualesquiera de las 2 subpoblaciones, a células efectoras.

## CÉLULAS ASESINAS NATURALES

Las células asesinas naturales o células NK (*natural killer cells*) conforman un grupo de linfocitos que no expresan marcadores de células T o B, por lo que al inicio se les denominó células nulas. Como la mayoría de estos linfocitos son grandes y contienen gránulos citoplasmáticos con actividad citocida, luego

se les denominó linfocitos grandes granulares (LGG) o células asesinas naturales (NK).

Las células NK se derivan de la médula ósea. Esta subpoblación puede comprender entre el 5 y hasta el 15 % de los linfocitos en sangre periférica y se encuentran, además, en los órganos linfoides, fundamentalmente en el bazo. En la sangre del cordón umbilical no se aprecia actividad NK; cuando se detecta su participación, es muy pequeña. La función de las células NK se incrementa en este entorno en presencia de interleucina 2 (IL-2) y de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ).

## IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS CÉLULAS ASESINAS NATURALES

Desde el punto de vista morfológico, las células asesinas naturales se distinguen con el microscopio óptico como linfocitos de 10  $\mu$ m de diámetro con una relación núcleo-citoplasma menor que el linfocito no granular. En el citoplasma se observan gránulos densos azurofílicos, por lo general, de gran tamaño. En estas células también se han observado gránulos medianos e, incluso, ausencia de estos.

## IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE LAS CÉLULAS ASESINAS NATURALES

Las células NK carecen de receptores T o B específicos para el antígeno (TCR o IgS). Desde el punto de vista fenotípico, se definen como linfocitos CD3- TCR, IgS, CD16+ y CD56+.

El antígeno CD16 se corresponde con el receptor de baja afinidad para la porción Fc de la inmunoglobulina G (IgG) (Fc $\gamma$  RIIIA). Este antígeno se identifica, además, en los neutrófilos, en algunos macrófagos y en ciertas células T que expresan la región transmembranosa de la molécula CD16. Aunque la presencia del CD32 (Fc $\gamma$  RII) también ha sido constatada en las células NK, no es un marcador que las caracterice.

Un marcador importante en la identificación de las células NK es el antígeno CD56. En este caso se trata de una molécula de adhesión de las células nerviosas (NCAM) que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas. El 90 % de las células NK son CD56<sup>dim</sup>; es decir, se observan al microscopio con baja intensidad de fluorescencia al enfrentarse a un anticuerpo monoclonal CD56, tienen escasa proliferación en un medio con IL-4, IL-7 e IL-12 y proliferación moderada en presencia de IL-2. El 10 % restante está

conformado por las células CD56<sup>bright</sup>, de fluorescencia brillante ante el anticuerpo monoclonal CD56, y proliferan más cuando se encuentran la IL-4, la IL-7 y la IL-12, que frente a la IL-2.

Entre las otras moléculas de adhesión que se detectan en las células NK, se encuentran las moléculas CD2 y LFA-1 (antígeno asociado a la función leucocitaria 1). Otras moléculas que pueden estar presentes en las células NK son los antígenos CD7, CD8, CD43, CD57, CD69 y CD95. Estas últimas moléculas están presentes también en otras estirpes celulares. En general, la variabilidad en la distribución de estos antígenos refleja distintos estados de diferenciación o de activación de diversos clones de células NK.

Las células NK en reposo expresan la cadena  $\alpha$  del receptor de IL-2. Cuando se trata de una célula que ha completado su diferenciación, en ella se identifican las subunidades  $\alpha$  del receptor de la IL-15 y los receptores para el IFN $\gamma$  e IL-12.

Las células NK que crecen en presencia del IL-2 son las denominadas células NK1 y las que proliferan cuando está presente la IL-4 se agrupan como células NK2. Los linfocitos comprendidos dentro de NK1 expresan niveles más altos del CD95 (Fas) y son más sensibles a la apoptosis inducida por anticuerpos o por agentes químicos. Estas células presentan una mayor cantidad de ARN mensajero de la cadena  $\beta$  del receptor de IL-2, responden mejor a la IL-12 que las NK2 y producen, sobre todo, IL-10 e IFN $\gamma$ . Por otra parte, las células NK2 liberan, en lo fundamental, IL-5 e IL-3. Aunque ambos tipos celulares difieren en sus características particulares, y la actividad citotóxica es similar.

## FUNCIONES DE LAS CÉLULAS ASESINAS NATURALES

Aunque las células NK se consideran células efectoras que eliminan tumores o células infectadas por virus a través de mecanismos inespecíficos, sin participación del MHC, existen evidencias experimentales que contradicen este argumento.

Las células NK actúan como citotóxicas frente a las células tumorales y a células infectadas por microorganismos, y pueden participar en mecanismos en los que están presentes otros elementos del sistema inmune, como citocinas y anticuerpos. También pueden favorecer otros mecanismos de lisis celular, en lo fundamental, la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC). Las múltiples posibilidades de las células NK permiten que estas células puedan participar en procesos relacionados con autoinmunidad, rechazo a transplantes y hemostasia.

## MECANISMO DE CITOTOXICIDAD DE LAS CÉLULAS ASESINAS NATURALES

Las células NK entran en contacto, de manera inespecífica, con su célula diana. Su actividad citotóxica se inicia cuando sus receptores de inhibición no reconocen moléculas MHC clase I. El mecanismo principal de citotoxicidad utilizado por las células NK requiere la presencia de  $Ca^{+2}$ . En este mecanismo participan perforinas liberadas de los gránulos, enzimas y citocinas, que siguen las mismas vías que utiliza el linfocito T citotóxico.

## ACTIVACIÓN E INHIBICIÓN DE LAS CÉLULAS ASESINAS NATURALES POR RECEPTORES DEL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD CLASE I

Las células NK son activas desde el punto de vista funcional, cuando no hay expresión de las moléculas MHC clase I (HLA-1) en la célula diana. Esta noción de “pérdida de lo propio” propone una complementariedad entre la célula NK y la célula T en la respuesta inmune celular: la célula T reconoce según el complejo péptido/MHC y la célula NK es activada cuando no hay expresión de la molécula MHC, e inhibida por el reconocimiento de estas moléculas. Esto significa que cuando un virus inhibe la expresión de las moléculas MHC clase I en su célula hospedera para “escapar” de la acción T-citotóxica, o por transformación maligna de la célula, esta se convierte en diana a merced de la actividad citotóxica NK.

Existe un balance entre las señales inhibitorias y estimuladoras que controlan la actividad NK. La actividad NK se reprime después del reconocimiento de ciertas moléculas MHC clase I. La mayoría de los receptores que tienen esta función pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas, y una minoría de los receptores está comprendida dentro de las moléculas similares a las lectinas. Ambos grupos portan pequeñas secuencias de aminoácidos denominadas ITIMs (*motifs* de inhibición basados en el inmunorreceptor de tirosina).

Las células NK maduras adquieren, al menos, un receptor de inhibición que reconoce moléculas MHC propias. Esta potencialidad es uno de los mecanismos

que permite la tolerancia de la célula NK frente a las células normales autólogas.

La familia relacionada con las inmunoglobulinas se localiza en el cromosoma humano 19. Los receptores con función inhibitoria se definieron al principio como p58 y p70/p140 o receptores de inhibición de la actividad matadora. Aunque la nomenclatura no ha sido establecida desde el punto de vista formal, se acordó nominar estos receptores como KIR (representación de los “receptores matadores similares a la inmunoglobulina”), y comprenden a todos los miembros de la familia, independientemente de sus funciones.

Se han descrito cerca de 12 genes KIR diferentes y un número limitado de variantes alélicas. Los estudios en donantes de sangre voluntarios sugieren que la distribución de estos genes no es similar. Se han detectado ligandos específicos para varios KIR; cada receptor reconoce a un grupo de alotipos HLA clase I que comparte características estructurales en el dominio  $\alpha 1$ .

## BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- Fan QR, Mosyak L, Winter CC, Wagtmann N, Long EO, Wiley DC. Structure of the inhibitory receptor for natural killer cells resembles haematopoietic receptors. *Nature* 1997;389: 96-100.
- Lanier LL. NK cell receptors. *Annu Rev Immunol* 1998; 16:359-93.
- Leibson PJ. Signal transduction during natural killer cell activation: inside the mind of a killer. *Immunity* 1997; 6: 655-61.
- López-Botet M, Bellón T. Natural killer cell activation and inhibition by receptors for MHC class I. *Current Opin Immunol* 1999; 11: 301-7.
- Mingari MC, Moretta A, Moretta L. Regulation of KIR expression in human T cells: a safety mechanism that may impair protective T cell responses. *Immunol Today* 1998; 19: 153-7.
- Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Biassoni R, Mingari MC, Moretta L. Receptors for HLA class I molecules in human natural killer cells. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 619-48.
- Reyburn H, Mandelboim O, Valdés-Gómez M, Sheu E, Pazmani L. Human NK cells: their ligands, receptors and functions. *Immunol Rev* 1997; 155: 119-25.
- Selvakumar A, Steffens U, Palanisamy N, Chaganti RS, Dupont B. Genomic organization and allelic polymorphism of the human killer cell inhibitory gene KIR 103. *Tissue antigens* 1997; 49: 564-73.
- Uhrberg M, Valiante NM, Shum BP, Shilling HG, Lienert-Weidenbach K, Corliss B. Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity* 1997; 6: 341-50.
- Yokohama WM. Natural killer cell receptors. *Curr Opin Immunol* 1998; 10: 298-305.

## **CONTENIDO**

---

### **Introducción/ 433**

### **Sistema del complemento/ 434**

### **Composición y vías de activación del sistema del complemento/ 434**

- Vía clásica de activación del complemento/ 434
- Vía alternativa de activación del complemento/ 435
- Vía de la lectina/ 435
- Complejo de ataque a la membrana/ 437

### **Mecanismos de regulación de la actividad del complemento/ 437**

### **Funciones biológicas del complemento/ 437**

### **Cascada de las cininas/ 440**

- Proteínas de la cascada de las cininas/ 440
- Activación de las cininas/ 440
- Regulación y amplificación de la generación de cininas/ 440
- Inhibidores plasmáticos de la generación de cininas/ 441
- Cininógeno de bajo peso molecular y calicreínas hísticas/ 441

### **Interrelación entre el complemento y otros mediadores sanguíneos/ 441**

### **Bibliografía recomendada/ 441**

### Capítulo 37



## COMPLEMENTO Y CININAS

*Lic. Isabel Matamoros Díaz*

### RESUMEN

Se conocen 4 sistemas fisiológicos que presentan activación secuencial enzimática del tipo de cascada y que están en el suero, de forma inactiva: el complemento, las cininas, la coagulación y la fibrinólisis. Estos tienen diferentes funciones en el organismo, pero interactúan entre sí y con las proteínas de la membrana. El sistema del complemento es muy importante en el potencial defensivo disponible del sistema inmune. Sus funciones esenciales son: la lisis celular, la opsonización de microorganismos, la solubilidad y el aclaramiento de inmunocomplejos, y la inflamación. La activación del complemento, que está en relación directa con el grado de lesión de los tejidos afectados, se produce en muchas enfermedades. Ocurre por 2 vías: clásica y alternativa. La primera, por lo general se inicia por la unión de anticuerpos al antígeno; mientras que la segunda constituye una vía de activación independiente del reconocimiento del agente activador por anticuerpos, por lo que es un elemento de la inmunidad innata, que no requiere del desarrollo de una respuesta específica. La función fisiológica del sistema generador de cininas no está aún muy clara, y su participación en las enfermedades solo se asevera en algunos casos. Algunos de los productos de su activación se han descubierto en las secreciones nasales, durante la rinitis y la inflamación nasal viral. También se cree que, por su propiedad de originar contracción de la musculatura lisa y escape capilar, las cininas contribuyen al asma y originan el dolor intenso en enfermedades como la pancreatitis.

### INTRODUCCIÓN

La inmunidad tiene mecanismos efectores específicos (anticuerpos, linfocitos sensibilizados), que con frecuencia son insuficientes para la destrucción y eliminación del antígeno. Los anticuerpos pueden impedir la infección de una célula por un virus o impedir la acción de una toxina, pero no bastan por sí solos para eliminar una infección localizada o para destruir bacterias.

La acción protectora de la inmunidad específica, y también sus efectos nocivos, se deben a la puesta en marcha de mecanismos que, una vez desencadenados, conducen a cambios cualitativos y cuantitativos de los efectos de la respuesta inmunitaria.

Estos mecanismos efectores y amplificadores son parte de la defensa inespecífica (inmunidad innata), y

aumentan su eficacia cuando cooperan con mecanismos de la inmunidad adaptativa. Los principales son: el sistema del complemento y la fagocitosis, como efectores humorales y celulares, respectivamente. Ambos sistemas interactúan entre sí para complementar sus efectos. La activación del complemento promueve la fagocitosis, pues aumenta el número de fagocitos, los cuales realizan la síntesis local de los componentes del complemento.

El sistema del complemento tiene 3 funciones principales, de las cuales se derivan otras, tan importantes como estas. La primera función y quizás la más conocida, es la lisis celular mediante el daño irreversible a las membranas celulares de bacterias, virus etc. La segunda es la opsonización de células ajenas, bacterias, virus y hongos que son preparados para la fagocitosis. Esta



función consiste en recubrir la partícula invasora con fragmentos específicos del complemento, que son reconocidos por receptores para estos fragmentos, que se encuentran en la membrana celular de los fagocitos. La tercera función del complemento, mucho más compleja, comprende la generación de fragmentos peptídicos que regulan la respuesta inflamatoria e inmune.

SISTEMA DEL COMPLEMENTO

Después del descubrimiento de los anticuerpos, se demostró que el suero contenía un componente termolábil que era necesario para la lisis inmune de las células rojas de la sangre. El término *complemento* fue asignado a este componente, debido a que su función *complementaba* la acción específica de los anticuerpos en la destrucción de bacterias, hongos y eritrocitos, entre otros. Por esta razón, se considera al complemento el mediador humoral de la unión antígeno-anticuerpo. En la actualidad, se conoce que el complemento es un complejo sistema multimolecular de proteínas plasmáticas y de membrana, que son activadas por estímulos inmunológicos y no inmunológicos. Este sistema juega un papel importante en la defensa contra las infecciones y en los procesos inflamatorios mediados por mecanismos inmunes.

COMPOSICIÓN Y VÍAS DE ACTIVACIÓN DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO

El sistema del complemento es un complejo de proteínas plasmáticas y de membrana, en el cual la activación enzimática secuencial de sus componentes genera una cascada biológica que permite una respuesta amplificada frente a los estímulos.

Los componentes del complemento son cerca de 40 proteínas solubles, presentes de forma inactiva en el suero y demás líquidos corporales, con excepción de algunos componentes (proteínas de membrana y receptores), que están insertados en la membrana de diversos tipos celulares. Se agrupan en componentes de la vía clásica de activación, componentes de la vía alternativa, componentes del complejo de ataque a la

membrana y proteínas reguladoras. Las proteínas de la vía clásica se denominan por números que siguen a la letra C (C1, C2, C4 y C3) y las de la vía alternativa y algunas proteínas de control se simbolizan por letras (B, D, H e I). La mayor parte de las proteínas del complemento se sintetiza en el hígado, pero también los monocitos, neutrófilos y macrófagos activados las pueden producir (localmente) en los lugares en que ocurra un proceso inflamatorio. En menor medida, el epitelio intestinal y el tejido adiposo pueden sintetizar algún componente (por ejemplo: C1 y factor D).

Los componentes del complemento difieren mucho entre sí, en cuanto a concentración en la sangre, peso molecular, movilidad electroforética, número y disposición de cadenas polipeptídicas, etc. La concentración es también diferente en el suero, y la mayoría no llega a 10 mg/dL. La mayor concentración la alcanza el C3 con 120 mg/dL. La mayoría de los componentes del complemento, debido a su utilización en las reacciones en que participa, tiene una vida media corta y su tasa de síntesis es alta.

La activación del complemento puede ocurrir por 2 vías conocidas: la vía clásica y la vía alternativa, que coinciden en el componente C3, común para ambas, y a partir del cual proceden de forma igual para continuar con el complejo de ataque a la membrana, que provoca la lisis celular. Se plantea que existe una tercera vía de activación del complemento, conocida como vía de la lectina (cuadro 5.1).

VÍA CLÁSICA DE ACTIVACIÓN DEL COMPLEMENTO

La vía clásica se activa por la presencia de complejos antígeno-anticuerpo, de clase IgM o IgG (excepto la subclase IgG4 en seres humanos). La IgG4, IgE, IgA e IgD no fijan el C1q y no pueden activar al complemento por la vía clásica. También puede activarse por interacción directa con ciertos lipopolisacáridos bacterianos, retrovirus (no por el VIH), proteína C reactiva, heparina y ADN, entre otros; pero en estos casos se desconoce la importancia fisiopatológica de este tipo de activación sin anticuerpos. Una molécula de IgM unida al antígeno es suficiente para activar

Cuadro 5.1 Componentes de la cascada del complemento

Vía clásica	C1q	C1r	C1s	C4	C2	C3	C5	C6	C7	C8	C9
Vía alternativa	C3	B	D	P	H	I					

al C1, pero se requieren, al menos, 2 de IgG cercanas para obtener el mismo resultado. El primer componente C1 es un complejo formado por 3 proteínas, C1q, C1r y C1s, unidas por iones calcio. La unión del C1q con la región Fc de la inmunoglobulina presente en el inmunocomplejo crea, por cambios conformacionales en las moléculas C1r, una actividad enzimática serin-proteasa. Esta actividad enzimática tiene como sustrato las moléculas de C1s, que también adquieren actividad serin-proteasa y que actúan casi de manera simultánea sobre C4 y C2. Ello produce la ruptura de ambas moléculas en 2 fragmentos, uno pequeño y otro de mayor peso molecular y con diferentes funciones. Los 2 pequeños, C4a y C2b, quedan libres en el medio fluido; mientras que los grandes, C4b y C2a, se unen por un enlace covalente con la superficie celular o con los inmunocomplejos, y se forma el C4b2a con actividad proteasa. Su centro activo se encuentra en C2a y la presencia de C4b le confiere la capacidad de actuar sobre C3 como sustrato, por lo que recibe el nombre de C3-convertasa. La enzima C3-convertasa es capaz de generar miles de moléculas de C3a y C3b, a partir de C3. Estos 2 fragmentos: uno pequeño, C3a, queda libre en el medio; y el otro, mayor, C3b, se une al complejo anterior, y se forma una nueva enzima, C4b2a3b, cuyo sustrato es el C5 y a la que se denomina C5-convertasa. Con la formación de la C5-convertasa se considera terminada la activación del complemento por vía clásica.

## VÍA ALTERNATIVA DE ACTIVACIÓN DEL COMPLEMENTO

La vía alternativa del complemento inicia su activación de forma diferente, no necesita anticuerpos para su funcionamiento y se activa sobre la superficie de células y de microorganismos, o de compuestos derivados de ellos. La IgA puede activar la vía, pero con muy baja eficiencia. El C3 es el componente principal de la vía alternativa. Esta molécula tiene un enlace tioéster, que en un medio acuoso se hidroliza de forma espontánea y continua, y da lugar al  $C3(H_2O)$  que tiene propiedades similares al C3b formado por vía clásica. Este  $C3(H_2O)$  reacciona con los factores B y D, y forma una C3-convertasa en fase fluida,  $C3(H_2O)Bb$ , que actúa sobre C3 y produce más C3b. Este C3b y el que se produce por la vía clásica, es inactivado por hidrólisis (iC3b), degradado después (dC3b) y solo una pequeña fracción se une a la superficie celular y continúa la cascada, si las proteínas reguladoras (factores H e I) no lo inactivan. Los microorganismos tienen superficies con bajo contenido en ácido siálico. Esto facilita

la formación del asa de retroalimentación que amplifica la cantidad de C3b que se deposita en ellas, al impedirse su inactivación por proteínas de control. Por otra parte, las células autólogas tienen superficies no activadoras, y el C3b es rápidamente inactivado por proteínas de control, lo que significa que el complemento se activa por la vía alternativa cuando encuentra una superficie que impide la inactivación del C3b por las proteínas reguladoras H e I. La vía clásica puede activar también a la vía alternativa mediante la unión del C4b al C3b, lo que impide su inactivación por las proteínas reguladoras. La generación de C3b establece la conexión entre las vías de activación del complemento, ya que la activación iniciada por una de ellas, permite la participación de ambas. El C3b generado puede unirse a la C3-convertasa, y formar el complejo  $C3bBbC3b_n$  conocido como la C3/C5-convertasa de la vía alternativa, pues tiene acción enzimática sobre el C3 y sobre el C5. Esta convertasa de la vía alternativa es muy inestable, se disocia con facilidad y debe su funcionalidad a la properdina, una proteína presente en la sangre que es un factor estabilizador de los complejos intermedios que tienen una vida media muy corta. Desde el punto de vista filogenético, la vía alternativa es más antigua que la clásica. Esta última se puede considerar como una adaptación o como el perfeccionamiento de un sistema defensivo inespecífico preexistente en la evolución de los mecanismos de la respuesta inmune.

Las 2 vías de activación del complemento están interconectadas (figura 5.11). El proceso de amplificación de la vía alternativa de activación es también operativo en la vía clásica: la vía alternativa amplifica la ruptura del componente C3 dependiente e independiente de anticuerpo.

## VÍA DE LA LECTINA

Se plantea que esta tercera vía (vía de la lectina) actúa mediante los macrófagos que, después de detectar una infección, segregan interleucina-6. Esta enzima, a su vez, estimula la secreción por el hígado de una lectina, capaz de unirse a la manosa (*mannose binding lectin*), común en los carbohidratos de la cápsula de las bacterias. Esto provoca la activación del complemento por C1r y C1s, y como resultado, el C4, el C2 y el C3 son activados, y continúan la cascada de activación de igual manera que en las 2 primeras vías. La vía de la lectina juega un papel importante en la inmunidad innata o inespecífica de los vertebrados y de los invertebrados.



## COMPLEJO DE ATAQUE A LA MEMBRANA

La formación de la C5-convertasa, por la vía clásica o por la vía de la lectina, y de la C3/C5-convertasa, por la vía alternativa y su acción sobre el C5, es la última fase enzimática de la secuencia de la cascada del complemento. A partir de este punto, las vías continúan en una vía final común, con la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC). La proteína C5 se divide en 2 fragmentos, uno pequeño que queda libre (C5a) y otro mayor (C5b) que inicia el ataque a la membrana y que posee un sitio de unión con la C6. En el complejo C5b6 se crea un sitio de unión a la C7 y se obtiene un complejo trimolecular, C5b67, que se separa de la C5-convertasa y se deposita en otros sitios de las membranas celulares activadoras de la cascada del complemento. La fijación del C8 sobre este complejo inicia el daño a la permeabilidad de las membranas implicadas. En este caso, varias moléculas de C9 se unen a C5b678 y termina de formarse el complejo de ataque a la membrana, que crea una estructura cilíndrica que atraviesa el espesor de esta. La formación de poros en la membrana plasmática permite el paso de iones y altera las condiciones de permeabilidad selectiva de la célula, lo que da lugar a la lisis osmótica. La lisis celular por la acción del MAC es un mecanismo importante de eliminación de bacterias y de algunos virus.

Las bacterias grampositivas son resistentes a la acción citolítica del complemento, debido a su gruesa capa de péptido glicano parietal, que restringe la acción del MAC en la membrana plasmática. También las células nucleadas pueden escapar de la acción citolítica del MAC, por mecanismos de endocitosis y exocitosis en los que se eliminan cantidades limitadas de MAC de sus superficies celulares, y su capacidad de reparación de la membrana, que exige la acumulación de lesiones causadas por el MAC para que se produzca la lisis celular.

## MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL COMPLEMENTO

El complemento no es un sistema que deba ser activado, pues ambas vías están activadas constantemente *in vivo*, aunque con baja intensidad. Los activadores solo aceleran o disparan la activación. Esto supera el riguroso control del conjunto de las proteínas reguladoras presentes en el plasma y en la membrana de diversos tipos celulares.

Por lo tanto, la activación del complemento requiere un control y una regulación cuidadosa, por medio de

diferentes mecanismos, con vistas a prevenir la destrucción de los tejidos propios del individuo. Estos mecanismos limitan la extensión, la intensidad y la duración de la activación del complemento en diferentes partes de la cascada: en primer lugar, la labilidad de las convertasas, que tienen una vida media que puede oscilar entre 1,5 y 3 minutos; y en segundo lugar, las proteínas reguladoras plasmáticas y de membrana, que controlan, en diferentes niveles, la activación del complemento.

Varias de estas proteínas de control son comunes para las 2 vías de activación del complemento, por ejemplo: DAF, CR1 y el factor I, pero este último actúa en cada vía con cofactores diferentes. En la vía clásica puede tener 3 cofactores: C4b-BP, CR1 y MCP; mientras que en la vía alternativa tiene como cofactor al factor H. La vía clásica posee, además, como proteínas de control: el C1-INH, el factor J y el C4b-BP. La formación del MAC es controlada por 2 proteínas plasmáticas: la proteína S y la SP40,40; y por 2 de membrana: la HRF/C8bp y la CD59. Por otra parte, el MAC tiene un efecto de retroalimentación negativa sobre la formación de las convertasas por ambas vías (tabla 5.1).

## FUNCIONES BIOLÓGICAS DEL COMPLEMENTO

Además de la producción de lisis celular, las proteínas del complemento y los fragmentos generados durante la activación de este, participan en los procesos de inflamación, opsonización microbiana, procesamiento de inmunocomplejos y regulación de la respuesta inmune, y sus efectos biológicos están mediados por la interacción de sus productos de activación con receptores celulares específicos.

**Receptores de complemento.** En la actualidad, se conoce que la mayoría de las células poseen receptores para el complemento en sus superficies celulares. Los receptores que reconocen los fragmentos de C3 son los más estudiados, y estos no reconocen ni son bloqueados por el componente C3. Existen receptores para C3b, iC3b, C1q, C5a y para otras muchas proteínas del complemento.

El receptor CR1 tiene afinidad por C3b y una amplia distribución celular. El 90 % de estos receptores se encuentra sobre los eritrocitos, por la superioridad en número de esta población. Las funciones de CR1 varían según la célula que lo expresa. En los eritrocitos, estos receptores forman agrupamientos que facilitan la captación de inmunocomplejos recubiertos por C3b, que son transportados por el torrente sanguíneo hacia el hígado, donde las células del sistema fagocítico-mononuclear

**Tabla 5.1** Proteínas reguladoras del sistema del complemento

Proteínas reguladoras del sistema del complemento			
	Regulador	Acción sobre	Vía de activación
<b>Plasmáticas</b>	C1-INH	C1	Clásica
	Factor J	C1	Clásica
	C4b-BP	C4b	Clásica
	Factor I	C3b, C4b	Ambas
	Properdina	Convertasas	Alternativa
	Proteína S	C5b, C6b, C7b	CAM
	Sp40,40	C5b, C6b, C7b	CAM
	Carboxi-peptidasa N	Anafilotoxinas	Ambas
<b>De membrana</b>	CR1	Convertasas	Ambas
	DAF (CD55)	Convertasas	Ambas
	MCP (CD46)	C3b, C4b	Clásica
	HRF/C8bp	C8	CAM
	CD59	C9	CAM

**Leyenda**

CAM: Complejo de ataque a la membrana.

que expresan receptores Fc, CR1 y CR3 captan y fagocitan los inmunocomplejos liberados por los eritrocitos, sin que estos queden dañados. También CR1 puede actuar como cofactor del factor I en la conversión de C3b en iC3b y C3d, ya que, aunque estos fragmentos no son ligandos del CR1, el inmunocomplejo se disocia de los eritrocitos, pero se vuelve a unir por medio de otra de las moléculas de C3b que lo opsonizan. Este proceso de asociación-disociación hace que los inmunocomplejos reduzcan su tamaño y pierdan potencial inflamatorio, ya que los fragmentos iC3b y C3d no son capaces de proseguir la activación. Otra función del complemento en el metabolismo de los inmunocomplejos, es mediante la acción del C3b que se deposita en ellos y bloquea las interacciones Fc-Fc, lo que evita la formación de grandes agregados y solubiliza los ya formados. En los neutrófilos y monocitos, el CR1 media la fagocitosis de partículas o microorganismos opsonizados con C3b.

El receptor CR2 se expresa en los linfocitos B y se une al fragmento de degradación C3d. Su función es servir de cofactor al factor I en la degradación de iC3b y tiene propiedades inmunorreguladoras. Actúa como sitio de unión y penetración del virus de Epstein-Barr.

Los receptores CR3 y CR4 pertenecen a la familia de las integrinas, proteínas de adhesión leucocitaria. Son importantes en la fagocitosis de microorganismos opsonizados con iC3b, y su ligando es específico. Promueven la adhesión al endotelio de neutrófilos (CR3) y monocitos (CR4). La opsonización por complemento

del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) facilita la infestación de macrófagos y monocitos por vía CR3 (tabla 5.2).

**Anafilotoxinas y quimiotaxis.** Producto de la activación de C3, C4, y C5, se derivan 3 pequeños péptidos: C3a, C4a y C5a, conocidos como anafilotoxinas. Su actividad biológica depende de una arginina en posición carboxilo-terminal, que es eliminada por la acción de una enzima plasmática, la carboxi-peptidasa N, que reduce su actividad de manera importante. Estas anafilotoxinas actúan de manera directa sobre la musculatura lisa y causan contracción en el útero, tráquea, arterias, intestinos, y otros, mediante la unión a receptores específicos. Por otra parte, los mastocitos y basófilos poseen receptores para estas anafilotoxinas y se produce la liberación de mediadores químicos (por ejemplo, la histamina), que también causan la contracción de la musculatura lisa y un aumento de la permeabilidad vascular. El C5a, la más potente de las anafilotoxinas, tiene también propiedades quimiotácticas, que hacen que durante la respuesta inflamatoria varios tipos celulares migren hacia el área en que ocurre la lesión. La quimiotaxis de las células polimorfonucleares, macrófagos, basófilos y eosinófilos, es característica de la respuesta inflamatoria. Se sabe que el C5a puede dirigir la migración de esas células a las áreas de inflamación inducidas por endotoxinas bacterianas o por inmunocomplejos.

**Tabla 5.2** Receptores del complemento

Receptores del complemento											
Distribución celular											
Receptor	Especificidad	Eritrocitos	Neutrófilos	Monocitos y macrófagos	Basófilos y mastocitos	Eosinófilos	Plaquetas	Linfocitos B	Linfocitos T	Células NK	Células dendríticas
<b>CR1 (CD35)</b>	C3b, C4b, iC3b, C3c *	+	+	+		+		+	+/-		+
<b>CR2 (CD21)</b>	C3d, iC3b, C3d *							+			+
<b>CR3 (Mac-1)</b>	iC3b, C3d *		+	+		+			+	+	+
<b>CR4 (p150/95)</b>	iC3d		+	+		+			+	+	
<b>CR5</b>	C3d		+				+				
<b>C3aR</b>	C3a, C4a		+	+	+	+			+		
<b>C5aR</b>	C5a		+	+	+		+				
<b>C1qR</b>	C1q		+	+			+	+			
<b>HR</b>	Factor H		+	+				+			
<b>DAF</b>	C4b2a, C3bBb	+	+				+				
<b>MCP</b>	C3b, C4b		+	+			+	+	+		
<b>HRF/C8bp</b>	C8, C9	+	+				+				
<b>CD59</b>	C8, C9	+	+				+				

**Leyenda**

\* Ligandos de baja afinidad.

Además de esto, el C5a estimula el metabolismo oxidativo de los neutrófilos y la producción de metabolitos tóxicos de oxígeno, así como desencadena la liberación de enzimas lisosomales de diversas células fagocíticas. Todo esto trae como resultado la acumulación de células y proteínas séricas, necesarias para una respuesta inflamatoria adecuada frente a agentes infecciosos o partículas extrañas.

Otros fragmentos del complemento pueden influir sobre la proliferación de los linfocitos, la producción de anticuerpos o la cooperación entre células inmuno-competentes. Por ejemplo, el C3a puede inhibir la formación de anticuerpos, al actuar sobre los linfocitos T

supresores; mientras que el C5a puede estimularla, al actuar sobre las células T cooperadoras.

El sistema del complemento es un punto importante en el potencial defensivo disponible del sistema inmune. La lisis celular, la opsonización de microorganismos, la solubilidad, el aclaramiento de inmunocomplejos y la inflamación, son algunas de sus funciones más importantes. La activación del complemento que está en relación directa con el grado de lesión de los tejidos afectados, es un fenómeno biológico que se produce en muchas enfermedades. La medición de los fragmentos o complejos que se generan durante la cascada de activación, es muy útil para valorar la actividad de estas (tabla 5.3).

**Tabla 5.3** Actividades biológicas de los componentes del complemento

Componente	Actividad biológica
C1	Estabiliza los inmunocomplejos
C2	Vasodilatación, incrementa la permeabilidad vascular
C3a	Anafilotoxina
C3b	Opsonización, activación linfocitaria
C4a	Anafilotoxina
C4b	Neutralización de virus
C5a	Anafilotoxina, principal factor quimiotáctico
C5b, C6b, C7b	Quimiotaxis

medio de vidrio, o de manera natural con materiales con actividad biológica como el lípido A de la endotoxina de bacterias gramnegativas, provoca su ruptura y activación. Este factor roto ( $\alpha$ HFa) tiene actividad proteolítica y puede romper moléculas adicionales del factor de Hageman para generar más  $\alpha$ HFa. El factor de Hageman está formado por una cadena única, que al romperse produce 2 cadenas, una pesada y una ligera, que se mantienen unidas por puentes disulfuro, y su actividad enzimática reside en la cadena ligera. La rotura también puede ser catalizada por la calicreína. El  $\alpha$ HFa puede actuar sobre el complejo cininógeno de APM-factor XI y activa el factor XI a factor Xia. Este, por su parte, puede activar la cascada de la coagulación. El  $\alpha$ HFa puede interactuar con el complejo de cininógeno de APM-precalicreína para romper la precalicreína de cadena simple en una molécula de 2 cadenas (calicreína), con cadenas que se asocian mediante enlaces disulfuro. Para facilitar la rotura del factor XI y la calicreína, los complejos de cininógeno de APM se unen a la superficie activadora cerca del factor de Hageman.

## CASCADA DE LAS CININAS

El segundo sistema en importancia en la formación de mediadores sanguíneos, es el sistema generador de cininas. Su producto final principal es la bradicinina, un nonapéptido de poderosa actividad, que incrementa la permeabilidad vascular, la vasodilatación, la hipotensión, la contracción de diversos tipos de musculatura lisa y la activación de la fosfolipasa A, con la subsiguiente activación del metabolismo del ácido araquidónico celular.

### PROTEÍNAS DE LA CASCADA DE LAS CININAS

Las proteínas plasmáticas que constituyen el sistema generador de bradicinina son: el factor de Hageman, el factor de coagulación XI, la precalicreína y el cininógeno de alto peso molecular (cininógeno de APM).

El factor de Hageman circula como proteína plasmática de una sola cadena y sin formar complejos. El factor de coagulación XI se encuentra como un complejo con el cininógeno de APM, en una relación molar 2:1. La precalicreína circula en forma de complejo con el cininógeno de APM, pero en una relación molar de 1:1.

### ACTIVACIÓN DE LAS CININAS

La interacción del factor de Hageman con una superficie de carga negativa, como la que se obtiene por

### REGULACIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE LA GENERACIÓN DE CININAS

La calicreína activa tiene la propiedad de romper al  $\alpha$ HFa, por lo que se pierde la cadena pesada, pero no la ligera, y se forma la  $\alpha$ HFa, que mantiene su propiedad de activar al complejo cininógeno de APM-precalicreína. Pero este no permanece fijo a la superficie ni interactúa de modo eficaz con el complejo cininógeno-factor XI. La precalicreína es una glucoproteína de una sola cadena, que se activa por rotura del puente disulfuro. Su sitio enzimático está ubicado en la cadena ligera, y el sitio de unión de superficie se halla en la cadena pesada. La calicreína activa puede romper el cininógeno de APM en diversos sitios para liberar la bradicinina del cininógeno. La bradicinina tiene una vida media corta, puesto que interactúa con la carboxi-peptidasa N, lo que elimina la arginina C-terminal, para formar la molécula denominada des-Arg bradicinina, que pierde la capacidad de contracción de la musculatura lisa que tiene la bradicinina, y no induce extravasación plasmática capilar cuando se inyecta en la piel, pero mantiene algunos de sus efectos vasculares. La des-Arg bradicinina, a su vez, es rota por la enzima convertidora de angiotensina, para formar péptidos de bajo peso molecular que carecen de actividad biológica.

## INHIBIDORES PLASMÁTICOS DE LA GENERACIÓN DE CININAS

Los inhibidores de este sistema generador de mediadores son 3: C1-INH,  $\alpha_2$ -macroglobulina e inhibidor de  $\alpha_1$ -proteínasa. La calicreína activa es inhibida por el C1-INH y por la  $\alpha_2$ -macroglobulina, pero el inhibidor de la C1 contribuye, en mayor parte, a la inactivación. La inactivación del factor XIa es mediada por el C1-INH y la  $\alpha_1$ -proteínasa, mientras que el primero de estos es el principal inhibidor del factor de Hageman.

## CININÓGENO DE BAJO PESO MOLECULAR Y CALICREÍNAS HÍSTICAS

El cininógeno de bajo peso molecular (cininógeno de BPM), es una proteína presente en el plasma, que tiene una cadena pesada idéntica a la del cininógeno de APM. El cininógeno de BPM puede actuar como fuente de bradicinina, pero no se rompe con facilidad por medio de la calicreína. Sin embargo, hay calicreínas hísticas (calicreínas de bajo peso molecular que se encuentran en los tejidos) que pueden romper el cininógeno de BPM hasta lisilbradicinina (bradicinina con una lisina unida adicional) y que puede sufrir la misma vía de degradación que la bradicinina.

## INTERRELACIÓN ENTRE EL COMPLEMENTO Y OTROS MEDIADORES SANGUÍNEOS

Existe una relación bioquímica entre el sistema del complemento, la coagulación y las cininas. En primer lugar, el concepto de activación en los 3 sistemas esta

relacionado con la consecutiva ruptura enzimática de muchos de sus componentes y, por otra parte, muchos componentes activos de un sistema ejercen sus efectos en algunos de los otros. Un ejemplo de esto es el C1-INH, que no solo controla la C1r y la C1s, sino que también inhibe la calicreína, la plasmina y los factores XII y XI de la coagulación. Otro ejemplo es la plasmina, que es capaz de activar al componente C3 del complemento y, aunque esto no es importante en condiciones fisiológicas, sí lo es en condiciones de *shock*, como en la coagulación intravascular diseminada o en el síndrome de distrés respiratorio, en que los 3 sistemas se activan de manera simultánea.

## BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- Benjamín E, Leskowitz S. Immunology: a short course. 2<sup>da</sup>. ed. New York: Wiley-Liss Publication, 1993.
- Douglas GN. Complement System. 2<sup>a</sup> ed. La Jolla: Behring Diagnostics, 1984.
- Frank MM. Complemento y Cininas. En: Stites DP, Terr AI, Parslow TG ed. Inmunología Básica y Clínica. 8<sup>va</sup>. Ed. México, DF: Editorial El Manual Moderno, 1996.
- Goldstein IM. Complement: Biologically active products. En: Gallin JE, Goldstein IM, Snyderman R (eds.). Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates. 2<sup>da</sup>. ed. Raven Press, 1992.
- Janeway CA. How the immune system recognizes invaders. *Scient Am* 1993, Sept: 41-47.
- Kozin F, Cochrane CH. The contact activation system of plasma: Biochemistry and pathophysiology. En: Gallin JE, Goldstein IM, Snyderman R (eds.). Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates. 2<sup>da</sup>. ed. Raven Press, 1992.
- Porcel JM, Vergani D. El sistema de complemento: una fascinante cascada biológica. *Med Clin (Barc)* 1993; 100:428-35.
- Roitt I, Brostoff J, Male D. Inmunología. 4<sup>ta</sup> ed. Madrid: Harcourt Brace, 1997.



## **CONTENIDO**

---

**Introducción/ 443**

**Inicio de la respuesta inflamatoria aguda y principales cambios fisiológicos a la agresión/ 444**

**Principales mediadores involucrados en la inflamación/ 444**

**Migración de los leucocitos desde los vasos sanguíneos hacia el sitio de la lesión/ 447**

**Papel de las quimiocinas en el reclutamiento celular/ 450**

**Respuesta de fase aguda/ 452**

**Inflamación mediada por la respuesta adaptativa/ 454**

**Inflamación mediada por anticuerpos citotóxicos/ 455**

**Inflamación mediada por complejos inmunitarios/ 455**

**Inflamación mediada por linfocitos TH1 y CD8 citotóxicos/ 455**

**Bibliografía recomendada/ 457**

# Capítulo 38

## INFLAMACIÓN

*Dra. Alina Alerm González*

### RESUMEN

La inflamación involucra muchos mecanismos, algunos de ellos inducidos por citocinas liberadas por los fagocitos como respuesta a la infección por los patógenos, durante la respuesta innata o no adaptativa. Sus principales efectos son: cambios locales en el calibre y la permeabilidad de los vasos sanguíneos, así como reclutamiento de células fagocíticas e inmunocompetentes y de moléculas hacia el sitio de la lesión; estimulación para la producción de las proteínas de fase aguda por el hígado, que se unen a las moléculas de la superficie bacteriana y activan el complemento, con lo que provocan su destrucción o estimulan la fagocitosis, al actuar como opsoninas; elevación de la temperatura corporal, lo que es deletéreo para ciertos microorganismos e incrementa la respuesta inmune. Puede producirse inflamación y daño hístico, como consecuencia de la respuesta adaptativa por medio de mecanismos que involucran anticuerpos de diferentes isotipos y células inmunocompetentes, frente a: alérgenos, antígenos exógenos modificados o pobremente catabolizados o autoantígenos, con la participación de células y mediadores de la respuesta no adaptativa, de manera que colaboran sistemas efectores específicos y no específicos.

### INTRODUCCIÓN

La inflamación es un proceso fisiológico, mediante el cual los tejidos vascularizados responden a cualquier lesión o daño. Durante el proceso de la inflamación, actúan de manera sinérgica, mediadores solubles y células que limitan y eliminan al agente causal del distrés. El proceso inflamatorio es crucial en la salud y la integridad del organismo; cuando no es controlado de manera adecuada puede provocar una destrucción hística masiva. En este sentido, el concepto de inflamación debe manejarse como un arma de doble filo. Los cuatro síntomas y signos básicos de la inflamación –rubor, calor, dolor y tumor– fueron descritos por Cornelius Celsus en el siglo I d.n.e. John Hunter fue el primer contribuidor a la apreciación de la inflamación como un fenómeno defensivo y opuesto a la enfermedad. Por su parte, Cohnheim realizó por primera vez la descripción microscópica del proceso inflamatorio. El descubrimiento de la quimiotaxis y la fagocitosis por Metchnikoff, las evidencias de la existencia de las

opsoninas que facilitan la fagocitosis, ofrecidas por los trabajos de A. Wright, así como de la capacidad vasoactiva de la histamina a través de los experimentos de Dale y Laidlaw, constituyeron hitos importantes en la comprensión de los mecanismos involucrados en la defensa del organismo, a través del fenómeno de la inflamación. Luego, los estudios de Lewis permitieron sugerir que las modificaciones que se producen durante la inflamación eran consecuencia de la liberación de cierta sustancia que provocaba la vasodilatación y a la cual denominó sustancia H, creyendo que se trataba de la histamina.

Hoy se conoce más acerca de los procesos involucrados en el desencadenamiento de los fenómenos inflamatorios, el papel que desempeñan la vasodilatación y el incremento de la permeabilidad vascular con la subsecuente salida de plasma del interior de los vasos sanguíneos, así como la acumulación de células en el sitio de la inflamación. La inflamación que es habitualmente un fenómeno agudo, caracterizado por la

acumulación de líquido, proteínas plasmáticas y leucocitos neutrófilos, puede dar paso a un proceso de mayor duración, en el que predomina la infiltración de macrófagos y de linfocitos, cuando en alguna medida, durante el proceso de curación, la respuesta se vuelve exagerada, o cuando resulta imposible eliminar el agente causal de la infección. Hay ocasiones en que el infiltrado celular está compuesto además por leucocitos no neutrófilos, como en el caso de la infección por helmintos y en la inflamación mediada por IgE en los fenómenos alérgicos.

Este capítulo trata acerca de la respuesta inmune no adaptativa, en lo que respecta a la producción de mediadores de la inflamación, y sus efectos locales y sistémicos; las señales tanto solubles como hístias involucradas en la migración leucocitaria y en el reclutamiento de nuevas células fagocíticas hacia el sitio de la infección; así como la inflamación mediada por la respuesta inmune adaptativa, cuyas modalidades tradicionalmente han recibido la denominación de reacciones de hipersensibilidad.

## **INICIO DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA AGUDA Y PRINCIPALES CAMBIOS FISIOLÓGICOS A LA AGRESIÓN**

La vía por la que se inicia el proceso inflamatorio, depende, en gran medida, de la puerta de entrada y del tipo de sustancia extraña y, en cierto grado, depende también de las características del individuo y de las circunstancias en que se produzca el reto. Los patógenos pueden iniciar la inflamación mediante mecanismos diferentes e idiosincrásicos, que incluyen la activación del sistema de proteasas plasmáticas como consecuencia de su interacción con productos de la degradación de las paredes bacterianas, y también mediante la secreción de toxinas que son capaces de activar la respuesta inflamatoria. A su vez, las células dañadas pueden liberar productos de degradación que inician una o más de las cascadas de estas proteasas y pueden, además, incrementar la expresión de citocinas proinflamatorias que intensifican el proceso.

Independientemente del agente desencadenante, existen cambios fisiológicos que siempre acompañan a la inflamación aguda y que son de 4 tipos: la vasodilatación, el incremento de la permeabilidad vascular, el reclutamiento y la activación de los neutrófilos, y la fiebre. La vasodilatación, precedida a menudo por un breve período de vasoconstricción, es una de las primeras respuestas fisiológicas frente al daño hístico. En ella están involucradas, en primer término, las arteriolas y, luego, el lecho capilar. Esto provoca un incremento

en el flujo sanguíneo, que ocasiona un enrojecimiento (rubor) y el incremento de la temperatura (calor) del área en la que se encuentra el foco de la inflamación. En condiciones normales, las células del endotelio vascular funcionan como una membrana semipermeable que restringe las proteínas plasmáticas al espacio intravascular; pero, en repuesta al estímulo inflamatorio, las células endoteliales en las vénulas se contraen, lo que amplía las uniones intercelulares, hasta formar intersticios que permiten el paso de líquido y de proteínas del plasma hacia el espacio extravascular (tumor). Ello permite que lleguen al sitio de la lesión moléculas mediadoras y efectoras (anticuerpos) importantes en la defensa frente a la agresión. El reclutamiento y activación de los neutrófilos, que se expone con mayor detalle en otro acápite de este mismo capítulo, constituyen elementos cruciales en la respuesta inflamatoria. Se identifican varias etapas que van desde la marginación y la adherencia a las células endoteliales hasta que entran al tejido, y pasan a través de los intersticios formados entre las uniones de estas células.

La fiebre es producida tanto por sustancias liberadas por las bacterias (pirógenos bacterianos), como por los leucocitos, en respuesta a diferentes estímulos (pirógenos endógenos). Los pirógenos ejercen sus acciones sobre los mecanismos reguladores de la temperatura, centrados en la región termorreguladora hipotalámica. Existe un gran número de mediadores proinflamatorios, liberados por células fagocíticas activadas. Entre las funciones que se atribuyen a la elevación de la temperatura corporal está la disminución de la tasa de crecimiento bacteriano y viral, el favorecimiento de los mecanismos de la inmunidad innata y adaptativa (por ejemplo, el incremento de la actividad fagocítica, de la movilidad de los PMN, así como el aumento del procesamiento antigénico con la consiguiente activación de las poblaciones linfoides) y el desempeño crítico en la inducción de la respuesta por parte del hígado, para sintetizar proteínas de fase aguda.

## **PRINCIPALES MEDIADORES INVOLUCRADOS EN LA INFLAMACIÓN**

Los fenómenos vasoactivos, así como el reclutamiento de las células fagocíticas y de las moléculas efectoras hacia el sitio de la infección, se producen como consecuencia de la liberación de múltiples mediadores de la inflamación, los cuales ejercen sus efectos sobre los eventos de este proceso. Entre esos mediadores solubles se reconocen los siguientes: las proteasas plasmáticas, los mediadores lipídicos, los péptidos y las aminas, los metabolitos del oxígeno y las citocinas proinflamatorias.

Los 3 grupos principales de proteasas plasmáticas son: el sistema del complemento, el sistema de las cininas y los sistemas de la coagulación y el fibrinolítico. Aunque fueron analizados ya los componentes del sistema del complemento, las vías de activación y los mecanismos para su regulación, es necesario recordar que por medio de escisiones proteolíticas secuenciales, las proteínas del complemento son activadas y promueven una respuesta inflamatoria, mediante su unión con los agentes extraños. Esto incrementa la fagocitosis y los componentes C3b y C4b funcionan como pequeñas proteínas con acciones vasoactivas y quimiotácticas para las células inflamatorias (C3a y C5a) y se crean complejos líticos multiproteicos (C5b-9).

El sistema de las cininas, del que también se ha tratado en este texto, tiene como producto final la bradisinina, una sustancia inductora de la contracción del músculo liso y que incrementa la permeabilidad vascular. Su papel en la inflamación está relacionado con esas funciones, y la cascada de activación se desencadena a partir de ciertos productos del daño hístico —la colágena, el cartílago y las membranas basales—, así como por endotoxinas y materiales inorgánicos activadores del factor XII de la coagulación. El factor XII media entonces la escisión de la precalicreína hacia calicreína, y esta última escinde al cininógeno, que está en estado de proenzima, para producir la bradisinina. El factor XII representa una intersección crucial entre estos sistemas, ya que puede ser activado por la calicreína, que es el producto de su acción proteolítica sobre la precalicreína, lo cual origina un sistema de retroalimentación positiva (a más calicreína más factor XII, a más factor XII más calicreína), además de tener como activador también a la plasmina, un producto de la proteólisis de las proteínas fibrinolíticas.

A su vez, las proteínas de la coagulación y del sistema fibrinolítico contribuyen, de manera significativa, a la respuesta inflamatoria, por medio de la activación de ese mismo factor XII, que también escinde el fibrinógeno hacia la formación de fibrina, con lo que se originan pequeños fibrinopéptidos que tienen funciones moduladoras de la inflamación. La relación factor XII-plasmina es también del tipo de retroalimentación, ya que la plasmina es capaz de activar el factor XII. Este, a su vez, actúa sobre las proteínas del sistema fibrinolítico y genera la proteasa plasmina. La plasmina, de manera similar al factor XII, representa un sitio de intersección importante para los 3 sistemas de proteasas, ya que su actividad está dirigida hacia distintas direcciones: genera productos de la escisión de la fibrina, los cuales se comportan como mediadores inflamatorios; su

actividad aumenta la producción de factor XII activado y activa el sistema del complemento a través de la proteólisis de C3.

Otros mediadores liberados por las células fagocíticas como respuesta a los agentes infecciosos y que juegan un importante papel en los mecanismos de la inflamación, los constituyen una gran variedad de moléculas. Entre ellas se encuentran las prostaglandinas, los leucotrienos, en particular el leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), el factor activador de plaquetas (PAF) y un nuevo grupo conocido como lipoxinas. Las prostaglandinas y los leucotrienos son moléculas derivadas del metabolismo del ácido araquidónico. Tienen diferentes acciones biológicas, muchas de ellas proinflamatorias, en particular, el LTB<sub>4</sub>, que es un potente quimioattractante para los leucocitos. Los fosfolípidos son componentes principales de las membranas, y las fosfolipasas presentes en los leucocitos, plaquetas y otras células son activadas durante la inflamación y los fosfolípidos se degradan para formar el ácido araquidónico. Este puede, a su vez, ser metabolizado por la enzima ciclo-oxigenasa y formar prostaglandinas, y puede ser metabolizado por la enzima lipo-oxigenasa hacia la formación de los ácidos hidroxi-eicosatetraenoicos (HETE) y derivados del 5-hidroperoxieicosatetranioco, denominados leucotrienos. De acuerdo con las isomerasas de las enzimas que estén presentes en un tejido en particular, así serán los productos finales de ese metabolismo, incluyendo las prostaglandinas, los tromboxanos y las prostaciclinas.

Durante la inflamación, la producción de prostaglandinas es regulada por varios mecanismos, como son: el incremento en la accesibilidad de los sustratos lipídicos y de la actividad de la fosfolipasa, así como por el aumento en los niveles de actividad de la ciclooxigenasa. Las fuentes principales de prostaglandinas incluyen los fagocitos mononucleares, las células endoteliales y las plaquetas. Su síntesis aumenta durante la inflamación a partir de diferentes estímulos, que incluyen las endotoxinas bacterianas, los complejos inmunes, el C3a, la bradisinina y la interleucina 1 (IL-1). Las prostaglandinas median sus efectos proinflamatorios a través de receptores específicos en las células diana. Se conoce que la prostaglandina E<sub>2</sub> incrementa la permeabilidad vascular, es pirogénica y aumenta la sensibilidad al dolor. Por otra parte, los leucotrienos son sintetizados y liberados a partir de los neutrófilos y, en un menor grado, a partir de los eosinófilos. También, pueden ser incorporados por los eritrocitos, las plaquetas y las células endoteliales, en las que pueden ocurrir transformaciones metabólicas de un tipo de leucotrieno a otro. Leucotrienos, como el LTC<sub>4</sub> y el LTD<sub>4</sub> estimulan la

broncoconstricción, y desempeñan una función importante en el asma bronquial. Los macrófagos, granulocitos y basófilos son fuentes importantes de leucotrieno B<sub>4</sub>, el cual es sintetizado en concentraciones importantes durante la inflamación.

El factor activador de plaquetas (PAF) se deriva del glicerol fosfato, y existe en forma soluble y celular en las células endoteliales. Su principal acción en la inflamación se relaciona con el incremento de la adherencia de los neutrófilos al endotelio de los vasos.

Entre los péptidos y las aminas proinflamatorias se encuentran 2 de las que hace más tiempo se conocen, la histamina y la serotonina, así como ciertos neuropéptidos, que también participan en la inflamación. Su papel primordial está relacionado con la inflamación frente a la invasión e infestación por helmintos y la mediada por la respuesta inmune en la enfermedad alérgica, las cuales serán expuestas más adelante. La histamina es un producto de la descarboxilación del aminoácido histidina, es sintetizada y almacenada en los mastocitos hísticos y en los basófilos, y liberada como respuesta a una gran variedad de estímulos. Difunde muy rápido a través de los tejidos y del torrente sanguíneo y promueve múltiples efectos inflamatorios, como son: la vasodilatación, el incremento de la permeabilidad vascular y la interacción con el sistema nervioso periférico. Ella es reconocida por receptores específicos identificados como H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> y H<sub>3</sub>. La serotonina, derivada del triptófano, se almacena en las plaquetas, en los mastocitos y en las células enterocromafines del tracto gastrointestinal, y se libera como producto de la degranulación de estas células. De manera similar a la histamina, la serotonina tiene propiedades vasoactivas mediadas por su unión a receptores, a pesar de que su papel en la inflamación no está bien definido.

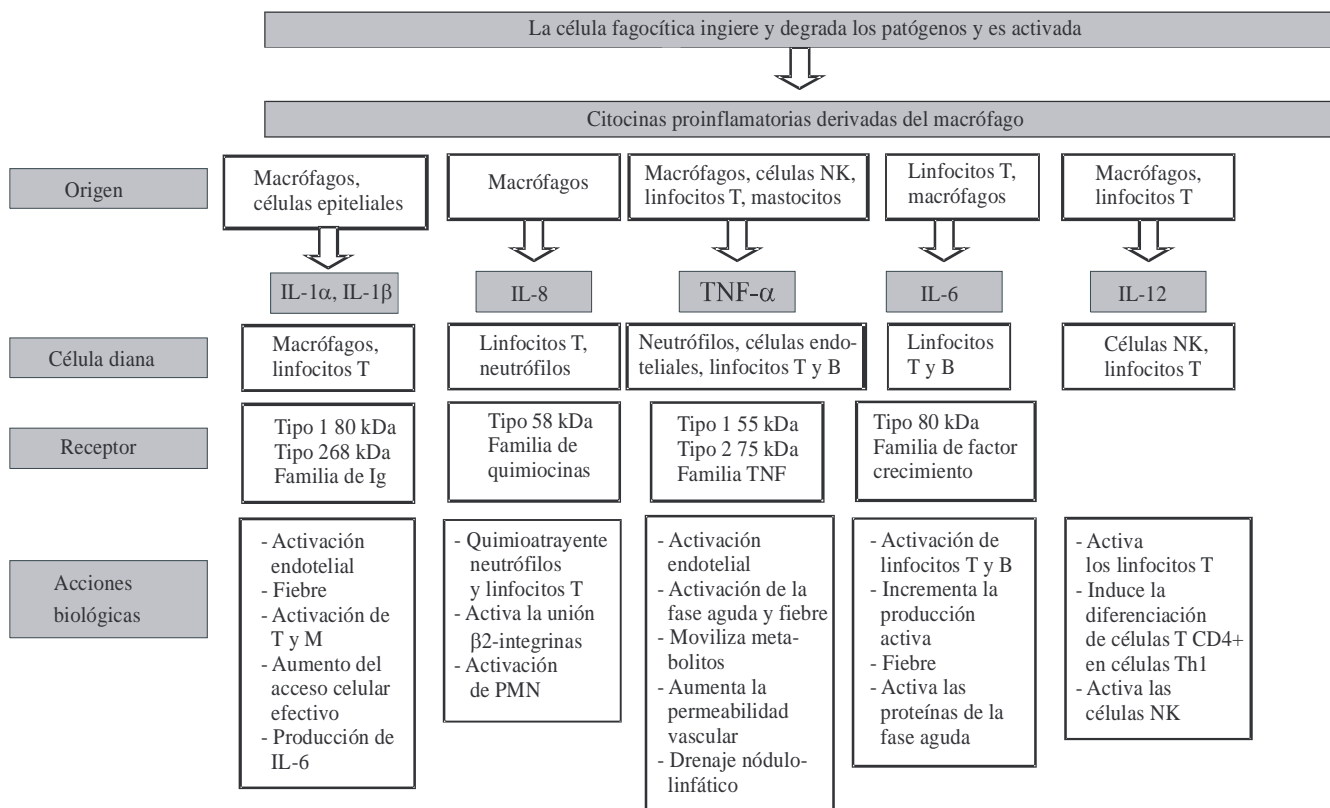
Los neuropéptidos se encuentran entre muchos de los componentes que conectan el sistema nervioso y la respuesta inflamatoria. Como grupo, son mediadores de la inflamación liberados por las neuronas en respuesta al daño hístico local. Este grupo de mediadores incluye la sustancia P, el péptido vasoactivo intestinal, la somatostatina y el péptido relacionado con los genes, la calcitonina. Se encuentra en estudio el papel que juegan las enzimas degradadoras de los neuropéptidos, como la endopeptidasa neutral, detectada en las membranas de los neutrófilos.

Entre los metabolitos del oxígeno, los que han sido más estudiados en cuanto a su papel en la defensa del organismo, son los que se producen como consecuencia del estallido respiratorio en las células fágicas y que conducen a la muerte de los patógenos. No obstante, a pesar de que se sabe que el óxido nítrico (NO)

tiene actividad como neurotransmisor y como agente mantenedor de la estabilidad hemodinámica, su verdadero papel en la defensa del organismo es un asunto muy controvertido. Los resultados más recientes indican que el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) y el interferón gamma (IFN $\gamma$ ) sinergizan en la activación de los macrófagos, sobre todo en la inducción del NO, el cual posee una amplia actividad microbicida. El óxido nítrico, producido por la enzima sintetasa del óxido nítrico, parece jugar un papel importante en las infecciones por patógenos intracelulares.

Las citocinas secretadas por los fagocitos en respuesta a la ingestión y degradación de ciertas bacterias forman un grupo de moléculas diferentes desde el punto de vista estructural y funcional. Entre las más importantes se incluyen la interleucina 1 (IL-1), la interleucina 6 (IL-6), la interleucina 8 (IL-8), la interleucina 12 (IL-12) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ). El TNF- $\alpha$  es una citocina proinflamatoria típica, ya que incrementa la permeabilidad vascular, con la consiguiente entrada de componentes del complemento, inmunoglobulinas y células, además de que moviliza metabolitos y es capaz de provocar *shock*. La IL-1 es el principal mediador de inflamación, y se produce por monocitos y macrófagos activados. La actividad de IL-1 se produce por dos polipéptidos (IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ), y en los linfocitos y los fibroblastos se encuentran receptores de alta afinidad para esta citocina. La IL-1, la IL-6 y el TNF- $\alpha$  provocan efectos sistémicos como la producción de fiebre, y la llamada reacción de fase aguda. La IL-1 y el TNF- $\alpha$  activan el endotelio vascular, e incrementan la expresión de las moléculas de adhesión que participan en la marginación y la diapédesis de los polimorfonucleares neutrófilos (proceso que será analizado más adelante). La IL-8, por su parte, es un potente quimiotáctico para neutrófilos y activa la unión mediada por las integrinas. Las características más generales de la estructura, receptores, células de origen, células diana y efectos locales y sistémicos de estas citocinas se resumen en la figura 5.12.

Hay otras dos citocinas, que si bien no son producidas por los macrófagos activados, tienen un papel importante en la inflamación, ya sea a corto o a largo plazo. Ellas son: el interferón gamma (IFN $\gamma$ ) y la interleucina 4 (IL-4). El IFN $\gamma$ , sintetizado por los linfocitos T y por las células asesinas naturales (NK) durante la infección, provoca un aumento en la generación de especies muy reactivas del oxígeno, y altera los antígenos de la superficie celular de los macrófagos. Esto les permite eliminar los patógenos que los han invadido. Se ha evidenciado también que el IFN $\gamma$  es capaz



**Figura 5.12** Características principales de las citocinas secretadas por los fagocitos como respuesta a la ingestión y degradación de bacterias.

de activar las células del endotelio vascular y en un menor grado los neutrófilos. Las acciones de la interleucina 4 (IL-4) están relacionadas con la inflamación alérgica, e incluyen: la estimulación del desarrollo de los basófilos, es quimiotáctica para los eosinófilos y la expresión de la inmunoglobulina E (IgE) en la superficie del linfocito B. La IL-4 también participa en la fusión celular relacionada con la formación de granulomas, y se le atribuyen también acciones antiinflamatorias.

## MIGRACIÓN DE LOS LEUCOCITOS DESDE LOS VASOS SANGUÍNEOS HACIA EL SITIO DE LA LESIÓN

Durante la reacción inflamatoria se produce la extravasación de los leucocitos del torrente circulatorio a los focos de inflamación. El conjunto de pasos sucesivos que ocurren desde el contacto inicial de los leucocitos con las células del endotelio vascular hasta alcanzar la matriz extracelular, tiende a considerarse una cascada similar a la que ocurre durante la activación del sistema del complemento o de la coagulación. Todos estos procesos están regulados y controlados por las moléculas de adhesión.

En condiciones normales, los leucocitos están restringidos a la parte central de los vasos sanguíneos,

donde el flujo es más rápido. En los sitios donde se han producido los primeros cambios inflamatorios y los vasos están dilatados, el ralentecimiento del flujo sanguíneo permite a los leucocitos separarse de la corriente central e interactuar con las células endoteliales. Este contacto inicial de los leucocitos y las células endoteliales es un proceso aleatorio, pero se incrementa de manera notable en los sitios de inflamación local o trauma. Ello favorece el rodamiento (*rolling*) de los leucocitos a lo largo de las células endoteliales próximas a los focos inflamatorios. Ante la presencia de sustancias inflamatorias activadoras, esta unión inicial débil se convierte en una adhesión fuerte, y los leucocitos migran por medio de los intersticios celulares hacia el tejido. De ahí, llegan a la matriz extracelular, donde alcanzan el foco inflamatorio. A estos cambios se suma el incremento de la permeabilidad vascular, lo que lleva a la acumulación, en los tejidos, de líquido rico en componentes del complemento, inmunoglobulinas y otras proteínas de la sangre. Los cambios en la adhesión leucocitaria al endotelio están mediados por la expresión de moléculas de adhesión, inducidas por los mediadores proinflamatorios. Estas moléculas de adhesión unen a los monocitos y neutrófilos circulantes a las células endoteliales e intensifican la velocidad con que ellos migran a través de las paredes de los pequeños vasos hacia los tejidos. Los monocitos migran de manera

constante a los tejidos, y allí se diferencian en macrófagos; los leucocitos se mantienen en el espacio vascular, hasta que, durante una respuesta inflamatoria, la inducción de las moléculas de adhesión en la superficie de las células endoteliales de los vasos, así como los cambios ocurridos en las moléculas que se expresan en los leucocitos, reclutan un gran número de células circulantes: primero los neutrófilos y, más tarde, los monocitos.

**Activación y adhesión leucocitaria. Mediadores y moléculas de adhesión**

Los neutrófilos en la circulación son células en reposo que solo tienen el potencial para mediar muchas de las actividades inflamatorias. Esas potencialidades se hacen reales solo cuando ellos se activan, como consecuencia de la acción de varios agentes (tabla 5.4). La unión de algunas moléculas mediadoras con sus receptores específicos transmite señales a través de la membrana de la célula, las que se relacionan con los sistemas de fosforilación, con el influjo de calcio y despolarización de la membrana. Estos fenómenos los pone en condiciones de interactuar con las moléculas que están siendo expresadas en la superficie de las células endoteliales. Todo parece indicar que el fenómeno de la activación leucocitaria es un proceso en 2 pasos, que requiere de un cambio desde el estado no receptivo hacia otro receptivo. Se identifican 4 etapas:

desde el leucocito quiescente hasta su entrada a los tejidos y llegada al sitio donde se está produciendo el daño hístico, y en cada una de ellas participan mediadores solubles y moléculas de adhesión (tabla 5.5).

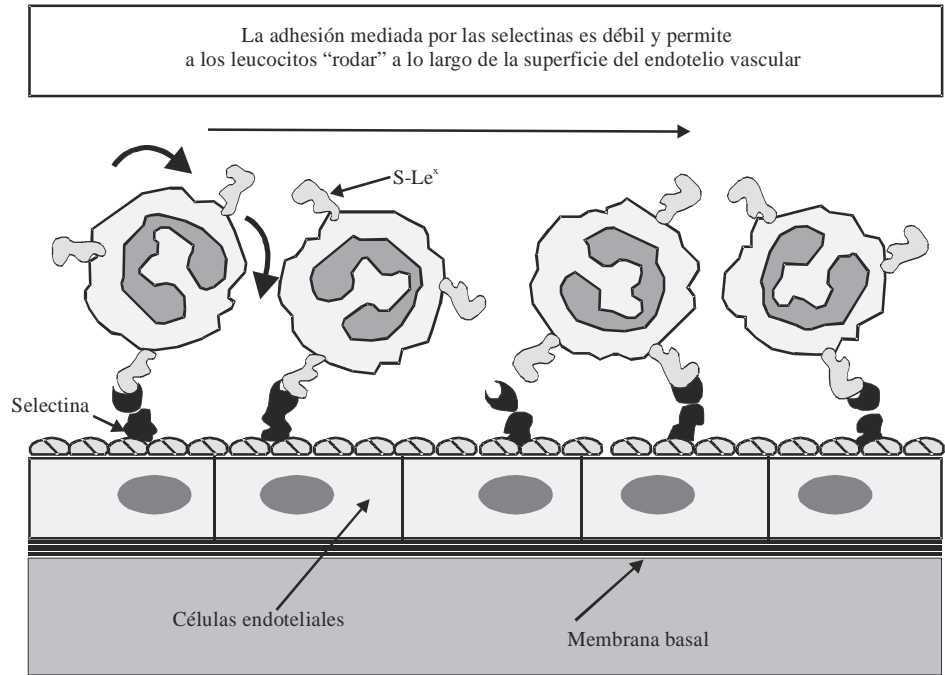
El primer paso en la adhesión leucocitaria al endotelio vascular está mediado por las selectinas. La P-selectina, que está en el interior de las células endoteliales en gránulos denominados cuerpos de Weibel-Palade, aparece sobre las células endoteliales durante los primeros minutos de la exposición al LTB<sub>4</sub>, la C5a o a la histamina. Otra molécula, la E-selectina, aparece después de pocas horas de la exposición a los lipopolisacáridos bacterianos o al TNF- $\alpha$ . Estas selectinas reconocen los epítopes de carbohidratos, en este caso la mitad del sialil-Lewis<sup>x</sup> de ciertas glicoproteínas leucocitarias. La interacción de las P-selectinas y de las E-selectinas con estas glicoproteínas de superficie, permite a los neutrófilos y monocitos unirse de manera reversible a la pared vascular, por lo que las células circulantes dan la impresión de que “ruedan” a lo largo del endotelio que ha recibido el influjo de las citocinas inflamatorias. Este tipo de interacción no permite al neutrófilo anclarse en la pared del vaso en contra de la fuerza de arrastre del flujo sanguíneo, por lo que se establece y se rompen de manera continua los contactos. Estas interacciones de adhesiones lábiles permiten el establecimiento de las interacciones más fuertes de la segunda etapa en la migración de los leucocitos (figura 5.13 a).

**Tabla 5.4** Agentes que promueven la activación de los neutrófilos

Agente	Funciones estimuladas
LTB <sub>4</sub>	Quimioattractante. Incrementa la adherencia a las células endoteliales. Activa la degranulación y la actividad de la NADPH oxidasa
C5a	Quimioattractante. Induce la adherencia y la degranulación
PAF	Induce la agregación y la adherencia. Quimioattractante. Activa la degranulación
Histamina	Induce cambios dependientes de la concentración en la “instrucción” ( <i>priming</i> ) para la quimiotaxis y la degranulación
G-CSF	Incrementa la citotoxicidad dependiente de anticuerpos, la fagocitosis, estimula la maduración en la médula ósea
GM-CSF	<i>Priming</i> . Estimula la maduración en la médula ósea
TNF- $\alpha$	Quimioattractante. <i>Priming</i> . Incrementa la fagocitosis y la citotoxicidad dependiente de anticuerpos
IL-8	Quimioattractante. Induce la degranulación y la actividad de la NADPH oxidasa

**Tabla 5.5** Principales moléculas de adhesión y mediadores solubles que participan en las fases de rodamiento, activación, adhesión, diapédesis y migración subendotelial

Rodamiento	Etapa				
	Activación	Adhesión	Diapédesis	Migración	
Leucocito	CD15s	Citocinas Quimiocinas	<i>Integrinas</i> VLA-4	<i>Integrinas</i> VLA-4	<i>Integrinas</i> VLA-5
	<i>Selectinas</i> L (CD62L)	Receptores quimiotácticos	VLA-1 LPAM 2 LFA-1 Mac-1 CR3	VLA-1 LPAM 2 LFA-1 Mac-1 Hermes	VLA-4 VLA-1 Ly24 (CD44)
Endotelio	<i>Selectinas</i> P (CD 62P) E (CD 62E)	<i>Quimiocinas</i> IL-8	<i>Familia de Ig</i> ICAM-1 ICAM-2 VCAM-1	CD31	
	<i>Diriginas</i> CD34 MadCAM-1 GlyCAM-1	<i>Selectinas</i> E (CD 62E)	<i>Diriginas</i> MadCAM-1	<i>Familia de Ig</i> ICAM-1 VCAM-1	
Tejidos	Histamina Trombina Leucotrienos	<i>Citocinas</i> GM-CSF, IL-5	<i>Citocinas</i> IL-1, TNF $\alpha$ IFN- $\gamma$ , IL-4	<i>Quimiocinas</i> IL-8	Componentes de la matriz extracelular
	<i>Citocinas</i> IL-1, TNF $\alpha$	<i>Quimiocinas</i> IL-8		<i>Quimioatrayentes</i> C5a	<i>Quimiocinas</i> IL-8
	Oxidantes	<i>Quimioatrayentes</i> C5a			<i>Quimioatrayentes</i> C5a



**Figura 5.13 (a)** Adhesión leucocitaria. Primer paso mediado por las selectinas.



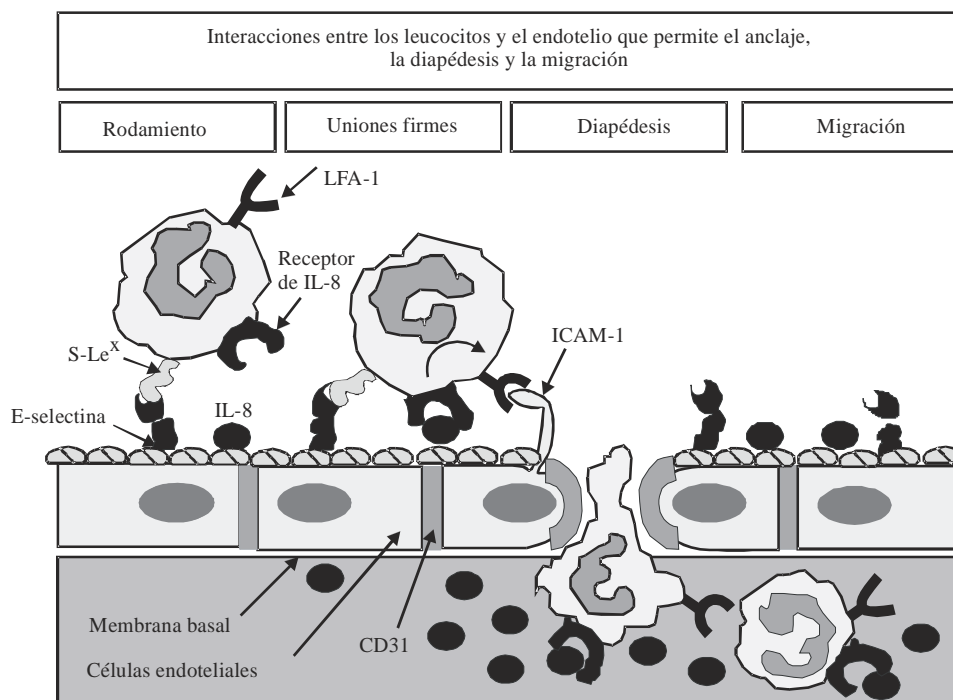
El segundo paso o etapa depende de las interacciones entre las integrinas leucocitarias conocidas como LFA-1 (CD11a:CD18) y CR3 (CD11b:CD18, también denominado Mac-1) con moléculas pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas llamadas ICAM-1, cuya expresión es también inducida en la superficie de las células endoteliales por efecto del  $\text{TNF}\alpha$ . Las moléculas LFA-1 y CR3 se adhieren débilmente, pero la IL-8 u otros quimioattractantes provocan cambios conformacionales en ambas moléculas durante el rodamiento leucocitario, con la subsiguiente modulación de la avidéz de los receptores de las integrinas, lo que incrementa su capacidad de adhesión. Como consecuencia, el leucocito se une firmemente al endotelio y el rodamiento se detiene. Otras integrinas leucocitarias se han asociado con el fenómeno de la adhesión, como: la VLA-4, VLA-1 y LPAM-2. Además del ICAM-1 endotelial se pueden mencionar otros miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas como los ligandos de las integrinas leucocitarias, que son: ICAM-2, VCAM-1 y MadCam-1. La expresión de estas moléculas en el endotelio es inducida por el  $\text{TNF}\alpha$ , la IL-1, el  $\text{IFN}\gamma$  y la IL-4.

En la tercera etapa, el leucocito se extravasa o atraviesa la pared endotelial. Este paso también involucra a las integrinas leucocitarias LFA-1 y Mac-1, así como a otras interacciones de adhesión. Estas incluyen a

moléculas de la superfamilia de las inmunoglobulinas denominadas PECAM o CD31, expresadas ambas en la superficie leucocitaria y en las uniones intercelulares del endotelio. Estas interacciones son las que le permiten al leucocito pasar, estrechándose entre los intersticios de las células endoteliales. De este modo, el leucocito penetra a las membranas basales que son matrices extracelulares con la ayuda de las enzimas proteolíticas que escinden las proteínas de esas membranas. El movimiento a través de la pared del vaso se conoce como diapédesis y le permite al leucocito alcanzar el sitio de la infección. Por último, el leucocito migra a través del gradiente de concentración de los quimioattractantes secretados por las células en el sitio de la infección (figura 5.13 b).

## PAPEL DE LAS QUIMIOCINAS EN EL RECLUTAMIENTO CELULAR

Algunas de las citocinas liberadas como respuesta a la infección, pertenecen a una familia de proteínas que se denominan quimiocinas. Estas son pequeños polipéptidos sintetizados no solo por las células fagocíticas, sino también por las células endoteliales, por los queratinocitos de la piel, y por los fibroblastos y las células musculares lisas del tejido conectivo. La IL-8, cuya contribución a la extravasación ya ha sido analizada, pertenece a esta estirpe de citocinas. Todas



**Figura 5.13 (b)** Adhesión leucocitaria. Segundo paso mediado por las integrinas.

las quimiocinas están relacionadas en su secuencia de aminoácidos, y en su principal función como quimioattractantes para células fagocíticas y para el reclutamiento de diferentes estirpes celulares durante la inflamación.

Los miembros de la familia de las quimiocinas pertenecen a 3 grandes grupos:

1. Las conocidas como quimiocinas CC, que tienen 2 residuos de cisteína adyacentes y que son codificadas en una región del cromosoma 4.
2. Las quimiocinas CXC, en las cuales los 2 residuos de cisteína están separados por cualquier otro aminoácido, codificadas en un grupo de genes ubicados en el cromosoma 7.
3. Las quimiocinas C, que poseen una sola cisteína en el mismo sitio que los otros tipos de quimiocinas. Estos 3 grupos actúan sobre diferentes tipos celulares. Se ha podido determinar que, en general, las del tipo CXC promueven la migración de los neutrófilos; las CC, lo hacen para las células mononucleares; y las del grupo C, según por lo que

hasta estos momentos se ha podido identificar, tienen funciones individuales especializadas. Un buen ejemplo de quimiocina CXC es la IL-8, y una representativa de las del tipo CC es el factor activante y quimioattractante de los macrófagos humanos (MCAF o MCP-1). La IL-8 y el MCAF tienen funciones similares aunque complementarias, pues la IL-8 induce a los neutrófilos a abandonar el torrente sanguíneo y migrar hacia los tejidos circundantes; mientras que el MCAF actúa sobre los monocitos para que migren hacia los tejidos y se transformen en células especializadas, de acuerdo con el hábitat donde se instalen. Por ejemplo, el RANTES (CC) puede promover la infiltración histica de otros tipos celulares, incluyendo las células T efectoras. Para ello actúa, de manera sinérgica, con diferentes quimiocinas sobre distintas subpoblaciones celulares. Las quimiocinas C más específicas tienen entre sus representantes a la linfotactina, que atrae a precursores de las células T hacia el timo, y también a la eotaxina, que es un potente quimioatrayente de los eosinófilos (tabla 5.6).

**Tabla 5.6** Principales quimiocinas y sus propiedades

Quimiocina	Subclase	Producida por	Efectos ejercidos sobre		
			Células T	Monocitos	Leucocitos
IL-8	CXC	Monocitos Macrófagos Fibroblastos Queratinocitos	Quimioatrayente para células T "ingenuas" ( <i>naive</i> )		Quimioatrayente y activador de neutrófilos
PBP/b-TG/NAP-2	CXC	Plaquetas			Quimioatrayente activador de degranulación
MIP-1 $\alpha$ MIP-1 $\beta$	CC	Monocitos Macrófagos Neutrófilos Endotelio	Quimioatrayente para células CD8 +		Quimioatrayente para eosinófilos
MCP-1 o MCAF	CC	Monocitos Macrófagos Neutrófilos Endotelio	Quimioatrayente para células T de memoria	Quimioatrayente activador	Quimioatrayente para eosinófilos
RANTES	CC	Células T	Quimioatrayente para células T de memoria	Quimioatrayente	Quimioatrayente para eosinófilos
Linfotactina	C	Estroma tímico Algunas células T	Quimioatrayente para células pre T hacia el timo		
Eotaxina	C	Células T <sub>H</sub> 2			Quimioatrayente para eosinófilos. Activador de eosinófilos

El papel de algunas quimiocinas como la IL-8 y el MCAF es doble en lo que respecta al reclutamiento celular: en primer lugar, convierten las interacciones iniciales del “rodamiento” (*rolling*) de los leucocitos a lo largo del endotelio vascular en uniones estables, y en segundo lugar, dirigen su migración hacia un gradiente de los quimiotácticos que incrementa en concentración hacia el sitio de la infección. Esto se logra mediante la unión de las pequeñas moléculas solubles del quimioatrayente –ya fijadas a sus receptores en las células que están migrando– a las de los proteoglicanos presentes en la matriz extracelular y en la superficie de las células endoteliales. De esta forma, las quimiocinas se despliegan sobre un sustrato sólido, a lo largo del cual los leucocitos pueden migrar. Una vez que los leucocitos han atravesado el endotelio y las membranas basales, para entrar a los tejidos, su migración hacia el foco de infección es dirigida por el gradiente de las moléculas de quimiocinas asociadas con la matriz.

Las quimiocinas pueden ser producidas por una amplia gama de células, como respuesta al estímulo ejercido por productos bacterianos, virus y agentes que provocan daño físico y ponen en acción el reclutamiento de las células fagocíticas hacia el sitio de la lesión. Tanto la IL-8 como la MCAF activan también sus respectivas células diana, por lo que no solo las llevan hacia el encuentro con los patógenos, sino que las arman para enfrentarse con cualquier tipo de patógeno con las que puedan encontrarse. En particular, los neutrófilos que se exponen a la acción de la IL-8 y del TNF $\alpha$  se activan y median el estallido respiratorio, generan entonces radicales del oxígeno y el óxido nítrico, y liberan el contenido de sus gránulos. De esta manera contribuyen tanto a la defensa del organismo como a la destrucción local de tejidos, lo que se traduce en la formación del pus cuando se trata de infecciones por bacterias conocidas como piógenas.

De la misma manera que las quimiocinas son similares en su estructura, lo son también sus receptores. Todos son proteínas integrales de membrana, que contienen 7 hélices extendidas de un lado a otro de la membrana, y tienen homología con los receptores de la rodopsina retiniana y los colinérgicos muscarínicos, por tener una primera señalización para la activación, asociada con el acople con proteínas que unen a la guanina (proteínas G). El porqué existen tantas quimiocinas y el papel exacto que juega cada una de ellas en la defensa del organismo y en la respuesta patológica, está aún por determinar. La redundancia en los sistemas de comunicación intercelular por medio de los mediadores y de sus receptores, es un fenómeno frecuente

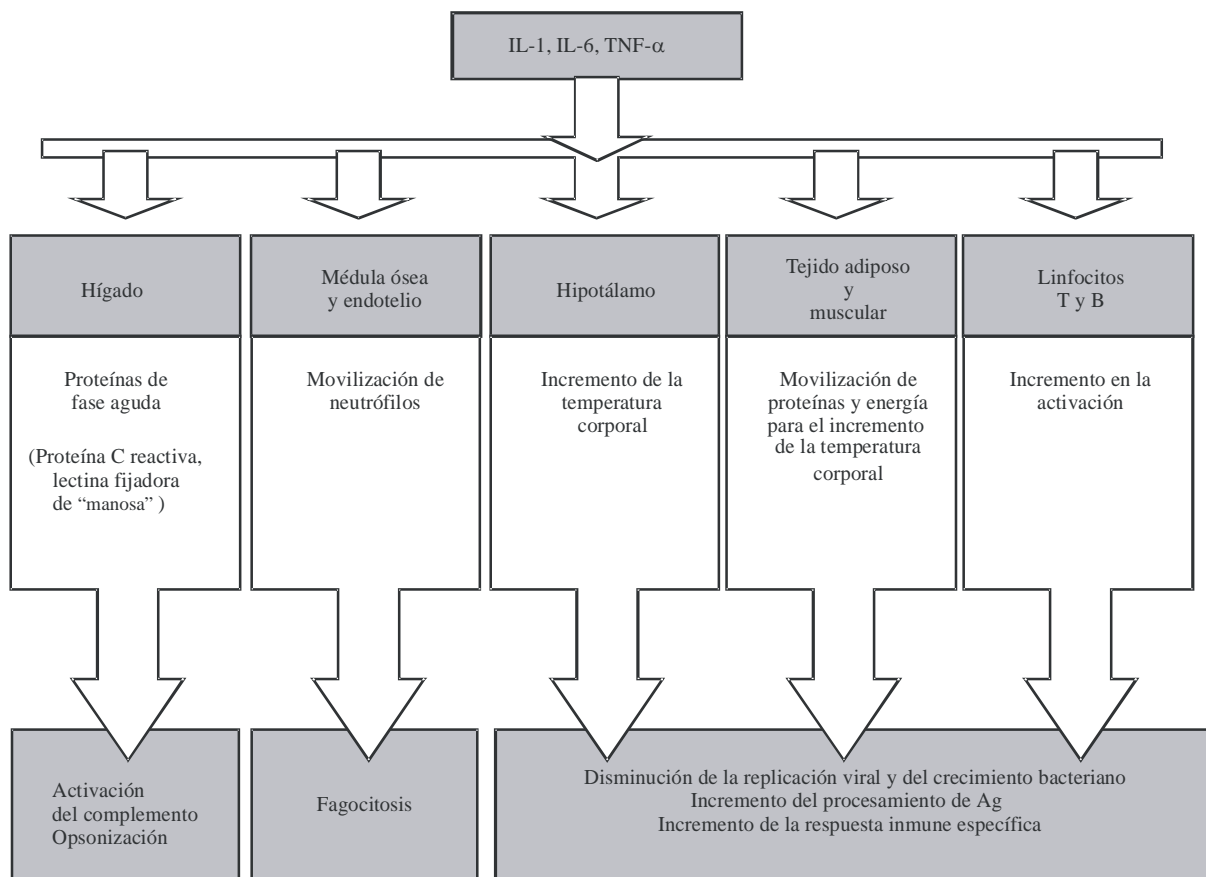
en el sistema inmune, ya que no solo comparten funciones sino también algunas cadenas de sus moléculas receptoras o poseen una gran homología.

## RESPUESTA DE FASE AGUDA

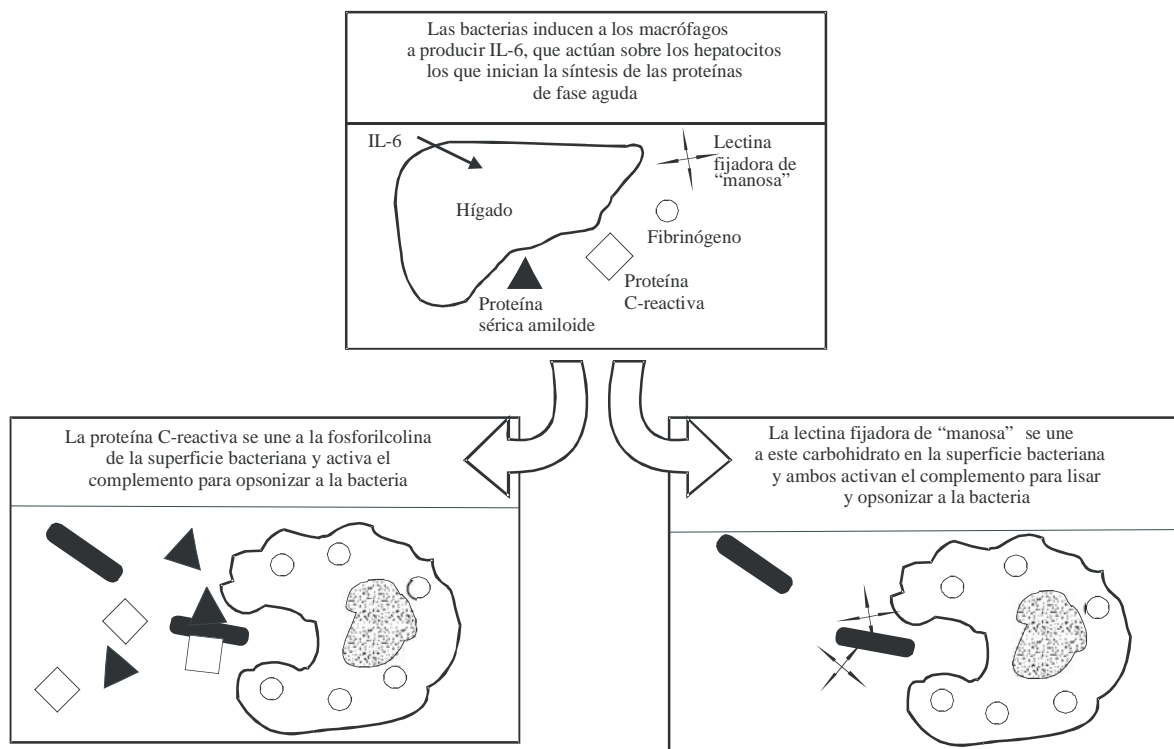
Los efectos de las citocinas que participan en la inflamación no solo son locales, sino que también involucran acciones sistémicas. Al igual que el incremento en la temperatura corporal, uno de los efectos más importantes del TNF $\alpha$ , de la IL-1 y de la IL-6 es el de iniciar algunos mecanismos que se conocen como *respuesta de fase aguda*. Esta respuesta involucra la movilización de los neutrófilos por su acción sobre la médula ósea, la alteración del metabolismo energético para coadyuvar el aumento de la temperatura corporal, así como un cambio en la secreción de proteínas por el hígado como consecuencia de la acción de esas citocinas sobre los hepatocitos (figura 5.14). Este efecto sobre las células hepáticas hace que se produzcan caídas de ciertas proteínas plasmáticas, mientras que otras se incrementan de manera marcada. Aquellas proteínas cuya secreción es inducida por la acción del TNF $\alpha$ , de la IL-1 y de la IL-6 se conocen como *proteínas de fase aguda*. Algunas de ellas resultan de mucho interés, ya que mimetizan la acción de los anticuerpos. Se incluyen la proteína C-reactiva, las lectinas que unen a los residuos de manosa, el fibrinógeno y la proteína amiloide sérica (figura 5.15).

La proteína C-reactiva es miembro de la familia de las pentraxinas, llamadas así porque están formadas por 5 subunidades idénticas. Esta proteína actúa uniéndose a la porción fosforilcolina de los lipopolisacáridos de la pared de algunas bacterias y hongos, pero es incapaz de reaccionar con esta misma estructura, que se encuentra presente de manera constitutiva en los fosfolípidos de las membranas celulares, en otra forma molecular. Cuando la proteína C-reactiva se une a los patógenos, no solo es capaz de opsonizarlos, sino que también activa la cascada del complemento, pues une al C1q mediante el dominio filamentosos que remeda al colágeno, más que por su porción globular contactada por las moléculas de anticuerpos, pero el efecto sobre el inicio de la reacción es el mismo.

En condiciones normales, las proteínas que unen residuos de manosa se encuentran en el suero, pero en bajos niveles; sus concentraciones se incrementan durante la respuesta de fase aguda. Estas son capaces de unirse a los carbohidratos en presencia de calcio, grupo molecular integrado por las lectinas, que estructuralmente pertenece a la familia de las proteínas conocidas como colectinas. Las lectinas se unen a los residuos de manosa presentes en las paredes bacterianas, pero son incapaces de fijar otros carbohidratos que están presentes en las células de los vertebrados. Su función es también la



**Figura 5.14** Respuesta inflamatoria coordinada sistémica mediada por citocinas.



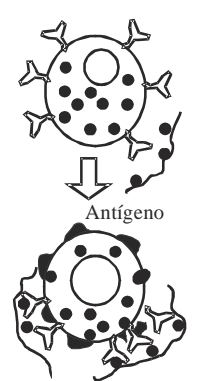
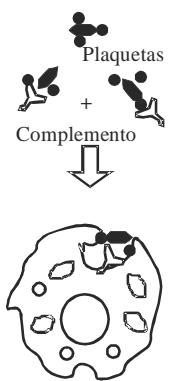

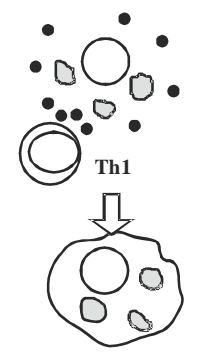
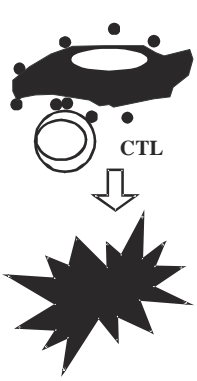
**Figura 5.15** Inducción de proteínas de fase aguda que unen bacterias, pero no células del hospedero.

de opsonizar los monocitos, los cuales, a diferencia de los macrófagos hísticos, no presentan receptores de “manosa”. Desde el punto de vista estructural, esta proteína se parece al componente C1q del sistema del complemento, a pesar de que no tienen homología en su secuencia de aminoácidos. Una vez que se une a las bacterias, la lectina puede, al igual que el C1q, activar el complejo enzimático que escinde al C4 y al C2, y se inicia la activación del complemento a través de la vía de las lectinas. La familia de las colectinas incluye también a los surfactantes pulmonares A y D (SP-A y SP-D), los cuales probablemente son importantes para unir y opsonizar los patógenos pulmonares, como el *Pneumocystis carinii*.

De esta manera, durante 1 a 2 días, la respuesta de fase aguda provee al hospedero de 2 proteínas con las propiedades funcionales de los anticuerpos, que pueden unir muchas bacterias, y aunque carecen de diversidad estructural, en cierta medida permiten limitar la infección mientras se elabora la respuesta adaptativa.

# INFLAMACIÓN MEDIADA POR LA RESPUESTA ADAPTATIVA

Cuando en el origen de los procesos inflamatorios están involucrados efectores de la respuesta inmune, se les denomina *fenómenos de hipersensibilidad* o *hipersensibilidad*, y se clasifican de acuerdo con diferentes criterios. La clasificación más usada es la que establecieron Coombs y Gell, que se basa en el mecanismo de producción del daño hístico, en los efectores de la respuesta inmunitaria involucrados en este proceso y en los tiempos de aparición de las manifestaciones clínicas (figura 5.16). En la actualidad, cuando se hace referencia a la hipersensibilidad, se prefiere denominarla: *inflamación mediada por la respuesta inmune*, ya que las lesiones producidas por mecanismos de citotoxicidad en los que participan los anticuerpos, el complemento y las células fagocíticas, así como aquellas producidas por el depósito de inmunocomplejos, pueden ser desencadenadas por antígenos exógenos o por autoantígenos, y existir entonces una frontera difusa entre

	Tipo I	Tipo II	Tipo III	Tipo IV	
Inmunorreactante	IgE, linfocitos Th2	IgG	IgG	Linfocitos T	
Antígeno	Antígeno soluble	Antígeno asociado con células	Antígeno soluble	Antígeno soluble	Antígeno asociado con células
Mecanismo efector	Activación de células cebadas	Complejo FcR, fagocitos y células NK	Activación de macrófagos		
					
Ejemplo de reacción	Asma, rinitis alérgica, anafilaxia sistémica	Discrasias sanguíneas por drogas	Enfermedad del suero Reacción de Arthus	Dermatitis por contacto Reacción a la tuberculina	Dermatitis por contacto

**Figura 5.16** Tipos de reacciones de hipersensibilidad y sus características más generales.

la hipersensibilidad clásicamente definida y el daño hístico que se observa en las enfermedades autoinmunes. Es importante destacar que los elementos relacionados con el tiempo de aparición de las manifestaciones clínicas, que se tuvieron en cuenta para establecer la clasificación de Coombs y Gell, hoy se han reconsiderado.

## **INFLAMACIÓN MEDIADA POR ANTICUERPOS CITOTÓXICOS**

Una grave destrucción de tejido se puede producir por la unión de anticuerpos fijadores del complemento –de clase IgG o IgM– a las células. El reconocimiento por parte de los anticuerpos de ciertos antígenos sobre células circulantes conduce a la activación del complemento y al depósito de opsoninas sobre la superficie de estas células. Los fagocitos fijos o libres poseen receptores para componentes del complemento y para las inmunoglobulinas y, por tanto, eliminan las células que portan proteínas para las cuales son específicos los anticuerpos. La unión extravascular de anticuerpos fijadores de complemento a las células o a estructuras tales como membranas basales, también activa el complemento. La inflamación se produce al activarse esta cascada, como consecuencia de la producción de anafilotoxinas que provocan vasodilatación, incremento de la permeabilidad vascular y atracción de los leucocitos. La acumulación de neutrófilos, con la consiguiente liberación de sus enzimas lisosomales y la generación de productos derivados del oxígeno, destruye los tejidos e incrementa el proceso inflamatorio.

Esta modalidad de inflamación mediada por la respuesta adaptativa puede observarse en la destrucción de los eritrocitos (anemia hemolítica) o de las plaquetas (trombocitopenia), seguida de la unión de ciertos fármacos a estas células o en la anemia hemolítica autoinmune, así como en la lesión de las membranas basales de los glomérulos y alveolos pulmonares en el síndrome de Goodpasture, o en la trombocitopenia del lupus eritematoso sistémico.

## **INFLAMACIÓN MEDIADA POR COMPLEJOS INMUNITARIOS**

En algunas condiciones, cuando se trata de antígenos solubles, la inflamación es causada por el depósito de complejos inmunitarios. Se describen 2 formas principales. Una local, denominada reacción de Arthus, en el caso de que se inyecte cierto antígeno en la piel de un individuo que ya posee anticuerpos preformados para este; y otra, cuando se produce la entrada, de

manera sistémica, de grandes cantidades de antígenos pobremente catabolizados, denominada enfermedad del suero, porque describe la enfermedad que sigue a la administración intravenosa de antisueros terapéuticos. Tal es el caso del antisuero de caballo, que se usaba para tratar ciertas enfermedades (cuando no existían los antibióticos), y el antídoto de la mordedura de algunas serpientes venenosas. En cualquiera de los 2 casos, la función de los complejos inmunitarios es la de aclarar los antígenos extraños y, por tanto, son entidades autolimitadas. Pero en otras ocasiones, en que el antígeno persiste, el daño es mantenido y progresivo, como ocurre cuando la respuesta adaptativa es incapaz de eliminar un agente infeccioso (la endocarditis bacteriana subaguda y la vasculitis en las hepatitis virales), o en el caso de ciertas enfermedades autoinmunes.

La unión de los anticuerpos de clase IgM o IgG con el antígeno, activa la cascada del complemento y se generan péptidos activos, que provocan la dilatación de los capilares y el aumento de la permeabilidad vascular, así como la movilización de células fagocíticas. La unión de los complejos inmunitarios a los neutrófilos y a los macrófagos, mediada por los receptores para Fc, activa el estallido respiratorio, lo cual hace que se generen los productos tóxicos del oxígeno. Las enzimas proteolíticas lisosomales asociadas con estos radicales libres del oxígeno, constituyen un poderoso sistema que provoca daño del tejido, en este caso: vasculitis, con necrosis hemorrágica y destrucción hística. La fagocitosis de los inmunocomplejos por los macrófagos puede provocar la liberación de mediadores de inflamación, cuyos efectos se analizaron antes (tabla 5.7).

## **INFLAMACIÓN MEDIADA POR LINFOCITOS TH1 Y CD8 CITOTÓXICOS**

La inflamación mediada por linfocitos TH1 y CD8 citotóxicos, denominada hipersensibilidad retardada o hipersensibilidad tipo IV, es mediada por linfocitos T específicos. Estos funcionan, en esencia, de la misma manera que frente a los patógenos, en la respuesta adaptativa ante microorganismos de vida intracelular facultativa u obligada. La reacción prototipo es un “artefacto” de la medicina moderna: la reacción a la tuberculina, empleada para el diagnóstico de contacto con la micobacteria tuberculosis. Se han identificado también reacciones de este tipo, provocadas por el veneno de ciertos insectos, por haptenos e iones de metales como níquel y cromo, que originan las dermatitis por contacto, así como la enteropatía por gluten (enfermedad celiaca), en que el antígeno es la gliadina.

**Tabla 5.7** Moléculas sintetizadas y liberadas por los mastocitos una vez que han sido activados por la unión de los antígenos a la IgE

Tipo de producto	Ejemplos	Efectos biológicos
Enzimas	Triptasa, quimasa, catepsina G, carboxipeptidasa	Remodelación de la matriz de tejido conectivo
Mediadores tóxicos	Histamina Heparina	Tóxicos para parásitos Incremento de la permeabilidad vascular Contracción del músculo liso
Citocinas	IL-4, IL-13	Estimula y amplifica la respuesta de tipo Th2
	IL-3, IL-5, GM-CSF	Promueve la producción y la activación de los eosinófilos
	TNF $\alpha$	Promueve la inflamación Estimula la producción de citocinas por parte de muchas células Activa el endotelio
Mediadores lipídicos	Leucotrienos C4 y D4	Contracción del músculo liso Incremento de la permeabilidad vascular Secreción de <i>mucus</i>
	Factor activador de plaquetas	Quimiotáctico para leucocitos Amplifica la producción de mediadores lipídicos Activador de neutrófilos, eosinófilos y de plaquetas

Cuando pequeñas cantidades de una proteína como la derivada de la micobacteria tuberculosis es inyectada en los tejidos subcutáneos, se desarrolla una reacción inflamatoria local que evoluciona entre 24 y 72 horas en los individuos que han estado en contacto previo con este patógeno. La respuesta es mediada por las células TH1, las cuales entran al sitio de la inyección del antígeno, reconocen el complejo péptido: MHC clase II sobre las células presentadoras de antígeno, y liberan citocinas inflamatorias que incrementan la permeabilidad vascular local, con la consiguiente salida de líquido y proteínas, y el reclutamiento de células accesorias hacia el lugar. Como las células específicas no son frecuentes y aún no hay un proceso inflamatorio que las atraiga hacia el sitio de la inyección, se necesitan varias horas para que llegue una célula con la especificidad adecuada. Una vez que se ha producido el reconocimiento específico, el linfocito TH1 libera quimiocinas, citocinas y citotoxinas. Las quimiocinas atraen a los macrófagos, lo que amplifica la respuesta. El TNF $\alpha$  y el TNF $\beta$

afectan a los vasos sanguíneos locales e incrementan la expresión endotelial de moléculas de adhesión, y provocan la destrucción hística. La liberación de la IL-13 y del GM-CSF estimula la producción de monocitos en la médula ósea. Por último, las células TH1 activan a los macrófagos mediante la liberación del IFN $\gamma$  y del TNF $\alpha$ , y destruyen macrófagos y otras células sensibles a través de la liberación del TNF $\beta$  o por la expresión del ligando Fas.

Este tipo de inflamación puede también involucrar linfocitos CD8+ capaces de dañar los tejidos a través de la citotoxicidad mediada por células. Algunos productos químicos solubles en lípidos pueden atravesar la membrana celular y modificar las proteínas intracelulares. Estas, a su vez, generan péptidos modificados dentro del citosol, que son translocados al retículo endoplásmico y transportados hacia la superficie de la célula dentro de una molécula MHC de clase I. Estos péptidos son reconocidos por los linfocitos CD8+, los que destruyen a las células que portan el complejo MHC: péptido modificado (tabla 5.8).

**Tabla 5.8** Productos de secreción de los eosinófilos

Tipo de producto	Ejemplos	Efectos biológicos
Enzimas	Peroxidasa de eosinófilo	Tóxico. Catalizador de halogenación. Desencadena la liberación de histamina por los mastocitos
	Colagenasa de eosinófilo	Remodelación de la matriz del tejido conectivo
Proteínas tóxicas	Proteína básica principal	Tóxica para parásitos y células de mamíferos. Desencadena la liberación de histamina por los mastocitos
	Proteína catiónica	Tóxica para parásitos. Neurotoxina
	Neurotoxina derivada de eosinófilos	Neurotóxica
Citocinas	IL-1, IL-3, IL-5, IL-6, TNF $\alpha$ , TGF $\alpha$ , TGF $\beta$ , IL-4, IL-2, IL-10, IFN $\gamma$	Inflamación. Regulación de la respuesta inmune
Quimiocinas y factores del crecimiento	IL-8, IL-3, IL-5, IL-16, MIP-1a, RANTES, eotaxina	Promueve el reclutamiento de leucocitos
Mediadores lipídicos	Leucotrienos C4 y D4	Contracción del músculo liso. Incremento de la permeabilidad vascular. Secreción de <i>mucus</i>
	Factor activador de plaquetas	Quimiotáctico para leucocitos, amplifica la producción de mediadores lipídicos. Activador de leucocitos y plaquetas

## BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- Bevilacqua MP. Endothelial leukocyte adhesion molecules. *Ann Rev Immunol* 1993;11:767-804.
- Downey GP. Mechanism of leukocyte motility and chemotaxis. *Curr Opin Immunol* 1994;6:113-24.
- Springer T A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multi-step paradigm. *Cell* 1994;76:301-4.
- Ebnet K, Kaldjian EP, Anderson AO, Shaw S. Orchestrated information transfer underlying endothelial interactions. *Ann Rev Immunol* 1996;14:155-77.
- Sastry K, Ezekowitz RA. Collectins: pattern-recognition molecules involved in first-line host defense. *Curr. Opin Immunol* 1993;5:59-66.
- Galli SJ. New concepts about the mast cell. *N Engl J Med* 1993;328:257-65.
- Henricks PAJ, Bloemen PGM, Nijakamp FP. Adhesion molecules and the recruitment of eosinophils to the airways. *Res Immunol* 1997;148:18-28.
- Capron M, Desreux P. Immunobiology of eosinophils in allergy inflammation. *Res in Immunol* 1997; 148:18-28.
- Schroeder JT, Kagey Sobotka A, Lichtenstein L M. The role of the basophil in allergic inflammation. *Allergy* 1995;50:463-72.
- Marone G. Asthma: recent advances. *Trends Immunol Today* 1998;19:5-9.
- Murphy WG, Kelton JG. Immune haemolytic anemia and thrombocytopenia: drugs and autoantibodies *Biochem. Soc Trans* 1991;19:183-6.



## **CONTENIDO**

---

**Introducción/ 459**

**Enfermedades alérgicas/ 459**

**Hipersensibilidad inmediata/ 460**

**Factores que condicionan el desarrollo del estado atópico/ 460**

Antecedentes familiares/ 460

Exposición precoz a alérgenos/ 460

Factores ambientales/ 461

Enfermedades infecciosas/ 461

**Fisiopatología de la respuesta alérgica/ 461**

**Sensibilización. Síntesis de IgE/ 461**

**Respuesta alérgica inmediata. Efectos de la histamina/ 462**

**Respuesta alérgica tardía/ 463**

**Bibliografía recomendada/ 464**

# Capítulo 39



## RESPUESTA ALÉRGICA

*Dra. María Victoria Guntiñas Zamora*

### RESUMEN

Los factores (genéticos, ambientales, infecciosos e inmunológicos) que condicionan el estado atópico de muchos individuos han conducido a un incremento considerable en la morbilidad y la mortalidad por asma bronquial: enfermedad crónica no transmisible muy frecuente. En las enfermedades alérgicas se elabora una respuesta inmune contra sustancias llamadas alérgenos, que pueden resultar nocivas para algunos individuos. La hipersensibilidad mediada por IgE y mediadores químicos contenidos en los mastocitos, es la responsable de la aparición de los síntomas y signos. Los individuos que expresan un patrón Th2 preferencial, son más propensos al desarrollo de un estado alérgico que, por lo general, evoluciona en tres fases clínicas: fase de sensibilización, respuesta inmediata y respuesta tardía. En cada una intervienen las células que participan en el proceso inflamatorio mucoso y sus productos solubles: linfocitos T y B en la primera fase; mastocitos en la segunda; y eosinófilos, neutrófilos, células epiteliales y plaquetas en la tercera. Las moléculas que generan la inflamación son las aminas vasoactivas, las interleucinas y otras citocinas. El desarrollo de métodos de diagnóstico y terapéuticos para las enfermedades alérgicas, se sustenta en el conocimiento, cada vez más profundo, de las complejas interacciones celulares y moleculares que conducen a estas afecciones.

### INTRODUCCIÓN

La respuesta alérgica, en la que algunos componentes del sistema inmune de algunos individuos reaccionan frente a sustancias extrañas inofensivas, constituye un problema de salud y económico para muchos en el mundo. Hoy se observa un lamentable incremento progresivo en la morbilidad y la mortalidad por asma bronquial, considerada la afección crónica más común entre adultos y niños. Esta enfermedad afecta alrededor del 10 % de la población infantil mundial, cifra que se aproxima a la obtenida por estudios realizados en nuestro país. En algunos casos, este incremento se ha duplicado durante los últimos 10 años, fenómeno que no solo se observa en los países desarrollados, sino también en los países en vías de desarrollo que adoptan estilos de vida más modernos.

A pesar de los avances obtenidos en las pasadas tres décadas del siglo xx, en el estudio de los mecanismos de respuesta inmune, quedan aún muchas interrogantes acerca de las enfermedades atópicas. El futuro de la inmunoterapia específica espera por el esclarecimiento total de las complejas interacciones celulares y moleculares que acompañan al desarrollo de la respuesta alérgica.

### ENFERMEDADES ALÉRGICAS

Enfermedades alérgicas son aquellas que provocan inflamación hística o disfunción orgánica como consecuencia de una respuesta inmune contra antígenos ambientales (alérgenos). De acuerdo con la naturaleza

de los efectores inmunes involucrados en el daño, estas enfermedades se clasifican en 3 grupos:

1. Enfermedades alérgicas causadas por anticuerpos IgE y mediadores de mastocitos.
2. Enfermedades alérgicas causadas por anticuerpos IgG o IgM y activación del complemento.
3. Enfermedades alérgicas causadas por células T sensibilizadas.

En sentido general, los alérgenos de naturaleza química compleja, como las proteínas, suelen desencadenar respuestas de anticuerpos; mientras que los más simples desde el punto de vista estructural, desencadenan respuestas mediadas por células T.

Este capítulo trata acerca de la fisiopatología y la evaluación clínica y humoral de las enfermedades alérgicas mediadas por IgE, antes conocidas como hipersensibilidad inmediata. Entre ellas: la atopia, (susceptibilidad heredada para responder a alérgenos comunes en la naturaleza que hayan sido inhalados o ingeridos), la anafilaxia y la urticaria/angioedema (cualquier individuo, predispuesto genéticamente o no, puede desarrollar alguna vez una reacción de hipersensibilidad). En estos grupos de trastornos se encuentran el asma bronquial, la dermatitis atópica, la rinitis alérgica, la queratoconjuntivitis atópica y otras, algunas de las cuales pueden también ocurrir sin que medien mecanismos alérgicos en su fisiopatología.

## HIPERSENSIBILIDAD INMEDIATA

Los alérgenos, que pueden ser inhalados, ingeridos, inyectados o estar en contacto con la piel, se encuentran distribuidos en la naturaleza, y se comportan como moléculas inofensivas para muchas personas. Sin embargo, cada vez hay más individuos sensibles a ellos, cuyas propiedades patogénicas pueden poner en peligro sus vidas.

Los términos atopia y atópico fueron acuñados por Coca y Cooke a principios de siglo xx para designar un estado alérgico que aparecía en algunos individuos. En estos casos podía establecerse una correlación entre los resultados de las pruebas cutáneas de hipersensibilidad inmediata y la aparición de síntomas clínicos, cuando se exponían a los alérgenos específicos.

## FACTORES QUE CONDICIONAN EL DESARROLLO DEL ESTADO ATÓPICO

### ANTECEDENTES FAMILIARES

Desde principios del siglo xx, Coca y Cooke observaron que las reacciones atópicas aparecían con más frecuencia en los miembros de algunas familias. Por estudios en gemelos homocigóticos y dicigóticos, se sabe que al menos 3 genes localizados en los cromosomas 5 (q), 11 (q) y 14 están asociados con el desarrollo de las alergias, con mayor influencia sobre aquellos que se heredan por la línea materna, y en particular cuando estas enfermedades debutan en edades tempranas de la vida. La historia familiar, en especial la materna, de asma o atopia es tan relevante que se acepta en la actualidad como único marcador adecuado para identificar al *niño de riesgo*.

### EXPOSICIÓN PRECOZ A ALERGENOS

La exposición precoz a los alérgenos durante las primeras etapas de la vida constituye un factor de riesgo que puede desarrollar la enfermedad alérgica, sobre todo en los niños con historia familiar de atopia. Se ha detectado, incluso, la presencia de IgE específica contra proteínas de la leche de vaca y contra la penicilina en la sangre del cordón umbilical de algunos neonatos cuyas madres no portaban estos anticuerpos. Se ha visto que la prevalencia de enfermedades respiratorias alérgicas como el asma, la rinitis o rinoconjuntivitis, o las enfermedades cutáneas como la dermatitis atópica, es mayor en niños que en adultos, con una tendencia a decrecer con la edad. Estas observaciones hacen pensar que el sistema inmune de los recién nacidos, lactantes y niños es susceptible a las estimulaciones alérgicas, y esta respuesta se orienta hacia un patrón Th2 predominante. Diversos estudios en animales y en seres humanos han demostrado que la orientación de la respuesta inmunitaria Th1 o Th2 está muy influenciada por las interacciones maternofetales durante el embarazo, y por la edad, después del nacimiento. En Gran Bretaña, por ejemplo, se estudiaron poblaciones de negros de origen antillano, y se encontró una mayor incidencia de asma entre aquellos que nacieron en las Antillas y luego emigraron, con respecto a los que nacieron en el Viejo Continente.

## FACTORES AMBIENTALES

El ambiente es un elemento favorecedor del estado alérgico, por 3 razones esenciales:

1. Diferente comportamiento entre poblaciones urbanas y rurales.
2. Modificación de la enfermedad entre emigrantes.
3. Cambios sustanciales en el desarrollo tecnológico y nuevos estilos de vida que se imponen.

## ENFERMEDADES INFECCIOSAS

Las infecciones tienen una influencia muy importante en el desarrollo de las enfermedades atópicas en los niños, sobre todo en el asma y en la dermatitis atópica. Algunos estudios epidemiológicos indican que el 70 % de las crisis de asma se desencadenan durante una infección aguda. La infección, sobre todo si es viral, actúa mediante complejas interacciones celulares y moleculares que pueden provocar:

1. Aumento de la síntesis de IgE en individuos predispuestos.
2. Daños en el epitelio de las vías aéreas.
3. Bloqueo  $\beta$  adrenérgico.
4. Desarrollo de reacciones tardías ante el antígeno inhalado.
5. Aumento de la función inflamatoria de los leucocitos.

Los virus que con mayor frecuencia se asocian con la aparición de episodios broncospásticos son: virus sincitial respiratorio, virus parainfluenza, adenovirus y rinovirus.

Entre los factores que condicionan la enfermedad atópica no pueden desestimarse los elementos perinatales favorecedores, como el tabaquismo materno, el bajo peso al nacer (con la consecuente hipoplasia pulmonar), el parto prematuro, la distocia, la cesárea y las enfermedades neonatales.

## FISIOPATOLOGÍA DE LA RESPUESTA ALÉRGICA

Muchas células y moléculas participan en los procesos de respuesta alérgica, que son similares de persona a persona, independientemente de la naturaleza de la sustancia de que se trate. En el proceso inflamatorio mucoso, las células que pueden estar involucradas liberan mediadores químicos en cantidades variables, entre ellos: linfocitos, mastocitos, macrófagos, eosinófilos, neutrófilos, células epiteliales y plaquetas. Algunos

son neuropéptidos liberados por las terminaciones nerviosas, como la sustancia P y la neuroquinina.

Esta respuesta consta de 3 fases: fase de sensibilización, fase inmediata y fase tardía.

Durante la sensibilización, que puede transcurrir sin que el paciente la perciba, se inicia la síntesis de IgE específica contra el alérgeno. En la fase inmediata hay una liberación de histamina y de otros mediadores químicos de la inflamación a partir de los mastocitos; y en la fase tardía se produce una migración de células inflamatorias, en especial eosinófilos, hacia el sitio de la inflamación.

## SENSIBILIZACIÓN. SÍNTESIS DE IgE

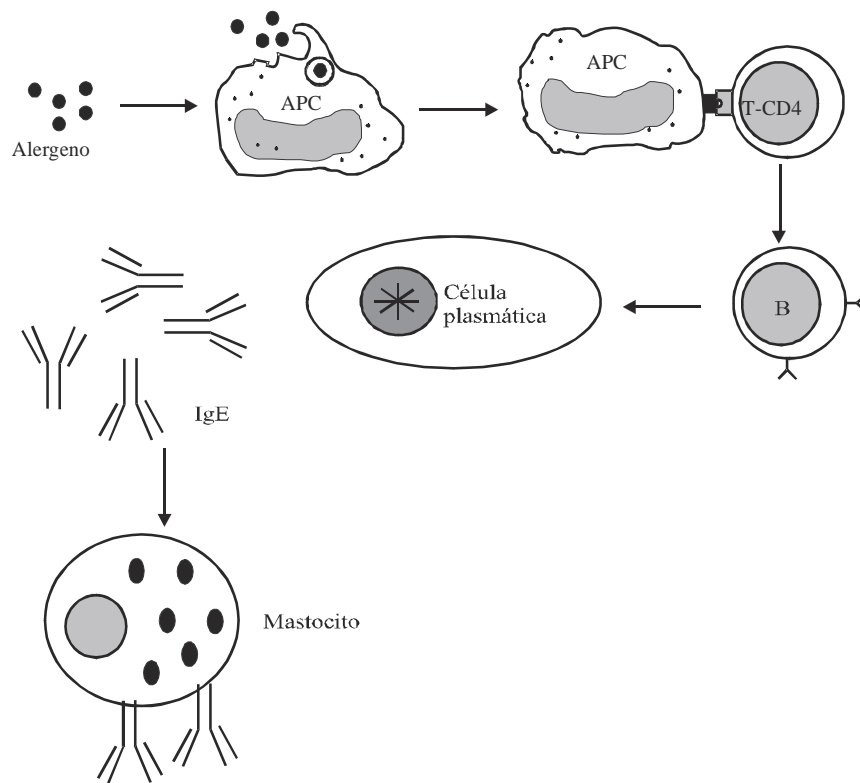
Frente a un primer contacto con el alérgeno, el organismo del individuo atópico sintetiza IgE específica, que luego se fija a los receptores Fc $\epsilon$  sobre la superficie de mastocitos y basófilos. El alérgeno desaparece de manera gradual, pero la molécula de IgE permanece fija a las superficies celulares, en espera del próximo contacto con el alérgeno que originó su formación (figura 5.17).

La producción de anticuerpos IgE es una etapa esencial de la reacción alérgica del aparato respiratorio.

Conocer la inducción y regulación de la síntesis de IgE es fundamental para dilucidar la patogénesis de las enfermedades alérgicas, así como para las perspectivas terapéuticas. Las células plasmáticas productoras de IgE se localizan, sobre todo, en el tejido linfóide asociado con las mucosas de los aparatos respiratorio y digestivo. A partir de la octava semana de embarazo, ya pueden identificarse en el feto células del parénquima hepático y pulmonar con moléculas de IgE sobre su superficie. El neonato normal presenta en la sangre periférica y en las secreciones exocrinas, niveles muy bajos de esta inmunoglobulina, comparados con el resto de las clases de anticuerpos, cifras que aumentan de manera progresiva alrededor de los 6 años de edad hasta alcanzar los niveles del adulto.

La regulación de la síntesis de IgE es un fenómeno complejo que involucra varias células y moléculas. Esta síntesis, al igual que la de otras inmunoglobulinas, resulta de la interacción de células T y B, de la manera siguiente:

1. Internamiento de la molécula alérgica por IgM o IgD de superficie en las células B, o por las células dendríticas presentes en el epitelio de las vías aéreas que expresan un alto nivel de moléculas de histocompatibilidad clase II.



**Figura 5.17** Sensibilización alérgica.

2. Migración de estas células a los ganglios regionales, donde realizan el procesamiento y la presentación del péptido alérgénico al linfocito Th0 (*naive*), conjuntamente con la molécula MHC II.
3. Reconocimiento del péptido por el TCR en presencia de señales coestimuladoras (CD40 y ligando de CD40).
4. Activación del linfocito Th0, que en el individuo atópico expresa una diferenciación preferencial hacia el patrón Th2: síntesis y secreción de citocinas IL-4, IL-13, que inducen la activación de células B.
5. Cambio de clase (*switch*) de IgM o IgD a IgE.

Los segmentos VDJ que determinan el idiotipo en una célula B madura, pueden compartirse con varios segmentos que determinan los isotipos. De manera que una célula B puede producir inmunoglobulinas de la misma especificidad, pero con regiones constantes y, por tanto, funciones biológicas diferentes.

Los fragmentos de genes que codifican para la síntesis de IgE, al igual que sucede para las restantes clases de inmunoglobulinas, se encuentran reordenados en los cromosomas 14 (cadena  $\epsilon$ ), 2 (cadena  $\kappa$ ) y 22 (cadena  $\lambda$ ), y forman parte del repertorio preinmune de los linfocitos B.

La IL-4 ha sido identificada como una citocina esencial para el cambio a IgE. La IL-13, que presenta el 30 % de homología con la IL-4, parece ser un elemento importante en la regulación de este proceso. Una gran cantidad de otras citocinas, a su vez, pueden intervenir en la síntesis y modular la producción de IL-4 y de IL-13 (cuadro 5.2).

**Cuadro 5.2** Citocinas que intervienen en la síntesis de IgE

<b>Aumentan</b>	TNF- $\alpha$ , IL-5, IL-6
<b>Inhiben</b>	IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , IL-8, IL-10, IL-12

## RESPUESTA ALÉRGICA INMEDIATA. EFECTOS DE LA HISTAMINA

Los mastocitos y basófilos sintetizan histamina que es almacenada en gránulos citoplasmáticos secretores y liberada después del contacto de la molécula de IgE específica que se fijó a la superficie celular con el alérgeno que provocó su formación. Además de la

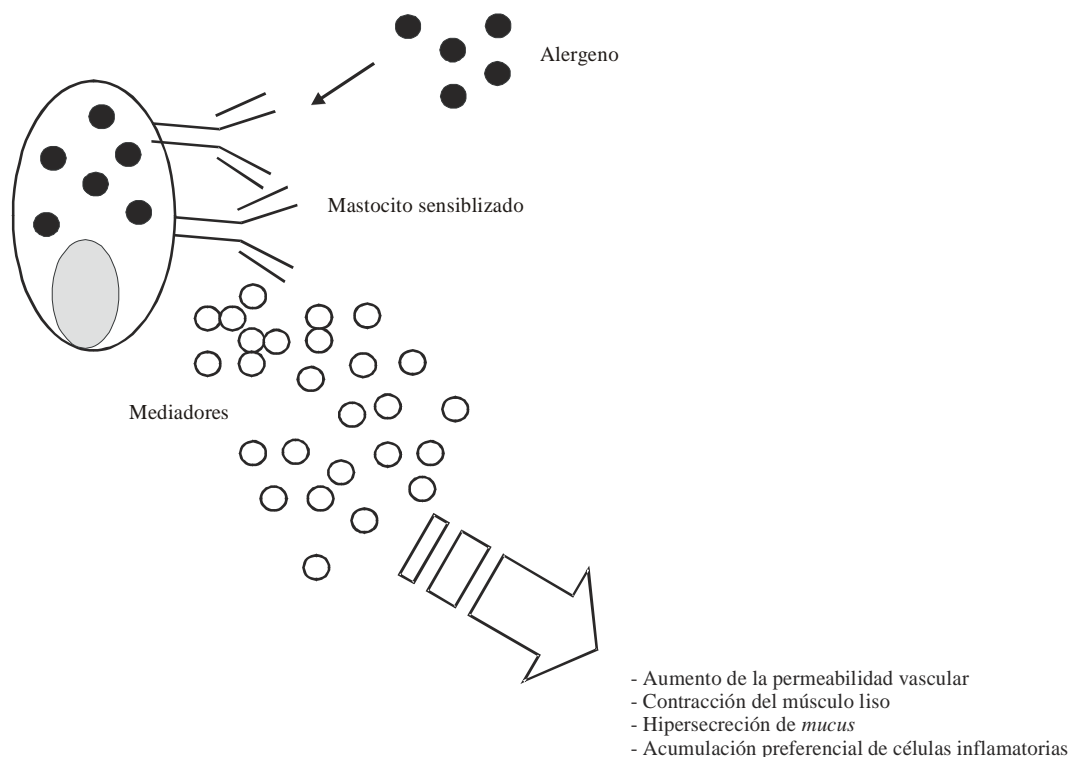
histamina, estas células liberan al medio otras sustancias que se sintetizan ante el estímulo alergénico, entre ellas: factor activador de plaquetas (PAF) y productos del metabolismo del ácido araquidónico (eicosanoides) como prostaglandinas, leucotrienos y ácidos hidroxi-eicosatetranoicos (HETE). Al mismo tiempo, pueden liberarse sustancias que pertenecen a la matriz del gránulo, como: triptasas, quimasas, peroxidasa y aril-sulfatasa B. De forma adicional, la degranulación inicia la transcripción, síntesis y secreción de ciertas citocinas como las interleucinas: IL-3, IL-4, IL-5 y IL-6, así como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) y el factor estimulante de colonias de monocitos y granulocitos (GM-CSF) (figura 5.18).

La histamina liberada de los mastocitos se une a los receptores de células específicas, para producir sus efectos clínicos, que dependerán del órgano o sistema afectado. Puede entonces aparecer broncoconstricción, aumento de la permeabilidad vascular, hipersecreción de *mucus*, edema de las mucosas, según se trate: ya sea del aparato respiratorio, digestivo y de la piel, entre otros. Se han reconocido 3 tipos principales de receptores de histamina, y los H1 son los que desempeñan la función más significativa en las reacciones alérgicas (tabla 5.9).

## RESPUESTA ALÉRGICA TARDÍA

El infiltrado inflamatorio que se observa durante la fase tardía de la reacción alérgica se caracteriza por células que difieren cualitativamente entre individuos atópicos y no atópicos. En los individuos atópicos predominan los eosinófilos, aunque también migran neutrófilos y monocitos. Los mecanismos por los cuales las células se acumulan en la zona alérgica no son del todo conocidos. Algunos de ellos se señalan a continuación:

1. Liberación de mediadores quimiotácticos por los mastocitos: PAF, leucotrieno B4 (LTB<sub>4</sub>).
2. Adhesión selectiva de eosinófilos al endotelio vascular. Es posible que la mayor acumulación de moléculas de adhesión celular (por ejemplo: ICAM-1 o CD54) en individuos atópicos, pueda contribuir a la acumulación de eosinófilos en la respuesta tardía.
3. Diapédesis preferencial de eosinófilos sensibilizados.
4. Influencia selectiva de algunas citocinas como IL-5, IL-3 y de factor estimulante de colonias de monocitos y granulocitos (GM-CSF) sobre los eosinófilos.



**Figura 5.18** Respuesta alérgica inmediata. Efecto de los mediadores.

**Tabla 5.9** Principales tipos de receptores de histamina

Receptor	Efecto
H1	Prurito Contracción del músculo liso Aumento de la permeabilidad vascular Síntesis de prostaglandinas Aumento de GMPc Disminución del tiempo de conducción del nodo atrioventricular Activación de reflejos vagales
H2	Secreción de ácido gástrico Contracción esofágica Secreción de <i>mucus</i> Inhibición de la liberación de histamina por los basófilos Inducción de células T supresoras Inhibición de la activación de neutrófilos Incremento del AMPc
H1 y H2	Vasodilatación Hipotensión Cefalea Rubor
H3	Inhibición de la liberación de histamina

La IL-5 tiene múltiples efectos sobre la maduración, diferenciación, migración, activación y vida media de los eosinófilos y basófilos, y la IL-3 estimula la producción de otros granulocitos y mastocitos. A su vez, ambas interleucinas estimulan la unión del eosinófilo al endotelio vascular y prolongan su vida.

Una vez que están en la zona alérgica, los eosinófilos se degranulan, y liberan mediadores como PAF y LTC<sub>4</sub>, proteína catiónica eosinofílica (ECP), proteína básica mayor (MBP) y peroxidasa eosinofílica (EP), que son sustancias citotóxicas potentes. De manera que contribuyen a dañar los tejidos, perpetuar la inflamación y, por tanto, a la cronicidad del proceso alérgico.

La respuesta alérgica, forma peculiar de respuesta inmune, cada vez se conoce más a fondo. Los avances científicotécnicos alcanzados en los últimos años del siglo xx, en especial en el terreno de la biología molecular, han sido esenciales en el esclarecimiento de los mecanismos de respuesta inmune y de inmunorregulación. Ellos han permitido el desarrollo de los métodos de diagnóstico y el mejoramiento de las acciones

inmunoterapéuticas que garantizan una mejor calidad de vida para estos enfermos.

## BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- Babe KS, Arlian LG, Confer PD, Kim R. House dust mite (*Dermatophagoides farinae* and *Dermatophagoides pteronyssinus*) prevalence in the rooms and hallways of a tertiary care hospital. *J Allergy Clin Immunol* 1995;95 (4):801-5.
- Branco FM, Palma AG. Cytokines and asthma. *Invest Allergol Clin Immunol* 1998; 8(3):141-8.
- Cavagni G, Caffarelli C. Le diagnosi di dermatite atopica nell'infanzia. *Riv Ital Pediatr (IJP)* 1998; 24 (Suppl. Al N.1): 7-11.
- De Vries Jan E, Gauchat Jean F, Aversa G et al. Regulation of IgE synthesis by cytokines. *Current Opinion Immunol* 1991; 3:851-58.
- Del Prete G, Maggi E, Parronchi P. IL-4 is an essential cofactor for the IgE synthesis induced in vitro by human T cell clones and their supernatants. *J Immunol* 1988;140: 4193.
- Egan RW, Umland P. Biology of interleukin 5 and its relevance to allergic diseases. *Allergy* 1996; 51:71-81.

- Etzel R, Rylander R. Indoor Molds and Children Health Environ Health Perspect 1999 Jun; 107 (Suppl 3): 463.
- Fain B, Guerin BJ. Hart. Mites and Allergic Diseases. Bélgica: Editora Groninghe Coutrai, 1992.
- Gajewski TF, Goldwasser EE, Fitch FW. Anti proliferative effect of IFN gamma in immunoregulation, II: IFN gamma inhibits the proliferation of murine bone marrow cells stimulated with IL-3, IL-4 or G-M-CSF. J Immunol 1998; 141:2635.
- Hahn D L, McDonald R. Can acute Chlamydia pneumoniae respiratory tract infection initiate chronic asthma? Ann Allergy Asthma Immunol 1998 Oct; 81 (4):339-44.
- Huang Shau-Ku. Molecular modulation of allergic responses. J Allergy Clin Immunol 1998; 102 (6) Part I: 887-91.
- Koning H, Baert M R M, Orange A S. Development of immune functions related to allergic mechanisms in young children. Pediatr Res 1996; 40: 363-75.
- Middleton E. Alergia: Principios y Prácticas. Tomo I Cap. 16. "Acarobiología y alérgenos inhalantes". 3<sup>ra</sup>. edición. Salvat, 1992.
- Panhuysen C I M, Meyers D A. The genetics of asthma and atopy. Allergy 1995; 50: 863-9.
- Platts-Mills Thomas A E. Atopic allergy: asthma and atopic dermatitis. Current Opinion Immunol 1991;3:874-80.
- Ponvert C, Paupe J, Scheinmann P. L'exposition précoce aux allergènes représente un facteur déterminant du risque de développement ultérieur des maladies allergiques chez les enfants a risque élevé d'atopie: hypothèses sur les mécanismes susceptibles d'être en cause. Rev Fr Allergol 1997; 37:6.
- Réfabert L, de Blic J, Scheinmann P. Infections respiratoires aiguës virales et asthme de l'enfant. Aspects épidémiologiques, immunopathologiques et thérapeutiques. Rev Franc D'Allergol et d'Immunol Clin 1996; 36:7.
- Ricci M. T cells, cytokines, IgE and allergic inflammation. Int Arch Allergy Immunol 1992; 99:165-71.
- Ricci M. IL-4: a key cytokine in atopy. Clin Exp Allergy 1993; 23:370-6.
- Sears MR. Epidemiology of children asthma. Lancet 1997; 350:1015-20.
- Sporik R, Holgate S, Platts-Mills TAE, Cogswell J. Exposure to house dust mite allergen (*Der p I*) and the development of asthma in childhood. A prospective study. N Engl J Med 1990; 323:502-7.
- Stites DP, Terr AI, Parslow TG. Basic and Clinical Immunology. Ed. Appleton and Lange Editors, 1994.
- Tonnel André B, Capron M. Mechanisms of the inflammatory allergic reaction in the respiratory tract. Recent advances. Bull Acad Natle Méd 1997; 181(8):1563-74.
- Van Asperen P P. Towards a better understanding of children asthma. J Paediatr Child Health 1985; 31:272-5.
- Warner JA, Jones AC, Miles EA. Maternofoetal interaction and allergy. 1996, 51: 447-51.
- Wickman M. Prevention and nonpharmacologic treatment of mite allergy. EAACI/DGAI Symposium Reviews. Allergy. 1997; 52:369-73.
- Worm M, Henz B M. Molecular regulation of IgE synthesis. J Mol Med 1997; 75: 440-47.



## **CONTENIDO**

---

**Introducción/ 467**

**Tolerancia a los componentes propios del organismo/ 468**

**Autoinmunidad y enfermedad/ 470**

**Definición de las enfermedades autoinmunes/ 472**

**Causas multifactoriales de las enfermedades autoinmunes/ 473**

Fondo genético/ 473

Factores ambientales que influyen en las enfermedades autoinmunes/ 475

Factores estocásticos que influyen en las enfermedades autoinmunes/ 477

**Eventos patogénicos que conducen a enfermedades autoinmunes/ 478**

**Mecanismos de lesión/ 481**

**Bibliografía recomendada/ 483**

## Capítulo 40



### AUTOINMUNIDAD Y ENFERMEDADES AUTOINMUNES

*Dra. Elena Kokuina*

#### RESUMEN

Las enfermedades autoinmunes constituyen uno de los problemas de salud más frecuentes en la actualidad y de los que menos se conoce. Aparecen cuando fallan los mecanismos fisiológicos que mantienen la tolerancia a los antígenos propios, mediante la eliminación física y la inactivación de las células T y B autorreactivas. Pero los mecanismos de tolerancia no son exhaustivos, y en el organismo existen autoanticuerpos y células autorreactivas sin consecuencias patológicas. Complejas interacciones, aún no definidas, de factores ambientales con alelos de múltiples *loci* diseminados en el genoma pueden provocar cambios patogénicos en las células autorreactivas normales o inocentes y desencadenar las EA. Los estudios del genoma humano evidencian la participación de genes del MHC y no MHC en la causa de las EA, así como de genes de susceptibilidad, comunes para distintas EA. Entre los factores ambientales, las infecciones virales ocupan un lugar importante. Los virus pueden desencadenar las EA por la similitud molecular con los autoantígenos o por la activación inespecífica de la respuesta autoinmune. La patogénesis de las EA es aún poco conocida. Se considera que transcurre en fases que precisan del desarrollo de un repertorio celular autoinmune, seguido por su activación; y permitido por “descuidos” del sistema inmune para regular la respuesta a los componentes propios. Aunque las terapias para las EA dependen del conocimiento exacto de los factores causales que condicionan estas fases, el esclarecimiento de los mecanismos destructivos de los autoanticuerpos y de las células autorreactivas ha trazado los primeros enfoques de la terapia inmunosupresora específica.

#### INTRODUCCIÓN

Aunque la inmunidad tiene un valor positivo para la supervivencia del individuo y de la especie, no existe una correspondencia entre inmunidad y defensa: hay respuestas inmunes que no protegen, sino que actúan de manera patogénica y causan enfermedades alérgicas; y hay un grupo heterogéneo de condiciones clínicas, en que el sistema inmune ataca a los constituyentes del organismo, las cuales se denominan enfermedades autoinmunes (EA).

Durante el desarrollo ontogénico, el sistema inmune se hace tolerante frente a los propios tejidos del organismo, debido al contacto con los antígenos específicos. Como la fuente del antígeno es endógena y su aporte es ilimitado, los estados de tolerancia frente a lo propio

tienden a persistir por mucho tiempo. En condiciones de poca salud no hay respuesta inmune, o solo respuestas mínimas, atenuadas, frente a lo que es propio y peculiar del individuo. La rotura de ese estado de tolerancia, la aparición de respuestas frente a lo propio, la elevación, desde el punto de vista cuantitativo, de las ya existentes o su modificación cualitativa, dan lugar a los estados de autoinmunidad, que pueden convertirse, de manera eventual, en causa de enfermedad.

El estudio de las EA acapara el interés de la comunidad científica por dos razones esenciales. En primer lugar, por su frecuencia y gravedad, las EA son una importante causa de padecimientos y disminución de la vida del hombre. En segundo lugar, el entendimiento de las aberraciones que conducen a la autoinmunidad patológica, podrá aportar las claves

para descifrar los mecanismos de control de la respuesta inmune que mantienen el fino equilibrio biológico entre salud y enfermedad.

## **TOLERANCIA A LOS COMPONENTES PROPIOS DEL ORGANISMO**

La tolerancia a los componentes propios del organismo nos protege de las EA. Existen tres grupos de mecanismos de tolerancia que evitan las respuestas inmunes a los autoantígenos:

1. Tolerancia central.
2. Tolerancia periférica.
3. Ignorancia clonal.

La tolerancia central se debe a la eliminación física o delección de los linfocitos T y B que encuentran los autoantígenos durante el proceso de maduración en el timo y la médula ósea, respectivamente; es importante para lograr la tolerancia frente a los autoantígenos que están en concentraciones altas en los órganos linfoides centrales o generativos. La tolerancia periférica son mecanismos que actúan sobre los linfocitos maduros que han abandonado los órganos generativos y encuentran los autoantígenos en los tejidos periféricos. Los autoantígenos pueden inducir tolerancia en los linfocitos T y B maduros si estos se presentan en ausencia de la segunda señal coestimuladora, y les confiere un estado de falta de respuesta, denominado anergia. También los autoantígenos en la periferia pueden desencadenar mecanismos que bloquean la activación linfocitaria o inducen la apoptosis. Esto permite deducir que el mantenimiento de la autotolerancia no refleja solo la falta de respuesta de los linfocitos a los autoantígenos, sino que las respuestas frente a los autoantígenos son reguladas por interacciones moleculares específicas. Una de estas interacciones moleculares es la inhibición de las células T, mediada por las moléculas CTLA-4. De hecho, resultó sorprendente que el segundo receptor celular para las moléculas B7, llamado CTLA-4, fuera inhibitorio para la activación de las células T. La expresión de esta molécula sobre las células T es inducida después de la activación, y al interactuar con las moléculas B7, este receptor celular provoca la transducción de señales que inhiben la transcripción de la IL-2 y la progresión del ciclo celular. El CTLA-4 bloquea las señales transducidas por el CD28, por lo que estas moléculas pueden funcionar como antagonistas. La función reguladora del CTLA-4 ha quedado bien ilustrada en los experimentos de la ruptura selectiva del gen CTLA-4 en el ratón. Ello dio como

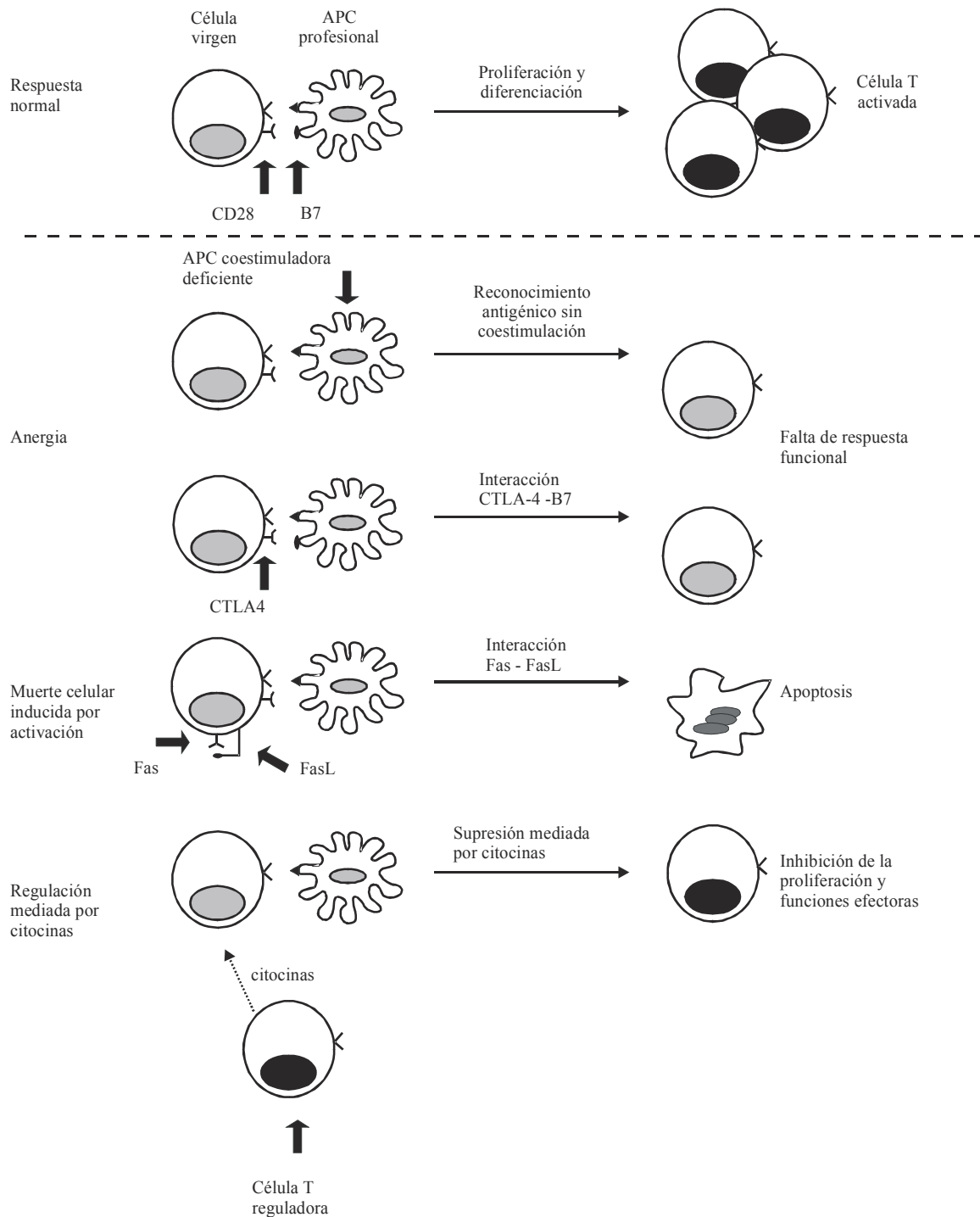
resultado la acumulación masiva de linfocitos activados en el bazo y los nódulos linfáticos, y manifestaciones de autoinmunidad. Por otra parte, la ausencia de otras moléculas críticas para la terminación de la respuesta inmune, como son las proteínas Fas y su ligando (FasL), que median la muerte apoptótica de las células activadas por el antígeno, también provoca EA experimental. Esto ha sido demostrado en el ratón *knockout* (desprovisto) de los genes Fas/FasL, el cual desarrolla una EA semejante al lupus eritematoso sistémico, asociada con una sobrevida prolongada de las células T auxiliaadoras (Th) autorreactivas y a la incapacidad de eliminar células B autorreactivas por apoptosis. Por tanto, la muerte celular mediada por las interacciones entre las moléculas Fas y sus ligandos (FasL) parece un mecanismo importante en la eliminación de las células autorreactivas activadas por los autoantígenos (figura 5.19).

La estimulación de los linfocitos T por el antígeno, en presencia de la segunda señal, conduce a su diferenciación no solo en células efectoras cuya función es eliminar el antígeno, sino también en células reguladoras. Aunque no se ha podido identificar un fenotipo individualizado de células T supresoras, estas funcionan mediante la producción de citocinas, cuyo efecto neto es inmunosupresor, entre ellas: el factor transformador de crecimiento- $\beta$  1 (TGF- $\beta$  1), el cual inhibe la proliferación linfocítica; y la interleucina 10 (IL-10), la cual inhibe la activación macrofágica y la expresión de las moléculas coestimuladoras. El papel de las células reguladoras en la prevención de la patología autoinmune ha sido ilustrado en los modelos animales, en los cuales la pérdida selectiva de células T de un fenotipo activado lleva al desarrollo de lesiones autoinmunes en múltiples órganos. Tales resultados indican que existe una subpoblación de células T que responde a los autoantígenos (por lo que es activada) y mantiene bajo control otros linfocitos autorreactivos, potencialmente patogénicos. Su función reguladora podría estar mediada por citocinas supresoras, pero las moléculas decisivas aún no han sido identificadas.

La existencia de los mecanismos reguladores activos como las moléculas CTLA-4, las interacciones Fas/FasL y los mediadores solubles de las células T, señalan que el reconocimiento de los autoantígenos es un fenómeno cotidiano, que es la regla y no la excepción; pero una vez que la respuesta autoinmune se inicia, esta es abortada en estado de salud. Es muy importante señalar que, a pesar de la presencia de múltiples mecanismos de autotolerancia, la falla de uno solo de estos lleva a la autoinmunidad. En otras palabras, estos mecanismos no son redundantes, y no pueden compensarse

unos con otros, lo que podría estar relacionado con el hecho de que diferentes autoantígenos induzcan mecanismos distintos de tolerancia. Por ejemplo, los autoantígenos restringidos a determinados tejidos y presentes en concentraciones reducidas, podrían inducir la anergia dependiente de CTLA-4; mientras que los

que son abundantes y están universalmente distribuidos, podrían causar la muerte apoptótica de las células activadas, mediada por Fas/FasL. La dificultad para probar esto radica en que la mayoría de los autoantígenos diana, tanto en las EA humanas como en las experimentales, aún no han sido identificados.



**Figura 5.19** Mecanismos de tolerancia periférica dependientes de la activación celular.

Algunos autoantígenos tal vez no induzcan tolerancia central, ni periférica, sino que son “ignorados” por el sistema inmune. Los ejemplos más ilustrativos de ignorancia o indiferencia del sistema inmune hacia los tejidos propios, son los autoantígenos anatómicamente “secuestrados” del contacto con los linfocitos inmunocompetentes. El “secuestro” puede ser también celular o molecular, pues entre los componentes antigénicos del propio organismo, algunos solo se manifiestan al exterior de las células esporádicamente o en condiciones anómalas. Por otra parte, en aquellas proteínas que circulan de manera abundante, hay determinantes antigénicos que están por lo general ocultos en el interior de la molécula o representados en una cantidad mínima, debido al polimorfismo de estas, y por ello, su presencia es “ignorada” por las células del sistema inmune. La “ignorancia” también puede funcionar frente a los antígenos que son presentados a los linfocitos en ausencia de la segunda señal coestimuladora, imprescindible para activar la respuesta inmune. Como los autoantígenos no provocan reacciones de la inmunidad innata, no es sorprendente que ellos puedan pasar inadvertidos por el sistema inmune. Aunque está establecido que el reconocimiento de los autoantígenos sin las señales coestimuladoras induce anergia, no se conocen hasta ahora los factores que determinan que un autoantígeno sea “ignorado” o que induzca anergia.

Un problema latente en los conceptos de la autotolerancia es que aún se desconoce cómo y cuáles autoantígenos inducen tolerancia central, periférica, o son “ignorados”; y las características de los autoantígenos que determinan cuál de estos mecanismos sea operativo.

## AUTOINMUNIDAD Y ENFERMEDAD

Hace poco se conoció que la tolerancia a los componentes propios no es absoluta. Por la gran diversidad proteica de los agentes patógenos, un sistema inmune que ha sido desprovisto de todo su potencial autorreactivo, tal vez no podría enfrentar a ningún invasor. La eliminación de células autorreactivas en los órganos linfoides centrales y periféricos no puede ser exhaustiva. Afecta, sobre todo, a las células de alta y moderada autorreactividad, y deja escapar un gran número de células potencialmente autorreactivas con los componentes propios, las cuales pueden ser útiles contra los microorganismos. De hecho, muchas células autoinmunes son retenidas, pero no causan problemas, pues ignoran los antígenos propios, en virtud de que estos son reconocidos con baja afinidad, son poco abundantes y porque lo impiden las barreras hísticas o de presentación antigénica.

Cabe preguntarse si alguna vez hay tolerancia completa, tanto frente a antígenos extraños como frente a componentes del propio cuerpo. Los estudios sobre tolerancia se han basado sobre todo en los resultados negativos: la ausencia de respuesta o de algún componente de esta. La sensibilidad de los métodos empleados condiciona los resultados; sin embargo, el progresivo perfeccionamiento de las técnicas inmunológicas ha permitido detectar respuestas muy leves en condiciones en las que antes parecía no haber respuesta alguna. Por ello, cada vez resulta más difícil contemplar la respuesta inmune como un fenómeno de “todo o nada”. Por el contrario, la respuesta inmune aparece como un fenómeno complejo que admite múltiples gradaciones de intensidad y matices cualitativos. Ante los estados de tolerancia, incluida la tolerancia a los componentes propios, al “yo” biológico, hay que pensar en una capacidad de respuesta frente al tolerógeno (el antígeno inductor de la tolerancia), regulada a niveles muy bajos. En tal sentido, el tema central de la autoinmunidad es, con frecuencia, un cambio cuantitativo, y en ocasiones también cualitativo, en la regulación de la respuesta frente a aquellos componentes del propio organismo que pueden tener propiedades antigénicas.

En la actualidad se concibe el reconocimiento de las estructuras propias como un fenómeno fisiológico que debe ser distinguido de las EA. El reconocimiento de las estructuras propias no solo no es dañino, sino que puede resultar imprescindible para el transcurso y la regulación de la respuesta inmune. La presencia de linfocitos T reactivos frente a las moléculas propias de histocompatibilidad clase II, los autoanticuerpos anti-idiotipos que aparecen después de la inmunización y regulan las respuestas humores, y la presencia de niveles bajos de autoanticuerpos a diversas moléculas propias en los individuos normales, forman parte del autorreconocimiento fisiológico o positivo. Aun cuando los valores umbrales de los ensayos se reajustan para excluir las reactividades leves, los anticuerpos antinucleares (AAN) y el factor reumatoide (FR) se observan en un pequeño, pero importante número de individuos sanos, y son más frecuentes en personas de edad avanzada y en pacientes hospitalizados.

La presencia de células autorreactivas y de autoanticuerpos en individuos sanos, correspondiente con el estado de autoinmunidad fisiológica o positiva, se necesita para la eliminación selectiva de células dañadas o senescentes, de inmunocomplejos generados en el funcionamiento normal de los mecanismos defensivos, o para el ajuste fino de la intrincada red neuroinmunoendocrina que se está empezando a entrever. Esto

ha sido demostrado para el FR, anticuerpo contra la molécula de IgG. El FR es en esencia IgM, y sus niveles se elevan rápido después de la inmunización con antígenos extraños, así como también se observa en pacientes con infecciones crónicas. Es muy probable que el FR facilite la eliminación de inmunocomplejos; su afinidad para la IgG monomérica es mucho más baja que para los multímeros de IgG que forman los complejos inmunes. La unión del FR a los inmunocomplejos promueve su remoción de la circulación por vía del sistema fagocítico mononuclear.

En apariencia, muchos individuos suelen permanecer en el estado de autoinmunidad fisiológica durante toda su vida. Se trata de manifestaciones mínimas de respuesta autoinmune, que solo se aprecian cuando se emplean procedimientos muy sensibles para su detección. Muchas de las enfermedades calificadas como autoinmunes pueden ser consideradas como resultantes de la exageración de los correspondientes fenómenos fisiológicos, que llegan a alcanzar capacidad patogénica cuando hay un cambio cualitativo o cuantitativo en la respuesta autoinmune que está presente de manera normal. Así ocurre cuando aumenta el título o la afinidad o varía el isotipo de un autoanticuerpo, o cuando se modifica la actividad o la subpoblación de los linfocitos autorreactivos. Reaparece aquí el concepto de la autoinmunidad patológica como un trastorno en la regulación del reconocimiento inmune que, de una manera constante, se está produciendo con respecto a los componentes del propio cuerpo, concepto según el cual la autoinmunidad no es un fenómeno esporádico y anormal, sino uno más de los mecanismos fisiológicos que opera en condiciones normales.

El término EA se aplica a aquellas condiciones clínicas en las cuales las células autorreactivas o los autoanticuerpos destruyen los tejidos y alteran sus funciones. Se considera que existen cerca de 40 enfermedades que pueden ser clasificadas parcialmente o completamente autoinmunes. Entre estas se encuentran desde las enfermedades limitadas o específicas de un solo órgano, hasta aquellas en las cuales la respuesta autoinmune y las lesiones afectan múltiples órganos, que son las EA sistémicas. La patología autoinmune acompaña otros problemas cotidianos de salud como son la arteriosclerosis, las enfermedades inflamatorias intestinales, la esquizofrenia, y determinados tipos de infertilidad (cuadro 5.3).

Las EA afectan cerca del 3 % de las poblaciones norteamericana y europea. Determinadas características de las EA podrían estar muy vinculadas con su causa, aún desconocida. La primera característica es la variabilidad de la evolución de una persona a otra

(e incluso entre los animales de experimentación), y su tendencia a las exacerbaciones y remisiones espontáneas. En un individuo, la actividad de la enfermedad puede atender contra la vida o ser asintomática, aun sin intervención médica, lo que sugiere la participación de potentes fuerzas que regulan el proceso autoinmune. La segunda característica de la mayoría de las EA es que el sexo femenino resulta mucho más sensible a padecerlas: más del 75 % de los enfermos son mujeres. El predominio del sexo femenino también es una característica de la mayoría de los modelos experimentales de las EA. Aunque las razones para esto aún no han sido descifradas, se considera que las influencias hormonales y determinadas anomalías endocrinológicas pueden desempeñar una función importante. La tercera característica de las EA es su superposición tanto en el plano clínico como serológico, lo que conduce a una confusión taxonómica. Por ejemplo, algunos pacientes presentan una enfermedad autoinmune llamada, en ocasiones, enfermedad mixta del tejido conectivo, la cual repite características del lupus eritematoso sistémico, esclerodermia y polimiositis.

**Cuadro 5.3** Espectro de las enfermedades autoinmunes

#### **Enfermedades específicas de órganos**

Tiroiditis de Hashimoto  
Mixedema primario  
Tirotoxicosis (grave)  
Anemia perniciosa  
Gastritis atrófica autoinmune  
Enfermedad de Addison  
Menopausia prematura  
Infertilidad masculina  
Miastenia gravis  
Diabetes mellitus insulín dependiente  
Síndrome de Goodpasture  
Pénfigo vulgar  
Oftalmia simpática  
Uveítis  
Esclerosis múltiple  
Anemia hemolítica autoinmune  
Púrpura trombocitopénica idiopática  
Leucopenia idiopática  
Cirrosis biliar primaria  
Hepatitis crónica autoinmune  
Colitis ulcerosa  
Síndrome de Sjögren  
Artritis reumatoide  
Esclerodermia  
Polimiositis-dermatomiositis  
Lupus discoide  
Lupus eritematoso sistémico (LES)

#### **Enfermedades no específicas de órganos o sistémicas**

Las relaciones entre autoinmunidad y enfermedad son complejas. Se conoce que la autoinmunidad puede ser la causa de una enfermedad, y que los productos de la respuesta autoinmune como los autoanticuerpos y los linfocitos T autorreactivos pueden dañar o alterar la funcionalidad de órganos y tejidos, y actuar por los mecanismos resumidos en el acápite sobre las reacciones de hipersensibilidad. Hay también respuestas autoinmunes que no son la causa, sino la consecuencia de una enfermedad o lesión originada de otra forma. La destrucción de tejidos por quemaduras, traumatismos (que puede ser quirúrgico), isquemias, entre otras causas, permite la liberación de antígenos hísticos, frente a los cuales hay una producción de anticuerpos específicos, que por lo general se detectan a las dos o tres semanas del acontecimiento. En ocasiones, esta respuesta autoinmune puede actuar como factor patogénico secundario, tal es el caso del síndrome de Dressler (pericarditis acompañada de pleuritis o neumonitis) en convalecientes de un infarto de miocardio.

## DEFINICIÓN DE LAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES

Es difícil emitir una definición satisfactoria de las EA. Demostrar la autoinmunidad como causa de enfermedad es una ardua tarea y requiere reproducir las manifestaciones de la enfermedad por la transferencia de anticuerpos o de linfocitos T. Como estos datos son engorrosos de obtener, en la práctica se interpreta que una enfermedad es autoinmune cuando se acompaña de la presencia de autoanticuerpos en la circulación, que se localizan junto con las proteínas del complemento y los linfocitos T en los tejidos dañados. Existen criterios básicos para considerar una enfermedad como autoinmune:

1. Presencia de un anticuerpo circulante o inmunidad celular frente a autoantígenos.
2. Definición del autoantígeno específico.
3. La capacidad de producir la enfermedad en un animal de experimentación por transferencia pasiva del autoanticuerpo o células autorreactivas.
4. La capacidad de producir la enfermedad en un animal de experimentación por la inmunización con el autoantígeno.
5. La capacidad de generar el autoanticuerpo o las células autorreactivas por la inmunización con el autoantígeno.

Según la estricta aplicación de estos criterios, muy pocas enfermedades podrían ser clasificadas como autoinmunes. De forma paradójica, aún el LES, una EA

prototipo, no cumple con exactitud estos criterios. La transferencia pasiva de los autoanticuerpos específicos que caracterizan al LES como los anti-ADN de doble cadena (anti-ADNdc) y los anti-Smith (anti-Sm), no ha producido la enfermedad en modelos experimentales. A pesar de algunos reclamos de la inmunogenicidad del ADN y del Sm, aún no se ha podido inducir el LES mediante la inmunización con estos autoantígenos emulsificados con adyuvante. Entonces hay que asumir que el LES y muchas otras enfermedades pueden ser clasificadas como autoinmunes porque presentan características indirectas en favor de la naturaleza autoinmune de sus lesiones como:

1. Ausencia de un agente infeccioso viable.
2. Mejoría o remisión del proceso patológico mediante el uso de terapia inmunosupresora.
3. Presencia de anticuerpos o linfocitos T oligoclonales en las lesiones.
4. Asociación con uno o más alelos del MHC.
5. Hipergammaglobulinemia en fases activas de la enfermedad.
6. Presencia de otros autoanticuerpos o autorrespuesta celular, no relacionados con el proceso patológico.

Muchas enfermedades inflamatorias crónicas se atribuyen a la autoinmunidad; pero, a pesar de los intensos estudios realizados durante décadas, la causa primaria aún no ha sido descubierta. Se recomienda cautela al clasificar las enfermedades crónicas de causa desconocida como autoinmunes, aun cuando exista asociación con alelos del MHC, o si se han demostrado autoanticuerpos y/o células T autorreactivas. Para ser autoinmune, la enfermedad debe resultar de una respuesta inmune deletérea, dirigida frente a los antígenos propios. Esta definición excluye las condiciones inmunopatológicas que se producen en las respuestas inmunes crónicas, dirigidas frente a antígenos microbianos persistentes, y algunas enfermedades consideradas de origen autoinmune podrían ser recategorizadas en un futuro, si se descubriera que un microbio nuevo es la diana de la respuesta inmune. Sería ingenuo imaginar que todos los agentes infecciosos están identificados; de hecho, estudios recientes estiman que solo se conocen alrededor del 0,4 % de todas las especies de bacterias existentes. La prueba de una fuerte asociación con el MHC, por ejemplo la del alelo HLA-B27 con las espondiloartropatías inflamatorias, pudiera implicar autoinmunidad, pero también podría reflejar susceptibilidad a una infección microbiana. Además, los

autoanticuerpos y las células autorreactivas pueden ser la consecuencia, más que la causa, de la enfermedad.

## CAUSAS MULTIFACTORIALES DE LAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES

Los trastornos que provocan las EA dependen de una compleja interrelación de factores genéticos y ambientales, la mayoría de los cuales aún no ha sido identificada. Los factores ambientales desencadenan la autoinmunidad patológica solo sobre un fondo genético susceptible. Las técnicas de biología molecular actuales han permitido una fina disección de los loci genéticos involucrados en los individuos susceptibles, y han facilitado la caracterización de las células inmunes que llevan a cabo la autoagresión. Se espera que en un futuro no muy lejano, las características de los estímulos ambientales vinculados a las respuestas autoinmunes también puedan ser conocidas, con fines de formular estrategias protectoras para salvaguardar a los individuos susceptibles de sus efectos.

Algunos estudios en modelos experimentales han permitido validar la hipótesis de *múltiples golpes* en la causa de las EA. En uno de esos estudios, un transgen viral se expresó en las células  $\beta$  del páncreas sin causar enfermedad. En un ratón transgénico expresó una molécula coestimuladora, la B7.1, sobre las células  $\beta$  del páncreas, y también permaneció sano. El cruce entre estas dos líneas transgénicas dio como resultado la destrucción de las células  $\beta$  del páncreas y de la diabetes. Cuando el transgen viral se expresó en el páncreas y el timo, de modo que las células T de mayor autorreactividad se eliminaban en virtud de la tolerancia central, el animal no desarrollaba la diabetes. Sin embargo, si este ratón se infectaba con el virus que expresaba el mismo gen que poseía en el páncreas, el ratón desarrollaba la diabetes. Estos resultados demuestran la contribución de *múltiples golpes* en el desarrollo de las EA:

1. Presencia de una molécula diana sobre el órgano blanco.
2. Expresión de una molécula coestimuladora en el órgano blanco.
3. Una infección viral que tal vez aumenta la secreción de las citocinas inflamatorias en el sitio de la destrucción inmune.

De forma análoga, la expresión de una EA en el hombre, probablemente requiera de una combinación de golpes genéticos y ambientales, por ejemplo:

1. Presencia de una molécula particular del MHC, como la HLA-B27.

2. Infección por un germen de las mucosas, como la Clamidia.
3. Un evento azaroso como una respuesta exacerbada de citocinas en el sinovio, pudiera desencadenar la artritis reactiva. Sin embargo, aún no se conoce con exactitud cómo se producen las interacciones entre los distintos factores de susceptibilidad para el desarrollo de una EA.

## FONDO GENÉTICO

La importancia de los genes como factores causales de las EA está basada en la agregación familiar de estas entidades y en la asociación epidemiológica de muchas de ellas con determinados antígenos del MHC. Producto de la función que desempeñan las moléculas del MHC en la presentación de los antígenos a las células T, la susceptibilidad para muchas EA está muy influenciada por genes de este complejo, en particular por los que codifican para las moléculas de clase I y II del MHC. Los genotipos del MHC determinan la capacidad de unir los distintos antígenos y, por tanto, de ellos depende la iniciación de la respuesta inmune. Durante muchos años, la asociación entre el MHC y las EA ha sido interpretada como una consecuencia de la eficiencia con que los alelos del MHC asociados con la enfermedad unen los autoantígenos específicos y los presentan a las células T. Esta interpretación ha sido invalidada a partir de un modelo inducible de EA, en el cual se demostró que el producto del alelo asociado con la enfermedad, el H-2<sup>s</sup>, unía el autoantígeno (un péptido de la proteína básica de la mielina) débilmente. Enseguida, el mismo grupo de trabajo demostró que la pobre unión del autoantígeno a las moléculas del MHC, dificultaba la eliminación de las células T autorreactivas específicas frente a ese péptido en el timo, lo que permitía su salida a la periferia. Se conoce que tanto el ratón no obeso diabético (NOD, el cual es el modelo experimental más estudiado de la diabetes autoinmune) y la mayoría de los pacientes con diabetes mellitus insulino dependiente (DMID) expresan moléculas clase II (DQ8, por ejemplo, HLA-DQA1\*0301 DQB1\*0302 en humanos, e I-A<sup>g7</sup> en el ratón), que se caracterizan por un residuo no aspártico en la posición 57 de la hoja  $\beta$  de la cadena clase II; un residuo que resulta crítico para la estructura y estabilidad de las moléculas MHC clase II. Varios estudios han demostrado que la molécula I-A<sup>g7</sup> une de manera muy débil diferentes autoantígenos de las células insulares pancreáticas, lo que le impide lograr la tolerancia tímica a esos autoantígenos, y aumenta el repertorio periférico de las células autorreactivas. Una situación parecida puede que



ocurra en el hombre por la similitud estructural entre las moléculas HLA-DQA1\*0301 DQB1\*0302 y la I-A<sup>g7</sup>, y porque las moléculas DQA1\*0301 y DQB1\*0302 también enlazan los pépticos diabetogénicos con muy poca afinidad. Al contrario, los genotipos que ofrecen resistencia a la diabetes, como el DQB1\*0602, son moléculas muy estables que podrían unir los péptidos de modo eficiente y asegurar así la tolerancia central frente a estos (tabla 5.10).

Existen además otros genes que se encuentran en la región del MHC, que desempeñan una función que influye directamente en el procesamiento y presentación antigénica y, por tanto, pueden influir en el desarrollo de la autoinmunidad patológica. Estos son, por ejemplo, los genes LMP-2 y LMP-7, que codifican para subunidades del proteosoma, encargadas de la degradación de las proteínas del citosol en pequeños pépticos. Los pépticos procesados son entonces transportados al lumen del retículo endoplasmático por los productos de los genes TAP-1 y TAP-2. Estas proteínas se encargan de la selección y transporte transmembrana de los fragmentos antigénicos que se unen a las moléculas HLA formadas por la asociación de las cadenas pesadas de clase I y la  $\beta$ 2 microglobulina. Se ha observado polimorfismo alélico tanto en los genes LMP como en los TAP, lo que posiblemente tenga alguna implicación en la susceptibilidad para las EA. La influencia de los genes MHC en la susceptibilidad de las EA no solo se atribuye a la función de las moléculas clase II y otras en la presentación antigénica, sino también al polimorfismo genético del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ), del cual depende la reacción inflamatoria. Se conoce el polimorfismo genético tanto en los genes como en las regiones promotoras del TNF  $\alpha$  y de la IL-10. La expresión de estas citocinas varía entre los individuos. Los estudios en gemelos sugieren que el fenotipo productor del TNF  $\alpha$  y de la IL-10 está determinado desde el punto de vista

genético. Es interesante conocer que el polimorfismo de transición de G a A en el primer intrón del gen del TNF se asocia con la susceptibilidad y el curso clínico de la artritis reumatoide (AR). Además, los pacientes con fenotipo GC en la posición 238, en la región promotora, presentan cifras significativamente superiores de articulaciones con erosiones. También se ha demostrado que el ratón *knockout* (desprovisto) de genes del TNF (TNF<sup>-/-</sup>) desarrolló una reacción inflamatoria en la articulación, marcadamente reducida, después de la inyección local del antígeno, en comparación con su contrapartida productora normal del TNF.

La contribución de los genes fuera del MHC ha quedado demostrada por la reducida concordancia de la enfermedad entre familiares idénticos para los *loci* HLA, en comparación con los gemelos monocigóticos. Por ejemplo, en la DMID, los gemelos monocigóticos tienen una concordancia de 36 % y los familiares HLA idénticos solo de 12 %. La dificultad en identificar los genes de susceptibilidad se debe, en parte, a la naturaleza inherente de esas complejas enfermedades poligénicas y a la diversidad en la composición genética de las poblaciones humanas. Los modelos experimentales en animales con una composición genética homogénea son menos complejos para la disección genética. En la actualidad, los modelos de ratón y de rata para las EA más importantes están sometidos a un intenso escrutinio mediante las técnicas de biología molecular y los estudios sistemáticos del genoma. Todos los modelos estudiados han resultado ser poligénicos, pues están regulados por múltiples *loci* genéticos, sin que exista un único gen que tenga el control absoluto sobre el inicio o la gravedad de la enfermedad. Más bien, los efectos aditivos o epistáticos de varios genes de contribución variable, ubicados en regiones diferentes del genoma, son necesarios para la expresión completa de la enfermedad. La interacción

**Tabla 5.10** Asociaciones epidemiológicas entre los alelos HLA y las enfermedades autoinmunes

Enfermedades	Alelos HLA
Artritis reumatoide	DR4
Diabetes mellitus insulínica	DR3, DQ3.2
Esclerosis múltiple	DR2
Pénfigo vulgar	DR4, DR6
Lupus eritematoso sistémico	DR2, DR3
Miastenia <i>gravis</i>	DR3
Enfermedad de Grave	DR3
Hepatitis crónica autoinmune	DR3 DQ2
Soriasis	Cw6
Espondiloartropatías	B27

entre los genes queda ilustrada en el siguiente ejemplo: ni el ratón blanco de Nueva Zelanda (NZW), ni el ratón negro de Nueva Zelandia (NZB) desarrollan enfermedad renal, ni anticuerpos anti-ADN, pero su híbrido (F1) desarrolla una nefritis muy grave, similar a la nefritis lúpica y a anticuerpos anti-ADN circulantes. Los factores genéticos determinan no solo la susceptibilidad a las EA, sino su curso y sus complicaciones. Se sabe que existen genes compartidos entre diferentes EA y otros genes específicos de EA particulares, lo que puede explicar la presencia de distintas EA en una misma familia y en un mismo individuo. Uno de esos genes compartidos pudiera ser el que codifica para la molécula CTLA-4, debido a la función que desempeña esta molécula en el desarrollo de la autoinmunidad en los sistemas experimentales y al fenotipo autoinmune del ratón desprovisto de CTLA-4 (CTLA-4  $-/-$ ). Se han encontrado varios polimorfismos en el gen CTLA-4 del hombre, los cuales se han asociado con diferentes EA como la DMID, la enfermedad de Grave, la tiroiditis de Hashimoto y otras. Esta aún no es la demostración definitiva de que el gen de la CTLA-4 sea el que predisponga a la autoinmunidad, pues pudiera serlo un gen muy ligado a este, como es el caso del gen de la molécula CD28. Se requieren estudios adicionales para conocer si estos polimorfismos resultan en una expresión alterada del gen de la CTLA-4 o modifican la función de esta molécula.

Sobre la base de las investigaciones actuales, se puede concluir que los componentes del MHC interactúan con productos génicos fuera de este, para regular las respuestas autoinmunes e inflamatorias. Para un paciente en específico, la susceptibilidad para la enfermedad (edad de inicio y facilidad para desencadenarse), la presentación (órgano diana y gravedad) y el pronóstico (grado de progresión/remisión y la lesión residual) reflejan los efectos aditivos o epistáticos de varios alelos “fortuitamente” heredados, muchos de los cuales pueden ser comunes entre varias EA.

## FACTORES AMBIENTALES QUE INFLUYEN EN LAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES

La influencia genética en las EA es elevada, pero no absoluta, pues en los gemelos monocigóticos la concordancia para las EA no sobrepasa el 60 %. Esto indica el papel de los factores ambientales en las causas de las EA. Se dispone de numerosos datos epidemiológicos que vinculan las EA a factores muy variados que incluyen: infecciones, fármacos, regímenes nutricionales, toxinas, estrés psicosocial y factores climáticos.

La radiación ultravioleta provoca recaídas del LES, y las lesiones dérmicas de esta enfermedad están por lo general limitadas a las áreas de exposición solar. Las temperaturas frías se consideran factores de riesgo que pueden acelerar el proceso patológico de la DMID. Muchos fármacos causan vasculitis de hipersensibilidad e inducen lupus. La procainamida, muy empleada para el tratamiento de arritmias ventriculares, es el agente causal más estudiado; pero también la hidralazina, la clorpromazina, la difenilhidantoína y muchos otros fármacos, cuando se ingieren por períodos prolongados inducen anticuerpos antinucleares dirigidos sobre todo contra histonas y un pequeño porcentaje de pacientes desarrolla una enfermedad evidente desde el punto de vista clínico.

Determinadas toxinas inducen EA. El cloruro de mercurio es el metal pesado que más se ha asociado con la autoinmunidad. Los animales tratados con  $HgCl_2$  desarrollan anticuerpos antinucleares y nefritis por depósito de inmunocomplejos. Los trabajadores expuestos a cloruro de polivinilo corren el riesgo de adquirir un síndrome semejante a la esclerodermia; y una enfermedad inflamatoria fibrótica, similar a la esclerodermia, está vinculada a la ingestión de aceite de colza. Un contaminante de las preparaciones de L-triptófano causa una enfermedad infiltrativa eosinofílica. Un área de gran controversia es la relación entre los implantes de senos de silicona y el desarrollo de esclerodermia y de otras enfermedades reumáticas. A pesar de algunas comunicaciones anecdóticas, no se ha encontrado una asociación verdadera. El hábito de fumar aumenta el riesgo de desarrollar la oftalmopatía en la enfermedad de Grave.

Factores nutricionales como el consumo de gran cantidad de calorías, ácidos grasos, vitaminas y minerales como el cinc, influyen en el desarrollo de la autoinmunidad en los modelos experimentales. El destete precoz y la temprana exposición a los antígenos de la leche de vaca se consideran factores desencadenantes de la autoinmunidad frente a las células  $\beta$  del páncreas.

Se han propuesto numerosos mecanismos para explicar cómo los agentes xenobióticos pueden inducir o acelerar la autoinmunidad. La mayoría de estos pueden ser divididos en tres categorías generales: la primera se refiere a las sustancias que previenen el establecimiento de la tolerancia central e inhiben la delección de las células autorreactivas del timo, lo que lleva a la liberación de las células autorreactivas a la periferia. Existe una hipótesis que plantea que los metabolitos de diversos fármacos que inducen la autoinmunidad pudieran interferir con los mecanismos de la selección

negativa de las células autoinmunes del timo; la segunda categoría abarca las sustancias que alteran la expresión de los genes de las células que participan en la respuesta inmune, y permiten a los linfocitos responder a las señales normalmente insuficientes para iniciar una respuesta o permiten a las APC estimular una respuesta anormal. Sobre la base de que la metilación del ADN está alterada en las EA, se ha propuesto que una de las formas en que los fármacos y otras toxinas pudieran desencadenar la autoinmunidad es inhibiendo la metilación del ADN, evento esencial para la expresión adecuada de proteínas; la tercera categoría se refiere a la modificación de las moléculas propias, al punto de que estas son reconocidas como extrañas por el sistema inmune, tanto por la alteración directa de las proteínas propias, como porque actúan sobre los genes que las codifican. Esto puede llevarse a cabo mediante el proceso de haptización. Determinadas moléculas extrañas, de pequeño tamaño, llamadas haptenos, que no alcanzan a ser antígenos por ellas mismas, pueden interactuar con moléculas propias, por ejemplo las moléculas del MHC y cambiar su estructura, lo que permite que estas sean reconocidas como extrañas y que sean atacadas por las células T y B. El mecanismo por el cual un hapteno se une a una proteína más grande para producir un antígeno, ha sido demostrado para un número importante de moléculas, que incluyen el cloruro de vinilo, los metabolitos de fenitoína, y los iones de mercurio, oro y níquel. Aunque aún no existen evidencias de que la haptización contribuye a las EA *in vivo*, se ha demostrado que los haptenos alteran las proteínas propias e inducen la producción de autoanticuerpos en algunos sistemas experimentales *in vitro*.

La contribución de los agentes infecciosos en el origen de las EA es un tema de investigación que se trata con empeño. Aunque casi todos los estudios sobre la incidencia y el curso de las EA muestran que las infecciones son epidemiológicas e indirectas, en los modelos animales se aprecia la veracidad de esta hipótesis. Las

asociaciones más repetidas son con los virus: virus de la leucemia humana tipo I (HTLV-I), virus de la linfocromeningitis humana (LCMV), virus herpes simple tipo 1 (HSV-1), virus *coxsackie* B (CVB), virus del herpes humano tipo 6 (HHV-6), virus de Epstein-Barr (EBV), virus de la hepatitis C (HCV) (tabla 5.11).

Existen dos posibles mecanismos de acción: el que recurre a la reactividad cruzada entre el germen y los antígenos propios, y el que se basa en los trastornos de la inmunorregulación que causa la infección. El concepto de la similitud molecular propone que los patógenos expresan una extensión de proteína, similar en secuencia o estructura con un autocomponente particular. Ese epítipo del patógeno puede ser presentado por las moléculas de histocompatibilidad y activar las células T autorreactivas. Esta activación tal vez se efectúa porque el receptor antigénico de las células T tiene una afinidad mayor para la proteína del patógeno que para el componente propio, o porque las células T se sensibilizan fácilmente durante el proceso inflamatorio de una infección. Como las células T sensibilizadas y amplificadas tienen un umbral más bajo para la activación, estas pueden ahora atacar a los autoantígenos que antes ignoraban.

El concepto alternativo es la activación inespecífica (*bystander activation*), el cual propone que los patógenos socavan la autotolerancia sin entrar en juego la especificidad antigénica. Ellos pueden lograrlo mediante varias vías: al causar la muerte celular se liberan antígenos intracelulares, lo que incrementa su visibilidad y abundancia; al atraer y potenciar las células presentadoras de antígeno; o al perturbar el equilibrio de las citocinas (local o a larga distancia) en el contexto de la inflamación asociada con la infección. En ese sentido, la autoinmunidad causada por la activación inespecífica pertenece a la amplia esfera de la inmunopatología asociada con los virus y parásitos, al considerar que la respuesta inmune frente a ellos es más deletérea que la toxicidad intrínseca de los gérmenes.

**Tabla 5.11** Enfermedades autoinmunes de posible causa viral

Enfermedades	Virus
Artropatías	HTLV-1
Anemia hemolítica	LCMV
Queratitis herpética	HSV-1
Diabetes mellitus insulino dependiente	CVB, rubéola
Esclerosis múltiple	HHV-6, EBV
Miastenia <i>gravis</i>	HCV
Lupus eritematoso sistémico	EBV

Los modelos experimentales han permitido demostrar que los virus pueden desencadenar EA, tanto por el mecanismo de la similitud molecular como por la activación inespecífica de las células autoinmunes. Se han encontrado muchas homologías entre las secuencias proteicas de los mamíferos y los patógenos, aunque la mayoría son de dudoso valor biológico. La base experimental la proveen los animales inmunizados con péptidos que contienen esas secuencias homólogas, y los ratones transgénicos en los cuales un epítipo viral es expresado en órganos particulares. Un ejemplo muy ilustrativo es la similitud entre la proteína P2-G del virus *coxsackie*, y el autoantígeno de la DMID que es la decarboxilasa del ácido glutámico (GAD). Este vínculo no es solo molecular, sino también existe asociación serológica y epidemiológica entre este virus y la diabetes. Es posible que la diabetes se inicie porque las células T autoinmunes específicas para la GAD sean activadas por la infección con el virus *coxsackie*, en virtud de su similitud secuencial. Pero recientemente un grupo de investigadores demostró que la infección con el virus *coxsackie* B4 produce diabetes en el ratón transgénico BDC2.5, en el cual la mayoría de sus células T reaccionan frente a un antígeno pancreático natural distinto al GAD. Esto señala la importancia del mecanismo de la activación inespecífica de las células autoinmunes para desencadenar la enfermedad. Hasta cierto punto, este efecto resultó específico del virus *coxsackie*, pues la infección con otro virus como el LMCV no produjo la diabetes. La diferencia entre estos dos virus es que el *coxsackie* B4 infecta las células pancreáticas, de modo que la inflamación local que lo acompaña podría perturbar el equilibrio inmunorregulatorio de las células T autorreactivas en la vecindad (por la mayor disponibilidad del autoantígeno y de las citocinas proinflamatorias), de modo que la supuesta conexión entre el virus *coxsackie* y la diabetes podría estar basada no tanto en la similitud molecular entre el virus y los autoantígenos, sino en que la infección viral del páncreas provoca la activación inespecífica de las células autoinmunes existentes, controladas hasta ese momento.

¿En qué medida pueden ser relevantes estos dos mecanismos en la patología humana? Teniendo en cuenta que las EA tienen una causa multifactorial y una patogenia tan compleja, tal vez será una tarea muy difícil identificar los microorganismos responsables por homología cuando las manifestaciones autoinmunes constituyen solo una complicación poco frecuente de la infección por patógenos comunes. Parece más verosímil que las células autoinmunes dormidas, inofensivas, sean activadas de forma inespecífica por patógenos con determinadas características inmunopatológicas.

## FACTORES ESTOCÁSTICOS QUE INFLUYEN EN LAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES

Hay otra categoría de factores que pueden jugar un papel importante en las EA, son los llamados estocásticos o azarosos, a los que pertenecen las recombinaciones somáticas de los genes de los anticuerpos durante el proceso de maduración de la afinidad y conducen a un autoanticuerpo patogénico. Esto pudiera ocurrir solo en uno de los dos gemelos monocigóticos, lo que explicaría la falta de concordancia en la expresión de las EA. Otro ejemplo sería la liberación de los antígenos secuestrados después de una infección o trauma, lo que condiciona la presentación de estos antígenos sobre la superficie de las APC y conduce a la activación de las células T y B. El estrés ha sido vinculado al comienzo de las EA. En modelos animales se ha demostrado que el sistema nervioso central puede inducir la respuesta inmune. Las manipulaciones de la conducta, tales como el estrés experimental, pueden agravar la artritis experimental. Investigaciones recientes informan de las conexiones cercanas que existen entre los sistemas nervioso, endocrino e inmune. Los niveles de corticosteroides endógenos cambian con el estrés, lo que puede tener un efecto significativo sobre la respuesta inmune. El eje hipotalámico-pituitario-adrenal dirige los cambios en los corticosteroides sistémicos, mediante la síntesis del factor liberador de corticotropina en el hipotálamo. Algunas citocinas como la IL-1, IL-6 y el TNF pueden afectar de manera directa el tejido cerebral, en particular el hipotálamo. Así, se cierra un circuito de dos vías entre el sistema nervioso central y el sistema inmune. El estrés, por sí solo, no causa EA. Sin embargo, cuando los mecanismos de oposición fallan, alteraciones importantes en la respuesta inmune pueden interactuar con factores genéticos y ambientales para completar los múltiples golpes necesarios para expresar la EA.

El gran predominio de las EA entre las mujeres sugiere que las hormonas sexuales pueden modular la susceptibilidad. Aunque los tipos de hormonas están determinados genéticamente, las fluctuaciones en los niveles hormonales es otro de los factores estocásticos asociados con las EA. La mayor parte de la atención ha estado enfocada sobre las hormonas sexuales: estrógenos, progesterona y testosterona, las cuales se producen en los ovarios y los testículos. Los efectos de los estrógenos sobre la respuesta inmune normal y las EA parecían contradictorios, hasta que se supo que esta hormona tiene efectos bifásicos, pues los niveles bajos incrementan las respuestas inmunes específicas y los altos (como los del embarazo) inhiben estas respuestas.

La progesterona promueve el desarrollo de las células Th2 y así contrarresta la respuesta Th1. La testosterona posee propiedades antiinflamatorias y ejerce efectos inmunosupresores en varios modelos experimentales de autoinmunidad (figura 5.20). También la prolactina y la hormona de crecimiento, que son más abundantes en las mujeres, potencian la autoinmunidad.

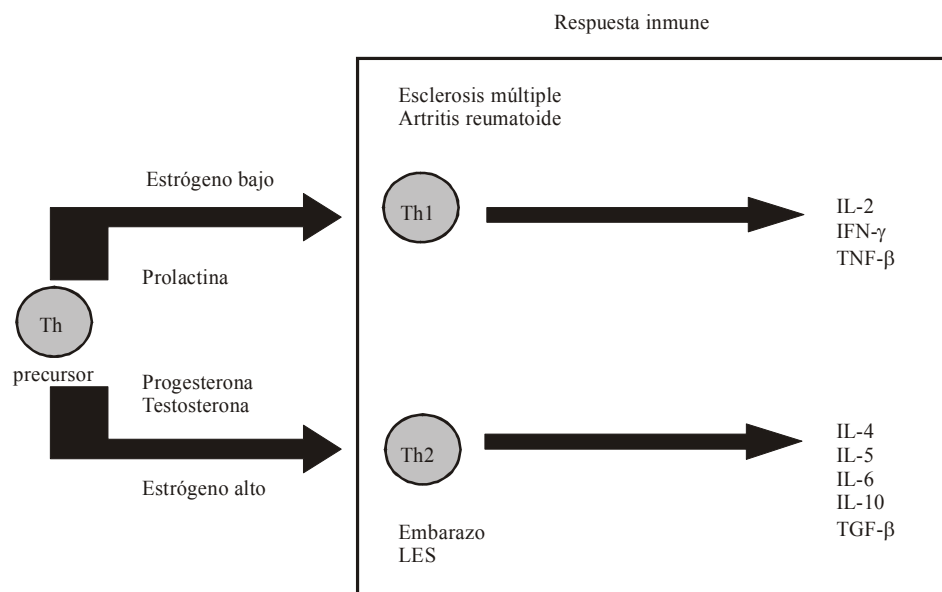
Existen varios posibles modos de acción de las hormonas sexuales sobre la respuesta inmune. Estas podrían modular la transducción de la señal de activación de las células T, alterar la expresión de las moléculas de activación sobre las células T y las APC, influir en la transcripción o traducción de los genes de las citocinas o en el reclutamiento de los linfocitos. El esclarecimiento de los mecanismos precisos por los cuales las hormonas sexuales alteran la función inmune, es vital para entender las diferencias de género de las EA.

En los niveles de las hormonas sexuales se producen fluctuaciones naturales durante el ciclo menstrual y el embarazo. Estas fluctuaciones pueden ser inducidas por los anticonceptivos orales, y por la terapia sustitutiva de estrógenos después de la menopausia. En la esclerosis múltiple (EM) y en la artritis reumatoide (AR), los síntomas de la enfermedad pueden empeorar antes de la menstruación. Durante el embarazo también hay diferencia entre las EA. En la EM y en la AR, se observa remisión de la enfermedad durante los 9 meses de la gestación, la que regresa a los niveles anteriores después del parto. Esto contrasta con el LES; según muchos autores experimenta

exacerbación en el embarazo. El medio hormonal característico del embarazo favorece la respuesta Th2, la cual impide el desarrollo de la respuesta Th1 asociada con EM y AR. En el LES, el embarazo potencia la respuesta Th2, promotora de anticuerpos, lo que agrava la enfermedad (figura 5.20). Muchas EA difieren en su presentación clínica entre hombres y mujeres. En la EM, el inicio de la enfermedad es más temprano en las mujeres, aunque en los hombres la enfermedad es más destructiva. El LES aparece en la adolescencia en las mujeres, mientras que es más tardío en los hombres. Las diferencias en la rapidez de progresión y presentación de las EA también se atribuyen a factores genéticos asociados con el sexo y a los efectos de las hormonas sexuales sobre los mecanismos de daño y reparación hística.

## EVENTOS PATOGENÉTICOS QUE CONDUCEN A ENFERMEDADES AUTOINMUNES

A finales del siglo xx se produjo una verdadera explosión en el conocimiento de los mecanismos inmunes concernientes a la autoinmunidad. Sobre la base de los estudios de los modelos experimentales se pudo deducir que la iniciación de la EA puede describirse como un proceso de tres etapas sometidas a las influencias genéticas y ambientales antes mencionadas. Este comienza con el desarrollo de varias células autoinmunes, seguido por la activación de estas células



**Figura 5.20** Influencias hormonales en las respuestas Th1 y Th2. Las hormonas sexuales, como la progesterona, que promueven el desarrollo de la respuesta Th2, contrarrestan la emergencia de las células Th1. Esto podría explicar por qué en la esclerosis múltiple y en la artritis reumatoide, los síntomas disminuyen durante el embarazo, mientras que en el lupus eritematoso sistémico, empeoran.

autorreactivas, ya sea por autoantígenos o por agentes externos, y por último, la progresión de la EA depende de la incapacidad del sistema inmune de regular de manera adecuada la respuesta autoinmune que se desencadenó. Así, por ejemplo, en la DMID, las células autorreactivas terminan destruyendo las células  $\beta$  del páncreas de los individuos genéticamente susceptibles. Primero, las moléculas HLA de clase II, que tienen una afinidad baja por los antígenos de las células  $\beta$ , fallan en inducir la autotolerancia frente a estos, y las células T específicas para los antígenos de las células  $\beta$  se escapan a la periferia. Al ser estimuladas por agentes ambientales o por los propios antígenos de las células  $\beta$ , estas células autorreactivas se expanden e infiltran los islotes pancreáticos hasta llegar a causar la insulinitis benigna; esta puede convertirse en insulinitis destructiva, al fallar cualquiera de los mecanismos inmunorregulatorios que mantienen bajo control las células autorreactivas, por ejemplo, una producción local aumentada de citocinas Th1, puede romper el equilibrio celular a favor de las células Th1, patogénicas e inductoras de los mecanismos efectores frente a las células  $\beta$  del páncreas.

La inducción de la diabetes autoinmune en modelos experimentales, ha permitido separar la enfermedad en una primera fase de reclutamiento o infiltración de las células autorreactivas en el páncreas y una segunda fase de manifestaciones clínicas que se corresponde con la destrucción del órgano. Las células autoinmunes comienzan a reclutarse en el órgano de choque, en virtud de las estimulaciones inespecíficas del sistema inmune, coincidentes con el destete, los cambios en la alimentación y en la flora intestinal. Estas estimulaciones inespecíficas incrementan el potencial de asentamiento (*homing*) de las células autorreactivas, lo que les confiere mayor capacidad de migrar al órgano “blanco”. También, como se ha observado en los modelos experimentales de la DMID, se producen alteraciones en la expresión de moléculas que dirigen la adhesión celular al endotelio de los vasos sanguíneos, como son las adhesinas MAdCAM y PNA<sub>d</sub>, y las células autorreactivas se tornan más adherentes a la pared de los vasos del páncreas, evento que coincide con el inicio de la insulinitis. Por otra parte, es concebible que la acumulación de las células T autorreactivas en el órgano de choque esté asociada con los cambios en la composición de las poblaciones de las APC, como los macrófagos y células dendríticas, las cuales pueden estar ausentes en el tejido conectivo entre los islotes y los vasos sanguíneos del páncreas, para impedir que las células T encuentren el antígeno en forma reconocible y procesada. Se puede especular que la iniciación espontánea de la diabetes está asociada con

un insulto local que libera los antígenos pancreáticos secuestrados, y le confiere al endotelio vascular la capacidad de atraer a las células T, cuyo potencial de reclutamiento (*homing*) ha sido aguzado, quizá de forma inespecífica, en el intestino.

Una vez que se instala la insulinitis, esta puede ser controlada por un tiempo, a pesar de que las células T con potencial agresivo están en contacto directo con sus antígenos específicos. La separación entre insulinitis y diabetes ha sido observada en muchos sistemas experimentales, por ejemplo, en el ratón NOD, una insulinitis prolongada no siempre culmina en enfermedad.

La adquisición de nuevas capacidades patogénicas efectoras puede depender del reajuste en las proporciones de células Th1/Th2, pues existen datos convincentes de que el reconocimiento de los autoantígenos por las células Th1 conduce a la destrucción del órgano, mientras que las Th2 autorreactivas son menos dañinas e incluso protectoras en algunas EA. Esto se explica porque la transferencia de células CD4<sup>+</sup> con perfil de citocinas Th1 ha provocado la diabetes, mientras que células que sintetizan citocinas Th2, aun siendo invasivas, no pueden inducir la enfermedad. Sobre la base de las citocinas encontradas en las lesiones y los modelos experimentales, algunas EA como la DMID, la AR y la EM han sido clasificadas como enfermedades mediadas por células Th1. Los estudios actuales advierten que la clasificación de las EA en Th1 o Th2 puede resultar demasiado simplista, y señalan, por ejemplo, que ha sido difícil demostrar una respuesta polarizada de citocinas en la EM, aunque exista una clara participación de las células Th1. Estudios recientes han demostrado que tanto la encefalitis alérgica experimental, el modelo de la EM, como la diabetes experimental pueden inducirse por la transferencia adoptiva de células Th2 y que ambos tipos de citocinas, Th1 y Th2, se expresan en las lesiones de la enfermedad activa. Aunque el concepto Th1/Th2 es un paradigma útil para la diferenciación y regulación de las células T, muchas respuestas inmunes y condiciones clínicas son más complejas y dependen de más de una población de células efectoras.

La función de las citocinas en la patogenia de las EA ha sido muy estudiado en los últimos años. Se han generado animales transgénicos que expresan citocinas individuales en órganos afectados por las EA. Estos experimentos indican que la expresión local de citocinas regula las respuestas autoinmunes a través de la modulación de la activación de las distintas poblaciones celulares. En correspondencia con el carácter patogénico de las células Th1 en los procesos autoinmunes (tema presentado anteriormente), la expresión transgénica de

citocinas inflamatorias como la IL-2, la IL-12, el IFN- $\gamma$  y el TNF ha acelerado la destrucción hística en distintos modelos experimentales. Estas citocinas activan las células T citotóxicas, las cuales atacan a las células propias, y los macrófagos, para la producción de citocinas proinflamatorias como la IL-1 y el TNF $\alpha$ , y los radicales libres muy tóxicos de oxígeno y nitrógeno.

Por otra parte, citocinas de tipo Th2, como la IL-4 y el TGF- $\beta$ , expresadas por transgénesis en el páncreas, regulan de manera negativa la respuesta Th1 y previenen la diabetes autoinmune. Sin embargo, trabajos recientes han dejado entrever el carácter inmunosupresor de las citocinas proinflamatorias Th1, así como el efecto inductor de la lesión autoinmune por parte de las citocinas Th2, consideradas antiinflamatorias, en dependencia de la fase de la respuesta inmune en la que comienza y el tipo de población celular con la que interactúan.

A pesar de los documentados efectos proinflamatorios del TNF durante las fases iniciales de la respuesta inmune, la administración tardía de esta citocina puede proteger al ratón NOD de la diabetes, así como también ha revelado propiedades antiinflamatorias en los procesos de desmielinización autoinmune.

Estas propiedades inmunosupresoras pudieran deberse a la capacidad del TNF de inducir la apoptosis de las células T, lo que resulta esencial para limitar la respuesta inmune; y sobre todo, al debilitamiento de las señales de activación de las células T que causa esta citocina, que fue recientemente demostrado. La estimulación crónica con el TNF obstaculiza la transducción de las señales activadoras en las células T, lo cual lleva a la muerte inducida por la activación de las células T activadas en el sitio de la inflamación. También la IL-12 y el IFN- $\gamma$  han resultado protectores en EA. Las propiedades inmunosupresoras del IFN- $\gamma$ , al igual que las del TNF, quizá se deban a la activación de los mecanismos homeostáticos para controlar la inflamación. Recientemente se ha demostrado que el IFN- $\gamma$  ejerce supresión directa sobre las células T autorreactivas. También el IFN- $\gamma$  puede prevenir la autoinmunidad al activar la apoptosis regulada por los genes Bcl-2 de las células T autorreactivas o de manera alternativa podría inducir la muerte de las células T autoinmunes efectoras, activadas en ausencia de señales coestimulatorias.

Los estudios anteriores muestran cuán contradictoria puede ser la función de las citocinas de acuerdo con el momento en que actúan. Las citocinas ejercen una importante influencia sobre la autoinmunidad no solo mediante la modulación de las células T, sino también de otras poblaciones celulares como las APC.

Las APC como los macrófagos y las células dendríticas (DC) tienen una función esencial en la patogenia de las EA. Estas células son las que sensibilizan a los linfocitos T autoinmunes en las fases iniciales de la enfermedad. Aunque los eventos que desencadenan la autoinmunidad no se conocen del todo, se señala que la apoptosis de unas pocas células  $\beta$  del páncreas precede la insulitis en el ratón NOD. Es muy probable que los macrófagos y las DC sean las primeras en capturar y presentar los autoantígenos liberados por apoptosis ocasionada por un daño primario no identificado. De manera simultánea, los macrófagos, por la secreción de IL-12, pueden desviar la respuesta inmune hacia la diferenciación de células inflamatorias Th1. La presencia local de las citocinas inflamatorias clásicas, que regulan de forma positiva las funciones de los macrófagos como el TNF y el IFN- $\gamma$ , activa la respuesta de células T autorreactivas y desencadena la lesión autoinmune. El mecanismo de acción de estas citocinas se atribuye en lo fundamental a que favorecen la captura y presentación de los autoantígenos por los macrófagos y las DC en los órganos diana. Por ejemplo, el IFN- $\gamma$  puede inducir la expresión de las moléculas MHC sobre las APC profesionales, así como sobre las células diana del ataque autoinmune. Las citocinas inflamatorias que se secretan durante la infección de un tejido pueden aportar las señales suficientes para la activación de los macrófagos y las DC, los cuales presentan los autoantígenos a las células T autorreactivas de los individuos con predisposición a las EA específicas de órganos.

En la actualidad se conoce que las citocinas de tipo Th2 también pueden activar los macrófagos y las DC. La IL-4 desencadena la diabetes autoinmune en el ratón transgénico, por su capacidad de incrementar la presentación de los antígenos de los islotes pancreáticos sobre los macrófagos y las DC. Aunque la IL-4 inhibe la vía inflamatoria clásica, caracterizada por la secreción de IL-1, TNF y radicales libres, puede inducir una vía alternativa de la activación de los macrófagos e incrementar su capacidad de fagocitosis, así como de expresión de moléculas MHC clase II, lo que puede llevar a la lesión autoinmune.

Estos estudios indican que las citocinas pueden desempeñar múltiples efectos en la patogenia de las EA, en dependencia de la fase de la respuesta inmune y el tipo celular con que interactúan. Aunque la IL-4 se opone al desarrollo de las células Th1, opera por su acción sobre los macrófagos y DC, con lo que promueve la presentación de los autoantígenos. Por otra parte, aunque la sola presencia del IFN- $\gamma$  puede ser suficiente para desencadenar autoinmunidad, esta

citocina también puede regular la respuesta inmune a través de las APC, con un efecto negativo. Además de su capacidad, mencionada antes, de limitar las respuestas de células Th1, el IFN- $\gamma$  puede facilitar la desactivación de los macrófagos porque incrementa la expresión de receptores A2b sobre estas células, lo que conduce a una menor expresión de moléculas MHC-II, así como una menor producción de la sintetasa del óxido nítrico y citocinas proinflamatorias. Estos mecanismos de control negativo pudieran ser útiles para regular la función presentadora de antígeno y las capacidades inflamatorias de los macrófagos en el curso de las respuestas autoinmunes y en la prevención de la autoinmunidad destructiva.

La progresión hacia la EA puede depender de la pérdida de sensibilidad a las señales negativas por parte de las células autoinmunes. Estas señales inhibitorias son transmitidas a través de las moléculas CTLA-4, los receptores de alta afinidad para la IL-2, requeridos para el equilibrio entre proliferación y muerte de las células T activadas, o los receptores inhibitorios para las moléculas MHC, que se expresan también sobre las células T y pueden representar un mecanismo de la tolerancia periférica frente a los autoantígenos.

En los modelos transgénicos de ratones que expresan una proteína viral de forma exclusiva sobre el páncreas, por lo que puede considerarse como propia, la diabetes se puede inducir por la inoculación del virus completo que comparte la proteína expresada transgénicamente. El inicio de la diabetes puede ser rápido (a los 14 días de la infección), o lento (a los 2 o 6 meses después de la infección); lo que está relacionado con la afinidad de células autorreactivas. Algunos de estos animales transgénicos logran expresar la proteína viral también en el timo, lo que conduce a la eliminación o deleción de las células T autorreactivas de gran afinidad, y quedan solo células de baja afinidad que demoran la aparición de la diabetes. Al contrario, los ratones que no logran expresar la proteína viral en el timo, no pueden eliminar las células T autorreactivas de mayor afinidad, las cuales pasan a la periferia y pueden lograr con rapidez una respuesta citotóxica, lo que provoca la diabetes de aparición rápida. A partir de este modelo transgénico, también se supo que el número de células autorreactivas resulta crítico para el desarrollo de la EA, pues, cuando se inducen células citotóxicas CD8<sup>+</sup> autorreactivas, que son las que provocan la destrucción de las células insulares del páncreas, en números inferiores a un valor umbral, la diabetes no se produce. Esta observación es una guía importante para la prevención y el tratamiento de las EA, los cuales no tendrían que estar

dirigidos a la erradicación total de las células autorreactivas, si no pudiera ser suficiente reducir su número por debajo de las cifras umbrales. Las capacidades patogénicas de las células T autorreactivas también dependen de sus funciones efectoras, pues en ausencia de moléculas efectoras como la perforina o el IFN- $\gamma$ , la diabetes no se desarrolla.

La cinética de la EA depende además del estado de las células blanco. Si se emplean tecnologías transgénicas para coexpresar junto con la proteína viral, moléculas coestimuladoras como las B7-1 sobre las células de los islotes pancreáticos, entonces la susceptibilidad para la diabetes se incrementa de manera apreciable; y, en algunos casos, la diabetes se produce de manera espontánea.

El comienzo de las EA que dependen de la producción de autoanticuerpos y del depósito de inmunocomplejos, como el LES, está relacionado con incrementos en el título, aumentos de la afinidad y cambios en el isotipo de los autoanticuerpos, lo que los convierte en patogénicos.

## MECANISMOS DE LESIÓN

Se estima que aún resulta de gran utilidad el esquema de clasificación de Gell y Coombs para entender los mecanismos de lesión de las EA. El daño mediado por la IgE no es importante en los trastornos autoinmunes. Los autoanticuerpos pueden causar daño a las células y tejidos por lisis directa, opsonización, actividad estimuladora y bloqueadora y por la deposición de inmunocomplejos. En la anemia hemolítica o trombocitopenia, los anticuerpos destruyen las células, ya sea por lisis directa si hay fijación de complemento, o por remoción de las células opsonizadas por el sistema fagocítico mononuclear. La enfermedad de Grave se caracteriza por hipertiroidismo mediado por anticuerpos estimulantes del tiroides que actúan de manera directa sobre el receptor de la TSH. En la miastenia *gravis* los autoanticuerpos antirreceptores de acetilcolina pueden bloquear el receptor e impedir la transmisión de la señal nerviosa, lo que provoca debilidad muscular. En la enfermedad crónica, sin embargo, los receptores son removidos por el daño directo en la placa neuromuscular. Los anticuerpos pueden también causar daño por sus efectos sobre el sistema de coagulación. El síndrome antifosfolípido se expresa por las trombosis arteriales y venosas, las cuales pueden causar infarto cerebral, cardíaco y tromboembolismos. Este síndrome se puede presentar aislado o como parte del LES y se debe no a verdaderos anticuerpos antifosfolípidos, sino a anticuerpos frente a proteínas



fijadoras de fosfolípidos, sobre todo la glicoproteína I  $\beta$ 2. Estos anticuerpos incrementan la agregación plaquetaria y promueven la formación del trombo; mientras que, paradójicamente, *in vitro* prolongan el tiempo parcial de tromboplastina, un indicador de la coagulación. Este fenómeno *in vitro* se denomina anticoagulante lúpico, y se presenta en una proporción muy baja de pacientes con LES, así como en individuos sin enfermedades conocidas. Se considera una causa importante de abortos espontáneos tempranos, y de la enfermedad trombótica en la población general. El daño hístico también lo pueden desencadenar los anticuerpos anticitoplasma de los neutrófilos (ANCA), los cuales reconocen la mieloperoxidasa y la proteinasa 3. Estos anticuerpos son útiles marcadores de las vasculitis, incluyendo la granulomatosis de Wegener, la glomerulonefritis necrotizante pauciinmune y crescentica pauciinmune, así como la poliarteritis nodosa, y sus títulos se correlacionan con la gravedad de la enfermedad. El mecanismo por el cual estos anticuerpos, dirigidos a proteínas citoplasmáticas, provocan la lesión de la pared de los vasos e inflamación aún no se conoce del todo, pero puede explicarse por la expresión de la proteinasa 3 y la mieloperoxidasa sobre los neutrófilos activados, y quizá por la liberación de proteinasa 3 libre. Los anticuerpos frente a estas moléculas pueden provocar una mayor quimiotaxis y adhesión de los neutrófilos, además de desencadenar el metabolismo respiratorio. Esto puede ocasionar eventos que culminan en la activación de células T y macrófagos y la formación de granulomas necrotizantes.

Las lesiones mediadas por inmunocomplejos son responsables de la mayor parte de la patología de las EA sistémicas, en particular del LES y la vasculitis. El LES es denominado también enfermedad del suero crónica, por ser el prototipo de enfermedad causada por inmunocomplejos, donde es frecuente la artritis, la enfermedad renal y la vasculitis. Los inmunocomplejos pueden formarse por las reacciones entre los antígenos y los anticuerpos en la circulación y luego depositarse en los tejidos, o pueden formarse en los tejidos *in situ*, cuando los antígenos se encuentran en la membrana basal (piel, capilares, glomérulo). Las propiedades físico-químicas y biológicas de los inmunocomplejos y, por tanto, su patogenicidad varían en dependencia de la naturaleza del antígeno, de la subclase del anticuerpo y de las proporciones de ambas moléculas que entran en la reacción. La capacidad de unir y activar el sistema de complemento por los inmunocomplejos se considera una de las más nocivas, porque precipita la activación de los neutrófilos y plaquetas, con la consecuente liberación de aminas vasoactivas que amplifican la reacción

inflamatoria. Ha sido mucho el interés depositado, aunque no tanto el éxito cosechado, en identificar el antígeno que forma parte de los inmunocomplejos del LES. Las exacerbaciones del LES son precedidas, con frecuencia, por caídas del complemento sérico, junto con elevaciones en los niveles de anticuerpos anti-ADNdc. Estos anticuerpos se concentran en los glomérulos de los pacientes con nefritis lúpica, lo que apoya la idea de que los complejos ADN-anti-ADN pueden depositarse en los riñones y provocar así la inflamación. Aunque existen evidencias de que los complejos ADN-anti-ADNdc son importantes en la enfermedad renal lúpica, es muy probable que otras especificidades de autoanticuerpos contribuyan también al daño glomerular. Por ejemplo, los anticuerpos anti-cromatina forman inmunocomplejos que pueden ubicarse sobre la membrana basal glomerular. Los estudios actuales están dirigidos a la definición de la carga, el tamaño y las características de tales anticuerpos con relación a su capacidad de unirse y dañar los glomérulos.

Los mecanismos de daño hístico se combinan en muchas EA, aunque pueden predominar unos sobre otros. Las respuestas autoinmunes mediadas por células, por lo general coexisten con los fenómenos inflamatorios causados por inmunocomplejos y la acción de los autoanticuerpos. Esos son los ejemplos de la AR y la EM, las cuales se clasifican como EA mediadas por células, aunque dependan también de los mecanismos humorales. Las lesiones cutáneas del LES se atribuyen sobre todo a las células T. Las lesiones inflamatorias destructivas de los músculos que caracterizan a la polimiositis están dominadas por células T, aunque es común la presencia de los anticuerpos anti-sintetasa y otras alteraciones serológicas. En la DMID, clasificada como una EA mediada por células, tampoco puede ser subestimada la función de los autoanticuerpos frente a los diferentes antígenos de los islotes pancreáticos. Aunque los mecanismos celulares son protagonizados por células T, ocurren con la participación de otras células inflamatorias como los neutrófilos y los macrófagos, los cuales liberan una miríada de factores inflamatorios dañinos para los tejidos. Uno de estos mediadores es el óxido nítrico, el cual se sabe que desempeña un papel importante en la sinovitis de la AR. Las células T pueden realizar la lisis de las células mediante la proteína formadora de poros en las membranas, que es la citolisina (perforina), la cual actúa en concierto con las serina-esterasas secretadas. Las células T también pueden inducir la muerte celular programada, la apoptosis, por medio de receptores

celulares de superficie, que son miembros de la familia del TNF. Aunque las células T CD8<sup>+</sup> se consideran los mediadores más importantes de la actividad citotóxica, las células CD4<sup>+</sup> también pueden adquirir la capacidad de realizar la lisis de las células blanco. El papel patogénico de las células T ha sido demostrado en los modelos experimentales de las EA, no así en los humanos, pues aún faltan las evidencias de la participación de las células T como mediadores directos de la lesión histica autoinmune.

En la actualidad, los tratamientos de las EA están dirigidos hacia los mecanismos de lesión conocidos o a la supresión global de la respuesta inmune, aunque se espera que en un futuro la diana de las terapias inmunosupresoras sean los factores causales de estos trastornos. Algunos fármacos antiinflamatorios como la aspirina y los corticoesteroides, algunos agentes contra la malaria como la cloroquina y la hidroxiclo-roquina, agentes citostáticos como el metotrexate, azatioprina y ciclofosfamida, la ciclosporina A y el FK506, la irradiación linfoide total, la plasmaféresis y la leucoféresis son las armas terapéuticas con que se cuenta hoy. El mayor problema de estas terapias es que inhiben la respuesta inmune de un modo muy inespecífico, al atacar los mismos mecanismos inmunes e inflamatorios necesarios para combatir los microbios y el crecimiento de células neoplásicas. Por tanto, el uso crónico y, peor aún, indiscriminado, de estos agentes terapéuticos conduce a un elevado riesgo de infecciones, y en ocasiones de enfermedades neoplásicas. El conocimiento mejorado de los mecanismos de lesión ha permitido trazar terapias con anticuerpos monoclonales anticitocinas o frente a marcadores de células T, tales como el anti-CD4, los cuales también por su falta de especificidad han resultado de limitado valor. Hoy día, se están ensayando diferentes terapias en modelos animales, dirigidas frente a moléculas específicas de la respuesta autoinmune como moléculas de la comunicación intercelular, otros factores solubles y ligandos de la superficie celular, tan específicos como el receptor de las células T y las moléculas MHC. Ya se ha logrado bloquear con éxito el desarrollo de

las EA experimentales mediante tratamientos dirigidos a cada uno de los componentes del complejo trimolecular de la molécula MHC, el péptido unido, y el receptor T. Estos resultados “iluminan” las posibilidades de tratamientos específicos de EA en el hombre y su próxima aplicación.

## BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- Andre I, González A, Wang B, Katz J, Benoist C, Mathis D. Checkpoints in the progression of autoimmune disease: Lessons from diabetes models. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:2260-3.
- Cope AP. Regulation of autoimmunity by proinflammatory cytokines. *Curr Opin Immunol* 1998; 10:669-76.
- Griffiths MM, Encinas JA, Remmers EF, Kuchroo VK, Wilder RL. Mapping autoimmunity genes. *Curr Opin Immunol* 1999; 11:689-700.
- Heimer H. Outer causes inner conflicts: environment and autoimmunity. *Environ Health Perspect* 1999; 107:A504-9.
- Horwitz MS, Bradley LM, Harbertson J, Krah T, Lee J, Sarvetnick N. Diabetes induced by Cocksackie virus: initiation by bystander damage and not molecular mimicry. *Nat Med* 1998; 4:781-5.
- Horwitz MZ, Sarvetnick N. Viruses, host responses, and autoimmunity. *Immunol Rev* 1999; 169:241-53.
- Kagi D, Odermatt B, Ohashi PS, Zinkernagel RM, Hengartner H. Development of insulinitis without diabetes in transgenic mice lacking perforin-dependent cytotoxicity. *J Exp Med* 1996; 183:2143-52.
- Muller D. The molecular biology of autoimmunity. *Immunol Allergy Clin North Am* 1996; 16:659-82.
- Nepom GT. MHC and autoimmunity diseases. En: Bach F(ed): Monoclonal antibodies and peptide therapy in autoimmune diseases. New York: Marcel Dekker; 1992. p.143-64.
- Oldstone MBA. Molecular mimicry and immune-mediated diseases. *FASEB J* 1998; 12: 1255-65.
- Rabinovitch A. An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res* 1998; 14: 129-51.
- Ridgway WM, Fathman CG. MHC structure and autoimmune T cell repertoire development. *Curr Opin Immunol* 1999;11: 638-42.
- Van Parijs L, Abbas AK. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: Turning lymphocytes off. *Science* 1998; 280: 243-8.
- Von Herrath MG, Dockter J, Oldstone MBA. How virus induces a rapid or slow onset insulin-dependent diabetes mellitus in a transgenic model. *Immunity* 1994; 1:231-42.
- Whitton JL, Fujinami RS. Viruses as triggers of autoimmunity: facts and fantasies. *Curr Opin Microbiol* 1999; 2:392-7.

## **CONTENIDO**

---

### **Introducción/ 485**

### **Inmunodeficiencias primarias/ 485**

Defectos primarios de linfocitos B/ 485

Defectos primarios de linfocitos T/ 486

Inmunodeficiencias combinadas/ 487

### **Deficiencias congénitas del sistema de complemento/ 488**

Deficiencia de los componentes de complemento/ 488

Deficiencia de proteínas controladoras del sistema de complemento/ 488

### **Alteraciones congénitas de fagocitos/ 488**

Enfermedad granulomatosa crónica/ 488

Déficit de adhesión leucocitaria/ 489

Síndrome de Chediak-Higashi/ 489

### **Inmunodeficiencias adquiridas o secundarias/ 489**

Causas de inmunodeficiencias secundarias/ 489

Síndrome de inmunodeficiencia adquirida. Inmunología de la infección por el virus de inmunodeficiencia humana/ 492

### **Diagnóstico y evaluación de las inmunodeficiencias/ 493**

Antecedentes patológicos personales/ 493

Historia familiar/ 494

Examen físico/ 494

Diagnóstico de laboratorio/ 495

### **Bibliografía recomendada/ 495**

# Capítulo 41



## INMUNODEFICIENCIAS CONGÉNITAS Y ADQUIRIDAS

*Dra. Martha L. Paradoa Pérez*  
*Dra. Vianed Marsán Suárez*

### RESUMEN

Se agrupan bajo el denominador común de inmunodeficiencias, un conjunto de defectos de uno o más de los componentes del sistema inmune, que pueden provocar enfermedades graves con peligro para la vida. Estos trastornos se clasifican según su origen en congénitos o primarios, y en adquiridos o secundarios. En los congénitos o primarios pueden estar comprometidas las células B, T y las asesinas naturales, así como los fagocitos y el sistema del complemento; los adquiridos o secundarios se desarrollan como consecuencia de malnutrición, neoplasias, problemas metabólicos o infecciones de las células del sistema inmunitario, lo que ocurre, sobre todo, en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida, uno de los principales azotes de la humanidad en estos tiempos. En este capítulo se hace especial énfasis en el diagnóstico y seguimiento de estas enfermedades, esencialmente por medio de los estudios moleculares.

### INTRODUCCIÓN

Los defectos de uno o más de los componentes del sistema inmune pueden provocar enfermedades graves que ponen en peligro la supervivencia del individuo. En general se denominan inmunodeficiencias.

Estas enfermedades se clasifican en dos grandes grupos:

1. Inmunodeficiencias congénitas o primarias, en las cuales pueden estar comprometidas las células B, T y las asesinas naturales (*natural killers* o NK), así como los fagocitos y el sistema de complemento.
2. Inmunodeficiencias adquiridas o secundarias, que se desarrollan como consecuencia de malnutrición, neoplasias, problemas metabólicos o infecciones de las células del sistema inmunitario, lo que ocurre sobre todo en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

En este capítulo se describen las características clínicas, patogénicas y las bases genéticas de algunas enfermedades congénitas y los principales mecanismos inmunológicos presentes, por lo general, en estos síndromes. Se discute, además, la compleja interacción

entre los efectos del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) sobre la función de las células inmunes y la respuesta del huésped frente a la infección viral, elementos importantes para el manejo terapéutico de esta enfermedad. Se hace notar que todas estas enfermedades, en un mayor o menor grado, están asociadas con una incidencia de tumores y el desarrollo de autoinmunidad.

### INMUNODEFICIENCIAS PRIMARIAS

#### DEFECTOS PRIMARIOS DE LINFOCITOS B

**Agammaglobulinemia ligada al cromosoma X (Bruton).** La mayoría de los niños afectados son asintomáticos en los primeros 6 a 9 meses de vida, pero después sufren infecciones por piógenos (*Pneumococcus*, *Streptococcus* y *Haemophylus*). La función de sus células T es normal.

Las concentraciones en suero de IgG, IgA, IgM e IgE están por debajo del 95 % del límite confidencial para los controles apropiados (menos de 100 mg/dL de Ig total).

El defecto molecular se localiza en la proteína tirosina quinasa de las células B, llamada Bruton tirosina quinasa (BTK), que está presente en toda la estirpe de células B, incluyendo las células pre-B y las células mieloides relacionadas con la transducción de la señal, e hipotéticamente, con la diferenciación de las células B. Las mutaciones de este gen, localizado en el *locus* Xq 22, así como concentraciones bajas o no detectables de ARNm específico para esta enzima, caracterizan esta enfermedad, lo que provoca que la actividad quinasa esté casi ausente en estos pacientes.

**Inmunodeficiencia variable común (CVID).** Conocida como hipogammaglobulinemia adquirida, el cuadro clínico es parecido a la agammaglobulinemia congénita de Bruton, pero se observa en ambos sexos. El 25 % de los casos cursa con esplenomegalia, y el cuadro clínico se presenta en edad más tardía. En general, el paciente posee hipogammaglobulinemia, neumonía intersticial linfóide, pseudolinfoma y esplenomegalia.

La relación familiar de esta inmunodeficiencia con el déficit selectivo de IgA hace pensar en una base genética común. Se ha descubierto una alta incidencia de deleciones en el gen C4-A y alelos raros del gen C2, por lo que puede sugerirse que el gen (o los genes) de susceptibilidad se encuentra en esta región del MHC.

**Déficit selectivo de IgA.** Es la deficiencia más común, con una frecuencia de 1:700 y encontrada en donantes de sangre, aparentemente sanos. En estos pacientes se presentan infecciones en los aparatos respiratorio, gastrointestinal y urogenital. Como se ha precisado ya, aunque el defecto básico de esta inmunodeficiencia es desconocido, existe cierta relación con la deleción en los genes MHC clase III, al igual que con CVID.

**Hipogammaglobulinemia transitoria de la infancia.** Se caracteriza por concentraciones disminuidas de Ig, que aumentan progresivamente a partir de los 3 años de edad. En estos pacientes, los anticuerpos contra los antígenos eritrocitarios A y B están normales, así como los específicos contra los antígenos de toxoide tetánico y de la difteria. En la actualidad, la base molecular de este trastorno es desconocida, aunque parece estar relacionada con el déficit de la producción de ciertas citocinas necesarias para la diferenciación de las células B.

**Subclases de IgG.** A pesar de que los valores de IgG están normales o elevados, estos pacientes presentan deficiencias de una o más subclases de IgG. El déficit de IgG3 es el más frecuente en adultos y el de IgG2 junto con IgA es más frecuente en niños. Este defecto se debe a una diferenciación anormal de las células B.

**Deleción de las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas.** Estos pacientes se descubren de forma fortuita, pues no tienen historia de infecciones. Presentan múltiples deleciones y ausencia total de IgG1, IgG2, IgG4 y/o IgA1.

**Enfermedad linfoproliferativa ligada al cromosoma X (enfermedad de Duncan).** Se ha detectado una inadecuada respuesta inmune al virus de Epstein-Barr (EBV). El gen defectuoso se localiza en el *locus* Xq25-26. La edad media de presentación es menos de 5 años, y prácticamente el 75 % de los casos presenta una forma severa fatal (tabla 5.12).

**Tabla 5.12** Localización cromosómica de los genes defectuosos en inmunodeficiencias de células B

Enfermedad	Cromosoma
Deficiencia de cadena <i>kappa</i>	2p11
CVID y déficit selectivo de IgA	6p.21.3
Deleción de cadena pesada de Ig	14q32.3
Agammaglobulinemia de Bruton	Xq 22
Linfoproliferativa	X4 24-26

## DEFECTOS PRIMARIOS DE LINFOCITOS T

**Síndrome de Di George (hipoplasia tímica).** Esta deficiencia se debe a una malformación congénita que produce un desarrollo defectuoso de los arcos branquiales tercero y cuarto, lo cual provoca una hipoplasia del timo, ausencia de glándulas paratiroides (tetania), desarrollo anormal de grandes vasos sanguíneos y deformidades faciales (labios y orejas). En algunos casos hay asociación con microdeleciones en el cromosoma 22. Los linfocitos T periféricos están bajos o ausentes y no responden a activadores policlonales de células T ni a aloantígenos. Los pacientes son susceptibles a infecciones por micobacterias, hongos y virus.

**Inmunodeficiencia ligada al cromosoma X con hiper IgM.** Los pacientes son niños que presentan cifras de IgG e IgA séricas muy bajas, con una concentración aumentada de IgM. El defecto molecular está en la gp 39 o ligando CD 40, muy importante en la señal de células T activadoras del linfocito B para la diferenciación y recombinación de cambio en la producción de los isotipos IgG e IgA. El gen anormal está localizado en el Xq 26.

**Defectos en las moléculas necesarias para la activación y función de células T.** Son 3 los defectos:

1. Expresión defectuosa del complejo receptor de células T (TCR) por mutaciones de los genes CD<sub>3</sub>γ o CD<sub>3</sub>ε localizados en el cromosoma 11.
2. Señalización defectuosa mediada por el complejo TCR, debido a mutaciones del gen ZAP-70 localizado en el cromosoma 2, que provoca una linfopenia CD 8 positiva.

- Síntesis defectuosa de citocinas como IL-2 e IFN $\gamma$  (en algunos casos, debido a defectos en la transcripción). Existe una relación con un enlace inadecuado del factor nuclear de células T activadoras (NF-AT). Estos casos cursan con deficiencias en la función de las células T, cuyas características clínicas y gravedad varían considerablemente (tabla 5.13).

## INMUNODEFICIENCIAS COMBINADAS

**Inmunodeficiencia combinada (síndrome de Nezelof).** Son pacientes con infecciones pulmonares crónicas o recurrentes, candidiasis oral o cutánea, diarrea crónica, infecciones urinarias y sepsis debido a bacterias gramnegativas. La función proliferativa de las células T a mitógenos, a antígenos y a aloantígenos está comprometida. Desde el punto de vista clínico, esta afección se parece al SIDA en edad pediátrica, aunque la relación Cel T-CD3<sup>+</sup> está muy disminuida y la proporción CD4<sup>+</sup>-CD8<sup>+</sup> es normal. El nivel de Ig es normal o aumentado. El patrón de herencia autosómico recesivo se observa con frecuencia. En esta deficiencia se ven mutaciones puntuales del gen que codifica la enzima PNP en el cromosoma 14q13.1. Estos pacientes desarrollan enfermedades autoinmunes.

**Inmunodeficiencias combinadas severas.** Este término se aplica a un grupo heterogéneo de enfermedades, caracterizadas por defectos en el desarrollo y función de los linfocitos T y B, por linfopenia e inmunodeficiencia humoral y celular. Por lo general los pacientes mueren en el primer año de vida por infecciones graves (bacterianas, virales, fúngicas, protozoarias y parasitarias).

El 60 % de estas inmunodeficiencias tienen un patrón genético ligado al cromosoma X, y el defecto molecular se encuentra en la cadena  $\gamma$  del receptor de IL-2, componente del receptor de muchas otras IL que regulan el desarrollo y función del sistema inmune (4, 7, 9 y 15).

Entre las inmunodeficiencias combinadas severas con patrón autosómico recesivo, la más frecuente es la deficiencia de ADA (adenosina diaminasasa), que provoca un efecto tóxico para las células del sistema inmunitario en desarrollo, con el consiguiente déficit de linfocitos B y T y una inmunodeficiencia severa. El gen delecionado se encuentra en el cromosoma 20q 13-ter.

La forma más grave de las inmunodeficiencias combinadas severas es una enfermedad llamada disgenesia reticular, caracterizada por la ausencia de linfocitos B, T, NK y granulocitos, debido, al parecer, a un defecto en la célula madre hematopoyética.

**Deficiencia en MHC clase I y clase II.** Se han diagnosticado 3 formas de esta enfermedad: el déficit de una de las dos clases y el déficit de ambas clases. Casi todos los pacientes mueren antes del tercer año de vida, pues en general se afectan la inmunidad humoral y celular y, sobre todo, la cooperación de las células inmunes por la función que desempeñan estas moléculas.

Se han definido 2 defectos moleculares de los genes promotores de MHC clase II: una mutación en el gen que codifica la partícula RFX (un factor de transcripción) y una mutación en el gen transactivador CIITA, otro factor de transcripción para la expresión del MHC clase II.

En algunos casos, el fracaso de la expresión de MHC clase I, se debe a mutaciones del gen que codifica la subunidad del transportador asociado con la presentación del Ag-2 (TAP-2) del complejo TAP (bombedador de los péptidos hacia el RE para el ensamblaje del MHC clase I).

**Inmunodeficiencias asociadas con otras enfermedades hereditarias.** Estas enfermedades congénitas se caracterizan por un amplio espectro de anomalías que implican múltiples sistemas y órganos, y desarrollan variables inmunodeficiencias de las células B y T. Una de ellas es el síndrome de Wiskott-Aldrich, enfermedad ligada al cromosoma X y caracterizada por eccema, trombocitopenia e infecciones por bacterias piógenas encapsuladas. Estos pacientes son incapaces de producir anticuerpos antipolisacáridos, presentan concentraciones elevadas de IgA e IgE y una disminución del porcentaje de células T (CD3, CD4 y CD8).

**Tabla 5.13** Localización del defecto en las inmunodeficiencias de linfocitos T

Enfermedad	Defecto molecular
Síndrome de Di George	Deleción en cromosoma 22q11
Inmunodeficiencia con hiper IgM	Mutación del LCD40 (gp 39) cromosoma Xq26
Expresión defectuosa de TCR	Mutación del CD $_3\gamma$ y CD $_3\epsilon$ en cromosoma 11
Linfocitopenia CD $_8$	Mutación en ZAP-70
Déficit en citocinas	Enlace inadecuado del NF-AT

El gen anormal ha sido localizado en Xp11.22-11.23, y esta proteína, llamada WASP (*Wiscott-Aldrich syndrome protein*), parece cumplir una función importante como reguladora de la función de los linfocitos y las plaquetas.

La ataxia telangectasia es otra de las enfermedades autosómicas recesivas, cuyo gen (AT) está localizado en el cromosoma 11 (11q 22-23), relacionado con la apoptosis. Estos pacientes cursan con un déficit de IgA e IgG<sub>2</sub>, trastornos neurológicos (ataxia), malformaciones vasculares (telangiectasia), aumento de la incidencia de tumores e inmunodeficiencias.

El síndrome de Omenn es una inmunodeficiencia combinada con hipereosinofilia, infiltración de células T de la piel, el hígado y el bazo, que da lugar a eritrodermia exfoliativa, linfadenopatía y hepatoesplenomegalia. Se encontró una dominancia TH2 en un paciente con este síndrome.

Otro síndrome muy raro que evoluciona junto con una inmunodeficiencia es el síndrome de hiper IgE. Las concentraciones de IgG, IgA o IgM están normales y cursa con una eosinofilia en sangre y esputo. Estos pacientes presentan abscesos por estafilococos en la piel, los pulmones y las articulaciones. Hay una dominancia de TH2, con elevados niveles de IL-4, estimuladora de IgE endógena.

## DEFICIENCIAS CONGÉNITAS DEL SISTEMA DE COMPLEMENTO

### DEFICIENCIA DE LOS COMPONENTES DEL COMPLEMENTO

Las deficiencias de los componentes del complemento evolucionan junto con enfermedades vasculares y del colágeno y con infecciones piógenas. Se ha observado que el 15 % de los pacientes con enfermedad sistémica por meningococo presentan un déficit genético de los componentes C5, C6, C7, C8 o C9. Esta susceptibilidad a infecciones por *Neisseria* no se conoce.

El déficit de C3 ha sido asociado con infecciones piógenas y como el factor quimiotáctico C5a no es generado, la opsonización bacteriana es ineficiente. El déficit de C2 también se relaciona con infecciones a neumococos.

El déficit de los componentes C1q, C1r, C1s, C4, C2 y C3 está relacionado con vasculitis y LES (lupus eritematoso sistémico).

En la deficiencia del factor D, las infecciones recurrentes son muy frecuentes y la vía alternativa del complemento está marcadamente deficiente o ausente.

## DEFICIENCIA DE PROTEÍNAS CONTROLADORAS DEL SISTEMA DE COMPLEMENTO

El déficit del factor I y del H se relaciona con severas infecciones piógenas con niveles de C3, factor B, actividad hemolítica total y actividad de la vía alternativa, muy bajos o no detectables. La deficiencia de properdina transcurre con infecciones sistémicas a meningococo y muerte por meningitis meningocócica.

Otra enfermedad de este grupo es el angioedema hereditario por déficit congénito del inhibidor del C1. Estos pacientes presentan edemas como resultado del efecto vasodilatador de la quinina. El edema laríngeo por lo general es fatal.

La hemoglobina paroxística nocturna es otra enfermedad por déficit en la expresión de DAF (*decay accelerating factor*), CD59 y C8bp en la membrana eritrocitaria. Estas proteínas controlan la formación de la enzima C3bBb y el complejo de ataque a la membrana.

## ALTERACIONES CONGÉNITAS DE FAGOCITOS

### ENFERMEDAD GRANULOMATOSA CRÓNICA

La enfermedad granulomatosa crónica (EGC) es una enfermedad rara que muestra un patrón de herencia ligado al cromosoma X en la mayoría de los casos y el resto muestra un patrón autosómico recesivo. Estas enfermedades desarrollan infecciones piógenas recurrentes o crónicas, con la formación de abscesos o granulomas en piel, pulmón, hígado y bazo. Con frecuencia se requiere drenaje de nódulos linfáticos en estos pacientes. Es interesante comentar que los enfermos con EGC no sufren infecciones por bacterias catalasa negativas, pues estos organismos liberan superóxido de nitrógeno en las vacuolas fagocíticas. La actividad microbicida se encuentra muy dañada.

El defecto está en la producción del anión superóxido, mediado por un complejo enzimático (NADPH oxidasa), que consiste, al menos, en 5 subunidades: el citocromo b558, formado por 2 subunidades (p22phox y p91phox), y las otras 3 subunidades son proteínas del

citosol (p47phox, p67phox) y una proteína de unión rac-1 (macrófago) o rac-2 (neutrófilo).

El gen que se localiza en la banda p21 del cromosoma X puede estar ausente, truncado o mutado, de tal forma que no se transcribe o el ARN es inestable. La mayoría de los casos de EGC autosómica recesiva se han atribuido a defectos en los genes codificadores de las proteínas citosólicas.

## DÉFICIT DE ADHESIÓN LEUCOCITARIA

El déficit de adhesión leucocitaria es un trastorno autosómico recesivo raro, caracterizado por infecciones bacterianas y fúngicas recurrentes en la piel, en la región subcutánea, y se asocia con un retraso en la caída del ombligo.

El tipo LAD-1 se caracteriza por el defecto en la expresión de tres  $\alpha\beta$  glicoproteínas heterodiméricas LFA-1 (CD11a), MAC-1 (CD11b) y p150,95 (CD11c). La subunidad  $\beta$  es común (CD18). Estos pacientes presentan déficit en la mayoría de las funciones de los leucocitos dependientes de la adhesión (quimiotaxis, adherencia al endotelio, agregación, citotoxicidad mediada por neutrófilos y fagocitosis).

El tipo LAD-2 es un trastorno por ausencia del Sialil-Lewis X, ligando de los leucocitos, para su unión

a la E-selectina y P-selectina en el endotelio activado. El defecto molecular se encuentra en el gen que codifica la enzima fucosiltransferasa.

## SÍNDROME DE CHEDIAK-HIGASHI

El síndrome de Chediak-Higashi es un trastorno autosómico recesivo que se caracteriza por infecciones recurrentes piógenas, albinismo oculocutáneo parcial e infiltración de varios órganos por linfocitos con gránulos citoplasmáticos gigantes.

Esta anomalía se debe a mutaciones en el gen CHS, situado en el cromosoma I que codifica una proteína que puede regular el tráfico intracelular de proteínas.

Se encuentra afectada la quimiotaxis, la fagocitosis y la actividad microbica (tablas 5.14 y 5.15).

## INMUNODEFICIENCIAS ADQUIRIDAS O SECUNDARIAS

### CAUSAS DE INMUNODEFICIENCIAS SECUNDARIAS

**Déficit nutricional.** La malnutrición proteico-calórica es muy común en los países en desarrollo. Gran parte de la morbilidad y la mortalidad que afecta a estas personas malnutridas se debe a las infecciones, debido

**Tabla 5.14** Alteraciones congénitas de la fagocitosis

Defecto molecular	Enfermedad
11q22.3	Ataxia telangiectasia
14q13.1	Deficiencia de PNP
20q13-ter	Deficiencia de ADA
Xp11.22-23	Síndrome de Wiskott-Aldrich
Xq13 IL-2 (cadena $\gamma$ )	Inmunodeficiencia combinada severa
Mutación del gen RFY y TAP-2	Deficiencia de Ag MHC de clases I y II

**Tabla 5.15** Localización del defecto en las alteraciones congénitas de la fagocitosis

Enfermedad	Defecto
Enfermedad granulomatosa crónica	Xp21 gp91
LAD1	21q22.3
LAD2	Mutaciones en el gen que codifica la enzima fucosiltransferasa
Síndrome de Chediak-Higashi	Cromosoma 1, mutaciones en el gen CHS



a alteraciones en los mecanismos de defensa frente a los microorganismos patógenos.

Se ha demostrado que las deficiencias de vitaminas y oligoelementos tienen un efecto negativo sobre el sistema inmunológico, ya que intervienen en la síntesis de ADN y de proteínas indispensables para la formación de los diferentes componentes del sistema inmune (tabla 5.16).

**Neoplasias.** Los pacientes con cáncer diseminado avanzado son susceptibles a las infecciones, debido a deficiencias en los mecanismos inmunológicos humorales y celulares frente a varios microorganismos. Estas deficiencias pueden estar relacionadas con la enfermedad primaria, por ejemplo, la neutropenia asociada con muchas neoplasias hematológicas, o las disgammaglobulinemias en pacientes con mieloma múltiple.

En los tumores de médula ósea, incluidas las leucemias que se originan en ella, se interfiere con la

proliferación y diferenciación de los linfocitos normales. Por otra parte, los tumores pueden producir sustancias que inhiben el desarrollo o la función linfocitaria, como es el caso del TGF- $\alpha$ . La enfermedad de Hodgkin es otro ejemplo de asociación entre tumor maligno e inmunodeficiencia. Los pacientes presentan una incapacidad para desarrollar reacciones de hipersensibilidad tras la inyección dérmica de varios antígenos comunes como *Candida* y toxoide tetánico. A esta ausencia de respuesta se le llama anergia.

Otros factores que influyen en el deterioro de la función del sistema inmune en pacientes con neoplasias son los largos estadios intrahospitalarios que facilitan las infecciones, el uso de antibióticos de amplio espectro, la utilización de múltiples productos hemoderivados, así como el uso de drogas citotóxicas que afectan la síntesis de moléculas que desempeñan una función central en la ontogenia celular T y B (tabla 5.17).

**Tabla 5.16** Deficiencias de vitaminas y oligoelementos y su repercusión en la inmunidad

Deficiencia	Alteración que produce
Vitamina B <sub>12</sub>	Anemia perniciosa Alteración de la respuesta linfocitaria a mitógenos Alteración celular y microbicida de polimorfonucleares
Ácido fólico	Alteración de la respuesta linfocitaria a mitógenos Disminución de la respuesta celular retardada
Vitamina B <sub>6</sub>	Disminución del número de linfocitos T y B Disminución de polimorfonucleares En la gestante, el feto presenta bazo y timo pequeños
Vitamina A	Alteración de la respuesta linfocitaria a mitógenos Disminución en la producción de IgA Atrofia de timo y bazo
Vitamina C	Defecto en los polimorfonucleares
Vitamina E	Disminución de la respuesta celular retardada Disminución en la producción de anticuerpos
Cinc	Involución del timo Disminución de anticuerpos timodependientes Disminución de la respuesta celular
Hierro	Alteración de la respuesta linfocitaria a mitógenos Disminución de la respuesta celular retardada Disminución en la producción de linfocinas Disminución de la actividad bactericida de los polimorfonucleares
Cobre y magnesio	Disminución en el número de células plasmáticas Disminución en la producción de anticuerpos Disminución en la actividad del complemento

**Tabla 5.17** Defectos inmunes que predisponen a la infección en pacientes con cáncer

Defecto	Patógenos comunes	Enfermedad neoplásica
Granulocitopenia	<i>Pseudomona aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>S. epidermidis</i>	Leucemias agudas Leucemia mieloide crónica Linfomas y tumores sólidos
Supresión de la respuesta inmune celular	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Mycobacterium sp.</i>	Linfomas Leucemia linfóide aguda
Supresión de la respuesta humoral	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Mieloma múltiple Leucemia linfóide crónica

**Pérdida excesiva de inmunoglobulinas y linfocitos.** La pérdida de proteínas a través del aparato urinario o del gastrointestinal es causa de hipogammaglobulinemia. La presencia de proteínas en la orina (proteinuria) es señal de daño glomerular, de defectos tubulares o de ambos. Cuando se debe a defectos en el glomérulo (síndrome nefrótico), la membrana glomerular deja escapar inmunoglobulinas pequeñas como la IgG y luego, las de mayor peso molecular como la IgM. De esta forma, la IgG muestra niveles séricos disminuidos, asociados con una corta supervivencia, mientras que los niveles séricos de la IgM son normales o incluso pueden estar aumentados. Cuando la pérdida de proteínas se produce a través del tracto gastrointestinal (gastroenteropatía perdedora de proteínas), da lugar a una hipogammaglobulinemia de gran magnitud. Este estado acompaña a más de cien desórdenes diferentes que afectan el tracto gastrointestinal. Cuando se asocia una linfangiectasia intestinal se acompaña de pérdida de linfocitos T, y se comporta como una inmunodeficiencia combinada.

**Infecciones crónicas.** Varios tipos de infección conducen a inmunosupresión. Las infecciones crónicas causadas por el virus de la hepatitis B producen, en lo fundamental, una alteración de la inmunidad humoral. Las infecciones crónicas por *Mycobacterium tuberculosis*, al igual que varios hongos, dan lugar con frecuencia a anergia frente a muchos antígenos e inmunodepresión, en esencia, celular. Las infecciones parasitarias crónicas pueden provocar inmunosupresión, por ejemplo, los pacientes con malaria crónica presentan una disminución de la función de sus linfocitos T, lo que influye en el desarrollo de neoplasias malignas asociadas con el virus de Epstein-Barr, como carcinomas nasofaríngeos y el síndrome de Duncan.

**Terapia inmunosupresora.** Otras de las causas de inmunodeficiencias secundarias la constituye la utilización de tratamientos inmunosupresores, entre ellos se incluyen los glucocorticoides y la mayoría de los productos que se utilizan como antineoplásicos. A los pacientes con cáncer se les administran diversos fármacos quimioterápicos que suelen ser citotóxicos para los linfocitos inmaduros y maduros, así como para los precursores de los granulocitos y monocitos. De este modo, la quimioterapia contra el cáncer se acompaña casi siempre de un período de inmunosupresión y riesgo de infecciones. El tratamiento radioterápico del cáncer provoca los mismos riesgos.

Las sales de oro, el levamisol, la azatioprina, la D penicilamina y la sulfasalazina pueden producir hipogammaglobulinemia, que en ocasiones afecta, de manera selectiva, la síntesis de IgA. Es importante tener en cuenta esto antes de realizar el diagnóstico de las inmunodeficiencias de anticuerpos y catalogarlas como primarias. La ciclosporina A inhibe la respuesta celular; por esta acción se utiliza para prevenir el rechazo de órganos que han sido trasplantados.

**Esplenectomía.** La ausencia del bazo, órgano linfóide secundario, ya sea por su extirpación quirúrgica después de un traumatismo o para el tratamiento de ciertas enfermedades hematológicas, o debido a infartos esplénicos en la anemia de células falciformes, es otra de las causas de inmunodeficiencias secundarias. Los pacientes esplenectomizados son más susceptibles a las infecciones por algunos microorganismos, sobre todo por bacterias encapsuladas como *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*. El bazo parece ser necesario para la inducción de respuestas humorales protectoras frente a los antígenos polisacáridos capsulares. En la actualidad suele dejarse un pequeño resto de tejido esplénico capaz de

compensar, en ocasiones, de forma muy completa, la totalidad del órgano.

**Transplante de médula ósea.** El transplante de médula ósea afecta profundamente los mecanismos de defensa del huésped. Durante los primeros 21 días posteriores al trasplante se produce una profunda mielosupresión, con daño de las barreras naturales: piel y mucosas; luego se produce una disfunción inmune celular y la aparición de una neumonía intersticial, complicación casi constante en los receptores. Los pacientes se infectan, sobre todo, con CMV y *Pneumocystis carinii*; y por esta causa muchos mueren. Durante los 2 o 3 meses posteriores al trasplante, aparecen infecciones por herpes simples y varicela zoster. Alrededor de los 6 meses se produce un deterioro de la inmunidad humoral, aumenta la susceptibilidad a las infecciones por *Streptococcus pneumoniae* y *Neisseria meningitidis*. Hace poco se conoció que otros agentes como rotavirus, adenovirus y virus *Coxsackie* son la causa de las gastroenteritis en los receptores de médula ósea.

**Transfusiones múltiples.** Aquellos pacientes que reciben múltiples transfusiones sufren un estado de inmunosupresión debido al agotamiento de los clones celulares continuamente estimulados o por la transmisión de infecciones, en lo fundamental, del CMV.

**Alcoholismo materno.** Se han reportado hijos de madres alcohólicas con un estado de inmunodeficiencia similar al síndrome de Di George.

**Enfermedades autoinmunes.** Con alta frecuencia se observa la aparición de inmunodeficiencias secundarias a enfermedades autoinmunes o del tejido conectivo, por el desarrollo de autoanticuerpos y/o células T autorreactivas que destruyen linfocitos T, B y células fagocíticas, debido a trastornos en la inmunorregulación. En niños que presentan infecciones recurrentes es frecuente encontrar anticuerpos dirigidos contra el citoplasma de los neutrófilos (ANCA), que dan lugar a neutropenias autoinmunes que favorecen, a su vez, la infección.

**Edad avanzada y prematuridad.** Con el envejecimiento se produce un agotamiento, tanto cuantitativo como cualitativo, de los diferentes componentes inmunológicos, por lo que son más frecuentes las infecciones, las manifestaciones autoinmunes y el desarrollo de ciertos tumores. Se ha descrito la disminución del mecanismo de muerte celular programada. En cambio, en los niños prematuros se encuentra un sistema inmunológico inmaduro, incapaz de combatir todas las agresiones externas, y son también frecuentes las infecciones. Se han reportado deficiencias transitorias tanto celulares como humorales en los prematuros.

**Infecciones del sistema inmune.** La infección directa de uno o más componentes del sistema inmunológico produce, por supuesto, un mayor estado de inmunodepresión. El virus del sarampión y el virus linfotrope de células T humano-1 (HTLV-1), son ejemplos de la infección directa. Ambos virus pueden infectar a los linfocitos T. El HTLV-1 es un retrovirus con tropismo por los linfocitos T CD4 positivos; sin embargo, en lugar de matar a los linfocitos T, los transforma y produce una neoplasia agresiva de células T, llamada leucemia/linfoma de células T del adulto.

Otros virus, como el CMV y el virus del herpes humano tipo 6 (HHV-6), tienen tropismo positivo por las células T. El CMV puede causar infección recurrente, persistente o latente, y afecta la inmunidad celular, en lo fundamental, la mediada por linfocitos T CD4 positivos. Por su parte, el HHV-6 se replica en las células T y causa una gran inmunodepresión celular. Hoy se conoce que es la causa del exantema súbito o roséola infantil.

## SÍNDROME DE INMUNODEFICIENCIA ADQUIRIDA. INMUNOLOGÍA DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA

### Características clínicas de la infección por el virus de inmunodeficiencia humana

Debido a la complejidad biológica del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), las manifestaciones clínicas son muy diversas. La fase inicial puede ser asintomática, pero en la mayoría de los casos desde la segunda a la sexta semana de exposición al virus, los pacientes desarrollan fiebre, linfadenopatías generalizadas, cefalea, faringitis y eritemas. La fase latente se caracteriza por una progresión de la enfermedad en los tejidos linfoides y cada vez más, las células TCD<sub>4</sub><sup>+</sup>, los macrófagos y las células dendríticas son infectados. Este período puede durar alrededor de 10 años.

En estas fases, el sistema inmunitario sigue siendo competente y la respuesta específica para productos génicos del virus está presente. La producción de anticuerpos anti-gp-120 y anti-gp-41 es observada en la mayoría de los sujetos infectados, lo que constituye marcadores de infección por VIH. Los anticuerpos anti-p24, transcriptasa inversa, gag y pol, probablemente tengan un efecto mínimo en el cuadro clínico de la infección. Es necesario anotar que los Ac de la envoltura son malos inhibidores de los efectos citopáticos

e inefectivos del virus, pues apoya la hipótesis de que estos epítopes tan inmunogénicos son los menos importantes en las funciones.

En general, la respuesta mediada por las células T, está presente de forma temprana. Se detectan  $\text{TCD}_4^+$  para los péptidos virales, así como CTL restringidos por MHC para las proteínas env, gag y pol. En estos pacientes se observa la actividad de las células asesinas naturales (NK) contra las células diana infectadas por VIH.

En realidad, estas respuestas se debilitan en la medida que progresa la enfermedad y las células  $\text{TCD}_4^+$  son inactivadas o destruidas.

Desde el punto de vista clínico, el paciente con SIDA presenta muchas combinaciones de infecciones oportunistas, neoplasias, caquexia y degeneración del sistema nervioso central (SNC).

La neumonía por *Pneumocystis carinii* es la infección más frecuente y la causa más común de muerte. Otros microorganismos son detectados con frecuencia como *Candida*, criptococos, histoplasma y micobacterias.

El sarcoma de Kaposi se desarrolla en el 30 % de los pacientes con SIDA. A diferencia de su forma esporádica, en la infección por VIH este sarcoma es muy agresivo y diseminado.

La encefalopatía por SIDA, con alguna forma de demencia, ocurre en el 66 % de los pacientes.

#### **Efectos citopáticos y alteraciones funcionales del sistema inmunitario inducidos por el virus de inmunodeficiencia humana**

Las manifestaciones clínicas de inmunodeficiencias, infecciones y tumores, observadas en estos pacientes, son consecuencia de dos aspectos fundamentales:

1. Depleción de los linfocitos T y alteraciones funcionales del sistema inmune, independientes del número de linfocitos T.
2. Los efectos citopáticos pueden ser directos sobre los linfocitos  $\text{CD}_4^+$  debido a:
  - a) La gemación y/o la inserción de la gp-41 a la membrana plasmática, con aumento de su permeabilidad.
  - b) Interacciones de la gp-120 con células T infectadas y las no infectadas, lo que produce células gigantes multinucleadas o sincitios letales para ambos tipos de células (infectadas y no infectadas).
  - c) Estas glicoproteínas, unidas a los  $\text{CD}_4$  intracelulares recién sintetizados, pueden tener efectos tóxicos.

Los efectos citopáticos indirectos son causados por mecanismos de lisis de las células infectadas por VIH (CTL o ADCC), efectos de apoptosis debidos a gp virales (gp-120) y superantígenos codificados por el propio VIH. Otro mecanismo que se invoca es la inhibición de la maduración en el timo de las células  $\text{CD}_4^+$ .

Entre las alteraciones funcionales del sistema inmune se encuentran algunos mecanismos que podrían explicar este fenómeno, pero todavía los datos son controvertidos. Hay indicios de que la gp-120 bloquea la interacción del  $\text{CD}_4^+$  con MHC clase II en los APC e interfiere la respuesta normal de las células T. La susceptibilidad de estos pacientes a infecciones por microorganismos intracelulares, se explica por la desviación que se produce al patrón TH2 (IL-4 e IL-10), inhibidores de la muerte de estos microorganismos, mediada por macrófagos.

Otros dos tipos celulares involucrados en la progresión de la inmunosupresión, son los fagocitos mononucleares y las células dendríticas foliculares (FDC). Los macrófagos son infectados por fagocitosis de otras células infectadas, por lo que constituyen un reservorio que debilita las funciones de presentación y la secreción de citocinas.

## **DIAGNÓSTICO Y EVALUACIÓN DE LAS INMUNODEFICIENCIAS**

Por lo general, es el médico clínico quien primero sospecha que existe inmunodeficiencia. Ante este caso deben tenerse en cuenta aspectos clínicos y de laboratorio que serán analizados con detalle.

### **ANTECEDENTES PATOLÓGICOS PERSONALES**

**Presencia de infecciones.** Las infecciones constituyen la causa más común de asistencia a consulta médica. En la historia clínica del paciente se deben recoger todos los detalles de las características de estas infecciones: el momento de aparición, la severidad, la recurrencia, la evolución hacia la cronicidad, la presencia de complicaciones, si se involucran varios sitios de infección, así como si existe una débil respuesta a los tratamientos habituales. Es importante, además, conocer qué tipo de microorganismos son los que con mayor frecuencia infectan al paciente, ya que esto puede orientar hacia el tipo de componente inmunológico que está deficiente. Por ejemplo, los pacientes con deficiencias en la producción y/o función de sus anticuerpos, con deficiencias del componente C3 del complemento

y del factor regulador I, son agredidos, sobre todo, por microorganismos de vida extracelular, entre ellos, las bacterias piógenas, lo que demuestra la importante función que desempeñan los anticuerpos y el complemento en la adherencia, opsonización y lisis bacteriana.

Los pacientes con alteraciones en la función de los linfocitos T, en lo fundamental los citotóxicos, se infectan sobre todo con microorganismos de vida intracelular como virus, hongos, protozoos y micobacterias. Las bacterias inusuales invaden a aquellos individuos con deficiencia en el número y la función de sus neutrófilos. Se han reportado infecciones diseminadas por *Neisseria* en aquellos pacientes con deficiencias del complejo de ataque a la membrana y/o deficiencias de properdina.

**Retardo en la caída del cordón umbilical.** Se observa con mucha frecuencia una demora en la cicatrización y posterior caída del cordón umbilical en niños con inmunodeficiencias, sobre todo, celulares.

**Tetania.** Es importante buscar signos de hipocalcemia, sobre todo en niños varones, con cardiopatías congénitas y con rasgos faciales sospechosos de síndrome de Di George.

**Respuesta a inmunizaciones.** Es muy importante recoger en la historia clínica del paciente cómo se ha comportado la respuesta frente a los diferentes esquemas de vacunación, sobre todo frente a vacunas compuestas por gérmenes vivos. En este caso pueden desencadenarse infecciones severas y complicaciones no esperadas, como es el desarrollo de una infección grave tras la inyección de BCG en un niño con aplasia tímica.

**Fenómenos atópicos.** Se observan con mucha frecuencia, manifestaciones alérgicas asociadas con las infecciones: respiratorias, digestivas y cutáneas, sobre todo en pacientes con deficiencias humorales y fundamentalmente con déficit de IgA. Estos pacientes absorben con más rapidez las proteínas alergénicas, lo que facilita la formación de la IgE, y muestran una mayor resistencia a los tratamientos habituales. En el síndrome de hiper IgE se observa, además de las manifestaciones alérgicas, principalmente cutáneas, una intensa eosinofilia.

**Fenómenos autoinmunes.** Es frecuente encontrar niveles elevados de autoanticuerpos en pacientes con inmunodeficiencias, que dan lugar a la aparición de enfermedades autoinmunes, sobre todo en las deficiencias de IgA, el síndrome de hiper IgM y las deficiencias del complemento, debido a trastornos en la inmunorregulación presente en estos pacientes.

**Enfermedades neoplásicas.** Existe una relación bidireccional entre inmunodeficiencias y enfermedades

neoplásicas. Los pacientes con inmunodeficiencias primarias como la ataxia telangiectasia, el síndrome de Wiskott-Aldrich y la inmunodeficiencia variable común desarrollan con mucha frecuencia tumores, sobre todo linforreticulares. Esto puede estar ocasionado por defectos en los mecanismos de inmunovigilancia o por un aumento en la susceptibilidad con microorganismos que predisponen la aparición de tumores. De igual forma, las enfermedades neoplásicas son causas de inmunodeficiencias.

**Cuadros de edemas.** Es importante recoger en la historia clínica, la aparición de cuadros clínicos de edemas resistentes a los antihistamínicos y esteroides, si se sospecha que existe deficiencia del C1 inhibidor.

**Sangrados.** La presencia de manifestaciones hemorragíparas: equimosis, hematomas y sangrados son importantes en el síndrome de Wiskott-Aldrich, ya que muchas veces constituye la primera manifestación clínica, seguida de eccemas e infecciones.

## HISTORIA FAMILIAR

Si existen miembros de la familia con inmunodeficiencias primarias; o que han muerto tempranamente, en la infancia; con enfermedades autoinmunes o del tejido conectivo y con una posible consanguinidad, son datos de gran interés que deben ser recogidos siempre que se sospeche una inmunodeficiencia primaria.

## EXAMEN FÍSICO

La exploración física del paciente en el que se sospeche una inmunodeficiencia, es fundamental en el diagnóstico de estas afecciones. Deben buscarse los siguientes signos clínicos:

1. Retardo del crecimiento pondostatural.
2. Ausencia de tonsilas y ganglios linfáticos: si se sospecha agammaglobulinemia de Bruton.
3. Hepatoesplenomegalia.
4. Telangiectasias, con ataxia o sin ella: si se sospecha ataxia telangiectasia.
5. Dermatitis crónica: en el síndrome de hiper IgE.
6. Eccemas: si se sospecha síndrome de Wiskott-Aldrich.
7. Coloración anormal de la piel y los pelos: en el síndrome de Chediack-Higashi.
8. Periodontitis crónica: aparece en las alteraciones de la quimiotaxis de los neutrófilos.
9. Gingivoestomatitis y erosión dental: en la deficiencia de la adhesión leucocitaria (LAD).

10. Abscesos múltiples: en las alteraciones funcionales de los neutrófilos y el síndrome de hiper IgE.
11. Adenopatías múltiples.

## DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Una vez recogidos en la historia clínica los antecedentes patológicos personales y familiares y luego de haber realizado un examen físico exhaustivo al paciente, puede llegarse a un presunto diagnóstico clínico y pasar a la exploración de laboratorio. La utilización de las técnicas de laboratorio para evaluar los diferentes componentes del sistema inmunológico debe ser racional y basada en un pensamiento clínico lógico y orientador:

1. Hemograma completo: es un medio rápido y asequible que puede brindar mucha información, por ejemplo, anemia y alteraciones morfológicas de los hematíes, que puede acompañar a los defectos celulares, neutropenias, linfopenias y trombocitopenias.
2. Eritrosedimentación: es otro proceder rápido que orienta hacia la presencia de infección o proceso inflamatorio.
3. Evaluación de la respuesta humoral:
  - a) Electroforesis de proteínas: presencia de hipogammaglobulinemia o de hipergammaglobulinemia.
  - b) Cuantificación de inmunoglobulinas séricas.
  - c) Dosificación de subclases de IgG.
  - d) Titulación de anticuerpos naturales, como las isohemaglutininas contra grupos sanguíneos.
  - e) Titulación de anticuerpos tras la vacunación (antitetánico, antineumococo).
  - f) Recuento porcentual y absoluto de linfocitos B: CD19, CD20, Ig de superficie.
4. Evaluación de la respuesta celular.
  - a) Respuesta proliferativa de linfocitos B a mitógenos y producción de Ig *in vitro*.
  - b) Recuento porcentual y absoluto de linfocitos T: CD2, CD3, CD4, CD7, CD8.
  - c) Respuesta proliferativa *in vitro* de linfocitos T a mitógenos.
  - d) Pruebas cutáneas de hipersensibilidad retardada: estreptocinasa-estreptodornasa, PPD, candidina.
  - e) Cultivo mixto de linfocitos.

5. Pruebas funcionales de células NK.
6. Evaluación del sistema mononuclear fagocítico:
  - a) Recuento absoluto de neutrófilos.
  - b) Adherencia, quimiotaxis, fagocitosis.
  - c) Presencia de moléculas de adhesión CD11/CD18.
  - d) Producción de monocinas: IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$ .
  - e) Expresión de receptores Fc para IgG, para complemento, para lipoproteínas, para proteínas unidoras de manosa importantes para el tráfico celular.
7. Evaluación del complemento (CH<sub>50</sub>, AP50).

La aplicación de diversas técnicas de biología molecular en el estudio de las inmunodeficiencias, ha permitido la descripción de tres patrones de herencia en ellas: ligadas al cromosoma X, recesivas autosómicas y sin patrón definido; de igual forma, ha hecho posible la detección de portadoras, a través de la inactividad del cromosoma X en las células afectadas (que no es al azar) y con un crecimiento disminuido de las células B con alelo anormal: en el diagnóstico del síndrome de Wiskott-Aldrich, en la agammaglobulinemia de Bruton, en la enfermedad granulomatosa crónica y en la inmunodeficiencia severa combinada. Por otra parte, el análisis de las vellosidades coriónicas, el cultivo de las células amnióticas y el estudio de la sangre fetal para la cuantificación de los linfocitos T y B, son procedimientos utilizados en el diagnóstico prenatal de muchas de las inmunodeficiencias primarias.

## BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- Conley ME. Primary immunodeficiencies: A flurry of new genes. *Immunol Today* 1995; 16: 313-5.
- Greene W. C. Regulation of HIV-1 gene expression. *Ann Rev Immunol* 1990; 8: 453-76.
- Pantaleo G, Fanci AS. New concepts in the immunopathogenesis of HIV infection. *Ann Rev Immunol* 1995;13: 487-512.
- Sideras P, Eduard Smith CI. Molecular and celular aspects of X-linked agammaglobulinemia. *Adv Immunol* 1995;59:135-223.
- Steimle V, Reith W, Mach B. Major histocompatibility complex class II deficiency: a disease of gen regulation. *Adv Immunol* 1996; 61: 327-40.
- Sugamura KH, Asao M, Kondo N, Tanaka, N Ishii K, Ohbo M, Nakamura Takeshita T. Interleukin-2 receptor gamma chain its role in multiple cytokine receptor complex and T cell development in XSCID. *Ann Rev of Immunol* 1996; 14:179-206.

## **CONTENIDO**

---

### **Introducción/ 497**

### **Tipos de trasplante/ 497**

#### **Trasplante renal/ 498**

- Rechazo del trasplante/ 498
- Rechazo hiperagudo del trasplante/ 498
- Rechazo agudo del trasplante/ 498
- Rechazo crónico del trasplante/ 500
- Formas de evitar y tratar el rechazo del trasplante/ 500

#### **Trasplante de corazón, de corazón-pulmón y de pulmón/ 501**

- Estudios de compatibilidad/ 501
- Inmunosupresión/ 501

#### **Trasplante hepático/ 501**

- Estudios de compatibilidad/ 501
- Inmunosupresión/ 501

#### **Trasplante de páncreas y de páncreas-riñón/ 501**

- Estudios de compatibilidad/ 501
- Inmunosupresión/ 501

#### **Trasplante de córnea/ 502**

- Estudios de compatibilidad/ 502
- Inmunosupresión/ 502

#### **Trasplante óseo/ 502**

- Estudios de compatibilidad/ 502
- Inmunosupresión/ 502

#### **Trasplante de médula ósea/ 502**

- Estudios de compatibilidad/ 503
- Inmunosupresión/ 503

#### **Futuro de la trasplantología/ 503**

- Hacia una inmunosupresión específica/ 503
- En busca de otras fuentes de órganos/ 504

### **Bibliografía recomendada/ 505**

### Capítulo 42



## TRASPLANTE CLÍNICO

*Dr. Jesús Gómez Arbesú*

### RESUMEN

El trasplante clínico constituye la única alternativa terapéutica eficaz y definitiva en muchas enfermedades, cuando el paciente tiene insuficiencia funcional de un órgano o tejido. El rechazo, de naturaleza inmunológica, constituye el obstáculo principal que atenta contra el éxito del trasplante. Las diferencias en los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad entre el donante y el receptor, son sus causantes. Mucho se ha avanzado en el estudio de la inmunopatogenia del rechazo y las formas de prevenirlo o tratarlo, pero aún cuando se han logrado tasas muy elevadas de supervivencia del órgano y del paciente trasplantado, en gran medida gracias a las nuevas terapias inmunosupresoras, existen obstáculos importantes en el tema del trasplante. Excepto los autotrasplantes y los trasplantes entre gemelos idénticos, la mayoría de los trasplantes se realizan sin la compatibilidad precisa, por lo que se hace perentorio el tratamiento inmunosupresor, con sus subsecuentes efectos deletéreos. Lograr una inmunosupresión específica que respete globalmente el sistema inmune y obtener nuevas fuentes de órganos que satisfagan las necesidades y tengan el más alto grado de compatibilidad, son las metas fundamentales en las que trabajan muchos investigadores en este campo.

### INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, el trasplante de órganos y tejidos ha evolucionado de un intento terapéutico a una solución clínica que cada vez alcanza mayor éxito. El más frecuente de los trasplantes de órganos es el renal, aunque otros como el de corazón e hígado se realizan anualmente por miles a escala mundial. Entre los trasplantes de tejidos más frecuentes se encuentran los de piel, hueso, córnea y médula ósea. Las transfusiones de sangre o sus componentes constituyen el “trasplante” más antiguo.

### TIPOS DE TRASPLANTE

Los trasplantes, según sus características, pueden ser: trasplantes de órganos y trasplantes de tejidos; ortotópico, cuando el cirujano implanta el órgano en el lugar que naturalmente ocupa; o heterotópico, cuando el órgano se ubica en otro sitio. Las clasificaciones más

significativas por sus implicaciones en el campo de la inmunología son:

1. Según la relación existente entre el donante y el receptor:
  - a) Autotrasplante: el donante es el mismo receptor, por ejemplo, algunos casos de trasplante de médula ósea, piel y autotransfusiones.
  - b) Singénico: el donante es genéticamente idéntico al receptor, por ejemplo, entre hermanos gemelos idénticos o entre ratones de la misma cepa endogámica.
  - c) Alogénico: el donante es un miembro de la misma especie. Puede tratarse de:
    - Emparentados (intrafamiliar), por ejemplo, entre hermanos, entre padres e hijos.
    - No emparentados.
  - d) Xenogénico: entre miembros de distintas especies, por ejemplo, piel de cerdo, válvulas cardíacas o algunos intentos de trasplante de corazón de monos al humano.



2. Según se realice el trasplante por vez primera, o por segunda o más, se puede distinguir el trasplante en primario o en retrasplante.
3. Según la condición del donante, se puede hablar de dos tipos: donante vivo o donante cadáver (por muerte cerebral o coma sobrepasado). En algunos trasplantes como el de médula ósea, siempre se utiliza un donante vivo; en otros, como el de corazón o el de corazón-pulmón, siempre es un donante cadáver; y en otros como el renal o el de hígado, existen las dos alternativas.

## TRASPLANTE RENAL

El trasplante renal, en el que se ha acumulado mayor experiencia, es el paradigma para el estudio del trasplante de órganos alogénico.

## RECHAZO DEL TRASPLANTE

Sin tomar en consideración otras posibles complicaciones, desde el punto de vista inmunológico, el éxito del trasplante dependerá de la aceptación o del rechazo del órgano trasplantado y del desarrollo de una respuesta inmune frente a las diferencias antigénicas existentes en el donante en relación con el receptor. Estas siempre existen en mayor o menor cuantía en los trasplantes alogénicos y xenogénicos (no así en el trasplante autólogo o singénico).

Aunque los síntomas y signos varían según el órgano trasplantado, siempre se aprecia inflamación e hipersensibilidad del aloinjerto, y disminución de su función. Existen 3 tipos de rechazo: el hiperagudo, que ocurre en las primeras 24 horas después del trasplante; el agudo y el crónico, que pueden presentarse unos meses o años después del trasplante.

## RECHAZO HIPERAGUDO DEL TRASPLANTE

El rechazo hiperagudo del trasplante ocurre cuando están presentes, en cantidades suficientes, isohemaglutininas anti-ABO (por una incompatibilidad ABO entre el donante y el receptor) o anticuerpos anti-HLA clase I preformados (producto de sensibilizaciones anteriores: embarazos, transfusiones o trasplantes previos). Estos anticuerpos se unen al endotelio vascular y se desencadenan eventos inmunológicos: la activación del complemento seguida de la activación de la coagulación. Si esta es intensa puede resultar en microtrombos, y provocar isquemia y necrosis del injerto.

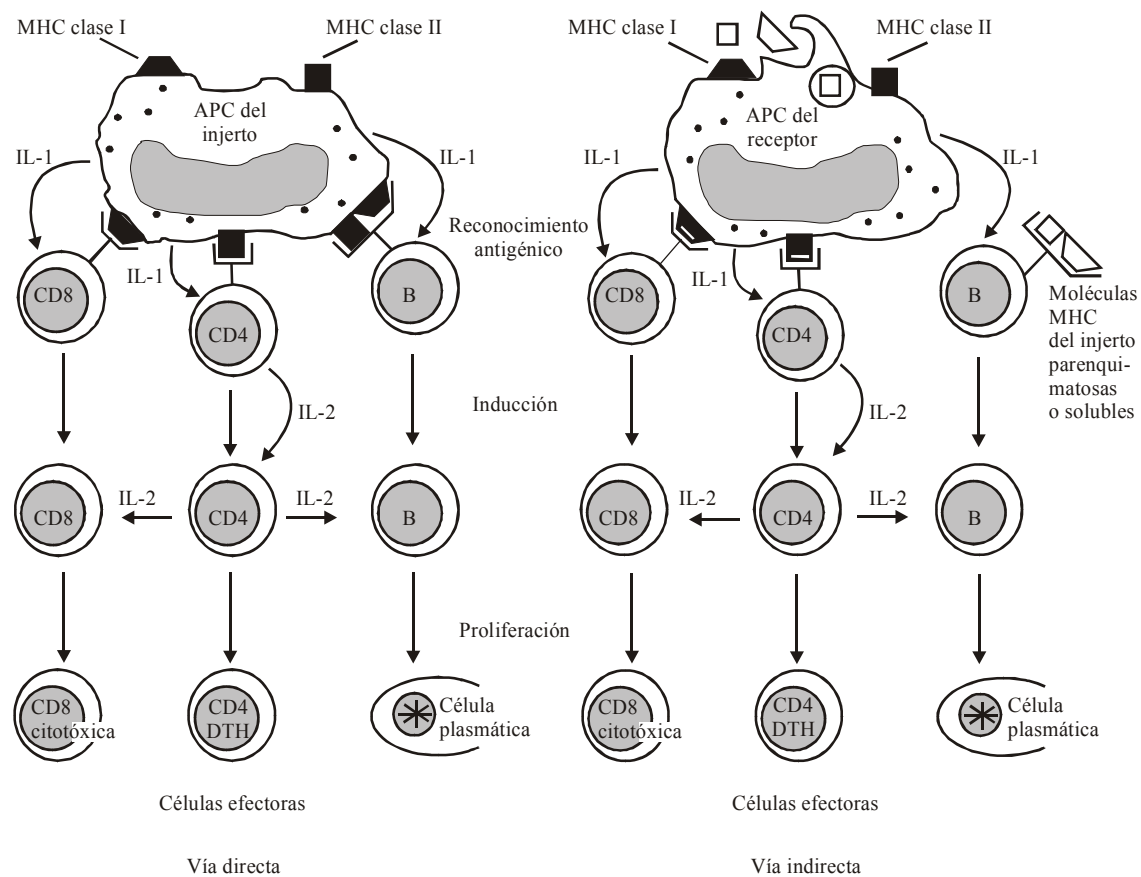
## RECHAZO AGUDO DEL TRASPLANTE

En el rechazo agudo del trasplante, las moléculas del sistema mayor de histocompatibilidad del donante proporcionan el estímulo primario, por lo que se sabe, mediante dos vías de presentación de antígenos. La *vía directa* de presentación sugiere que las células presentadoras de antígeno del donante en los injertos (*células pasajeras*) proporcionan el estímulo primario. Estas son células dendríticas intersticiales y monocitos que expresan moléculas HLA alogénicas clase I y II. La *vía indirecta* de presentación sugiere que las células presentadoras de antígeno del huésped pueden tener antígenos alogénicos esparcidos de clase I y II, originarios de las células parenquimatosas del donante. En ambos casos, las células presentadoras de antígeno proporcionan segundas señales, además de IL-1 e IL-6, que ayudan a la activación de linfocitos. La IL-1 participa en la activación de los linfocitos CD4 cooperadores, CD8 citotóxicos y B (figura 5.21).

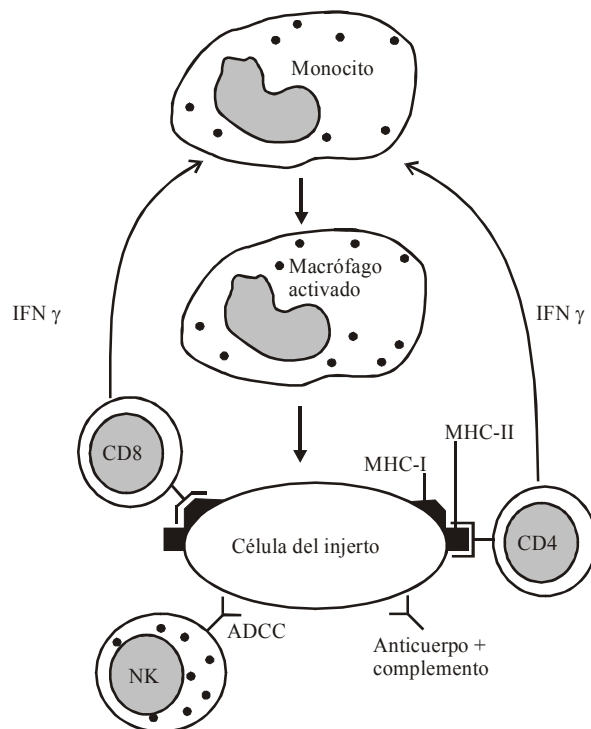
Una vez activadas las células CD4 (claves en la respuesta inmune), liberan IL-2, esencial para la activación de las CD8 y las células B. Como consecuencia de la exposición al Ag, a segundas señales y a citocinas, hay proliferación de clones y maduración de células reactivas al aloinjerto. Esto provoca el desarrollo de células T efectoras que emigran desde el tejido linfoide a través de la sangre hacia el injerto, donde determinan el daño. Los linfocitos B pueden operar a distancia, el anticuerpo se libera a la sangre, o se produce en el sitio donde se une a su antígeno.

El mecanismo preciso por el cual las células T destruyen el injerto aún está en estudio. Las células T efectoras CD4 y CD8, quizás destruyan el injerto por mecanismos clásicos citotóxicos; sin embargo, otra consecuencia significativa de la activación de las células T es su liberación de citocinas, en especial IFN- $\gamma$ , que puede producir dos efectos importantes: primero, aumento en la expresión de moléculas MHC-I y MHC-II en el aloinjerto, lo que potencialmente hace al injerto más vulnerable a los mecanismos efectoras; segundo, activa los monocitos para mediar una respuesta destructora de hipersensibilidad retardada contra el injerto (figura 5.22).

En adición al IFN- $\gamma$  y la IL-2, los linfocitos liberan otras citocinas, entre ellas: la IL-4 y la IL-5, que estimulan la producción de anticuerpos por las células B. El daño mediado por anticuerpos puede ser a través de la activación del complemento o al reclutar células efectoras de la ADCC.



**Figura 5.21** Respuesta inmune en el rechazo agudo del alotrasplante.



**Figura 5.22** Efectores en el rechazo agudo del alotrasplante.

Aunque no siempre están bien diferenciadas, hay investigadores que reconocen mediante estudios por biopsia, dos variantes de rechazo agudo: el rechazo agudo humoral y el rechazo agudo celular. Estos se producen por el predominio de respuestas Th2 o Th1 del linfocito T-CD4. No se conocen con exactitud los factores que conducen a una orientación hacia Th1 o Th2 en la célula CD4-Th0, pero la concentración relativa de citocinas Th1/Th2 y qué células presentadoras de antígeno participan, parecen ser los elementos cruciales.

## RECHAZO CRÓNICO DEL TRASPLANTE

El rechazo crónico del trasplante se caracteriza por el estrechamiento de la luz arterial vascular, debido a un crecimiento de las células endoteliales que recubren el lecho vascular. Se desconocen los mecanismos para esta respuesta, pero se producen señales inmunitarias de la lesión, liberación de IL-1 por los monocitos, y liberación del factor de crecimiento derivado por las plaquetas y las células endoteliales. Una vez que la lesión proliferante progresa a cambios fibróticos dentro de la pared del vaso sanguíneo, ya no responde a los tratamientos inmunosupresivos.

## FORMAS DE EVITAR Y TRATAR EL RECHAZO DEL TRASPLANTE

Existen dos formas de evitar el rechazo del trasplante: buscar la mayor compatibilidad posible entre el donante y el receptor, y el uso de tratamientos inmunosupresores. La importancia de ello varía y también depende de qué órgano o tejido se trate.

En el trasplante renal, por ejemplo, la conducta práctica es la siguiente:

### 1. Rechazo hiperagudo:

- a) Estudios de compatibilidad: para evitar el rechazo hiperagudo se requiere compatibilidad en el grupo sanguíneo ABO y realizar el trasplante solo cuando la prueba cruzada o *cross match* resulte negativa, lo cual significa que no existen ni isohemaglutininas ABO ni anticuerpos preformados anti-HLA.

- b) Inmunosupresión: no existe tratamiento inmunosupresor alguno contra este tipo de rechazo.

### 2. Rechazo agudo:

- a) Estudios de compatibilidad: puesto que la sensibilización que conduce al rechazo agudo es frente a los antígenos HLA del donante, la búsqueda

de la mayor compatibilidad HLA posible entre donante y receptor conduce a evitar el rechazo agudo y a una mayor duración del injerto. Cuando se trata de un donante vivo emparentado, el trasplante ideal es el de un donante HLA-idéntico, aunque en su ausencia, también se realiza de un donante HLA-haploidéntico. En el caso de un donante cadáver, se busca entre la lista de receptores en espera de trasplante renal aquel con mayor número de compatibilidades, y se les da mayor peso a las compatibilidades clase II (DR) que a las clase I (B y A).

### b) Inmunosupresión: tratamientos inmunosupresores de base para evitar la aparición del rechazo:

- Glucocorticoides (prednisona): actúan en varias vías: reducen la capacidad de las células presentadoras de antígeno de expresar HLA-I y HLA-II, y liberar IL-1, inhiben la aloactivación de las células T y, por consecuencia, la liberación de IL-2, tienen un efecto sobre la migración y función de las células efectoras, así como su capacidad para segregar IFN $\gamma$ .
- Otros inmunosupresores como la azatioprina y la ciclosporina: la azatioprina interfiere en la nueva formación del ADN en las células en proliferación. La ciclosporina es uno de los inmunosupresores más apreciados por alterar, de manera selectiva, las actividades inmunorreguladoras de las células T cooperadoras e inhibir su producción de citocinas y reducir de forma directa o indirecta la expresión de receptores de IL-2 en los linfocitos en proceso de activación, sin afectar las otras células T, los B, granulocitos y macrófagos. Además, deteriora las funciones celulares, sin destruir los linfocitos diana. Muchas veces se establece un régimen inmunosupresor de 3 drogas: prednisona, azatioprina y ciclosporina.

### c) Tratamientos inmunosupresores del rechazo, una vez establecido:

- Corticosteroides en dosis altas: globulina antitímocítica o globulina antilinfocítica (ATG o ALG). Provoca la lisis de los linfocitos.
- Anticuerpos monoclonales anti CD3. Inicialmente depletan de forma aguda los linfocitos T de la circulación al opsonizarlos y provocan su eliminación por el sistema reticuloendotelial. Después de 48 horas de iniciado el tratamiento, los linfocitos T regresan lentamente a la circulación, pero la molécula CD3 es modulada (internalizada o eliminada de la superficie

celular). Si no hay un número suficiente de moléculas CD3 en membrana, se dificulta la activación de la célula T.

### 3. Rechazo crónico:

- a) Estudios de compatibilidad: la búsqueda de la mayor compatibilidad HLA posible entre donante y receptor no solo evita el rechazo agudo sino también el crónico; mientras mayores sean las compatibilidades, mayor será la duración del injerto. Se ha demostrado que hay correlación entre el avance del rechazo crónico y el número de episodios de rechazo agudo sufridos por los pacientes. La liberación de citocinas en el rechazo agudo puede ser la explicación de esta correlación.
- b) Inmunosupresión: no existe tratamiento inmunosupresor alguno contra este tipo de rechazo.

## TRASPLANTE DE CORAZÓN, DE CORAZÓN-PULMÓN Y DE PULMÓN

### ESTUDIOS DE COMPATIBILIDAD

Como en cualquier trasplante de órgano sólido, para el trasplante de corazón se requiere de un donante compatible para el grupo ABO y con una prueba cruzada (*cross match*) negativa, dado que existe el riesgo de rechazo hiperagudo. Sin embargo, en el mundo, los pacientes se someten a un estudio de sensibilización pretrasplante que enfrenta el suero del receptor a un panel celular. Si el estudio arroja menos del 15 % de reacciones positivas entre los integrantes del panel puede obviarse el *cross match* y ahorrar tiempo (se dispone de poco tiempo una vez extraído el corazón del donante).

Por lo general no se toma en cuenta el tipaje HLA como criterio de selección, aunque muchas veces se realiza para estudios retrospectivos que han demostrado el efecto positivo de la compatibilidad HLA sobre la supervivencia. Un factor que debe tenerse en consideración es evitar las grandes listas de espera para poder compatibilizar al donante y al receptor, como ocurre en el trasplante renal, aunque se están incrementando en la medida en que aumenta la cantidad de trasplantes y la supervivencia que se logra.

### INMUNOSUPRESIÓN

Los esquemas de inmunosupresión utilizados para el trasplante de corazón, de corazón-pulmón y el pulmón son similares al de trasplante renal.

## TRASPLANTE HEPÁTICO

### ESTUDIOS DE COMPATIBILIDAD

Para el trasplante hepático se requiere la compatibilidad ABO, mientras que la prueba cruzada (*cross match*) es de importancia relativa. Han aparecido solo unos reportes de rechazos hiperagudos. Al parecer, el hígado ofrece resistencia a este tipo de rechazo por su masa total, que quizás diluya los títulos de anticuerpos preformados, hasta niveles no lesivos. Otros factores que pudieran influir en este sentido, es la pérdida considerable de sangre, con las transfusiones subsecuentes, que pudieran diluir los anticuerpos. En el trasplante hepático no se busca la compatibilidad HLA. Aunque se ha informado una relación, aún no ha sido demostrado un aumento de la duración como consecuencia de una mayor compatibilidad HLA.

### INMUNOSUPRESIÓN

Los esquemas de inmunosupresión utilizados para el trasplante hepático son similares al del trasplante renal.

## TRASPLANTE DE PÁNCREAS Y DE PÁNCREAS-RIÑÓN

### ESTUDIOS DE COMPATIBILIDAD

Para el trasplante de páncreas y de páncreas-riñón se requiere de compatibilidad del grupo ABO y se utilizan criterios estrictos en cuanto al *cross match*, similares a los utilizados en el trasplante renal, incluso cuando el trasplante sea solo de páncreas. En este último caso, la búsqueda de un alto grado de compatibilidad ha resultado controversial. Aunque puede esperarse que un aumento en la supervivencia del injerto esté relacionado con un grado mayor de identidad HLA, también se ha encontrado insulinitis en algunos trasplantes entre gemelos idénticos e intrafamiliares, lo cual pudiera explicarse por la asociación de algunos alelos HLA-clase II con la diabetes mellitus tipo I. El paciente ya tiene los genes predisponentes; si se buscan los mismos en el donante para compatibilizarlos, se facilita la reaparición de la enfermedad por la que ha sido trasplantado.

### INMUNOSUPRESIÓN

Los esquemas de inmunosupresión utilizados para el trasplante de páncreas y el de páncreas-riñón son

similares al trasplante renal, aunque debe detenerse en cuenta que los corticoides tienden a provocar efectos diabéticos.

Se ha experimentado en el trasplante de células de islote pancreático, al separar los islotes del tejido conectivo circundante y se ha obtenido una mayor supervivencia del injerto en la medida en que la preparación es más pura. Sin embargo, los islotes aún contienen células dendríticas, que expresan moléculas HLA-clase II, por lo que algunos investigadores las han tratado con anticuerpos monoclonales anti-HLA-DR. Todos estos experimentos en modelos animales han logrado una reversión prolongada del estado diabético, incluso sin una inmunosupresión concomitante; sin embargo, la falla del injerto ocurre a largo plazo, por lo que es más probable que la inmunosupresión sea necesaria, incluso en el alotrasplante de islotes pancreáticos.

## TRASPLANTE DE CÓRNEA

La córnea normal es un tejido carente de vasos sanguíneos y linfáticos, por lo que ha sido considerado como uno de los “sitios inmunológicamente privilegiados”. Por ello puede explicarse la escasa frecuencia de rechazo entre las córneas trasplantadas.

## ESTUDIOS DE COMPATIBILIDAD

Aunque está indicada la búsqueda de compatibilidad HLA entre donante y receptor, en casos con fracaso repetido del injerto corneal, o cuando existe vascularización grave, el tipaje y la compatibilidad HLA no son necesarios en la mayoría de los enfermos que necesitan trasplante de córnea.

## INMUNOSUPRESIÓN

Con frecuencia se usan corticosteroides tópicos como profilaxis contra el rechazo y más recientemente se han utilizado gotas oculares tópicas de ciclosporina. En el rechazo ya instalado, los corticosteroides tópicos se usan con mucha frecuencia (cada 1 h). En estos casos constituyen la terapéutica fundamental antirrechazo, aunque algunos pacientes pudieran requerir, adicionalmente, corticoides sistémicos o perioculares.

## TRASPLANTE ÓSEO

El hueso es uno de los tejidos más trasplantados, aunque en la mayoría de los casos son autotrasplantes, y en los casos de hueso alógeno siempre se realiza

en combinación con un autoinjerto que facilita un grado más temprano de reparación. Después del trasplante óseo, pueden ocurrir tres reacciones: que el injerto óseo sea viable y adquiera todas sus características biológicas, que sea total o parcialmente reabsorbido sin neoformación ósea, o que sea “secuestrado”, encapsulado y tratado por el huésped como un cuerpo extraño.

El hueso es un órgano vivo en constante renovación. En el trasplante exitoso, después de las primeras 2 semanas ocurre una inflamación que se asocia con una infiltración vascular y la presencia de tejido granular fibrótico, actividad osteoclástica y autólisis osteocítica. Entonces, ocurre una sustitución del hueso trasplantado por las células mesenquimatosas que se diferencian en osteoblastos con depósito osteoide sobre las trabéculas desvitalizadas.

## ESTUDIOS DE COMPATIBILIDAD

Los antígenos HLA inducen una respuesta inmune en el huésped. La respuesta celular parece ser más importante que los anticuerpos en el rechazo de los alotrasplantes óseos. El rechazo del tejido alogénico produce una respuesta que retrasa la cicatrización en el sitio de la osteosíntesis y bloquea la revascularización, reabsorción y neoformación óseas. Sin embargo, un rechazo bien definido solo ocurre en el 10 % de los huesos trasplantados; por otro lado, los antígenos HLA están presentes en el hueso trasplantado durante 2 o 3 meses, por lo que habitualmente no se realizan estudios de histocompatibilidad.

## INMUNOSUPRESIÓN

Se ha empleado solo una inmunosupresión temporal con azatioprina, corticosteroides, ciclosporina y ciclofosfamida. Sin embargo, por sus efectos colaterales y la baja tasa de fracaso del injerto, estos agentes ya no se usan de manera rutinaria en el trasplante músculo-esquelético en el hombre.

## TRASPLANTE DE MÉDULA ÓSEA

Para el inmunólogo, la lógica del trasplante de médula ósea (TMO) difiere (o es inversa) de los eventos inmunológicos que ocurren en otros trasplantes. El riesgo mayor es el llamado GVH (*graft versus host*) o enfermedad de injerto contra huésped. Para este trasplante, al paciente se le depleta de su sistema inmune mediante ciclofosfamida o radioterapia y se reconstituirá su inmunidad a partir de las *stem cells* o células madres

hematopoyéticas del donante. Sus indicaciones fundamentales son: aplasia medular, inmunodeficiencia severa combinada, leucemia mieloide aguda o crónica, y leucemia linfoblástica aguda. También se utiliza el autotrasplante de médula ósea en casos de tumores sólidos, para permitir el uso de radiaciones en dosis supraletales en la eliminación de las células neoplásicas.

En el autotrasplante en un paciente leucémico, la médula puede depurarse de células neoplásicas antes de ser infundida al paciente y en el alotrasplante se ha intentado depurar la médula de células T maduras para evitar el GVH, pero lamentablemente aumenta el riesgo de rechazo, de recaídas en las leucemias y de infecciones.

## ESTUDIOS DE COMPATIBILIDAD

En el TMO, la compatibilidad ABO, aunque preferible, no es obligatoria; y en la prueba de *cross match* un resultado positivo no contraindica el trasplante. Esto se explica puesto que las células que se han de trasplantar son las propias células inmunocompetentes que producirán los anticuerpos, por lo que una vez establecido el trasplante, no se producirán isohemaglutininas ni anticuerpos anti-HLA contra antígenos del donante. Puede utilizarse en un primer tiempo la plasmáferesis para eliminar los anticuerpos ya preformados.

El trasplante de células inmunocompetentes (TMO) exige una compatibilidad HLA casi perfecta. Antes solo se utilizaban como donantes, los hermanos que resultaran HLA idénticos (ambos haplotipos iguales). Con el desarrollo de las técnicas de biología molecular y análisis del ADN (ahora: SSO y SSP) se usan, para los individuos que no tienen un hermano HLA idéntico, voluntarios no emparentados de paneles internacionales con tipajes previamente realizados y almacenados en bases de datos computarizadas. Al comunicarse de país a país puede disponerse de un alto número de donantes voluntarios y, por tanto, obtener una probabilidad más alta de encontrar donantes adecuados: identidad completa HLA-II y prácticamente completa HLA-I (se admiten por lo general incompatibilidades “menores” clase I, es decir, identidad serológica; pero diferencias en subunidades detectables por análisis del ADN).

## INMUNOSUPRESIÓN

Los esquemas de inmunosupresión para la prevención del GVH son el metrotexate y la ciclosporina. Para el tratamiento del GVH agudo se han usado ATG, prednisona y anticuerpos monoclonales.

## FUTURO DE LA TRASPLANTOLOGÍA

### HACIA UNA INMUNOSUPRESIÓN ESPECÍFICA

En la actualidad, la inmunosupresión basada en corticoides, ciclosporina y otros citostáticos, es una inmunosupresión inespecífica que constituye un grosero ataque al sistema inmune, con la única intención de eliminar o deprimir clones alorreactivos. De manera consecuente, con frecuencia los pacientes sufren infecciones e incluso tienen una probabilidad mayor de padecer ciertas neoplasias malignas, sobre todo del sistema linfoide.

En este sentido, se trabaja para obtener una inmunosupresión específica con la que se logre una tolerancia al injerto, mientras se respetan otras funciones inmunitarias. El conocimiento actual sobre el papel del MHC en la patogenia del rechazo, ha estimulado a muchos a la investigación en el uso de antígenos o péptidos MHC para inducir la tolerancia específica del órgano trasplantado.

La aplicación intratímica de células completas que expresan moléculas MHC una semana antes del alotrasplante, ha demostrado ser efectiva en la inducción de la tolerancia al injerto al *reeducar* las células T para aceptar los aloantígenos como propios. Esta maniobra solo es efectiva si se realiza de conjunto con la irradiación corporal total subletal para eliminar las células T maduras periféricas y permitir que sean sustituidas por otras nuevas.

La administración periférica de moléculas MHC del donante también ha demostrado ser un método capaz de inducir mayor tolerancia al injerto, lo mismo cuando se aplican células completas o antígenos extraídos. Las transfusiones donante específicas pueden prolongar la sobrevida del trasplante tanto en el hombre como en animales de experimentación, mientras que la administración perioperatoria de antígenos MHC extraídos donante específicos ha logrado potenciar el efecto de la ciclosporina de prolongar la sobrevida del aloinjerto.

Una segunda posibilidad es el uso de péptidos sintéticos MHC. En estos experimentos, los péptidos MHC-I han resultado más eficaces en la inducción de tolerancia que los MHC-II. Se han estudiado péptidos bloqueadores, que pueden interrumpir la interacción específica MHC-TCR; péptidos alomiméticos, con los que se busca desarrollar una señal antigénica incompleta, inductora de anergia, y péptidos antagonistas, que difieren de los bloqueadores en que no tienen afinidad por los sitios de contacto con el TCR, lo que provoca

su activación incompleta y anergia en la célula T. En el uso terapéutico de algunos péptidos cortos, derivados del antígeno HLA-A2, se ha demostrado la inhibición del reconocimiento aloespecífico CTL y la lisis de la célula diana.

Otro enfoque es el bloqueo o la alteración de las segundas señales, con la administración de moléculas MHC solubles o unidas a membrana en células presentadoras de antígeno, no profesionales.

Muchos de estos métodos aplicados de modo experimental con relativo éxito tienen obvias limitaciones prácticas. Unos requieren de su aplicación durante algunos días antes del acto quirúrgico del trasplante y son donante-específicos, lo cual los hace inaplicables en la mayor parte de los trasplantes realizados (donde se utilizan donantes cadáveres). Otros utilizan péptidos que tienen que ser diseñados específicamente “a la medida”, lo cual los haría poco prácticos o muy costosos. Se necesita aún del desarrollo de muchas investigaciones, que permitan determinar y localizar los epítopes inmunogénicos o tolerogénicos dominantes o subdominantes en las moléculas MHC. Estos estudios son importantes en el entendimiento del papel de los antígenos MHC en la inducción de la aceptación o rechazo del aloinjerto; quizás permitan el uso por grupos de tales péptidos e, indudablemente, ayudarán en el futuro diseño de moléculas quiméricas y péptidos que puedan desviar la respuesta del huésped hacia la tolerancia.

## EN BUSCA DE OTRAS FUENTES DE ÓRGANOS

Desde sus inicios, el trasplante de órganos ha constituido una solución terapéutica para una minoría de pacientes candidatos. Los logros de supervivencia del injerto y de los pacientes que lo han recibido, han permitido que se investigue sobre más afecciones y pacientes que puedan ser tratados con esta vía. Esto hace que aumenten las listas de pacientes que precisan órganos y se extienda el tiempo de espera. A pesar de que en muchos países se realizan grandes esfuerzos por utilizar la mayor cantidad de órganos de los donantes (pacientes en coma sobrepasado), nunca podrán ser satisfechas todas las necesidades de órganos. En el caso de los niños, la escasez de donantes es aún mayor, puesto que la probabilidad de encontrar el adecuado está limitada por

los requerimientos de compatibilidad, incluso, del peso y del tamaño.

Es por ello que no ha cesado la búsqueda de otras fuentes de donantes. La investigación en xenotrasplantes ha demostrado que si bien es posible la utilización de animales como fuente de órganos, la tasa de supervivencia es menor que en el alotrasplante, sobre todo cuando existe un alto grado de compatibilidad. El trasplante de corazones de monos pequeños en niños se ha usado de manera eventual como un puente de espera hacia un alotrasplante. La experimentación en este sentido tiene el inconveniente de crear un riesgo importante, puesto que el paso repetido a un nuevo huésped de un agente microbiano (virus) puede tener un efecto de selección de mutaciones y la aparición de enfermedades en la especie humana, incluso más graves que sus correspondientes en el huésped animal. Hace poco se demostró la posibilidad de utilizar animales transgénicos para el MHC. El cerdo es el mejor candidato, puesto que el tamaño de sus órganos es muy similar al ser humano y, además, el riesgo del paso de virus al hombre es pequeño, pues está, desde el punto de vista filogenético, relativamente distante del hombre y se ha utilizado en la alimentación humana desde tiempos inmemoriales.

El futuro de la trasplantología apunta hacia el autotrasplante de órganos y de tejidos, que crecen a partir de células en el laboratorio o en el propio paciente. Con los avances de la ingeniería de tejidos, nueva rama de las ciencias que utiliza factores de crecimiento, se busca obtener tejidos y órganos completos en el laboratorio, incluso en el paciente. Ya se ha logrado el crecimiento de piel y de huesos (una falange del pulgar) sobre un soporte de coral, cartilago que se obtuvo “pintando” capas celulares sobre el hueso del paciente. Además, se han registrado tres patentes de la tecnología necesaria para el crecimiento de nuevos órganos y tejidos dentro del cuerpo humano. La compañía *Advanced Tissue Sciences* ya ha conducido ensayos en animales para el crecimiento de páncreas, de tracto gastrointestinal, de ligamentos, de hígado, y de músculo cardíaco y esquelético. El procedimiento es siempre el mismo: tomar las células responsables de la secreción de los factores de crecimiento y de la matriz proteica, y colocarlas en una estructura de soporte, que es de material biocompatible y biodegradable, que mimetiza las condiciones de crecimiento hístico dentro

del cuerpo. Una vez trasplantadas, las células recrean su propia función, los vasos sanguíneos se unen al tejido y la estructura de soporte desaparece.

Si estos estudios confirman su factibilidad, no solo se lograría llenar la creciente demanda de órganos, en la actualidad insatisfecha, sino que al eliminar virtualmente la posibilidad de rechazo, se harán innecesarias la inmunosupresión con sus inconvenientes y la búsqueda de compatibilidad, ya que en realidad se trata de un autotrasplante compatible del todo.

## BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

Chao NJ. Allogenic bone marrow transplantation for high-risk acute lymphoblastic leukemia during first complete remission. *Blood* 1991; 78:1923.

Garovoy MR, Stock P, Bumgardner G, Keith F, Linker C. Trasplante Clínico. En: Stites D P, Terr A I, Parslow T G. Eds. *Inmunología Básica y Clínica*. 8<sup>va</sup>. ed. México DF: Editorial El Manual Moderno, 1996.

Ghobrial RR, Stepkowski SM, Kahan BD. Molecular engineering of the major histocompatibility complex for immunomodulation. *Clin Transplant* 1995; 9:237-45.

Halloran PF, Broski AP, Batiuk TD, Madrenas J. The molecular immunology of acute rejection: An overview. *Transplant Immunol* 1993;1:3.

Kaye MP. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation. *J Heart Lung Transplant* 1992, 4:599.

Lake JR (ed.). *Advances in liver transplantation*. Gastroenterol Clin North Am 1993; 22:213.

O'Connor B. Advances in tissue engineering are creating human body shop. *Biotech organs grown in the lab or the body to replace transplants and prostheses*. *Biotech Lab Intern*, 1998; 3:1-4.

Roitt I, Brostoff J, Male D. *Inmunología*. 4ta ed. Madrid: Harcourt Brace, 1997.

Rose NR, Friedman H, Fahey JL. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3<sup>rd</sup> ed. Washington, D.C: American Society for Microbiology, 1997.

Terán L, Terán D, Juárez A, Gómez J, Castellanos J. *Inmunología del Trasplante*. En: Castellanos J (ed.). *Temas de Medicina Interna y Trasplante de Órganos*. Vol V. México DF: Editora McGraw Hill Interamericana. 1998; p.3-22.



## **CONTENIDO**

---

### **Introducción/ 507**

### **Adhesión celular, adhesión leucocitaria y moléculas de adhesión/ 508**

### **Características generales de las moléculas de adhesión/ 508**

Aspectos generales de las funciones de las moléculas de adhesión/ 508

### **Clasificación de las moléculas de adhesión/ 508**

Superfamilia de las inmunoglobulinas/ 509

Superfamilia de las integrinas/ 509

Superfamilia de las selectinas/ 512

### **Función de las moléculas de adhesión en la migración linfocitaria/ 513**

Características de las vías y mecanismos de recirculación linfocitaria/ 513

### **Importancia de las moléculas de adhesión en la respuesta inflamatoria/ 514**

### **Inmunodeficiencias por déficit de moléculas de adhesión/ 516**

Inmunodeficiencia LAD 1/ 516

Inmunodeficiencia LAD 2/ 516

### **Enfermedades asociadas con alteraciones de las moléculas de adhesión/ 516**

### **Potencial terapéutico/ 517**

### **Bibliografía recomendada/ 517**

### Capítulo 43



## MOLÉCULAS DE ADHESIÓN

*Dra. Consuelo Macías Abraham*

### RESUMEN

Una respuesta inmune eficaz requiere, además de la interacción del antígeno con el receptor antigénico, de otras interacciones entre receptores y contrarreceptores o ligandos, que constituyen segundas señales y señales coestimuladoras necesarias para la activación linfocitaria total. Sin ellas no se completan los mecanismos efectores de la respuesta inmune, y resultan de especial importancia en la unión de baja afinidad entre el antígeno y el receptor antigénico. Entre estas moléculas se encuentran las moléculas de adhesión, que facilitan los contactos intercelulares e incluyen a los receptores antigénicos de los linfocitos T y B; algunas de las llamadas moléculas accesorias, cuya interacción con el ligando específico es un requisito indispensable para la activación del linfocito; y otras moléculas, cuyas acciones son significativas en el desarrollo de la respuesta inmune, la migración linfocitaria y la respuesta inflamatoria. De acuerdo con sus características estructurales, estas moléculas se clasifican en tres familias proteicas fundamentales: la superfamilia de las inmunoglobulinas, las integrinas y las selectinas. Su importancia en la respuesta inmune e inflamatoria se evidencia en las inmunodeficiencias primarias por alteraciones moleculares en la síntesis de algunas de estas moléculas, que produce un cuadro clínico de infecciones bacterianas y en algunos casos de incompatibilidad con la vida. Muchas enfermedades en las que hay procesos inflamatorios agudos y crónicos, a veces son consecuencia de alteraciones de las moléculas de adhesión. Las nuevas perspectivas terapéuticas tienen resultados notables para muchas enfermedades.

### INTRODUCCIÓN

Para que las células del sistema inmune puedan realizar eficazmente sus funciones necesitan mantener contactos con otras células y con la matriz extracelular. Por esto, los leucocitos no solo poseen receptores específicos de cada población y subpoblación celular, en diferentes estadios de maduración y en su forma madura o inmunocompetente, que permite diferenciarlos y, al mismo tiempo, interactuar y dar respuestas a diferentes estímulos. También ellos poseen varias moléculas que les permiten la adhesión con otras células y con proteínas de la matriz extracelular como el colágeno, la fibronectina, la laminina, el hialuronato y otras, para reconocer el medio que les rodea.

Estos receptores o moléculas de adhesión que se expresan en la superficie de la membrana celular, para

poder ejercer sus funciones, no solo necesitan de la expresión de sus ligandos o contrarreceptores en el sitio con el cual interactúan, sino que también requieren de la preactivación de la propia célula. Esto induce un incremento de la avidéz del receptor por sus ligandos, lo cual colabora, a su vez, en la activación celular, pues envía señales coestimuladoras o coactivadoras al interior de la célula.

Esta función celular es de gran importancia en diferentes procesos biológicos del organismo, entre los cuales se encuentran: la organización de las células animales durante el desarrollo embrionario, ya que permite la diferenciación y migración de estas y su localización en los diferentes órganos y tejidos, o sea, una adecuada morfogénesis; interviene en los fenómenos de la hemostasia, como la agregación plaquetaria y la formación de trombos; en la reparación hística y la

cicatrización de las heridas; y desempeña un papel fundamental en el desarrollo de la respuesta inflamatoria y de los mecanismos que intervienen en la respuesta inmune celular.

## ADHESIÓN CELULAR, ADHESIÓN LEUCOCITARIA Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN

La adhesión celular es la que ocurre entre las células (adhesión intercelular) de un mismo tipo (adhesión homotípica) y de diferentes tipos (adhesión heterotípica), y también entre las células y las proteínas de la matriz extracelular (adhesión extracelular) como la laminina, el colágeno, la fibronectina y el hialuronato.

La adhesión que ocurre entre los leucocitos (células que participan en la respuesta inmune) es un proceso regulado y controlado por receptores que se expresan en la superficie de la membrana celular, los cuales se encuentran involucrados en el reconocimiento intercelular y célula-matriz extracelular. Estos receptores o moléculas celulares se denominan moléculas de adhesión leucocitarias.

Las moléculas de adhesión son receptores celulares funcionales que se encuentran involucrados en el reconocimiento intracelular y célula-matriz extracelular, cuya característica principal es la capacidad de transducir señales al interior de las células en su interacción con sus ligandos o contrarreceptores. De esta forma desencadena diferentes eventos funcionales celulares como la expresión génica, los cambios fenotípicos de inducción y/o sobreexpresión de determinadas moléculas en la membrana celular y, por tanto, cambios en el estado de activación de la célula (figura 5.23).

Los estímulos externos como la acción de las citocinas o la estimulación antigénica pueden provocar cambios intracitoplasmáticos que provoquen estos cambios fenotípicos, la activación celular y la inducción y sobreexpresión de las moléculas de adhesión (figura 5.24).

Interacción de los receptores de adhesión con sus ligandos → Activación celular

**Figura 5.23** Activación del interior al exterior de la célula.

### Medio ambiente extracelular

La acción de las citocinas y la interacción del antígeno con el receptor antigénico específico

### Citoplasma

Eventos funcionales como la fosforilación de proteínas

Activación celular con inducción o sobreexpresión de los receptores de adhesión

**Figura 5.24** Activación del exterior al interior de la célula.

## CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN

Las moléculas de adhesión establecen comunicación entre el medio ambiente extracelular e intracelular a través de ellas mismas (receptores funcionales) y permiten así la regulación de su expresión y cambios en el estado de activación de la célula.

La expresión de las moléculas de adhesión fluctúa entre un estado de alta y baja afección por sus ligandos, lo que permite el adecuado funcionamiento de estas durante las respuestas inflamatoria e inmune.

## ASPECTOS GENERALES DE LAS FUNCIONES DE LAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN

Las moléculas de adhesión participan en las interacciones intercelulares y con la matriz extracelular, desencadenan y están presentes en los mecanismos de la respuesta inmune celular. Además, participan en la migración y activación de los leucocitos en la inmunovigilancia y la respuesta inflamatoria.

## CLASIFICACIÓN DE LAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN

Se han descrito 3 familias proteicas bien definidas por sus características estructurales y las moléculas así agrupadas desempeñan funciones similares: superfamilia de las inmunoglobulinas, de las integrinas y de las selectinas. Además, existen otras moléculas no agrupadas en estas familias que por su importancia deben ser mencionadas (tablas 5.21 y 5.22).

## SUPERFAMILIA DE LAS INMUNOGLOBULINAS

La familia de las inmunoglobulinas agrupa aquellas moléculas que presentan dominios estructurales, variables o constantes, similares a las inmunoglobulinas e incluye a los receptores antigénicos de las células T y B, a las moléculas del sistema principal de histocompatibilidad de las clases I y II, a las moléculas accesorias de las células T en el reconocimiento del antígeno y su activación ( $CD_3$ ,  $CD_2$ ,  $CD_{58}$  (LFA-3),  $CD_4$ ,  $CD_8$ ), así como a otras moléculas de adhesión muy importantes, como son los ligandos o contrarreceptores de las integrinas en los leucocitos y las células endoteliales vasculares (ICAM-1 y VCAM-1). Por lo tanto, esta familia de moléculas es esencial en la presentación y el reconocimiento del antígeno, la activación linfocitaria, las interacciones celulares que ocurren durante la respuesta inmune para la cooperación entre poblaciones y subpoblaciones linfocitarias como la cooperación celular entre células presentadoras de antígenos (CPA), células B y T, así como en la interacción entre los leucocitos y las células endoteliales vasculares durante la respuesta inflamatoria, permitiendo así la trans migración leucocitaria del espacio vascular al extravascular y el reclutamiento leucocitario. La interacción  $CD_2$ -LFA-3 es muy importante en la unión de las CPA con la célula T en el reconocimiento antigénico y su activación, en la lisis de las células blanco por los linfocitos T y en la maduración de los timocitos inmaduros a células epiteliales tímicas (figura 5.25).

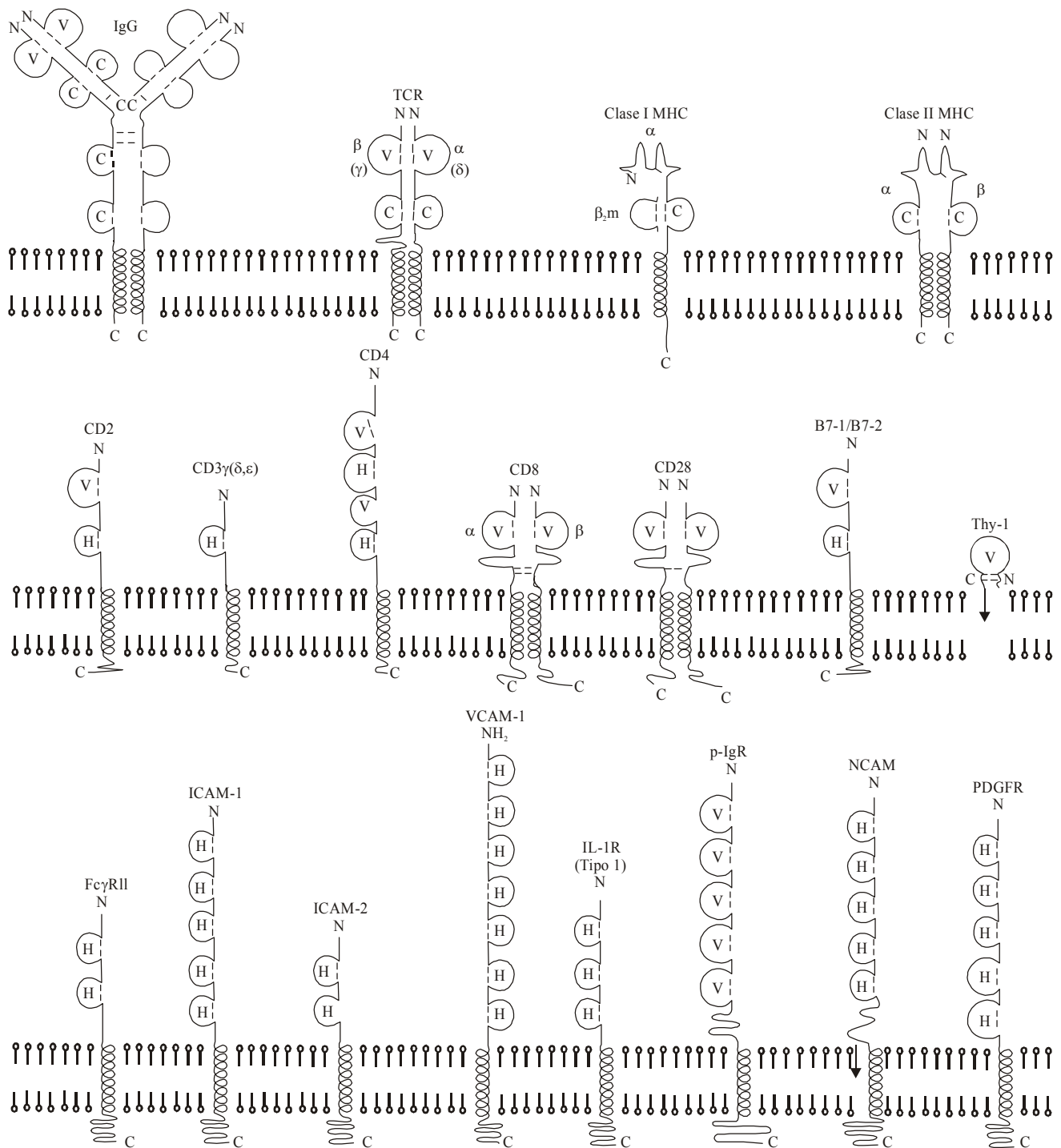
## SUPERFAMILIA DE LAS INTEGRINAS

Las integrinas reciben este nombre porque integran el medio ambiente extracelular e intracelular. Esta familia está constituida por  $\alpha\beta$  heterodímeros cuyas cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  transmembránicas se encuentran asociadas no covalentemente. Las cadenas alfa tienen un peso molecular que oscila entre 120 y 180 kDa y las cadenas beta de 90 a 110 kDa. Se encuentran expresadas en una gran variedad de células que, a su vez, suelen expresar diferentes familias de integrinas. Se han identificado al menos 20 subunidades alfa y hasta 8 subunidades beta y existe homología en la secuencia de aminoácidos entre las cadenas  $\alpha$  y las cadenas  $\beta$  de los diferentes tipos de integrinas. Esto ha permitido la asociación de determinadas cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  y la clasificación de estas en subfamilias, de acuerdo con la cadena  $\beta$  común. Mientras que algunas cadenas  $\alpha$  solo pueden asociarse con una cadena  $\beta$ , otras pueden asociarse con distintas cadenas  $\beta$ . Así, por ejemplo, la cadena  $\alpha_4$  puede unirse a

la cadena  $\beta_1$  y a la cadena  $\beta_7$ , y conformar la molécula VLA-4 ( $\alpha_4\beta_1$ ) y la molécula de adhesión del linfocito a las placas de Peyer, LPAM-1 ( $\alpha_4\beta_7$ ), respectivamente. Ambos receptores interaccionan con el ligando VCAM-1 en las células endoteliales (tabla 5.18).

La familia de las  $\beta_1$  integrinas se encuentra expresada fundamentalmente en leucocitos, pero tiene una amplia distribución histica. Por ello, pueden expresarse en plaquetas, células endoteliales, células epiteliales, fibroblastos y linfocitos, sobre todo después de su activación y tiene como cadena  $\beta$  común la cadena  $\beta_1$  o la cadena  $CD_{29}$ . Es la subfamilia más numerosa e incluye a las moléculas VLA (del inglés: *very late antigen*), ya que fueron inicialmente identificadas como antígenos de activación tardía VLA1-6, que median la adhesión de las células a las proteínas de la matriz extracelular, como el colágeno, la laminina (ligando de VLA-1 y VLA-6) y la fibronectina (ligando de VLA-4 y VLA-5), concretamente con la secuencia aminoacídica Arg-Gly-Asp (RGD), y también median procesos de adhesión independientes de RGD. Dentro de estas, las moléculas VLA-4, VLA-5 y VLA-6 se expresan en los linfocitos T no activados y aumentan la avidéz por sus ligandos después de la activación linfocitaria. Tienen una mayor expresión en los linfocitos de memoria que en los vírgenes, lo que permite la retención de estos en los tejidos periféricos (tabla 5.18).

La familia  $\beta_2$  integrinas o integrinas leucocitarias, así llamadas por su expresión limitada a los leucocitos, tienen como cadena  $\beta$  común la cadena  $CD_{18}$  que se asocia con tres cadenas  $\alpha$  diferentes  $\alpha_L$  ( $CD_{11a}$ ),  $\alpha_M$  ( $CD_{11b}$ ) y  $\alpha_X$  ( $CD_{11c}$ ), por lo que incluye a las tres moléculas LFA-1 ( $CD_{11a}/CD_{18}$ ), Mac-1 ( $CD_{11b}/CD_{18}$ ) y p150/95 ( $CD_{11c}/CD_{18}$ ). La molécula LFA-1 se expresa en linfocitos T, B, granulocitos, monocitos y células NK; la molécula Mac-1 se expresa en células NK, monocitos y granulocitos; y la molécula p150/95 se expresa en monocitos y granulocitos y su expresión es incrementada por mediadores de la inflamación. Los ligandos de LFA-1 pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas y son las moléculas ICAM-1, ICAM-2 e ICAM-3. Estas interacciones representan una vía fundamental de comunicación entre los leucocitos y otras células, y son necesarias para la respuesta inmunitaria. Los ligandos de la molécula Mac-1 son moléculas de origen extracelular como la fracción C3bi del complemento, el fibrinógeno y el factor X y la molécula ICAM-1 en su interacción celular. Los ligandos de p150/95 son moléculas extracelulares como el fibrinógeno y la fracción C3bi del complemento (tabla 5.18).



### Leyenda

V: dominio similar a la región variable de la Ig; C: dominio similar a la región constante de la Ig; Fc $\gamma$ RII: receptor FcII; ICAM-1: molécula de adhesión intracelular-1 (CD54); ICAM-2: molécula de adhesión intracelular-2; VCAM-1: molécula de adhesión vascular-1; IL-1R: receptor de IL-1; p-IgR, receptor polilg; NCAM: molécula de adhesión celular neural; PDGFR: receptor del factor de crecimiento plaquetario.

(Modificado por Hunkapiller, T & L. Hood. Diversity of the Immunoglobulin gene superfamily. *Advances of Immunology* 1989;44:1-63).

**Figura 5.25** Proteínas de la superfamilia de las inmunoglobulinas.

La familia  $\beta_3$  integrinas tiene como cadena  $\beta$  común la cadena  $\beta_3$  o molécula CD61 que se asocia a las cadenas  $\alpha_{IIb}$  (CD41) y  $\alpha_v$  (CD51), con lo que forma las moléculas gpIIb/IIIa ( $\alpha_{IIb}/\beta_3$ ) y el receptor de la vitronectina (VNR,  $\alpha_v\beta_3$ ). Ambas moléculas se expresan en plaquetas y megacariocitos y están implicadas en procesos de la coagulación. Sus ligandos son derivados del producto de la coagulación como el fibrinógeno, la fibronectina, la vitronectina o el factor de von Willebrand.

Dentro de esta gran familia, las moléculas LFA-1 ( $\beta_2$  integrinas) y VLA-4 ( $\beta_1$  integrinas) son los receptores de mayor importancia implicados en la activación del linfocito T y la cooperación celular, pues envían señales coestimuladoras; también en la interacción con el endotelio vascular facilitan la firme adhesión del leucocito al endotelio y su trans migración al espacio extravascular:

1. Molécula LFA-1: su expresión está incrementada en células T de memoria y efectoras. Su interacción

**Tabla 5.18** Integrinas

Subunidad	Nombre	Ligandos	Funciones
$\beta_1 \alpha_1$	VLA-1 (CD49a/CD29)	Colágeno laminina	Adhesión célula-matriz extracelular
$\alpha_2$	VLA-2 (CD49b/CD29)	Colágeno laminina	Adhesión célula-matriz extracelular
$\alpha_3$	VLA-3 (CD49c/CD29)	Fibronectina colágeno, laminina	Adhesión célula-matriz extracelular
$\alpha_4$	VLA-4 (CD49d/CD29)	Fibronectina VCAM-1	Adhesión célula-matriz extracelular, asentamiento de células T, coestimulación de células T, adhesión leucocitaria al endotelio
$\alpha_5$	VLA-5 (CD49e/CD29)	Fibronectina	Adhesión célula-matriz extracelular
$\alpha_6$	VLA-6 (CD49f/CD29)	Laminina	Adhesión célula-matriz extracelular
$\alpha_7$	CD49g/CD29	Laminina	Adhesión célula-matriz extracelular
$\alpha_8$	CD49h/CD29	—	—
$\alpha_v$		Vitronectina fibronectina	Adhesión célula-matriz extracelular
$\beta_2 \alpha_L$	LFA-1 (CD11a/CD18)	ICAM-1 ICAM-2 ICAM-3	Adhesión leucocitaria al endotelio, asentamiento de células T, interacción CPA-célula T, coestimulación de células T
$\alpha_M$	Mac-1 (CD11b/CD18)	C3bi, fibrinógeno factor X, ICAM-1	Adhesión leucocitaria y fagocitosis, Adhesión célula-matriz extracelular
$\alpha_x$	p150,95 (CD11c/CD18)	C3bi, fibrinógeno	Adhesión leucocitaria y fagocitosis, Adhesión célula-matriz extracelular
$\beta_3 \alpha_{IIb}$	—	Fibrinógeno, factor von Willebrand, fibronectina, trombospondina	Adhesión y agregación plaquetaria
$\alpha_v$	Receptor de vitronectina (CD51/CD61)	Vitronectina, fibrinógeno, factor von Willebrand, trombospondina fibronectina, colágeno	Adhesión célula-matriz extracelular
$\beta_4 \alpha_6$	—	Laminina (?)	—
$\beta_5 \alpha_v$	—	Vitronectina	Adhesión célula-matriz extracelular
$\beta_6 \alpha_v$	—	Fibronectina	Adhesión célula-matriz extracelular
$\beta_7 \alpha_4$	LPAM-1	Fibronectina, VCAM-1, MadCAM-1	Asentamiento linfocitario en las mucosas
$\alpha_E$	—	E-caderina	Adhesión linfocitaria a la mucosa epitelial
$\beta_6 \alpha_v$	—	?	—

**Leyenda**

? Se desconoce.

con ICAM-1 ha sido la más estudiada. Se conoce que su afección por ICAM-1 se incrementa transitoriamente tras la activación celular en la presentación antigénica por las CPA al receptor de las células T (RCT), transmite señales coestimuladoras al interior de la célula, y colabora así en la activación del linfocito T. La afección por sus ligandos es regulable. La estimulación del linfocito T por las vías del TCR y la molécula CD2 incrementa la interacción LFA-1/ICAM-1 de manera transitoria y reversible sin que requiera del aumento de la expresión de la molécula, ya que se encuentra implicada la proteína quinasa C (PKC) y la fosforilación de proteínas intracitoplasmáticas que provocan un cambio conformacional de su dominio extracelular de unión a su ligando. Esta interacción se requiere para múltiples funciones leucocitarias como la interacción de los linfocitos T citotóxicos y las células NK con las células blanco y, por tanto, una citólisis efectiva de estas células y en la trans migración de los granulocitos y linfocitos en la respuesta inflamatoria. También interviene en su interacción con ICAM-2, que se expresa en células endoteliales no activadas, en el asentamiento de los linfocitos T de memoria y T efectores en tejidos periféricos o sitios de inflamación. La interacción con ICAM-3, que solo se expresa en células linfoides, tiene mayor importancia en la hematopoyesis.

2. Molécula VLA-4: esta molécula constituye una excepción dentro de las  $\beta_1$  integrinas ya que, además de unirse a la proteína extracelular fibronectina, al igual que la LFA-1, participa en la adhesión intercelular y muestra características funcionales comunes. Su expresión está incrementada en células T de memoria y efectoras, por lo que interviene en el asentamiento de los linfocitos en tejidos periféricos, envía señales coestimuladoras en la activación del linfocito T y en la trans migración leucocitaria durante la respuesta inflamatoria. Su ligando en las células endoteliales activadas es la molécula VCAM-1. Su propiedad de unirse a la fibronectina es importante en la retención de las células T en los tejidos.

Otra subfamilia de las integrinas que ha adquirido una gran relevancia es la asociada a la cadena  $\beta_7$ . Ella incluye a la molécula  $\alpha_4\beta_7$  (LPAM-1), identificada como el receptor de asentamiento linfocitario para las placas de Peyer en la mucosa intestinal. Al igual que la molécula VLA-4 se une a la molécula VCAM-1 en el endotelio activado y a la fibronectina. En las placas de

Peyer se une a la molécula MadCAM (molécula de citoadhesión, adresina mucosal), una adresina vascular de expresión restringida a las vénulas endoteliales altas (HEV). La integrina  $\alpha_E\beta_7$  se expresa específicamente en los linfocitos intraepiteliales y entre el 2 y el 5 % de los linfocitos de sangre periférica. Esta molécula es también un receptor de asentamiento linfocitario en la piel inflamada y su ligando lo constituye la molécula E-selectina. Su expresión es inducible por el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ) (tabla 5.18).

## SUPERFAMILIA DE LAS SELECTINAS

Las selectinas se caracterizan por estar implicadas en la selectividad del asentamiento linfocitario en órganos y tejidos (ELAM-1, molécula de adhesión leucocitaria al endotelio). Presentan en su estructura un dominio similar al factor de crecimiento epidérmico, un dominio similar a las proteínas reguladoras del complemento y un dominio similar a las lectinas, implicado en sus características funcionales (a ello se debe su denominación). Se han descrito 3 moléculas L, P y E selectinas. La letra inicial corresponde con el sitio de expresión (tabla 5.19).

La L-selectina se expresa en la membrana leucocitaria. Su expresión está incrementada en los linfocitos T vírgenes, por lo que media la migración de ellos a los nódulos linfáticos. Sus ligandos corresponden con la molécula Glycam-1, proteoglicano producido en el endotelio de las HEV. También interacciona con la molécula CD34, proteoglicano sobre las células endoteliales, y con la molécula MadCAM-1 expresada en la mucosa intestinal. La E-selectina se expresa solamente en el endotelio activado por citocinas y la P-selectina en los gránulos alfa plaquetarios y los gránulos de los cuerpos Weibull Palade del endotelio y sus ligandos corresponden con oligosacáridos sialilados, muy similares a las sustancias sialil Lewis X y A. La P-selectina también interacciona con una glicoproteína similar a la mucina, PSGL-1 (ligando glicoproteico de la P selectina-1). Intervienen en la migración de los linfocitos T a los órganos linfoides secundarios y en su asentamiento en los tejidos periféricos de persistencia antigénica (recirculación linfocitaria), así como en la adhesión inicial y el rodamiento de los leucocitos sobre el endotelio de la pared vascular durante la respuesta inflamatoria (tabla 5.19).

Otra molécula que por su importancia debe ser mencionada es la CD<sub>44</sub>, que se expresa en células T maduras, timocitos, células B, granulocitos, macrófagos, eritrocitos y fibroblastos, y existe de forma soluble en el

plasma. Es un marcador de memoria de las células T en los sitios de inflamación periférica y el endotelio de las placas de Peyer, por lo que participa en la retención de las células T en los tejidos extravasculares. Su expresión está incrementada en las células T precursoras y disminuye con la maduración de estas, por lo que es muy útil en el estudio de la maduración y diferenciación de las células T.

## FUNCIÓN DE LAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN EN LA MIGRACIÓN LINFOCITARIA

La migración linfocitaria y el asentamiento de los linfocitos T en los tejidos periféricos no es posible sin las interacciones adhesivas de las moléculas de adhesión. Esta migración linfocitaria se clasifica en tres grandes grupos:

1. La migración selectiva de las células T y B vírgenes a los órganos linfoides secundarios, importante para el desarrollo de la respuesta inmune competente.
2. La migración de los linfoblastos y subpoblaciones de memoria a los sitios extralinfoides como el epitelio de las mucosas y la piel, que es de gran importancia en la respuesta inmune de memoria en los sitios de entrada o persistencia de los antígenos.
3. La migración leucocitaria a un estímulo localizado que ocurre durante la respuesta inflamatoria.

## CARACTERÍSTICAS DE LAS VÍAS Y MECANISMOS DE RECIRCULACIÓN LINFOCITARIA

Las células T vírgenes, las células T efectoras activadas y las células T de memoria tienen diferentes patrones de recirculación.

La migración de los linfocitos es mediada por receptores de asentamiento sobre los linfocitos y de sus ligandos sobre las células endoteliales denominados adresinas vasculares, que no son más que receptores de adhesión.

La expresión y las funciones de estas moléculas de adhesión que participan en la migración o recirculación linfocitaria son reguladas por el reconocimiento del antígeno y los estímulos inflamatorios.

La extravasación del linfocito en el nódulo linfático ocurre selectivamente en las vénulas poscapilares endoteliales altas (HEV), presentes en la mucosa del tejido linfoide (igualmente ocurre en las placas de Peyer en el intestino). El desarrollo es una consecuencia de la activación de los linfocitos T y la producción de citocinas como el interferón  $\gamma$ . La principal característica de esta extravasación es la mayor adhesividad del linfocito circulante al endotelio alto durante varios segundos, a diferencia del aplanado, al que solo se asocian durante la fracción de un segundo. La baja afinidad de adhesión hace que por la fuerza del flujo sanguíneo los linfocitos se separen del endotelio, aunque una pequeña parte puede adherirse firmemente y a través de las células endoteliales penetrar al estroma del nódulo linfático. Esta firme adhesión es posible por la interacción de la L-selectina expresada en los linfocitos T vírgenes, fundamentalmente con el Glycam-1, la molécula CD34 y la molécula MadCAM-1. Si las células T no interactúan con el antígeno específico en los nódulos linfáticos, salen por los vasos linfáticos eferentes, continúan su recirculación linfática y regresan a la sangre a través del conducto torácico. En el intestino, el tiempo de unión de las células T es más prolongado, lo que provoca que el 50 % de estas penetren a la mucosa.

**Tabla 5.19** Características de las selectinas

Designación clásica	Otras designaciones	Principales ligandos	Células que las expresan
L-selectina	CD62L, LAM-1	GlyCAM-1, CD34, MadCAM-1, Sgp200, PSGL-1, E-selectina	Granulocitos, subpoblaciones de linfocitos, monolitos
E-selectina	CD62E, ELAM-1	PSGL-1 (CLA), ESL-1, L-selectina	Células endoteliales activadas
P-selectina	CD62P, PADGEM	PSGL-1, CD24	Células endoteliales y plaquetas activadas



Cuando, por el contrario, el linfocito T interactúa con su antígeno específico en el nódulo linfático, se activa, comienza a proliferar y a liberar mediadores solubles que provocan un incremento de la expresión de las moléculas de adhesión LFA-1, VLA-4, VLA-5, VLA-6 y CD44 que median su adhesión a otras células y a la matriz extracelular. De esta forma, aumenta la afinidad por sus ligandos e incrementa la adherencia de las células accesorias a la matriz extracelular, por lo que las células efectoras y de memoria permanecen en el nódulo linfático hasta que, pasado un tiempo, la avidéz de estas moléculas de adhesión por sus ligandos fluctúa de nuevo y disminuye. Estas células retornan nuevamente por vía eferente a la sangre, pero ya diferenciadas como células efectoras y de memoria circulantes, con una expresión disminuida de L-selectina y un incremento en la expresión de las integrinas mencionadas y de la molécula CD44. Posteriormente, se asientan en los sitios de inflamación y en los sitios de entrada y persistencia del antígeno, y median la fase efectora de la respuesta de las células T mediante las interacciones con sus ligandos LFA-1/ICAM-1, VLA-4/VCAM-1 y CD44/hialuronato. En determinados sitios del organismo se conocen otras interacciones específicas como son: en la mucosa intestinal las interacciones  $\alpha_4\beta_7$ /MadCAM-1,  $\alpha_4\beta_7$ /VCAM-1 y CD44/hialuronato y en la piel inflamada la interacción CLA-1 (antígeno linfocitario cutáneo-1)/E-selectina (tabla 5.20).

Los linfocitos B vírgenes activados permanecen en los órganos linfoides periféricos como los nódulos linfáticos y el bazo. En respuesta al estímulo antigénico específico dan lugar a los anticuerpos específicos que actúan a distancia. Las células B de memoria no necesitan de asentamiento periférico y permanecen en los centros germinales de los órganos linfoides donde participan en la respuesta secundaria y su asentamiento en los órganos linfoides periféricos ocurre mediante la interacción VLA-4/VCAM-1.

## IMPORTANCIA DE LAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA

La inflamación es una compleja serie de reacciones homeostáticas que involucra a los mecanismos inmunológicos humorales y celulares para proteger al organismo. Si esta reacción resulta exagerada o crónica, no cumple su función y ocurren cambios patológicos.

Se caracteriza por una reacción vascular inicial a un estímulo localizado (reconocimiento antigénico) con liberación de mediadores vasoactivos, una reacción celular de reclutamiento de células inflamatorias (leucocitos inmunocompetentes) que depende de la adhesión leucocitaria y una reacción hística en la que los leucocitos liberan mediadores inflamatorios y provo-

**Tabla 5.20** Receptores de adhesión implicados en la migración de los linfocitos T

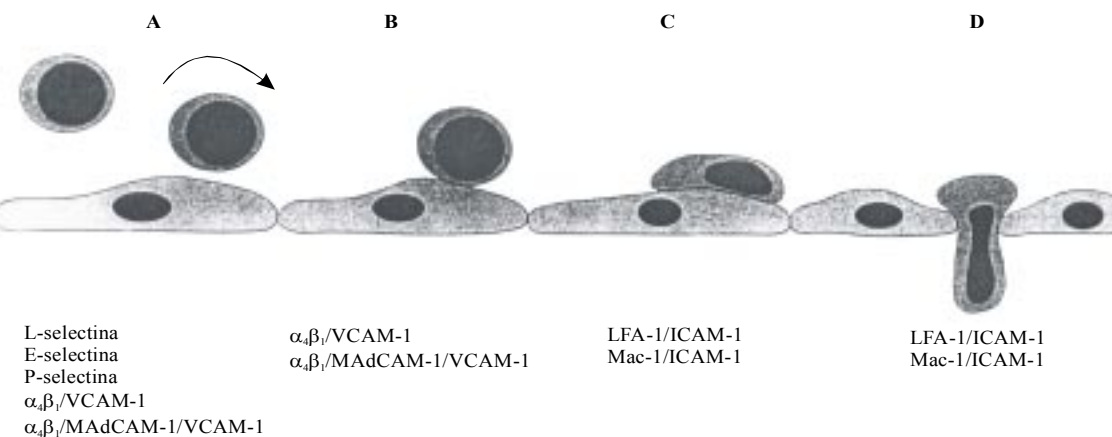
Asentamiento de las células T	Receptores de asentamiento de los linfocitos T	Ligando endotelial
Asentamiento de las células T vírgenes a los órganos linfoides periféricos	L-selectina	GlyCAM-1 CD34 MadCAM-1
Asentamiento de las células T de memoria y efectoras a los sitios de inflamación (general)	LFA-1 VLA-4 CD44	ICAM-1, ICAM-2 VCAM-1 Hialuronato
Asentamiento de las células T a las mucosas de los tejidos (placas de Peyer)	Integrina $\alpha_4\beta_7$ CD44	MadCAM-1 Hialuronato
Asentamiento de células T de memoria a la piel inflamada	CLA-1	E-selectina

can los efectos deseados (eliminación del antígeno) o no (destrucción histica).

**Reacción vascular.** Las células T de memoria reconocen su antígeno específico en un sitio alejado (periferia) del lugar de la presentación antigénica inicial, lo cual provoca una alteración de las células endoteliales microvasculares locales. Se inicia el contacto celular entre las células endoteliales y los linfocitos T activados (interacción entre el CD<sub>40</sub> en las células endoteliales y el CD<sub>40L</sub> en los linfocitos), los cuales liberan citocinas como el factor de necrosis tumoral que provoca la liberación de sustancias vasodilatadoras endoteliales, el interferón  $\gamma$  que induce la liberación de óxido nítrico y prostaciclina, factores liberadores de histamina y quimiocinas derivadas de las células T que actúan sobre los mastocitos y provocan la liberación de histamina. Todo esto induce la activación del endotelio y vasodilatación con incremento del flujo sanguíneo local con optimización de la llegada de leucocitos al sitio de inflamación e incremento del tiempo de permanencia o residencia de los leucocitos en la superficie vascular.

**Reacción celular.** La vasodilatación favorece la adhesión inicial y el rodamiento en una fase temprana de los leucocitos sobre el endotelio vascular: inicialmente los neutrófilos y después los linfocitos y monocitos. Entre la primera o segunda horas de activación endotelial por citocinas se expresa la E-selectina, mediante la cual se unen los neutrófilos y las células T CD<sub>4</sub> Th1 (del inglés, *T helper 1*) al endotelio; también se induce la P-selectina y ocurre la interacción P-selectina/PSGL-1; a las 6 a 12 horas se expresa el VCAM-1 que permite las interacciones VLA-4/VCAM-1 y LPAM-1 ( $\alpha_4\beta_7$ )/(VCAM-1) mediante las cuales se unen los linfocitos y las células T de memoria. Los neutrófilos utilizan la vía L-selectina/CD34 y L-selectina/MadCAM-1 (figura 5.26).

Esta fase de rodamiento va seguida de la firme adhesión y trans migración leucocitaria, la cual es desencadenada por la acción de los mediadores solubles o quimiocinas como el MIP $\beta_1$  (proteína inflamatoria del macrófago  $\beta_1$ ), que provocan cambios conformacionales en los receptores de adhesión, y la interacción del receptor CD<sub>31</sub> o PECAM-1 (molécula de cito adhesión



#### Leyenda

A: rodamiento; B: captura; C: firme adhesión; D: trans migración mediada por las moléculas de adhesión.

VCAM-1: molécula de adhesión vascular-1; MAdCAM-1: molécula de adhesión celular adresina mucosal; LFA-1: antígeno asociado a la función leucocitaria-1; ICAM-1: molécula de adhesión intercelular-1; VLA-4, antígeno de activación tardía-4.

(Modificado por C. Macías. Tomado de: Springer TA. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. Annu Rev. Physiol. 1995;57:827-72.)

**Figura 5.26** Migración leucocitaria transendotelial del espacio vascular a los tejidos extravasculares.

endotelial que está localizada en las uniones intercelulares) que facilita la trans migración al enviar señales a los leucocitos. Las quimiocinas como la interleucina 8 y la proteína quimiotáctica del macrófago (MCP-1) se van a unir a los glicosaminoglicanos-heparán-sulfato de la superficie de las células endoteliales, a las moléculas de adhesión CD<sub>44</sub> y al *syndecan* y van a favorecer la óptima presentación de los leucocitos unidos a las células endoteliales y a promover la extravasación. Las citocinas o las señales producto del contacto intercelular de las células endoteliales con las células T activadas provocan cambios en la forma de las células endoteliales y remodelación de la membrana basal que favorece el escape de macromoléculas. Durante 24 horas, las células endoteliales organizan sus moléculas de adhesión y se concentran en los sitios de unión intercelular endotelial. La deposición de fibrinógeno y fibrina (macromoléculas extravasadas del plasma) en los tejidos forman un sostén o armazón (matriz) que facilita la migración leucocitaria y la subsecuente retención de los leucocitos en los tejidos extravasculares por gradientes quimiotácticos hísticos. La interacción de las moléculas de adhesión y las quimiocinas han permitido establecer el modelo de multietapas de reclutamiento leucocitario en la respuesta inflamatoria. Las quimiocinas son sintetizadas por los leucocitos hísticos activados y las células endoteliales activadas. Los leucocitos activados por quimiocinas reordenan su cito esqueleto, pasan de su forma esférica a achatada y aumentan su afinidad de interacción con el endotelio y su motilidad. La captura y la firme adhesión de los leucocitos al endotelio y su trans migración del espacio vascular al extravascular están mediadas por las interacciones LFA-1/ICAM-1 y VLA-4/VCAM-1. Este proceso de trans migración puede ser secuencial, primero los monocitos y después las células T de memoria. La vía de interacción utilizada es discutida por diferentes autores en cuanto a si depende del tipo celular o de la naturaleza del estímulo. Se conoce que el monocito utiliza la molécula CD18 y que cuando la interleucina-1 y el TNF provocan la estimulación endotelial, la trans migración ocurre a través de la vía VLA-4/VCAM-1. También la activación endotelial por la vía de CD31 provoca la inducción de la integrina

VLA-4 y su interacción con VCAM-1. En pocos días, los neutrófilos abandonan los tejidos por la vía linfática y posteriormente los linfocitos T y monocitos activados.

## **INMUNODEFICIENCIAS POR DÉFICIT DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN**

### **INMUNODEFICIENCIA LAD 1**

La inmunodeficiencia LAD 1 se caracteriza, desde el punto de vista molecular, por un defecto en el gen que codifica a la molécula CD18, que puede ser la ausencia, delección o mutación de este. Existe una síntesis defectuosa o no hay síntesis de esta molécula, no se expresan las  $\beta_2$  integrinas leucocitarias, y existe una alteración total de la respuesta inmune y ausencia del reclutamiento leucocitario durante la respuesta inflamatoria.

### **INMUNODEFICIENCIA LAD 2**

La inmunodeficiencia LAD 2 se caracteriza por una deficiencia de las estructuras glicano-fucosiladas y por el déficit de la sustancia H y el epítipo sialil Lewis X, ligando de la P y E-selectina, por lo que los leucocitos no se unen a ellas, y se afecta el rodamiento y la migración trans endotelial marcadamente, disminuye así la infiltración leucocitaria y la respuesta inflamatoria a infecciones.

## **ENFERMEDADES ASOCIADAS CON ALTERACIONES DE LAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN**

Las enfermedades que cursan con inflamación aguda y crónica, infecciosas o no, se encuentran asociadas con alteraciones de las moléculas de adhesión, como son: las enfermedades autoinmunes, los trasplantes de órganos y tejidos y sus complicaciones más frecuentes como las infecciones, el rechazo al alotrasplante, la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD) en el trasplante de médula ósea, las

enfermedades hematológicas con alteraciones de la hemostasia y de la hemopoyesis, así como todas las afecciones malignas en que la expresión de estas moléculas está vinculada con el desarrollo del tumor y su diseminación o metástasis.

## POTENCIAL TERAPÉUTICO

Resulta alentador el estudio de las moléculas de adhesión, pues estas presentan grandes dominios extracelulares y son estrechamente reguladas por las citocinas inflamatorias, lo cual facilita su efectividad como moléculas blanco en la terapéutica antiinflamatoria y el control de algunas afecciones.

Se han empleado múltiples formas terapéuticas experimentales durante el período 1988-1992, para tratar de inducir un déficit de las moléculas  $\beta_2$  integrinas leucocitarias y disminuir las respuestas inflamatorias exacerbadas y dañinas al organismo, como ocurre en las enfermedades autoinmunes y en otras. En un inicio se utilizaron AcMo anti-ICAM-1, anti CD18 ( $\beta_2$  integrina) y antisubunidad  $\alpha_4$  de la molécula VLA-4 y también AcMo antiintegrinas  $\beta_1$  asociados a drogas antitumorales y antiinvasivas en el tratamiento de tumores sólidos para inhibir su desarrollo y metástasis. Por su acción moduladora, se han empleado otros productos en la expresión de estas moléculas, entre ellos, los retinoides, que disminuyen la expresión basal de ICAM-1 y estimulan la producción de interferón  $\gamma$ , por lo que tienen un efecto antiinflamatorio; y el óxido nítrico, como modulador antiinflamatorio y antiadhesivo.

En la actualidad se utilizan con mejores resultados, el tratamiento oral de sustancias no peptídicas de bajo peso molecular que bloquean o inhiben específicamente la unión de la  $GP_{IIb/IIIa}$  plaquetaria al fibrinógeno y las interacciones LFA-1/ICAM-1, VLA-4/VCAM-1 y PECAM-1/PECAM-1, así como el bloqueo del receptor para la vitronectina  $\alpha_5\beta_3$ , como una nueva terapia contra la angiogénesis en los tumores sólidos. La interacción VLA-4/fibronectina y VLA-4/VCAM-1 promete ser un buen blanco terapéutico en el asma y el AcMo anti- $\alpha_4\beta_7$  en el tratamiento de las enfermedades del intestino como la colitis ulcerativa y la enfermedad de Crohn. Un AcMo anti  $gp_{IIb/IIIa}$  plaquetaria se ha usado con resultados satisfactorios para

prevenir restenosis después de la angioplastia y un gran número de potentes péptidos de bajo peso molecular y antagonistas no peptídicos se encuentran en desarrollo. Muchas moléculas para intervenciones terapéuticas, entre ellas: la P-selectina y E-selectina, otras integrinas como LFA-1, Mac-1, VLA-4,  $\alpha_4\beta_7$ , la L-selectina, la CD44 y otras mayormente implicadas en los mecanismos inmunes y de la respuesta inflamatoria, se han seleccionado para estos fines y con perspectivas alentadoras.

## BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- Becker DJ, Lowe JB. Leukocyte adhesion deficiency type II. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1455(2-3):193-204.
- Bevilacqua MP. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annu Rev Immunol* 1993; 11:767-804.
- Buckley CD, & Simmons DL. Cell adhesion: a new target for therapy. *Mol Med Today* 1997; 449-56.
- Diamond MS, Springer TA. The dynamic regulation of integrin adhesiveness. *Curr Biol* 1994;6:506-17.
- Divya Jyothi M, Varalakshmi C, Khar A. Regulation of effector cell functions through the ligation of lymphocyte function-associated antigen-1 and intracellular adhesion molecule-1 leads to spontaneous regression of a rat histiocytoma. 1999; 50(4):378-86.
- Ebnet K, Kaldjian EP, Anderson AO Shaw S. Orchestrated information transfer underlying leukocyte endothelial interactions *Annu Rev Immunol* 1996;14:155-7.
- Hogg N, Berlin C. Structure and function of adhesion receptors in leukocyte trafficking. *Immunol Today* 1995; 16:327-9.
- Martinez CM, Hernández R. Chemokines, a new family of cytokines in inflammatory cell recruitment. 1999; 51(4):255-68.
- Meneghetti A, Mariani E, Santi S, Riccio M, Cattini L, Paoletti S, Facchini A. NK binding capacity and lytic activity depend on the expression of ICAM-1 on target bone tumours. 1999; 15(5):909-14.
- Nakada MT, Amin K, Christofidou-Solomidou M. Antibodies against the first Ig-like domain of human platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) that inhibit PECAM-1-dependent homophilic adhesion block in vivo neutrophil recruitment. *J Immunol* 2000; 164(1): 452-62.
- Shibagaki N, Hanada KI, Yamashita H, Shimada S, Hamada H. Overexpression of CD82 on human T cells enhances LFA-1/ICAM-1-mediated cell-cell adhesion: functional association between CD82 and LFA-1 in T cell activation. 1999; 29(12):4081-91.
- Springer TA. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol* 1995;57:827-72.

## CONTENIDO

---

### **Introducción/ 519**

### **Pruebas *in vivo*/ 520**

- Reacción de hipersensibilidad retardada a antígenos en pruebas cutáneas/ 520
- Sensibilización al dinitroclorobenceno/ 521

### **Pruebas *in vitro* y preparación de suspensiones de linfocitos y células accesorias de la respuesta inmune/ 521**

- Órganos linfoides primarios/ 521
- Órganos linfoides secundarios/ 521
- Líneas celulares linfoides/ 522
- Suspensiones celulares obtenidas a partir de órganos sólidos/ 522
- Células accesorias/ 522
- Condiciones para la manipulación celular/ 522
- Células obtenidas de algunos líquidos corporales/ 523

### **Métodos de laboratorio para la identificación de las poblaciones leucocitarias/ 524**

- Métodos de rosetas/ 524
- Determinación de inmunoglobulinas de superficie por inmunofluorescencia indirecta/ 524
- Anticuerpos monoclonales contra antígenos de diferenciación celular/ 525
- Métodos de laboratorio para el inmunofenotipaje celular/ 527

### **Métodos que evalúan la capacidad funcional de las células inmunocompetentes/ 528**

- Transformación linfoblástica por criterio de incorporación de timidina tritiada/ 528
- Evaluación de la citotoxicidad natural por criterio de liberación de  $^{51}\text{Cr}$ / 528
- Evaluación de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos por criterio de liberación de  $^{51}\text{Cr}$ / 529

### **Bibliografía recomendada/ 529**

### Capítulo 44



## MÉTODOS DE LABORATORIO PARA EL ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR

Lic. René Antonio Rivero Jiménez  
Dra. Miriam de la Caridad Sánchez Segura

### RESUMEN

Las células del sistema inmunológico se dividen en células protagonistas de la respuesta inmune celular, células ambientadoras de las anteriores, células accesorias y células efectoras de la reacción inmunológica. Las linfoides son las protagonistas de la respuesta inmune. Las pruebas para el estudio de la respuesta inmune celular pueden ser *in vivo* o *in vitro*, además de los métodos para el estudio de las subpoblaciones linfocitarias. En este capítulo se dedica especial interés a los métodos para el fenotipaje celular (inmunofluorescencia, citometría de flujo y ensayos inmunoenzimáticos), así como a los que evalúan la capacidad funcional de las células inmunocompetentes.

### INTRODUCCIÓN

El conjunto de células, de diverso origen y naturaleza, que participa activamente en las respuestas y reacciones inmunológicas, constituye el sistema inmunológico. Casi todos los elementos de este sistema son células de origen mesodérmico, aunque existen también células de origen endodérmico. En cuanto a su función inmune, se pueden dividir en células protagonistas de la respuesta inmune, células ambientadoras de las anteriores, células accesorias y células efectoras de la reacción inmunológica.

Las células protagonistas de la respuesta inmune son las células linfoides. No tienen un desarrollo normal, ni diferenciación, ni maduración, sin el ambiente que les prestan otras células: las ambientadoras, que constituyen el componente epitelial del timo y de la bolsa de Fabricio (en las aves) y de los órganos linfoides periféricos. Las células accesorias de la respuesta inmunológica son aquellas que realizan una de las funciones siguientes o ambas: presentación del antígeno de forma adecuada a las células linfoides capaces de reconocerlo, y secreción de factores que, junto con el

reconocimiento del antígeno, son necesarios para la iniciación de la actividad de las células protagonistas de la respuesta inmune. Hay un tercer grupo de células que, independientemente de su eventual participación en la respuesta inmunológica, son elementos importantes en los mecanismos efectoras, es decir, en la mediación de los efectos protectores o lesivos que se producen como un resultado del contacto con el antígeno. Además de los monocitos, macrófagos e histiocitos, se incluyen también los leucocitos polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y los mastocitos, las células T citotóxicas, y las células NK (*natural killer* o asesinas naturales).

El sistema inmunológico está organizado funcionalmente en tres compartimentos: de origen, de diferenciación y de respuesta.

El de sistema inmunológico de origen, en el que se forman los primeros elementos precursores (*stem cells*) de las células linfoides, según la edad, se encuentra en el saco vitelino, en el hígado fetal o en la médula ósea, que es el principal asiento del compartimento de origen de las células linfoides durante la mayor parte de la vida de un individuo. Las células precursoras originadas

en la médula ósea pueden seguir una de las dos vías principales de diferenciación, de manera que una parte de ellas viaja hasta el timo, donde comienza, bajo la influencia del microambiente creado por el componente epitelial de este órgano, una serie de procesos de división celular muy activa, que madura en linfocitos T o las células T. Otra parte de las células precursoras madurarán de una forma distinta, para convertirse en linfocitos B o células B.

La maduración de las células B se hace en los mamíferos, incluido el hombre, en la propia médula ósea, por lo que, al igual que el timo para las células T, la médula ósea para las células B es el compartimento de maduración (expansión y diferenciación) para esta población linfocitaria. Las células que han alcanzado un grado suficiente de maduración en la médula ósea, la abandonan para ir a poblar, junto con las células T procedentes del timo, los órganos linfoides periféricos, que constituyen el compartimento de respuesta. Son órganos linfoides periféricos: la médula ósea, los ganglios linfáticos, el bazo, las amígdalas y demás formaciones linfoides nasofaríngeas que constituyen el anillo linfático de Waldeyer, las placas de Peyer del íleon y las restantes formaciones linfoides del intestino, así como los demás cúmulos o infiltrados linfoides organizados que se encuentran en condiciones normales o patológicas en los más diversos órganos y tejidos. En todos hay linfocitos T y B, además de células accesorias. Estos linfocitos no constituyen elementos fijos y permanentes, sino que se encuentran en una situación dinámica de recambio y movilidad, que es variable de unas células a otras, y de unos tejidos a otros, y que aumentan su eficacia funcional. La recirculación linfático-sanguínea de los linfocitos hace posible el reconocimiento de antígenos presentes en diversas partes del organismo y facilita las interacciones celulares que modulan la respuesta inmune. La larga duración de la vida de determinadas poblaciones linfocitarias, especialmente de los linfocitos T, está muy relacionada con el fenómeno de la memoria inmunológica.

La imagen morfológica más frecuente y característica del linfocito, el linfocito pequeño, de unos 7 u 8 micrómetros de diámetro, constituido casi enteramente por material nuclear con solo un delgado ribete citoplasmático, es la que corresponde a la situación funcional de reposo, previa a la estimulación por el antígeno o recobrada algún tiempo después de que esta haya tenido lugar. Esta imagen de microscopía óptica no permite identificar un linfocito como T o B, ni reconocer sus capacidades funcionales (célula competente, célula de memoria, efectora, reguladora, etc.). La célula estimulada por el antígeno y eventualmente

preparada para la división, adopta la forma de linfoblasto: aumenta el tamaño del núcleo y aún más el del citoplasma, de manera que la relación núcleo-citoplasma disminuye, la cromatina nuclear se hace menos densa, y uno o varios nucléolos se hacen prominentes, lo mismo que algunos orgánulos citoplasmáticos. Además, se estimulan diversas actividades metabólicas y, de forma ostensible, se estimula la síntesis del ADN nuclear.

## PRUEBAS *IN VIVO*

### REACCIÓN DE HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA A ANTÍGENOS EN PRUEBAS CUTÁNEAS

La observación visual de la respuesta cutánea a la inyección intradérmica de determinados antígenos que inducen memoria inmunológica, se ha convertido en un procedimiento que posee extraordinario valor para evaluar la integridad de la respuesta inmunológica de tipo celular. El ejemplo clásico es la introducción de una cantidad mínima de PPD, un preparado a partir de proteínas derivadas de la pared bacteriana de micobacterias, que provoca inicialmente algún cambio cutáneo; pero en realidad lo que se evalúa es el cambio que comienza a ocurrir con el transcurso del tiempo, es decir, después de las 24 a 48 horas de aplicado el antígeno. Este cambio depende del proceso de hipersensibilidad retardada, que implica una infiltración de linfocitos y fagocitos mononucleares en los tejidos subepiteliales, además de la participación de los mediadores solubles de la inmunidad. Esta lesión alcanza la intensidad máxima en el plazo de 24 a 48 horas, y puede prolongarse varios días. El desarrollo de la induración es lo único importante para interpretar la prueba, y no se debe tomar en cuenta el eritema. Se debe medir, en milímetros, el área completa de la induración, para lo que se utiliza una pequeña regla o escala, y se mide generalmente en dos direcciones, perpendiculares entre sí, de manera que al final el diámetro de la induración es un promedio de dos mediciones sobre la piel.

Esta prueba puede tener dos aplicaciones. La primera (clásica) es su aplicación, en el pasado, para el diagnóstico de determinadas enfermedades como la tuberculosis, la lepra y otras, o para definir si un individuo había adquirido determinado grado de inmunidad contra esta enfermedad; pero en épocas más recientes, las reacciones cutáneas de hipersensibilidad retardada se han usado para investigar la inmunocompetencia de un individuo. Los antígenos que se utilizan con más

frecuencia incluyen la tuberculina o PPD, la histoplasmina, coccidioidina, antígeno de la *Candida albicans* o candidina, la estreptoquinasa-estreptodornasa, los antígenos de *Proteus vulgaris*, tricofton, tétanos y otros. Los individuos normales responden, por lo general, a más de un antígeno; las personas que presentan respuesta negativa a todos los antígenos se denominan anérgicas, y las que responden contra alguno en particular, pero no con fuerza, se dice que son hipoérgicas. La anergia puede ser transitoria y su presencia puede estar relacionada con una compleja serie de factores, entre los que se incluyen la disminución de las funciones de los linfocitos T y los macrófagos, la reactividad vascular o una asociación de ambas. Como casi todos los individuos han estado expuestos, en algún momento de sus vidas, a uno o a varios de los antígenos mencionados, lo lógico es que en los individuos normales se suscite una respuesta cutánea positiva.

## SENSIBILIZACIÓN AL DINITROCLOROBENCENO

El dinitroclorobenceno (DNCB) es un producto químico industrial que suele originar sensibilización intensa cuando se aplica en la piel del individuo normal. La pequeña molécula actúa como un hapteno, pues se fija a la proteína normal de la piel y suscita un tipo de hipersensibilidad de contacto retardado, por mediación de las células T. Como el compuesto no se presenta normalmente en la naturaleza, son pocas las personas que ya están sensibilizadas. El DNCB se utiliza en el laboratorio clínico para determinar la capacidad de un paciente de responder a un estímulo que normalmente origina inmunización dependiente de linfocitos T (sensibilidad de contacto). Una pequeña dosis sensibilizadora se aplica en la piel del brazo, junto con una dosis menor de prueba, para descartar cualquier sensibilidad previa. Dos semanas después, se vuelve a aplicar la otra dosis de prueba en otro lugar distinto del brazo. La aplicación sensibilizadora deberá provocar eritema, pero no induración, y la segunda aplicación provocará ambos fenómenos. Un resultado negativo indica que el individuo tiene una función celular T disminuida. La prueba con DNCB se ha usado en otros países para estudiar la inmunidad en pacientes con cáncer o previo a un trasplante. En Cuba no se ha aplicado con frecuencia, por el riesgo de sensibilización, y porque el resultado demora mucho tiempo, ya que hay que esperar al menos dos semanas para completar el estudio.

## PRUEBAS *IN VITRO* Y PREPARACIÓN DE SUSENSIONES DE LINFOCITOS Y CÉLULAS ACCESORIAS DE LA RESPUESTA INMUNE

### ÓRGANOS LINFOIDES PRIMARIOS

En los adultos, la médula ósea y el timo son los principales sitios de generación de nuevos linfocitos. Estos órganos contienen células inmaduras y células maduras. La fracción de células maduras es menor (entre el 5 y el 10 %). Las células inmaduras tienen dos destinos: madurar o morir. Las células grandes, en estadios de división celular (blastos), se pueden encontrar entre estas células inmaduras, pero entre ellas predominan las células pequeñas. Ninguno de estos dos órganos se encuentra en la vía principal de recirculación de los linfocitos de la sangre periférica, por lo que las células maduras no reingresan en un número significativo en este tipo de órganos. No obstante, la médula contiene algunos linfocitos maduros inmunocompetentes que han estado en la periferia y han regresado. Por otra parte, la presencia de células B contaminantes en el timo se podría deber, parcialmente, a la inclusión accidental de ganglios linfáticos paratímicos, que se encuentran adyacentes a este órgano, por lo que se debe aclarar que si el objetivo es obtener linfocitos T y B maduros, lo mejor es buscarlos en los órganos linfoides secundarios o periféricos, donde abundan y se pueden separar las poblaciones T de las B. Sin embargo, si se quiere estudiar el proceso de maduración celular, los órganos linfoides primarios son los sitios de elección para la toma de muestras. Las muestras de médula ósea de esternón y fosa ilíaca son representativas de todo el sistema, y se obtienen por punción con trocar. En los adolescentes, cuando los órganos linfoides primarios están al máximo de su celularidad, la médula ósea contiene hasta del 30 al 50 % de linfocitos.

### ÓRGANOS LINFOIDES SECUNDARIOS

El bazo, los ganglios linfáticos, las placas de Peyer, las amígdalas y el anillo linfático de Waldeyer, junto a otros tejidos linfoides asociados a las mucosas, son los principales órganos linfoides secundarios en los que se localizan los linfocitos inmunocompetentes. Ellos están fisiológicamente interconectados por la migración de la mayoría de los linfocitos pequeños (recirculación linfocitaria). En animales como el ratón, cada linfocito recirculante pasa por el conducto linfático-torácico cada 24 a 48 horas. Los linfoblastos usualmente no recirculan, solo lo hacen una vez que se han diferenciado como



linfocitos pequeños. Los rendimientos en celularidad de estos tejidos varían de manera considerable, y dependen de los niveles de sensibilización antigénica. En los animales libres de patógenos, estos órganos son muy pequeños. La relación linfocito T/B es muy variable y característica de cada órgano. Los ganglios linfáticos contienen la mayor proporción de linfocitos T (entre el 55 y el 80 %, comparable con los niveles de linfocitos en el conducto torácico); en el bazo es intermedio (40 % de linfocitos T) y en las placas de Peyer es donde se encuentra la menor densidad (30 %).

## LÍNEAS CELULARES LINFOIDES

Las líneas celulares linfoides tienen como ventaja general que son reproducibles en condiciones de cultivo y sus células se pueden incrementar por multiplicación, lo cual es muy útil para el estudio de células de origen humano. Sin embargo, en la práctica se deben tomar medidas de aseguramiento de la calidad para monitorear la posible aparición de variantes no deseadas, provocadas por mutaciones o contaminación. En muchos casos, si se quiere estudiar el fenotipo con una batería de anticuerpos monoclonales (AcM), se pueden establecer comparaciones entre la expresión de una línea celular y las células de leucemias o linfomas que le dieron origen, aunque no siempre coincide la expresión de la línea celular con el fenotipo del tumor de origen.

## SUSPENSIONES CELULARES OBTENIDAS A PARTIR DE ÓRGANOS SÓLIDOS

La mayoría de los tejidos linfoides se pueden disociar con relativa facilidad, debido a que las células no están fuertemente atadas unas a las otras o por cantidades sustanciales de tejido conectivo. El simple macerado o corte de un órgano linfoide libera grandes cantidades de linfocitos con gran viabilidad, pero hay que tener presente que algunas poblaciones podrían, selectivamente, resistirse a estos procedimientos de aislamiento y, aunque no sean importantes en número, quizá sí lo sean por su función. También hay tejidos celulares que pueden ser más frágiles y morir con mayor facilidad ante los traumas mecánicos, por ejemplo, los linfoblastos sobreviven menos que los linfocitos pequeños. Los órganos linfoides no son simples bolsas de linfocitos en espera de que se las pinche para liberarlos, ellos tienen: cápsula, células del estroma y células endoteliales de diferentes tipos, entre ellas: las células columnares de las vénulas de endotelio cuboide alto, en la paracorteza de los ganglios linfáticos, y las células

accesorias. El bazo también contiene la pulpa roja, que actúa como un gran reservorio de todas las células sanguíneas, y es un sitio de formación de anticuerpos por las células plasmáticas y en el que los macrófagos atrapan a los antígenos. Las poblaciones de esplenocitos contienen, por tanto, hematíes, leucocitos de todo tipo y linfocitos. La obtención de células de los órganos linfoides se convierte entonces en un balance entre simplicidad y rapidez, así como entre viabilidad celular y recuperación total. La principal decisión que hay que tomar radica en el uso o no de enzimas. Es más rápido sin enzimas y las células no tienen que elevarse hasta una temperatura de 37 °C, por lo que se pueden usar medios simples, y así evitar que las enzimas destruyan a las moléculas de la superficie celular. Sin embargo, hay órganos que ofrecen los más altos rendimientos de linfocitos después de 20 a 60 minutos de tratamiento con collagenasa o collagenasa positiva (+), una proteasa neutra como la tripsina. Las enzimas son esenciales para la liberación de las células dendríticas, ya que son células muy frágiles para someterse a la desagregación mecánica.

La ruptura puramente mecánica se puede realizar con varios grados de vigor. La perfusión y el corte del órgano en varios fragmentos, seguidos por su aplastamiento con pinzas de punta fina, es un método bastante “gentil”, pero requiere paciencia y casi siempre se pierden células en los residuos. La maceración del órgano a través de mallas de acero inoxidable o plásticas, o la homogenización con instrumentos de vidrio por fricción, permiten obtener mayor cantidad de células, pero en detrimento de la viabilidad.

## CÉLULAS ACCESORIAS

La necesidad de células no linfoides para colaborar con los linfocitos en la respuesta inmunológica es un hecho observado *in vitro* desde hace más de 20 años. Desde entonces se han utilizado varios métodos para obtener su enriquecimiento en las suspensiones celulares, tales como la adherencia, los gradientes de densidad, la radio-resistencia, y los marcadores de superficie como receptores Fc y los antígenos clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC).

## CONDICIONES PARA LA MANIPULACIÓN CELULAR

Por lo general se asume que lo que es bueno para las células *in vivo*, debe ser bueno para las células *in vitro*, pero los sistemas amortiguadores corporales,

principalmente basados en el bicarbonato, y las complejidades de los nutrientes son difíciles de imitar *in vitro*. Los linfocitos pequeños son relativamente inactivos desde el punto de vista metabólico, en especial a temperaturas de 4 °C o menos, por lo que ellos pueden sobrevivir a los tratamientos durante 24 horas en medios simples amortiguados con fosfatos, y mantener su funcionalidad intacta o con pequeños cambios reversibles. Los grandes linfocitos más activos requieren mejores condiciones. Para manipulaciones que duren pocas horas, las suspensiones de linfocitos de sangre periférica en soluciones salinas balanceadas o amortiguadas toleran muy bien la temperatura ambiente del laboratorio (entre 20 y 25 °C), pero para procedimientos más largos, lo más conveniente es mantener las células a temperaturas de 4 °C. Tanto las células de la médula ósea como las del timo pierden viabilidad si no se colocan en un baño de agua helada, pero lo más importante es reconocer que lo que más afecta a las células es el cambio brusco de temperaturas. Por eso se recomienda que en los procesos que impliquen la centrifugación donde se incrementa la temperatura, se utilicen las centrífugas refrigeradas, a no ser que sea un proceso de centrifugación muy simple. Cuando se requiere el cultivo o la incubación de células a 37 °C, los medios se deben suplementar con soluciones amortiguadoras apropiadas, tales como el bicarbonato de sodio o el HEPES; con frecuencia se usa el medio RPMI-1640 con 5 % de suero de bovinos recién nacidos.

El pH normal de la sangre es 7,4. El medio para la manipulación de las células puede amortiguarse con fosfatos, de manera que no se produzcan cambios fuertes de pH por las condiciones a las que están expuestas. Sin embargo, para cultivos, el alto nivel de fosfatos no es bien tolerado y por eso se recomienda el uso de bicarbonato de sodio más HEPES. La tonicidad del suero es muy variable y depende de la especie. Su equivalencia de cloruro de sodio en mmol/L es de 147 para el suero humano o de monos, equivalente a la solución salina fisiológica; 153 para el suero de rata; 118 para el de ratón y el de pollo y 170 para el de fetos bovinos. Por ello, la formulación de un medio simple que sea universal para todas las especies no es posible, aunque no hay suficientes elementos para saber si esto afecta o no a los linfocitos de cada especie, y el único caso donde puede ocurrir una afectación es en la centrifugación isopícnica, ya que las pequeñas variaciones en la tonicidad tienen un efecto sustancial en la densidad celular y, por ende, en el rendimiento. Como se ha informado previamente, la selección de cuán rico debe

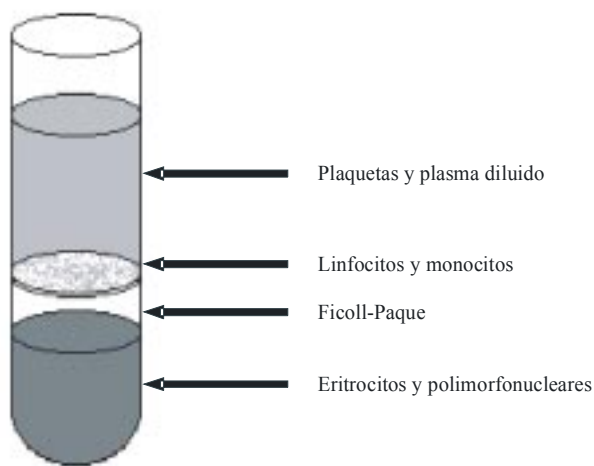
ser el medio depende de la temperatura y del tipo de células. Los medios más simples contienen sales inorgánicas, por ejemplo, la solución salina amortiguada con fosfatos (siglas en inglés: PBS), a la que se le añade  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , según Dulbecco. La mayoría de los autores consideran esencial añadir una fuente de proteínas (5 % de suero de bovinos recién nacidos o 0,2 % de seroalbúmina bovina) para reducir los enlaces no específicos de las células a la superficie de los frascos o tubos de ensayo. Cuando se requiere que cese el metabolismo celular, por ejemplo, para prevenir el encapamiento (*capping*) y la liberación (*shedding*) de los complejos antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) en la superficie celular durante las técnicas de marcaje de células con Ac), se recomienda trabajar en presencia de azida sódica (de 3 a 10 mM) a 4 °C, pero esta usualmente no se adiciona en trabajos a temperatura ambiente o a 37 °C. Nosotros recomendamos para trabajos con células, el PBS, según Dulbecco con  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , con 0,2 % de seroalbúmina bovina y 3 mM de azida sódica, en técnicas de identificación por inmunofluorescencia indirecta (IFI).

Todas las células son susceptibles a los cambios de fuerzas físicas, por lo que los procesos de resuspensión de botones celulares, por succión con pipetas de Pasteur, se deben ejecutar con “gentileza”, sin introducir burbujas de aire, pues estas atrapan células y las dejan expuestas a condiciones desfavorables. Para obtener células linfoides por centrifugación, se deben ejercer fuerzas de 300 g, entre 7 y 10 minutos; pero para obtener células de medios más densos (por ejemplo, de gradientes de densidad en Ficoll), será necesaria una aceleración mayor. Las gravedades (g) elevadas no dañan a las células intrínsecamente, ya que ellas sobreviven después de someterse a varios miles de g en gradientes de densidad autoformables, siempre que se mantengan en suspensión. Solo si llegan a formar un botón celular y se comprimen contra el fondo del tubo, es que se produce su daño.

## CÉLULAS OBTENIDAS DE ALGUNOS LÍQUIDOS CORPORALES

La sangre periférica es la fuente de más fácil acceso para obtener células linfoides y accesorias. La sangre humana contiene entre 5 y 10 millones de leucocitos por mililitro y 1 000 más de eritrocitos. Cerca del 30 % de los leucocitos son linfocitos y entre el 1 y el 3 % son monocitos, a este conjunto se le llama células mononucleares de sangre periférica. El método de elección para su aislamiento es el recomendado por Boyüm,

mediante centrifugación sobre un gradiente de Ficoll-Paque, densidad 1,077 g/mL. Básicamente, en este método la sangre diluida a partes iguales (con PBS, Hanks, medio RPMI, etc.) se coloca con suavidad sobre una mezcla de Ficoll-Paque, de forma tal que no se mezclen ambas soluciones. Después de una centrifugación a 1 000 g durante 20 minutos, se obtiene un gradiente donde, en la parte inferior del tubo, se encuentran las células más densas: hematíes y leucocitos polimorfonucleares. Más hacia arriba se observa la solución de Ficoll-Paque, y en el límite entre esta y el plasma diluido (donde se encuentran las plaquetas) está un anillo blanco formado por las células mononucleares (linfocitos y monocitos), el cual puede aspirarse y pasarse a otro tubo, donde las células se someten a varios lavados, uno de los cuales puede realizarse a baja velocidad, con el fin de minimizar la contaminación con plaquetas (figura 5.27).



**Figura 5.27** Separación celular después de la centrifugación sobre gradiente de Ficoll-Paque.

## MÉTODOS DE LABORATORIO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LAS POBLACIONES LEUCOCITARIAS

### MÉTODOS DE ROSETAS

En la especie humana, los linfocitos T tienen en su superficie receptores para eritrocitos ovinos (de carnero), que se corresponden con la molécula CD2, antes conocida como antígeno T11. Estos receptores pueden ser identificados por la formación de rosetas cuando se incuban *in vitro*, en condiciones adecuadas, una suspensión mixta de linfocitos humanos y eritrocitos ovinos. Se llama roseta

por la apariencia de los linfocitos T rodeados por eritrocitos, que dan la impresión de una flor, cuando se observan al microscopio en cámara de Neubauer. Se cuenta un mínimo de 200 linfocitos y de ellos, se determina el porcentaje que forman rosetas, por tener 3 o más eritrocitos de carnero unidos a su superficie. Se llama roseta espontánea (RE) a aquellas que se forman con una relación de eritrocitos a linfocitos de 40:1 y cuyo tiempo de incubación es de 18 horas; se llama roseta activa (RA) cuando la relación eritrocito-linfocito es de 8:1 y un tiempo de incubación de 5 minutos. Los valores de referencia en Cuba son RE: de 64 a 85 % y RA: de 35 a 47 %. La interpretación de los resultados: valores mayores se consideran un incremento de los linfocitos T, lo cual puede ocurrir durante un proceso infeccioso; valores inferiores se consideran un detrimento en la cifra de linfocitos T, lo cual ocurre en los estados de inmunodeficiencia celular. Si se evalúa la formación de RE, se están cuantificando los linfocitos T periféricos totales. Si se evalúa la formación de RA, se están cuantificando los linfocitos T funcionalmente activos en periferia. Fuentes de error: restos biológicos en la cristalería usada; ajuste inadecuado del pH, de la temperatura y del tiempo de incubación; inadecuada homogenización de la muestra. Roseta con eritrocitos sensibilizados (REA): este proceder se basa en la presencia de receptores Fc en la membrana de los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMN) que son capaces de fijar a la IgG por la porción Fc de esta molécula que recubre a los eritrocitos empleados como antígenos para obtener estos anticuerpos específicos. Se conoce que no todos los PMN expresan el receptor, que aún entre los que lo presentan no hay igual cantidad de receptores y que la presencia de los receptores de este tipo permite a la célula una mayor actividad funcional, por lo que se demuestra la heterogeneidad de esta población celular. Se ha calculado que el 43 % de los PMN forman este tipo de roseta cuando se enfrentan de manera apropiada a los eritrocitos así sensibilizados con anticuerpos específicos. Se evalúa como PMN formador de REA aquel que tiene adherido a su superficie no menos de tres eritrocitos de carnero sensibilizados, en cada caso se cuenta un mínimo de 200 células.

### DETERMINACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS DE SUPERFICIE POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

La identificación de las células B se suele hacer aprovechando la presencia de inmunoglobulinas de superficie (IgS) sintetizadas por la propia célula. Pueden ser demostradas por métodos sencillos, como la inmunofluorescencia

indirecta (IFI), tomando las precauciones adecuadas para no confundir con un linfocito B a una célula que tenga en su superficie inmunoglobulina tomada del exterior, gracias a la presencia de receptores celulares para inmunoglobulinas o complemento, o como resultado de una reacción antígeno-anticuerpo ocurrida sobre la superficie celular.

ANTICUERPOS MONOCLONALES  
CONTRA ANTÍGENOS DE DIFERENCIACIÓN  
CELULAR

Sin dudas, el avance más importante en la distinción de poblaciones y subpoblaciones de linfocitos es el proporcionado por el empleo de anticuerpos monoclonales (AcM) dirigidos contra antígenos, cuya expresión en la superficie celular corresponde a determinados estadios de diferenciación o a fases peculiares de activación de estas células.

El conocimiento del proceso de maduración de los linfocitos B se ha obtenido, en gran parte, gracias al estudio de procesos linfoproliferativos en los que los linfocitos B se han detenido en distintos periodos de desarrollo. Asimismo, ha sido de gran utilidad el empleo de AcM y las técnicas de biología molecular aplicadas al estudio del reordenamiento y expresión de los genes de las inmunoglobulinas.

Los linfocitos T desempeñan una función central en los mecanismos de acción y control de la respuesta inmunológica. Esto ha sido confirmado en varios sistemas, como son: rechazo de trasplantes y tumores, enfermedad de injerto contra huésped, hipersensibilidad retardada y otras. La identificación y posterior caracterización de las moléculas de la membrana, citoplasma y núcleo de los linfocitos T, constituye la primera

etapa para comprender y dilucidar sus mecanismos efectores. En estos estudios, los AcM dirigidos contra estas estructuras se convierten en reactivos de uso imprescindible. Durante los últimos años se ha obtenido un gran número de AcM que reconocen antígenos de los linfocitos B y T. Con estos AcM se han llevado a cabo los estudios de expresión de estos antígenos en los linfocitos, se han identificado distintas poblaciones y subpoblaciones celulares y funcionales, y se han establecido distintas etapas en el proceso de diferenciación intratímica de los linfocitos T. También se han identificado estructuras moleculares que se expresan selectivamente en los linfocitos T después de ser estimulados por antígenos o mitógenos. Se han descubierto varios mecanismos moleculares a través de los cuales los linfocitos T pueden ser activados. Los AcM frente a antígenos de activación han servido para detectar la existencia de poblaciones activadas en determinados procesos patológicos del sistema inmune.

La mayoría de los antígenos de diferenciación descritos mediante su reacción con AcM específicos, recibió una denominación arbitraria por parte de los investigadores de los laboratorios en los que se identificaron por primera vez. Muchos de ellos han tomado el nombre del AcM que los definió. Pero estos antígenos en la superficie de los leucocitos se definen en la actualidad por sus reacciones con grupos de AcM, y los antígenos se denominan según el grupo de AcM de diferenciación (CD: conjunto de diferenciación) que los identifican. Se han realizado varias conferencias internacionales para el tipaje de leucocitos en París (1982), Boston (1984), Oxford (1986), Viena (1989) y Boston (1993), en las que ha surgido la nueva nomenclatura general que engloba, bajo la designación de un CD, a los AcM que reconocen idénticos o distintos epítopes en la misma estructura molecular del antígeno (tabla 5.21).

Tabla 5.21 Principales clústers de diferenciación con importancia clínica

Células de estirpe T		
CD	Clones	Distribución/función celular
1	OKT6, Leu-6	Timocitos
2	OKT11, Leu-5a	Receptor de roseta E
3	OKT3, Leu-4, ior-t3	Asociado a receptor de células T
4	OKT4, Leu-3a, ior-t4	Células T auxiliaoras
5	OK-CLL, Leu-1, T101	Células T, subpoblación de células B
6	B-F3, ior-t1	Timocitos
7	A1, Leu9	Pan-T, receptor Fc (IgM)
8	OKT8, Leu-2a, Leu-2ab, ior-t8	Células T citotóxicas/supresoras

**Tabla 5.21** Continuación

Células de estirpe mieloide		
CD	Clones	Distribución / función celular
11a	B-B15	LFA-1 (antígeno funcional leucocitario p150/90)
11b	B Leu-15, Mol, Mac-1, OKM1, D12	Receptor 3 del complemento, p 165/90
11c	C Leu-M5	p150/95
13	My7, B-F10	Monocito, granulocito, mieloide temprana
14	My4, Vim13, Mo2, Leu-M3	Monocito, macrófagos, células dendríticas reticulares
15	Leu-M1, My1, VimD5	X-hapteno
16	Leu-11 a, b, c	Receptor FcIII (IgG)
17		Ceramida-lactosilo, granulocito, monocito, plaquetas
18	ICAM-1 receptor	LFA-1; cadena beta, leucocito
33	My9	Mieloide temprana
34	My10, HPCA-1	Célula madre
Células de estirpe B		
CD	Clones	Distribución / función celular
9	Ba-2	Asociado a leucemias (no T y no B LLA), antígeno p24
10	J5, BA-3, VIL-A1	Antígeno común leucémico
19	Leu-12, B4, HD37	Células B
20	Leu-16, B1, L27	Células B
21	BE5, B-D6	B-receptor complemento 2 (CR2) Receptor VEB
22	Leu-14, HD6, TO15	Células B
23	B 532	Células B activadas, RFcII IgE de baja afinidad, receptor IL-4
24	BA1	Células B, granulocitos
Marcadores misceláneos		
CD	Clones	Distribución / función celular
25	Tac, B1.49.9, 2A3	TAC, receptor IL-2 cadena $\beta$ gp55, macrófagos-cel T-cel B activadas
w26	Ta-1	Activación de células T
w29	4B4	Células T auxiliaadoras/inductoras
30	Ki-1	Células <i>Reed-Stenberg</i>
31		Glicoproteína plaquetaria IIa, plaquetas, monocitos, macrófagos, células B
w32		Receptor Fc II (IgG): monocitos/granulocitos/células B, eosinófilos
35	44D, C3bR, CR1	Receptor complemento 1 (CR1), granulocitos (basófilos negativos), monocitos, célula B, eritrocitos
38	OKT10, Leu-17	Timocitos, células nulas, célula madre, linfocitos activados
39w41		Glicoproteína plaquetaria complejo IIb/IIIa
39w42		Glicoproteína Ib plaquetaria
44		Pgp-1, ECM III
45	T200	Antígeno común leucocitario (ACL)
45R	Leu-18, 2H4	ACL restringido
54		Molécula adhesión intercelular 1
55		proteína DAF reguladora del complemento
56	NKH1	N-CAM isoforma (molécula de adhesión célula-neurol)
58		LFA-3
71		Receptor de transferrina
73		Ecto-5' nucleotidasa

## MÉTODOS DE LABORATORIO PARA EL INMUNOFENOTIPAJE CELULAR

### Inmunofluorescencia

Las técnicas de laboratorio basadas en el empleo de AcM para la identificación, cuantificación y separación de células linfoides, se basan en el principio de la reacción antígeno-anticuerpo. Las más antiguas usan anticuerpos fluorescentes, es decir, acoplados o conjugados a un colorante fluorescente, que reaccionan con el antígeno. Se utiliza un microscopio fluorescente ultravioleta (UV) para visualizar la reacción. Si el mismo AcM está conjugado, se denomina inmunofluorescencia directa (IFD), pero si en su lugar, el AcM no está conjugado, y se requiere de un segundo Ac, que se conjugue con el colorante fluorescente para poder visualizar la reacción del primer Ac, entonces se llama inmunofluorescencia indirecta (IFI). Este segundo Ac conjugado debe ser específico contra un isotipo particular del AcM (IgG, IgA, IgM). Esta técnica es altamente sensible y específica en manos expertas. Los trabajos recientes para dotarlas de muestras patrones reconocidas internacionalmente han permitido la cuantificación segura de las concentraciones óptimas de Ac que se han de utilizar a través de una titulación de punto final (la dilución en serie más alta para la cual la coloración fluorescente específica aún se mantiene) y a través de la medida de la intensidad visual del colorante fluorescente en comparación con un material patrón de reconocida calidad.

La inmunofluorescencia se realizaba de manera clásica en tubos de ensayo. Posteriormente, se diseñaron micrométodos en que se utilizan placas de 96 pozuelos que permiten el procesamiento de un mayor número de muestras o determinaciones. Al principio, la lectura se hacía en un microscopio UV, pero con el avance tecnológico actual, se llevó a un sistema automatizado para el análisis, la cuantificación y la separación de las células: la citometría de flujo.

### Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica que tiene grandes perspectivas para la separación, clasificación y cuantificación de células sanguíneas y Ac que reaccionan con estas células. Los instrumentos computarizados más complejos se usan para pasar un flujo monocelular de elementos particulados microscópicos a través de una pantalla de rayos láser. Las células se caracterizan, primero, por su tamaño, y luego de un análisis computarizado, se pueden separar las mezclas de elementos celulares según su tipo celular por

su tamaño. Además, se usan AcM específicos contra determinados CD conjugados con fluorocromos, y se cuenta cada célula que emite luz fluorescente en determinado rango. La tabulación de los datos del conteo, en conjunción con el análisis de la tabla, permite la determinación del porcentaje relativo de cada subpoblación específica de células según el AcM utilizado, incluso cuando el tamaño de la célula es idéntico al de otra subpoblación reconocida por otro AcM, lo que permite realizar estudios de 2 o 3 marcadores en una misma célula, de forma simultánea.

### Métodos inmunoenzimáticos

Como una alternativa a las técnicas de inmunofluorescencia, han surgido las técnicas inmunoenzimáticas, por ejemplo, con el uso de la enzima inmunoperoxidasa o de la fosfatasa alcalina. En el primer ejemplo, en lugar de un conjugado fluorescente, se emplea un segundo anticuerpo conjugado con la enzima peroxidasa. Esta enzima reacciona luego con un sustrato, para producir, en presencia de un cromógeno, un producto insoluble que se puede ver a través del microscopio óptico, lo que evita el uso de los costosos microscopios de fluorescencia. Recientemente, los análisis inmunocitoquímicos incluyen la determinación computarizada de los campos vistos a través del microscopio óptico, después de una reacción de inmunoperoxidasa directa o indirecta, lo que además de tener una elevada especificidad (ya que elimina la posible subjetividad del operador), permite la cuantificación de los resultados por medio de un análisis computarizado del color, la intensidad y la concentración. Estos análisis poseen como ventaja adicional su bajo costo y la posibilidad de la evaluación morfológica de las células en estudio.

El inmunofenotipaje, similar al que se realiza a escala internacional, se caracteriza por la habilidad de los anticuerpos marcados con fluorocromos o enzimas, de detectar antígenos asociados con células, mediante la citometría de flujo o las técnicas citoquímicas, respectivamente. Se usa para la clasificación de las leucemias y los linfomas según su fenotipo inmunológicamente identificado y, además, para el diagnóstico de otras enfermedades del sistema inmunológico, como el SIDA.

### Aplicación clínica del fenotipaje celular

Muchas especialidades médicas se benefician con el estudio de las subpoblaciones celulares. Con estos métodos se puede contribuir al diagnóstico inmunológico de inmunodeficiencias primarias y secundarias, de enfermedades oncohematológicas como las leucemias y linfomas, además de otras situaciones

médicas en las que se pueden utilizar para el monitoreo de pacientes sometidos a trasplantes de órganos y tejidos, en tratamientos con citostáticos e inmunorreguladores, entre otros.

## MÉTODOS QUE EVALÚAN LA CAPACIDAD FUNCIONAL DE LAS CÉLULAS INMUNOCOMPETENTES

### TRANSFORMACIÓN LINFOBLÁSTICA POR CRITERIO DE INCORPORACIÓN DE TIMIDINA TRITIADA

La transformación linfoblástica provoca cambios morfológicos y bioquímicos en los linfocitos pequeños que se encuentran en reposo: aumento en la membrana de la síntesis de fosfolípidos, aumento de la permeabilidad de cationes divalentes (cambios en los potenciales de la membrana), aumento de la adenilato y guanilato ciclasas y la correspondiente elevación del AMPc y GMPc intracelular, así como aumento en la síntesis de ADN, ARN y proteínas. Las causas de estos cambios que pueden llevar a la división celular son:

1. Estimulantes inespecíficos: sustancias que, sin haber tenido contacto previo, inducen la transformación linfoblástica, por ejemplo: las fitohemaglutininas del *Phaseolus vulgaris* (PHA), la concanavalina A de la *Canavalia ensiformis* (Con A), y el mitógeno de la *Phytolacca americana* (PWM). Las dos primeras estimulan los linfocitos T y el último, principalmente los linfocitos B.
2. Estimulantes específicos: estos actúan como antígenos sobre los linfocitos de individuos previamente sensibilizados. Los antígenos que más se utilizan son: PPD o tuberculina, histoplasmina, coccidioidina, toxoides diftérico y tetánico, entre otros medicamentos. En este método es importante mantener las condiciones de esterilidad desde la obtención de la muestra.

Los valores de timidina incorporada al ADN se pueden informar en recuentos por minuto (CPM) y en índice de estimulación (IE), que se determina como media de los CPM de la proliferación de las células estimuladas, dividido por la media de los CPM de las no estimuladas, cuando se emplea el criterio de incorporación de la timidina tritiada. Los valores de referencia dependen del valor normalizado en cada laboratorio. Los valores del IE pueden ser superiores a 300, según se señala en la literatura internacional. Interpretación de los resultados: valores inferiores a los de referencia

indican un déficit en la capacidad de la respuesta proliferativa de los linfocitos después de la estimulación antigénica, mitogénica o ambas.

## EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD NATURAL POR CRITERIO DE LIBERACIÓN DE $^{51}\text{Cr}$

Entre las células efectoras de la respuesta inmune natural se destacan las células citotóxicas naturales, también llamadas *natural killer cells* o células NK. Estas células provocan la lisis espontánea de un amplio grupo de células diana susceptibles a su acción, tales como: células infectadas por virus, células tumorales, células de línea como las Molt 4, K-562 (de eritroleucemia humana), y células normales singénicas y alogénicas. Las células efectoras NK se pueden obtener a partir de las células mononucleares de sangre periférica. Como células diana para el ensayo de citotoxicidad, se emplea con mucha frecuencia la línea K-562. La actividad lítica se mide por la liberación, al medio de cultivo, de  $^{51}\text{Cr}$  previamente incorporado por incubación a las células diana, cuando se enfrentan en este tipo de ensayo, con las células efectoras.

Los valores de referencia en cada laboratorio se establecen según sus condiciones experimentales. En el laboratorio del hospital “Hermanos Ameijeiras” se considera normal un rango de 56,81  $\pm$  16,93 % para el sexo masculino y de 43,33  $\pm$  18,94 % para el sexo femenino. Interpretación de los resultados: cuando los valores obtenidos como índice de citotoxicidad son menores que el rango de valores de referencia establecidos, se interpreta que la muestra tiene un déficit de la actividad citotóxica de esta población celular. Por el contrario, cuando son superiores, se considera que existe una actividad funcional incrementada de estas células. Ambas alteraciones pueden estar relacionadas con la patogenia o los mecanismos de defensa de algunas enfermedades malignas, infecciosas (virales), enfermedad de injerto contra huésped y trasplante de médula ósea, entre otras. Cada resultado se debe analizar en dependencia del cuadro clínico del enfermo.

En cada caso, se debe realizar un control de calidad:

1. Cada situación experimental se debe realizar por triplicado.
2. El montaje de la técnica se realiza paralelamente con la de una muestra tomada de un individuo supuestamente sano, como un donante de sangre.
3. El porcentaje de liberación espontánea de  $^{51}\text{Cr}$  debe ser menor de 15 % con respecto a la liberación máxima.

Las fuentes de error pueden ser:

1. Ajuste incorrecto de las células.
2. Micropipetas mal calibradas.
3. Temperatura de incubación inadecuada.
4. Inadecuado marcaje de las células diana con el isótopo radiactivo.
5. Mala viabilidad de las células diana, de las efectoras o de ambas.

## EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD CELULAR DEPENDIENTE DE ANTICUERPOS POR CRITERIO DE LIBERACIÓN DE $^{51}\text{Cr}$

Entre las células efectoras de la respuesta inmune existen varios tipos celulares (macrófagos, monocitos, células NK) capaces de ejercer un tipo de actividad citotóxica, mediada por un anticuerpo específico para un antígeno celular. Este anticuerpo se une a él y sensibiliza a las células diana, y es a través del receptor Fc para las IgG1 e IgG3 que las células K se unirán al anticuerpo sensibilizante específico y provocarán la lisis de las células diana. Este fenómeno se denomina citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, del inglés: *antibody dependent cellular cytotoxicity*). Estas células provocan la lisis de un grupo de células diana susceptibles a la acción de los anticuerpos contra los que se desarrolla la inmunidad específica, tales como: células infectadas por virus, células tumorales y células de línea, que han sensibilizado al sistema inmune del individuo. Las células efectoras K se pueden obtener a partir de las células mononucleares de sangre periférica. Como células diana para el ensayo de citotoxicidad se emplea con mucha frecuencia una línea de células epiteliales humanas en cultivo, formadoras de monocapa, las células Chang, para las cuales se desarrolla un antisero en conejos u otra especie, de manera que se puedan recubrir con el anticuerpo específico. La actividad lítica se mide por la liberación al medio de cultivo de  $^{51}\text{Cr}$ , previamente incorporado por incubación a las células diana sensibilizadas con una dosis no lítica del anticuerpo, cuando se enfrentan en este tipo de ensayo, con las células efectoras. Los valores de referencia en cada laboratorio se establecen según sus condiciones experimentales. En el nuestro se considera normal un rango de 56,81  $\pm$  16,93 % para el sexo masculino y de 43,33  $\pm$  18,94 % para el sexo femenino. Cuando los valores obtenidos como índice de citotoxicidad son menores que el rango de valores de referencia establecido, se interpreta que la muestra tiene un déficit de la actividad citotóxica de esta población celular. Por el contrario, cuando son superiores, se considera que existe una actividad funcional incrementada de estas células. Ambas alteraciones pueden estar relacionadas con la patogenia de diferentes enfermedades, y favorecer la aparición de enfermedades malignas, enfermedades

infecciosas (virales), enfermedades hematológicas, complicaciones como la enfermedad de injerto contra huésped en el trasplante de médula ósea y otras. Cada resultado se debe analizar en dependencia del cuadro clínico del enfermo.

En cada caso, debe realizarse un control de calidad:

1. Cada situación experimental se debe realizar por triplicado.
2. El montaje de la técnica se realiza paralelamente con la de una muestra tomada de un individuo supuestamente sano, como un donante de sangre.
3. El porcentaje de liberación espontánea de  $^{51}\text{Cr}$  debe ser menor de 15 % con respecto a la liberación máxima.

Las fuentes de error pueden ser:

1. Ajuste incorrecto de las células.
2. Micropipetas mal calibradas.
3. Temperatura de incubación inadecuada.
4. Inadecuado marcaje de las células diana con el isótopo radiactivo.
5. Mala viabilidad de las células diana y/o efectoras.

## BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- Alfonso ME, Aranda RE, Lorigados L, Del Vale LO, Rojas A. Estandarización de la técnica de citotoxicidad mediada por células destructoras naturales (NK). Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter 1986; 2:76-84.
- Cruz C, Fernández NL, Bernal B, Hernández P, Ballester JM. Técnicas de rosetas. Rev Cubana Med 1981; 20:379-387.
- Klaus CCG (ed.). Lymphocytes. A Practical Approach Series. Oxford: IRL Press, 1987.
- Kranz BR, Thierfelder S. Improved detection of terminal transferase (Tdt): The use of detergent on glutaraldehyde-fixed non-dehydrated cells prevents denaturation and diffusion artifacts. Leuk Res 1986; 10:1041-9.
- Lesourd B, Winters WD. Specific immune response to skin test antigens following repeated multiple antigen skin test in normal individuals. Clin Exp Immunol 1986;50:635.
- López Borrascas A (ed.). Enciclopedia Iberoamericana de Hematología. Vol. II. Editorial Universidad de Salamanca, 1994.
- Lorigados L, Aranda RE, Macías C, Rivero R, del Vale LO, Rojas A. Estandarización de la técnica de citotoxicidad por células dependientes de anticuerpos. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter 1988;4:107-17.
- Lorigados RC, Aranda RE, Rivero RA, Palma L. Estandarización de la técnica de inmunofluorescencia indirecta para el estudio de subpoblaciones linfocitarias con anticuerpos monoclonales. Rev Cubana Hematol Inmunol. Hemoter 1985;1:185-192.
- Rivero RA, Bello M, Suárez LE, Cruz C, Martínez M, Palma L. Introducción de un ultramicrométodo inmunocitoquímico para la cuantificación de subpoblaciones linfocitarias identificadas con anticuerpos monoclonales. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter 1995;11:46-56.
- Ross G, Dixon JB, Veevers A. Variation in the lymphocyte transformation assay. J Immunol Methods 1987;98:189-93.
- Torres IM, Cruz C, Inclán G, Aranda RE, Macías C, Rivero R. Estandarización de una técnica de formación de rosetas con hematíes sensibilizados (EA). Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter 1988;4:101-9.



## CONTENIDO

---

### **Introducción/ 531**

### **Pruebas *in vivo*/ 532**

Evaluación de la quimiotaxis mediante la prueba de la ventana cutánea de Rebuck y Crowley/ 532

### **Pruebas *in vitro* y preparación de suspensiones de monocitos y neutrófilos/ 533**

Métodos de laboratorio para la evaluación de la adherencia leucocitaria/ 533

Métodos de laboratorio para la evaluación de la quimiotaxis/ 533

Métodos de laboratorio para la evaluación de la opsonización y de la ingestión, simultáneamente/ 534

Métodos directos/ 535

Métodos indirectos/ 535

### **Métodos que evalúan la capacidad microbica intracelular/ 535**

### **Bibliografía recomendada/ 537**

### Capítulo 45



## MÉTODOS DE LABORATORIO PARA EL ESTUDIO DE LA FUNCIÓN FAGOCÍTICA

Lic. René Antonio Rivero Jiménez

### RESUMEN

Este capítulo está dedicado a las pruebas de laboratorio para el estudio de los fagocitos, células cuya misión efectora principal es la respuesta inmunológica o defensiva del organismo, por medio de la fagocitosis y la destrucción posterior de las bacterias que penetran en él: los granulocitos neutrófilos, también llamados leucocitos polimorfonucleares neutrófilos o segmentados, los monocitos y los macrófagos hísticos. Se presentan los métodos de laboratorio para la evaluación de la quimiotaxis *in vivo* e *in vitro*, así como para la evaluación de la adherencia, la opsonización y la digestión simultáneas. La estimación del rendimiento de estos métodos es presentada de manera resumida en una tabla.

### INTRODUCCIÓN

Aunque varios tipos de células pueden, ocasionalmente, ingerir partículas, los fagocitos, cuya misión efectora principal en la respuesta inmunológica o defensiva del organismo, son los granulocitos neutrófilos (GN), también llamados leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMN) o simplemente segmentados, junto con los monocitos y los macrófagos hísticos.

Los GN son células altamente diferenciadas y especializadas en la función fagocítica. Su importancia radica en que cuando ocurre una disminución grande en el número o una alteración en la función, dejan al individuo gravemente indefenso frente a los agentes infecciosos. Gracias a las investigaciones del científico ruso E. Metchnikoff, con su teoría fagocítica de la inmunidad, desde principios del siglo xx se comprendió la importancia de estas células, no solo en la especie humana, sino en todas las especies, incluidos los organismos unicelulares, en los que este fenómeno tiene gran importancia para la nutrición.

En los animales dotados de circulación sanguínea, existen fagocitos circulantes que se movilizan desde el torrente circulatorio hasta el lugar de la penetración bacteriana, y allí ingieren y destruyen a los microorganismos.

Pero si los fagocitos fracasan, estos se multiplican e invaden otros sitios y son capaces de ocasionar la muerte del huésped. Previamente, Metchnikoff había sugerido que los GN eran atraídos por las bacterias y sus productos. Este movimiento, dirigido por sustancias químicas, se denominó quimiotaxis.

Otro fenómeno descrito por este investigador fue que los GN poseían fermentos capaces de digerir gelatina y otras proteínas, y que los microorganismos ingeridos eran encerrados en vacuolas y lentamente digeridos, lo cual había sido evaluado y publicado por Kanthack y Ardí, en 1894, cuando señalaron que “los gránulos se desplazan, generalmente en grupos, a las porciones de la célula en contacto inmediato con los bacilos y allí se ve cómo disminuyen en tamaño, hasta que finalmente desaparecen”. Pero no fue hasta 1956, cuando se reemprendieron los estudios de la degranulación lisosomal y se comprendió su importancia para la destrucción intracelular de los microorganismos.

Con respecto al metabolismo, Bladridge y Gerard, en 1933, habían observado un fuerte estímulo en la captación de oxígeno por el GN durante la fagocitosis. Este fenómeno también quedó en el olvido, hasta que en 1956 Stähelin lo comprobó en varios experimentos. La cooperación entre los fagocitos y factores humorales

en las funciones de la defensa anti-infecciosa ya era conocida a inicios del siglo xx, gracias a las observaciones de Wright y Douglas, quienes se dieron cuenta de que los GN no podían fagocitar a los estafilococos si al medio no se añadía plasma o suero normales, por lo que se le atribuyó al suero una función facilitadora o preparadora de la ingestión. Asimismo, comprobaron que esta actividad se perdía si se calentaba el suero por encima de 56 °C, y al factor o factores séricos responsables de esta misión le denominaron opsoninas, que en griego significa: acción de condimentar o preparar de manera más apetitosa la comida.

En 1907, se demostró la interacción entre anticuerpos y el complemento en la actividad opsonica normal. Así, el concepto de la misión del fagocito, que comprendía lo que se denomina hoy desplazamiento quimiotáctico, endocitosis o ingestión y acción microbicida, quedaba enriquecido con la función opsonizante y favorecedora del quimiotactismo, llevada a cabo por factores humorales, que incluían a anticuerpos y factores del complemento.

La fagocitosis ha pasado de ser entendida como el mero mecanismo de nutrición de los seres unicelulares, a servir como término para designar (como es usado por Stossel y la mayoría de los autores contemporáneos), el conjunto de mecanismos, fases y cambios metabólicos que se suceden en el curso del cumplimiento de la misión de los fagocitos. Al hablar de fagocitosis en los GN se incluyen, por tanto, los procesos de adherencia al endotelio, quimiotaxis, opsonización, endocitosis, degranulación, estimulación del metabolismo oxidativo y acción de los sistemas microbicidas.

Los estudios metabólicos y funcionales del GN cobran auge a raíz de la descripción de una enfermedad que puede considerarse como patrón o modelo de alteración de la función del GN. En 1957, Berendes, Bridges y Good, describieron los casos clínicos de 4 niños varones que padecían infecciones bacterianas recurrentes en la piel, los ganglios, el hígado y el pulmón, y que cursaban con hipergammaglobulinemia y leucocitosis neutrófila. El examen histológico de los tejidos afectados revelaba una respuesta granulomatosa crónica.

Transcurrieron casi 10 años hasta que los trabajos de Holmes, Quie, y Baehner pusieron de manifiesto que la causa de la enfermedad residía en un fracaso de la actividad bactericida de los GN y que este fracaso tenía relación con una alteración metabólica y con la falta de producción de peróxido de hidrógeno, elemento básico en diversos sistemas bactericidas. La descripción de sucesivos casos y variantes de la enfermedad granulomatosa crónica (EGC) supuso la espoleta para que se multiplicasen, tanto en el ámbito clínico como

en el de investigación, numerosos estudios y publicaciones referentes a la función y patología de los GN.

En las últimas tres décadas se han descrito síndromes clínicos nuevos, producidos por alteraciones en el quimiotactismo, como el síndrome del leucocito “perezoso”, descrito en 1971 por Miller, o el síndrome de hiperinmunoglobulinemia E y defecto del quimiotactismo, descrito por Hill en 1974. También se ha aclarado la patogenia de los síntomas de algunas enfermedades ya descritas, como el síndrome de Chediak-Higashi. Además, se ha descubierto la relación entre el déficit de algunas enzimas granulocitarias y la aparición de síndromes similares a la EGC. Finalmente, se han identificado alteraciones en los factores humorales que cooperan en la función granulocitaria como causa de trastornos. Numerosos investigadores, procedentes de diversos campos de la medicina y especialmente inmunólogos, hematólogos, pediatras y especialistas en Medicina Interna, se han dedicado por completo, en los últimos años, al estudio de la fisiología y patología de los GN y a los métodos de exploración de las funciones granulocitarias.

Si se considera que la complejidad de la función de estas células no es como la de los otros elementos celulares sanguíneos como hematíes y plaquetas, y que su estudio se ha iniciado recientemente, se comprenderá que, con respecto a la fisiología y al conocimiento y diagnóstico de las alteraciones patológicas, nos hallamos en un momento de gran dinamismo.

## PRUEBAS *IN VIVO*

### EVALUACIÓN DE LA QUIMIOTAXIS MEDIANTE LA PRUEBA DE LA VENTANA CUTÁNEA DE REBUCK Y CROWLEY

Este método de evaluación del desplazamiento de los fagocitos se basa en la descripción original realizada por Rebeck y Crowley, que consiste en efectuar una abrasión de la piel, depositar sobre ella un factor quimiotáctico y cubrirla con un portaobjeto, que se cambia a diferentes intervalos de tiempo para efectuar el conteo de las células adheridas a la lámina de vidrio. Cuando la lámina se sustituye por una pequeña cámara de plástico estéril, abierta sobre la abrasión y con un factor quimiotáctico en su interior, por lo general derivado del suero activado, se puede cuantificar, con bastante precisión, la capacidad de desplazamiento de los GN que han migrado hasta el foco inflamatorio artificialmente provocado. El estudio cinético de esta migración, según este método muy primitivo, permite dividir a los individuos

normales en tres grupos, en dependencia del comportamiento de sus GN: grupo 1 o de “pico”, en el que la migración expresada en la densidad de células por unidad de tiempo alcanza su valor máximo entre 4 y 8 horas; grupo 2 o de la “curva ascendente”, cuando los valores obtenidos entre las 4 y 8 horas iniciales sigue aumentando hasta las 24 horas; y grupo 3 o grupo del “plano alto”, cuyo valor máximo se obtiene alrededor de las 4 horas y se mantiene estable a partir de este momento, sin cambios en las siguientes 24 horas.

## PRUEBAS *IN VITRO* Y PREPARACIÓN DE SUSENSIONES DE MONOCITOS Y NEUTRÓFILOS

A partir de un volumen de 10 mL de sangre venosa desfibrinada se puede realizar el aislamiento de las células mononucleares, mediante el método de Boyüm modificado. Una vez eliminado el sobrenadante del tubo plástico o siliconizado que está constituido por plasma, anillo de interfase compuesto por las células mononucleares y el Ficoll-Paque, el sedimento de eritrocitos y granulocitos neutrófilos (GN) (capa blanca que aparece en el tubo sobre los eritrocitos) se deja en los tubos; luego se lava con PBS (15 a 20 mL) para eliminar los restos del Ficoll-Paque, con centrifugaciones a temperatura ambiente. Después de eliminado el sobrenadante, se hace un tratamiento osmótico con una solución de cloruro de amonio a 4 °C para eliminar los eritrocitos contaminantes, y finalmente se ajusta en PBS la concentración deseada de los GN.

Otro método utiliza sangre heparinizada, tratada con dextrano para promover la sedimentación de los eritrocitos. Después de los sedimentados, el plasma rico en leucocitos se separa y centrifuga, y la masa de leucocitos se lava, se cuenta y se resuspende a la concentración deseada, por lo general  $10^7$  células por mL.

Los macrófagos se pueden obtener de muchas fuentes, y presentan diferencias bien establecidas en cuanto a sus propiedades funcionales y en dependencia de la fuente de origen. La mayoría de los estudios sobre anomalías en la función de los macrófagos, se han efectuado en animales de laboratorio, ya que del hombre no se pueden obtener suficientes células para estas investigaciones.

En animales de laboratorio es posible cultivar gran cantidad de macrófagos peritoneales a partir de la cavidad peritoneal, varios días después de la inyección de agentes inductores, como glicógeno, aceite mineral, caseína, caldo de tioglicolato y otros. También se pueden cultivar a partir de lavados o de la maceración de tejido pulmonar, del hígado, del bazo o de los ganglios linfáticos.

En el hombre, a partir de la sangre periférica se obtienen macrófagos, generalmente en forma de monocitos, por aislamiento de células mononucleares con Ficoll-Paque y por la propiedad que tienen los monocitos de adherirse al plástico si se incuban en presencia de un medio de cultivo rico en sueros, por ejemplo, suero fetal bovino. Los monocitos se resuspenden con el empleo de “policías de goma” o cambios bruscos de temperatura para llevarlos a 4 °C.

## MÉTODOS DE LABORATORIO PARA LA EVALUACIÓN DE LA ADHERENCIA LEUCOCITARIA

En la sangre periférica, unos GN aparecen libres en la circulación, mientras otros se adhieren a las paredes de los vasos sanguíneos; ambos (los GN marginados y los circulantes) constituyen la reserva total de la sangre, por lo que existe un intercambio libre entre estas poblaciones celulares.

La presencia de agentes extraños provoca la formación de quimiotoxinas que contactan con las paredes del endotelio vascular, y estimulan a través de estas la marginación o adherencia de estas células, que posteriormente atraviesan la pared del endotelio y luego migran hacia el foco infeccioso. La técnica de evaluación de la adherencia mide la capacidad de los GN de adherirse a la pared vascular *in vivo*, gracias a su capacidad de unirse a la fibra de nailon *in vitro*. Se emplean 5 mL de sangre venosa heparinizada y jeringuillas de 1 mL precalentadas a 37 °C, empaquetadas con 50 mg de fibras de nailon (Leucopak). Se forman columnas de fibras de nailon de 15 mm de altura (por triplicado) con agujas de 26 G en el extremo distal, se hace pasar un volumen de 1 mL de sangre al que se le midió previamente el total de GN. Una vez que haya pasado por la columna, se vuelve a medir el número de GN eluido de cada columna y se calcula el porcentaje de GN adheridos, cuando se resta del 100 % la diferencia entre el promedio de GN en el eluido sobre los GN totales al inicio del experimento, multiplicado por 100.

## MÉTODOS DE LABORATORIO PARA LA EVALUACIÓN DE LA QUIMIOTAXIS

La valoración de la capacidad de desplazamiento de los GN forma parte de un conjunto de estudios que intentan cuantificar el estado funcional de estas células. Estas investigaciones son de gran interés en la evaluación de pacientes con cuadros sépticos a repetición, siempre que no se encuentren otras causas más comunes de inmunodeficiencia. Esto se ha analizado tanto *in vivo*

como *in vitro*. Entre los procedimientos *in vitro* está la llamada prueba de la cámara de Boyden y sus derivaciones, que han demostrado una gran correlación con los métodos *in vivo*. No obstante, hay que destacar que la evaluación *in vitro* ha traído muchos problemas metodológicos, lo cual explica las modificaciones que se han realizado en las técnicas originales. En este método, una suspensión de células se introduce en la parte superior de la cámara, separada de la inferior por una membrana porosa, por ejemplo, una membrana Millipore con orificios de 3 micras. En la cámara inferior se dispone un estímulo quimiotáctico, por ejemplo, un suero humano activado con algún agente químico. Tras la incubación, se retira la membrana y se calcula el número de células que emigraron a través de la membrana y el número que se encuentra en la parte inicial, para establecer un índice quimiotáctico. Para establecer el rango normal hay que normalizar el método: se utilizan al menos 30 controles sanos, y luego se comparan con los resultados de pacientes en los que se sospecha de antemano una alteración de esta función.

### MÉTODOS DE LABORATORIO PARA LA EVALUACIÓN DE LA OPSONIZACIÓN Y DE LA INGESTIÓN, SIMULTÁNEAMENTE

Los métodos de laboratorio para la evaluación de la opsonización y la ingestión aparecen en la tabla 5.22.

**Tabla 5.22** Métodos de exploración de la opsonización-ingestión

Métodos	
Directos	Indirectos
<p>Microscópicos</p> <p>Partículas de látex (Baehner, 1968)</p> <p>Levaduras de panadero (Brandt, 1967)</p> <p><i>Candida albicans</i> (Lehrer, 1969)</p> <p>Bacterias (Maaloe, 1946)</p> <p>Isotópicos</p> <p>Marcaje de partículas Brzuchowska, 1966)</p> <p>Seroalbúmina marcada con <sup>125</sup>I (Chang, 1969)</p> <p>De extracción</p> <p>Marcaje de partículas (Brzuchowska, 1966)</p> <p>Seroalbúmina marcada con <sup>125</sup>I (Chang, 1969)</p>	<p>Consumo de oxígeno (Kvarstein, 1970)</p> <p>Oxidación de la glucosa (Sbarra, 1959)</p> <p>Quimioluminiscencia (Allen, 1972)</p> <p>Iodinación (Klebanoff, 1977)</p> <p>Reducción del NBT (Park, 1968)</p>

### Índice opsonofagocítico

La ingestión de bacterias y otras partículas requiere de un contacto estrecho entre estas y la membrana del GN, proceso favorecido por la acción de opsoninas séricas que modifican las cargas eléctricas de la superficie bacteriana.

Se conocen dos sistemas de opsoninas:

1. Las opsoninas del sistema complemento: fracciones C3b y C4b (termolábiles).
2. Las inmunoglobulinas de la clase IgG, subclases IgG1 e IgG3 (termoestables).

El modo de acción de ambas opsoninas es similar. Consiste en recubrir toda la superficie externa del microorganismo (opsonización), y así propiciar la instauración de puentes moleculares entre las partículas y los receptores de superficie presentes en la membrana del GN, sean para el fragmento Fc de la IgG o para las fracciones C3b y C4b del complemento. Una vez establecido el contacto, el GN emite pseudópodos que engloban al microorganismo en forma progresiva y circular, hasta lograr la fusión de los extremos distales de los pseudópodos con la interiorización y el aislamiento de la vacuola fagocítica (ingestión).

Este proceso requiere de la integridad de la membrana citoplasmática del GN (presencia de receptores Fc para las opsoninas), de los microfilamentos (estructuras

proteicas que permiten la formación de pseudópodos), de la internalización de los nucleótidos cíclicos intracelulares y del aporte energético proporcionado por el ATP producido en la glicólisis anaerobia.

La opsonización-ingestión se halla influenciada por determinadas condiciones ambientales, como la osmolaridad, el pH, la riqueza de carbohidratos, la presencia de cationes divalentes y otras, que pueden causar la inhibición de la fagocitosis. El índice fagocítico, por tanto, mide la capacidad que tienen las células fagocíticas de internalizar o ingerir el microorganismo de que se trate.

La opsonización mide la capacidad que tiene el suero de proporcionar las opsoninas para recubrir el microorganismo “prueba” (en este ejemplo, la *Candida albicans*), y permitir su ulterior ingestión.

El índice opsonofagocítico mide ambos procesos simultáneamente, tanto la presencia adecuada de opsoninas en el suero del paciente como la capacidad de sus células fagocíticas para ingerir al microorganismo utilizado en la prueba.

## MÉTODOS DIRECTOS

**Métodos microscópicos.** Son muy sencillos técnicamente porque no requieren una dotación instrumental compleja; pero el principal inconveniente consiste en su eventual dificultad de interpretación, ya que puede resultar difícil discernir si la partícula tiene una situación intracelular o está solamente adherida a la superficie de la célula. Por otra parte, no son muy fiables, por ser procedimientos estáticos que no valoran la velocidad de ingestión, por lo que se recomienda evaluar la muestra a diferentes intervalos, por ejemplo, tiempo 0, a los 15 minutos y a los 60 minutos del contacto célula-partícula, además, la comparación de resultados es compleja, dada la falta de una estandarización metodológica de uso general, no obstante, son métodos valiosos.

Se han recomendado la técnica de Brandt con el uso de levaduras, la técnica de Baehner con el empleo de látex y la de Lehrer-Cline que usa *Candida albicans*, aunque esta última es más complicada porque requiere de conocimientos de microbiología para el manejo de los microorganismos, así como medidas de bioseguridad.

**Métodos isotópicos.** El fundamento de estas técnicas consiste en el marcaje de partículas (inertes o vivas) y/o de complejos inmunes con isótopos radiactivos

( $^{14}\text{C}$ ,  $^{33}\text{P}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{45}\text{Ca}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ) para evaluar después la radiactividad emitida por los fagocitos. Como sucede con la mayor parte de las técnicas que utilizan materiales radiactivos, su principal problema técnico estriba en la disponibilidad de una adecuada dotación de equipos y medios.

**Métodos de extracción.** En estos procedimientos las partículas ingeridas por los GN se extraen del interior de estos mediante la utilización de sustancias disolventes adecuadas, y se procede después a cuantificar este extracto. Se emplean dos tipos de partículas: látex y sustancias oleosas.

Existen otras técnicas en las cuales la exploración de la ingestión se realiza mediante el conteo del número de partículas presentes en el medio extracelular tras la incubación, para deducir esta cifra del número total inicial de partículas añadidas. Por lo general se suelen utilizar gérmes, y se realiza el recuento por técnicas bacteriológicas.

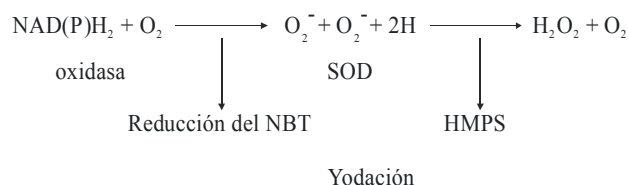
## MÉTODOS INDIRECTOS

Los métodos indirectos se fundamentan en el estudio de los mecanismos metabólicos que siguen a la ingestión, los cuales solo tienen lugar cuando las etapas anteriores de la función granulocítica se han desarrollado adecuadamente. No son métodos idóneos para medir la ingestión porque un defecto aislado en cualquiera de los procesos metabólicos posfagocíticos puede contribuir definitivamente a desvirtuar los resultados que se obtengan.

## MÉTODOS QUE EVALÚAN LA CAPACIDAD MICROBICIDA INTRACELULAR

**Prueba del NBT.** Cuando los GN fagocitan partículas, por ejemplo de látex, en presencia del azul de nitro tetrazolio (NBT), un indicador hidrosoluble, el colorante de formazán se reduce, y forman gránulos oscuros del color azul prusia en el interior de los GN. Por esa coloración se consideran células NBT positivas. El fenómeno se puede leer directamente a través del microscopio óptico en una extensión coloreada con May-Grünwal Giemsa. En los pacientes con infecciones bacterianas se suele encontrar un número más elevado de células NBT positivas.

La estimulación de los GN *in vitro* con endotoxinas bacterianas induce un notable incremento de las células NBT positivas. La ausencia de este incremento después de la estimulación indica que las células son incapaces de responder, lo que se interpreta como una falla en el metabolismo oxidativo de estas células. Inicialmente se supuso que la reducción del NBT sería una consecuencia de la producción de  $H_2O_2$ , o bien debida a la acción directa de las oxidasas dependientes del NADH o del NADPH que desencadenaba el mecanismo de la activación respiratoria en los GN. Sin embargo, a partir de estudios de la fagocitosis, efectuados en medios anaerobios, y tras el descubrimiento de la producción del anión superóxido por parte de los GN, se llegó a conocer el mecanismo por el cual se produce esta reducción, que es debida a una reacción química entre el colorante y el  $O_2^-$  generado durante el proceso oxidativo:



Las técnicas más difundidas que utilizan este colorante para el estudio de la fagocitosis son tres:

1. Métodos sin estimulación de la fagocitosis.
2. Técnicas en las que se estimula la fagocitosis:
  - a) NBT semicuantitativo.
  - b) NBT cuantitativo.

En ausencia de una respuesta normal, cuando no ocurre la reducción del NBT, la prueba se ha empleado como criterio diagnóstico de la EGC.

### 3. Reacción microbicida intracelular.

Estos métodos se pueden clasificar según la tabla 5.23.

Una vez aislados los GN, aun cuando estén contaminados con una pequeña cantidad de eritrocitos y células mononucleares que no sean capaces de alterar la exactitud de los resultados, se puede añadir una suspensión de bacterias viables de concentración conocida; las más empleadas para estos ensayos son los estafilococos dorados, cepa *S. aureus* Cowan I, que se incuban en presencia de suero normal, a fin de obtener una cantidad óptima de opsoninas.

El número de células y bacterias deberá controlarse con precisión, por lo general en la proporción 5:10 bacterias por GN. Después de incubar durante distintos intervalos de tiempo a 37 °C, según la técnica que fomenta el contacto entre bacterias y GN, se retiran las muestras para determinar el número de bacterias viables. Para ello se aplica el método de recuento de colonias en placas de Petri con medios de cultivo enriquecidos como Apgar sangre. Si se emplean estafilococos como gérmenes experimentales, la lisotafina mata a los gérmenes extracelulares y proporciona resultados reproducibles de excelente calidad.

Esta prueba de base y sus modificaciones han servido para valorar la función de los GN en varias enfermedades, pues existe correlación entre la función debilitada y la susceptibilidad a las infecciones. Una variante del método emplea, en lugar de bacterias, una levadura como la *Candida albicans*, y mide la actividad microbicida sobre este tipo de germen (tabla 5.24).

**Tabla 5.23** Métodos que evalúan la actividad microbicida intracelular

Métodos	
Generales (evaluación global)	Específicos
Muerte intracelular de <i>Candida albicans</i> (Lehrer, 1969)	Determinación de la enzima mieloperoxidasa (MPX)
Muerte intracelular de bacterias	Detección de $H_2O_2$ intravacuolar
Método de valoración microbiológico (Maaloe, 1946)	Yodinación
Método de valoración isotópico (Cline, 1973)	Quimioluminiscencia
Método de valoración fotodensimétrico (Olling, 1979)	Muramidasa
	Lactoferrina
	Proteínas catiónicas intragranulares

**Tabla 5.24** Estimación del rendimiento de los métodos para investigar la opsonización-ingestión y de la función microbicida de los granulocitos

Método	Sencillez técnica	Facilidad de interpretación	Reproducibilidad	Rendimiento de la prueba
Látex	+++	+	++	Bueno
Levaduras	+++	++/-	++	Bueno
<i>Candida albicans</i>	++	+	++	Bueno
Otros gérmenes	++	+/-	+/-	Escaso
Marcaje de partículas	+	++	Se desconoce	No probado
Extracción de sustancias oleosas	+++	++	++	Bueno
Métodos indirectos	+	+	+	Variable
Función frente a <i>Candida</i>	++	++	++	Aceptable
Función frente a bacterias	+	+	+/-	Escaso
Microbicida frente a bacterias	++/-	++	+	Bueno

## BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

Cardellach F, Feliu E, Matutes E, Martí M, Vives Corrons JL, Jou JM *et al.* Exploración de la capacidad de desplazamiento de los granulocitos humanos. Método de soporte en agarosa. *Sangre* 1979;24(5-B):730-8.

Giraldo MP, Cortes MT, Rubio-Félix D, Raichs A. Métodos de exploración de la opsonización-ingestión y de la función microbicida de los granulocitos. *Sangre* 1979; 24 (5-B): 739-50.

Ortega JJ. Alteraciones congénitas o primarias de la función granulocitaria. *Sangre* 1979;24(5-B):681-714.



## **CONTENIDO**

---

**Introducción/ 539**

**Medida de IgE total/ 539**

**Medida de IgE específica/ 540**

Medida de IgG4 específica/ 540

**Liberación de histamina por los basófilos/ 540**

**Medida de leucotrienos/ 540**

**Prueba por punción cutánea/ 541**

**Prueba intradérmica/ 541**

**Pruebas de provocación/ 542**

Prueba de provocación bronquial/ 542

Prueba de provocación nasal/ 542

Prueba de provocación conjuntival/ 542

Prueba del parche/ 542

Proteína catiónica de los eosinófilos/ 542

**Bibliografía recomendada/ 543**

### Capítulo 46



## PRUEBAS DE LABORATORIO PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA ALERGIA

*Dra. Rosa Elena Aranda Rivero*

### RESUMEN

El diagnóstico de la alergia, inflamación mediada por IgE, se determina por la historia clínica del paciente y por diferentes pruebas de laboratorio, que pueden realizarse *in vitro* e *in vivo*, así como pruebas específicas y no específicas. Estas últimas utilizan alérgenos o proteínas que se derivan de ellos, lo que permite identificar los alérgenos causantes de los síntomas de alergia y los niveles de sensibilidad del paciente. Se han descrito varias pruebas para el diagnóstico de la alergia, entre ellas, las que emplean métodos *in vitro*, como la medida total de IgE, la medida de IgE específica, la medida de IgG4 específica, la liberación de histamina por los basófilos y la medida de leucotrienos. Entre las que utilizan los métodos *in vivo* están las pruebas por punción cutánea, la prueba intradérmica, la prueba del parche y las pruebas de provocación bronquial, nasal y conjuntival.

### INTRODUCCIÓN

Existen pacientes con hiperreactividad, que muestran una respuesta de hipersensibilidad a diferentes estímulos irritantes como el humo, el aire, el frío, los perfumes y otros, que provocan reacciones anormales consideradas por los pacientes como alergia, pero que no es mediada por la IgE. Ante un paciente con síntomas de alergia, es necesario diferenciar ambas situaciones, mediante la historia clínica y las diferentes pruebas que existen para evaluar si la sensibilidad es debida a alergia (condición mediada por IgE). Si es así, es necesario identificar el o los alérgenos responsables de los síntomas de alergia, de manera que el tratamiento correcto pueda iniciarse en una etapa temprana y reducir el riesgo de inflamación crónica y destrucción de los tejidos. Se

han desarrollado diferentes pruebas, tanto *in vitro* como *in vivo*, para el diagnóstico de la alergia.

### MEDIDA DE IgE TOTAL

La concentración de IgE en el suero es extremadamente baja, por lo que se requieren pruebas sensibles para su cuantificación. La síntesis de IgE en el pulmón y en el hígado del feto comienza a las 11 semanas de embarazo. En la sangre del cordón umbilical, la concentración de IgE es aproximadamente 1 ng/mL (0,41 U/mL); se incrementa durante la vida, en individuos no alérgicos, hasta alrededor de 200 ng/mL y disminuye a partir de los 70 años. Aún es cuestionable el valor pronóstico de niveles altos de IgE en la sangre del cordón, aunque por lo

general, los lactantes con niveles de IgE elevados y/o que se eleven rápidamente, sobre todo los que tienen antecedentes de alergia, deben ser observados cuidadosamente. En individuos alérgicos se pueden encontrar valores normales de IgE, por lo que el valor predictivo de la cuantificación de IgE es limitado, aunque en general, niveles altos de IgE total, tanto en niños como en adultos, deben ser investigados para confirmar la presencia o no de alergia. La cantidad de IgE sérica no es un reflejo directo de la cantidad de IgE unida a las células cebadas. Los niveles totales aumentan en las enfermedades alérgicas, en la medida en que estén involucradas áreas mayores de la mucosa o de la piel. No solo la alergia provoca elevaciones de los niveles de IgE; se observan, además, niveles altos en diferentes estados de inmunodeficiencias, parasitismos y el síndrome de hiper IgE.

La cuantificación de IgE se realiza por diferentes métodos; pero los más utilizados son el radioinmunoensayo (RIA) y el ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*). En general, se fija un anticuerpo anti-IgE a una fase sólida, se adiciona la muestra que se va a estudiar y, por último, un anticuerpo anti-IgE marcado con un radioisótopo o una enzima. En paralelo se utiliza una curva estándar, a partir de la cual se realiza el cálculo para determinar la concentración de la muestra problema. Estos métodos pueden detectar 1,2 ng de IgE/mL, aunque la sensibilidad analítica máxima se obtiene entre los 18 y 1 500 ng/mL, valores que se corresponden con la porción recta de la curva.

## MEDIDA DE IgE ESPECÍFICA

La medida de anticuerpos IgE específicos para los diferentes alérgenos, es el método *in vitro* más importante para el diagnóstico de la hipersensibilidad mediada por IgE.

RAST (*radioallergosorbent test*) fue la primera prueba inmunoquímica *in vitro*, desarrollada para la evaluación semicuantitativa de IgE específica. En esta prueba, el alérgeno es adsorbido a discos de celulosa; se adiciona el suero del paciente y, por último, la anti-IgE humana marcada con  $^{125}\text{I}$ . Los resultados se expresan en clases: clase 0 (nivel no detectable de IgE alérgeno-específico), clase 1 (nivel bajo), clase 2 (nivel moderado), clase 3 (nivel elevado) y clase 4 (nivel muy elevado).

Se han desarrollado sistemas más sensibles, en los que se utilizan diferentes fases sólidas y nuevos métodos de revelado de la IgE específica unida al alérgeno (quimioluminiscencia, fluorescencia o colorimetría). Estos métodos permiten medir los niveles de anticuerpos IgE específicos contra más de 300 alérgenos diferentes, pero para obtener una alta especificidad y sensibilidad, es necesario disponer de alérgenos de elevada calidad y un sistema de detección óptimo. El resultado de la prueba puede ser falso positivo en pacientes con niveles muy elevados de IgE total, por unión inespecífica al inmuoadsorbente.

## MEDIDA DE IgG4 ESPECÍFICA

La presencia de anticuerpos IgG4 específicos contra alérgenos en el suero de pacientes alérgicos, ha sido interpretada de formas diferentes. Algunos autores le atribuyen la función de anticuerpo bloqueador y otros le atribuyen igual función que la IgE. En general, se señala que la medida de IgG4 puede ser útil en dos situaciones: como soporte diagnóstico en algunos casos de alergia alimentaria con IgE específica no demostrable y como indicador de la eficacia de la inmunoterapia específica, particularmente con veneno de abejas. La IgG4 específica puede ser medida de igual forma que la IgE, pero con el uso de anticuerpos anti-IgG4.

## LIBERACIÓN DE HISTAMINA POR LOS BASÓFILOS

Los basófilos con IgE en su superficie, al ponerse en contacto con el alérgeno para el cual es específica la IgE, liberan histamina. La histamina liberada por los basófilos puede ser medida por métodos inmunoradiométricos o fluorescentes. El resultado es semicuantitativo y se expresa en clases, basado en la cantidad de alérgeno necesaria para producir una liberación de histamina significativa.

## MEDIDA DE LEUCOTRIENOS

Los leucotrienos ( $\text{LTC}_4$ ,  $\text{LTD}_4$  y  $\text{LTE}_4$ ), derivados de la lipooxigenación del ácido araquidónico, son producidos por los mastocitos, monocitos/macrófagos y eosinófilos. En el pulmón, disminuyen el aclaramiento

mucociliar, aumentan la secreción de *mucus*, provocan espasmo del músculo liso, cambios en la permeabilidad vascular y aumentan la hiperreactividad de las vías aéreas; además, hay evidencias que sugieren que aumentan el transporte de iones a través de las células epiteliales y la estimulación de las neuronas aferentes. El conocimiento de las funciones biológicas de los leucotrienos ha despertado interés sobre cómo medirlos en diferentes patologías, dentro de ellas, las alergias.

El mejor lugar para medir los mediadores inflamatorios es su sitio de acción, sin embargo, se ha demostrado que en ausencia de disfunción renal o hepática, el nivel de los mediadores (o metabolitos) en orina, refleja los niveles plasmáticos. La recolección de orina es fácil y, en humanos, el LTE<sub>4</sub> es el producto de conversión estable del metabolismo de los leucotrienos. La medida de la excreción urinaria de LTE<sub>4</sub> brinda información valiosa en los pacientes con asma severa y crónica, en las pruebas de provocación, así como en la evaluación del efecto modulador de diferentes estrategias terapéuticas en los pacientes asmáticos. La medida de LTE<sub>4</sub> se ha realizado por la combinación de la cromatografía líquida de fase reversa de alta presión (HPLC) y el radioinmunoensayo. Recientemente se ha descrito un ensayo inmunoenzimático sensible, que correlaciona bien con el método antes señalado y es mucho más sencillo.

## PRUEBA POR PUNCIÓN CUTÁNEA

La prueba por punción cutánea es una de las más utilizadas para demostrar la sensibilidad a un alérgeno. El alérgeno es introducido en la dermis y reacciona con los anticuerpos IgE que se encuentran en la membrana de las células cebadas de la piel y se liberan diferentes mediadores que originan una pápula y un eritema. La prueba se realiza en la cara anterior del antebrazo o en la piel del dorso: se deposita una gota del extracto alérgico sobre la piel y se punciona la piel a través de la gota, con una lanceta con punta de 1 mm, y pasados 15 minutos se mide el diámetro de la pápula. Como control negativo, se utiliza la solución de dilución del extracto alérgico. En los países nórdicos se incluye, además, un control positivo, el dihidrocloruro de histamina 10 mg/mL. Hay diferentes

formas de evaluar la respuesta, pero en general se considera positiva cuando se obtiene un diámetro de pápula igual o mayor que 3 mm. Los antihistamínicos clásicos deben ser suspendidos 72 h antes de la realización de la prueba y los antihistamínicos no sedantes, al menos dos semanas antes. Además de estos, los antidepresores tricíclicos también interfieren en los resultados. La sensibilidad del método es del 100 % o muy cercana a esta cifra; en cambio, la especificidad es por lo general entre el 70 y el 80 %. Estos valores de especificidad pueden obedecer a resultados falso positivos o indicar un estado de alergia latente.

Es importante disponer de preparaciones alérgicas estandarizadas, con una potencia y composición definidas. Para comparar la potencia y composición entre diferentes preparaciones de un extracto alérgico, se utilizan ensayos de inhibición, inmunorradioactivos o inmunoenzimáticos. El paralelismo entre las curvas indica que las preparaciones estudiadas tienen igual composición. La potencia está inversamente relacionada con la cantidad de alérgeno requerida para inhibir la unión de anticuerpos IgE, a una cantidad fija de alérgeno unida a la fase sólida, además, se utilizan para estudiar la composición de las preparaciones alérgicas, la radioinmuno-electroforesis cruzada y el *western blotting*.

## PRUEBA INTRADÉRMICA

En algunos pacientes se obtienen resultados negativos en la prueba por punción cutánea con un alérgeno en particular y existe una fuerte sospecha de sensibilidad a este alérgeno, lo que puede estar ocasionado por una débil potencia del extracto utilizado, y en estos casos debe realizarse la prueba intradérmica. Este método requiere preparaciones alérgicas 1 000 veces menos potentes que la prueba por punción cutánea, pero con mayor frecuencia brinda resultados falso positivos y es mucho más riesgosa para el paciente. El volumen recomendado a inyectar es de 0,01 mL; la prueba debe realizarse en el antebrazo y se debe incluir un control negativo. Como alternativa se puede incluir un control positivo y en los resultados se registran tanto el eritema como la pápula.

## PRUEBAS DE PROVOCACIÓN

En algunos pacientes alérgicos no es posible llegar a una conclusión basada en las pruebas para la alergia antes mencionadas, por lo que es importante realizar la prueba de provocación en el órgano involucrado en la respuesta alérgica. No se emplea como una prueba de rutina, excepto en la prueba del parche.

### PRUEBA DE PROVOCACIÓN BRONQUIAL

La prueba de provocación bronquial con extractos alérgicos se indica en el estudio de pacientes con asma alérgica. Se realiza una prueba cutánea para determinar una dosis segura de inicio del reto bronquial, se preparan diferentes diluciones del extracto alérgico en solución salina fisiológica y se aplica por medio de un nebulizador. Se mide el volumen espiratorio forzado en un segundo (VEF1); la dosis de provocación que origina el 20 % de reducción del VEF1, se denomina PD<sub>20</sub>. La caída del VEF1 se inicia a los 10 minutos, llega al máximo a los 20 o 30 minutos y regresa a la línea de base. Puede observarse una respuesta tardía a las 4 a 6 horas, por lo que después que ha cedido la fase inmediata, debe observarse la función pulmonar cada una hora. La prueba debe realizarse en un hospital, para poder tratar las reacciones que se presenten.

### PRUEBA DE PROVOCACIÓN NASAL

La prueba de provocación nasal se realiza para medir la reactividad de la mucosa nasal al alérgeno. Se aplica el extracto en solución acuosa, 0,2 mL con un atomizador, en concentraciones crecientes; como control se utiliza solución salina fisiológica. Se realiza rinomanometría de flujo y se registra el volumen de secreción nasal, estornudos y prurito. Es una prueba bastante subjetiva.

### PRUEBA DE PROVOCACIÓN CONJUNTIVAL

La prueba de provocación conjuntival ha sido utilizada cada vez más en los últimos años. Es fácil de realizar y no tiene riesgo apreciable de reacción

sistémica. Se preparan diluciones del alérgeno y se deposita una gota en el saco conjuntival de uno de los ojos. Se aplican dosis crecientes cada 15 minutos, hasta que se alcanza la dosis de provocación (PD). La reacción se evidencia por enrojecimiento de la conjuntiva. Como control se aplica en el otro ojo solución salina fisiológica en los mismos intervalos. La prueba de provocación conjuntival tiene buena precisión y ha sido utilizada con buenos resultados en el diagnóstico de pacientes que solo presentan síntomas de asma y no ofrece riesgos al paciente.

### PRUEBA DEL PARCHÉ

La prueba del parche se realiza para el diagnóstico de la dermatitis alérgica por contacto. El alérgeno es, por lo general, una sustancia química que debe ser utilizada en la prueba a una concentración tal que provoque reacción en los pacientes alérgicos, pero que no provoque irritación en los individuos normales. Puede aplicarse una gota del extracto en una solución de acetona en la piel o embeber una pequeña almohadilla con el extracto en petrolato y pegarla a la piel. En ambos casos se inspecciona el sitio de la prueba a las 48 horas. La prueba es positiva si aparecen eritema, pápulas o vesículas. Si los resultados son negativos, se examinará el sitio de la prueba a las 72 y 96 horas. Los corticoesteroides sistémicos deben suspenderse antes de la realización de la prueba, ya que inhiben la inmunidad mediada por células.

### PROTEÍNA CATIONICA DE LOS EOSINÓFILOS

La proteína catiónica de los eosinófilos es una proteína única, de cadena simple, contenida en los gránulos secretorios de los eosinófilos, con un peso molecular entre 16 y 22 kDa. También ha sido llamada ribonucleasa 3, debido a su analogía con estas enzimas. El gen que determina su producción está localizado en el cromosoma 14 (q24-q31), muy próximo a los de la familia de las ribonucleasas y se ha observado la presencia de polimorfismo genético, que estaría relacionado con el desarrollo de manifestaciones alérgicas.

Esta proteína es una potente molécula citotóxica con actividad antiviral, antibacteriana y antiparasitaria.

Cumple un grupo importante de funciones no relacionadas con la citotoxicidad, como la liberación de histamina por los basófilos, el estímulo de la secreción de *mucus* en las vías respiratorias y la interacción con el sistema del complemento, entre otras. La medición de sus niveles en el suero constituye un indicador de la activación de la mezcla de eosinófilos circulantes en la sangre y no necesariamente del número de estos.

Se ha demostrado que los niveles séricos de la proteína catiónica están relacionados con la severidad del asma y no con su padecimiento. Este importante hallazgo permite que sea un marcador muy confiable de la actividad inflamatoria de la mucosa bronquial, especialmente en el seguimiento evolutivo y como medidor de la eficacia del tratamiento antiinflamatorio: el aumento de los niveles séricos predice las recaídas y crisis de exacerbación. Asimismo, sus niveles se incrementan marcadamente en relación con la exposición a un alérgeno y regresan a la normalidad cuando este es eliminado.

Por todo ello, la proteína catiónica de los eosinófilos es un parámetro muy útil para la toma de decisiones

sobre la administración de corticoesteroides por vía inhalatoria, tanto en lo referente a las dosis como a la duración de este tipo de tratamientos.

## BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- Ciprandi G, Tosca MA, Fasce L. Allergen-specific conjunctival challenge in children with allergic asthma: a clinical tool. *Allergy* 1994;49:489-91.
- Dreborg S. Skin prick test. An update. *Folia Allergol Immunol Clin* 1988; 35:3-11.
- Frolund L, Madsen F, Gerner U. Reproducibility of standardized bronchial allergen provocation test. *Allergy* 1986; 41:30-6.
- Holgate S, Dahlén SE. SRS-A to leukotrienes. Ed. Zeneca, Blackwell Science, 1997.
- Oehling AK, Huerta López JG. Progress in Allergy and Clinical Immunology. Volumen 4, Cancun, México: Hogrefe & Huber Publishers, 1997.
- Plebani M, Borghesan F, Faggian D. Clinical efficiency of in vitro and in vivo test for allergic diseases. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 1995;74:23-28.
- Venge, P y cols. Eosinophil cationic protein (ECP): molecular and biological properties and the use of ECP as a marker of eosinophil activation in disease. *Clin Exp Allergy* 1999; 29 (9): 1172-1186.

## **CONTENIDO**

---

### **Introducción/ 545**

### **Métodos serológicos/ 545**

Aislamiento de linfocitos como fuente antigénica de clase I/ 545

Prueba de linfocitotoxicidad para clase I/ 545

### **Aislamiento de linfocitos como fuente antigénica de clase II/ 547**

Separación de linfocitos T y B por fibras de nailon/ 547

Separación de células T y B mediante partículas magnéticas/ 547

### **Prueba de linfocitotoxicidad para clase II/ 548**

### **Fluorescencia bicolor para tipaje histico serológico/ 548**

### **Prueba cruzada/ 549**

### **Biología molecular y el sistema HLA/ 549**

Reacción en cadena de la polimerasa/ 549

### **Métodos moleculares para la tipificación HLA/ 549**

Oligonucleótidos específicos de secuencias/ 550

*Primers* específicos de alelos/ 550

### **Aplicaciones y ventajas de estas técnicas moleculares/ 550**

### **Trasplante/ 550**

### **Bibliografía recomendada/ 551**

### Capítulo 47



## TÉCNICAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD PARA EL TRASPLANTE DE ÓRGANOS Y TEJIDOS

*Lic. Francis Ramos Álvarez*

### RESUMEN

En este capítulo se exponen algunos de los métodos para garantizar la preparación inmunológica de los donantes y receptores de trasplante. Está dividido en dos acápites fundamentales: los métodos serológicos y los métodos de biología molecular, cuya introducción ha tenido un gran impacto en el estudio del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Además, ha sido una revolución en el trasplante de órganos y tejidos, el diagnóstico de enfermedades y el estudio de la filiación paterna, entre otras aplicaciones. A pesar de las grandes posibilidades que existen con respecto a la inmunosupresión tras la introducción de la ciclosporina A y del *tacrolimus*, la compatibilidad sigue siendo fundamental para el éxito del trasplante. Cualquier esfuerzo que se haga por desarrollar estas técnicas será de esencial importancia para el desarrollo de la trasplantología.

### INTRODUCCIÓN

Desde épocas remotas, el trasplante de órganos sólidos fue un sueño de la humanidad, sin embargo, hubo que esperar a que, en la década del 40 del siglo xx, Medawar aportara pruebas inequívocas de que el rechazo de tejidos injertados era resultado de una reacción inmunológica, lo que motivó que muchos investigadores comenzaran a trabajar en el campo de la inmunología del trasplante.

En 1952, Dousset y Zenna descubrieron la prueba de aglutinación de linfocitos; en 1958, Dousset descubrió el primer antígeno HLA (HLA-A2) y Payne y Rolfs y Van Rood y colaboradores descubrieron que el suero de las paridas contiene anticuerpos leucoaglutinantes. En 1964, Paul Terasaki y McClelland introdujeron la técnica de microlinfocitotoxicidad. Esta lista sería interminable, ya que cada día las investigaciones acerca de ello van ampliando el horizonte. De las técnicas de leucoaglutinación descritas inicialmente para seleccionar de una forma más adecuada el donante “ideal” para cada receptor, hoy en día se emplean métodos más sofisticados como la biología molecular.

En este capítulo se exponen muy someramente algunos de los métodos para garantizar la preparación

inmunológica de los donantes y receptores de trasplante. Serán abordados en dos acápites: los métodos serológicos y los métodos de biología molecular. El empleo adecuado de las diferentes técnicas es el objetivo de otro capítulo de este libro.

### MÉTODOS SEROLÓGICOS

#### AISLAMIENTO DE LINFOCITOS COMO FUENTE ANTIGÉNICA DE CLASE I

El aislamiento de linfocitos como fuente antigénica de clase I se realiza habitualmente a partir de sangre periférica con el método recomendado por Boyüm, mediante centrifugación sobre un gradiente de Ficoll-Paque con densidad 1,077 g/mL (véase el capítulo correspondiente) y posteriormente, la solución es ajustada a una concentración entre 2 000 y 3 000 células/mL.

#### PRUEBA DE LINFOCITOTOXICIDAD PARA CLASE I

En placas de la microprueba de Terasaki, con sus pozuelos previamente recubiertos con aceite mineral



no tóxico o parafina líquida, se encuentran ya dispensados los antisueros anti-HLA clase I siguiendo un protocolo en el que estén presentes antisueros para todos los antígenos de los *locus* A, B y C descritos, o al menos los más frecuentes, y por lo menos dos antisueros diferentes para cada alelo.

En el momento de la realización de la técnica se añade a cada pozuelo 1 mL de la suspensión celular ajustada a 2 000 o 3 000 mL/mL. Luego, se incuba la placa a temperatura de laboratorio durante 30 minutos, al cabo de los cuales se le añade 5 mL de suero de conejo, como fuente de complemento a cada pocillo, y se incuba nuevamente durante 1 hora. Se realiza entonces una tinción con eosina, que detiene la reacción con formaldehído. La lectura se realiza después de un corto tiempo, mediante microscopio invertido de contraste de fase. La conservación de la placa de ensayo en refrigeración a 4 °C permitirá la lectura, incluso después de varios días.

#### Principios de la técnica de microlinfocitotoxicidad

Los sueros anti-HLA reaccionan con los correspondientes antígenos linfocitarios. La adición de complemento modifica la membrana celular de estos linfocitos, lo que permite la penetración de un colorante supravital (la eosina) en la célula y la tinción de esta (reacción positiva). Las células que no reaccionan, no absorben el colorante (reacción negativa).

#### Valoración de las reacciones

La lectura se realiza con el microscopio invertido de contraste de fase. Las células vivas son claras y brillantes (reacción negativa); las células muertas son más oscuras y de mayor tamaño (reacción positiva). El porcentaje de células muertas se indica en puntos (tabla 5.25).

**Tabla 5.25** Porcentaje de células muertas

Células muertas	Puntuación
0 - 10	1
11 - 20	2
21 - 50	4
51 - 80	6
81 - 100	8

Las placas, además de llevar al menos 2 antisueros de cada alelo, deben llevar un control positivo que proporcione el 100 % de las células muertas y un control negativo. Si el control se muestra débilmente positivo, se tendrá en cuenta durante la valoración de la técnica.

#### Interpretación de los resultados

En la interpretación de los resultados se tendrán en cuenta las reacciones positivas de 8 y 6; se pueden valorar las reacciones de hasta 4 por reacciones cruzadas, entre otras. Se toman en consideración los valores más positivos y con la ayuda de tablas de reacciones cruzadas, haplotipos más frecuentes, desequilibrios de ligamiento, entre otros, se llega al tipaje final (figura 5.26).

A Con-	B 8 A <sub>1</sub>	C 8 A <sub>1</sub>	D A <sub>2</sub>	E A <sub>2</sub>	F A <sub>2</sub> <sup>+</sup> <sub>28</sub>
A <sub>2</sub> <sup>+</sup> <sub>28</sub>	4 A <sub>3</sub>	A <sub>3</sub>	8 A <sub>9</sub>	8 A <sub>9</sub>	A <sub>23</sub>
8 A <sub>24</sub>	A <sub>10</sub>	A <sub>10</sub>	A <sub>25</sub>	A <sub>26</sub>	A <sub>11</sub>
A <sub>31</sub>	A <sub>32</sub>	A <sub>33</sub>	A <sub>34</sub>	A <sub>33+34</sub>	A <sub>36</sub>
B <sub>5</sub>	B <sub>5</sub>	B <sub>7</sub>	B <sub>7</sub>	8 B <sub>8</sub>	8 B <sub>8</sub>
8 B <sub>12</sub>	B <sub>12</sub>	8 B <sub>44</sub>	8 B <sub>45</sub>	B <sub>13</sub>	B <sub>13</sub>
4 B <sub>14</sub>	B <sub>14</sub>	B <sub>15</sub>	B <sub>15</sub>	B <sub>16</sub>	B <sub>16</sub>
B <sub>17</sub>	B <sub>17</sub>	B <sub>15</sub>	B <sub>15</sub>	B <sub>16</sub>	B <sub>16</sub>
B <sub>22</sub>	B <sub>22</sub>	B <sub>27</sub>	B <sub>27</sub>	B <sub>35</sub>	B <sub>35</sub>
B <sub>60</sub>	B <sub>62</sub>	B <sub>63</sub>	B <sub>70</sub>	B <sub>73</sub>	8 Con-

**Figura 5.26** Tipaje HLA A<sub>1</sub>, A<sub>24</sub> (9), B<sub>8</sub>, B<sub>44</sub> (12)\*

## AISLAMIENTO DE LINFOCITOS COMO FUENTE ANTIGÉNICA DE CLASE II

El aislamiento de linfocitos como fuente antigénica de clase II se realiza mediante el método recomendado por Boyüm, al igual que para clase I. Para ello, se inicia partiendo generalmente con mayor cantidad de sangre periférica. Una vez obtenida la solución total de linfocitos, se procede a la separación de linfocitos T y B, ya que las moléculas HLA clase II se expresan solo en las células presentadoras y, por tanto, debe realizarse la tipificación en células B.

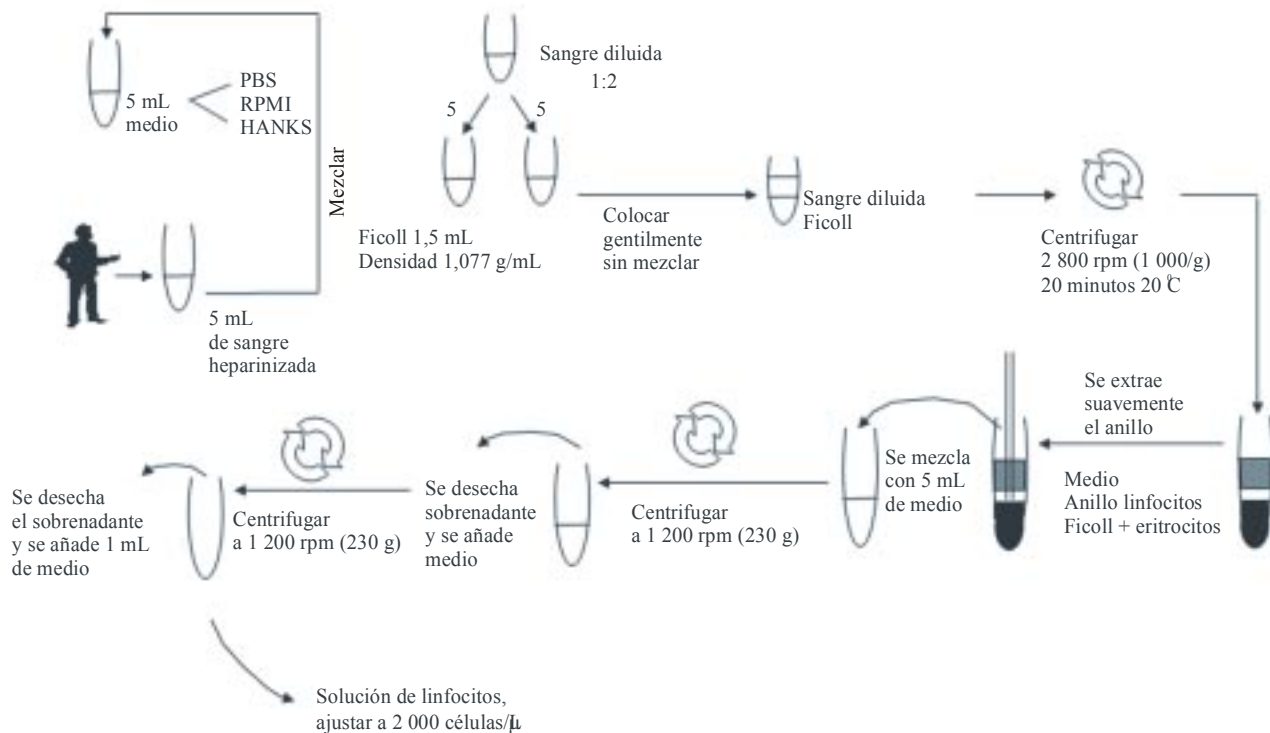
### SEPARACIÓN DE LINFOCITOS T Y B POR FIBRAS DE NAILON

La solución de linfocitos se introduce en una jeringuilla llena de fibras de nailon para aprovechar la propiedad de los linfocitos B de adherirse, a diferencia de los T que no se adhieren. Después de un periodo de incubación, se abre la punta de la jeringuilla y se deja drenar los linfocitos T. Los linfocitos B se extraen por la acción mecánica del émbolo sobre la fibra de nailon. La solución enriquecida en células

B es entonces ajustada a 2 000 o 3 000 células/mL y está lista para ser usada en el tipaje DR-DQ. Los linfocitos T pueden ser usados en el tipaje HLA-ABC.

### SEPARACIÓN DE CÉLULAS T Y B MEDIANTE PARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Una forma de separación rápida son las bolas magnéticas recubiertas con anticuerpos monoclonales pan-B y pan-T, como las reconocidas internacionalmente: Dynabeads™. En este caso existen diferentes procedimientos, pero uno de ellos es añadiendo, a la muestra, Dynabeads clase I para obtener células B o bolas magnéticas con anticuerpos anti B (Dynabeads clase II) para obtener células T; se incuban durante 5 minutos y se coloca un magneto en la pared del tubo, al cual se le deben pegar las células en forma de roseta y se colecta el sobrenadante por decantación. Posteriormente, las rosetas son lavadas de 4 a 5 veces; se separa el tubo del magneto y mediante lavados se obtiene un pellet que es resuspendido hasta ajustar las células a 2 000 por mL. Se pueden utilizar directamente las células T para el tipaje clase I y las células B para clase II (figura 5.28).



**Figura 5.28** Aislamiento de linfocitos a partir de sangre periférica como fuente antigénica.

## PRUEBA DE LINFOCITOTOXICIDAD PARA CLASE II

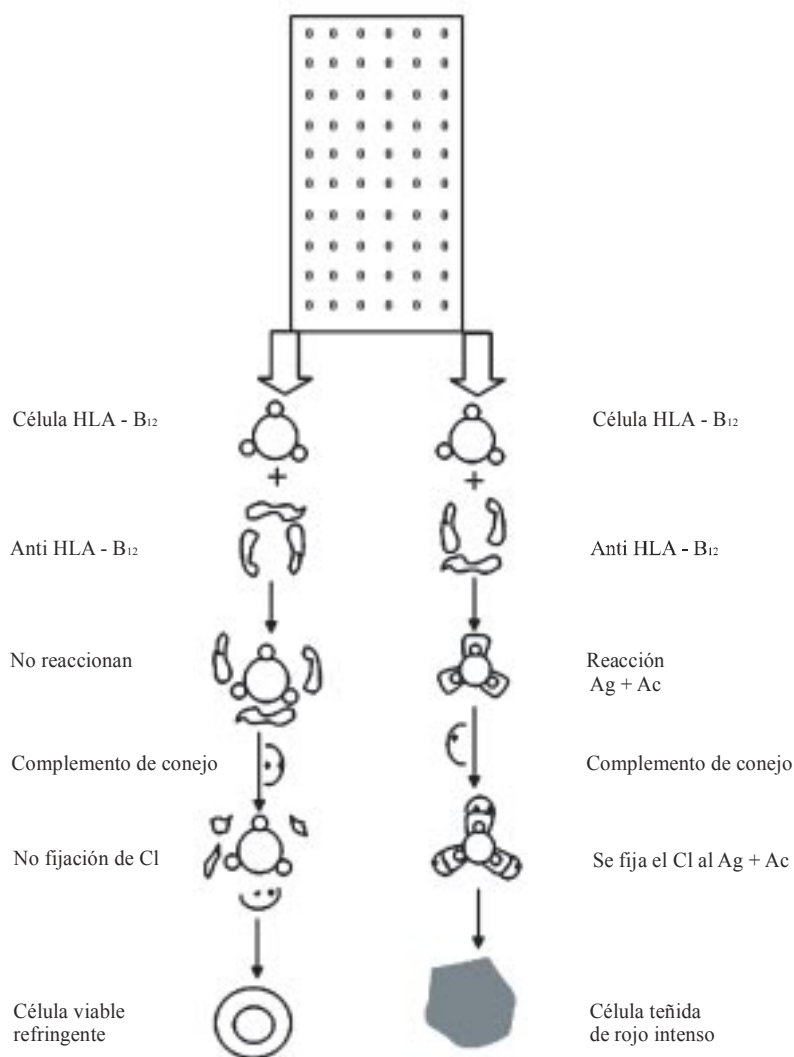
El principio de esta técnica y el procedimiento son iguales a los de la clase I, pero en este caso en las placas se utilizan antisueros clase II y los tiempos de incubación se duplican. La valoración de las reacciones es similar a la clase I, aunque se debe tener en cuenta que las reacciones cruzadas entre los antígenos DR son mucho mayores que en la clase I.

## FLUORESCENCIA BICOLOR PARA TIPAJE HÍSTICO SEROLÓGICO

Para la fluorescencia bicolor para tipaje hístico serológico, se hace una extracción de linfocitos por la técnica de Boyüm, a la suspensión celular ajustada. Luego se realizan procedimientos que se fundamentan en que al añadir una gota de antiinmunoglobulina total

marcada con fluoresceína e incubarse a 37 °C, las células B quedan marcadas de verde fluorescente, a diferencia de las células T, y se dispensa la suspensión celular en la placa de Terasaki para el tipaje HLA DR-DQ. En lugar de utilizar eosina como colorante supravital, se utiliza *propidium yodine* o *etidium bromide*, pues estas sustancias tienen la capacidad de penetrar solo las membranas celulares dañadas, unirse al ADN y colorear de rojo fluorescente las células muertas. Se procede a la lectura en un microscopio de doble fluorescencia; para ello se toman en consideración solamente las células B muertas (que son las marcadas con fluoresceína) y la interpretación de los resultados es igual a las técnicas de microlinfocitotoxicidad ya descritas.

Como se puede apreciar, esta técnica se basa en que las células B muestran inmunoglobulinas como marcadores de membrana, principio este que se aprovecha para diferenciarlas de los linfocitos T. Es una técnica mucho más costosa por su equipamiento, pero de más fácil manipulación (figura 5.29).



**Figura 5.29** Representación del ensayo de linfocitotoxicidad sobre células mononucleares HLA-B<sub>12</sub>.

## PRUEBA CRUZADA

La regla de oro en el trasplante de la mayor parte de los órganos sólidos es el *cross match* o prueba cruzada, en la cual los linfocitos del donante se enfrentan a los sueros del futuro receptor. En esta prueba estandarizada por el NIH se utiliza la técnica de microlinfotoxicidad para clase I (descrita en este capítulo) con simple incubación, solo que, a diferencia de esta, la lectura se toma como positiva en todo caso con muerte celular por encima del control negativo. Un *cross match* positivo contraindica el trasplante de casi todos los órganos sólidos (en este orden: riñón, páncreas-riñón, corazón y, sin importancia demostrada, el hígado).

Algunos autores han querido aumentar la especificidad y han duplicado los tiempos de incubación, así como otros autores han adicionado una fase antiglobulina para detectar los anticuerpos no fijadores de complemento, pero en ningún caso se ha podido establecer el significado clínico de la prueba, por lo que la técnica de *cross match* estandarizada por NIH continúa siendo la regla de oro.

También se han descrito *cross match* en que los sueros son tratados con ditroteitol (DTT), un reductor de puentes disulfuros, y se comparan entre sí para ver si son anticuerpos de tipo IgG o IgM. El procedimiento es sencillo: se realiza una incubación del suero del paciente con una solución de DTT; luego se enfrenta a las células del donante por la técnica clásica de microlinfocitotoxicidad de simple incubación, descrita anteriormente, y se compara con el *cross match* del suero sin tratar. El significado clínico, así como el empleo de esta técnica, difieren según los diferentes grupos de trasplante. Cuando el suero puro es positivo y el tratado con DTT negativo, los anticuerpos son de tipo IgM. Las consideraciones sobre su importancia clínica han ido variando en el tiempo.

En el caso de futuros receptores de corazón, por la premura del trasplante, muchos grupos enfrentan el suero de los pacientes a un panel de células linfocitarias de donantes de sangre para conocer la inmunización de este paciente y conocer si puede obviarse o no el *cross match*; este procedimiento se conoce como estudio de sensibilización pretrasplante, y se hace de manera similar en futuros receptores de trasplante renal. En este caso su objetivo es conocer el porcentaje de inmunización de los pacientes con diferentes fines en el futuro trasplante. En el caso del trasplante de corazón, generalmente se acepta que puede realizarse sin esperar el resultado del *cross match*, cuando el estudio de sensibilización pretrasplante arroja un resultado inferior al 15 %.

## BIOLOGÍA MOLECULAR Y EL SISTEMA HLA

La introducción de las técnicas de biología molecular (BM) ha provocado un impacto en el estudio del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), y ha creado una revolución en el trasplante de órganos y tejidos, en el diagnóstico de enfermedades que muestran asociaciones fuertes, así como en el estudio de la filiación paterna, entre otras aplicaciones.

Durante estos últimos años se han desarrollado metodologías moleculares para el estudio del sistema HLA a partir del ADN leucocitario. La molécula de ADN está formada por dos cadenas lineales de nucleótidos entrelazadas, que forman una doble hélice. Las dos cadenas de nucleótidos se unen entre sí a través de sus bases, unión que es altamente específica: adenina-timina (A-T) o citosina-guanina (C-G), de ahí su complementariedad. Se han aprovechado las características físicas y químicas de esta molécula para desarrollar estas técnicas. Sin duda, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la más utilizada.

## REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

La reacción en cadena de la polimerasa permite obtener muchas réplicas del segmento de ADN seleccionado *a priori* mediante la acción de la *taq* polimerasa.

En cada ciclo hay una primera etapa de desnaturalización a 94 °C, una segunda etapa de apareamiento de 54 a 60 °C en la que se aparean los oligonucleótidos iniciadores (*primers*) a las cadenas de ADN, y una tercera etapa de extensión a 72 °C, en la que se incorporan los diferentes nucleótidos para formar el segmento de ADN complementario. En un primer ciclo, en vez de 2 cadenas originales, se obtienen 4, las cuales sirven como molde para el siguiente ciclo de amplificación, y así consecutivamente, puede obtenerse alrededor de un millón de veces el fragmento de ADN seleccionado.

Después de la cristalización del alotipo A2 quedó bien clara la participación de los dominios más externos de las moléculas de HLA en la presentación antigénica, que es precisamente la región más polimórfica y es, por tanto, la región (segundo exón) que es seleccionada para amplificar.

## MÉTODOS MOLECULARES PARA LA TIPIFICACIÓN HLA

Una vez amplificado el ADN, pueden emplearse diferentes métodos analíticos para la tipificación HLA, en dependencia del grado de información que se desee y del tiempo que se tenga para realizar la prueba (tabla 5.26).

**Tabla 5.26** Métodos moleculares actuales usados en la tipificación HLA. Características

Métodos	Características
Dot blot PCR-SSO	Más útil cuando hay muchas muestras Muy informativa Resultados en 1 a 2 días
Dot blot PCR-SSO reversa	Igual a la anterior, pero más útil cuando se quiere trabajar una sola muestra
PCR-SSP	Menos informativa Resultados en 2 a 3 horas

## OLIGONUCLEÓTIDOS ESPECÍFICOS DE SECUENCIAS

Una vez obtenido el producto amplificado, se coloca en membranas de nailon en un formato de manchas, se desnaturaliza y se hibrida con los oligonucleótidos complementarios (oligosondas). El número de sondas que se ha de utilizar depende del polimorfismo de la región seleccionada (por ejemplo, en el DQ se utilizan alrededor de 22 oligosondas, mientras que en el DR se emplean de 80 a 90).

Esta sonda se “marca” previamente con digoxigenina (DIG), y se utiliza la enzima transferasa terminal. El marcaje se identifica con el uso de un anticuerpo anti-DIG, que tiene unida la fosfatasa alcalina. El anticuerpo se unirá al sitio donde se unió la oligosonda. La visualización se lleva a cabo con el empleo de un agente quimioluminiscente en una placa de rayos X convencional. La presencia de una mancha en la placa indica hibridación positiva.

Esta técnica es de mucha utilidad, sobre todo para el trasplante de médula ósea no relacionado; también lo es para el estudio de las asociaciones HLA-enfermedad, por ser muy informativa; puede detectar diferencias alélicas en individuos que son aparentemente idénticos, tipificados por serología.

## PRIMERS ESPECÍFICOS DE ALELOS

La técnica *primers* específicos de alelos o PCR-SSP fue introducida por Ollerup. A diferencia de la anterior, se emplean *primers* o iniciadores conocidos como específicos de alelos o grupos de alelos. La asignación de la especificidad está dada por la presencia o ausencia del producto amplificado, el cual se visualiza a través de una electroforesis. Es una técnica simple, reproducible y de gran poder de resolución. Es de gran utilidad en el trasplante renal por su rapidez: dura 3 horas.

## APLICACIONES Y VENTAJAS DE ESTAS TÉCNICAS MOLECULARES

Las ventajas de estas técnicas moleculares se pusieron de manifiesto desde un principio, cuando se compararon los mapas cromosómicos de mediados de los años 80 con los de principios de los 90. En estos últimos años del siglo XX, los científicos se han enriquecido enormemente en información, en un período muy corto, ya que esta tecnología permite abordar directamente al cromosoma y no a su producto, como lo hacen las técnicas serológicas.

Estas técnicas permiten detectar alelos que no se tipifican por métodos serológicos, como son los correspondientes al DQa, y brinda un panorama más real del verdadero polimorfismo de este sistema, pues da respuestas a muchas interrogantes que existían con respecto a las asociaciones HLA-enfermedad y al trasplante.

## TRASPLANTE

Uno de los aspectos más controversiales de los últimos años, sobre todo después de la introducción de la ciclosporina, fue el papel de la compatibilidad MHC en la sobrevida del trasplante de órganos. Hoy día se sabe que el efecto de la ciclosporina A disminuye con el tiempo y sigue siendo la compatibilidad el aspecto fundamental para el éxito del trasplante, por lo tanto, cualquier intento por mejorar estas técnicas será meritorio para la sobrevida del injerto.

En estudios comparativos de tipaje renal entre clase II por serología y por biología molecular, se demostró que alrededor del 8 % de los pacientes no se pueden tipificar por serología, por problemas tecnológicos y, por tanto, hay que repetirles la extracción de sangre.

Con el empleo de técnicas serológicas, existe alrededor de 20 % de pacientes mal tipificados y hay dificultades para detectar a los homocigóticos.

También hay alrededor de 30 % de pacientes a los cuales no se les pueden detectar las subunidades, sin embargo, la mayor ventaja obtenida con la introducción de las técnicas moleculares es la confiabilidad del tipaje. Existe entre 20 y 25 % de error por técnicas serológicas. Esta ventaja es de importancia práctica y biológica porque se demuestra que si los errores de tipaje se eliminaran para la selección del DR, los resultados del trasplante al año de vida serán tan buenos como los reportados para los trasplantes relacionados e idénticos. Además, se da respuesta a episodios de rechazo y pérdida del injerto. La biología molecular pone en manos de los trasplantólogos un

arma fundamental en el éxito de estas operaciones e, indirectamente, ha estimulado la revisión de los protocolos de inmunosupresión.

También la introducción de estas técnicas brinda ventajas prácticas: permite procesar muchas muestras en el día; facilita el intercambio de muestras entre laboratorios, porque el ADN es muy fácil de trasladar sin que se afecte su integridad, y el volumen de sangre que se extrae a los pacientes es mucho menor. Por las características de conservación del ADN se pueden realizar estudios retrospectivos, además, estas técnicas permiten suprimir las técnicas celulares de cultivo mixto de linfocitos (tabla 5.30).

**Tabla 5.30** Ventajas de las técnicas moleculares

Inherentes al tipaje	Prácticas
Confiabilidad del tipaje	Posibilitan el procesamiento simultáneo de un gran número de muestras
Tipaje de homocigóticos	Facilitan el intercambio de muestras entre los laboratorios
Detección de subunidades	Menor volumen de muestra Facilitan los estudios retrospectivos Hacen innecesaria la realización del cultivo mixto de linfocitos

## BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

Bender K. The HLA-System. Biotest Bulletin 1984;2: 64-116.  
Daniel P, Stites Abba J. Terr. Inmunología humana y básica. México DF: Editorial El Manual Moderno S.A.; 1994.  
Kesemeyer-Nielsen F (editor): Histocompatibility Testing. Copenhagen; 1975.

Roitt IM, Brostoff 2, Male D. Inmunología. Londres: Grower Medical Publishing; 1995.

Terasaki PJ, Park MS, Danovitch GM. Histocompatibility testing, Cross-Matching and allocation of cadaveric kidney trasplant: Handbook of Kidney Transplantation. Boston: Little Brown and Company; 1992; p. 43-66.

# CONTENIDO

---

## **Introducción/ 553**

- Descubrimiento de los grupos sanguíneos eritrocitarios/ 553
- Localización de los antígenos de los grupos sanguíneos en la membrana de los eritrocitos/ 554
- Terminología de los grupos sanguíneos eritrocitarios/ 554
- Sistemas de los grupos sanguíneos eritrocitarios/ 555
- Anticuerpos de los grupos sanguíneos eritrocitarios/ 555
- Destrucción inmune de los eritrocitos/ 555
- Mecanismo de la hemólisis intravascular/ 557
- Mecanismo de la hemólisis extravascular/ 557

## **Sistemas de los grupos sanguíneos ABO, Hh, Lewis, P y de los antígenos Ii/ 558**

- Sistemas ABO y Hh/ 558
- Fenotipos del sistema ABO/ 558
- Subgrupos del sistema ABO/ 559
- Anticuerpos del sistema ABO/ 560
- Determinación del grupo sanguíneo ABO/ 560
- Discrepancias en las determinaciones del grupo sanguíneo ABO/ 560
- Fenotipos del sistema Hh/ 561
- Sistema Lewis/ 562
- Anticuerpos del sistema Lewis/ 562
- Antígenos I e i/ 562
- Anticuerpos anti-I y anti-i/ 562
- Sistema P y antígenos relacionados/ 563

## **Sistemas de grupos sanguíneos Rh y LW/ 563**

- Nomenclatura/ 563
- Antígeno D/ 564
- Antígenos C, c, E, e/ 564
- Determinación del fenotipo Rh e inferencia del genotipo/ 564
- Expresión débil del antígeno D/ 565
- Antígeno D débil en el donante de sangre/ 566
- Antígeno D débil en el receptor de sangre/ 567
- Antígeno D parcial/ 567
- Anticuerpos del sistema Rh/ 569
- Determinación del grupo sanguíneo RhD/ 569
- Sistema LW/ 569

## **Sistema de grupo sanguíneo MNS/ 570**

## **Sistemas de grupos sanguíneos Kell y XK/ 570**

## **Sistema de grupo sanguíneo Duffy/ 571**

## **Sistema de grupo sanguíneo Kidd/ 571**

## **Sistema de grupo sanguíneo Lutheran/ 572**

## **Sistema de grupo sanguíneo Diego/ 572**

## **Bibliografía recomendada/ 573**

### Capítulo 48



## GRUPOS SANGUÍNEOS ERITROCITARIOS

*Lic. Antonio A. Bencomo Hernández*

*Dra. María Elena Alfonso Valdés*

*Lic. Yalile Alfonso Valdés*

*Dra. Martha Díaz Salazar*

### RESUMEN

Luego de transcurrida una centuria desde su descubrimiento, los antígenos de los grupos sanguíneos eritrocitarios continúan siendo una de las principales causas de reacciones adversas a la transfusión y de enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido. El estudio del polimorfismo de los antígenos de los grupos sanguíneos ha permitido comprender la estructura y función de estos. Esos resultados permitirán la aplicación de nuevas estrategias de tratamiento en el campo de la hematología y de la medicina transfusional. En este capítulo se estudian los grupos sanguíneos eritrocitarios, su importancia clínica, los aspectos genéticos y moleculares, la terminología empleada y se hace énfasis en los sistemas de grupos eritrocitarios de mayor importancia en medicina transfusional, especialmente los sistemas ABO y Rh.

### INTRODUCCIÓN

El término inmunohematología abarca el estudio de los antígenos, los anticuerpos y las reacciones inmunológicas de todos los componentes de la sangre. Esta disciplina está muy relacionada con la medicina transfusional por cuanto esta última encuentra en ella las bases científicas de sus procedimientos y el aseguramiento inmunológico de la transfusión.

La inmunohematología, a su vez, provee las herramientas para el diagnóstico, prevención y tratamiento de la aloinmunización asociada con la transfusión de sangre, el embarazo y el trasplante de órganos y tejidos. También estudia las enfermedades autoinmunes relacionadas con las células sanguíneas y los problemas que tienen que ver con la exclusión de la paternidad. Los avances recientes de las técnicas moleculares han permitido dilucidar la estructura y función de muchos de los antígenos de grupos sanguíneos que prometen grandes contribuciones al diagnóstico y tratamiento de enfermedades hematológicas y nuevas aplicaciones en la transfusión de sangre y el trasplante. Las investigaciones en esta disciplina

también han hecho aportes significativos en el campo de la genética humana, la antropología, la criminalística y la medicina legal.

### DESCUBRIMIENTO DE LOS GRUPOS SANGUÍNEOS ERITROCITARIOS

En 1875 se reconoció que, al mezclar sueros sanguíneos con eritrocitos de diferentes especies, se observaba la ocurrencia de hemólisis, lo que sugirió diferencias entre las especies en cuanto a la aparición de factores en su membrana. Karl Landsteiner, en 1900, demostró diferencias entre los eritrocitos de los humanos al mezclar sueros y eritrocitos de diferentes individuos, lo que llevó al descubrimiento del sistema de grupos sanguíneos ABO. Estudios posteriores permitieron el reconocimiento de los sistemas MNS, P y Rh, al inmunizar conejos con eritrocitos humanos, aunque los supuestos anticuerpos anti-Rh obtenidos en conejos reconocían en realidad a los antígenos del sistema LW. El resto de los sistemas de grupos sanguíneos fueron descubiertos generalmente



al identificarse anticuerpos en el suero de pacientes politransfundidos o en púerperas con recién nacidos afectados de enfermedad hemolítica.

Se pueden definir los grupos sanguíneos como características inmunoquímicas presentes en la membrana de los eritrocitos de algunos de los miembros de la especie y ausentes en otros. Estas estructuras están bajo estricto control genético y se heredan de acuerdo con las leyes de Mendel. Todos los mamíferos poseen este tipo de estructuras, por lo que son diferentes entre sí y especialmente con animales de otras especies. Los grupos sanguíneos son características permanentes de los individuos: se nace y se muere con ellos.

## LOCALIZACIÓN DE LOS ANTÍGENOS DE LOS GRUPOS SANGUÍNEOS EN LA MEMBRANA DE LOS ERITROCITOS

Los estudios de membrana y, más recientemente, la clonación de los genes de los grupos sanguíneos, han aportado información sobre la bioquímica y la localización de los antígenos de los grupos sanguíneos sobre la membrana de los eritrocitos y de su posible función biológica (tabla 6.1).

Los antígenos de naturaleza glucídica se localizan sobre cadenas de oligosacáridos que están unidos directamente a los glicosfingolípidos o a los dominios de la membrana asociados a la banda 3 y 4,5. Los antígenos glicoproteicos están asociados a las glicoforinas. Las glicoforinas de las membranas están constituidas por cuatro tipos de cadenas polipeptídicas, denominadas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ . La cadena  $\alpha$  constituye la glicoforina A (GPA) y en ella se localizan los antígenos M y N, mientras que la cadena  $\delta$  caracteriza a la glicoforina B (GPB) y contiene los antígenos S, s y U. Las glicoforinas C y D están compuestas por las cadenas  $\beta$  y  $\gamma$ , respectivamente, y en ellas se pueden identificar los antígenos del sistema Gerbich. Otras proteínas de membrana corresponden a los demás antígenos de los grupos sanguíneos.

## TERMINOLOGÍA DE LOS GRUPOS SANGUÍNEOS ERITROCITARIOS

La terminología de los grupos sanguíneos es variable y no tiene un patrón único. En la mayoría de los

**Tabla 6.1** Estructura y función de los componentes de la membrana que representan a los sistemas de grupos sanguíneos eritrocitarios

No.	Sistemas	Estructuras	Función
001	ABO	Carbohidratos	Desconocida
002	MNS	Glicoforina A y B	Desconocida
003	P	Carbohidratos	Desconocida
004	Rh	Polipéptidos Rh	Transportadores ?
005	Lutheran	Super familia de las Ig	Receptor de lamininas
006	Kell	Glicoproteína	Endopeptidasa ?
007	Lewis	Carbohidratos	Ligando (s-Le <sup>a</sup> )
008	Duffy	DARC	Receptor de citocinas
009	Kidd	Glicoproteína	Transporte de urea
010	Diego	Banda 3	Intercambio de aniones
011	Cartwirg	Acetilcolinesterasa	Desconocida en los hematíes
012	Xg	Glicoproteína (CD99)	Receptor
013	Scianna	Glicoproteína	Desconocida
014	Dombrock	Glicoproteína	Desconocida
015	Colton	Acuaporina-1	Canales de agua
016	LW	Superfamilia de las Ig (ICAM-4)	Ligando de integrinas CD11/CD18
017	Chido/Rodger	Complemento C4A/C4B	Componentes del complemento
018	H	Carbohidratos	Desconocida
019	Kx	Polipéptido	Transporte ?
020	Gerbich	Glicoforina C/D	Esqueléticas de membrana
021	Cromer	DAF	Regulador del complemento
022	Knops	CR1	Receptor del complemento
023	Indian	CD44	Receptor del hialuronato
024	Ok	Superfamilia de las Ig (CD147)	Receptor
025	RAPH	Desconocida	Desconocida

### Leyenda

?: no confirmado.

sistemas, el mismo término es usado para describir el gen y el antígeno con la diferencia de que el gen se escribe con letra itálica. Por ejemplo, el gen *Fy<sup>a</sup>* codifica para el antígeno *Fy<sup>a</sup>*. Otros sistemas utilizan una sola letra; el ejemplo típico es el sistema ABO. Los antígenos son *A<sub>1</sub>*, *A<sub>2</sub>* y *B*, los genes son *A<sup>1</sup>*, *A<sup>2</sup>*, *B* y *O*. En otros sistemas, como el Kell, los alelos principales se denotan con letra itálica mayúscula y minúscula como *K* y *k*. En los sistemas *Le*, *Lu*, *Fy*, *Jk*, *Di*, *Yt*, *Do*, *Co*, *Kn* e *In* se utiliza un patrón uniforme. El primer alelo reconocido se denota con el superíndice *a* y el segundo con el *b*, por ejemplo, *Lu<sup>a</sup>* y *Lu<sup>b</sup>*. El fenotipo se escribe *Lu (a+b-)* y demás combinaciones. Una nomenclatura numérica ha sido adoptada por la Sociedad Internacional de Transfusión Sanguínea (SITS), que consiste en números de 6 dígitos. Los primeros 3 números representan el sistema de grupos sanguíneos, por ejemplo, 001 ABO, 002 MNSs, 003 P, 004 Rh, etc. y los tres números restantes identifican a los antígenos; de esta forma, al antígeno A del sistema ABO le corresponde el 001001, el antígeno D del Rh se denota con el número 004001. Otra serie de números se ha establecido para las colecciones, así como para los antígenos de alta incidencia (la serie 900) y para los de baja incidencia (la serie 700).

## SISTEMAS DE LOS GRUPOS SANGUÍNEOS ERITROCITARIOS

Se han descrito 271 grupos sanguíneos eritrocitarios, distribuidos en 25 sistemas. Cada sistema contiene uno o más antígenos codificados por un gen o por dos o más genes homólogos. Algunos de los antígenos son específicos de la línea eritroide, mientras otros son compartidos con otros tejidos. Los sistemas de grupos sanguíneos descritos hasta el momento son: ABO, MNSs, P, Rh, Lutheran (*Lu*), Kell (*K*), Lewis (*Le*), Duffy (*Fy*), Kidd (*Jk*), Diego (*Di*), Cartwright (*Yt*), Xg, Scianna (*Sc*), Dombrock (*Do*), Colton (*Co*), LW, Chido/Rodger (*Ch/Rg*), Hh, Kx, Gerbich (*Ge*), Cromer (*Cr*), Knops (*Kn*), Indian (*In*), Ok y RAPH. Los antígenos que no se han asignado a ninguno de los sistemas anteriores por no cumplir con los criterios para ello, se agrupan en 5 colecciones denominadas Cost (*Cs*), Er, I, Glob y LKE. El resto lo constituyen los antígenos de alta frecuencia (públicos) y los antígenos de baja frecuencia (privados) que son independientes de los sistemas y las colecciones (tabla 6.2).

## ANTICUERPOS DE LOS GRUPOS SANGUÍNEOS ERITROCITARIOS

La mayoría de los anticuerpos eritrocitarios pertenecen a las clases de inmunoglobulinas (Ig): IgG e IgM. Ocasionalmente pueden identificarse anticuerpos de la clase IgA. Los anticuerpos eritrocitarios se clasifican como aloanticuerpos, si reconocen a antígenos que no están presentes en los eritrocitos del individuo, o como autoanticuerpos si reaccionan con los antígenos eritrocitarios del propio individuo. Algunos de los aloanticuerpos se clasifican como naturales, si se desconoce el estímulo antigénico que los generó. Estos aparecen en el suero de individuos que carecen de los antígenos correspondientes, como son los anticuerpos del sistema ABO. Se pueden identificar también con especificidad para otros antígenos de los grupos sanguíneos, pero en menor frecuencia. Los aloanticuerpos generalmente se producen como resultado de la inmunización con eritrocitos por las transfusiones de sangre o por el paso trasplacentario de eritrocitos fetales durante el embarazo o el parto. La presencia de aloanticuerpos eritrocitarios implica la selección de componentes sanguíneos carentes de los antígenos específicos para los anticuerpos identificados para evitar las reacciones transfusionales hemolíticas.

## DESTRUCCIÓN INMUNE DE LOS ERITROCITOS

Los anticuerpos, por sí solos, no causan daño a los eritrocitos, sino que a partir de su unión se desencadena una serie de eventos que provocan su hemólisis inmune. Estos eventos pueden subdividirse en tres fases:

1. En la primera fase ocurre la unión de los autoanticuerpos o aloanticuerpos a los antígenos eritrocitarios, con la activación del complemento o sin ella. Los factores más importantes en esta etapa son la clase de inmunoglobulina y la subclase de IgG de los anticuerpos involucrados en la reacción.
2. En la segunda fase, los eritrocitos opsonizados interactúan con los fagocitos mononucleares por los receptores para el fragmento Fc de la inmunoglobulina o los receptores para el fragmento C3b del complemento.
3. En la última fase, los mediadores inflamatorios producidos en las dos primeras actúan sobre una variedad de células y causan de esta forma las manifestaciones clínicas de la hemólisis.

En dependencia de la clase de Ig de los anticuerpos y el sitio de destrucción de los eritrocitos, la hemólisis inmune puede ser intravascular o extravascular.

**Tabla 6.2** Antígenos de los grupos sanguíneos eritrocitarios

Sistemas		Número del antígeno									
		001	002	003	004	005	006	007	008	009	010
001	ABO	A	B	A, B	A1						
002	MNS	M	N	S	s	U	He	Mi <sup>a</sup>	M <sup>c</sup>	Vw	Mur
003	P	P1									
004	RH	D	C	E	c	e	f	Ce	C <sup>w</sup>	C <sup>x</sup>	V
005	LU	Lu <sup>a</sup>	Lu <sup>b</sup>	Lu3	Lu4	Lu5	Lu6	Lu7	Lu8	Lu9	*
006	KEL	K	k	Kp <sup>a</sup>	Kp <sup>b</sup>	Ku	Js <sup>a</sup>	Js <sup>b</sup>	*	*	UJ <sup>a</sup>
007	IE	Le <sup>a</sup>	Le <sup>b</sup>	Le <sup>ab</sup>	Le <sup>bH</sup>	ALe <sup>b</sup>	BL <sup>e</sup>				
008	FY	Fy <sup>a</sup>	Fy <sup>b</sup>	Fy3	Fy4	Fy5	Fy6				
009	JK	Jk <sup>a</sup>	Jk <sup>b</sup>	Jk3							
010	DI	Di <sup>a</sup>	Di <sup>b</sup>	Wr <sup>a</sup>	Wr <sup>b</sup>	Wd <sup>a</sup>	Rb <sup>a</sup>	WARR	ELO	Wu	Bp <sup>a</sup>
011	YT	Yt <sup>a</sup>	Yt <sup>b</sup>								
012	XG	X <sup>a</sup>									
013	SC	Sc1	Sc2	Sc3							
014	DO	Do <sup>a</sup>	Do <sup>b</sup>	Gy <sup>a</sup>	H <sub>y</sub>	Jo <sup>a</sup>					
015	CO	Co <sup>a</sup>	Co <sup>b</sup>	Co3							
016	LW	LW	*	*	*	*	LW <sup>a</sup>	LW <sup>ab</sup>	LW <sup>b</sup>		
017	CH/RG	Ch1	Ch2	Ch3	Ch4	Ch5	Ch6	WH			
018	H	H									
019	XK	Kx									
020	GE	*	Ge2	Ge3	Ge4	Wb	Ls <sup>a</sup>	An <sup>a</sup>	Dh <sup>a</sup>		
021	CROM	Cr <sup>a</sup>	Tc <sup>a</sup>	Tc <sup>b</sup>	Tc <sup>c</sup>	Dr <sup>a</sup>	Es <sup>a</sup>	IFC	WES <sup>a</sup>	WES <sup>b</sup>	UMC
022	KN	Kn <sup>a</sup>	Kn <sup>b</sup>	McC <sup>a</sup>	SI <sup>a</sup>	Yk <sup>a</sup>					
023	IN	In <sup>a</sup>	In <sup>b</sup>								
024	OK	Ok <sup>a</sup>									
025	RAPH	MER2									

Sistemas		Número del antígeno									
		011	012	013	014	015	016	017	018	019	020
002	MNS	M <sup>g</sup>	Vr	M <sup>c</sup>	Mt <sup>a</sup>	St <sup>a</sup>	Ri <sup>a</sup>	Cl <sup>a</sup>	Ny <sup>a</sup>	Hut	Hil
004	RH	E <sup>w</sup>	G	*	*	*	*	Hr <sub>o</sub>	Hr	hr <sup>s</sup>	VS
005	LU	Lu11	Lu12	Lu13	Lu14	*	Lu16	Lu17	Au <sup>a</sup>	Au <sup>b</sup>	Lu20
006	KEL	K11	K12	K13	K14	*	K16	K17	K18	K19	Km
010	DI	Mo <sup>a</sup>	Hg <sup>a</sup>	Vg <sup>a</sup>	Sw <sup>a</sup>	BOW	NFLD	Jn <sup>a</sup>	KREP	Tr <sup>a</sup> **	
017	CH/RG	Rg1	Rg2								

Sistemas		Número del antígeno									
		021	022	023	024	025	026	027	028	029	030
002	MNS	M <sup>v</sup>	Far	s <sup>D</sup>	Mit	Dantu	Hop	Nob	En <sup>a</sup>	ENKT	'N'
004	RH	C <sup>G</sup>	CE	D <sup>w</sup>	*	*	c-like	cE	hr <sup>H</sup>	Rh29	Go <sup>a</sup>
006	KEL	Kp <sup>C</sup>	K22	K23	K24	VLAN	TOU				

**Tabla 6.2** Continuación

Sistemas		Número del antígeno									
		031	032	033	034	035	036	037	038	039	040
002	MNS	Or	DANE	TSEN	MINY	MUT	SAT	ERIK	Os <sup>a</sup>	ENEP	ENEH
004	RH	hr <sup>B</sup>	Rh32	Rh33	Hr <sup>B</sup>	Rh35	Be <sup>a</sup>	Evans	*	Rh39	Tar

Sistemas		Número del antígeno									
		041	042	043	044	045	046	047	048	049	050
002	MNS	HAG	ENAV	MARS							
004	RH	Rh41	Rh42	Crawford	Nou	Riv	Sec	Dav	JAL	STEM	FPTT

Sistemas		Número del antígeno	
		051	052
004	RH	MARC	BARC

**Leyenda**

\* Antígenos obsoletos.

\*\* Provisional.

## MECANISMO DE LA HEMÓLISIS INTRAVASCULAR

El mecanismo de la hemólisis intravascular es característico de los anticuerpos de la clase IgM, fijadores de complemento por la vía clásica, en especial de los anti-A y anti-B. Ocurre, por ejemplo, cuando por error se administran eritrocitos de grupo A o B a receptores de grupo O. La hemólisis, en este caso, ocurre en el sitio de administración, o sea, dentro del vaso sanguíneo, de ahí su nombre de hemólisis intravascular.

La fijación del complemento por los anticuerpos IgM provoca la destrucción de los eritrocitos a partir de la unión del complejo de ataque a la membrana. Debido a la activación del complemento, se liberan las anafilotoxinas C3a y C5a, que son las responsables de los signos y síntomas de la hemólisis intravascular. Estas actúan sobre los fagocitos mononucleares y los neutrófilos, y activan a su vez a los basófilos, para la liberación de mediadores de sus gránulos como la histamina, el factor de activación plaquetario, el factor de necrosis tumoral alfa (FNT $\alpha$ ) y las interleucinas, leucotrienos y prostaglandinas. En adición, las células fagocíticas extravasculares se activan *per se* por la fagocitosis y por el C5a, con la secreción consecuente de los mediadores de la respuesta inflamatoria aguda.

Estos mediadores incrementan la vasodilatación, que provoca la hipotensión y la falla renal. La liberación de los fosfolípidos de los eritrocitos por la hemólisis, así como la activación del complemento, activan la vía extrínseca de la coagulación y contribuyen al desarrollo de la coagulación intravascular diseminada (CID).

## MECANISMO DE LA HEMÓLISIS EXTRAVASCULAR

La hemólisis extravascular es causada por los autoanticuerpos o aloanticuerpos de las clases IgG e IgA, fijadores o no del complemento, y los eritrocitos son secuestrados en el hígado o el bazo, en dependencia de las inmunoproteínas presentes en los eritrocitos. Los eritrocitos recubiertos con IgG fijadora del complemento escapan a la destrucción intravascular debido a la acción de las proteínas inactivadoras del C3 y a los factores H e I del plasma.

La adherencia de los eritrocitos con autoanticuerpos o aloanticuerpos de las clases IgG e IgA se realiza a través de los receptores para el fragmento Fc (RFcy y RFc $\alpha$ ) de estas inmunoglobulinas y por los receptores para el C3b y el C3bi presentes en los macrófagos.

Esta interacción lleva a la fagocitosis o a la citotoxicidad de los eritrocitos. La fagocitosis lisa los eritrocitos por los radicales de oxígeno liberados como resultado del estallido respiratorio. La citotoxicidad es mediada por las enzimas lisosomales liberadas por los fagocitos.

Los eritrocitos en los que se detecta IgG pero no C3, son predominantemente destruidos en el bazo. Aquellos en los que se detectan ambos tipos de inmunoproteínas, son secuestrados en el hígado y el bazo. Los macrófagos del hígado con receptores para el fragmento C3b no son eficientes en la destrucción de eritrocitos con C3b unido sin inmunoglobulinas.

Es conocido que los receptores para el fragmento Fc de la IgG pueden unir tanto la IgG libre en el plasma como la unida a una célula. En el bazo, la concentración de eritrocitos es alta y la de plasma es reducida, o sea, que existen pequeñas concentraciones de IgG libre. Por tanto, la destrucción de células con IgG unida es eficiente.

Los eritrocitos recubiertos con anticuerpos de la clase IgA son secuestrados en el bazo por un mecanismo similar al de la IgG a través de los receptores para el fragmento Fc de esta inmunoglobulina (RFc $\alpha$ ).

En la hemólisis extravascular también hay producción de citocinas que son de 2 tipos, las que aparecen en grandes concentraciones (valores del nivel de ng/mL en 24 horas) como la IL-8 y otras producidas en niveles menores (valores de 100 pg/mL) como la IL-1B, IL-6 y el FNT $\alpha$ . Este último es de presentación tardía y queda circunscrito al sitio de destrucción, fundamentalmente en el bazo. Tanto la IL-1B como la IL-6 producidas por los macrófagos como respuesta a la presencia de eritrocitos recubiertos de IgG, aumentan sus niveles de forma progresiva hasta aproximadamente los 100 pg/mL. Al ser estos 2 factores de crecimiento y diferenciación de la célula B, la estimulan para la producción de aloanticuerpos y autoanticuerpos que se asocia a menudo con la hemólisis extravascular.

Uno de los aspectos característicos de la hemólisis mediada por IgG es la producción de un inhibidor de la IL-1 o receptor antagonista de la IL-1, la IL-1<sup>ra</sup>. Los niveles de esta aparecen de forma paralela a los de IL-1B, a pesar de que la expresión de la IL-1 precede a los de la IL-1<sup>ra</sup>. Al parecer, la producción de este antagonista es un fenómeno relacionado con el estímulo de los eritrocitos recubiertos de IgG, más que una respuesta autocrina inducida por la producción de IL-1. Este relativo balance entre la IL-1 y su antagonista

es la causa de la variabilidad clínica de la hemólisis extravascular.

## **SISTEMAS DE LOS GRUPOS SANGUÍNEOS ABO, HH, LEWIS, P Y LOS ANTÍGENOS II**

Los antígenos de los grupos sanguíneos ABO, Hh, Lewis, P e Ii son moléculas de carbohidratos y es el producto de las enzimas glicosiltransferasas que están codificadas genéticamente. Los antígenos se forman cuando las transferasas añaden los azúcares sobre los oligosacáridos. El azúcar añadido le confiere la especificidad antigénica a la cadena de oligosacáridos, por lo que se le denomina azúcar inmunodominante. Los oligosacáridos son cadenas de azúcares unidas a proteínas (glicoproteínas), esfingolípidos (glicoesfingolípidos) o lípidos (glicolípidos). Las glicoproteínas están asociadas con las membranas de los eritrocitos y de otras células. Las glicoproteínas con actividad de grupo sanguíneo pueden encontrarse también de forma soluble en el plasma y las secreciones. Los glicolípidos se encuentran en forma soluble en el plasma pero no en las secreciones.

### **SISTEMAS ABO Y Hh**

En 1900, Karl Landsteiner descubrió los antígenos A y B del sistema de grupos sanguíneos ABO y sus correspondientes anticuerpos. Este sistema tiene la característica de que en el suero de cualquier individuo se demuestran los anticuerpos contra los antígenos que no posee, condición que solo se observa en este sistema de grupos sanguíneos. Los antígenos A y B se detectan en los eritrocitos fetales de solo 6 semanas, pero no alcanzan su máxima expresión hasta los 3 años de edad. Los antígenos ABO se encuentran también en las plaquetas y los linfocitos. Debido a que los antígenos ABO se demuestran en muchos de los tejidos del organismo, son conocidos como antígenos de histo-grupo-sanguíneos. Este sistema fue el primero en descubrirse y se considera el de mayor importancia transfusional, debido a que la incompatibilidad ABO provoca hemólisis intravascular severa.

### **FENOTIPOS DEL SISTEMA ABO**

Los fenotipos dentro del sistema ABO destacan los grupos sanguíneos A, B, O y AB, que presentan una distribución variable entre los diferentes grupos raciales. Las determinaciones de este grupo incluyen

el empleo de reactivos hemoclasificadores anti-A, anti-B y anti-AB para la detección de los antígenos específicos en los eritrocitos, así como la determinación de los anticuerpos séricos con el empleo de eritrocitos de fenotipo ABO conocido (tabla 6.3).

## SUBGRUPOS DEL SISTEMA ABO

Los fenotipos A y B se dividen en subgrupos de acuerdo con su reacción con los sueros hemoclasificadores anti-A, anti-B y anti-AB, así como con las lectinas anti-A<sub>1</sub>, obtenidas a partir de semillas de *Dolichos biflorus*, y anti-H extraída de semillas de *Ulex europaeus*. Para su clasificación es también importante la determinación de los antígenos A, B y H en la saliva y de la reacción del suero con los eritrocitos de fenotipo A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B y O. Los subgrupos de A y B muestran diferencias cuantitativas debido a que poseen una disminución de los sitios antigénicos por eritrocitos. También se invocan diferencias cualitativas, ya que ocasionalmente se detectan anticuerpos contra los antígenos A y B comunes (tabla 6.4).

**Tabla 6.3** Determinación del grupo sanguíneo ABO

Reactivos		Suero frente a eritrocitos			Interpretación
anti-A	anti-B	A <sub>1</sub>	B	O	
0	0	+	+	0	O
+	0	0	+	0	A
0	+	+	0	0	B
+	+	0	0	0	AB

Los subgrupos más comunes se encuentran dentro del grupo sanguíneo A. Los dos subgrupos principales son A<sub>1</sub>, A<sub>1</sub>B y A<sub>2</sub>, A<sub>2</sub>B que corresponden al 80 y al 20 % de los grupos A y AB, respectivamente. Los genes A<sup>1</sup> y A<sup>2</sup> determinan distintas transferasas que median diferencias tanto cualitativas como cuantitativas entre los fenotipos A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>. Las distinciones serológicas entre A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> se realizan con los reactivos anti-A<sub>1</sub> y anti-H. El anti-A<sub>1</sub> aglutina los eritrocitos A<sub>1</sub> y A<sub>1</sub>B pero no los eritrocitos A<sub>2</sub> y A<sub>2</sub>B; el reactivo anti-H aglutina los eritrocitos A<sub>2</sub> y A<sub>2</sub>B; y no reconoce a los eritrocitos A<sub>1</sub> y A<sub>1</sub>B. En el suero del 1 al 8 % de las personas de grupo A<sub>2</sub> y del 22 al 35 % de las de grupo A<sub>2</sub>B se detectan aloanticuerpos anti-A<sub>1</sub>. El anti-A<sub>1</sub> puede causar discrepancias en la determinación del grupo ABO y en las pruebas de compatibilidad pretransfusionales. Los anticuerpos anti-A<sub>1</sub> reaccionan mejor o únicamente a temperaturas inferiores a 37 °C y no se consideran de importancia transfusional, a menos que sean hemolíticos a 37 °C. La detección de rutina de estos anticuerpos (anti-A<sub>1</sub>) en los pacientes o en los donantes de sangre de grupo A es innecesaria. Los restantes subgrupos de A y B se identifican solo ocasionalmente y tienen poca importancia para la transfusión. Los subgrupos de A son muy útiles para el control de los reactivos hemoclasificadores policlonales y monoclonales anti-A. La distribución de los subgrupos de A también es diferente entre los distintos grupos raciales. Las frecuencias de estos dentro de la población cubana se muestran en la tabla 6.5.

**Tabla 6.4** Hallazgos serológicos en los subgrupos de A y B del sistema ABO

Subgrupos	Reactivos					Suero frente a eritrocitos				
ABO	anti-A	anti-B	anti-AB	anti-H	anti-A <sub>1</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	B	O	saliva
A <sub>1</sub>	4+	0	4+	0	4+	0	0	4+	0	A, H
A <sub>int</sub>	4+	0	4+	3+	2+	0	0	4+	0	A, H
A <sub>2</sub>	4+	0	4+	2+	0	*	0	4+	0	A, H
A <sub>3</sub>	2+	0	2+	3+	0	*	0	4+	0	A, H
A <sub>m</sub>	0/+	0	0/+	4+	0	0	0	4+	0	A, H
A <sub>x</sub>	0/+	0	1+	4+	0	2+/0	0	4+	0	H
A <sub>el</sub>	0	0	0	4+	0	2+/0	0	4+	0	H
B	0	4+	4+	0		4+	4+	0	0	B, H
B <sub>3</sub>	0	1+	2+	4+		4+	4+	0	0	B, H
B <sub>m</sub>	0	0	0/+	4+		4+	4+	0	0	B, H
B <sub>x</sub>	0	0/+	0/+	4+		4+	4+	0	0	H

### Leyenda

\* Puede detectarse anti-A<sub>1</sub>.

**Tabla 6.5** Frecuencia de los grupos sanguíneos ABO en donantes de sangre cubanos

Fenotipos	Blancos (%) n = 1261	Mestizos (%) n = 569	Negros (%) n = 277	General (%) n = 2107
O	45,84	55,18	50,91	49,03
A <sub>1</sub>	32,35	24,08	13,72	27,67
A <sub>2</sub>	8,09	6,32	13,00	8,26
A <sub>int</sub>	0,63	0,35	1,44	0,66
A <sub>el</sub>	0,16	0	0	0,09
B	10,00	10,90	17,33	11,20
A <sub>1</sub> B	2,22	2,64	1,80	2,28
A <sub>2</sub> B	0,71	0,53	1,80	0,81

## ANTICUERPOS DEL SISTEMA ABO

Los anticuerpos del sistema ABO se reconocen como anticuerpos naturales, aunque estos se producen rápidamente después del nacimiento por exposición, tras la ingestión o inhalación de sustancias antigénicas presentes en los polisacáridos bacterianos, en los alimentos y en el polen. Comúnmente los individuos poseen los anticuerpos anti-A o anti-B que están ausentes de sus eritrocitos. Esto permite determinar el grupo ABO del individuo por la detección de estos en el suero. Los anticuerpos anti-A y anti-B se detectan alrededor de los 4 a los 6 meses de edad, se incrementan en su concentración entre los 5 y los 10 años de edad y declinan en edades muy avanzadas. Los anticuerpos de este sistema incluyen los anti-A, anti-B y anti-AB. Este último es producido por las personas de grupo O y reacciona con estructuras comunes a los antígenos A y B, por lo que no pueden separarse las actividades anti-A de las anti-B. Estos anticuerpos anti-AB son muy útiles para la detección de los subgrupos A<sub>x</sub> y B<sub>x</sub>, ya que estos son únicamente aglutinados por los anti-AB y no por los anti-A y anti-B.

Los anticuerpos naturales anti-A y anti-B son predominantemente de la clase IgM, aunque pueden detectarse pequeñas concentraciones de IgG. Los anticuerpos anti-AB son generalmente de la clase IgG; por este motivo los recién nacidos de madres de grupo O tienen más riesgos de padecer de enfermedad hemolítica por incompatibilidad ABO que aquellos de madres de grupos A o B. Ambas clases de anticuerpos aglutinan los eritrocitos preferentemente a temperatura ambiente (20-24 °C) y activan con eficiencia el complemento a 37 °C. Los anticuerpos inmunes son de la clase IgG y se producen como respuesta a inmunizaciones trasplacentarias, a la inyección deliberada de sustancias de grupo sanguíneo para la producción de reactivos hemoclasificadores o por la transfusión accidental de eritrocitos ABO incompatibles.

Los anticuerpos anti-A, anti-B, anti-AB de la clase IgA están también presentes en el calostro, la saliva y las lágrimas.

## DETERMINACIÓN DEL GRUPO SANGUÍNEO ABO

Para la determinación del grupo sanguíneo ABO se requiere del empleo de los reactivos hemoclasificadores anti-A, anti-B y anti-AB, y de eritrocitos de fenotipo A<sub>1</sub> y B para el tipaje sérico o grupo reverso. Las determinaciones de rutina, tanto en los pacientes como en los donantes de sangre, deben incluir las determinaciones del antígeno en los eritrocitos y en el grupo sérico y los resultados deben ser coincidentes. Para confirmar el tipaje ABO de una unidad de sangre ya previamente clasificada, solo es necesario realizar el tipaje celular, así como para la determinación del grupo sanguíneo de niños menores de 4 años de edad, en los que los anticuerpos no son aún detectables. Las técnicas de determinación del grupo sanguíneo ABO incluyen los procedimientos en láminas, tubos y microplacas. Sin embargo, las técnicas de láminas no se recomiendan debido a que pueden no detectar expresiones débiles de los antígenos o anticuerpos en bajas concentraciones. En ocasiones, es necesario incluir eritrocitos A<sub>2</sub> para el grupo reverso cuando se sospecha la presencia de anticuerpos anti-A<sub>1</sub>. Los eritrocitos de grupo O deben formar parte de las determinaciones de anticuerpos para la detección de aloanticuerpos reactivos a temperatura ambiente que puedan interferir con las determinaciones o alerten sobre la presencia de estos.

## DISCREPANCIAS EN LAS DETERMINACIONES DEL GRUPO SANGUÍNEO ABO

Raramente se observan discrepancias o dificultades en la determinación del grupo sanguíneo ABO. Se

aprecian cuando no hay coincidencia entre el grupo celular y el serológico. Por otra parte, pueden observarse expresiones débiles de los antígenos, que imposibilitan la determinación exacta del fenotipo. Cuando esto ocurre, se hace necesario recurrir al empleo de procedimientos más complejos como son los estudios de adsorción-elución y, en algunos casos, hasta las determinaciones de las transferasas séricas para la confirmación del fenotipo. Algunas de las discrepancias más comunes se describen en la tabla 6.6.

De ser preciso la transfusión urgente en un paciente en que no sea posible la determinación del grupo ABO rápidamente, se debe transfundir concentrado de eritrocitos de grupo O y, si es necesario, un derivado plasmático, que será de grupo AB. Deberá extraerse una muestra de sangre al paciente, previa a la transfusión, para concluir los estudios de grupo ABO.

## FENOTIPOS DEL SISTEMA Hh

Aunque muchas de las características del sistema Hh han sido tratadas en el acápite acerca del

sistema ABO, es importante precisar los hallazgos no comentados anteriormente. El sistema H tiene dos genes, H y h y un antígeno, H. La concentración de antígeno H en los eritrocitos de los diferentes fenotipos, sigue un orden decreciente como sigue:  $O > A_2 > B > A_2B > A_1 > A_1B$ . Los individuos que son homocigóticos para el gen h no presentan antígeno H en los eritrocitos y se conocen como fenotipo Bombay u  $O_h$ . Los eritrocitos de este raro fenotipo no son aglutinados por anti-A, anti-B, anti-AB o anti-H y presentan en su suero anti-A, anti-B y anti-H. Genéticamente pueden haber heredado los genes A y/o B pero no son capaces de expresarse por la ausencia de la sustancia H precursora en sus eritrocitos. Este fenotipo se descubre cuando al mezclar el suero con eritrocitos de grupo O en el grupo reverso aparece una aglutinación inmediata y sus eritrocitos no reaccionan con anti-H obtenido a partir de la lectina de *Ulex europaeus*. El anti-H de los individuos  $O_h$  reacciona en un rango de 4 a 37 °C con todos los eritrocitos excepto con los eritrocitos  $O_h$ . Los individuos de este grupo tienen que transfundirse con eritrocitos del mismo fenotipo.

En raras ocasiones, en los individuos de grupo  $A_1$  y  $A_1B$  pueden demostrarse anti-H, pero estos anticuerpos

**Tabla 6.6** Algunas discrepancias en las determinaciones de los grupos sanguíneos ABO

	Tipaje celular	Grupo reverso
<b>Reacción positiva inesperada</b>	Antígeno B adquirido asociado con cáncer gástrico y de colon	Aumento de proteínas en el plasma en pacientes con gammapatía monoclonal
	Presencia de gelatina de Wharton en la sangre del cordón	Presencia de aloanticuerpos, por ejemplo: anti-M, anti-N, anti- $P_1$
	Autoaglutinación por autoanticuerpos fríos	Autoanticuerpos fríos, por ejemplo: anti-I, anti-IH
	Eritrocitos con PAD positiva	Anticuerpos ABO adquiridos pasivamente
	Fenómeno de poliaglutinación Anticuerpos contra la acriflavina usada como colorante del anti-B Trasplante de médula ósea Reacción transfusional ABO incompatible	Subgrupo de A con anti- $A_1$
<b>Reacción negativa inesperada</b>	Subgrupos de A y B	Recién nacidos y ancianos
	Depresión de los antígenos ABO en la leucemia y otras enfermedades	Hipogammaglobulinemia
	Aumento de sustancia ABO soluble en el plasma asociada con quiste de ovario pseudomucinoso	Inmunosupresión



reaccionan solo a temperatura ambiente o a temperaturas más bajas y no se consideran clínicamente importantes para la transfusión.

## SISTEMA LEWIS

El sistema Lewis tiene dos genes, Le y le, y dos antígenos principales, el Le<sup>a</sup> y el Le<sup>b</sup>. Los antígenos del sistema Lewis se producen a partir de la misma cadena precursora de tipo 1 que los antígenos ABO solubles. A diferencia de los antígenos ABO, los antígenos del sistema Lewis no se sintetizan directamente en la membrana de los eritrocitos, sino que se expresan en los glicoesfingolípidos y son adsorbidos del plasma a los eritrocitos. Al igual que los antígenos ABO, estos antígenos se distribuyen en todos los fluidos corporales y tejidos, y son de importancia clínica en el trasplante de órganos. Al nacimiento, los antígenos Lewis no están bien expresados en los eritrocitos, por lo que los eritrocitos del cordón umbilical resultan ser Le (a-b-). La frecuencia de los fenotipos más comunes se muestra en la tabla 6.7.

**Tabla 6.7** Fenotipos del sistema Lewis

Reactivos		Fenotipos	Frecuencias fenotípicas (%)	
anti-Le <sup>a</sup>	anti-Le <sup>b</sup>		Caucásicos	Africanos
+	0	Le (a+b-)	22	23
0	+	Le (a-b+)	72	55
0	0	Le (a-b-)	6	22
+	+	Le (a+b+)	Infrecuente	Infrecuente

## ANTICUERPOS DEL SISTEMA LEWIS

Tanto los anti-Le<sup>a</sup> como los anti-Le<sup>b</sup> son anticuerpos naturales de la clase IgM. La temperatura óptima de reacción es la temperatura ambiente, aunque algunos anti-Le<sup>a</sup> pueden reaccionar a 37 °C. También se puede observar hemólisis *in vitro* por algunos anti-Le<sup>a</sup>. Se han reportado algunas reacciones hemolíticas por anti-Le<sup>a</sup>, no así por anti-Le<sup>b</sup>. Se recomienda que estos anticuerpos se consideren de importancia clínica si son capaces de provocar hemólisis *in vitro* de los eritrocitos o si reaccionan fuertemente en la prueba de antiglobulina (Coombs) y, por lo tanto, se le administrarán al paciente eritrocitos carentes del antígeno específico. De no tener disponibles eritrocitos compatibles, puede administrarse, antes de la transfusión de estos, plasma que contenga antígenos Lewis solubles para neutralizar a los anticuerpos. Los anticuerpos de este sistema no

provocan enfermedad hemolítica del recién nacido (EHRN), ya que en su mayoría son de la clase IgM y los antígenos Lewis están muy poco expresados en los eritrocitos de los recién nacidos.

## ANTÍGENOS I E i

Al igual que los antígenos A, B, H y Lewis, los antígenos I e i se derivan de los glicoesfingolípidos o de las glicoproteínas asociados con las membranas. Estos antígenos no están codificados por genes alélicos, por lo que no se les considera como un sistema de grupos sanguíneos. La actividad del antígeno i se asocia con estructuras H lineales, mientras que el antígeno I se asocia con estructuras H ramificadas. Se ha sugerido que el gen I codifica para una enzima responsable de ramificar las cadenas H y producir el antígeno I. Los eritrocitos del cordón son I- i+. Desde el nacimiento hasta los 18 meses, la expresión del antígeno i decrece gradualmente y la del antígeno I aumenta hasta llegar a su máxima expresión en los eritrocitos del adulto que son I+ i-. Algunos individuos adultos no desarrollan el fenotipo I+ i- y se mantienen como i+ I-, se clasifican como fenotipo i<sub>adulto</sub>. Al parecer esto se debe a la herencia de un patrón recesivo. En la tabla 6.8 se muestran los fenotipos de los antígenos Ii. El antígeno I también se demuestra en los leucocitos y en las plaquetas además de en los fluidos corporales.

**Tabla 6.8** Fenotipos asociados con los antígenos Ii

Fenotipos	Temperatura	anti-I	anti-i
I <sub>adulto</sub>	4 °C	4+	0-1+
i <sub>cordón</sub>		0-2+	3+
i <sub>adulto</sub>		0-1+	4+
I <sub>adulto</sub>	22 °C	2+	0
i <sub>cordón</sub>		0	2-3+
i <sub>adulto</sub>		0	0

## ANTICUERPOS ANTI-I Y ANTI-i

Los anticuerpos anti-I pueden identificarse como aloanticuerpos o como autoanticuerpos, su rango óptimo de temperatura es inferior a 22 °C. Los aloanti-I son muy poco frecuentes debido a que se identifican como anticuerpos naturales de las clases IgM e IgG en individuos de fenotipo i<sub>adulto</sub> y este fenotipo es extremadamente raro.

Los autoanti-I es común encontrarlos como aglutininas frías de la clase IgM de bajo título en la mayoría de los individuos sanos. Estos autoanticuerpos pueden convertirse en patogénicos y provocar síndrome de aglutininas frías. La presencia de anti-I de altos títulos se asocia con la infección por *Mycoplasma pneumoniae*. La asociación de estos autoanticuerpos con enfermedades autoinmunes se describe en el acápite de anemias hemolíticas autoinmunes.

Los anticuerpos anti-i son muy poco frecuentes, pero se han encontrado autoanti-i potentes en el suero de los pacientes con mononucleosis infecciosa y en pacientes con cirrosis hepática causada por alcoholismo. No se ha reportado la presencia de aloanti-i. Se han descrito también anticuerpos contra antígenos compuestos como anti-IA, anti-IB, anti-IH e ILe<sup>bH</sup> que reaccionan únicamente con eritrocitos que poseen ambos antígenos.

## SISTEMA P Y ANTÍGENOS RELACIONADOS

El sistema P contiene un solo antígeno originalmente denominado P, pero clasificado con posterioridad como P<sub>1</sub>. Se llama P a un antígeno presente en casi todos los eritrocitos humanos. Los antígenos p, P<sub>1</sub><sup>k</sup>, P<sub>2</sub><sup>k</sup> y LKE (Luke), antes considerados parte del sistema P, han sido asignados a la colección de antígenos globósidos. Los eritrocitos que no poseen el antígeno P<sub>1</sub>, pero presentan P, son del fenotipo P<sub>2</sub>. El antígeno P<sub>1</sub> está presente en los eritrocitos del 79 % de los individuos blancos y en el 94 % de los negros. Los antígenos P, P<sub>1</sub> y P<sup>k</sup> se encuentran en los eritrocitos, plaquetas, leucocitos y fibroblastos. Los antígenos P y P<sup>k</sup> también están en el plasma (tabla 6.9).

Varios fenotipos raros se asocian con el sistema de grupos sanguíneos P. El fenotipo P<sup>k</sup> ocurre cuando el antígeno P<sup>k</sup> no es convertido en P. Muy pocas personas carecen de los antígenos P<sub>1</sub>, P y P<sup>k</sup> y se dice que estos individuos son del fenotipo p. Los eritrocitos de los fenotipos P<sub>1</sub><sup>k</sup> y P<sub>2</sub><sup>k</sup> son aglutinados por la bacteria causante de la meningitis (*Streptococcus suis*). El antígeno P

es el receptor para el parvovirus B19, el cual puede ocasionar crisis aplásticas. Los individuos de fenotipo p son resistentes a la infección por este agente.

## SISTEMAS DE GRUPOS SANGUÍNEOS Rh Y LW

Debido a la relación histórica que tienen estos dos sistemas desde su descubrimiento, serán abordados en un solo acápite, aunque hoy se conoce que entre ellos sólo existe una asociación fenotípica.

El descubrimiento del sistema Rh se le atribuye a Landsteiner y Wiener, en 1940, a partir de sus experimentos con animales al inmunizar conejos con eritrocitos del mono *Macacus rhesus*. Los anticuerpos obtenidos aglutinaban los eritrocitos del 85 % de los individuos y se planteó que estos eran portadores del factor Rh, o sea, Rh positivos. Al 15 % restante se le clasificó como Rh negativos. Posteriormente se reportó que los anticuerpos anti-Rh obtenidos en conejos, eran de igual especificidad a los encontrados por Levine y Stelson en 1939, en una puérpera con un hijo afectado por EHRN. De esta forma, se describió el conflicto materno fetal por incompatibilidad Rh. Investigaciones ulteriores demostraron que los anticuerpos obtenidos en conejos por inmunización con eritrocitos del mono *Macacus rhesus* reconocían antígenos diferentes a lo que hoy se conoce como el antígeno RhD y se les agrupó en un nuevo sistema denominado con las iniciales de sus descubridores (LW). El sistema Rh, en la actualidad, es el sistema de grupos sanguíneos eritrocitarios más polimórfico en los humanos y comprende 46 antígenos (tabla 6.2).

## NOMENCLATURA

Desde el descubrimiento del sistema Rh, se han propuesto varias nomenclaturas en concordancia con la teoría genética que pretendía demostrar. La nomenclatura más usada es la de Fisher-Race (CDE), que es

**Tabla 6.9** Fenotipos del sistema P y antígenos relacionados

Reactivos				Fenotipos	Frecuencias fenotípicas (%)	
anti-P <sub>1</sub>	anti-P	anti-P <sup>k</sup>	anti-PP <sub>1</sub> P <sup>k</sup>		Caucásicos	Africanos
+	+	0	+	P <sub>1</sub>	79	94
0	+	0	+	P <sub>2</sub>	21	6
0	0	0	0	p	Muy infrecuente	
+	0	+	+	P <sub>1</sub> <sup>k</sup>		
0	0	+	+	P <sub>2</sub> <sup>k</sup>		

la que se refleja en este capítulo. La nomenclatura de Wiener (Rh-hr) se ubicará entre paréntesis cuando sea necesario su empleo. Rosenfield, en 1962, propuso un sistema numérico para denominar a los antígenos, pero esta notación no es práctica debido a que el número de antígenos aumenta constantemente y es difícil relacionarlos de forma numérica. En la tabla 6.10 se comparan estas tres nomenclaturas.

## ANTÍGENO D

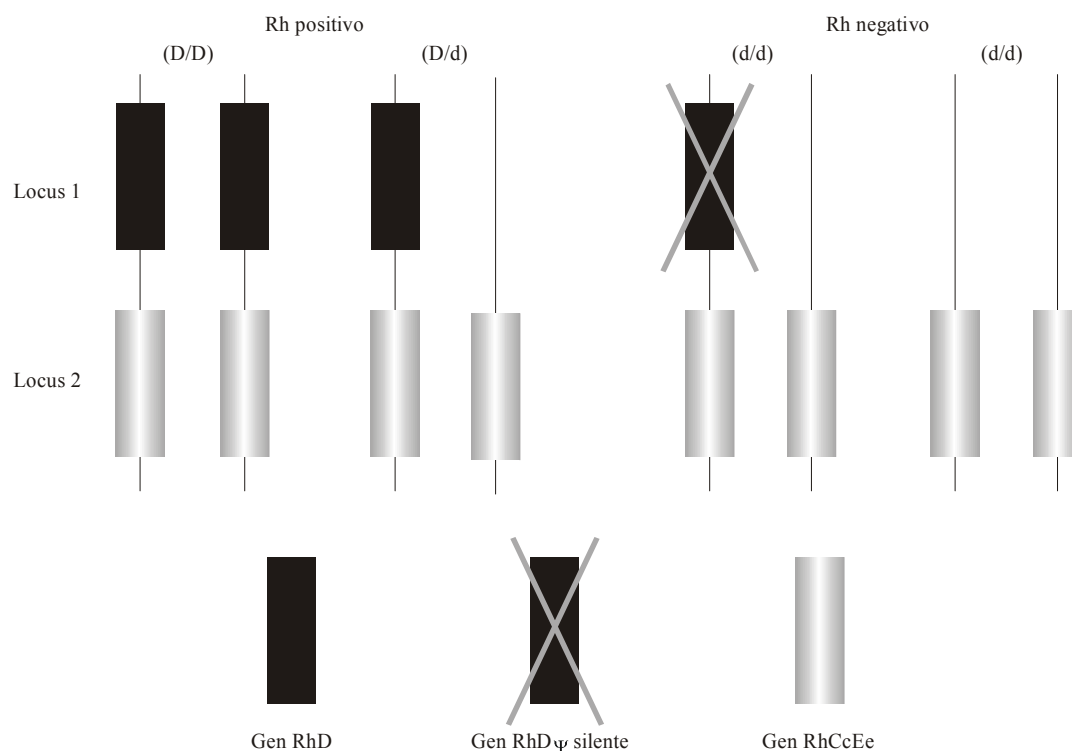
Los términos Rh<sup>+</sup> y Rh<sup>-</sup> hacen referencia únicamente a la presencia o ausencia del antígeno D (Rh<sub>0</sub>) en los eritrocitos. Después de los antígenos A y B del sistema ABO, este antígeno es el de mayor importancia en la práctica transfusional. A diferencia del sistema ABO, los individuos que carecen del antígeno D, o sea los Rh<sup>-</sup>, no presentan anticuerpos anti-D naturales en el suero. La formación de estos anticuerpos se produce por exposiciones a eritrocitos D<sup>+</sup> a través de las transfusiones de sangre o en el embarazo. La inmunogenicidad de este antígeno es tal que el 80 % de los individuos RhD<sup>-</sup> producen anticuerpos anti-D con la transfusión de una unidad de sangre RhD<sup>+</sup>. Estos anticuerpos son los responsables de la EHRN en las embarazadas RhD<sup>-</sup>.

## ANTÍGENOS C, c, E, e

Después del antígeno D, los antígenos C, c, E y e son los más importantes del sistema Rh, ya que están involucrados en más del 99 % de los problemas clínicos relacionados con el sistema Rh. Estos antígenos están representados en todos los individuos, independientemente de la presencia del D, aunque su frecuencia difiere en los individuos Rh<sup>+</sup> y Rh<sup>-</sup>. Los cinco antígenos (D, C, c, E y e) constituyen la base del sistema Rh. La frecuencia de los fenotipos Rh en la población cubana se muestra en la tabla 6.11.

## DETERMINACIÓN DEL FENOTIPO Rh E INFERENCIA DEL GENOTIPO

En la práctica clínica pueden utilizarse los reactivos anti-D, -C, -c y -E, -e para los estudios de fenotipo Rh. En los estudios pretransfusionales de rutina, es únicamente necesaria la determinación del antígeno D. Los otros reactivos se utilizan cuando existen aloanticuerpos en el receptor contra alguno de estos antígenos o para estudios familiares de inferencia del genotipo. La distribución de los antígenos Rh en los eritrocitos constituye el fenotipo Rh (figura 6.1). La



**Figura 6.1** Estructura del *locus* del Rh.

determinación de los antígenos Rh no siempre permite la deducción confiable del genotipo. La presunción del genotipo más probable descansa en el estudio de las frecuencias génicas realizadas en la población y deducidas a partir de los estudios fenotípicos. Las inferencias del genotipo son útiles en estudios de población y para predecir a partir del estudio de la pareja, si el feto presenta el antígeno Rh heredado del

**Tabla 6.10** Notaciones equivalentes del sistema Rh

Notación numérica	Fisher-Race CDE	Wiener Rh-hr	Otras
Rh1	D	Rh <sub>0</sub>	
Rh2	C	rh <sub>0</sub> <sup>'</sup>	
Rh3	E	rh <sub>0</sub> <sup>''</sup>	
Rh4	c	hr <sub>0</sub> <sup>'</sup>	
Rh5	e	hr <sub>0</sub> <sup>''</sup>	
Rh6	ce (f)	hr	
Rh7	Ce	rh <sub>0</sub>	
Rh8	C <sup>W</sup>	rh <sub>0</sub> <sup>W1</sup>	
Rh9	C <sup>X</sup>	rh <sub>0</sub> <sup>X</sup>	
Rh10	ce <sup>s</sup>	hr <sub>0</sub> <sup>V</sup>	V
Rh11	E <sup>W</sup>	rh <sub>0</sub> <sup>W2</sup>	
Rh12	G	rh <sub>0</sub> <sup>G</sup>	
Rh17		Hr <sub>0</sub>	
Rh18		Hr	
Rh19		hr <sup>S</sup>	
Rh20	E <sup>S</sup>		VS
Rh21	C <sup>G</sup>		
Rh22	CE	rh <sub>y</sub>	Jarvis
Rh23	D <sup>W</sup>		Wiel
Rh26	c-like		Deal
Rh27	cE	rh	
Rh28		hr <sup>H</sup>	Hernández
Rh29			Rh total
Rh30	D <sup>Cor</sup>		Go <sup>a</sup>
Rh31		hr <sup>B</sup>	
Rh32			Troll
Rh33			
Rh34		Hr <sup>B</sup>	Bastian
Rh35			1114
Rh36			Be <sup>a</sup>
Rh37			Evans
Rh39	C-like		
Rh40			Targett (Tar)
Rh41	Ce-like		
Rh42	Ce <sup>S</sup>	rh <sup>S</sup>	Thornton
Rh43			Crawford
Rh44			Nou
Rh45			Riv
Rh46			Sec
Rh47			Dav
Rh48			JAL
Rh49			STEM
Rh50			FPTT
Rh51			MAR
Rh52			BARC

padre para el cual la madre presenta anticuerpos capaces de provocar EHRN. Aun cuando en la actualidad todavía se continúa con la inferencia del genotipo por esta metodología, el proceder más confiable es la determinación por técnicas de biología molecular del gen RHD y de los alelos del RHCE. Para los antígenos C, c, E y e es posible determinar la cigocidad por las características de codominancia de estos, no así para el antígeno D, en el que solo puede tenerse evidencia de presencia y ausencia y no es posible inferir por el efecto de dosis los genotipos D/d y D/D. Estos últimos solo pueden estimarse a partir de las frecuencias génicas en la población, pero en ellos influye el origen racial del individuo. Por ejemplo, un individuo blanco con el fenotipo ccDee probablemente sea de genotipo cDe/ce, sin embargo, en un individuo de la raza negra es igualmente probable que sea cDe/cDe que cDe/ce (tabla 6.12).

## EXPRESIÓN DÉBIL DEL ANTÍGENO D

La mayoría de los individuos RhD positivos muestran aglutinación definida con el reactivo anti-D. En ocasiones, los eritrocitos D positivos no reaccionan con los reactivos anti-D en las técnicas convencionales y la detección del antígeno D requiere una incubación prolongada con el anti-D o el empleo de la técnica de antiglobulina (de Coombs). Antiguamente, estos eritrocitos eran considerados como D<sup>u</sup>. Este término ya no es usado, en su lugar se emplea el de D débil, aunque estos eritrocitos son considerados D positivos. Los anticuerpos monoclonales anti-D pueden aglutinar directamente las muestras de eritrocitos considerados como D débiles con los reactivos anti-D policlonales. La frecuencia de D débil es mayor en los pacientes negros que en los blancos.

El D débil se define como un fenotipo que desde el punto de vista cuantitativo, pero no cualitativo, tiene una menor expresión del antígeno D y responde a varias circunstancias genéticas. Algunos genes RhD pueden codificar para una expresión debilitada del antígeno D. Este tipo es común entre los negros y tiene lugar como parte del haplotipo cDe. Otro de los fenómenos bien conocidos es el debilitamiento del antígeno D por la presencia del gen C en posición *trans* con respecto al D, o sea en el cromosoma opuesto. Los eritrocitos que muestran este efecto son generalmente de genotipo CDe/Ce.

Los análisis moleculares de los genes que codifican para el antígeno D débil muestran que estos poseen una secuencia normal, pero una reducción severa en la expresión del ARN<sub>m</sub>, lo que sugiere la ocurrencia de un

**Tabla 6.11** Frecuencia del sistema Rh en donantes de sangre cubanos

Fenotipos	Blancos (%) n = 967	Mestizos (%) n = 407	Negros (%) n = 233	General (%) n = 1607
CcDee	38,78	39,80	30,04	37,77
CCDee	15,92	9,34	3,43	12,45
CcDEe	12,31	13,51	6,87	11,82
ccDee	7,55	14,50	39,92	14,00
ccDEe	4,65	7,62	10,73	6,29
ccDEE	1,34	0,24	0	0,87
CCDEe	0,93	1,72	0,43	1,06
C <sup>w</sup> cDee	1,45	1,47	0,43	1,31
C <sup>w</sup> cDEe	0,83	1,23	0	0,81
C <sup>w</sup> CDee	0,10	0	0	0,06
C <sup>w</sup> CDEE	0,10	0	0	0,06
ccdee	13,55	9,34	8,15	11,70
ccdEe	0,93	0	0	0,56
Ccdee	0,83	0,74	0	0,68
C <sup>w</sup> cdee	0,52	0	0	0,32
CcdEe	0,21	0,49	0	0,25

defecto en el nivel de transcripción o procesamiento del pre-ARN<sub>m</sub>. Otros estudios, sin embargo, encontraron la presencia de mutaciones en los exones del gen RhD. Todas las sustituciones de aminoácidos encontradas se localizaron en las partes intracelulares o transmembranas de la proteína RhD. La mayoría de las sustituciones que se han reportado no son conservadoras y los aminoácidos introducidos, como la prolina en particular, es probable que rompan la estructura secundaria y terciaria de la proteína. No obstante, existen evidencias de que las bases moleculares pueden ser heterogéneas y algunos D débiles pueden portar alelos estructuralmente anormales.

#### ANTÍGENO D DÉBIL EN EL DONANTE DE SANGRE

La posibilidad de que los eritrocitos D débiles puedan estimular la producción de anticuerpos anti-D ha invalidado el uso de los eritrocitos de este fenotipo para la transfusión de los receptores RhD negativos. Al parecer, esta posibilidad es remota, ya que estas formas debilitadas del D son mucho menos inmunogénicas. También es probable que estos eritrocitos sean destruidos si se les transfunde a receptores que presenten anticuerpos anti-D. Las evidencias sobre la inmunogenicidad del D débil son limitadas. Muchos factores

**Tabla 6.12** Determinación del fenotipo Rh

Reactivos					Fenotipos	
anti-D	anti-C	anti-E	anti-c	anti-e	CDE	Rh-Hr
+	+	0	+	+	CcDee	R <sub>1</sub> r
+	+	0	0	+	CCDee	R <sub>1</sub> R <sub>1</sub>
+	+	+	+	+	CcDEe	R <sub>1</sub> R <sub>2</sub>
+	0	0	+	+	CcDee	R <sub>0</sub>
+	0	+	+	+	ccDEe	R <sub>2</sub> r
+	0	+	+	0	ccDEE	R <sub>2</sub> R <sub>2</sub>
+	+	+	0	+	CCDEe	R <sub>1</sub> R <sub>Z</sub>
+	+	+	+	0	CcDEE	R <sub>12</sub> R <sub>Z</sub>
+	+	+	0	0	CCDEE	R <sub>Z</sub> R <sub>Z</sub>
0	0	0	+	+	ccee	Rr
0	+	0	+	+	Ccee	r'r
0	0	+	+	+	ccEe	r''r
0	+	+	+	+	CcEe	r'r''

son necesarios evaluar para dilucidar la importancia clínica de este, como son: el volumen de sangre transfundida, el número de inmunizaciones y la densidad del antígeno D. El empleo de los reactivos anti-D monoclonales ha minimizado estos riesgos, pues actualmente muchos de estos fenotipos se clasifican como RhD positivos. No obstante, es importante la identificación correcta del fenotipo D débil en los donantes de sangre, ya que existen algunas evidencias de inmunización de receptores RhD negativos transfundidos con eritrocitos D débil. Las políticas sobre este tema deben ser definidas en cada país teniendo en cuenta la composición étnica de su población, la frecuencia de este fenotipo y los reactivos de que se dispone para la tipificación RhD.

## ANTÍGENO D DÉBIL EN EL RECEPTOR DE SANGRE

La mayoría de los pacientes con este fenotipo pueden recibir sangre RhD positiva sin riesgos de inmunización, a menos que carezcan de algún epítipo del antígeno D (D parcial). Las políticas actuales con respecto al D débil como receptor de sangre plantean que es innecesario la detección de formas débiles del antígeno en los pacientes. Los centros que disponen de reactivos anti-D monoclonales clasifican a los pacientes D débiles como RhD positivos y los restantes no detectados reciben sangre RhD negativa. En algunos centros se considera esta política como un gasto inútil sangre D negativa y prefieren realizar la detección del D en técnica de antiglobulina a todos los receptores D negativos y, de ser positivos, administrar sangre D positiva. Sin embargo, de seguirse esta alternativa, es importante implementar procedimientos que prevengan una determinación errónea en la técnica de antiglobulina del antígeno D en un paciente D negativo con prueba de antiglobulina directa positiva. Por otra parte, estas determinaciones pueden dar lugar a diferentes interpretaciones del estatus D de un paciente entre un centro y otro, que puede motivar dudas y se pueden hacer reclamaciones.

## ANTÍGENO D PARCIAL

La producción de anti-D en un paciente D positivo se publicó por vez primera en 1953. Al antígeno D presente en estos individuos se le denominó *variantes D* o *D parcial*. Se postuló que los eritrocitos de estos individuos han perdido una parte del mosaico del antígeno D y el anticuerpo anti-D que producen es contra la

parte del antígeno que no está presente en sus células. La clasificación inicial agrupó en 4 categorías, las células carentes de una parte del antígeno D. Usando la notación de Wiener, se denominaban como: Rh<sup>A</sup>, Rh<sup>B</sup>, Rh<sup>C</sup> y Rh<sup>D</sup> o Rh13, Rh14, Rh15 y Rh16. Esta nomenclatura actualmente es obsoleta y ha sido reemplazada por el sistema de categorías de Tippett y Sanger. En un inicio, solo era posible identificar estas categorías cuando individuos D parciales producían anti-D como respuesta a exposiciones con sangre RhD positiva.

Al identificarse anticuerpos anti-D en un individuo RhD positivo, sobre todo cuando son anticuerpos que reaccionan débilmente, es necesario corroborar que no se está en presencia de anticuerpos anti-LW (sistema LW). Estos últimos reaccionan con mayor fortaleza con eritrocitos RhD+ que con RhD- y podría erróneamente clasificarse a un individuo con anti-D como D parcial. Los anti-LW se pueden diferenciar de los anti-D por el tratamiento de los eritrocitos con compuestos sulfidrilos como el ditiotreitól, ya que estos destruyen los antígenos LW y no al antígeno D.

Los anticuerpos monoclonales anti-D humanos producidos en el transcurso de los últimos años han permitido la caracterización de los epítopes del antígeno D, por lo que las células con categorías del D presentan un patrón particular de reactividad con el panel de anticuerpos. Sobre la base de estos resultados se determinó inicialmente que el mosaico del antígeno D tiene 9 epítopes que definen a 6 categorías del D parcial: D<sup>II</sup> a D<sup>VII</sup> (D<sup>I</sup> es obsoleto). Los ensayos más recientes sugieren la presencia de 37 epítopes del antígeno D y al menos 12 categorías del D. Muchos de estos fenotipos aparecen como resultado del entrecruzamiento entre los genes homólogos RhD y RhCE, en los que uno o más exones del gen RhD son reemplazados por el o los exones equivalentes del RhCE. Tal conversión provoca la formación de un gen híbrido que codifica una cadena polipeptídica, la cual ha perdido algunos de los epítopes codificados por el gen RhD, lo que origina el fenotipo D parcial. Este fenotipo puede presentarse, además, por mutación-delección del gen RhD que no se relacionan con el RhCE. Algunas de estas categorías de D parciales presentan antígenos Rh de baja incidencia. Es muy probable que estos antígenos de baja incidencia sean neoantígenos formados por el entrecruzamiento de los genes RhD y RhCE presentes en los fenotipos D parciales ( tablas 6.13 y 6.14).

El fenotipo D parcial siempre involucra una diferencia cualitativa en el antígeno D y en algunas ocasiones coincide con diferencias cuantitativas (D débil parcial). La producción de anti-D en individuos D positivos es rara, excepto para algunas categorías del anti-

**Tabla 6.13** Epítopes del antígeno D identificados con anticuerpos monoclonales anti-D y eritrocitos de fenotipo D parcial

Epítopo	Categorías de D parcial												
	II	IIIa	IIIb	IIIc	IVa	IVb	Va	VI	VII	DFR	DBT	R <sub>0</sub> <sup>Har</sup>	HMi
1	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+
2	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+
3	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+
4	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
5	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+
6	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+
7	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+
8	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+
9	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+
10	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+
11	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
12	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
13	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
14	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
15	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
17	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
18	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+
19	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+
21	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-/+
22	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-/+
23	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+
24	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-
25	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
26	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
27	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
28	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
29	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-
30	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+
31	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
32	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
33	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-
34	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-
35	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+
36	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+
37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+

**Tabla 6.14** Bases moleculares de los fenotipos D parciales codificados por genes híbridos

Derivación del exón del gen RhD y RhCE												Antígenos de baja incidencia
Categorías	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
IIIb	D	Ce	D	D	D	D	D	D	D	D	D	-
IIIc	D	D	CE	D	D	D	D	D	D	D	D	-
IVa*	D	D	CE	D	D	D	CE	D	D	D	D	Go <sup>a</sup> (Rh 30)
IVb	D	D	D	D	D	D	CE	CE	CE	CE	D	Evans ? (Rh 37)
Va	D	D	D	D	CE	D	D	D	D	D	D	D <sup>w</sup> (Rh 23)
VI (tipo I)	D	D	D	cE	cE	D	D	D	D	D	D	-
VI (tipo II)	D	D	D	CE	CE	CE	D	D	D	D	D	Barc
VI (tipo III)	D	D	CE	CE	CE	CE	D	D	D	D	D	Barc
DFR	D	D	D	CE	D	D	D	D	D	D	D	FPTT (Rh 50)
DBT	D	D	D	D	CE	CE	CE	D	D	D	D	Rh 32
R <sup>oHar</sup>	ce	Ce	ce	ce	D	ce	ce	ce	ce	ce	ce	Rh 33
HMi	D	D	cE	cE	cE	D	D	D	D	D	D	-

**Leyenda**

\* Se identifica también una sustitución de aminoácidos no relacionados con la secuencia Rh en el exón 2.

?: no confirmado.

geno D, como la D<sup>VI</sup>. La discriminación serológica de anomalías cualitativas y cuantitativas del antígeno D no se encuentra exenta de motivar conclusiones erradas en las muestras que presentan gran reducción en la densidad del antígeno D.

## ANTICUERPOS DEL SISTEMA Rh

La mayoría de los anticuerpos anti-Rh se producen por la inmunización con eritrocitos en las transfusiones o en los embarazos. Otros, sin embargo, como los anti-E, los anti-C<sup>w</sup> y los anticuerpos contra los antígenos de baja frecuencia, pueden detectarse sin que se conozca el estímulo que los generó. El D es el más inmunogénico de los antígenos del Rh, seguido del c y el E. La mayoría de los anticuerpos anti-Rh son de la clase IgG y se detectan en la prueba de antiglobulina, en un medio albuminoideo y en las técnicas que utilizan enzimas proteolíticas. Estos anticuerpos persisten en el suero por muchos años y, aunque desaparezcan, un estímulo posterior puede incrementar su producción en niveles superiores a los que le precedieron. La presencia de anticuerpos contra cualquier antígeno Rh debe considerarse de importancia clínica tanto para la transfusión de sangre como en las mujeres embarazadas, por el riesgo de provocar enfermedad hemolítica del feto y la del recién nacido (EHRN). De esta forma, los receptores de sangre con aloanticuerpos anti-Rh recibirán eritrocitos carentes del antígeno específico para los anticuerpos séricos. Los eritrocitos recubiertos con anticuerpos anti-Rh son destruidos por mecanismos extravasculares. Los anticuerpos anti-Rh no fijan complemento, aunque en su mayoría son de las subclases IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub>. Los anticuerpos anti-D humanos, obtenidos a partir de donantes inmunizados o de mujeres sensibilizadas, son utilizados en la producción de la inmunoglobulina Rh para la prevención de la EHRN y la del feto.

## DETERMINACIÓN DEL GRUPO SANGUÍNEO RhD

El tipaje Rh de rutina incluye la determinación del antígeno D en los receptores y en los donantes. Debe también realizarse la determinación del D débil en los donantes de sangre supuestamente RhD negativos. La tipificación de los demás antígenos del Rh se realiza únicamente con propósitos justificados como en la búsqueda de sangre compatible para pacientes con aloanticuerpos anti-Rh. Los reactivos para la determinación del antígeno D tradicionalmente se obtienen a partir de donantes con anti-D, cuyo suero después de procesado es enriquecido

con albúmina bovina polimerizada para que los anticuerpos sean capaces de aglutinar los eritrocitos suspendidos en solución salina o en plasma autólogo. En la actualidad, muchos centros utilizan anticuerpos monoclonales humanos anti-D, preferiblemente de la clase IgM, que aglutinan los eritrocitos en un medio salino, son muy específicos y no requieren del empleo de albúmina bovina. Estos anticuerpos provocan una aglutinación más fuerte que los policlonales IgG, pero pueden no aglutinar eritrocitos de fenotipo D débil. Para estos casos es necesario el uso de anticuerpos IgG que pueden ser policlonales o monoclonales.

Las técnicas para el tipaje RhD incluyen el uso de láminas, tubos o microplacas. El empleo de la lámina aunque ampliamente extendido, tiene como inconveniente que esta pueda secarse en la incubación y dar la falsa impresión de una aglutinación. Los procedimientos en tubos y microplacas son más recomendados. La detección del D débil no puede realizarse en lámina, sino que requiere del empleo de la técnica de antiglobulina en tubos o microplacas.

La determinación de antígeno D en recién nacidos con enfermedad hemolítica por incompatibilidad de grupos sanguíneos requiere de un comentario especial. Los eritrocitos de los recién nacidos con enfermedad hemolítica están sensibilizados con anticuerpos, por lo que prefiere el empleo de reactivos anti-D que aglutinen los eritrocitos en solución salina. Los reactivos policlonales usualmente contienen potenciadores de la aglutinación, como la albúmina, que provocan la aglutinación de los eritrocitos recubiertos por anticuerpos y esto podría llevar a un resultado falso positivo. En el caso de que los eritrocitos estén sensibilizados con anticuerpos anti-D, los reactivos anti-D salinos podrían no reaccionar con el antígeno D por estar el antígeno bloqueado por anticuerpos IgG. Para obtener un resultado adecuado se deben separar los anticuerpos de los eritrocitos del recién nacido por un método de elución como el del calor a 45 °C.

## SISTEMA LW

El sistema LW recibe esta denominación como reconocimiento a sus descubridores, Landsteiner y Wiener. Hoy se conoce que los anticuerpos estimulados por los eritrocitos *rhesus*, inicialmente atribuidos al descubrimiento del sistema Rh, reconocen en realidad a los antígenos de la glicoproteína LW. La confusión inicial se debió a que los antígenos de este sistema están más expresados en los eritrocitos adultos RhD<sup>+</sup> que en los RhD<sup>-</sup>. Sin embargo, los antígenos LW están



igualmente expresados en los eritrocitos fetales y en los de los recién nacidos RhD+ y RhD-. Los antígenos LW son destruidos por compuestos sulfhidrilos como el ditiotreitól y el bromuro de 2-aminoetilisotiuronio (AET), así como por la enzima pronasa.

Antes de establecerse como LW, este sistema tuvo varias clasificaciones. En la actualidad se acepta la presencia de dos antígenos: el LW<sup>a</sup> y el LW<sup>b</sup>. El fenotipo LW (a-b+) es el más frecuente y comprende más del 99 % de los individuos. El fenotipo LW (a+b+) tiene una frecuencia menor del 1 % y el LW (a-b-) es muy poco frecuente. El gen que codifica los antígenos LW está en el cromosoma 19.

Los eritrocitos Rh nulo son también LW (a-b-). Es posible que la glicoproteína LW interactúe preferentemente con el RhD que con el RhCcEe.

Los anticuerpos anti-Lw<sup>a</sup> no destruyen los eritrocitos incompatibles. Puede observarse una reducción transitoria de los antígenos LW, especialmente en embarazadas y producirse anticuerpos anti-LW, pero que no poseen importancia clínica. Se ha descrito un anti-LW<sup>ab</sup> potente en una embarazada de fenotipo RhD+LW(a-b-) y se han detectado también los anticuerpos en el recién nacido.

## SISTEMA DE GRUPO SANGUÍNEO MNS

El sistema de grupo sanguíneo MNS agrupa 43 antígenos distribuidos en las glicoforinas, aunque los más importantes son los antígenos M, N, S, s y U (tabla 6.2).

Los antígenos M y N se localizan en la glicoforina A (GPA) y los antígenos S, s y U se localizan en la glicoforina B (GPB). Existe una interacción genética que se manifiesta en un desequilibrio de lincaje entre las frecuencias de M, N y S, s, donde la frecuencia N con s es mayor que la de N con S. El fenotipo eritrocitario En(a-) carece de la GPA y estos individuos pueden producir anticuerpos anti-En<sup>a</sup>. Los eritrocitos de fenotipo S-s- son también negativos para el antígeno U de alta frecuencia y carecen de GPB. Las personas U negativas pueden producir anti-U al ser transfundidas. El fenotipo M<sup>k</sup> M<sup>k</sup> es el resultado de la ausencia de GPA y GPB en la membrana (tabla 6.15).

El sistema MNS agrupa varios antígenos de baja incidencia que son el producto de sustituciones de aminoácidos en las glicoforinas o agrupa híbridos de ambas proteínas.

Los anticuerpos anti-M se detectan frecuentemente con eritrocitos suspendidos en solución salina y en individuos que no tienen historia previa de transfusiones o embarazos. Estos anticuerpos son generalmente de la

clase IgM, aunque pueden ser también de la clase IgG. Los anticuerpos anti-M se consideran de importancia clínica si reaccionan *in vitro* a 37 °C o en la prueba de antiglobulina (Coombs). En casos excepcionales pueden provocar enfermedad hemolítica del recién nacido.

Los anti-N son infrecuentes, casi siempre de la clase IgM, y reaccionan mejor a bajas temperaturas. Los de la clase IgG potentes se producen en individuos de fenotipo M+N-S-s-U-, ya que carecen de la glicoforina B que expresa el antígeno "N". En algunos pacientes con hemodiálisis que han usado membranas de diálisis esterilizadas con formaldehído, se puede demostrar la presencia de anti-N. Al parecer, el formaldehído induce alteraciones en la inmunogenicidad de los antígenos N y "N".

Los anticuerpos anti-S, -s, -U son los de mayor importancia clínica. Todos son capaces de provocar reacciones transfusionales hemolíticas y EHRN. Estos anticuerpos casi invariablemente se detectan en la prueba de antiglobulina. El anti-U es raro, ya que muy pocas personas carecen de él. Mayormente este fenotipo se demuestra en los negros.

## SISTEMAS DE GRUPOS SANGUÍNEOS KELL Y XK

Como el Kell y XK están fenotípicamente asociados, muchos investigadores consideraban al antígeno Kx codificado por XK como parte del sistema Kell. En estos momentos se han establecido como dos sistemas de grupos sanguíneos.

El antígeno Kell se identificó en 1946 en una puerpera cuyo hijo estuvo afectado por enfermedad hemolítica. La presencia del alelo k se estableció cuando se comprobó la relación antitética entre el K y el k. En la actualidad, el sistema Kell lo constituyen 24 antígenos (tabla 6.2). Los fenotipos más frecuentes de este sistema se muestran en la tabla 6.16. En esta también se muestra el fenotipo K<sub>0</sub>, un fenotipo nulo en el cual los eritrocitos carecen de todos los antígenos del sistema Kell. El sistema XK codifica para el antígeno Kx, el cual se demuestra en niveles elevados en los eritrocitos K<sub>0</sub> y solo vestigios de este se pueden encontrar en los eritrocitos de fenotipos Kell comunes (tabla 6.16).

Los eritrocitos que carecen de Kx tienen una expresión deprimida de los antígenos del sistema Kell. Además, muestran una permeabilidad disminuida al agua y morfología acantocítica. Estos hallazgos caracterizan al fenotipo McLeod, cuyos individuos poseen además una

**Tabla 6.15** Fenotipos del sistema MNS

Reactivos					Frecuencias fenotípicas (%)		
anti-M	anti-N	anti-S	anti-s	Anti-U	Fenotipos	Caucásicos	Africanos
+	0				M+N-	28	26
+	+				M+N+	50	44
0	+				M-N+	22	30
		+	0	+	S+s-U+	11	3
		+	+	+	S+s+U+	44	28
		0	+	+	S-s+U+	45	69
		0	0	0	S-s-U-	0	Menos del 1
		0	0	(+)	S-s-U+ (débil)	0	Infrecuente

**Tabla 6.16** Fenotipos del sistema Kell

Reactivos						Frecuencias fenotípicas (%)		
anti-K	anti-k	anti-Kp <sup>a</sup>	anti-Kp <sup>b</sup>	anti-Js <sup>a</sup>	anti-Js <sup>b</sup>	Fenotipos	Caucásicos	Africanos
+	0					K+k-	0,2	Infrecuente
+	+					K+k+	8,8	2
0	+					K-k+	91,0	98
		+	0			Kp (a+b-)	Infrecuente	0
		+	+			Kp (a+b+)	2,3	Infrecuente
		0	+			Kp (a-b+)	97,7	100
			+	0	Js (a+b-)	0,0		1
			+	+	Js (a+b+)		Infrecuente	19
			0	+	Js (a-b+)		100,0	80
0	0	0	0	0	0	K <sub>0</sub>		Muy infrecuente

disfunción del sistema neuromuscular. En algunos casos, este fenotipo se ha encontrado en pacientes con enfermedad granulomatosa crónica (EGC), en la que los granulocitos conservan la función fagocítica, pero son incapaces de provocar la muerte del patógeno ingerido. El fenotipo McLeod asociado con EGC parece ser la consecuencia de la delección de una parte del cromosoma X que comprende el locus XK y X-EGC.

## SISTEMA DE GRUPO SANGUÍNEO DUFFY

El sistema de grupo sanguíneo Duffy se descubrió en 1950, al identificarse un anticuerpo que se le denominó anti-Fy<sup>a</sup> en un paciente hemofílico politransfundido. El sistema Duffy está constituido por 6 antígenos. Los antígenos de mayor importancia son el Fy<sup>a</sup> y el Fy<sup>b</sup>, los restantes son el Fy3, Fy4, Fy5 y el Fy6. La frecuencia de los fenotipos Fy<sup>a</sup> y Fy<sup>b</sup> difiere entre las diferentes poblaciones. El fenotipo Fy (a-b-) se encuentra en el 68 % de los negros y se aproxima al 100 % en algunas áreas de África Occidental (tabla 6.17).

Se ha descrito una forma débil de Fy<sup>b</sup> denominada Fy<sup>x</sup>, que solo puede ser detectada por los anti-Fy<sup>b</sup> muy potentes. Se ha sugerido que el antígeno Fy5 es el resultado de la interacción de los productos de los genes Rh y Duffy, ya que este antígeno está ausente en los eritrocitos Rh nulo.

## SISTEMA DE GRUPO SANGUÍNEO KIDD

Este sistema se describió en 1951, al identificarse un anticuerpo, que se le denominó anti-Jk<sup>a</sup>, en el suero de una púrpura cuyo hijo tuvo una EHRN. Dos años más tarde se describió el anti-Jk<sup>b</sup> en una paciente con una reacción postransfusional hemolítica. El sistema consta de tres antígenos: Jk<sup>a</sup>, Jk<sup>b</sup> y Jk3, y el fenotipo Jk (a-b-) es extremadamente infrecuente, excepto en algunas poblaciones de las islas del Pacífico. La expresión de los antígenos depende del estado homocigótico o heterocigótico de los alelos del sistema (tabla 6.18).

Los anticuerpos de este sistema pueden causar EHRN, pero generalmente es un cuadro clínico leve.

**Tabla 6.17** Fenotipos del sistema Duffy

Reactivos		Fenotipos	Frecuencias fenotípicas (%)	
anti-Fy <sup>a</sup>	anti-Fy <sup>b</sup>		Caucásicos	Africanos
+	0	Fy (a+b-)	17	9
+	+	Fy (a+b+)	49	1
0	+	Fy (a-b+)	34	22
0	0	Fy (a-b-)	Muy infrecuente	68

**Tabla 6.18** Fenotipos del sistema Kidd

Reactivos		Fenotipos	Frecuencias fenotípicas (%)	
anti-Jk <sup>a</sup>	anti-Jk <sup>b</sup>		Caucásicos	Africanos
+	0	Jk (a+b-)	28	57
+	+	Jk (a+b+)	49	34
0	+	Jk (a-b+)	23	9
0	0	Jk (a-b-)	Muy infrecuentes	

Sin embargo, son en extremo importantes por estar involucrados en reacciones postransfusionales hemolíticas tardías al no detectarse en las pruebas de compatibilidad pretransfusionales.

Por muchos años se consideró que los anticuerpos IgG anti-Kidd activaban el complemento; en la actualidad se conoce que principalmente son los IgM y que la fracción IgG<sub>3</sub>, aunque contribuye, no es el principal agente.

## SISTEMA DE GRUPO SANGUÍNEO LUTHERAN

El sistema Lutheran se describió en 1945, cuando fue identificado el anti-Lu<sup>a</sup> en un suero que contenía varios anticuerpos. Este sistema lo componen 18 antígenos. Los más conocidos son el Lu<sup>a</sup> y el Lu<sup>b</sup>, y el fenotipo Lu (a-b-) es en extremo infrecuente. El número de sitios antigénicos Lu<sup>b</sup> por eritrocito es de aproximadamente 600 a 1 600 en los eritrocitos Lu (a+b+) y de 1 400 a 3 800 en los eritrocitos Lu (a-b+). Los antígenos Lu9 y Lu14 son de baja incidencia y muestran una aparente relación antitética con los antígenos de alta incidencia y, excepto los Au<sup>a</sup> y Au<sup>b</sup>, no están presentes en los eritrocitos de fenotipo Lu (a-b-) (tabla 6.19).

Los anticuerpos de este sistema pueden reaccionar con eritrocitos resuspendidos en solución salina y provocar una aglutinación en campo mixto. Con frecuencia se detectan también en la prueba de antiglobulina indirecta.

## SISTEMA DE GRUPO SANGUÍNEO DIEGO

El sistema Diego lo constituyen 18 antígenos que están localizados en el transportador de aniones (AE-1) o banda 3. Los antígenos más conocidos son el Di<sup>a</sup>, Di<sup>b</sup>, Wr<sup>a</sup> y Wr<sup>b</sup> cuyas frecuencias fenotípicas se exponen en la tabla 6.20. Los antígenos Di<sup>a</sup> y Di<sup>b</sup> se utilizan como marcadores antropológicos, ya que la presencia del antígeno Di<sup>a</sup> está circunscrita a poblaciones mongoloides y a indígenas de América. La expresión del antígeno Wr<sup>b</sup> depende de la presencia de GPA.

Los anticuerpos de este sistema se detectan generalmente en la técnica de antiglobulina indirecta. El anti-Di<sup>a</sup> puede ocasionar EHRN y reacción transfusional heteróloga (RTH). El anti-Di<sup>b</sup> es infrecuente pero de importancia clínica. El anti-Wr<sup>a</sup> generalmente se identifica en individuos sin antecedentes de estímulo previo. En pocas ocasiones provoca EHRN y RTH.

**Tabla 6.19** Fenotipos del sistema Lutheran

Reactivos		Fenotipos	Frecuencias fenotípicas (%)
anti-Lu <sup>a</sup>	anti-Lu <sup>b</sup>		
+	0	Lu (a+b-)	0,15
+	+	Lu (a+b+)	7,5
0	+	Lu (a-b+)	92,35
0	0	Lu (a-b-)	Muy infrecuente

**Tabla 6.20** Fenotipos del sistema Diego

Reactivos		Fenotipos	Frecuencias fenotípicas (%)
anti-Di <sup>a</sup>	anti-Di <sup>b</sup>		
+	0	Di (a+b-)	0
+	+	Di (a+b+)	Infrecuente
0	+	Di (a-b+)	100
W <sub>R</sub> <sup>a</sup>	W <sub>R</sub> <sup>b</sup>		
+	0	W <sub>R</sub> (a+b-)	0
+	+	W <sub>R</sub> (a+b+)	1
0	+	W <sub>R</sub> (a-b+)	99

## BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- Avent ND, Reid ME. The Rh blood group system: a review. *Blood* 2000;95:375-87.
- Bencomo A, Alfonso Y, Alfonso ME, González R, Fernández J, Ballester A. Frecuencia de los grupos sanguíneos A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>int</sub>, A<sub>el</sub>, B y O en donantes de sangre. *Rev Cubana Hematol Inmunol - Hemoter*, 1997;13(2):124-131.
- Bencomo A, Alfonso Y, Alfonso ME, González R, Martínez M. Frecuencia de los grupos sanguíneos ABO y Rh en donantes de sangre cubanos. *Rev Argen de Transf* 1997; 23(1):20-1.

- Guidelines for the Blood Transfusion Service, London, UK: HMSO; 1992.
- Hernández P, Bencomo A, Rivero R. Variantes fenotípicas y moleculares del antígeno RhD. *Rev Argen Transf* 2000; XXVI(2):131-142.
- Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M. *Blood transfusion in clinical medicine*. 10<sup>th</sup> ed. London:Blackwell Scientific Publications; 1997.
- Parsons SF, Spring FA, Chasis JA, Anstee DJ. Erythroid cell adhesion molecules Lutheran and LW in health and disease. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol*, 1999;12:729-45.
- Scott M. Rh serology-coordinator's report. *Transfus Clin Biol* 1996;3:333-7.

## CONTENIDO

---

### **Reacción antígeno-anticuerpo en inmunohematología/ 575**

- Primera etapa de la reacción de aglutinación/ 576
- Segunda etapa de la reacción de aglutinación/ 576

### **Detección e identificación de anticuerpos eritrocitarios/ 577**

- Prueba de antiglobulina/ 577
- Prueba de antiglobulina directa/ 577
- Prueba de antiglobulina indirecta/ 577
- Control de la calidad de la técnica/ 578
- Otros procedimientos para la detección de anticuerpos eritrocitarios/ 578
- Aglutinación en gel/ 578
- Hemólisis/ 579
- Técnica en fase sólida/ 579

### **Determinación de la especificidad de los anticuerpos y pruebas de compatibilidad pretransfusionales/ 579**

- Determinación de la especificidad de los anticuerpos/ 579
- Pruebas de compatibilidad pretransfusionales/ 581
- Detección de anticuerpos eritrocitarios/ 582
- Pruebas cruzadas/ 582
- Etiquetado del hemoderivado compatible/ 582
- Registro de los resultados/ 582

### **Autoanticuerpos eritrocitarios y anemias hemolíticas autoinmunes/ 582**

- Diferencias entre las anemias hemolíticas hereditarias y las anemias hemolíticas inmunes/ 583
- Diagnóstico inmunohematológico de las anemias hemolíticas autoinmunes/ 583
- Autoanticuerpos benignos/ 583
- Evaluación de una prueba de antiglobulina directa positiva/ 584
- Anemia hemolítica autoinmune caliente/ 584
- Anemia hemolítica autoinmune con la prueba de antiglobulina directa negativa/ 587
- Anemia hemolítica autoinmune inducida por fármacos/ 587
- Síndrome de aglutininas frías/ 588
- Anemia hemolítica autoinmune mixta/ 589
- Hemoglobinuria paroxística *a frigore*/ 590

### **Bibliografía recomendada/ 591**

### Capítulo 49



## PROCEDIMIENTOS PARA LA DETERMINACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS ERITROCITARIOS. PRUEBAS DE COMPATIBILIDAD PRETRANSFUSIONAL

*Lic. Antonio A. Bencomo Hernández*

*Dra. María Elena Alfonso Valdés*

*Lic. Yalile Alfonso Valdés*

*Dra. Martha Díaz Salazar*

### RESUMEN

Existen pacientes que presentan anticuerpos como resultado de la exposición a eritrocitos, por las transfusiones o embarazos. En este capítulo se estudian algunos procedimientos para detectar e identificar los anticuerpos eritrocitarios y su especificidad, así como las pruebas de compatibilidad pretransfusionales. Se analiza la reacción de aglutinación, separada en sus dos etapas, y la relación entre los autoanticuerpos eritrocitarios y las anemias hemolíticas autoinmunes. Se exponen, además, las diferencias entre estas y las anemias hemolíticas hereditarias.

### REACCIÓN ANTÍGENO-ANTICUERPO EN INMUNOHEMATOLOGÍA

Los requerimientos transfusionales de la mayoría de los pacientes que necesitan una transfusión sanguínea, se cumplen al administrar sangre de donantes de igual fenotipo ABO y RhD. Muchos antígenos de grupos sanguíneos diferentes al A, B y RhD son ignorados en el acto transfusional, debido a que muy pocas personas poseen anticuerpos dirigidos contra alguno de ellos.

Del 0,5 al 1,5 % de los pacientes presentan anticuerpos como resultado de la exposición a eritrocitos por las transfusiones o embarazos. Estos anticuerpos eritrocitarios se pueden detectar e identificar por diferentes procedimientos. Sin embargo, existen factores que afectan la reacción entre el anticuerpo y el antígeno; los factores pueden estar asociados con el antígeno, el anticuerpo o con las condiciones de la reacción.

Los factores relacionados con el antígeno incluyen el número de sitios antigénicos, las interacciones génicas, la dosis, el sitio que ocupa el antígeno sobre la superficie eritrocitaria, la edad de las células y las

condiciones de almacenaje de estas. Entre los factores relacionados con el anticuerpo se encuentran la capacidad para fijar el complemento, la influencia que sobre la reacción tienen el uso de suero o plasma, el fenómeno de *rouleaux* (pilas de monedas) y la contaminación bacteriana.

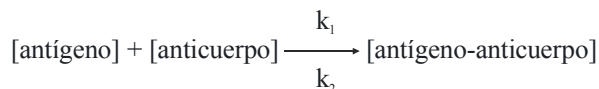
Las condiciones de la reacción incluyen el pH, la relación entre la concentración de antígeno y anticuerpo, la temperatura, el tiempo de incubación, la centrifugación, la fuerza iónica y, por último, el medio utilizado, ya sea salino, albuminoideo, enzimático o antiglobulínico (prueba de Coombs).

Los anticuerpos aglutinan a los eritrocitos en dos etapas. En la primera, el anticuerpo se une físicamente al antígeno en los eritrocitos (sensibilización); en la segunda, los eritrocitos, a los cuales los anticuerpos se unieron, aglutinan y forman puentes entre ellos para crear una estructura de enrejado que constituye la aglutinación. En algunas reacciones antígeno-anticuerpo, las dos etapas ocurren casi de manera simultánea, mientras que en otras solo ocurre la primera etapa de la reacción, es decir, hay sensibilización de los eritrocitos por anticuerpos no aglutinantes.

Para analizar la reacción de aglutinación es conveniente separarla en sus dos etapas, ya que existen factores y variables que afectan a cada una.

## PRIMERA ETAPA DE LA REACCIÓN DE AGLUTINACIÓN

La asociación y disociación del complejo antígeno-anticuerpo se rige por la Ley de acción de masas; esta es una reacción reversible:



donde [antígeno], [anticuerpo] y [antígeno-anticuerpo] son las concentraciones del antígeno, del anticuerpo y del complejo antígeno-anticuerpo, respectivamente;  $k_1$  es la constante de asociación y  $k_2$  la de disociación. De acuerdo con esta Ley de acción de masas:

$$\frac{[\text{antígeno-anticuerpo}]}{[\text{antígeno}] + [\text{anticuerpo}]} = \frac{k_1}{k_2} = K$$

K es la constante de equilibrio o afinidad de la reacción y refleja la fuerza de unión entre el antígeno y el anticuerpo. Mientras mayor sea K, la velocidad de asociación de la reacción será mayor, es decir, serán mayores las cantidades que se formarán del complejo antígeno-anticuerpo y la velocidad de disociación será más lenta.

La constante de equilibrio K en la reacción de aglutinación se afecta por las concentraciones de antígeno y las de anticuerpo, y por condiciones físicas de las técnicas, tales como: pH, temperatura, fuerza iónica y tiempo de incubación. La alteración de estas últimas condiciones puede producir aumento o disminución de la sensibilidad en la aglutinación.

La mayoría de los anticuerpos de grupos sanguíneos reaccionan en un rango restringido de temperatura. Por ejemplo, los anti-P reaccionan, de forma óptima, a 18 °C y los anti-Fy<sup>a</sup> a 37 °C. Los anticuerpos de la clase IgM son más reactivos a bajas temperaturas (de 4 a 27 °C), mientras que los de la clase IgG lo son a 37 °C. Por este motivo, las técnicas de detección de anticuerpos abarcan rangos de temperaturas de 22 a 37 °C o 30 a 37 °C. Aquellos anticuerpos que reaccionan *in vitro* a temperaturas por debajo de 37 °C, no se consideran significativos desde el punto de vista clínico,

y rara vez destruyen eritrocitos transfundidos. Algunos anticuerpos de la clase IgM pueden activar el complemento a temperaturas por debajo de 30 °C, pero solo acortan de forma mínima la supervivencia de eritrocitos incompatibles transfundidos. Los anticuerpos significativos desde el punto de vista clínico, son aquellos que tienen actividad *in vitro* a 37 °C.

Los anticuerpos de los diversos grupos sanguíneos tienen diferentes tiempos para alcanzar el equilibrio, en esto interviene de manera significativa la clase de inmunoglobulina y la forma en que se une a su antígeno específico.

Los estudios con eritrocitos suspendidos en suero o solución salina han demostrado que del 100 % de anticuerpos RhD que se fijan, aproximadamente el 25 % lo hace en los primeros 15 minutos y el 75 % restante lo hace durante la primera hora. La adición de varios agentes potenciadores (por ejemplo, disminución de la fuerza iónica) puede aumentar la cantidad de anticuerpos fijados durante los primeros 15 minutos y con esto disminuir el tiempo de incubación necesario para alcanzar el equilibrio.

## SEGUNDA ETAPA DE LA REACCIÓN DE AGLUTINACIÓN

Una vez que la reacción antígeno-anticuerpo ha ocurrido, la aglutinación puede producirse o no. Algunos factores facilitan la aglutinación, mientras que otros la impiden. Entre ellos: las características del anticuerpo, la localización y el número de sitios antigénicos, las fuerzas que mantienen la distancia entre los eritrocitos, el uso de albúmina sérica bovina, el uso de enzimas, el efecto de dosis y el efecto de las moléculas con carga positiva.

Los anticuerpos que no aglutinan eritrocitos suspendidos en solución salina, en ocasiones los aglutinan cuando están suspendidos en albúmina bovina. Esto es posible porque la albúmina provoca un incremento en la constante dieléctrica del medio en el que están suspendidos los eritrocitos y una disminución del potencial zeta. La constante dieléctrica de un medio es una medida de su habilidad para disipar cargas.

No todos los anticuerpos de los grupos sanguíneos aumentan su actividad en las pruebas de albúmina: los anti-A, los anti-B y los anti-Lewis muestran reducción de su actividad en presencia de albúmina. Esta influye en el grado de hidratación de la membrana, lo cual puede alterar la orientación estérica del determinante antigénico o puede disminuir la entropía disponible para dirigir la reacción.

Enzimas del tipo de las proteasas, como la bromeína, tripsina, papaína y ficina se utilizan en las pruebas serológicas porque reducen la carga de la superficie de los eritrocitos al hidrolizar las sialoglicoproteínas de la superficie celular. La neuraminidasa también reduce la carga de la superficie celular porque escinde moléculas de ácido siálico de las cadenas de polisacáridos.

Además de estas acciones, las enzimas proteolíticas destruyen antígenos de los grupos sanguíneos como el M, N, Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup> y Xg<sup>a</sup>. Esta propiedad de las enzimas proteolíticas es de gran utilidad en la identificación de anticuerpos eritrocitarios.

## DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS ERITROCITARIOS

La pesquisa de anticuerpos eritrocitarios tiene como objetivo detectar y luego identificar anticuerpos significativos desde el punto de vista clínico, que puedan causar reacción transfusional y acortamiento de la supervivencia normal de los eritrocitos, de modo que deben emplearse métodos *in vitro* apropiados.

La técnica por excelencia para la detección e identificación de anticuerpos eritrocitarios es la prueba de antiglobulina o de Coombs.

### PRUEBA DE ANTIGLOBULINA

La prueba de antiglobulina comenzó a utilizarse después de que Coombs, Mourant y Race la describieron en 1945. En un inicio se utilizó para detectar anticuerpos en el suero, pero luego se demostró su utilidad para detectar anticuerpos fijados a los eritrocitos *in vivo*. De esta forma, la prueba de antiglobulina directa se utiliza para demostrar anticuerpos que sensibilizan a los eritrocitos *in vivo* y la prueba de antiglobulina indirecta para detectar anticuerpos libres en el suero.

**Fundamento.** Para la prueba de antiglobulina se emplean anticuerpos contra las globulinas humanas, denominados reactivos antiglobulínicos poliespecíficos, que contienen, al menos, anti-IgG y anticuerpos contra el fragmento C3 del complemento. Este proceder cumple los principios siguientes:

1. Todas las moléculas de anticuerpos son globulinas.
2. Al inyectar a un animal con globulinas humanas, este genera anticuerpos contra la proteína extraña o antiglobulina humana (AGH); luego, el suero animal es adsorbido, para eliminar los heteroanticuerpos contra los eritrocitos humanos para garantizar que

reaccione solo con las globulinas humanas. Las particularidades del control de este reactivo se exponen en el acápite sobre reactivos en la parte que trata acerca de la inmunohematología.

3. Los dos sitios Fab de la molécula de AGH se unen a las porciones Fc de dos anticuerpos que se encuentran sensibilizando a dos eritrocitos adyacentes. Esta unión forma un puente entre los eritrocitos y la aglutinación se hace visible.
4. La AGH reacciona con globulinas humanas que están unidas a eritrocitos o están libres en el suero. Estas últimas se unen con preferencia a la AGH, la neutralizan y ofrecen un resultado falsamente negativo. Por ello, los eritrocitos deben lavarse antes de la adición del reactivo antiglobulínico.

### PRUEBA DE ANTIGLOBULINA DIRECTA

La prueba de antiglobulina directa (PAD) se usa para demostrar que existe IgG y C3 en los eritrocitos. Para esto se utiliza una suspensión de eritrocitos lavados, que son mezclados de manera directa con el suero antiglobulínico. Entre las aplicaciones más importantes de esta prueba se encuentran: la investigación de las reacciones transfusionales hemolíticas; la detección de anticuerpos en los eritrocitos de los recién nacidos en los que se sospecha enfermedad hemolítica por incompatibilidad de grupos sanguíneos; en la investigación de autoanticuerpos en las anemias hemolíticas autoinmunes y en la detección de anticuerpos contra fármacos que pueden destruir a los eritrocitos del paciente.

### PRUEBA DE ANTIGLOBULINA INDIRECTA

La prueba de antiglobulina indirecta (PAI) se realiza en dos pasos y es la más recomendada para la detección de anticuerpos que no producen aglutinación directa de los eritrocitos. En la primera fase se mezclan los eritrocitos con el suero que se va a investigar y se incuban a 37 °C, de 30 a 45 minutos. Luego se lavan los eritrocitos tres veces con solución salina y se les añade el suero antiglobulínico para revelar la reacción. Esta prueba se utiliza para: la detección e identificación de anticuerpos eritrocitarios en el suero del paciente; el tipaje de grupos sanguíneos con reactivos que requieren de esta técnica para revelar la reacción y en las pruebas de compatibilidad pretransfusional.

#### Sensibilidad de la técnica de antiglobulina

Aunque este proceder se considera de gran sensibilidad, un resultado negativo no excluye que haya



anticuerpos. Se ha estimado que esta técnica detecta de 100 a 500 moléculas de IgG o C3 por eritrocito; un número menor de moléculas por eritrocitos puede dar un resultado negativo. Por otra parte, el componente anti-IgA es casi siempre deficiente en el reactivo poliespecífico, y los anticuerpos de este isotipo, aunque no son frecuentes, no se detectan con facilidad. A su vez el suero AGH muestra, en ocasiones, mayor actividad contra algunas subclases de IgG y, por lo tanto, los anticuerpos de determinadas subclases pueden no ser detectados. Otros procedimientos como la técnica manual de polibreno y la de polietilenglicol-antiglobulina permiten la detección de anticuerpos no reactivos en la técnica de Coombs.

## CONTROL DE LA CALIDAD DE LA TÉCNICA

Para confirmar los resultados negativos, tanto en la PAD como en la PAI, se debe añadir las células controles de Coombs a cada tubo en los que se observó un resultado negativo. Estas células se preparan al sensibilizar los eritrocitos con anticuerpos anti-Rh, en específico anti-D, que muestren una reacción de aglutinación en antiglobulina de dos cruces de aglutinación (2+). Después de añadido este control, deberá observarse un resultado positivo; de no ser así, es necesario repetir el proceder y controlar la calidad del reactivo antes de su uso. El uso de estas células alerta sobre lavados insuficientes de las células o sobre el deterioro del reactivo AGH.

### Falsos negativos de la prueba de antiglobulina

Los falsos negativos de la prueba de antiglobulina son:

1. Lavado insuficiente de los eritrocitos.
2. Demoras en la realización del proceder.
3. Olvidar la adición del reactivo antiglobulínico.
4. Centrifugación inadecuada.
5. Deterioro del reactivo, entre otras.

### Falsos positivos de la prueba de antiglobulina

Los falsos positivos de la prueba de antiglobulina son:

1. Utilizar eritrocitos del paciente para la realización de la PAD, almacenados en anticoagulantes diferentes al EDTA, ACD o CPD y que hayan sido almacenados a 4 °C, ya que puede unirse complemento a los eritrocitos y resultar en una PAD positiva.
2. La contaminación bacteriana del reactivo.
3. La centrifugación a altas velocidades.
4. El uso de material lavado de manera inapropiada.

## OTROS PROCEDERES PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ERITROCITARIOS

Por lo general, se utilizan diferentes técnicas para la detección de anticuerpos eritrocitarios, una de ellas es el tratamiento enzimático de los eritrocitos con proteasas. Esta es mucho más sensible que otras, en especial en la detección de anticuerpos Rh y de otros anticuerpos que solo reaccionan con eritrocitos pretratados.

**Enzimas proteolíticas.** A pesar de las ventajas que brindan las enzimas proteolíticas, es importante alertar en relación con su uso como rutina en la detección de anticuerpos eritrocitarios. Los eritrocitos pretratados con enzimas pueden detectar anticuerpos fríos y otros anticuerpos que no son de importancia clínica. En la actualidad, esta técnica se utiliza para la identificación de mezclas de anticuerpos de varias especificidades, y cuando se sospecha que alguno de ellos reconoce antígenos que son destruidos por proteasas.

**Solución de baja fuerza iónica, polibreno y polietilenglicol.** Entre las técnicas que deben emplearse como rutina en la evaluación de anticuerpos eritrocitarios se encuentran: la técnica manual de polibreno; el empleo de la solución de baja fuerza iónica, conocido como LISS (del inglés *Low Ionic Strength Solution*), en la fase de incubación previa a la realización de la técnica de antiglobulina; y la técnica de polietilenglicol antiglobulina. Estas técnicas pueden revelar la presencia de anticuerpos de importancia clínica no detectados por la técnica de antiglobulina tradicional.

Es necesario comentar que la técnica del LISS solo debe realizarse a 37 °C, ya que a temperatura ambiente se pueden detectar anticuerpos que no tienen repercusión clínica.

Al contrario, el método del polibreno se realiza a temperatura ambiente y tiene como ventaja que detecta, sobre todo, anticuerpos que son activos a 37 °C por otros métodos.

## AGLUTINACIÓN EN GEL

A finales de la década del 80 del siglo xx, se desarrolló un nuevo método para el tipaje de grupos sanguíneos y para la detección e identificación de anticuerpos eritrocitarios. La prueba de aglutinación en gel es un método de serología transfusional, en el que la reacción entre anticuerpos y antígenos ocurre en el gel *Sephadex* contenido en los microtubos de una tarjeta plástica. La centrifugación se realiza en una centrífuga no convencional y el gel empleado puede ser neutro, contener reactivo AGH para la PAI o reactivos hemoclases de grupos sanguíneos para tipificar la sangre.

La prueba de aglutinación en gel es negativa si después de la centrifugación los eritrocitos van al fondo del microtubo al pasar a través del gel; los eritrocitos aglutinados quedan atrapados en el gel formando diferentes patrones de aglutinación. Esta técnica es fácil, sensible y reproducible. Entre sus ventajas están el uso de eritrocitos no lavados para la ejecución de la prueba de antiglobulina; requiere de pocas cantidades de reactivos; después que la reacción ocurre en el gel, esta puede mantenerse sin cambios hasta pasadas las 24 horas y los resultados en los microtubos pueden ser fotocopiados.

La detección *in vitro* de la reacción antígeno-anticuerpo en todas las técnicas que se han comentado hasta aquí se evidencia por aglutinación. Sin embargo, existen otras formas para detectar esta reacción. Por ejemplo, las pruebas de inhibición de la aglutinación: en ellas se detecta el antígeno o el anticuerpo cuando la aglutinación, previamente observada de un elemento, queda inhibida. Otros medios de detección son sencillos, como la hemólisis; pero otros como el radioinmunoanálisis son más peligrosos, costosos y complejos.

## HEMÓLISIS

La hemólisis es la ruptura de los eritrocitos con la consiguiente liberación de la hemoglobina intracelular. Cuando es mediada por anticuerpos, requiere el concurso del complemento y no se produce si el plasma contiene un agente quelante del calcio o del magnesio. Si la hemólisis se produce, el sobrenadante se torna color rosa tras la incubación de los anticuerpos con los eritrocitos; este resultado se considera positivo. Los anticuerpos anti-Le<sup>a</sup> pueden provocar la hemólisis de eritrocitos suspendidos en solución salina.

## TÉCNICA EN FASE SÓLIDA

Otra de las técnicas utilizadas para identificar antígenos o anticuerpos es la prueba de adherencia de eritrocitos en fase sólida, la cual emplea eritrocitos indicadores. En la prueba directa se recubren las paredes de una microplaca con anticuerpos y se añaden eritrocitos a los pocillos. Si tienen el antígeno adecuado, se adherirán a los anticuerpos en la pared del pocillo; si no hay reacción antígeno-anticuerpo, se sedimentan en el fondo del pocillo. En la prueba de antiglobulina indirecta se adhieren eritrocitos a los bordes de los pocillos mediante pretratamiento con glutaraldehído, formaldehído o un anticuerpo monoclonal potente, luego se añade suero del paciente y después eritrocitos recubiertos con IgG (células indicadoras). En la reacción positiva, los eritrocitos recubiertos se adhieren a las

paredes del pocillo; en la negativa, los eritrocitos sedimentan en el fondo de los pocillos.

## DETERMINACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DE LOS ANTICUERPOS Y PRUEBAS DE COMPATIBILIDAD PRETRANSFUSIONALES

### DETERMINACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DE LOS ANTICUERPOS

Las pruebas de detección de anticuerpos tienen como objetivo evidenciar la mayor cantidad posible de anticuerpos con significación clínica. Para ello, los eritrocitos que se utilicen deben portar los antígenos, contra los cuales está dirigida la mayoría de los anticuerpos que se encuentran de manera común. Para investigar los sueros de los pacientes, por lo general son suficientes dos muestras testigos de eritrocitos de donantes del fenotipo seleccionado (tabla 6.21).

Cuando se detecta un anticuerpo en el suero de un individuo, deberá identificarse su especificidad para conocer su significado clínico y, si es necesaria la transfusión, administrar entonces eritrocitos carentes del antígeno o de los antígenos que reconocen los anticuerpos detectados. El procedimiento emplea un panel eritrocitario de fenotipo conocido; y en dependencia de las células que reaccionen con el suero o no, se podrá reconocer el antígeno contra el cual está dirigido el anticuerpo. Al realizar la identificación de los anticuerpos, se deberá tener en cuenta la fuerza de aglutinación con cada una de las células del panel, ya que esto puede indicar que hay anticuerpos contra varios antígenos o informar sobre la identificación de anticuerpos que reconocen solo a los antígenos que están en doble dosis (homocigóticos). La estimación de la fuerza de la aglutinación es un proceder subjetivo que depende de la experiencia y apreciación del personal que realiza la investigación. Una de las escalas más usadas se ofrece a continuación:

- 4+ Aglutinación total en un solo cúmulo grande sobre fondo claro.
- 3+ Dos o tres aglutinados grandes sobre fondo claro.
- 2+ Aglutinados pequeños, de igual tamaño, sobre fondo rojo.
- 1+ Aglutinados muy pequeños, pero definidos, sobre fondo rojo.
- ± Pequeños aglutinados no definidos.
- 0 Ausencia de aglutinación.

En la tabla 6.22 se muestra el ejemplo de un suero que reacciona en la PAI con todas las células S+ y no

Tabla 6.21. Fenotipos testigos para la detección de anticuerpos eritrocitarios

Sistemas de grupos sanguíneos																												
Muestras		Rh			MNS			Lutheran		P	Lewis		Kell			Duffy		Kidd		*								
		D	C	C <sup>w</sup>	E	c	e	M	N	S	s	Lu <sup>a</sup>	Lu <sup>b</sup>	P <sub>I</sub>	Le <sup>a</sup>	Le <sup>b</sup>	K	k	Kp <sup>a</sup>	Kp <sup>b</sup>	J <sup>s</sup> <sub>s</sub>	J <sup>s</sup> <sub>S</sub>	Fy <sup>a</sup>	Fy <sup>b</sup>	Jk <sup>a</sup>	Jk <sup>b</sup>	Xg <sup>a</sup>	
1	+	+	0	0	0	0	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	0	0	+	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+	0	+	+

Leyenda

\* Ligado al sexo.

Tabla 6.22 Panel para la identificación de anticuerpos eritrocitarios

Muestras	Rh	MNS			Lutheran		P	Lewis		Kell				Duffy	Kidd	* Resultado PAI						
		M	N	S	U	Lu <sup>a</sup>		Lu <sup>b</sup>	P <sub>I</sub>	Le <sup>a</sup>	Le <sup>b</sup>	K	k			Kp <sup>a</sup>	Kp <sup>b</sup>	J <sub>S</sub> <sup>a</sup>	J <sub>S</sub> <sup>b</sup>	Fy <sup>a</sup>	Fy <sup>b</sup>	Jk <sup>a</sup>
1	CCddee	+	+	0	0	0	+	+	0	0	+	0	0	+	+	0	+	0	0	+	+	0
2	CC <sup>w</sup> Dee	0	+	+	0	0	+	+	+	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	2+
3	CCDee	+	+	0	+	+	0	0	0	+	0	0	0	+	+	0	+	0	+	+	+	0
4	ccDEE	+	0	+	0	0	+	+	0	+	0	0	0	+	+	0	+	0	+	+	0	3+
5	ccddEE	+	0	0	+	0	+	+	0	+	0	0	0	+	+	0	+	0	+	+	+	0
6	ccddeee	0	+	0	+	0	+	+	0	0	0	0	0	+	+	0	+	0	0	+	+	0
7	ccddeee	+	+	0	+	0	+	0	+	0	0	0	0	+	+	0	+	0	+	+	+	0
8	ccddeee	+	+	0	+	0	+	+	0	+	0	0	0	+	+	0	+	0	+	+	+	0
9	CCDEe	+	0	0	+	0	+	+	0	+	0	0	0	+	+	0	+	0	0	+	+	0
10	CcDee	+	0	+	0	0	+	0	0	+	0	0	0	+	+	0	+	0	+	0	+	3+

Leyenda

\* Ligado al sexo.

reacciona con las S-. En este caso, el suero contiene anticuerpos anti-S y se pueden excluir otras posibilidades; por ejemplo, las células 2, 4 y 10 son D+ y reaccionan con el suero, las células 1, 5, 6, 7 y 8 son D- y no reaccionan con el suero, pero los anticuerpos no pueden ser anti-D porque las células 3 y 9 son D+ y el suero no reacciona con ellas.

De esta manera, se pueden excluir anticuerpos de otras especificidades; sin embargo, otros no. En el ejemplo anterior, el suero puede presentar anticuerpos anti-C<sup>w</sup> tanto como anti-S porque el suero reacciona con la célula 2 y esta es S+ y C<sup>w</sup>. En este caso y en otros similares es necesario el uso de eritrocitos fenotipo S(-), C<sup>w</sup>(+).

Cuando el suero contiene distintos tipos de anticuerpos se deben utilizar diferentes métodos para determinar las especificidades presentes. Una de ellas es valorar la fuerza de la aglutinación con cada fenotipo del panel eritrocitario, otra es el tratamiento enzimático de los eritrocitos para eliminar los sitios antigénicos de los antígenos Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, M, N y S. También se puede usar más de una técnica para identificar varias especificidades si se tiene en cuenta que muchos anticuerpos reaccionan por diferentes métodos.

La identificación de anticuerpos contra antígenos de baja o alta incidencia, se rige por los mismos principios detallados antes para otros anticuerpos: se requiere el uso de fenotipos raros. Estas células *exóticas* no poseen antígenos de alta incidencia o, por el contrario, portan algunos de estos antígenos infrecuentes.

En otras ocasiones, los métodos de adsorción y elución son útiles para la identificación de anticuerpos eritrocitarios. Por ejemplo, un suero que contiene anti-K producido por un individuo RhD- se debe estudiar para dilucidar si hay anticuerpos anti-D. Si la muestra de eritrocitos D+, K- es insuficiente para confirmar o excluir la presencia del anti-D, el suero se puede adsorber con células D-, K+ de forma repetida. Cuando se obtiene el suero libre de anti-K, este se enfrenta a muestras D+ y D-. Si el anti-D está presente, el anti-K se puede separar de ese anticuerpo por elución de los eritrocitos D- y K+ adsorbidos.

## PRUEBAS DE COMPATIBILIDAD PRETRANSFUSIONALES

Las pruebas de compatibilidad tienen como objetivo proveer a los pacientes de componentes sanguíneos lo más seguros posible. Para ello es necesario el cumplimiento de algunos pasos que garantizan la seguridad del proceder, como: la correcta identificación del paciente

y de sus muestras de sangre, consultar si el paciente ha recibido sangre con anterioridad y la realización de las pruebas inmunohematológicas recomendadas al paciente, previas a la transfusión.

### Identificación del paciente

Antes de realizar la flebotomía, el técnico debe asegurarse de la identidad del receptor. Siempre que sea posible, debe interrogar al paciente; pero si su estado no lo permite, lo identificará por los registros que posee el personal de enfermería o con los familiares. La muestra de sangre se colectará en tubos etiquetados con el nombre y apellidos del paciente. Para los neonatos se anotaría el sexo y el número de identificación de la pulsera. En pacientes de identidad desconocida, se recomienda utilizar una serie única de números que figurarán en la pulsera que se les pone. Se debe tener en cuenta que el período entre la extracción de la muestra, la realización del estudio inmunohematológico y la fecha de la transfusión no debe exceder de las 72 horas. Esta premisa es especialmente importante en las embarazadas y en transfusiones recientes del paciente.

### Transfusiones anteriores

Es necesario consultar si el paciente ha recibido transfusiones y los resultados anteriores de las pruebas que se le han realizado. Esto nos puede alertar sobre la existencia de anticuerpos eritrocitarios ya conocidos, que obligan a la administración de sangre fenotipada para los antígenos específicos. En muchas ocasiones, los anticuerpos identificados de manera previa, disminuyen su concentración con el tiempo y pueden no ser detectados en pruebas serológicas posteriores, lo que no excluye que con un nuevo estímulo aumenten su título de forma brusca y provoquen reacciones transfusionales hemolíticas. Por otra parte, pueden existir discrepancias en el tipaje ABO y RhD con determinaciones previas, las que deberán ser resueltas antes de la transfusión.

### Investigaciones inmunohematológicas

Las investigaciones inmunohematológicas comprenden la determinación del grupo sanguíneo ABO y RhD, la investigación de anticuerpos irregulares y la prueba de compatibilidad.

Los grupos sanguíneos ABO y Rh se investigarán en el receptor y en todos los componentes que contengan

eritrocitos. En los receptores no se requiere de la determinación del D débil (D<sup>u</sup>). En los componentes plasmáticos y plaquetarios se determinarán el grupo ABO, por las isoaglutininas, con una muestra de plasma del componente y eritrocitos del grupo ABO conocidos. Se seleccionará, de manera preferible, el componente del mismo grupo ABO y RhD del receptor.

## DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ERITROCITARIOS

En la actualidad se recomienda que la detección de anticuerpos eritrocitarios (véase el acápite anterior) sea realizada en paralelo con la determinación del grupo sanguíneo del paciente. En este proceder se utilizarán eritrocitos fenotipados o células de pesquisa (tabla 6.22) y se buscará si hay anticuerpos reactivos en solución salina a 37 °C y en la prueba de antiglobulina indirecta. Si el resultado es positivo, es necesario investigar la especificidad de los anticuerpos y proveer al paciente de eritrocitos carentes del antígeno específico.

## PRUEBAS CRUZADAS

Se realizará la prueba cruzada entre el receptor y el donante en las transfusiones de componentes que contengan cantidades de glóbulos rojos visibles a simple vista. El significado más importante de esta prueba es comprobar la compatibilidad ABO entre el donante y el receptor. Las técnicas que se realizan en las pruebas de compatibilidad deberán incluir la de solución salina con centrifugación inmediata. Esto es mezclar una suspensión en solución salina de los eritrocitos de la unidad de sangre con el suero del receptor y centrifugar. Las muestras de sangre de los componentes se obtendrán de un segmento de la guía unida, en inicio, a la bolsa.

Con este método se corrobora la identidad ABO entre el donante y el receptor. La prueba de antiglobulina puede omitirse si no se demostraron anticuerpos en los ensayos de detección de anticuerpos. De no realizarse en paralelo la detección de anticuerpos, entonces la prueba cruzada se realizará también en la técnica de antiglobulina indirecta.

Un resultado positivo en las pruebas de compatibilidad obliga a una investigación rigurosa para dilucidar la causa antes de proceder a la transfusión.

Esta prueba podrá omitirse si existe una necesidad urgente de sangre, y solo se realizará al grupo sanguíneo ABO y RhD, al receptor y a la unidad que se ha de transfundir. De ser imposible tipificar al paciente, se le

administrarán eritrocitos de grupo O RhD negativos. En estos casos se obtiene una muestra del paciente con posterioridad y se realizan, en ese momento, todos los procedimientos recomendados.

En la transfusión de componentes plasmáticos se tendrá en cuenta solo la compatibilidad ABO entre el donante y el receptor.

Las muestras de sangre del receptor y del donante se mantendrán tapadas a temperatura de 1 a 6 °C durante 7 días después de la transfusión, por si son necesarias investigaciones ulteriores o se diagnostica una reacción postransfusional hemolítica tardía.

## ETIQUETADO DEL HEMODERIVADO COMPATIBLE

En el hemoderivado debe aparecer el nombre, el número de identificación, el grupo ABO y RhD del receptor, la interpretación de las pruebas de compatibilidad y la identificación de la persona que ha realizado las pruebas de compatibilidad.

## REGISTRO DE LOS RESULTADOS

En la solicitud de la transfusión se llenarán los datos del número de identificación de los donantes, el grupo ABO y Rh de los donantes, la interpretación de la prueba de compatibilidad, la identificación de la persona que ha realizado la prueba de compatibilidad, la fecha y hora en que se entrega el hemoderivado para su uso y la firma de quien lo entrega y de quien lo recibe.

## AUTOANTICUERPOS ERITROCITARIOS Y ANEMIAS HEMOLÍTICAS AUTOINMUNES

Los eritrocitos humanos tienen una vida media en la circulación de 120 días. Ellos son destruidos por el sistema reticuloendotelial, aproximadamente el 1 % por día, e igual cantidad es reemplazada por la médula ósea. Cuando existe una pérdida excesiva de eritrocitos, como ocurre en los procesos hemolíticos, se presenta anemia y un aumento en la producción de eritrocitos que se traduce en un incremento en el número de reticulocitos, eritroblastos basófilos y policromatófilos. Otros indicadores de destrucción eritrocítica pueden ser los esferocitos y los eritrocitos fragmentados, el incremento de la bilirrubina a expensas de la prueba de antiglobulina indirecta, la disminución de la haptoglobina, niveles elevados de lactato deshidrogenasa (LDH) y hemoglobinuria.

## DIFERENCIAS ENTRE LAS ANEMIAS HEMOLÍTICAS HEREDITARIAS Y LAS ANEMIAS HEMOLÍTICAS INMUNES

Las anemias hemolíticas hereditarias se caracterizan por un defecto intrínseco de la membrana de los eritrocitos (esferocitosis, eliptocitosis, estomatocitosis); por síntesis de hemoglobina anormal (anemias drepanocíticas, talasemias) o por deficiencias en la síntesis de enzimas glicolíticas (glucosa 6 fosfato deshidrogenasa). Otras anemias hemolíticas están asociadas con los fenotipos Rh nulos, Rh modificado y el fenotipo McLeod (véase el sistema Rh y Kell).

La hemólisis es característica de todas estas entidades, pero en ningún caso la destrucción de los eritrocitos es mediada por anticuerpos. Por el contrario, en las anemias hemolíticas inmunes, los eritrocitos son normales desde el punto de vista morfológico y funcional, y son hemolizados por la presencia de anticuerpos eritrocitarios (aloimunes o autoinmunes).

Las anemias hemolíticas aloimunes se caracterizan por la destrucción de los eritrocitos por anticuerpos debido a la aloinmunización. Esta se divide en dos grandes grupos: la reacción transfusional hemolítica (RTH) y la enfermedad hemolítica del recién nacido (EHRN).

En las anemias hemolíticas autoinmunes (AHAI), la destrucción de los eritrocitos se debe a la producción de autoanticuerpos por el paciente, dirigidos contra sus propios antígenos eritrocitarios.

## DIAGNÓSTICO INMUNOHEMATOLÓGICO DE LAS ANEMIAS HEMOLÍTICAS AUTOINMUNES

El diagnóstico de laboratorio se realiza, sobre todo, con la prueba de antiglobulina directa (PAD) o prueba de Coombs directa. Este ensayo requiere suero de antiglobulina humana (suero de Coombs) que se obtiene en animales inmunizados con las globulinas humanas. Este reactivo debe contener anticuerpos contra la IgG y el fragmento C3d del complemento humano, y puede presentar o no anticuerpo anti-IgM y anti-IgA (suero de Coombs poliespecífico).

Es preferible usar un reactivo en el que estén presentes todas las características, para garantizar un mayor espectro de detección de autoanticuerpos. Está demostrado que los autoanticuerpos de la clase IgA son infrecuentes, pero cuando se presentan es difícil su detección en la PAD.

Una prueba de Coombs directa positiva significa que hay anticuerpos y/o complemento (C3) unido a los eritrocitos *in vivo*, pero no es un resultado exclusivo

de las anemias hemolíticas autoinmunes (AHAI), ya que también puede ocurrir por los siguientes fenómenos *in vivo*:

1. Presencia de aloanticuerpos en un receptor de sangre recién transfundida, los cuales reaccionan con los antígenos eritrocitarios del donante.
2. Anticuerpos presentes en los derivados plasmáticos o que son producto del fraccionamiento, que reaccionan con los antígenos de los eritrocitos del receptor (por ejemplo: anti-A, anti-B, anti-AB).
3. Aloanticuerpos maternos que atraviesan la placenta y se unen a los eritrocitos fetales. Estos anticuerpos provocan la EHRN.
4. Anticuerpos contra algunos fármacos, como la penicilina, que se unen a la membrana de los eritrocitos.
5. Modificaciones de las membranas eritrocitarias como resultado de la terapia con fármacos del grupo de las cefalosporinas, que provocan la adsorción no inmune de proteínas a los eritrocitos, e incluye las inmunoglobulinas y el complemento.
6. Inmunocomplejos como respuesta a la administración de quinidina y fenacetina (por citar algunas), que causan la unión de componentes del complemento a los eritrocitos.
7. Anticuerpos heterófilos antieritrocitos humanos en la globulina antilinfocítica (GAL) de origen equino.
8. Unión de inmunoglobulinas a los eritrocitos de los pacientes con hipergammaglobulinemias. También se observa en pacientes tratados con altas dosis de gammaglobulina intravenosa.
9. Anticuerpos eritrocitarios producidos por linfocitos alogénicos, presentes en los órganos transplantados.

## AUTOANTICUERPOS BENIGNOS

En el 10 % de los pacientes hospitalizados y entre 1 en 1 000 y 1 en 9 000 donantes de sangre se ha detectado una PAD positiva de anemia hemolítica. Los resultados serológicos de estos casos son similares a los de pacientes con AHAI. Los estudios de subclases de IgG han revelado la presencia de IgG<sub>1</sub> y, en algunas ocasiones, de IgG<sub>3</sub>, en concentraciones similares en los eritrocitos de pacientes con anemia hemolítica autoinmune caliente (AHAIC), por lo que las diferencias cuantitativas no se relacionan con el desarrollo de la enfermedad.

Se ha observado que en donantes de sangre con PAD positiva hay dos poblaciones de autoanticuerpos IgG. Una de ellas reacciona con los eritrocitos, que son en realidad los autoanticuerpos, y la otra no reacciona con los eritrocitos, sino con los autoanticuerpos unidos a ellos. Estos anticuerpos son antiidiotipos específicos contra los autoanticuerpos.

Las interacciones idiotipos-antiidiotipos pueden ser la causa de la ausencia de hemólisis en individuos normales con autoanticuerpos eritrocitarios. En los pacientes con AHAIC no se demuestra la presencia de anticuerpos antiidiotipos.

## EVALUACIÓN DE UNA PRUEBA DE ANTIGLOBULINA DIRECTA POSITIVA

Las consideraciones clínicas son definitorias para evaluar la importancia de una prueba de antiglobulina directa (PAD) positiva. El diálogo con el clínico es importante antes de realizar cualquier prueba serológica. Para una correcta interpretación de la prueba se requiere el conocimiento del diagnóstico clínico del paciente, la historia reciente de transfusiones, o de tratamiento con fármacos y en qué condiciones comenzó el cuadro clínico de anemia hemolítica adquirida en el paciente. El resultado de las pruebas de laboratorio no es diagnóstico. Su significación solo puede tenerse en cuenta en relación con las condiciones clínicas del paciente y los demás exámenes de laboratorio, como son: hematócrito, bilirrubina, haptoglobina y recuento de reticulocitos.

La evidencia de hemólisis *in vivo* está dada por reticulocitosis, hemoglobinemia, hemoglobinuria, disminución de la haptoglobina sérica, niveles elevados de bilirrubina no conjugada y de LDH, en específico la LDH1.

En un paciente anémico con PAD positiva y signos y síntomas de hemólisis, es apropiado determinar si la hemólisis es de tipo inmune. Luego es necesario identificar el tipo de inmunoproteína unida a los eritrocitos, para lo cual es necesario el empleo de suero

de Coombs monoespecífico anti-IgG y anti-C<sub>3</sub>. La presencia de IgG en los eritrocitos se relaciona con una anemia hemolítica autoinmune caliente. El C<sub>3</sub>, como única inmunoproteína en los eritrocitos, se detecta con más frecuencia en las anemias hemolíticas por anticuerpos fríos. La reacción negativa con los reactivos monoespecíficos anti-IgG y anti-C<sub>3</sub> puede indicar la existencia de anticuerpos de la clase IgA, lo cual debe ser confirmado con suero monoespecífico anti-IgA. En tales casos es necesario tener en cuenta que los estudios posteriores sean realizados con suero de Coombs con actividad anti-IgA demostrada.

## ANEMIA HEMOLÍTICA AUTOINMUNE CALIENTE

La anemia hemolítica autoinmune caliente (AHAIC) puede ser primaria (idiopática) o secundaria a algunas enfermedades como linfomas, lupus eritematoso sistémico y carcinomas, o por la terapia con ciertos fármacos.

La incidencia de esta enfermedad varía en dependencia de las series estudiadas, pero no existe duda de que es el tipo más común de anemia hemolítica autoinmune. Los estimados oscilan entre el 48 y el 70 % del total de las AHAI. En la tabla 6.23 se resumen los hallazgos inmunohematológicos en las AHAIC.

**Prueba de antiglobulina directa (PAD).** En la PAD se pueden detectar los autoanticuerpos de los isotipos IgG, IgA e IgM, aunque estos últimos por lo general concomitan con los IgG. Puede haber solo de C<sub>3</sub>, e incluso, puede ser negativa la prueba (véase el acápite acerca de la AHAI y la PAD negativa).

**Tabla 6.23** Hallazgos inmunohematológicos en las anemias hemolíticas autoinmunes calientes

Parámetros	Resultados
Porcentaje de casos	48 - 70 %
PAD	
IgG	20 - 66 %
IgG, C <sub>3</sub>	24 - 63 %
C <sub>3</sub>	7 - 14 %
IgA/IgM	1 - 10 %
Negativa	10 - 20 %
Isotipo de autoanticuerpos	IgG (en menor frecuencia IgA/IgM)
Eluido	Autoanticuerpos IgG
Suero	Anticuerpos incompletos, reactivos con células tratadas con enzimas (90 %). Hemólisis de células tratadas con enzimas (13 %). Hemólisis de células no tratadas (infrecuente)
Especificidad de autoanticuerpos	Rh y otras 80 % tipo I; 20 % tipo II

**Elución.** La presencia de un autoanticuerpo en los eritrocitos debe ser confirmada por la elución, o sea, con el empleo de algún procedimiento para separar a los autoanticuerpos de los eritrocitos y obtenerlos en una fase acuosa para su posterior caracterización. En algunos casos, los autoanticuerpos están presentes en pequeñas concentraciones y pueden no ser recuperados en la elución. Cuando en la PAD se detecta solo  $C_3$ , en la elución puede detectarse o no el autoanticuerpo. Esto se debe, tal vez, a que el autoanticuerpo se separa de los eritrocitos después de haberse iniciado la cascada del complemento. No obstante, con técnicas de mayor sensibilidad que la prueba de Coombs, puede revelarse la presencia de este.

Una elución inactiva de eritrocitos con una PAD intensamente positiva, puede ser indicativo de que hay anticuerpos contra fármacos que están unidos a los eritrocitos.

La elución obtenida debe ser enfrentada a eritrocitos de grupo O pertenecientes a un panel de eritrocitos de identificación de anticuerpos (tabla 6.21). El estudio debe realizarse a 37 °C en la PAI y con eritrocitos tratados con enzimas proteolíticas, que aumentan la sensibilidad de detección de los anticuerpos. Si el resultado es positivo, debe enfrentarse a todo el panel de eritrocitos para determinar la especificidad de los anticuerpos (tabla 6.22). En la mayoría de los casos, el autoanticuerpo no muestra especificidad aparente y reacciona con todas las muestras de eritrocitos que conforman el panel de células.

En muy pocos casos, el anticuerpo posee especificidad, y la confirmación de la naturaleza autoinmune de este, se demuestra por la presencia del antígeno específico en los eritrocitos del paciente, o en que estos adsorben de nuevo los anticuerpos de la elución.

La existencia de autoanticuerpos reactivos a 37 °C en la elución, confirma el diagnóstico de una AHAIC.

**Especificidad de los autoanticuerpos.** La especificidad de los autoanticuerpos asociados con AHAIC es muy compleja. La clasificación más simple es la que divide la especificidad en dos tipos:

1. Tipo I: autoanticuerpos calientes que reaccionan solo con los eritrocitos senescentes o gerocitos del paciente.
2. Tipo II: autoanticuerpos calientes que reaccionan por igual con los reticulocitos (eritrocitos jóvenes) que con los eritrocitos senescentes.

Los autoanticuerpos calientes de tipo I por lo general muestran especificidades para los antígenos del sistema Rh; no así los anticuerpos de tipo II que, en la mayoría de los casos, no es posible determinar su especificidad.

En pocos casos (4 %), los autoanticuerpos muestran especificidades simples (por ejemplo: anti-e, anti-c); en otros, las especificidades reveladas pueden ser confundidas con un aloanticuerpo. Por ejemplo, un paciente con fenotipo Rh CcDee y anticuerpo anti-E en la elución; pero este anticuerpo es capaz de adsorberse con eritrocitos que carecen del antígeno, por lo que en realidad son autoanticuerpos que mimetizan especificidades de aloanticuerpos.

En casi todos los casos, la especificidad se manifiesta como una *especificidad relativa*, y esta es revelada al diluir la elución y enfrentarla a diferentes fenotipos Rh. La especificidad relativa más común es anti-e. De otros autoanticuerpos solo puede determinarse que son específicos para el complejo Rh al no reaccionar con eritrocitos Rh nulos (carentes de los antígenos del sistema Rh o en parte delecionados). La reacción de los autoanticuerpos con eritrocitos Rh nulos o delecionados de manera parcial sugiere especificidades no relacionadas con el sistema Rh.

Se han identificado también autoanticuerpos con especificidades para otros sistemas de grupos sanguíneos, entre los que se incluyen los antígenos A (ABO), Ena, Jk<sup>a</sup>, Kell, Kp<sup>b</sup>, Js<sup>b</sup>, Lan, LW, N, Sc1, U, Wr<sup>b</sup>, Xg<sup>a</sup> y otros.

Las determinaciones de la especificidad de los autoanticuerpos es de interés académico; no existe relación alguna entre la especificidad y la severidad de la enfermedad. El conocimiento de la especificidad de los autoanticuerpos puede ser útil al determinar si los anticuerpos circulantes en el suero son aloanticuerpos o autoanticuerpos y para la estimación de la concentración de estos últimos, que puede servir de referencia al evaluar la efectividad del tratamiento. Algunos centros de investigación se apoyan en la especificidad de los autoanticuerpos para seleccionar la sangre que se debe transfundir.

**Estudios en el suero del paciente.** En la mayoría de los pacientes, los autoanticuerpos libres en el suero están en bajas concentraciones. Estos son detectados en el suero cuando todos los sitios antigénicos de los eritrocitos están ocupados y no pueden unirse a ellos más anticuerpos *in vivo*. La PAD en estos casos es intensamente positiva. En el 50 % de los pacientes se detectan autoanticuerpos IgG en el suero que reaccionan de manera apropiada en la prueba de antiglobulina indirecta (PAI). Con el tratamiento de los eritrocitos con enzimas se obtiene positividad en el 90 % de los casos. Los autoanticuerpos capaces de hemolizar a células no tratadas con enzimas (autohemolisinas), afortunadamente son poco frecuentes, ya que estos provocan hemólisis intravascular que se asocia con una alta mortalidad



de los pacientes. Las investigaciones en el suero del paciente pueden revelar que existen aloanticuerpos provocados por transfusiones o embarazos anteriores. La detección de aloanticuerpos es vital para la terapia transfusional, ya que pueden estimular reacciones transfusionales hemolíticas y comprometer la recuperación y la vida del paciente. La certeza de la aloinmunización se tiene al identificar, en el suero del paciente, anticuerpos contra antígenos eritrocitarios no presentes en sus eritrocitos, por lo general con especificidades entre los sistemas Rh, Kell, Duffy y Kidd.

La presencia de los aloanticuerpos puede estar enmascarada por autoanticuerpos circulantes en el suero, y es necesario eliminar estos últimos de la reacción para revelar los primeros. Con este objetivo se utiliza la técnica de adsorción en caliente, que consiste en la incubación a 37 °C del suero del paciente con los eritrocitos autólogos tratados antes con enzimas proteolíticas o con una combinación de estas con ditiotreitól (ZZAP). Es necesario el tratamiento previo de los eritrocitos, para eliminar los autoanticuerpos unidos *in vivo* a ellos, y dejar libres los sitios antigénicos para la adsorción de los autoanticuerpos del suero.

**Destrucción inmune de los eritrocitos en las AHAIC.** La destrucción intravascular de los eritrocitos en las AHAIC es poco frecuente. Cuando esta ocurre, se han detectado hemolisinas *in vitro*. Como es de esperar, los pacientes con estos autoanticuerpos presentan una anemia severa y por lo general la mortalidad es alta si no es suprimido el proceso hemolítico. La destrucción de eritrocitos en la AHAIC es, sobre todo, extravascular (véase el mecanismo de hemólisis extravascular).

**Autoanticuerpos estimulados por la transfusión.** Las transfusiones en períodos tempranos de la aparición de la enfermedad sin que comience aún el tratamiento inmunosupresor, comprometen la respuesta a este. Las transfusiones innecesarias incrementan la producción de autoanticuerpos por el estímulo inmunogénico que producen los eritrocitos del donante. En algunos pacientes, las transfusiones provocan la aparición de complemento en los eritrocitos en los que solo se detectaba IgG. Esto indica un incremento de la anemia por el efecto sinérgico que el complemento manifiesta en la destrucción de los eritrocitos por el macrófago.

**Selección de la sangre para la transfusión en las AHAIC.** El aspecto más importante para la selección de la sangre que se va a transfundir es la detección de aloanticuerpos circulantes que puedan causar reacciones transfusionales hemolíticas. No existe justificación para ignorar este aspecto en las

pruebas de compatibilidad. Los procedimientos utilizados para este fin han sido mencionados, son prácticos y no requieren mucho tiempo para su realización.

Cuando los autoanticuerpos tienen especificidad definida o muestran especificidad relativa, esta puede tenerse en cuenta para la transfusión. En los pacientes con autoanticuerpos de especificidad anti-e, los eritrocitos de fenotipo Rh ccDEE pueden sobrevivir mejor al ser transfundidos, que los de fenotipo Rh ccddee o los CcDee. Sin embargo, este hallazgo no es siempre cierto y, en ocasiones, la sobrevivencia de eritrocitos carentes del antígeno no es muy diferente a la de los que lo presentan. Por ejemplo, en un estudio se comprobó que la vida media de los eritrocitos CCDee fue de 2 días y la de los eritrocitos ccDEE fue de 4 días.

En otros casos, los autoanticuerpos que muestran especificidad son los responsables directos de la destrucción y, con la transfusión de eritrocitos carentes del antígeno, se obtienen beneficios notables. Existen dos excepciones en las que no se recomienda la transfusión de eritrocitos carentes del antígeno específico para los autoanticuerpos. Una de ellas es la transfusión de sangre RhD positiva a pacientes RhD negativos. Esto es particularmente importante en las mujeres en edad gestacional o cuando es necesario administrar varias transfusiones. Por ejemplo, en un paciente con fenotipo Rh ccddee con especificidad de autoanticuerpo anti-e, los eritrocitos indicados serían de fenotipo E+e- y este fenotipo es imposible encontrarlo en donantes RhD negativos (ccddEE), por lo que la única alternativa de sangre carente del antígeno se encuentra en donantes RhD positivos.

La otra excepción es cuando el paciente presenta un aloanticuerpo que contraindica la transfusión de eritrocitos carentes del antígeno específico para los autoanticuerpos; por ejemplo, un paciente con un aloanti-E y un autoanti-e. Los aloanticuerpos siempre deben ser considerados de mayor relevancia clínica, por lo que debe transfundirse sangre E negativa.

Teniendo en cuenta este último ejemplo, no se recomienda la transfusión a partir de la compatibilidad de la especificidad de los autoanticuerpos, si existe riesgo de aloinmunización. Sin embargo, se conoce que la aloinmunización en pacientes con AHAIC es un evento poco frecuente, debido a que la respuesta aloinmune está suprimida por el uso de inmunosupresores.

Cuando existen autoanticuerpos de especificidad no definida, circulantes en el suero, es necesario transfundir los eritrocitos incompatibles, después de comprobar la ausencia de aloanticuerpos causantes de RTH. Se sugiere realizar las pruebas de compatibilidad con diferentes donantes y seleccionar la unidad de eritrocitos menos incompatible, aunque no existen datos que apoyen esta recomendación y que demuestren que estos eritrocitos sobrevivan mejor en el paciente.

En la mayoría de los casos y teniendo en cuenta que es difícil evitar la incompatibilidad causada por los autoanticuerpos en la selección de la sangre, ya que solo en el 4 % de los pacientes con AHAIC se demuestra especificidad de autoanticuerpos y que la incompatibilidad por autoanticuerpos rara vez causa problemas clínicos, no se debe considerar la especificidad del autoanticuerpo para la transfusión. Si es obligatorio investigar si existen autoanticuerpos y excluir la incompatibilidad causada por estos. Otros aspectos relacionados con la transfusión se abordan en el capítulo acerca de la medicina transfusional.

### ANEMIA HEMOLÍTICA AUTOINMUNE CON LA PRUEBA DE ANTIGLOBULINA DIRECTA NEGATIVA

La mayoría de los pacientes con AHAIC presentan una prueba de antiglobulina directa (PAD) positiva, pero una PAD negativa no excluye la enfermedad. Se han descrito varios casos de AHAI en los que los autoanticuerpos no han sido demostrados con las pruebas serológicas convencionales. Una de las explicaciones de este fenómeno es que el número de moléculas de IgG por eritrocito es inferior a 200, que es el requerido para una PAD positiva.

Durante mucho tiempo, el diagnóstico de AHAIC con PAD negativa se realizaba por exclusión. En la actualidad se cuenta con procedimientos que, si bien no son todo lo eficientes que se desea, pueden establecer un diagnóstico en la mayoría de los casos en que se sospecha hemólisis inmune.

Los procedimientos más usados son:

1. Ensayos inmunoenzimáticos de antiglobulina (ELISA).
2. Prueba de antiglobulina directa (PAD) en autoanizador.
3. PAD con antiinmunoglobulinas marcadas con radioisótopos.
4. Técnica manual de polibrene directa.
5. Técnica directa con bromelina.
6. Concentración del eluato.
7. Ensayos de fagocitosis *in vitro* con monocitos.

Los resultados obtenidos con estos métodos confirman que la PAD negativa no es atribuible solo a la presencia de pocas moléculas de IgG por eritrocito. En muchos casos, las concentraciones de autoanticuerpos IgG son superiores a las encontradas en eritrocitos con PAD débilmente positiva. Al parecer, la ineffectividad de la prueba de Coombs se explica

porque las antiinmunoglobulinas no establecen uniones entre células, debido a una orientación particular de las moléculas de autoanticuerpos. Esta disposición impide que se evidencie la aglutinación.

En algunos pacientes, la negatividad de la PAD se debe a los procedimientos utilizados *in vitro* (por ejemplo, lavado de los eritrocitos). Cuando existen autoanticuerpos IgG de baja afinidad y los lavados de los eritrocitos se realizan con solución salina a temperatura ambiente, la PAD puede ser negativa, lo que demuestra la presencia de los autoanticuerpos cuando los lavados se realizan con solución salina fría a -4 °C o en solución de baja fuerza iónica.

### ANEMIA HEMOLÍTICA AUTOINMUNE INDUCIDA POR FÁRMACOS

Los primeros casos descritos de AHAI inducida por fármacos, se relacionaron con la administración de alfa-metildopa. Después de esta observación, han sido identificadas otras drogas como inductoras de autoinmunidad contra eritrocitos. Entre ellas: clorpromazina, nomifensina, cianidanol, fenacetina, diclofenac, procainamida, ibuprofén, estreptomycin, levodopa, ácido mefenámico e interferón alfa. El tratamiento con estos medicamentos provoca desórdenes del sistema inmune, aún no dilucidados del todo, que llevan a la producción de autoanticuerpos contra los propios eritrocitos del paciente. Es importante no confundir este mecanismo con el de la anemia hemolítica por fármacos, debido a la producción de anticuerpos contra el medicamento, en que los eritrocitos se comportan como espectadores inocentes de la inmunohemólisis.

Los hallazgos serológicos de estos casos no se pueden distinguir de los asociados con las AHAIC. Aparecen en la tabla 6.24.

Para explicar la inducción de la autoinmunidad por medicamentos, se han propuesto diferentes mecanismos. Unos se apoyan en que el fármaco altera los antígenos del eritrocito, que son reconocidos luego como no propios, por el sistema inmune. También en ensayos *in vitro* se ha demostrado que la droga interfiere en la función de las células T supresoras, lo que facilita la producción de autoanticuerpos por las células B. Otros estudios no confirman estos resultados. Algunos autores plantean que el mecanismo de inducción de autoinmunidad por el interferón alfa (IFN) es similar al de la metildopa. Estas observaciones se apoyan en que el IFN puede modificar las membranas celulares y convertirlas en antigénicas.

Los hallazgos relacionados con la inducción de autoanticuerpos por la alfa-metildopa son los siguientes:

1. PAD positiva en aproximadamente el 15 % de los pacientes que reciben tratamiento con este fármaco. De ellos solo del 0,5 al 1 % desarrollan anemia hemolítica.
2. En los eritrocitos se identifica solo la IgG; rara vez, C<sub>3</sub>.
3. PAD positiva 6 meses después del tratamiento.
4. Los autoanticuerpos en el suero y en la elución tienen características similares a las encontradas en la AHAIC.
5. La positividad de la PAD puede disminuir de manera progresiva después que se suspende el tratamiento, y puede persistir hasta 2 años.

Cuando se evidencia que el fármaco ha inducido la anemia hemolítica, debe ser retirado. En los pacientes con autoanticuerpos inducidos por alfa-metildopa, pero sin manifestaciones clínicas de anemia hemolítica, se debe descontinuar el tratamiento. La inducción del proceso hemolítico es dosis-dependiente.

En aquellos pacientes en que se decida continuar la terapia, aunque presenten autoanticuerpos sin manifestaciones de anemia, deberán ser monitorizados

cuidadosamente desde el punto de vista serológico y hematológico. En estos casos es importante la realización de la PAI. En los pacientes con PAD positiva y PAI negativa, la anemia hemolítica es improbable. En los que ambas pruebas resulten positivas, hay alto riesgo de aparición de anemia hemolítica.

## SÍNDROME DE AGLUTININAS FRÍAS

El síndrome de aglutininas frías (SAF) es el tipo más común de anemia hemolítica asociada con autoanticuerpos fríos. Representa del 16 al 32 % de los casos con hemólisis de tipo inmune. Este síndrome puede manifestarse de forma aguda o crónica. La forma aguda es secundaria a enfermedades linfoproliferativas (por ejemplo: linfomas) o a la infección por *Mycoplasma pneumoniae* o al virus de inmunodeficiencia adquirida (VIH). La forma crónica se aprecia en pacientes de edad avanzada con manifestaciones de anemia ligera o moderada. Los pacientes expuestos a ambientes fríos pueden presentar hemoglobinuria y fenómeno de Raynaud. En la tabla 6.25 se resumen los hallazgos inmunohematológicos en el SAF.

**Tabla 6.24** Hallazgos inmunohematológicos en las anemias hemolíticas autoinmunes inducidas por fármacos

Parámetros	Resultados
Porcentaje de casos PAD	12 - 18 %
IgG	94 %
IgG, C <sub>3</sub>	6 %
Isotipo de autoanticuerpos	IgG
Eluido	Autoanticuerpos IgG
Suero	Autoanticuerpos IgG
Especificidad de autoanticuerpos	Rh

**Tabla 6.25** Hallazgos inmunohematológicos en el síndrome de aglutininas frías

Parámetros	Resultados
Porcentaje de los casos PAD	16 - 32 %
C <sub>3</sub>	98%
Isotipo de autoanticuerpos	IgM
Eluido	No reactivo
Suero	Crioaglutinina IgM de título mayor que 1 000, a 4 °C, que reaccionan a 37 °C. Autoanticuerpo monoclonal en la forma crónica
Especificidad de autoanticuerpos	Anti-I, anti-i, IT, Pr, IH, AI, BI, Gd

**Prueba de antiglobulina directa (PAD).** El complemento es la única proteína detectada en los eritrocitos. El autoanticuerpo frío es de tipo IgM y se une a los eritrocitos, en la circulación periférica, cuando la temperatura está por debajo de 32 °C. Al unirse la IgM, activa la cascada del complemento y promueve la unión del C3b y del C4b a los eritrocitos. Al circular el eritrocito por áreas donde la temperatura es mayor, la IgM se disocia y solo queda el complemento unido a los eritrocitos. La acción de los inactivadores H e I provoca que el C3b/C4b sea inactivado a C3dg/C4d, y estos son los fragmentos que se identifican sobre los eritrocitos en la PAD. Estos hallazgos muestran la importancia de la presencia del anti-C3d en el suero de Coombs.

**Elución.** Por lo general, no se obtiene actividad de autoanticuerpos en la elución, ya que en los eritrocitos *in vivo* solo está presente el complemento.

**Especificidad de los autoanticuerpos.** La especificidad más común es anti-I, y la menos probable, anti-i. Esta última aparece asociada, con más frecuencia, con la mononucleosis infecciosa. En raras ocasiones pueden identificarse anti-Pr y otras especificidades.

**Estudios en el suero.** En el suero de estos pacientes se identifican autoanticuerpos IgM fríos o crioaglutininas con títulos que pueden ser de 1 000 en períodos de incubación de 12 horas, a 4 °C. Cuando se usan períodos de incubación de 1 hora, a 4 °C, se obtienen títulos mayores de 64 y un amplio rango térmico de actividad de anticuerpo. Esto indica que las crioaglutininas de importancia clínica aglutinan eritrocitos a 37 °C en presencia de albúmina y son capaces de hemolizar los eritrocitos tratados con enzimas. Es importante tener en cuenta esto, ya que los autoanticuerpos fríos son anticuerpos *naturales* presentes en la mayoría de los individuos sanos, pero en títulos menores de 64, a una temperatura de 4 °C e incapaces de reaccionar a 37 °C.

En algunos casos se puede demostrar la actividad hemolítica con eritrocitos suspendidos en solución salina a temperaturas entre 20 y 25 °C.

En el SAF crónico, el autoanticuerpo IgM es monoclonal, mientras que la forma aguda se caracteriza por una IgM policlonal.

Es también necesario realizar la detección e identificación de aloanticuerpos, estrictamente a 37 °C, ya que a menores temperaturas puede fijarse el autoanticuerpo y provocar positividad en la PAI. En algunos casos en que la producción de autoanticuerpos fríos está exacerbada, es necesario recurrir a procedimientos de autoadsorción en frío para realizar el estudio de los aloanticuerpos.

**Destrucción inmune de los eritrocitos en el SAF.** La exposición al frío provoca la unión de los autoanticuerpos IgM a los eritrocitos, y se activa la vía clásica del complemento. Como resultado, algunos eritrocitos son destruidos por lisis intravascular. Cuando la temperatura del paciente vuelve a ser normal, la IgM pierde afinidad, se separa y deja fijado el C3b a los eritrocitos. Los eritrocitos con C3b son atrapados por los macrófagos del hígado si antes el C3b no fue inactivado por los factores H e I para producir C3dg. Los eritrocitos con C3dg unido sobreviven de manera normal en la circulación, ya que no existen receptores para este fragmento en los macrófagos. La destrucción extravascular en estos casos es limitada.

**Selección de la sangre para la transfusión en el SAF.** La compatibilidad de la sangre para el autoanticuerpo es casi imposible, ya que no hay forma de obtener sangre de adulto carente del antígeno I. La transfusión hay que administrarla con resultados positivos en la prueba de compatibilidad pretransfusional, sobre todo en las que se realizan en un medio salino y albuminoideo. Las características de la transfusión en estos pacientes se definen en el capítulo sobre medicina transfusional.

## ANEMIA HEMOLÍTICA AUTOINMUNE MIXTA

La anemia hemolítica autoinmune mixta se caracteriza por hallazgos serológicos compatibles con la AHAIC y con el síndrome de aglutininas frías (SAF). Representa entre el 7 y el 8 % de las AHAI y puede ser idiopática o secundaria, por lo general asociada con LES. Los hallazgos serológicos se muestran en la tabla 6.26.

**PAD.** La prueba de antiglobulina directa es positiva cuando hay IgG y C3dg. Presumiblemente, la IgG es el autoanticuerpo caliente, mientras que el C3dg es fijado por la autoaglutinina fría IgM.

**Elución.** En la elución se detecta el autoanticuerpo IgG caliente.

**Especificidad de los autoanticuerpos.** La crioaglutinina es de igual especificidad que en el SAF (anti-I, anti-i). En otros casos no ha sido posible determinar la especificidad.

Los autoanticuerpos calientes muestran especificidades similares a las descritas en las AHAIC, aunque se ha sugerido que puede reconocer un determinante antigénico de los grupos sanguíneos, diferente de los que reconoce el autoanticuerpo en la AHAIC.

**Tabla 6.26** Hallazgos inmunohematológicos en la anemia hemolítica autoinmune mixta

Parámetros	Resultados
Porcentaje de casos	7 - 8 %
PAD	
IgG, C <sub>3</sub>	71 - 100 %
Isotipo de autoanticuerpos	IgG e IgM
Eluido	Autoanticuerpos IgG
Suero	Autoanticuerpo IgG reactivo en la PAI. Crioaglutinina IgM de título menor de 64, a 4 °C que reacciona a 37 °C
Especificidad de autoanticuerpos	IgG de especificidad no definida Crioaglutininas: anti-I, anti-i u otras

**Estudios en el suero.** En el suero se encuentran autoanticuerpos calientes IgG y la crioaglutinina IgM, con la diferencia de que esta última es de título menor de 64 a 4 °C pero reacciona a 37 °C.

**Destrucción inmune de los eritrocitos en la AHAI mixta.** La destrucción inmune de los eritrocitos es por mecanismos extravasculares similares a los de la AHAIC.

**Selección de la sangre para la transfusión en la AHAI mixta.** Se realiza de forma similar a lo expresado en la AHAIC.

## HEMOGLOBINURIA PAROXÍSTICA A FRIGORE

La hemoglobinuria paroxística *a frigore* (HPF) es poco frecuente. En ocasiones, se encuentra asociada con la sífilis, pero por lo general se presenta como un proceso agudo ocasional, secundario a infecciones virales, sobre todo en los niños, aunque puede

presentarse como una enfermedad crónica idiopática en personas de edad avanzada. Los hallazgos serológicos se muestran en la tabla 6.27.

**PAD.** El autoanticuerpo en la HPF es de la clase IgG y, al igual que el autoanticuerpo frío, IgM reacciona con los eritrocitos en las áreas de menor temperatura del cuerpo (por lo general en las extremidades), lo que causa la deposición de componentes del complemento (C3, C4) y se separa de los eritrocitos en las áreas de mayor temperatura corporal. La PAD solo detecta el complemento (C3) fijado a los eritrocitos. Es posible detectar los autoanticuerpos IgG cuando los eritrocitos son lavados con solución salina a 4 °C y se comportan como anticuerpos de baja afinidad.

**Elución.** Es invariablemente no reactivo.

**Especificidad de los autoanticuerpos.** Los autoanticuerpos son casi siempre de especificidad anti-P. De manera excepcional, se han descrito especificidades anti-I, anti-i y anti-Pr.

**Tabla 6.27** Hallazgos inmunohematológicos en la hemoglobinuria paroxística *a frigore*

Parámetros	Resultados
Porcentaje de casos	32 % en niños, infrecuente en adultos
PAD	
C <sub>3</sub>	94 - 100 %
Isotipo de autoanticuerpos	IgG
Eluido	No reactivo
Suero	Hemolisina bifásica IgG (anticuerpo de Donath-Landsteiner)
Especificidad de autoanticuerpos	Anti-P

**Investigaciones en el suero.** El autoanticuerpo IgG es descrito como una hemolisina bifásica, ya que se une a los eritrocitos a bajas temperaturas y los lisa a 37 °C. Esta es la prueba básica para el diagnóstico de la enfermedad (prueba de Donath-Landsteiner). Los autoanticuerpos pueden aglutinar los eritrocitos a 4 °C, pero rara vez a títulos mayores de 64 °C.

**Destrucción inmune de los eritrocitos en la HPF.** Se observan episodios de hemólisis intravascular por fijación de complemento que coincide con la hemoglobinuria.

**Selección de la sangre para la transfusión en la HPF.** El suero de los pacientes con HPF es compatible con eritrocitos de donantes cuando se realizan las pruebas de compatibilidad pretransfusional, ya que el

anticuerpo rara vez aglutina los eritrocitos a temperaturas superiores a 4 °C. Los autoanticuerpos de especificidad anti-P no reaccionan con eritrocitos de fenotipos raros p y P<sup>k</sup>. Existen evidencias de que los eritrocitos p sobreviven mejor que los P+ (P1+ o P1-). La incidencia de donantes p es aproximadamente 1 en 200 000; por tanto, los pacientes que requieran transfusiones urgentes deben transfundirse con independencia de la compatibilidad del autoanticuerpo, ya que la posibilidad de encontrar donantes compatibles es poco frecuente.

Las diferencias serológicas entre el síndrome de aglutininas frías (SAF) y la hemoglobinuria paroxística *a frigore* (HPF) y algunas características inmunohe-matológicas, se describen en la tabla 6.28.

**Tabla 6.28** Comparación de algunas características asociadas con el síndrome de aglutininas frías y la hemoglobinuria paroxística *a frigore*

Características	SAF	HPF
PAD	C3	C3
Título de aglutininas frías	>500	<64
Hemolisinas frías	Monofásicas	Bifásicas
Amplitud térmica	30 - 37 °C	10 - 20 °C
Prueba de Donath-Landsteiner	Negativa	Positiva
Isotipo de inmunoglobulina	IgM	IgG
Especificidad	I (i, Pr)	P
Eritrofagocitosis en lámina periférica	No	Muy frecuente
Fagocitosis con monocitos <i>in vitro</i>	No	Sí
Hemoglobinuria	Infrecuente	Muy frecuente

## BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

Cartron JP, Baily P, Le Van Kim C, Cherif-Zahar B, Matalssi G, Bertrand O, et al. Insights into the structure and function of membrana polypeptides carrying blood group antigens. *Vox Sang* 1998;74 (Suppl 2): 29-64.

CECMED. Recomendaciones para la evaluación de los diagnósticos para uso en Inmunohematología, 1998.

Daniels G. Terminology for red cell antigens-1999 update. *Immunohematol* 1999;15:95-9.

Guidelines for the Blood Transfusion Service. London. VW: HMSO, 1992.

Lapierre Y, Rigal D, Adam J. The gel test: a new way to detect red cell antigen-antibody reactions. *Transfusion* 1990;30:109-13.

Leger RM, Garratty G. Evaluation of methods for detecting alloantibodies underlying warm autoantibodies. *Transfusion* 1999 Jan;39(1):11-6.

Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M. Blood transfusion in clinical medicine. 10<sup>th</sup> ed. London: Blackwell Scientific Publications; 1997.

Rouger P, Noizat-Pirenne F, Le Pennec PY. Advances in the use of monoclonal antibodies for blood group testing. *Transfus Clin Biol* 1997;4:345-9.

Scott M. Rh serology coordinator's report. *Transfus Clin Biol* 1996, 3:333-7.

Shanwell A, Sallander S, Bremme K, Westgren M. Clinical evaluation of a solid-phase test for red cell antibody screening of pregnant women. *Transfusion* 1999; 39(1):26-31.

Vengelen-Tyler V (ed.). Technical manual. 12<sup>th</sup> ed. Bethesda: American Association of Blood Banks, 1996.

# CONTENIDO

---

## **Antígenos plaquetarios/ 593**

Antígenos compartidos/ 593

Antígenos específicos/ 594

Isoantígenos/ 594

Antígenos crípticos/ 594

Autoantígenos/ 595

## **Tipificación de los antígenos plaquetarios/ 596**

## **Técnicas para la detección de los aloanticuerpos/ 596**

Técnica de inmunofluorescencia/ 596

Ensayos inmunoenzimáticos/ 596

MAIPA/ 596

Métodos para diferenciar los anticuerpos específicos de los anticuerpos anti-HLA/ 597

## **Púrpura trombocitopénica neonatal aloinmune/ 597**

## **Púrpura trombocitopénica postransfusional/ 598**

## **Refractariedad a la transfusión de plaquetas/ 598**

## **Técnicas de detección de autoanticuerpos/ 598**

Prueba de inmunofluorescencia directa/ 598

Radioinmunoanálisis/ 598

Técnica de elución de anticuerpos/ 599

## **Antígenos leucocitarios/ 599**

Antígenos granulocitarios/ 599

Antígenos específicos de granulocitos/ 599

Antígenos compartidos/ 600

Antígenos presentes en los linfocitos/ 601

Antígenos presentes en los monocitos/ 601

## **Tipificación de antígenos granulocitarios/ 601**

## **Técnicas de detección de anticuerpos contra antígenos de granulocitos/ 601**

Técnica de leucoaglutinación/ 601

Técnica de inmunofluorescencia/ 601

Técnica de quimioluminiscencia/ 602

Dificultades de las técnicas serológicas convencionales/ 602

## **Detección de anticuerpos específicos de granulocitos/ 602**

Repercusión clínica de los anticuerpos específicos de granulocitos/ 602

## **Neutropenia neonatal aloinmune/ 602**

## **Neutropenia neonatal isoinmune/ 603**

## **Neutropenia autoinmune/ 603**

## **Principales reactivos usados en inmunohematología/ 603**

Reactivos hemoclasificadores policlonales/ 604

Reactivos hemoclasificadores policlonales del sistema de grupos sanguíneos ABO/ 605

Reactivos hemoclasificadores policlonales del sistema de grupo sanguíneo Rh/ 605

Reactivos hemoclasificadores monoclonales/ 606

Reactivos antiglobulínicos humanos/ 607

Albúmina sérica bovina/ 608

## **Bibliografía recomendada/ 609**

### Capítulo 50



## INMUNOLOGÍA DE LAS PLAQUETAS Y LOS LEUCOCITOS

*Lic. Antonio A. Bencomo Hernández*

*Dra. María Elena Alfonso Valdés*

*Lic. Yalile Alfonso Valdés*

*Dra. Martha Díaz Salazar*

### RESUMEN

La descripción, en 1958, del primer antígeno del sistema HLA (*Human Leucocytes Antigens*) y del primer antígeno específico de plaquetas, inicia la era de los antígenos plaquetarios y leucocitarios. Casi medio siglo ha transcurrido desde entonces, período en el cual se ha logrado precisar, en gran medida, la significación clínica de los anticuerpos antiplaquetarios y antileucocitarios. La detección de estos anticuerpos ha permitido la superación de muchas dificultades técnicas. La aplicación de los avances en el campo de la inmunología y la biología molecular, ha sido de vital importancia en el desarrollo de la serología leucoplaquetaria en la última década del siglo xx. En este capítulo se exponen los métodos para la tipificación de antígenos plaquetarios y granulocíticos. Se estudian, de forma breve, los trastornos más importantes relacionados con ellos. Por último, a manera de resumen, se ofrece una panorámica referente a la producción y al control de la calidad de los principales reactivos usados en el trabajo diario en los laboratorios de inmunohematología.

### ANTÍGENOS PLAQUETARIOS

Las plaquetas y los leucocitos tienen una entidad inmunológica propia, aunque expresan antígenos compartidos con otras células del organismo.

A diferencia de la serología eritrocitaria, la de los leucocitos y las plaquetas no se desarrolló junto con la historia de la transfusión sanguínea. Los anticuerpos antiplaquetas y antileucocitos se demostraron, en principio, en las trombocitopenias inducidas por medicamentos y en la agranulocitosis crónica, respectivamente.

La descripción del primer antígeno del sistema HLA (*Human Leucocytes Antigens*) y del primer antígeno específico de plaquetas, en 1958, inicia la era de los antígenos plaquetarios y leucocitarios. Casi medio siglo ha transcurrido desde entonces, período en el cual se ha logrado precisar en gran medida la significación clínica de los anticuerpos antiplaquetarios y antileucocitarios. La detección de estos anticuerpos ha llevado consigo la superación de muchas dificultades técnicas.

La identificación, caracterización bioquímica y localización de las dianas de los anticuerpos antiplaquetarios y antileucocitarios han repercutido en el perfeccionamiento de los métodos de detección. Por otra parte, la aplicación de los avances en el campo de la inmunología y la biología molecular ha sido de vital importancia en el desarrollo de la serología leucoplaquetaria en la última década del siglo xx.

A continuación se aborda el tema de los antígenos plaquetarios y leucocitarios, compartidos y específicos, así como los métodos de detección de los anticuerpos dirigidos contra estas células. Además, se exponen algunas consideraciones diagnósticas de las trombocitopenias y de las neutropenias inmunes.

### ANTÍGENOS COMPARTIDOS

Los antígenos compartidos se expresan en las plaquetas y en otras líneas celulares. Incluyen los antígenos de grupos sanguíneos y los del sistema HLA clase I.



Los antígenos A, B y H presentes en la membrana plaquetaria son constituyentes propios de esta y también pueden ser adsorbidos de las formas solubles del plasma. En el primer caso, la síntesis se realiza a partir de moléculas H tipo II y su expresión es independiente de los genes Lewis y Secretor. Estos se encuentran fundamentalmente en la cadena  $\alpha$  de la glicoproteína Ib (GPIb). En el segundo caso, la síntesis se realiza a partir de precursores H tipo I y su expresión depende de los genes Lewis y Secretor. Los antígenos de los sistemas Lewis, I y P se expresan en pequeñas cantidades, por lo que sus expresiones carecen de importancia clínica.

La expresión de los antígenos del sistema ABO debe tenerse en cuenta en la selección de las plaquetas, para la realización de las pruebas serológicas y en la transfusión de este componente. La administración de plaquetas ABO incompatibles puede ser indicada en casos de no disponerse de plaquetas compatibles. La sobrevida de las plaquetas ABO incompatibles es variable, debido a la variabilidad individual en la expresión de estos antígenos y al menor título de anti-B presente en los receptores, lo que está relacionado con la mayor sobrevida de las plaquetas B incompatibles.

Los antígenos del sistema HLA clase I pueden ser adsorbidos del plasma, pero su expresión se debe en mayor medida a la síntesis a partir del ARN contenido en las plaquetas. Las moléculas de clase I se encuentran involucradas en la refractariedad a la transfusión de las plaquetas (RTF) y en las reacciones febriles postransfusionales. Su participación en la púrpura trombocitopénica neonatal aloinmune (PTNA) es un tema controversial en la literatura científica.

## ANTÍGENOS ESPECÍFICOS

En un inicio, los antígenos específicos de plaquetas fueron identificados con diferentes nombres por los distintos investigadores que los descubrieron. En 1990, Von den Borne propuso una nomenclatura uniforme, que designa a cada sistema con las iniciales HPA (*Human Platelet Antigen*) y un número asignado de acuerdo con el orden cronológico del descubrimiento de cada sistema. Hasta el momento se conocen 5 sistemas bialélicos bien definidos. Las dos formas alélicas son codominantes y se identifican con las letras a y b en correspondencia con sus frecuencias relativas. Existen 8 sistemas de los que solo se conoce el alelo de baja frecuencia. En estos casos se utiliza la letra w para designar al sistema. El sistema bialélico puede definirse solamente cuando se identifican aloanticuerpos contra ambos alelos. Recientemente se han identificado 6 antígenos que se

encuentran pendientes de caracterizar de manera definitiva. Con excepción de los antígenos del sistema Gov, el resto reside en las glicoproteínas (GP) mayores de la membrana plaquetaria (tabla 6.29).

En el complejo glicoproteico GP IIb/IIIa se localiza la mayor cantidad de los antígenos plaquetarios específicos. En la membrana plaquetaria existen aproximadamente de 50 000 a 80 000 copias de este heterodímero que actúa como receptor del fibrinógeno una vez que la plaqueta se encuentra activada. Hasta la fecha se conocen las bases genéticas de 10 aloantígenos localizados en este complejo. En 9 casos, la causa de la variabilidad antigénica es la sustitución de un simple nucleótido. El antígeno Oe<sup>a</sup> es la excepción, el cual resulta de la delección de un fragmento de 3 nucleótidos en la glicoproteína IIIa.

En el complejo glicoproteico Ib/IX/V residen 4 sistemas antigénicos, en dos de los cuales se han podido determinar las bases genéticas. Este complejo funciona como receptor del factor von Willebrand y se encuentra involucrado en la adhesión plaquetaria a la matriz subendotelial de vasos sanguíneos dañados.

El complejo antigénico GP Ia/IIa o VLA-2 se expresa en las plaquetas, en los linfocitos T activados y en otros tipos celulares. Este heterodímero funciona como receptor del colágeno en el subendotelio expuesto y existen entre 800 y 2 800 copias de heterodímero por plaqueta. En este complejo residen dos sistemas antigénicos y en ambos casos la variabilidad es ocasionada por la sustitución de un nucleótido.

## ISOANTÍGENOS

El antígeno plaquetario nak<sup>a</sup> puede provocar la producción de anticuerpos causantes de refractariedad. La carencia de este antígeno se debe a la ausencia de la gp-iv, por lo que se ha considerado como un isoantígeno, ya que los anticuerpos no reconocen una variante molecular de la gp-iv.

## ANTÍGENOS CRÍPTICOS

Los antígenos crípticos deben su nombre a que su expresión no se puede detectar en condiciones normales, solo ocurre bajo algún tipo de influencia del entorno. Entre ellos se encuentra el antígeno tn, que puede expresarse en pacientes con anemias hemolíticas, leucemias y deficiencias de transferasas. El antígeno t puede quedar expuesto por tratamientos con neuroaminidasa. La activación, generalmente bacteriana, del antígeno t puede inducir el reconocimiento de las plaquetas infectadas por parte de los anticuerpos anti-t

**Tabla 6.29** Aloantígenos plaquetarios

Sistema	Antígeno	Otras nomenclaturas	Glicoproteína	Cambio de aminoácido
HPA-1	HPA-1a HPA-1b	Zw <sup>a</sup> , PI <sup>A1</sup> Zw <sup>b</sup> , PI <sup>A2</sup>	GPIIIa Pro <sup>33</sup>	Leu <sup>33</sup>
HPA-2	HPA-2a HPA-2b	Ko <sup>b</sup> Ko <sup>a</sup> , Sib <sup>a</sup>	GPIb Met <sup>145</sup>	Tre <sup>145</sup>
HPA-3	HPA-3a HPA-3b	Bak <sup>a</sup> , Lek <sup>a</sup> Bak <sup>b</sup>	GPIIb Ser <sup>843</sup>	Iso <sup>843</sup>
HPA-4	HPA-4a HPA-4b	Yuk <sup>b</sup> , Pen <sup>a</sup> Yuk <sup>a</sup> , Pen <sup>b</sup>	GPIIIa Glu <sup>143</sup>	Arg <sup>143</sup>
HPA-5	HPA-5a HPA-5b	Br <sup>b</sup> , Zav <sup>b</sup> Br <sup>a</sup> , Zav <sup>b</sup>	GP-Ia Lis <sup>505</sup>	A. Glu <sup>505</sup>
HPA-6w	HPA-6bw	Ca <sup>a</sup> , Tu <sup>a</sup>	GPIIIa Glu <sup>489</sup>	Arg <sup>489</sup>
HPA-7w	HPA-7bw	Mo	GPIIIa Ala <sup>407</sup>	Pro <sup>407</sup>
HPA-8w	HPA-8bw	Sr <sup>a</sup>	GPIIIa Cis <sup>636</sup>	Arg <sup>636</sup>
HPA-9w	HPA-9bw	Max <sup>a</sup>	GPIIb Met <sup>837</sup>	Val <sup>837</sup>
HPA-10w	HPA-10bw	La <sup>a</sup>	GPIIIa Glu <sup>62</sup>	Arg <sup>62</sup>
HPA-11w	HPA-11bw	Gro <sup>a</sup>	GPIIIa His <sup>633</sup>	Arg <sup>633</sup>
HPA-12w	HPA-12bW	Iy <sup>a</sup>	GP Ibβ A. Glu <sup>15</sup>	Gli <sup>15</sup>
HPA-13w	HPA-13bw	Sit <sup>a</sup>	GPIa	Tre <sup>799</sup> Met <sup>799</sup>
		Oe <sup>a</sup> Va <sup>a</sup> Pe <sup>a</sup> PI <sup>T</sup> Dy <sup>a</sup> Vis	GPIIIa GPIIb/ IIIa GP Iba GPV 38 kDa GPIV	Deleción de lis
Gov	Gov <sup>a</sup>	CD109 Gov <sup>b</sup>		

presentes en la mayoría de los sueros. Sin embargo, esta unión no produce trombocitopenia.

El EDTA produce modificaciones en la configuración del complejo gpiib-iiia. Los anticuerpos EDTA-dependientes inducen agregación y satelitismo. Su reconocimiento y confirmación serológica son importantes para evitar falsos diagnósticos y exploraciones innecesarias.

Drogas como la quinidina y la quinina inducen la expresión de neoantígenos en la membrana plaquetaria.

Estos neoantígenos estimulan la producción de anticuerpos que provocan trombocitopenia, la cual reaparece al suspender el tratamiento con la droga.

## AUTOANTÍGENOS

La mayoría de los autoanticuerpos detectados en los pacientes con púrpura trombocitopénica autoinmune (PTA) reconocen epítopes localizados en el complejo GPIIb/IIIa. En algunos casos se han identificado

anticuerpos que reconocen determinantes presentes en el complejo GPIb/IX y en la GPIa.

Además de las glicoproteínas de membrana, existen otras proteínas que han sido identificadas como diana de los autoanticuerpos en la pta. Ellos incluyen el receptor del colágeno de 62 kDa, el v $\alpha$ -2 y proteínas con pesos moleculares desde 50 a 240 kDa o de un rango más estrecho de 50 a 90 kDa. Koerner y algunos colaboradores purificaron 13 glicosfingolípidos y plantearon que 2 no bien caracterizados pudieran actuar como autoantígenos.

## TIPIFICACIÓN DE LOS ANTÍGENOS PLAQUETARIOS

El desarrollo de la biología molecular ha hecho posible vencer muchas de las dificultades para el tipaje de los sistemas HPA. En el tipaje celular se emplean antiseros procedentes de individuos sensibilizados, por lo que la disponibilidad de estos es escasa, sobre todo en los casos de los antiseros dirigidos contra antígenos de baja frecuencia. Además, la mayoría de estos antiseros están contaminados con anticuerpos anti-HLA, lo que puede afectar la especificidad de la reacción.

En inmunohematología se aplican las técnicas denominadas PCR-ASRA (PCR-*allele specific restriction analysis*), PCR-ASO (PCR-*allele specific oligonucleotide*) y PCR-SSP (PCR-*sequence-specific primer*).

La PCR-ASRA consiste en amplificar los segmentos de interés, mediante *primers* específicos para las GP implicadas en los sistemas HPA. El producto de la amplificación es digerido por endonucleasas de restricción específicas. Después de la digestión se realiza una electroforesis en geles de agarosa o acrilamida, tinción con el agente intercalante bromuro de etidio y transiluminación con luz ultravioleta de onda media (302 nm). El patrón de bandas resultantes se interpreta con la ayuda de una muestra control, consistente en diversos fragmentos de ADN de tamaño conocido, que se incluye en el mismo proceso electroforético.

En la PCR-ASO, una vez amplificado el producto de interés, este es transferido a un soporte sólido e hibridado con una sonda de ADN específica. La positividad se muestra como manchas oscuras, cuyo revelado depende del sistema de marcaje utilizado para la sonda.

La técnica de PCR-SSP permite amplificar alelos de forma específica. Esto evita pasos adicionales de restricción o hibridación, ya que la mera presencia o ausencia de fragmento de ADN es suficiente para determinar el genotipo.

## TÉCNICAS PARA LA DETECCIÓN DE ALOANTICUERPOS

Las técnicas para detectar aloanticuerpos emplean plaquetas de donantes de sangre, las cuales son enfrentadas al suero del paciente. En caso de existir aloinmunización plaquetaria, el suero debe ser enfrentado a un panel de plaquetas fenotipadas para conocer la especificidad de los aloanticuerpos.

## TÉCNICA DE INMUNOFLOURESCENCIA

La detección de los anticuerpos se realiza mediante un conjugado antiglobulínico marcado con isocianato de fluoresceína. En esta técnica las plaquetas son tratadas con paraformaldehído con el objetivo de disminuir la fijación inespecífica de IgG o de inmunocomplejos. Sus ventajas son: la fácil detección de fragmentos plaquetarios portadores de fluorescencia no específica y la identificación de IgG, IgM e IgA mediante antiglobulinas monoespecíficas. Este método es tomado como estándar para comparar nuevos procedimientos. Una desventaja que presenta es la baja sensibilidad, ya que se requiere como mínimo 1 000 moléculas de IgG unidas a las plaquetas para obtener una reacción positiva.

Una alternativa de la inmunofluorescencia microscópica es la citometría de flujo. Esta variante ha sido usada para la detección de aloanticuerpos y para la realización de las pruebas de compatibilidad.

## ENSAYOS INMUNOENZIMÁTICOS

En los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) se emplea antiglobulina marcada con peroxidasa o fosfatasa alcalina. La desventaja de este método es la tendencia de las IgG del suero a unirse a las microplacas, lo que puede dar resultados positivos falsos.

Las plaquetas se fijan a las microplacas y se incuban con el suero problema. Después de varios lavados, se añade una suspensión de eritrocitos recubiertos con anti-IgG. En el caso de que las plaquetas queden sensibilizadas, los eritrocitos se distribuirán de manera que recubran toda la monocapa plaquetaria; en el caso contrario, los eritrocitos se concentrarán en el fondo del pocillo. El uso de una solución de baja fuerza iónica reduce el tiempo de realización del ensayo. En lugar de emplear eritrocitos acoplados a anti-IgG, pueden usarse eritrocitos sensibilizados con anti-D de la clase IgG y luego añadir anti-IgG.

## MAIPA

El nombre de esta técnica proviene del inglés *Monoclonal Antibodies-specific Immobilization of*

*Platelet Antigen Assay* (MAIPA). En ella las plaquetas se incuban con el suero problema, y después de lavarlas se incuban con anticuerpos monoclonales contra glicoproteínas. Las plaquetas se solubilizan y el sobrenadante del lisado es incubado en microplacas previamente recubiertas con antiglobulina de ratón. Si el suero contiene anticuerpos, el sobrenadante contendrá inmunocomplejos, formados por la unión del anticuerpo monoclonal a su GP específica, a la cual se habrá fijado también el anticuerpo problema. Estos inmunocomplejos se unen mediante el anticuerpo monoclonal a la antiglobulina de ratón fijada a la microplaca. El anticuerpo es detectado por la adición de una antiglobulina humana marcada con fosfatasa alcalina o peroxidasa. Esta técnica tiene como ventajas que es más sensible que la inmunofluorescencia, la fase sólida o el ELISA, y permite definir la especificidad del anticuerpo detectado porque la presencia de anticuerpos HLA no interfiere en el resultado. El principal inconveniente de este método es la necesidad de disponer de un panel de anticuerpos monoclonales contra antígenos específicos de plaquetas. Además, si el anticuerpo monoclonal reconoce el mismo epítipo que el anticuerpo plaquetario, se pueden obtener resultados negativos falsos.

#### MÉTODOS PARA DIFERENCIAR LOS ANTICUERPOS ESPECÍFICOS DE LOS ANTICUERPOS ANTI-HLA

La especificidad de los aloanticuerpos es de vital importancia en el diagnóstico de la púrpura trombocitopénica neonatal aloinmune (PTNA) y de la púrpura trombocitopénica postransfusional (PTP). En ocasiones, esto se hace difícil por la coexistencia de anticuerpos específicos de plaquetas y de especificidad HLA clase I. Este problema se resuelve en parte al tratar las plaquetas con cloroquina, la cual eluye los antígenos HLA clase I. Después de 20 minutos de incubación con la cloroquina, el 80 % de los antígenos HLA es removido, mientras que las glicoproteínas no son afectadas. Sin embargo, después de 1 hora de incubación, el 50 % de las glicoproteínas es removido.

Una alternativa para remover los antígenos de clase I es el tratamiento de las plaquetas con solución reguladora de ácido cítrico. Existe la posibilidad de poder combinar los dos métodos anteriores, al usar el difosfato de cloroquina en un medio acidificado. Esta combinación es más efectiva y se dañan menos plaquetas.

## PÚRPURA TROMBOCITOPÉNICA NEONATAL ALOINMUNE

La púrpura trombocitopénica neonatal aloinmune (PTNA) es una trombocitopenia ocasionada por aloanticuerpos maternos de tipo IgG dirigidos contra antígenos plaquetarios del feto, heredados del padre, de los cuales la madre carece. La incidencia es de 1 por cada 2 000 a 4 000 recién nacidos. El 50 % de los casos se produce en una primera gestación.

El diagnóstico de la PTNA debe incluir la pesquisa del suero de la madre y la identificación de la especificidad del anticuerpo reactivo. Para este fin debe usarse un panel de plaquetas homocigóticas para los antígenos de relevancia clínica, ya que algunos anticuerpos no reaccionan con plaquetas heterocigóticas. Un resultado negativo de anticuerpos antiplaquetarios no excluye el origen aloinmune de la trombocitopenia. Esto puede ser debido a la baja sensibilidad de los métodos disponibles. En algunos casos, los anticuerpos son detectables después de 3 a 6 meses del parto. Cuando los anticuerpos no son detectados, el tipaje de la madre, el del padre y el del neonato son de mucha ayuda. Las técnicas de biología molecular ofrecen la posibilidad de conocer el genotipo del niño, aun cuando la severa trombocitopenia no permita el fenotipaje con el uso de un panel de antisueros. Las plaquetas del padre deben ser tipadas para el sistema antigénico responsable de la aloinmunización, con el propósito de predecir la probabilidad de afectación en futuros embarazos.

Las pruebas cruzadas entre el suero de la madre y las plaquetas del padre permiten detectar anticuerpos contra antígenos de baja frecuencia que pasan inadvertidos cuando se enfrenta el suero de la madre contra un panel celular. La utilización del MAIPA en las pruebas de compatibilidad ofrece la posibilidad de discriminar entre incompatibilidad debido a anticuerpos específicos de plaquetas y anticuerpos anti-HLA.

Existe controversia acerca de los posibles beneficios que reportaría el tipaje para el antígeno hpa-1a, para todas las mujeres en su primer embarazo, y la pesquisa de aloanticuerpos para las que resulten hpa-1a negativas. Al margen de que resulte beneficioso o no realizar un programa a gran escala, las hermanas de las mujeres con niños afectados deben de ser tipadas para el antígeno que estimuló la producción de aloanticuerpos. Es importante cerciorarse de que el recuento plaquetario de la madre sea normal, ya que los autoanticuerpos pueden ocasionar trombocitopenias neonatales.

## **PÚRPURA TROMBOCITOPÉNICA POSTRANSFUSIONAL**

La púrpura trombocitopénica postransfusional (PTP) es un cuadro clínico poco frecuente, caracterizado por una trombocitopenia que aparece entre los 7 y 10 días después de una transfusión de componentes sanguíneos en un paciente con historia de exposición a antígenos plaquetarios por embarazo o transfusiones anteriores. El diagnóstico se realiza por la detección de anticuerpos específicos de plaquetas. La especificidad debe ser determinada con vistas a obtener plaquetas compatibles, en caso de que sea necesario aportarlas. El genotipaje del paciente se puede realizar por medio de técnicas de biología molecular si no se dispone de la cantidad de plaquetas necesaria para realizar el tipaje con el uso de un panel de antisueros.

Siempre que la cifra de las plaquetas lo permita, se deberá realizar el estudio de la elución, en el que se detectará el mismo anticuerpo que fue hallado en el suero. Este resultado permite diferenciar la PTP de la trombocitopenia inducida por drogas y de la PTA. En la primera, los resultados son positivos solo cuando el fármaco está presente en la elución. En la PTA, los anticuerpos contenidos en la elución son reactivos con todas las plaquetas de un panel, excepto con aquellas que no expresen determinadas glicoproteínas.

## **REFRACTARIEDAD A LA TRANSFUSIÓN DE PLAQUETAS**

La refractariedad a la transfusión de plaquetas se define como la ausencia de un incremento en la cifra de plaquetas en el recuento efectuado una hora después de la transfusión.

Debido a que los aloanticuerpos que producen con mayor frecuencia refractariedad son de especificidad HLA-A y B, el empleo de plaquetas compatibles produce incrementos postransfusionales satisfactorios. Si la especificidad es conocida, el uso de plaquetas carentes del antígeno puede llevar a un incremento del recuento postransfusional. Lamentablemente, casi nunca se puede definir la especificidad, debido a la amplia exposición de alelos HLA a los que se han enfrentado los pacientes politransfundidos. Ante esta situación, una alternativa es el uso de donantes HLA compatibles. El enorme polimorfismo de los antígenos del sistema HLA, implica la necesidad de disponer de al menos 2 500 donantes para la selección de un donante de plaquetas HLA compatible.

La solución más práctica en estos casos es la realización de pruebas de compatibilidad entre las plaquetas del donante y el suero del receptor, y seleccionar los donantes con resultados negativos. Las técnicas más usuales empleadas en las pruebas cruzadas son las de ELISA, inmunofluorescencia y fase sólida. Los aloanticuerpos pueden desaparecer a lo largo del tiempo, por lo que el suero de los pacientes aloinmunizados debe ser evaluado de forma periódica. Si los anticuerpos desaparecen, el paciente puede ser tratado de nuevo con plaquetas de un donante escogido al azar.

A pesar de que los anticuerpos de especificidad HLA son los principales causantes de la refractariedad de causa inmunológica, los anticuerpos específicos de plaquetas, los autoanticuerpos y los anticuerpos producidos por drogas pueden también ocasionarla. Un pequeño porcentaje se debe a la infusión de anticuerpos presentes en el producto transfundido.

## **TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE AUTOANTICUERPOS**

La identificación de los anticuerpos sobre la membrana plaquetaria en los pacientes con PTA tiene mayor sensibilidad en el diagnóstico que los estudios serológicos. Sin embargo, la especificidad de estos ensayos es baja. Esto se debe a que la cantidad de IgG asociada con las plaquetas puede estar afectada por la presencia de inmunocomplejos circulantes, por la activación plaquetaria o por anticuerpos dependientes de drogas. Además, las plaquetas contienen IgG en sus gránulos  $\alpha$ , cuyo contenido varía en dependencia de los niveles de IgG en el plasma y de la edad del paciente. Otro inconveniente que presentan los ensayos directos es la excesiva cantidad de sangre que se necesita en el caso de los pacientes con trombocitopenia severa.

## **PRUEBA DE INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA**

La prueba de inmunofluorescencia directa es similar a la descrita para aloanticuerpos, con la diferencia que emplea plaquetas de pacientes de quienes se sospecha que presenten púrpura trombocitopénica autoinmune.

## **RADIOINMUNOANÁLISIS**

En caso de que se sospeche PTA y resulte negativa la prueba de inmunofluorescencia directa, se puede

realizar un radioinmunoanálisis con el empleo de anticuerpos monoclonales (MARIA), en los cuales un gradiente de sucrosa separa los fragmentos, lo que evita que los anticuerpos detectados sean producto de la fragmentación plaquetaria.

## TÉCNICA DE ELUCIÓN DE ANTICUERPOS

La elución de los anticuerpos es fundamental para confirmar que las inmunoglobulinas fijadas a las plaquetas del paciente se corresponden con anticuerpos antiplaquetarios y no son el resultado de uniones inespecíficas. Los métodos más usualmente empleados en la elución son el éter y la elución ácida.

## ANTÍGENOS LEUCOCITARIOS

Los leucocitos presentan antígenos identificados por anticuerpos monoclonales que juegan un papel importante en la diferenciación celular, además, actúan como moléculas de adhesión y como receptores en las múltiples funciones que tienen estas células. Estos antígenos no son reconocidos por aloantisueros y su identificación es importante en el diagnóstico de procesos hematológicos malignos, por lo que serán tratados en otros capítulos. En este capítulo se centra la atención en que los antígenos capaces de generar una respuesta aloinmune o autoinmune, por lo que la identificación de anticuerpos contra ellos resulta valiosa en el diagnóstico de las neutropenias aloinmunes y autoinmunes, en las reacciones febriles postransfusionales y en el daño pulmonar asociado con la transfusión sanguínea.

## ANTÍGENOS GRANULOCITARIOS

Los antígenos de la membrana granulocitaria no están tan bien caracterizados como los plaquetarios. Resulta conveniente dividirlos en 3 grupos:

1. Antígenos específicos de granulocitos: de los cuales la mayor parte se localiza en el receptor de la IgG FcγIIIb (CD16).
2. Antígenos compartidos: los que con frecuencia tienen una distribución limitada en otros tipos celulares, sobre todo en otros leucocitos. La mayoría se localiza en la molécula CD 11/18.
3. Antígenos comunes: están ampliamente distribuidos en otras células sanguíneas y del resto del organismo. Entre ellos están los antígenos de los grupos sanguíneos I, P, Le<sup>x</sup> y sialyl-Le<sup>x</sup> (CD15) y los antígenos HLA de clase I.

La nomenclatura inicial empleada para los antígenos granulocitarios usaba la letra N para indicar especificidad de neutrófilos, seguida por una letra mayúscula para designar el *locus* que controlaba la producción del antígeno, seguida de un número que corresponde al alelo específico del *locus*. Este sistema tiene el inconveniente de que tras haberse descubierto muchos antígenos ampliamente distribuidos, no se ajustan a esta convención. Hace poco se propuso una nueva nomenclatura que incluye los antígenos específicos y los compartidos. En el caso de los antígenos que no se tenga información suficiente, es necesario referirlos de acuerdo con el nombre original que les fue asignado.

## ANTÍGENOS ESPECÍFICOS DE GRANULOCITOS

En la molécula FcγIIIb (CD16) se localizan los antígenos HNA-1a, HNA-1b, HNA-1c, LAN y SAR. Los 2 primeros antígenos difieren en sus pesos moleculares debido a un patrón diferente de glicosilación. Sin embargo, en el ADN, ambos alelos solo difieren en 5 nucleótidos, lo que lleva a la sustitución de 4 aminoácidos. El HNA-1c difiere solo del HNA-1b en la sustitución de un aminoácido (tabla 6.30).

El LAN y el SAR son antígenos de alta frecuencia que se han definido por antisueros humanos. Su localización molecular en la molécula FcγIIIb se desconoce.

El antígeno HNA-2a se expresa en los granulocitos del 97 % de la población y se encuentra localizado en una glicoproteína de 56 a 64 kDa expresada tanto en la membrana plasmática como en la membrana de los gránulos específicos. Los anticuerpos anti-NB2 no reaccionan con la glicoproteína de 56 a 64 kDa, lo que sugiere que estos anticuerpos no reconocen un antígeno antitético al HPA-2a. El hallazgo de que el NB2 se localiza en una glicoproteína de 46 a 56 kDa, constituye otra evidencia en contra de que ambos antígenos sean antitéticos.

A diferencia del resto de los antígenos específicos de granulocitos, los antígenos ND1 y NE1 se definieron por autoanticuerpos procedentes de un paciente con neutropenia autoinmune. Hasta el momento no se conocen las bases moleculares, ni la naturaleza de tales antígenos.

**Tabla 6.30** Aloantígenos específicos de granulocitos

Nomenclatura HNA	Nombre original del sistema	Nombre original del antígeno	Glicoproteína	Cambio de aminoácido
HNA-1a	NA	NA1	FCγRIIIb Asp <sup>65</sup> A. Asp <sup>82</sup> Val <sup>106</sup>	Arg <sup>36</sup>
HNA-1b		NA2	FCγRIIIb Ser <sup>65</sup> Asp <sup>82</sup> Iso <sup>106</sup>	Ser <sup>36</sup>
HNA-1c	SH SH-	SH+	FCγRIIIb Ala <sup>78</sup>	A. Asp <sup>78</sup>
HNA-2 a	NB	NB1	56-64 kDa	
		NB2	45-56 kDa	
	NC	NC1		
	ND	ND1		
	NE	NE1		
	LAN SAR	LAN <sup>a</sup> SAR <sup>a</sup>	FCγRIIIb FCγRIIIb	

## ANTÍGENOS COMPARTIDOS

El antígeno 9a se definió en un principio como específico de granulocitos, pero investigaciones posteriores sugieren que este antígeno es idéntico al NB2 y al antígeno 1 de monocitos humanos (HMA 1). La localización molecular de este antígeno no se conoce aún.

Los antígenos del antes nombrado sistema cinco, conformado por los antígenos 5a y 5b, este último, conocido hoy como HNA-3a, se expresan en granulocitos, plaquetas, linfocitos y en células del riñón, ganglios linfáticos y bazo. Existen algunas evidencias que sugieren que estos antígenos son específicos de

granulocitos y que la amplia distribución encontrada en un inicio se deba a la contaminación de los antiseros con otros aloanticuerpos, tal vez de especificidad HLA. El HNA-3a se localiza en una glicoproteína granulocitaria de 70 a 95 kDa. Los antiseros contra el antígeno 5a son poco frecuentes, por esta razón, la significación clínica y la localización de este antígeno se desconoce (tabla 6.31).

Los antígenos HNA-4a y HNA-5a se localizan en las moléculas de adhesión CD11b/CD18 y CD11a/CD18, respectivamente. El HNA-4a se expresa en los granulocitos, monocitos y algunas subpoblaciones

**Tabla 6.31** Aloantígenos compartidos por los granulocitos y otras líneas celulares

Nomenclatura HNA	Nombre original del sistema	Nombre original del antígeno	Glicoproteína	Cambio de aminoácido
	9	9a		
	Cinco	5a		
HNA-3a		5b	70-95 kDa	
HNA-4a	Mart	Mart <sup>a</sup> (+)	CD11b	Arg <sup>61</sup>
		Mart <sup>a</sup> (-)	CD11b	His <sup>61</sup>
HNA-5a	Ond	Ond <sup>a</sup> (+)	CD11a	Arg <sup>766</sup>
		Ond <sup>a</sup> (-)	CD11a	Tre <sup>766</sup>
	SL	SL <sup>a</sup>		

de linfocitos T. El HNA-5a se expresa en granulocitos, monocitos, y linfocitos T y B.

El antígeno SL se identificó por un antisuero procedente de la madre de un neonato afectado de neutropenia aloinmune. El antígeno se expresa en granulocitos y en linfocitos, pero no se conoce la localización molecular de este.

## ANTÍGENOS PRESENTES EN LOS LINFOCITOS

En los linfocitos han sido identificados dos sistemas alélicos, uno en las células  $T\gamma$ , con los antígenos TCA1 y TCA2 y otro en las células  $T\mu$  con los antígenos TCB1 y TCB2.

La significación clínica de los aloanticuerpos contra antígenos específicos de linfocitos es desconocida. Solo se ha informado un caso de linfopenia aloinmune del recién nacido debido a aloanticuerpos maternos, los que provocaron inmunodeficiencia severa combinada.

En la literatura médica existen dos informes de hipogammaglobulinemia asociada con la presencia de autoanticuerpos citotóxicos. En uno de los casos, las dianas eran los linfocitos B y en el otro, los T cooperadores.

## ANTÍGENOS PRESENTES EN LOS MONOCITOS

Los monocitos expresan el antígeno Em, el cual se encuentra además en las células endoteliales. Los anticuerpos contra este antígeno están involucrados en el rechazo de los riñones trasplantados y pudieran participar también en la enfermedad de injerto contra huésped. La importancia clínica de los antígenos específicos de monocitos no se conoce del todo, por lo que aún se requieren investigaciones en este campo, lo que pudiera ayudar al mejor manejo de los pacientes que han necesitado un trasplante de órgano.

## TIPIFICACIÓN DE ANTÍGENOS GRANULOCITARIOS

En un inicio, los granulocitos, al igual que las plaquetas, se tipaban con sueros humanos de individuos aloinmunizados. Estos métodos serológicos tienen las mismas limitaciones que las de las plaquetas. Sin embargo, antígenos como el HNA-3a, 5a, 9a, NB2 y SL solo pueden ser tipados con el uso de técnicas serológicas convencionales.

Hoy se dispone de técnicas de biología molecular de PCR-SSP para el genotipaje de los antígenos HNA-1a, HNA-1b y HNA-1c. La descripción de las bases moleculares del polimorfismo de los antígenos HNA-4a y HNA-5a abre la posibilidad de que en un futuro sea posible realizar el genotipaje de estos antígenos.

## TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA ANTÍGENOS DE GRANULOCITOS

Las técnicas de detección de anticuerpos contra antígenos de granulocitos pueden ser directas e indirectas. Los ensayos directos se realizan en pacientes con sospecha de padecer neutropenias autoinmunes y se utilizan neutrófilos de estos pacientes. Los indirectos se emplean, sobre todo, en el diagnóstico de las neutropenias aloinmunes, aunque pueden ser también útiles en las neutropenias autoinmunes, en caso de que los anticuerpos se encuentren libres en el suero. En las pruebas indirectas se utilizan neutrófilos de donantes, a los cuales se enfrentan los sueros problemáticos. Las técnicas más empleadas en la detección de anticuerpos antigranulocitos son: la leucoaglutinación, la inmunofluorescencia y, en menor medida, la quimioluminiscencia.

## TÉCNICA DE LEUCOAGLUTINACIÓN

La técnica de leucoaglutinación inicialmente fue descrita por Lalezari como un macrométodo, pero hoy se realiza en microplacas. La aglutinación producida por los anticuerpos de la clase IgM es debida a un entrecruzamiento de la inmunoglobulina con el antígeno presente en la célula diana, de forma homóloga a como ocurre en los eritrocitos. Sin embargo, la aglutinación producida por la IgG es una respuesta activa de la célula al interactuar con el anticuerpo.

## TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA

La detección en la técnica de inmunofluorescencia se realiza mediante un reactivo antiglobulínico conjugado con isocianato de fluoresceína. En realidad se deben emplear fragmentos Fab o  $F(ab')_2$  de la fracción IgG antiinmunoglobulinas humanas, para evitar uniones por los receptores Fc de los granulocitos.

La citometría de flujo es empleada para realizar la inmunofluorescencia. No requiere el aislamiento previo de los granulocitos, ya que estos son identificados



de acuerdo con su patrón de dispersión de la luz. Además, la citometría hace posible la identificación, al unísono, de anticuerpos contra granulocitos, plaquetas y linfocitos.

## TÉCNICA DE QUIMIOLUMINISCENCIA

La técnica de quimioluminiscencia emplea granulocitos sensibilizados y células mononucleares de donantes sanos. Los primeros, son incubados con células mononucleares frescas y con luminol. Las células mononucleares con función fagocítica se activan producto de la sensibilización de los granulocitos por los anticuerpos contenidos en el suero. Esta activación trae como consecuencia la generación de radicales de oxígeno y la oxidación del luminol, la cual se lee en un luminoter. La sensibilidad de la técnica de quimioluminiscencia es similar a la de inmunofluorescencia.

## DIFICULTADES DE LAS TÉCNICAS SEROLÓGICAS CONVENCIONALES

Uno de los problemas esenciales de las técnicas serológicas es la coexistencia de los antígenos HLA clase I con los antígenos específicos de granulocitos. Por esta razón, los sueros que se han de investigar deben ser sometidos a la pesquisa de detección de anticuerpos anti-HLA, mediante ensayos de linfocitotoxicidad. En el caso de los sueros positivos por las dos técnicas, se debe descartar la coexistencia de anticuerpos de ambas especificidades. Con este propósito, se debe absorber el suero problema con una cantidad determinada de plaquetas para remover los anticuerpos anti-HLA clase I, o realizar la elución de los antígenos HLA de los granulocitos mediante un tratamiento con cloroquina. Ninguno de los dos procedimientos es efectivo. La absorción con las plaquetas puede ocasionar la pérdida de anticuerpos de baja afinidad para antígenos específicos de granulocitos, y la elución puede dañar los granulocitos.

Otro inconveniente de las pruebas serológicas es la interferencia ocasionada por los inmunocomplejos, que pueden adherirse a los receptores de complemento y de IgG, lo que ocasiona resultados positivos falsos. Se han propuesto 3 posibilidades para distinguir entre anticuerpos unidos de manera específica e inmunocomplejos:

1. Elución de los anticuerpos de los granulocitos, los que si son unidos de forma específica deben reaccionar de nuevo con otros granulocitos.

2. Realizar estudios de citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC).
3. Bloquear los receptores Fc con el uso de anticuerpos monoclonales.

En la práctica es difícil distinguir entre anticuerpos e inmunocomplejos, debido a la disponibilidad de los granulocitos para realizar la elución y a lo difícil que resulta interpretar los resultados de la técnica de ADCC.

## DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS DE GRANULOCITOS

La caracterización bioquímica de los antígenos específicos de granulocitos ha permitido el desarrollo de técnicas capaces de identificar anticuerpos contra estos antígenos. Estos métodos incluyen captura de antígenos, *immunoblot* y ensayos de inmunoprecipitación. El de mayor generalización es el MAIGRA (*Monoclonal Antibody-specific Immobilization of Granulocyte Antigens*). Esta técnica es homóloga a la MAIPA utilizada para las plaquetas.

## REPERCUSIÓN CLÍNICA DE LOS ANTICUERPOS ESPECÍFICOS DE GRANULOCITOS

Los anticuerpos antigranulocitos pueden ocasionar neutropenia neonatal aloinmune e isoimmune, neutropenia autoimmune, reacción febril postransfusional y daño pulmonar agudo relacionado con la transfusión. Las complicaciones postransfusionales generadas por los anticuerpos antileucocitarios serán tratadas en otro capítulo, por lo que en este se hará énfasis en las neutropenias inmunes.

## NEUTROPENIA NEONATAL ALOINMUNE

La neutropenia neonatal aloinmune es análoga a la enfermedad hemolítica del recién nacido. Desde el punto de vista clínico, se manifiesta por infecciones. El grado de neutropenia es severo y en el suero de la madre se pueden identificar potentes anticuerpos contra antígenos específicos de granulocitos. Se estima que la incidencia de este síndrome es de 0,2 %.

El diagnóstico serológico requiere la demostración de aloanticuerpos antigranulocitarios en el suero de la madre. El anticuerpo causante del síndrome debe ser reactivo con los granulocitos paternos y con todas las células de un panel granulocitario, en las que se

encuentre el antígeno específico correspondiente. Los antígenos más implicados son: el HNA-1a, el HNA-1b y el HNA-2a. La tipificación de los granulocitos de los padres ayuda a confirmar la especificidad del anticuerpo detectado.

## NEUTROPENIA NEONATAL ISOINMUNE

Las madres con deleciones en los genes de las glicoproteínas pueden desarrollar isoaglutininas contra determinantes no polimórficos. Las neutropenias severas pueden ocurrir en neonatos, hijos de madres con deleciones del gen FcRIIIb. El isoanticuerpo es reactivo con todos los granulocitos, excepto con los carentes de FcRIIIb. Esto, asociado con un fenotipo NA *null* (nulo) y con la ausencia de reacción de los granulocitos maternos frente a un monoclonal anti-CD16, permiten establecer el diagnóstico.

## NEUTROPENIA AUTOINMUNE

La neutropenia resulta de la presencia de autoanticuerpos antineutrófilos, que median la destrucción de los neutrófilos en el bazo. Los antígenos específicos de granulocitos involucrados en las neutropenias autoinmunes son el HNA-1a, el HNA-1b, el HNA-2a, el ND1, el NE1 y el 9a. Las integrinas leucocitarias CD11/CD18 han sido identificadas como dianas de autoanticuerpos en pacientes con neutropenias.

Un aspecto importante en el curso clínico de las neutropenias es la clonalidad de los autoanticuerpos. Las neutropenias seguidas de infecciones o exposiciones a medicamentos, por lo general ofrecen un patrón policlonal y son de curso limitado. En contraste, anticuerpos dirigidos contra autoantígenos tienen un patrón monoclonal, lo que implica un defecto del sistema inmunológico y predice una neutropenia de mayor grado y duración.

A pesar de los logros alcanzados en la detección de los anticuerpos antiplaquetarios y antileucocitarios, aún existen barreras técnicas difíciles de vencer. En las plaquetas, las mayores dificultades se concentran en la inespecificidad de los ensayos directos, lo que hace compleja su interpretación. En la serología leucocitaria, el mayor inconveniente reside en la presencia de receptores para el complemento y la porción Fc de las inmunoglobulinas. Los ensayos indirectos tienen limitaciones, en ambas células, ya que en ocasiones se hace difícil definir si los anticuerpos están dirigidos contra antígenos específicos de estas células o contra moléculas HLA de clase I. Los métodos de detección de anticuerpos específicos permiten superar este inconveniente, pero son

técnicas costosas que se encuentran al alcance de un número limitado de laboratorios.

Para interpretar de manera correcta los resultados de los métodos de detección de los anticuerpos antiplaquetarios y antileucocitarios es imprescindible que el clínico conozca las ventajas y desventajas del método aplicado en cada paciente, así como también es importante que el profesional de laboratorio domine los datos clínicos, para de esta forma aplicar el método más adecuado en cada caso.

## PRINCIPALES REACTIVOS USADOS EN INMUNOHEMATOLOGÍA

El descubrimiento de los grupos sanguíneos ABO, por Karl Landsteiner, en 1900, impulsó el desarrollo de la inmunohematología y de la medicina transfusional. A este avance le sucedieron los descubrimientos de numerosos sistemas de grupos sanguíneos. No obstante, el ABO es el más importante en la práctica transfusional.

Los primeros resultados en la producción de anticuerpos se remontan a principios del siglo xx. Los reactivos para uso en inmunohematología se producen después de ciertos avances en este campo y en la hemoterapia, aparejados con el desarrollo de la inmunología. Reactivos como el suero antiglobulínico y los sueros hemoclasificadores de grupos sanguíneos, paneles de células reactivas y algunos equipos constituyen la piedra angular para la investigación y la producción en inmunohematología.

Cuando se habla de producción de anticuerpos se piensa en grandes centros de obtención de anticuerpos; sin embargo, estos reactivos no solo se obtienen a escala industrial, sino también en laboratorios docentes y de investigaciones biomédicas. Los anticuerpos pueden producirse por inmunización *in vitro*, o mediante la inmunización o inoculación inducida del inmunógeno *in vivo* en animales y en humanos inmunocompetentes (donantes voluntarios sanos o sensibilización por transfusión sanguínea), por inmunización natural en mujeres sensibilizadas durante el embarazo, y por técnicas biotecnológicas y de ingeniería genética.

Después de los años 80 del siglo xx, los reactivos hemoclasificadores de los antígenos de los grupos sanguíneos, compuestos por anticuerpos policlonales obtenidos a partir de plasma animal o humano, son desplazados por reactivos que contienen anticuerpos monoclonales (AcMo), producidos por un clon celular immortalizado. Los reactivos monoclonales han incrementado de manera considerable la calidad de los ensayos inmunohematológicos y, en consecuencia, la

seguridad transfusional. A continuación se brinda una panorámica sobre la producción y el control de la calidad de los principales reactivos usados en inmunohematología: los reactivos hemoclasificadores policlonales y monoclonales, los antiglobulínicos humanos y la albúmina sérica bovina.

## REACTIVOS HEMOCLASIFICADORES POLICLONALES

Karl Landsteiner desarrolló un procedimiento para la determinación del grupo sanguíneo, al analizar muestras de sangre de sus colegas: mezcló sueros de unos con suspensiones de eritrocitos de otros, y de esta forma descubrió el sistema de grupo sanguíneo ABO. El temprano hallazgo del sistema ABO se debe a su ingenio, y a que este es el único sistema en el que los anticuerpos recíprocos se encuentran de manera constante y predecible en el suero de personas normales, cuyos eritrocitos no poseen el antígeno o los antígenos correspondientes.

Los restantes sistemas de grupos sanguíneos se descubrieron de modo sucesivo, por anticuerpos obtenidos al inmunizar animales con eritrocitos humanos (sistemas P y MN), por anticuerpos responsables de la enfermedad hemolítica del recién nacido presentes en el suero de púrpas (sistema Rh, antígeno D, sistema Kell y sistema Kidd, antígeno Jk<sup>a</sup>) y por anticuerpos responsables de reacciones postransfusionales presentes en el suero de pacientes transfundidos (sistema Rh, antígenos C, c, E, e y sistema Kidd, antígeno Jk<sup>b</sup>).

Estos anticuerpos son policlonales y con características heterogéneas, ya que son producidos por diferentes células plasmáticas provenientes de diferentes clones de células B. Su heterogeneidad se manifiesta en la naturaleza de los anticuerpos sintetizados, los cuales están dirigidos contra sitios diferentes de la molécula de antígeno y reaccionan con distintos grados de afinidad.

Los reactivos hemoclasificadores policlonales se obtienen mediante un esquema de inmunización en animales o en humanos (donantes voluntarios sanos), con sustancias específicas de grupos, ya sean antígenos solubles humanos o portados por los eritrocitos de humanos; en otros casos, el reactivo se produce a partir del suero de pacientes aloinmunizados que pueden ser pacientes politransfundidos o púrpas.

Cuando se alcanza un título conveniente de los anticuerpos dirigidos contra el antígeno de que se trate, se procede a la extracción de sangre para la producción del reactivo. Si este se realiza por inmunización en conejos se sacrifica al animal, ya que el volumen de

suero que se extrae resulta insuficiente para una producción a gran escala, no así cuando los animales inmunizados son carneros o caballos. En humanos, el suero se colecta por la exanguinotransfusión, cuando se trata de personas politransfundidas, como los pacientes con hemoglobinopatías, o a partir del plasma obtenido en la plasmaféresis en el caso de una púrpura o de un donante.

Un título superior a 1/64 es suficiente para decidir la extracción del suero. Este debe ser procesado, ya que puede contener anticuerpos de interés para producir un reactivo hemoclasificador, anticuerpos que reaccionen con otros antígenos eritrocitarios y contra antígenos de otras entidades celulares. Estos anticuerpos indeseables se eliminan tras adsorciones del suero con eritrocitos humanos lavados. Una vez terminado el proceso de adsorción y si es necesario, el suero se concentra para aumentar su título; en otras ocasiones se debe restituir con diluentes como la albúmina sérica bovina, o el suero humano de grupo AB libre de anticuerpos irregulares, que son aquellos anticuerpos contra antígenos de grupos sanguíneos diferentes al ABO.

La finalidad de la producción de un reactivo de este tipo es su comercialización y uso en los laboratorios de inmunología e inmunohematología, en los servicios de transfusiones y en los bancos de sangre. Para ello, el reactivo debe pasar previamente un riguroso control de calidad que consiste en la demostración de sus características funcionales. Estas deben responder al propósito para el cual fue diseñado el producto.

Entre los requisitos generales que debe cumplir el reactivo hemoclasificador como producto terminado es su esterilidad, transparencia y ausencia de partículas, debe contener preservativos antimicrobianos, envasarse en frascos apropiados y mantener la actividad biológica y características físico-químicas durante el periodo de validez declarado, a la temperatura de conservación recomendada por el productor.

En el ensayo funcional se deben utilizar al menos 3 muestras: una debe obtenerse del inicio y otra del final del proceso de llenado. El productor debe realizar un estudio de estabilidad, es decir, conservar 3 muestras del lote en las condiciones recomendadas por él, como mínimo 6 meses después de la fecha de vencimiento del producto.

Los colorantes usados no deben afectar las características biológicas del reactivo, ni variar de manera significativa durante el periodo de validez. Además, deben permitir observar el contenido y la detección de partículas o turbiedad en el preparado, durante el uso.

Estos requisitos son extensivos a los reactivos hemoclasificadores monoclonales, a los antiglobulínicos y a la albúmina sérica bovina (de los que se hablará más adelante).

El control de calidad se realiza mediante la evaluación de la potencia, avidez, especificidad y reproducibilidad del producto. La potencia es el recíproco de la mayor dilución del reactivo en que la aglutinación es de 1+. La avidez es el tiempo que tarda el reactivo en aglutinar los eritrocitos. La especificidad se produce cuando el producto identifica, de manera certera, las muestras carentes del antígeno de que se trata. En la reproducibilidad se obtienen iguales resultados al repetir un ensayo en días sucesivos.

Estos aspectos solo se tendrán en cuenta para los hemoclasificadores policlonales que reconocen los antígenos de los grupos sanguíneos eritrocitarios ABO y Rh, por ser los más utilizados en bancos de sangre, servicios de transfusión sanguínea y laboratorios de inmunohematología.

## REACTIVOS HEMOCLASIFICADORES POLICLONALES DEL SISTEMA DE GRUPOS SANGUÍNEOS ABO

La potencia se evalúa con la técnica de tubo por centrifugación, el reactivo anti-A enfrentado a eritrocitos  $A_1$  debe tener una potencia no menor que 64 y no menor que 16 con 3 muestras de eritrocitos  $A_2B$ . El reactivo anti-B se ensaya con eritrocitos B con una potencia no menor que 64 y no menor que 32 con tres muestras de eritrocitos  $A_1B$  y el reactivo anti-AB con eritrocitos  $A_1$  y B, debe tener una potencia no menor que 64 y no menor que 32 con eritrocitos  $A_2$ . La avidez se evalúa en la técnica de lámina: para cada reactivo se utilizan los mismos fenotipos que en la prueba de potencia y deben observarse aglutinados en un intervalo no mayor de 60 s. Estos no excederán 1 mm de diámetro a los 2 min, según inspección visual.

En la prueba de especificidad, el hemoclasificador anti-A se ensaya con 2 muestras de fenotipo  $A_1$ , 2  $A_2B$ , 2 B y 2 O; el anti-B con 2  $A_1$ , 2  $A_1B$ , 2 B y 2 O y el anti-AB con 1  $A_1$ , 2  $A_2$ , 2 B y 4 O. Los hemoclasificadores deben reaccionar con al menos 2+ de aglutinación con los fenotipos que contengan el antígeno específico y no reaccionar con los fenotipos carentes de este. Además, no deben presentar anticuerpos contra los antígenos de grupos sanguíneos H, I,  $Le^a$ ,  $Le^b$ , K, k,  $Kp^b$ ,  $Js^b$ ,  $P_1$ , D, C, c, E, e,  $C^w$ , M, N, S, s, U,  $Lu^b$ ,  $Jk^a$ ,  $Jk^b$ ,  $Fy^a$ ,  $Fy^b$  y  $Xg^a$ ; no deben hemolizar; no deben provocar una falsa aglutinación en la que los eritrocitos se agrupan en formación de *pilas de monedas* (fenómeno *Rouleaux*); y no deben aglutinar eritrocitos de grupo O con prueba de Coombs

positiva con 3+ o 4+ obtenidos de pacientes con anemia hemolítica autoinmune (AHAI) o preparados *in vitro*.

La reproducibilidad se estudia con un ensayo de al menos 300 muestras de sangre de donantes, en cada uno de los métodos para los que se recomienda el hemoclasificador. Además, el grupo sanguíneo ABO de las muestras debe verificarse al determinar las isoaglutininas en el plasma o en el suero del donante con el uso o no de un producto de referencia.

## REACTIVOS HEMOCLASIFICADORES POLICLONALES DEL SISTEMA DE GRUPO SANGUÍNEO Rh

El sistema Rh posee más de 45 antígenos. Después de los antígenos A y B, el RhD es el de mayor importancia en la práctica transfusional. A diferencia del A y del B, los individuos cuyos eritrocitos carecen del antígeno D no presentan anti-D de manera regular en el suero. Su formación se produce por exposición a eritrocitos que contiene el antígeno D, bien por transfusión o por embarazos.

El control de calidad, en especial la prueba de potencia, de los hemoclasificadores anti-D varía en dependencia del tipo de anti-D, es decir, si es un reactivo albuminoideo usado para el tipaje  $Rh_0$  (D) y recomendado para la prueba  $D^u$  (grupo I), reactivo de bajo contenido proteico o salino usado para el tipaje  $Rh_0$  (D) (grupo II), reactivo químicamente modificado usado para el tipaje  $Rh_0$  (D) y recomendado para la prueba  $D^u$  (grupo III) y reactivo recomendado solo para la prueba  $D^u$  (grupo IV).

La potencia se realiza en la prueba de tubo por centrifugación. En todos los casos, los eritrocitos se suspenden al 2 % en solución salina con albúmina al 2 %. Los reactivos del grupo I se diluyen en albúmina bovina del 20 al 22 % y se incuban 15 minutos a 37 °C. Los del grupo II se incuban 15 minutos a 37 °C o de 20 a 30 °C, en dependencia de lo recomendado por el productor. Los del grupo III se incuban 15 minutos a 37 °C y los del grupo IV se incuban 30 minutos a 37 °C (se realiza la prueba de Coombs indirecta). El diluyente de los reactivos de los grupos II, III y IV es solución salina con albúmina al 2 %. Los reactivos hemoclasificadores anti-D deben tener una potencia no menor que 32 frente a eritrocitos de fenotipo ccDee ( $R_0r$ ).

La avidez se efectúa en la técnica de lámina con incubación sobre una lámpara. Se utiliza el mismo fenotipo que en la prueba de potencia y deben observarse aglutinados en un intervalo no mayor de 60 s, estos no excederán 1 mm de diámetro a los 2 min según

inspección visual. Esta prueba no se le realiza a los reactivos del grupo IV.

En la prueba de especificidad los hemoclasificadores anti-D deben cumplir varios requisitos:

1. Reaccionar con al menos 2+ de aglutinación con 2 muestras de eritrocitos de fenotipo CcDee ( $R_1r$ ) y ccDee ( $R_0r$ ).
2. No aglutinar eritrocitos de fenotipo Ccddee ( $r'r$ ), ccddEe ( $r''r$ ),  $A_1ccdee$ , Bccddee,  $A_1Bccddee$  y Occddee ( $rr$ ).
3. No presentar anticuerpos contra los antígenos de grupos sanguíneos H, I,  $Le^a$ ,  $Le^b$ , K, k,  $Kp^b$ ,  $Js^b$ ,  $P_1$ , C, c, E, e,  $C^w$ , M, N, S, s, U,  $Lu^b$ ,  $Jk^a$ ,  $Jk^b$ ,  $Fy^a$ ,  $Fy^b$ ,  $Xg^a$ .
4. No hemolizar ni provocar el fenómeno Rouleaux.
5. Los reactivos del grupo IV deben reaccionar además con al menos 2+ de aglutinación con 3 muestras de eritrocitos de fenotipo D<sup>u</sup>.
6. Los reactivos de los grupos II y III no deben aglutinar eritrocitos de grupo Occddee con prueba de Coombs directa positiva con 3+ o 4+, obtenidos de pacientes con AHAI o preparados *in vitro*.

La reproducibilidad se estudia con un ensayo de al menos 350 muestras de sangre de donantes, en cada uno de los métodos para los que se recomienda el hemoclasificador. El estudio es en paralelo con un suero anti-D de iguales características al obtenido por el productor.

En el control de calidad de los hemoclasificadores anti-D, además de la potencia, la avidéz, la especificidad y la reproducibilidad del producto, se evalúa el efecto de prozona, término que se usa para definir la ausencia o presencia de aglutinaciones débiles en el exceso de anticuerpos. En este caso, los hemoclasificadores anti-D no deben mostrar disminución de la aglutinación, con el incremento del tiempo de incubación al estudiarse con eritrocitos de fenotipo  $R_1r$ , en la técnica de tubo y en tiempos de incubación de 15, 30 y 60 minutos. En todos los tiempos debe observarse al menos 2+ de aglutinación.

## REACTIVOS HEMOCLASIFICADORES MONOCLONALES

La tecnología de hibridoma fue iniciada por George Köhler y Cesar Milstein en 1975. Después de describir una producción de anticuerpos *in vitro* de especificidad predeterminada, observaron que por primera vez se podían producir AcMo dirigidos contra un epítipo en particular.

Una línea celular productora de anticuerpos, generada por esta vía, proviene de la integración física,

mediante un agente fusógeno, de células B productoras de anticuerpos de un animal inmunizado y células de una línea de mieloma (plasmocitoma) con un similar estadio de diferenciación. El hibridoma resultante puede preservar la capacidad de producir y secretar inmunoglobulinas específicas y la posibilidad de reproducirse indefinidamente.

El desarrollo de este tipo de hibridoma fue exitoso con células de ratón y de rata, a diferencia de las células humanas. Una vía para la obtención de hibridomas humanos fue la inmortalización de linfocitos de sangre periférica con el virus de Epstein-Barr (VEB). Este último procedimiento tenía como desventaja la corta vida de las células en cultivo. Como alternativa, se fusionaron células B inmortalizadas con VEB a células de mieloma de ratón para dar lugar a un heterohibridoma humano-ratón. La hibridación de los linfocitos humanos ha sido necesaria para producir determinados anticuerpos contra antígenos eritrocitarios que no son reconocidos por el sistema inmune del ratón (antígenos del sistema Rh).

Esta tecnología y otras modificaciones introducidas luego permitieron la producción ilimitada de anticuerpos de singulares especificidades. Estos podían prepararse con la eliminación de variabilidades de lote a lote. En todas las disciplinas en las que se utilizan los anticuerpos como rutina y/o investigación, la introducción de la producción de monoclonales *in vitro* modificó las prácticas de trabajo y los conceptos teóricos.

A diferencia de los policlonales, los AcMo son homogéneos, ya que los produce por una célula plasmática proveniente de un clon de células B. Su homogeneidad se manifiesta en la naturaleza de los anticuerpos sintetizados, los cuales están dirigidos contra un epítipo de la molécula de antígeno y reaccionan con un grado de afinidad determinado.

La aplicación de la tecnología monoclonal desarrollada por Köhler y Milstein a los anticuerpos de grupos sanguíneos, ha devenido en la generación de miles de AcMo dirigidos contra muchos antígenos eritrocitarios. En la actualidad se producen AcMo hemoclasificadores por la tecnología del hibridoma, a partir de sustancias específicas de grupo, obtenidas por síntesis química o de los eritrocitos correspondientes. Solo algunos de estos reactivos han mostrado ser mejores que los reactivos convencionales por su excelente especificidad, estabilidad y efectividad de costo.

Los reactivos que detectan los antígenos del sistema ABO son los más usados. Por ello, no sorprende que hayan sido los primeros producidos por esta tecnología. Algunos reactivos monoclonales anti-A reaccionan fuertemente con el fenotipo  $A_x$ , y con otros subgrupos de A

de la misma manera que con  $A_1$  y  $A_2$ . Estos subgrupos no siempre son detectados con el uso de anti-A policlonal humano. Otros reactivos monoclonales anti-A no producen una aglutinación rápida y completa de células  $A_1$  y  $A_2$ , lo que hace necesaria la utilización del reactivo en forma de mezclas de al menos dos AcMo de la clase IgM, uno que permita detectar con relativa facilidad subgrupos de A y otro que asegure una reacción con avidez de células  $A_1$  y  $A_2$ .

Se han desarrollado muchos AcMo contra el antígeno D, tanto de la clase IgG como de la IgM. La generación de estos reactivos monoclonales ha contribuido de manera significativa, al estudio de los eritrocitos con antígenos D parciales de personas RhD positivas que pueden aloinmunizarse y producir anti-D.

El reactivo hemoclasificador monoclonal como producto terminado, debe cumplir los requisitos generales del control de calidad descritos para los hemoclasificadores policlonales, también debe cumplir los requisitos de potencia, avidez, especificidad, reproducibilidad, y el efecto de prozona para el hemoclasificador anti-D. En este último, al evaluar la especificidad se investiga, además, la reacción con eritrocitos de las categorías  $D^{IV}$ ,  $D^V$  y  $D^{VI}$ .

Estos reactivos no están exentos de beneficios y riesgos, de ventajas y desventajas.

Las ventajas son:

1. No se producen reacciones positivas indeseadas debido a la presencia de anticuerpos contaminantes (anti-HLA, anti-LFA, anti-T), proteínas y virus.
2. Cada monoclonal es una aglutinina directa, de una sola clase de inmunoglobulina (IgM, IgA o IgG), de una sola especificidad y avidez.
3. Pocos anticuerpos se producen mediante el uso de células B humanas inmortalizadas.
4. Se dispone de cantidades de anticuerpos ilimitadas.
5. Se producen reactivos estandarizados con poca variación de lote a lote.
6. La especificidad de un único epítipo puede revelar nueva información acerca de los antígenos de grupos sanguíneos.
7. Se desarrollan reactivos muy confiables, aun cuando el AcMo posee una pequeña diferencia de especificidad.
8. Se puede hacer una selección de los anticuerpos *a priori* por su potencia, avidez y especificidad.
9. La concentración de anticuerpos es la única fuente de variabilidad y esta puede medirse por diferentes métodos estandarizados (ELISA, citometría de flujo).
10. La calidad del material crudo se puede certificar.
11. El control de calidad es simple, así como la ejecución de los ensayos en los que esté involucrado.

12. No se necesita inmunizar y realizar plasmaféresis a donantes humanos.
13. En inmunohematología la producción de AcMo permitirá el desarrollo de nuevas generaciones de ensayos.

Las desventajas son:

1. La especificidad de un único epítipo puede ser restrictiva para el tiraje. Este problema, en ocasiones, puede resolverse con el uso de mezclas de AcMo.
2. Algunos AcMo pueden fallar al aglutinar eritrocitos.
3. Algunos AcMo pueden ser dependientes de la técnica (pH, temperatura, entre otros).
4. Algunos AcMo pueden tener reacción cruzada (define los epítopes compartidos de diferentes antígenos).
5. El uso de sobrenadante de cultivo o fluido ascítico puede resultar en aparentes diferencias de especificidad.

Debido a estos dos últimos aspectos, algunos AcMo no son apropiados para los ensayos de adsorción-elución.

El desarrollo de métodos para la producción y obtención de AcMo humanos y murinos ha permitido resolver, al menos de manera parcial, los problemas del suplemento de plasmas ricos en anticuerpos y ha mejorado la calidad y la estandarización de los reactivos usados en inmunohematología.

Los hibridomas y AcMo no se utilizan solo para la producción de reactivos hemoclasificadores. Ellos se aplican también en la identificación de marcadores fenotípicos únicos de tipos celulares particulares, en el diagnóstico de muchas enfermedades infecciosas y sistémicas, en el diagnóstico y terapia tumoral, en el control del rechazo de trasplante y en el control funcional de moléculas de superficie celular y secretadas.

## REACTIVOS ANTIGLOBULÍNICOS HUMANOS

En 1945, Coombs, Mourant y Race describieron una prueba para detectar anticuerpos Rh no aglutinantes en suero, luego se utilizó esa misma prueba para demostrar el recubrimiento de anticuerpos y componentes del complemento sobre el eritrocito *in vivo*. Esta prueba se conoce hoy como prueba de antiglobulina o prueba de Coombs, en honor al investigador. Además de haber impulsado el desarrollo de la inmunohematología y de las ciencias afines, la prueba de Coombs permitió el descubrimiento de varios sistemas de grupos sanguíneos.

El reactivo antiglobulínico humano o suero de Coombs se obtiene al inmunizar animales con globulinas del suero humano. Estas pueden ser inmunoglobulinas purificadas (IgG, IgM e IgA) y/o fracciones de complemento (C3b y C3d, entre otras), que producen antiproteínas humanas en el suero animal, las que se purifican tras adsorción con eritrocitos humanos lavados que eliminan las aglutininas no deseadas.

Con este reactivo se demuestran anticuerpos eritrocitarios y/o complemento que recubren eritrocitos *in vivo*. A esta prueba se le conoce como prueba de antiglobulina directa (PAD) o Coombs directo. Con la utilización de un panel eritrocitario se realiza la prueba de antiglobulina indirecta (PAI) o Coombs indirecto, que muestra la presencia de anticuerpos libres en suero, mediante la reacción antígeno-anticuerpo *in vitro*.

Los sueros antiglobulínicos se obtienen de forma policlonal y mediante la tecnología de hibridomas. Ambos pueden ser poliespecíficos o monoespecíficos. Los primeros contienen anticuerpos antiinmunoglobulinas y anticomplemento; los segundos pueden ser monoespecíficos anti-IgG, anti-IgA o anti-IgM si no tienen actividad anticomplemento, o monoespecíficos anti-C3d si no tienen actividad antiinmunoglobulina.

El reactivo de Coombs en su evaluación como diagnosticador, debe cumplir los requisitos generales descritos para los hemoclasificadores policlonales, así como los requisitos de potencia, especificidad y reproducibilidad. Para el control de calidad, los sueros antiglobulínicos se dividen en 3 grupos: el grupo I está compuesto por los sueros antiglobulínicos poliespecíficos (anti-IgG, anti-C3 y, en ocasiones, anti-IgA), el grupo II lo integra el suero anti-IgG y el grupo III el suero anticomplemento (anti-C3).

Para la prueba de potencia de los reactivos de los grupos I y II deben utilizarse sueros anti-D y anti-Fy<sup>a</sup> (clase IgG) de título 16 a 64 en la PAI. Los sueros de estos dos grupos y sus diluciones 1:2 y 1:4 deben aglutinar eritrocitos de grupo RhD positivos, Fy(a+b+) sensibilizados con la dilución 1:16, 1:32 o 1:64 (dependerá del título de los anticuerpos usados) de anti-D y anti-Fy<sup>a</sup>. Los reactivos de los grupos I y III deben aglutinar eritrocitos recubiertos con C3b con título no menor que 4 y deben aglutinar eritrocitos recubiertos de C3d con un título no menor que 1 y reacción de 2+ de aglutinación. Los reactivos del grupo I con actividad anti-IgA deben aglutinar eritrocitos recubiertos de IgA con título no menor que 4.

En la prueba de especificidad los reactivos del grupo I no deben aglutinar eritrocitos recubiertos con C4d, los del grupo II no deben aglutinar eritrocitos recubiertos con C3b, C3d, C4d, y los del grupo III no

deben aglutinar eritrocitos recubiertos de IgG y C4d. Los sueros antiglobulínicos no deben aglutinar ni hemolizar eritrocitos de los grupos A<sub>1</sub>, B y O tratados con papaína, tampoco cuando se incuben muestras de estos grupos durante 30 minutos a temperaturas de 4 °C, de 20 a 30 °C y de 37 °C.

Los reactivos antiglobulínicos no deben aglutinar ni hemolizar suspensiones de eritrocitos en solución salina ni en solución de baja fuerza iónica (LISS), provenientes de 2 donantes de cada uno de los grupos A<sub>1</sub>, B y O. Las muestras deben colectarse del segmento de las unidades de sangre que estén almacenadas entre 2 y 8 °C durante 10 a 15 días. Así mismo, no deben reaccionar en la PAI con los eritrocitos mencionados ni el suero de 6 donantes. Los sueros de los donantes deben obtenerse antes de las 24 horas de realizarse el estudio: deben estar libres de anticuerpos irregulares y ser ABO compatibles con las muestras de los eritrocitos colectados.

La reproducibilidad se determina al realizar la PAI y la PAD en al menos 300 muestras de sangre de donantes, 5 muestras de pacientes con AHAI y 5 muestras de pacientes con anticuerpos irregulares. Estos ensayos se deben realizar en paralelo con un producto de referencia.

Los reactivos antiglobulínicos junto a los hemoclasificadores monoclonales y policlonales, se aplican en la detección e identificación de anticuerpos, pruebas de compatibilidad, determinación de grupos sanguíneos, diagnóstico de AHAI, estudios de hemólisis inducida por fármacos, estudios de enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido, investigación de reacciones transfusionales hemolíticas y conformación de paneles celulares.

## ALBÚMINA SÉRICA BOVINA

La albúmina constituye el 60 % de las proteínas presentes en el plasma. Sus funciones en el organismo son: el establecimiento de la presión coloidosmótica para regular los volúmenes intracelular y extracelular; el transporte de sustancias como hormonas, fármacos, enzimas y toxinas; la participación en el secuestro de radicales libres; la regulación del equilibrio ácido-básico y la unión a lípidos, para formar lipoproteínas.

En inmunohematología, la reacción antígeno-anticuerpo puede medirse *in vitro* por diferentes técnicas como las pruebas de ELISA, de hemólisis, de inhibición de la aglutinación y de aglutinación. Estas últimas son las más utilizadas. En las técnicas de aglutinación, si el anticuerpo que participa en la reacción antígeno-anticuerpo es de la clase IgG (molécula monomérica),

necesita el concurso de otros agentes que faciliten su acercamiento al antígeno en los eritrocitos. Estos agentes potenciadores de la aglutinación son las enzimas proteolíticas, los reactivos antiglobulínicos humanos y la albúmina sérica bovina.

La obtención de albúmina a partir del plasma bovino se realiza por 3 vías: electroforesis, purificación en columna y termocoagulación. En la corrida electroforética, se toma la banda de la albúmina, que luego se electroeluye y en la purificación por columna de gel se purifica por peso molecular. Estos dos métodos son caros; por ello se prefiere la termocoagulación a una temperatura (controlada) de 70 °C. A esta temperatura, la albúmina termocoagula con un alto grado de pureza. Para su uso en inmunohematología, la albúmina debe polimerizarse con glutaraldehído, para formar un polímero de alto peso molecular.

La albúmina sérica bovina como producto terminado, debe cumplir los requisitos generales descritos. Los requisitos particulares que debe poseer este tipo de reactivo son:

1. Concentración de 200 y 300 g/L para su uso en inmunohematología.
2. Habilidad potenciadora de la reacción de aglutinación.
3. Los títulos de anticuerpos anti-D y anti-C obtenidos con la albúmina evaluada deben ser iguales o superiores a los obtenidos con una albúmina de referencia.
4. Las reacciones de aglutinación observadas con la albúmina evaluada deben ser iguales o mayores a las obtenidas con la albúmina de referencia.
5. No debe provocar el fenómeno de prozona.
6. En la prueba de falsos positivos, la albúmina no debe provocar hemólisis ni fenómenos *rouleaux*, al ser añadida a eritrocitos de los grupos A<sub>1</sub>, B y O.
7. No debe presentar proteínas IgG. Su presencia se investiga por técnicas electroforéticas o por ensayos serológicos de inhibición de la reacción de anticuerpos anti-D, con el reactivo antiglobulínico humano poliespecífico.

8. No debe presentar sustancias de grupos sanguíneos como A, B, Le<sup>a</sup> y Le<sup>b</sup>. Esto se determina al realizar ensayos de inhibición de la aglutinación con eritrocitos y anticuerpos anti-A, -B, -Le<sup>a</sup> y -Le<sup>b</sup>.
9. No debe presentar sustancias con actividad tipo neuraminidasa, capaces de exponer el criptoantígeno T en los eritrocitos.

## BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- Behrens G, Leist M. Evidence that the granulocyte-specific antigen NC1 is identical with NA2. *Vox Sang* 1995; 68:46-9.
- Bux J. Challenges in the determination of clinically significant granulocyte antibodies and antigens. *Transf Med Rev* 1996; X:222-32.
- Bux J. Nomenclature of granulocyte alloantigens. *Transfusion* 1999; 39:662-3.
- CECMED. Recomendaciones para la evaluación de los diagnosticadores para uso en Inmunohematología, 1998.
- Engelfriet CP, Holburn AM, Leikola J, Lothe F. The production of anti-human globulin reagent for use in immunohematology. Lab/84.8, WHO, 1984.
- Guidelines for the Blood Transfusion Service. London: HMSO, 1992.
- Lucas G F, Metcalfe P. Platelet and granulocyte glycoprotein polymorphisms. *Transf Med* 2000.
- Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M. Blood transfusion in clinical medicine. 10<sup>th</sup> ed. London: Blackwell Scientific Publications, 1997.
- Noizat-Pirenne F, Le Pennec PY, Rouger P. Quality control of reactant lots at the Nation Blood Group Reference Center (CNRGS). Data for the year 1998. *Transfus Clin Biol* 1999;6:195-200.
- Porcelijn L, Von dem Borne AEGKr. Immune mediated thrombocytopenias: basic and immunological aspect. *Ballière's Clin Haematol* 1998;11:331-41.
- Stein EL, Santoso S, Behrens G. Genotyping of the granulocyte-specific NA antigens from small quantities of blood or serum. *Tissue Antigens* 1995;45:69-72.
- Vengelen-Tyler V, ed. Technical manual. 12<sup>th</sup> ed. Bethesda: American Association of Blood Banks, 1996.
- Warner MN, Moore JC, Warkentin TE, Santos AV, Kelton JG. Prospective study of protein-specific assay used to investigate idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 1999;104:442-7.



# CONTENIDO

---

## **Introducción/ 611**

### **Donación de sangre/ 612**

- Registro del donante de sangre/ 612
- Información suministrada al donante de sangre/ 613
- Selección del donante de sangre/ 613
- Examen físico del donante de sangre/ 615
- Exámenes de laboratorio antes de la donación de sangre/ 616

### **Extracción de la sangre/ 616**

- Materiales e instrumentos para la extracción de la sangre/ 616
- Recipientes para conservar la sangre/ 616
- Identificación/ 617
- Preparación del sitio para la venopuntura/ 617
- Flebotomía y colección de muestras para procesamiento y pruebas de compatibilidad/ 617
- Atención al donante de sangre después de la flebotomía/ 618
- Reacciones adversas de la donación de sangre/ 619

### **Pruebas realizadas a la sangre/ 619**

- Tipificación ABO y Rh/ 620
- Pesquisa de anticuerpos/ 620
- Sífilis/ 620
- Hepatitis B y C/ 621
- Virus de inmunodeficiencia humana/ 621
- Virus linfotrópicos humanos de células T/ 622
- Otras pruebas de la sangre que no son obligatorias/ 622

### **Conservación de la sangre y sus componentes/ 623**

- Anticoagulantes y aditivos/ 623
- Cambios bioquímicos de la sangre durante su almacenamiento/ 623
- Preparación de los componentes de la sangre/ 623
- Conservación de los componentes de la sangre/ 626
- Componentes de la sangre/ 626

### **Indicaciones de la sangre, sus componentes y derivados/ 628**

- Sangre total/ 628
- Concentrado de eritrocitos/ 628
- Concentrado de plaquetas/ 629
- Concentrado de leucocitos/ 630
- Plasma fresco congelado/ 630
- Crioprecipitado/ 630
- Albumina y fracción proteica del plasma/ 630
- Concentrados de los factores de la coagulación/ 630
- Gammaglobulina/ 631

### **Transfusión sanguínea autóloga/ 632**

- Ventajas de la transfusión sanguínea autóloga/ 632
- Tipos de transfusión sanguínea autóloga/ 632

### **Aféresis/ 633**

- Obtención por aféresis de componentes de la sangre/ 634
- Aféresis terapéutica/ 635

### **Exanguinotransfusión/ 638**

- Indicaciones de la exanguinotransfusión/ 638
- Complicaciones de la exanguinotransfusión/ 639

### **Transfusión sanguínea en situaciones especiales/ 639**

- Transfusiones sanguíneas dirigidas/ 639
- Transfusiones sanguíneas masivas/ 639
- Transfusión sanguínea en el *bypass* cardiopulmonar/ 641
- Hemoterapia neonatal/ 641
- Transfusión sanguínea en la enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido/ 643
- Transfusión sanguínea en la anemia drepanocítica/ 644
- Transfusión sanguínea en las anemias hemolíticas autoinmunes/ 645

### **Bibliografía recomendada/ 645**

### Capítulo 51



### MEDICINA TRANSFUSIONAL

*Dra. María Elena Alfonso Valdés  
Lic. Antonio Bencomo Hernández  
Dr. Lázaro Cortina Rosales  
Lic. Patricia Hernández Díaz  
Dra. María del Rosario López de Roux*

#### RESUMEN

La medicina transfusional es una especialidad multidisciplinaria que comprende aspectos tales como: la adecuada obtención, selección y utilización de la sangre y de sus componentes, la remoción de la sangre o de sus componentes en el tratamiento o prevención de enfermedades, y los efectos adversos secundarios a la transfusión sanguínea. En este capítulo se exponen los elementos esenciales para el empleo racional y seguro de los componentes sanguíneos, así como la amplia variedad de componentes disponibles en la actualidad, sus indicaciones y las limitaciones para su uso. Todo ello con el fin de educar a los futuros médicos para que sean capaces de evitar la indicación innecesaria o inadecuada de la sangre o de sus componentes y de llevar a cabo una selección responsable de los donantes de sangre. También se dedica un acápite a las transfusiones sanguíneas en situaciones especiales: las transfusiones sanguíneas autólogas, las transfusiones sanguíneas masivas, las transfusiones sanguíneas en la enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido, así como las transfusiones sanguíneas en las anemias hemolíticas autoinmunes y en el *bypass* cardiopulmonar. Además, este capítulo trata acerca de la obtención, por aféresis, de los componentes de la sangre.

#### INTRODUCCIÓN

La medicina transfusional ha tenido tan importantes avances en las últimas décadas, que se ha convertido en una especialidad en sí misma. Algunos de los adelantos más relevantes en medicina y cirugía se deben parcialmente a la disponibilidad de componentes de la sangre. La cirugía cardíaca complicada, los trasplantes de hígado y de médula ósea y la quimioterapia agresiva son ejemplos de tratamientos que dependen esencialmente de la transfusión de sangre y sus componentes.

La medicina transfusional es una especialidad multidisciplinaria que está dirigida a la obtención, selección y utilización de la sangre y sus componentes de manera responsable y segura, a la remoción de la sangre y sus componentes en el tratamiento o prevención de enfermedades, y los efectos adversos secundarios a una transfusión.

Los especialistas en esta disciplina deben conocer algunos problemas tales como el uso adecuado de los componentes sanguíneos, las complicaciones inmunohematológicas de la transfusión sanguínea y la prevención de la transmisión de enfermedades infecciosas por medio de la transfusión.

Desdichadamente, la mayor parte de las escuelas de medicina no incluyen en los programas de formación médica, los elementos esenciales del empleo racional y seguro de los componentes sanguíneos. Muchos de los médicos que prescriben transfusiones sanguíneas desconocen la amplia variedad de componentes disponibles, las indicaciones y las limitaciones de su uso.

Los componentes de la sangre —eritrocitos, plaquetas, leucocitos, plasma fresco congelado y crioprecipitado— se obtienen directamente a partir de una unidad de sangre total, con el empleo de diferentes

métodos de separación física (sedimentación, centrifugación, congelación o por métodos de aféresis). Los derivados de la sangre —albúmina, fracción proteica del plasma, gammaglobulina inmune y concentrados de factores de la coagulación— se producen por la industria farmacéutica y se obtienen generalmente a partir de la mezcla de plasma de miles de donantes, con el empleo de modificaciones de la técnica de fraccionamiento en etanol de Cohn. El principio básico de este método es que las proteínas diferentes pueden precipitarse del plasma, sin que haya desnaturalización, por ajuste de la cantidad de etanol añadido.

Al considerar el uso de la terapia transfusional, el médico debe valorar la relación entre los beneficios esperados y los riesgos potenciales. Los riesgos de la transfusión sanguínea incluyen eventos tan graves como la reacción hemolítica postransfusional o el desarrollo de enfermedades infecciosas transmitidas por la sangre.

Las medidas actualmente existentes para la prevención de la transmisión del VIH y de otras infecciones, hacen de la transfusión sanguínea alogénica un medio terapéutico más seguro que antes.

Las principales medidas que se deben adoptar para optimizar la terapéutica transfusional incluyen: educar a los clínicos para evitar la indicación innecesaria o inadecuada de sangre o sus componentes, una selección precisa de los donantes de sangre y una correcta educación a la población para lograr la autoexclusión de individuos pertenecientes a grupos de riesgo, el uso de medios automatizados para minimizar errores en la transferencia de información, continuar la investigación y el desarrollo de vías para la inactivación de virus presentes en los productos sanguíneos, así como la adopción de procedimientos racionales para las pruebas de compatibilidad pretransfusionales. A ello puede contribuir, de forma determinante, el funcionamiento de los comités de transfusión sanguínea hospitalarios, así como las auditorías periódicas.

El presente capítulo abarca de forma sencilla los principales aspectos de la medicina transfusional desde la donación de sangre hasta las complicaciones secundarias al empleo de los componentes sanguíneos.

## DONACIÓN DE SANGRE

El donante voluntario es el elemento básico sobre el que descansa el Programa de Sangre. Este es el que garantiza el suministro de la sangre para cumplir con las necesidades de componentes destinados a la terapia transfusional (concentrados de eritrocitos, concentrados de plaquetas, plasma fresco congelado, crioprecipitado, etc.), así como también proporciona la materia prima

indispensable para la producción de hemoderivados (concentrados de albúmina, concentrados de inmunoglobulinas, concentrados de factores de la coagulación, interferón, factor de transferencia, etc.), elementos imprescindibles en la medicina moderna, que indican la importancia del acto de la donación de sangre. Este debe ser un acto voluntario, altruista y desinteresado, sin que medie beneficio alguno directo o indirecto para el donante. Teniendo en cuenta esta situación, para atraer inicialmente a los donantes y lograr su participación asidua, es necesario que las condiciones circundantes de la donación de sangre sean agradables, seguras y tan confortables como sea posible.

## REGISTRO DEL DONANTE DE SANGRE

**Inscripción.** El acto de inscripción garantizará la obtención de la identificación completa del donante y comprende la siguiente información:

1. Nombre y apellidos.
2. Dirección: domicilio privado y/o profesional.
3. Teléfono: privado y profesional.
4. Sexo.
5. Fecha y hora de la donación.

**Edad y fecha de nacimiento.** Los donantes de sangre deben tener por lo menos 18 años de edad y no más de 65. El incumplimiento de este requisito solo procede en situaciones excepcionales y debe contar con la aprobación legal y del médico jefe del banco de sangre.

**Registro de aplazamientos previos.** En las personas que en donaciones previas han sido aplazadas, se debe determinar las causas de este hecho, por interrogatorio y en los datos del archivo, para definir si esta situación se mantiene en la actualidad.

### Otros datos que pueden ser útiles

**Raza.** Esta información puede tener particular utilidad cuando se precisa sangre de un fenotipo específico para pacientes que presentan anticuerpos inesperados.

**Características singulares del donante.** Determinada información acerca del donante puede permitir al banco de sangre un uso óptimo de la donación, por ejemplo: donantes que son seronegativos para citomegalovirus o pertenecen al grupo Rh negativo se destinan a menudo para pacientes recién nacidos. Los individuos que tienen anticuerpos clínicamente inesperados significativos pueden ser identificados para que su sangre sea procesada en componentes que contengan mínimas cantidades de plasma.

Si la donación se dirige a un paciente específico, se debe obtener la información acerca de cuándo y dónde será hospitalizado el receptor destinatario. Si el donante es consanguíneo en primera línea del receptor, debe registrarse para que sus componentes celulares sean irradiados.

## INFORMACIÓN SUMINISTRADA AL DONANTE DE SANGRE

Reviste gran importancia la educación del donante de sangre; para ello se le brindará información sobre este acto y su connotación sobre su estado de salud, lo que permitirá una mayor cooperación de su parte.

Este será informado acerca de las pruebas que se le realizarán en su sangre y de sus resultados, en caso de ser positivos. Debe explicársele, además, que existe la posibilidad de que las pruebas no identifiquen a individuos infecciosos en estadio temprano y de ahí la importancia de que donantes con antecedentes de riesgo lo informen. También se les indicarán los centros que realizan los estudios serológicos para evitar que los individuos busquen su pesquisa mediante la donación de sangre.

Se debe advertir al donante sobre las posibles reacciones adversas y los cuidados consecutivos a la flebotomía.

La información se debe presentar de manera que el donante comprenda; puede ser útil disponer de folletos que ilustren esto de manera detallada y permitan una mejor comprensión.

## SELECCIÓN DEL DONANTE DE SANGRE

El proceso de selección del donante de sangre es uno de los pasos más importantes para garantizar la seguridad de la sangre donada. Su propósito fundamental es asegurar que el donante potencial tenga un buen estado de salud y así proteger al receptor de efectos adversos debidos a la transmisión de enfermedades y de drogas por la transfusión de sangre o de sus componentes y proteger de algún riesgo el estado de salud del donante.

La selección del donante de sangre se basa en los datos contenidos en la historia clínica. En este documento quedarán registrados los datos referentes al interrogatorio, examen físico y pruebas de laboratorio efectuados al donante, de manera tal que quede bien establecido su estado de salud en el momento de la donación.

La historia clínica del donante de sangre es el documento más importante del banco de sangre. En ella

están incluidas las informaciones fundamentales del donante y constituye un documento oficial con fuerza legal para cualquier trámite e investigación que se requiera realizar sobre los datos contenidos en ella. Debe mantenerse en el archivo durante un año y, posteriormente, pasar al archivo pasivo por cinco años.

## Interrogatorio al donante

La selección del donante está determinada por el interrogatorio, el examen físico y la determinación de la hemoglobina y el hematócrito, efectuados el día de la donación. El valor del examen físico es limitado, por eso, el interrogatorio determinará una parte importante del procedimiento de evaluación, por medio de las respuestas a las preguntas normalizadas acerca de los antecedentes patológicos personales y del estado general de salud en ese momento.

El interrogatorio debe ser efectuado por un personal entrenado y en adecuada privacidad para evitar aprehensiones. Se debe disponer de tiempo para eventuales conversaciones o explicaciones. Debe confeccionarse un cuestionario normalizado que incluya todas aquellas enfermedades o situaciones que constituyen causa de exclusión temporal o definitiva de los donantes.

Durante el interrogatorio, los donantes deben comprender la información que se les presenta para adoptar una decisión consciente con respecto a la donación. Una comunicación efectiva es vital para transmitir información importante y excluir donantes no aptos. El entrevistador debe evaluar todas las respuestas y determinar la aptitud para la donación y documentar la decisión. Los aplazamientos o rechazos, a menudo dejan a esas personas con sentimientos negativos acerca de sí mismos, o del sistema. Por ello, deben recibir una explicación completa acerca de las razones y se les debe decir si pueden volver a donar sangre y cuándo.

## Situaciones en que se difiere la donación de sangre de forma transitoria

De manera general, los aspectos que deben tenerse en cuenta son:

1. Estado de salud del donante de sangre en el momento de la donación: el donante debe presentar un aspecto saludable, no debe aquejar dolor, ni tos persistente, ni resfriado o gripe, ni cefalea, ni náuseas, ni hipo, ni vértigo o nerviosismo acentuado.
2. Antecedentes de rechazo: siempre se debe indagar la causa por la que realizó la donación y si esta se mantiene.

3. Drogas: en general, los medicamentos administrados al donante no son peligrosos para el receptor. El aplazamiento por muchas drogas se basa en el proceso de la enfermedad, no en las propiedades de las drogas mismas:

- a) La isotretionina (accutane), usada para el acné, descalifica al donante de sangre por un mes porque es teratógena. Por razones similares, el uso de la finasterida (proscar) para tratar la hiperplasia prostática, descalifica al donante por un mes.
- b) La sangre de los donantes que han ingerido aspirina no debe emplearse para obtener plaquetas.
- c) La tetraciclina y otros antibióticos, los esteroides de uso tópico, los broncodilatadores y descongestionantes nasales, los tranquilizantes, hipnóticos, hipoglucemiantes orales, analgésicos moderados, vitaminas, hormonas sustitutivas, son drogas comúnmente aceptadas en donantes.
- d) Si el donante de sangre recibió penicilina benzatínica no debe donar hasta transcurrido un mes después de la última dosis.
- e) El uso de drogas debe ser evaluado directamente por el médico del banco de sangre.
- f) Pérdida de peso inexplicable mayor que 4,5 kg o igual a esta cifra.

#### **Causas que invalidan de manera transitoria la donación de sangre**

Para proteger al donante de sangre, está limitado de manera transitoria por:

- 1. Haber donado sangre en las últimas 8 semanas: durante una donación se pierden 200 g de hierro, lo cual puede producir un estado de ferropenia. Por tal situación, la donación debe ser más espaciada en el tiempo y, si se considera necesario, administrar suplemento de hierro. La donación no debe ser mayor que 525 mL.
- 2. Tener menos de 18 años de edad.
- 3. Peso menor que 50 kg o 110 libras.
- 4. Haber comido de manera abundante durante las 2 horas anteriores a la donación.
- 5. Embarazo y hasta 6 semanas después del parto.
- 6. Después de plasmaféresis, tromboféresis o leucoféresis deben transcurrir como mínimo 48 horas antes de una donación de sangre total.
- 7. Temperatura mayor que 37,5 °C o igual a esta cifra, o menor que 35 °C.
- 8. Pulso mayor que 100 pulsaciones por minuto o menor que 60 pulsaciones por minuto.

9. Después de abortos e intervenciones quirúrgicas sin complicaciones, se difieren solo hasta completarse la recuperación y la reanudación de las actividades normales.

Para proteger al receptor, el donante de sangre está limitado de manera transitoria por:

- 1. Enfermedades graves e intervenciones quirúrgicas que hayan requerido transfusión de sangre o componentes en los últimos 12 meses.
- 2. Enfermedades hepáticas: un estado de portador de hepatitis no puede ser detectado con certeza por pruebas de laboratorio como las de AgsHB, anti-VHC y anti-VHB. En consecuencia, deben establecerse pautas estrictas para la aceptabilidad del donante.

Los aplazamientos por 12 meses se sugieren:

- 1. A las parejas sexuales de una persona con hepatitis viral o el haber recibido inmunoglobulina anti-HB.
- 2. Si en los últimos 12 meses se ha practicado tatuaje, tratamiento de acupuntura, perforación en orejas, pinchazos con agujas.
- 3. Transfusiones o transplante de órganos en los últimos 12 meses.
- 4. Viajes a zonas donde la enfermedad de Chagas es endémica: los donantes deben ser encuestados escrupulosamente, para determinar una posible exposición a esta enfermedad.
- 5. Malaria: las personas que hayan viajado a zonas endémicas se descalificarán como donantes hasta 6 meses después de su regreso a una zona no endémica, siempre que no presenten ningún síntoma de enfermedad y no hayan tomado antipalúdicos. Los donantes que hayan tenido malaria o hayan seguido una profilaxis durante la visita a una zona endémica, serán rechazados por un período de 3 años después de finalizada la terapia o abandonado la zona endémica. Las donaciones que vayan a emplearse en la preparación de plasma o componentes del plasma o fracciones sin eritrocitos intactos, están exentas de tales restricciones.
- 6. Sífilis o blenorragia descalifican por un período de 12 meses.
- 7. Deben ser rechazadas y orientadas correctamente aquellas personas que donan sangre con la finalidad de que se les practiquen las pruebas de diagnóstico del VIH-SIDA.
- 8. Vacunación: los donantes libres de síntomas que han sido inmunizados con toxoides o vacunas de

agentes muertos no necesitan ser aplazados (ántrax, cólera, tétanos, difteria, influenza, pertusis, fiebre tifoidea, tifus, fiebre de las montañas rocallas). Vacunas contra sarampión, paperas, fiebre amarilla y antipolio oral hasta 2 semanas después; rubeola hasta 4 semanas.

9. Vacuna para las hepatitis A y B: son aceptados siempre que no existan otras razones.
10. Inmunoglobulina sérica: 1 año.
11. Los donantes con antecedentes de tuberculosis pueden donar después del tratamiento y recuperación total. Los donantes con prueba a la tuberculina positiva pueden donar salvo si están bajo tratamiento para la TB.
12. El dengue en cualquiera de sus manifestaciones descalifica al donante por 1 mes después de restablecido.
13. Los donantes que han sufrido cólera no deben donar hasta 1 mes después de la recuperación total.

#### **Situaciones en que se difiere la donación de forma permanente**

No deben donar sangre aquellas personas que cumplan los requisitos siguientes:

1. Enfermedades cardiovasculares: antecedentes de cardiopatías que pueden ocasionar insuficiencia cardíaca asociada con la donación y cardiopatía isquémica, valvulopatía e hipertensión arterial maligna.
2. Enfermedades pulmonares: tuberculosis activa.
3. Enfermedades hepáticas: cualquier tipo de enfermedad inflamatoria o degenerativa es motivo de rechazo. Particular importancia tiene el rechazo de las hepatitis virales, para las cuales se establecen pautas muy estrictas: se consideran donantes aplazados indefinidamente:
  - a) Antecedentes de hepatitis viral después de los 10 años de edad.
  - b) Antecedentes de hepatitis B o una prueba positiva para el AgsHB o pruebas positivas en dos o más ocasiones para el anti-H y el anti-B.
  - c) Evidencias clínicas o de laboratorio de enfermedad por el virus de la hepatitis C.
4. Adictos a drogas intravenosas (se les debe revisar los brazos).
5. Enfermedades oncológicas: los donantes que han padecido cáncer, con excepción del localizado en piel y el carcinoma cervical *in situ*, deben ser evaluados por un médico calificado.
6. Los individuos que han finalizado un tratamiento y no presentan enfermedad en un período de 5 años o

más pueden ser aceptados. Los donantes con neoplasias hematológicas como las leucemias y linfomas serán descartados.

7. Enfermedades hematológicas crónicas: hemofilias, enfermedad de von Willebrand, aplasia medular, entre otras.
8. Antecedentes que sugieran riesgo de enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (C-J).
9. Enfermedad de Chagas: los donantes con antecedentes de enfermedad causada por el *Trypanosoma cruzi* deben ser descartados.
10. Infección por VIH: interrogar sobre los síntomas y signos del SIDA, antecedentes que sugieran que es un personal de riesgo, estudios serológicos positivos. Las personas con evidencias clínicas o de laboratorio y con actitudes de riesgo no deben donar sangre.
11. Drogadicción: serán aplazados indefinidamente.
12. Empleo de concentrado de factores de la coagulación: sus parejas sexuales serán aplazadas hasta 12 meses después del último coito, aun si se ha practicado sexo seguro.
13. Recepción de órganos: estómago, riñón, pulmón, intestino.
14. Amputación de miembros.
15. Politransfundidos.
16. Enfermedades del SNC: enfermedades cerebrovasculares y epilepsia.
17. Enfermedades endocrinas: diabetes, hipertiroidismo, leishmaniasis y brucelosis.

Se les debe solicitar a los donantes de sangre que informen sobre las enfermedades que hayan padecido pocos días después de la donación y especialmente que informen una prueba positiva para VIH o el desarrollo de hepatitis o SIDA dentro de los 12 meses posteriores a la donación.

Una vez aceptado, el donante de sangre debe dirigirse a que se le realice la extracción de esta. Previamente, debe efectuarse su hidratación con jugos o con agua.

#### **EXAMEN FÍSICO DEL DONANTE DE SANGRE**

El examen físico comienza desde el mismo momento en que el donante entra en la sección:

1. Aspecto general: si el donante aparenta tener una enfermedad, parece estar bajo influencia de drogas o alcohol, o si está excesivamente nervioso, es mejor aplazar la donación.

2. **Peso:** un donante es considerado apto cuando pesa 50 kg o más y puede donar un máximo de 525 mL de sangre. A los donantes con menor peso se les pueden extraer 300 mL de sangre sin reducir la cantidad de anticoagulante de la bolsa principal. Estas unidades serán etiquetadas como unidades de bajo volumen y no se emplearán para preparar plaquetas o componentes plasmáticos. Cuando es necesario extraer menos de 300 mL, se reduce de forma proporcional la cantidad de anticoagulante.
3. **Lesiones de la piel:** la piel del sitio de venipuntura debe estar libre de lesiones. Ambos brazos deben ser examinados para buscar signos de uso reiterado de drogas por vía intravenosa. Los individuos con forúnculos, heridas purulentas o infecciones severas en cualquier parte del cuerpo deben ser aplazados, al igual que aquellos que presenten nódulos hemorrágicos o rojo púrpura o placas induradas, sugestivas de sarcoma de Kaposi.
4. **Temperatura:** se mide la temperatura axilar, la cual debe ser menor que 37,5 °C y mayor que 35 °C. La temperatura se toma con un termómetro clínico que se coloca debajo de la axila y se espera que transcurra un minuto. El termómetro debe estar estéril y tener el mercurio recogido en el bulbo. Los termómetros usados se colocarán en un recipiente que contenga una solución germicida (tintura de yodo 2 %, fenol 5 %) durante 30 minutos, después se lavarán con detergente y se verificará si tienen el mercurio en el bulbo; en caso contrario, se debe agitar hasta lograrlo. Se coloca nuevamente en solución germicida por 10 minutos y se enjuaga posteriormente con agua destilada estéril, se secan con un paño estéril y se guardan.
5. **Pulso:** se acostumbra a tomar el pulso arterial radial, pero puede utilizarse el humeral o el carotídeo. La frecuencia del pulso se debe contar en 15 segundos, debe ser regular y estar entre 60 y 100 pulsaciones por minuto. Las cifras por debajo o por encima de estos límites invalidan al donante. En caso de bradicardia por crisis vasovagal o taquicardia por distonía neurovegetativa a predominio simpático, es aconsejable aplazar la donación por algún tiempo, brindar psicoterapia y explicar la inocuidad del procedimiento. Después de un tiempo prudencial se mide de nuevo la frecuencia y, si se mantiene la alteración, será declarado no apto transitoriamente.
6. **Presión arterial:** la presión arterial sistólica debe estar entre 90 y 180 mmHg, y la diastólica entre 60 y 100 mmHg.

## EXÁMENES DE LABORATORIO ANTES DE LA DONACIÓN DE SANGRE

Una vez terminada la inscripción del donante y obtenidos los datos generales de la historia clínica se le realizarán las siguientes investigaciones:

1. Grupo sanguíneo celular.
2. Hemoglobina (Hb) y hematócrito (Hto).

La Hb se puede determinar por el método colorimétrico de la cianometahemoglobina o por el gravimétrico del sulfato de cobre. Siempre es aconsejable disponer de un hemoglobinómetro o fotolorímetro.

## EXTRACCIÓN DE LA SANGRE

La sangre es extraída solo por un personal entrenado, bajo la dirección de un médico calificado. La extracción debe llevarse a cabo mediante métodos asépticos, con el uso de un sistema estéril cerrado.

## MATERIALES E INSTRUMENTOS PARA LA EXTRACCIÓN DE LA SANGRE

Muchos de los elementos usados para la flebotomía están disponibles en forma estéril, de un solo uso, desechables. Si el envase tiene solución de continuidad no debe ser usado. Las bolsas vienen preparadas en un sistema cerrado de 2, 3 o 4 bolsas con agujas para punción venosa, todo estéril.

Otros elementos como gasa, torundas de algodón, aplicadores, pinzas y portapinzas deben ser esterilizados adecuadamente mediante vapor bajo presión por no menos de 30 minutos a 121,5 °C; mediante calor seco durante 2 horas a 170 °C o por esterilización con gas.

Las cajas con elementos esterilizados se deben etiquetar y anotar la fecha de esterilización y de apertura. Las cajas esterilizadas sin abrir se pueden almacenar hasta tres semanas si su cierre asegura la esterilidad del contenido. Las cajas abiertas se pueden usar durante 1 semana si el contenido se retira con técnica aséptica y se reemplazan las tapas.

## RECIPIENTES PARA CONSERVAR LA SANGRE

Los recipientes destinados para conservar la sangre deben estar estériles y libres de pirógenos, contener 63 mL de una solución conservante (preservadora-

anticoagulante) CPD o CPDA-1. El citrato impide la coagulación por quelación de los iones de calcio, el fosfato impide el descenso del pH por almacenamiento, la dextrosa sostiene la generación de ATP por la vía glicolítica y la adenina proporciona el sustrato a partir del cual los eritrocitos pueden sintetizar ATP. Las soluciones de CPD permiten el almacenamiento durante 21 días entre 2 y 6 °C, mientras el CPDA-1 extiende el almacenamiento a 35 días entre 2 y 6 °C.

Para la extracción de sangre destinada a la separación en componentes, existen sistemas cerrados, formados por una bolsa principal con bolsas satélites integralmente conectadas, de modo que el contenido no se exponga al aire ambiental durante la separación de los componentes.

## IDENTIFICACIÓN

La identificación del donante es esencial en cada paso de su registro. Se debe usar un sistema numérico o alfanumérico que identifique el donante y el centro de extracción. Esta identificación debe aparecer en las bolsas de sangre, los tubos de muestras y la historia clínica (HCL) del donante. Es necesario un cuidado extremo para evitar cualquier confusión o duplicación de números. El método ideal de identificación es el código de barras automatizado. Antes de comenzar la extracción de la sangre se debe:

1. Rectificar con el donante su nombre y compararlo con el de la historia clínica adjunta.
2. Adjuntar etiquetas con una numeración idéntica a la de la historia clínica del donante, a la bolsa principal y a las bolsas satélites, así como a los tubos de muestras de sangre del donante.
3. Volver a verificar todos los números.

## PREPARACIÓN DEL SITIO PARA LA VENOPUNTURA

Se debe extraer la sangre de una vena periférica grande y firme, por lo general en el área antecubital y libre de lesiones de la piel. Mediante un torniquete colocado en el brazo, las venas se hacen muy prominentes, lo que facilita el proceso de selección. Una vez elegida la vena se retira la compresión.

El procedimiento es el siguiente:

1. Comenzando por el sitio destinado a la venopuntura y moviéndose hacia fuera en una espiral concéntrica, aplicar compuestos esterilizantes (PVP-yodo al 10 %) y dejar asentar durante 30 segundos.

2. Cubrir el área con gasa estéril y seca, hasta el momento de la venopuntura. Una vez preparada la piel, no debe ser nuevamente tocada.
3. Volver a aplicar el torniquete. Realizar la venopuntura. Una vez que el bisel ha penetrado la piel, se puede realizar palpación por encima del tallo de la aguja con un dedo enguantado, siempre que no toque la aguja.
4. Si se retira la aguja y se intenta nuevamente la venopuntura, se debe repetir la preparación del sitio comenzando por el paso 1.
5. En los donantes alérgicos al yodo, se emplearán otras soluciones esterilizantes.

## FLEBOTOMÍA Y COLECCIÓN DE MUESTRAS PARA PROCESAMIENTO Y PRUEBAS DE COMPATIBILIDAD

Una vez realizada la venopuntura, se obtiene la sangre destinada a la transfusión sanguínea y las muestras acompañantes.

El procedimiento es el siguiente:

1. Preparar el brazo del donante como se describe en el apartado anterior.
2. Inspeccionar la bolsa para detectar cualquier defecto o cambio de color. Aplicar presión para controlar si hay pérdidas. Inspeccionar si el anticoagulante tiene el volumen y color apropiados y si existen contaminantes particulados.
3. Colocar la bolsa por debajo del nivel del brazo del donante. Colgar la bolsa y orientar el sistema tubular con la ayuda de la pinza. Se debe aplicar un hemostato antes de destapar la aguja para evitar que el aire ingrese en la vía.
4. Practicar venopuntura de la forma antes descrita, con la aguja estéril acoplada al sistema tubular de las bolsas de donación. Es esencial una venopuntura limpia y experta para la recolección de una unidad completa libre de coágulos. Ajustar el sistema tubular, con tela adhesiva, al brazo del donante, para mantener la aguja en el lugar y cubrir el sitio con gasa estéril.
5. Abrir el cierre transitorio entre el interior de la bolsa y el sistema tubular.
6. Hacer que el donante abra y cierre la mano lentamente cada 10 o 12 segundos durante la colección.
7. Mantener al donante en observación durante todo el proceso de donación.
8. Mezclar suave y periódicamente la sangre y el anticoagulante durante la colección, de forma manual o con agitador mecánico.



9. Asegurarse de que el flujo sanguíneo se mantiene bastante vivo, de modo que no se desencadene la actividad de la coagulación. La extracción no debe durar más de 15 minutos.
10. Controlar el volumen de sangre que se está extrayendo. Si se utiliza una balanza, interrumpir el flujo sanguíneo después de haber recolectado la cantidad apropiada. Un mililitro de sangre pesa 1,053 g, indicados por la densidad mínima permisible para los donantes. Una cifra conveniente es 1,06 g/mL, una bolsa que contiene entre 405 y 495 mL debe pesar de 429 a 525 g más el peso del recipiente con su anticoagulante.
11. Pinzar el sistema tubular cerca del sitio de venopuntura, con un hemostato, una pinza de metal u otra pinza transitoria. Liberar el manguito de la presión hasta 20 mmHg y llenar los tubos para las muestras de procesamiento sanguíneo sin que ocurra contaminación del contenido de la bolsa.
12. Desinflar el manguito y retirar el torniquete. Extraer la aguja del brazo, si no ha sido extraída antes. Aplicar presión sobre la gasa y hacer que el donante eleve el brazo y sostenga la gasa firmemente sobre el sitio de flebotomía con la otra mano.
13. Arrojar la aguja en un recipiente de biopeligros diseñado para evitar lesiones accidentales y contaminación del personal.
14. Luego de la extracción, escurrir el sistema tubular tanto como sea posible dentro de la bolsa, comenzando por el sellado. Evitar que la sangre se coagule. Invertir la bolsa varias veces para mezclarla bien, luego dejar que el sistema tubular se vuelva a llenar con sangre anticoagulada de la bolsa. Repetir este procedimiento una segunda vez.
15. Sellar el sistema tubular en segmentos, numerar uno de ellos de forma clara y legible. Adosar a otro sistema un número de identificación de la unidad para almacenarlo con el fin de realizar eventuales pruebas de compatibilidad. Es necesario separar los segmentos de la unidad sin afectar la esterilidad de la bolsa.
16. Inspeccionar el recipiente para detectar defectos.
17. Controlar los números en el recipiente, tubos procesadores, registro de donación y segmento de retención.
18. Colocar la sangre a temperatura apropiada. A menos que se vayan a extraer plaquetas, se debe almacenar la sangre total de 2 a 6 °C inmediatamente después de la colección. Si se van a obtener plaquetas se almacenan entre 20 y 24 °C. Las plaquetas deben ser separadas dentro de las 8 horas de la colección de la sangre total.

### Algunas consideraciones sobre la flebotomía

Para realizar la flebotomía es muy importante que:

1. La cantidad de sangre extraída se debe controlar cuidadosamente, para que el total no supere los 525 mL o menos, en el caso de que el donante pese menos de 50 kg.
2. El flebotomista siempre debe usar guantes.
3. Las agujas y cualquier residuo contaminado con sangre deben ser eliminados de forma segura.

### ATENCIÓN AL DONANTE DE SANGRE DESPUÉS DE LA FLEBOTOMÍA

Luego de la flebotomía es necesario:

1. Aplicar presión firme sobre el punto de ingreso de la aguja y retirar el apósito solo cuando deje de sangrar.
2. Mantener al donante reclinado en la cama o en el sillón durante unos minutos en estrecha observación personal.
3. Permitir al donante que tome asiento y dejarlo en observación si su estado es satisfactorio, y seguirlo al área de refrigerio, donde se debe mantener la observación.
4. Dar instrucciones acerca de los cuidados posflebotomía.
5. Darle al donante algo de comer y de beber antes de retirarse (este no debe retirarse sin el consentimiento de algún miembro del personal). Otras instrucciones que deben impartirse son:
  - a) Beber más líquido de lo habitual en las siguientes 4 horas.
  - b) Evitar el consumo de alcohol antes de comer.
  - c) No fumar durante 30 minutos.
  - d) Si sangra por el sitio de la flebotomía, levantar el brazo y comprimir.
  - e) Si se producen mareos o vértigos, debe acostarse o sentarse con la cabeza entre las rodillas.
  - f) Si persisten los síntomas, acudir al médico.
  - g) Reanudar las actividades normales si no hay síntomas. No efectuar actividades de riesgo (trabajo en las alturas, operación de maquinarias, etc.).
  - h) Mantener la ingestión de líquidos durante aproximadamente 3 días, para lograr una completa restauración del volumen de sangre.
6. Agradecer al donante por su importante contribución y alentarle a repetir la donación después de un intervalo apropiado.
7. Anotar en el registro del donante las reacciones adversas que hayan tenido lugar. Si el donante deja el área antes de ser autorizado, reflejarlo en el registro.

## REACCIONES ADVERSAS DE LA DONACIÓN DE SANGRE

La mayoría de los donantes de sangre toleran muy bien la donación, pero en ocasiones tienen lugar reacciones adversas. A continuación se relacionan varias medidas de carácter general y particular para enfrentarlas:

1. Retirar el torniquete y la aguja si se producen signos de reacción durante la flebotomía.
2. Trasladar al donante que presenta una reacción adversa a un área donde pueda ser asistido.

De manera particular, se pueden tomar las siguientes medidas:

1. Si ocurre un desvanecimiento: colocar al donante en decúbito supino con los pies elevados a un nivel superior al de la cabeza, aflojarle la vestimenta, asegurarle una vía aérea adecuada, aplicar en la frente o en la nuca compresas frías. Si no responde, hacerle inhalar amoníaco; el donante debe responder tosiendo, lo que eleva la tensión arterial. Controlar la tensión arterial, el pulso y la respiración hasta la recuperación. Si no responde, llamar al médico del banco.
2. Si se producen náuseas y vómitos: proveer al donante de toda la comodidad que sea posible. Indicarle que respire con lentitud y profundamente, aplicar compresas frías en la frente y/o en la nuca, volver la cabeza del donante hacia un lado, suministrarle un receptáculo adecuado para los vómitos y tener preparados paños de limpieza o toallas húmedas. Cuando el donante termine de vomitar darle agua para que se enjuague la boca.
3. Si ocurren contracciones y espasmos musculares: donantes extremadamente nerviosos se pueden hiperventilar, lo que puede causarles contracciones musculares o espasmo tetánico de las manos o el rostro. Se debe distraer la atención del donante, conversar con él, para interrumpir la pausa de hiperventilación. Si tiene síntomas, hacerlo respirar en una bolsa de papel. No debe dársele oxígeno.
4. Si se produce un hematoma durante o después de la flebotomía: retirar el torniquete y la aguja del brazo. Colocar tres o cuatro gasas estériles sobre el sitio de venipuntura y aplicar una firme presión digital durante 7 a 10 minutos con el brazo del donante por encima del nivel del corazón. Aplicar hielo en el área durante 5 minutos. Si se sospecha punción arterial, retirar de inmediato la aguja y aplicar vendaje compresivo. Controlar el pulso; pero si está ausente, llamar al médico.

5. Si hay convulsiones: pedir ayuda médica de inmediato. Impedir autolesiones del donante inmovilizándolo, y asegurar vía aérea permeable.
6. Trastornos cardíacos graves: pedir ayuda médica y/o una unidad de emergencia de inmediato. Si el donante se encuentra en paro cardíaco, comenzar de inmediato la reanimación cardiopulmonar y continuar hasta que llegue la asistencia.

En cualquiera de los casos, si no hay una rápida recuperación, llamar al médico del banco de sangre o el que esté designado para estos fines.

El carácter y el tratamiento de todas las reacciones, deben ser anotados en el registro del donante y especificar si puede ser aceptado o no para futuras donaciones.

Los bancos de sangre deben tener disponibles los recursos para hacer frente a las reacciones antes descritas: oxígeno, máscara, equipos de plástico o de goma dura para permeabilizar la vía aérea orofaríngea, drogas de emergencia, toallas, entre otros.

Una vez concluido el proceso de donación de sangre, las muestras piloto pasarán al laboratorio para la realización de pruebas imprescindibles que determinarán el empleo o no de la sangre y los componentes obtenidos de esta. Mientras tanto se mantendrán en refrigeración hasta su liberación.

## PRUEBAS REALIZADAS A LA SANGRE

La sangre obtenida de una donación debe ser sometida a un conjunto de exámenes considerados imprescindibles, que certifican su calidad y determinan su empleo en la terapia transfusional. Estos incluyen pruebas aceptadas internacionalmente con carácter absoluto y pruebas de carácter nacional determinadas por las condiciones epidemiológicas del país de que se trate. Entre las primeras se encuentran el tipaje de grupo sanguíneo ABO y Rh D y las pruebas para investigar infecciones por virus de inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis B (VHB) y virus de la hepatitis C (VHC). Las pruebas para la detección de infección por los virus linfotrópicos humanos de células T (HTLV- I/II) y el *Tripanosoma cruzi* se realizan en áreas geográficas endémicas de estas infecciones como Japón y América del Sur, respectivamente.

Los exámenes de laboratorio imprescindibles establecidos en Cuba para todas las donaciones son:

1. Grupo sanguíneo del sistema ABO: tipaje celular y sérico (contratipaje).
2. Tipaje del antígeno D del sistema Rh.

3. Variante D débil.
4. Prueba de anticuerpos irregulares contra antígenos eritrocitarios.
5. Pesquisa de enfermedades transmisibles: sífilis, hepatitis B, hepatitis C, VIH-I y VIH-II.

## TIPIFICACIÓN ABO Y Rh

### Grupo sanguíneo ABO

Toda donación destinada al uso alogénico debe ser evaluada para el sistema ABO, y no se deben usar registros previos de los resultados ABO del donante para rotular una unidad de sangre. Los registros previos deben ser comparados con los resultados de las pruebas actuales y resolver las discrepancias si existieran antes de que las unidades sean rotuladas. Las pruebas para tipificación ABO incluyen:

1. Pruebas que usan anti-A y anti-B para determinar la presencia y ausencia de estos antígenos en la superficie de los eritrocitos, denominadas pruebas directas o eritrocitarias.
2. El uso de eritrocitos A1 y B para detectar anti-A y anti-B en el suero del donante, denominada prueba inversa o sérica.

Ambas pruebas se complementan y su realización es de obligatorio cumplimiento.

Algunos reactivos para tipificar el grupo ABO de los eritrocitos se preparan a partir de mezclas de sueros de individuos que han sido estimulados con sustancias de grupo sanguíneo A o B para producir altos títulos de anticuerpos. Otros reactivos de tipificación ABO son anticuerpos monoclonales, procedentes de líneas celulares de cultivo. Ambos tipos de reactivos aglutinan la mayor parte de los eritrocitos antígeno-positivos por contacto directo, aun sin centrifugación. Las pruebas pueden realizarse en láminas portaobjetos o en tubos. El anti-A y el anti-B en el suero de la mayoría de los donantes, suelen ser demasiado débiles para aglutinar los eritrocitos sin centrifugación, de modo que las pruebas con suero deben ser efectuadas mediante técnicas en tubo o microplacas, no en láminas portaobjetos.

### Rh D débil

La transfusión de sangre con expresión débil del antígeno D a receptores Rh D negativos, ha sido proscrita hace mucho tiempo, por la posibilidad de que estos eritrocitos puedan ocasionar una respuesta inmune contra el antígeno D. Este evento es, al parecer,

más aparente que real, ya que las formas débiles del antígeno D son sustancialmente menos inmunogénicas que la forma D positiva normal. Más importante que la inmunogenicidad potencial de los eritrocitos D débil es la posibilidad de que estas células experimenten destrucción acelerada si se les transfunde a un receptor con anti-D circulante. Basado en todo lo anterior, se ha decidido que en toda donación D negativa se deben buscar antígenos D débil por medio de la prueba de antiglobulina.

## PESQUISA DE ANTICUERPOS

La sangre de donantes con antecedentes de transfusiones o embarazos, debe ser evaluada para detectar anticuerpos irregulares contra antígenos eritrocitarios.

Se examina el suero o el plasma de donantes frente a muestras individuales o frente a una mezcla de eritrocitos testigos de fenotipos conocidos. Las células testigos seleccionadas deben expresar, como mínimo, los siguientes antígenos: D, C, E, e, c, K, k, Fy<sup>a</sup>, Jk<sup>a</sup>, Jk<sup>b</sup>, Le<sup>a</sup>, Le<sup>b</sup>, M, N, S, s y P<sub>1</sub>.

Los métodos empleados deben ser los que demuestran anticuerpos séricos clínicamente significativos, en particular la prueba en solución salina y la de antiglobulina indirecta.

El plasma de donantes con anticuerpos irregulares contra antígenos eritrocitarios no se empleará con fines transfusionales.

## SÍFILIS

La sífilis es causada por la espiroqueta *Treponema pallidum* y se transmite por contacto sexual. La fase de espiroquetemia es breve y los microorganismos sobreviven únicamente a 4 °C algunos días; de modo que, si bien es posible la transmisión por transfusión, ocurre muy rara vez. La transmisión de la sífilis por transfusión sanguínea no se evita si se somete la sangre del donante a pruebas serológicas estándares para la sífilis, porque la seroconversión ocurre mucho después de la fase de espiroquetemia. Las pruebas serológicas para la sífilis se exigen como indicador de alto riesgo que hace más probable la transmisión de otros microorganismos.

La prueba serológica para la sífilis más utilizada detecta anticuerpos denominados reaginas, dirigidos contra la cardiolipina, antígeno ampliamente distribuido. Es habitual el desarrollo de anticuerpos anticardiolipinas en individuos que han tenido una infección

sifilítica no tratada, pero también pueden desarrollarse de forma transitoria, en pacientes después de una infección con distintas bacterias, virus o posterior a procedimientos de inmunización. A veces aparecen anticuerpos anticardiolipinas persistentes en pacientes con trastornos autoinmunes. Antes de notificar a un donante los resultados de la prueba, es recomendable realizar otras técnicas, para ver si presenta anticuerpos específicos contra el *treponema*.

## HEPATITIS B Y C

La hepatitis es la inflamación del hígado que puede ser causada por agentes tóxicos e infecciosos, entre los infecciosos se incluyen los virus de las hepatitis A, B, C, D y E, así como el citomegalovirus y el virus de Epstein-Barr, entre otros. Los agentes infecciosos que persisten en la circulación sanguínea de individuos asintomáticos, que se encuentran suficientemente sanos como para ser donantes de sangre, constituyen una amenaza para los receptores de sangre. La mayoría de los individuos que adquieren una infección por los virus de la hepatitis B o C, tienen una infección subclínica sin síntomas obvios ni evidencia física de la enfermedad.

Los marcadores virológicos empleados en la pesquisa de donantes son:

### 1. Hepatitis por virus B:

- a) Antígeno de superficie HB (AgsHB): es el primer marcador serológico que aparece en la infección por el VHB, de 2 a 6 semanas después de la infección. La sangre de individuos AgsHB positivo puede infectar a otros. Un individuo con Ag HB positivo puede tener una infección viral aguda o ser un portador crónico.

El ensayo inmunoenzimático (ELISA) es la prueba de elección para la detección de AgsHB en donantes. Esta técnica emplea un soporte sólido revestido con un antisuero contra el antígeno apropiado. El elemento indicador es el mismo anticuerpo marcado con una enzima cuya presencia se detecta por el cambio de color en el sustrato. Si la muestra contiene el antígeno, se unirá al anticuerpo de fase sólida y a su vez será ligado por un anticuerpo contra el AgsHB con enzima. Al añadir el sustrato correspondiente, se producirá una reacción con cambio de color que puede leerse de forma automatizada.

Las pruebas de ELISA son altamente sensibles, por lo que son útiles como examen de selección, pero pueden dar reacciones falsas positivas. Si la prueba inicial es positiva, se debe repetir el estudio de la muestra por duplicado.

En caso de que una o ambas pruebas den resultados positivos, se describe la muestra como repetidamente reactiva, y la unidad y todos sus componentes deben ser descartados. No se exigen pruebas confirmatorias para adoptar esta conducta. Esta situación se notificará al donante y se orientará hacia una consulta especializada donde se esclarecerá su situación con otros estudios (pruebas de neutralización, antiHBc y anti HBe).

### 2. Hepatitis por virus C:

- a) Anti-VHC: se ha detectado en el 80 al 90 % de las muestras de pacientes con diagnóstico inicial de hepatitis no A-no B, ya sea adquirida por transfusión sanguínea o de manera extra-hospitalaria. El método para su determinación es el ELISA. Se emplea una fase sólida revestida con antígenos preparados a partir de proteínas virales recombinantes o péptidos sintéticos apropiados. Se incubaba el suero o plasma, los anticuerpos presentes se unen fuertemente al antígeno, después de los lavados se agrega una preparación de antígeno conjugado con enzima. De existir Ac, se unirán al antígeno marcado y el complejo antígeno-anticuerpo-antígeno puede determinarse por la reacción enzima-sustrato producida después de la adición de este último.

Las muestras reactivas en la prueba inicial de selección, deben ser repetidas por duplicado. La reactividad en una o en ambas pruebas repetidas constituye un resultado positivo. Si ambas pruebas repetidas no son reactivas, la prueba se interpreta como negativa.

En algunos países se realiza un ensayo de *immunoblot* con el empleo de antígenos recombinantes inmovilizados (RIBA), para confirmar los resultados reactivos repetidos por ELISA. Se considera que un individuo RIBA positivo tiene verdaderos anticuerpos anti-HVC, en estos casos casi siempre se detecta ácido nucleico del VHC por PCR y se han comunicado tasas de infectividad de 80 a 90 %. Cualesquiera que sean los resultados del RIBA, no se puede utilizar para transfusión sanguínea una donación con un resultado reactivo repetido del ELISA.

## VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA

Desde la implementación de las pruebas para detectar el VIH en donantes de sangre en 1985, el riesgo

de transmisión de VIH por transfusión sanguínea ha disminuido notablemente. Los casos detectados con posterioridad son la consecuencia de la donación de sangre de un individuo recientemente infectado, cuyo suero no era aún reactivo a las pruebas de detección de Acs anti-VIH. El tiempo que media entre la adquisición de la infección y la aparición de Acs detectables en suero se conoce como período de ventana.

Las pruebas de detección de Acs, disponibles hasta 1992, tenían un período de ventana de 45 días. A partir de esta fecha, la introducción de pruebas más sensibles ha disminuido este período a 22 o 25 días. Hoy día el riesgo de adquirir VIH por transfusión sanguínea se aproxima a 1 por 420 000 transfusiones.

### Pruebas de VIH para donantes de sangre

La prueba empleada para la detección de Acs anti-VIH 1 y anti-VIH 2 en donantes, es el ensayo inmunoenzimático. Sus principios son similares a los descritos en las hepatitis B y C. Debido a que las consecuencias de omitir un positivo verdadero son graves, las pruebas de selección están ideadas para tener una elevada sensibilidad. La especificidad es menos importante aunque las pruebas para anti-VIH tienen una especificidad que excede el 99,5 %.

A los donantes con examen de selección por ELISA reactivo, se les debe repetir la prueba por duplicado, y si uno o ambos son reactivos, se descarta la unidad y se procede a realizar exámenes de confirmación por *western blot*, PCR o cultivos virales.

Se autoriza el empleo de la sangre cuya prueba de ELISA ha sido negativa inicialmente y aquellas que fueron positivas, pero que al repetir por duplicado resultaron negativas.

La prueba confirmatoria determinará si un donante es en verdad positivo. En estos casos, el donante debe ser notificado confidencialmente y se le recomendará asesoramiento y seguimiento médico.

## VIRUS LINFOTRÓPICOS HUMANOS DE CÉLULAS T

El virus HTLV-I, asociado con la leucemia-linfoma T del adulto y la paraparesia espástica tropical, muestra una incidencia elevada en determinadas áreas geográficas como el sur del Japón, África subsahariana, Brasil y la cuenca del Caribe. Esta distribución determinó que la pesquisa para este virus sólo se realizará en los países donde es endémico. Sin embargo, existe una tendencia actual a incorporar la pesquisa en otros países. En Cuba

se crean actualmente las condiciones para introducir las técnicas de pesquisa para el HTLV-I.

El HTLV-II se asocia con la paraparesia espástica tropical y suele ser endémico de algunas poblaciones autóctonas de América y entre los drogadictos.

Ambos virus, el HTLV-I y el HTLV-II tienen una similitud en sus secuencias genéticas del 60 % y los anticuerpos contra cualquiera de ellos muestran reactividad cruzada en las pruebas con lisados virales.

Actualmente, la prueba de selección autorizada para HTLV-I y HTLV-II es el ELISA, la cual no hace discriminación entre ambos virus. En los casos con pruebas repetidamente reactivas está indicada la confirmación por PCR para lograr la caracterización del agente infectante.

## OTRAS PRUEBAS DE LA SANGRE QUE NO SON OBLIGATORIAS

Existen algunas pruebas con indicaciones precisas:

1. Citomegalovirus (CMV): en general, la infección postransfusional por CMV no tiene consecuencias clínicas en receptores inmunocompetentes. Sin embargo, varias categorías de pacientes inmunodeprimidos deben ser protegidos del riesgo de transmisión del CMV. Estas incluyen:
  - a) Lactantes prematuros de bajo peso al nacer, hijos de madre seronegativas.
  - b) Receptores seronegativos de transplante de médula ósea (TMO) de donantes CMV seronegativos.
  - c) Mujeres seronegativas embarazadas.
2. Otras categorías incluidas en ocasiones son: los receptores seronegativos de cualquier tipo de trasplante, individuos seronegativos que son candidatos para TMO autólogo o alogénico, pacientes con SIDA que están libres de infección por CMV.
3. Pruebas de detección de anticuerpo contra CMV: la sangre de personas sin anticuerpos contra el virus no tienen ningún riesgo de transmitir la infección. Solo una pequeña proporción de donantes con anti-CMV transmitirán realmente la infección, pero actualmente no existe ninguna forma de distinguir las unidades infectantes con anticuerpos positivos de las unidades no infectantes que contienen anti-CMV.

Los procedimientos habitualmente utilizados son:

1. Ensayos inmunoabsorbentes enzimáticos para detectar el anti-CMV.
2. Detección de Acs anti-CMV por aglutinación de látex.

## CONSERVACIÓN DE LA SANGRE Y SUS COMPONENTES

### ANTICOAGULANTES Y ADITIVOS

El primer anticoagulante empleado fue el citrato (en 1914), el cual previene la activación de la cascada de la coagulación mediante su unión al calcio. En 1916 se le añadió la dextrosa para proveer una fuente de energía para los eritrocitos. Pero durante el proceso de esterilización a causa del pH alcalino, se producía la cristalización, por lo que había que esterilizar por separado el citrato y la glucosa y posteriormente mezclarlos. A principios de la década del 40 se disminuyó el pH de la muestra por la adición de ácido cítrico. La nueva solución obtenida: ácido-citrato-dextrosa (ACD) con un pH bajo, podía esterilizarse sin cristalizarse y se convirtió en el anticoagulante estándar.

En los años 50 del pasado siglo, se desarrolló la mezcla citrato-fosfato-dextrosa (CPD). En ella se adiciona el ACD solución reguladora fosfato inorgánico para aumentar la producción de ATP y así incrementar la viabilidad de los eritrocitos. El CPD, además, requiere menos ácido cítrico, por lo que el pH es mayor, lo que permite que el 2,3 difosfoglicerato (2,3 DPG) se mantenga mejor durante el almacenamiento de los eritrocitos y no se deplete durante 2 semanas. El 2,3 DPG promueve la liberación de oxígeno de la Hb de los eritrocitos a los tejidos.

En la década del 70 del siglo xx, se adicionó adenina a los anticoagulantes ACD y CPD, y se aumentó el tiempo máximo de almacenamiento de 21 días a 35 días de 2 a 6 °C. La adenina provee el sustrato a los eritrocitos para aumentar la producción de ATP y, por tanto, aumentar la viabilidad de estos.

En la década del 80 del propio siglo xx, con la introducción comercial de aditivos para los eritrocitos, se incrementó el tiempo de conservación de estos a 42 días. La solución aditiva contiene salina, adenina y dextrosa a altas concentraciones, también puede contener manitol (agente estabilizador de la membrana eritrocitaria).

### CAMBIOS BIOQUÍMICOS DE LA SANGRE DURANTE SU ALMACENAMIENTO

Con todos los anticoagulantes mencionados ocurren cambios bioquímicos durante el almacenamiento de los eritrocitos. Los principales cambios son la disminución del pH y los niveles plasmáticos de potasio, sodio, ATP y 2'3 DPG. Estas alteraciones son de particular importancia en las transfusiones masivas y las

neonatales, por lo que en estos casos es recomendable el empleo de sangre de menos de 5 días de extraída.

### PREPARACIÓN DE LOS COMPONENTES DE LA SANGRE

Aunque la sangre total puede ser utilizada en determinadas circunstancias, la terapia transfusional moderna consiste en la utilización del componente específico que está clínicamente indicado para evitar la infusión innecesaria y hasta perjudicial de los restantes constituyentes.

Los componentes son los constituyentes terapéuticos de la sangre que pueden ser preparados por medio de centrifugación, filtrado y congelación con el uso de la metodología convencional en un banco de sangre.

La terapia con componentes ofrece ventajas logísticas, éticas y económicas.

La preparación de los componentes de la sangre depende de múltiples factores. Entre ellos se encuentra el personal que realiza este trabajo, el cual debe poseer conocimientos suficientes de microbiología e higiene y estar consciente de la importancia de la prevención de la contaminación microbiana propia de los donantes, de los componentes sanguíneos y del medio.

Los locales para la producción deben estar separados del resto de las áreas de trabajo, y los equipos que se usan en el procesamiento sanguíneo se diseñan para satisfacer los propósitos para los que fue creado y no pueden presentar ningún tipo de riesgo.

Los donantes deben ser cuidadosamente seleccionados de acuerdo con las regulaciones establecidas. La recogida de sangre requiere ser estrictamente controlada, y los componentes de la sangre necesitan ser preparados siguiendo instrucciones claras y detalladas para lograr la calidad deseada. Siempre que sea posible, los componentes de la sangre deberán procesarse dentro de un sistema cerrado.

#### Proceso de preparación de la sangre

Los componentes sanguíneos pueden ser preparados mediante dos formas:

1. Procesamiento de la sangre a partir de la donación de sangre convencional.
2. Tecnología de aféresis: mediante el proceso de extracción selectiva de componentes con el empleo de máquinas procesadoras de sangre.

Las condiciones de almacenamiento, así como el tiempo entre la extracción y el procesamiento son vitales

para la preparación de los componentes, debido al deterioro potencial de la actividad y función de los componentes lábiles de la sangre.

Las células progenitoras hematopoyéticas (CPH) pueden recogerse a partir de la médula ósea, de la sangre periférica o de la sangre fetal, por medio de una combinación de diferentes técnicas, en dependencia de la fuente de origen.

### **Solución anticoagulante y sistema de bolsas**

La sangre total se recoge en una bolsa que debe tener una proporción determinada de solución anticoagulante que contiene citrato y nutrientes celulares como la adenina y la glucosa para poder resistir el período de almacenamiento.

Para poder mantener el sistema cerrado a lo largo del proceso de separación, es necesario utilizar una configuración de bolsas múltiples. El diseño y disposición del sistema debe permitir la preparación estéril requerida del componente deseado. Algunas veces pueden ser útiles los sistemas abiertos, en estos casos se debe prestar especial atención al uso de procedimientos estériles. Los productos preparados de este modo se deben utilizar para la transfusión sanguínea en el plazo de 24 horas desde su procesamiento, si se han procesado y almacenado a 4 °C; o en el plazo de 6 horas, si se han almacenado a temperatura ambiente.

### **Centrifugación de la sangre**

Las células sanguíneas se sedimentan de forma distinta en dependencia de su tamaño y de la diferencia de densidad entre estas y el fluido que las rodea. Las de mayor densidad (en g/mL) son los eritrocitos (1,100), les siguen los neutrófilos (1,082), los linfocitos (1,070), los monocitos (1,062) y las plaquetas (1,058). La densidad del plasma es de 1,026 g/mL. Los de mayor volumen medio (en  $10^{-15}$ L) son los monocitos (740), le siguen los neutrófilos (270), los linfocitos (230), los eritrocitos (87) y las plaquetas (16). Otros factores que se deben tener en cuenta son la viscosidad del medio y la flexibilidad de las células, que dependen de la temperatura. La temperatura óptima con respecto a estos factores es de 20 °C o superior.

En la primera fase de la centrifugación, el fluido está constituido solo por una mezcla de solución anticoagulante y plasma. Los leucocitos y los eritrocitos sedimentan más rápido que las plaquetas, ya que ambos tienen un mayor volumen que estas.

En la fase posterior, en dependencia del tiempo y la velocidad de centrifugación, la mayoría de los

leucocitos y los eritrocitos se posan en la mitad inferior de la bolsa, y la mitad superior contiene plasma rico en plaquetas. Un centrifugado más elevado da como resultado una sedimentación de plaquetas impulsadas por una fuerza proporcional al cuadrado del número de rotaciones por minuto y la distancia de cada célula al centro del rotor; mientras que los leucocitos, rodeados ahora por un fluido de alta densidad (la masa de eritrocitos), se mueven hacia arriba. Al final de la centrifugación, el plasma libre de células se encuentra en la parte superior de la bolsa y los eritrocitos en el fondo. Las plaquetas se acumulan encima de la capa de eritrocitos, mientras que la mayoría de los leucocitos se encontrarán inmediatamente por debajo, en los 10 mL superiores de la masa de eritrocitos.

Las células progenitoras hematopoyéticas poseen características similares a las de las células mononucleares normales de la sangre. Sin embargo, sus contaminantes pueden ser células inmaduras o malignas de diferentes linajes hematopoyéticos que habitualmente tienen un tamaño más grande y una densidad más baja que sus semejantes maduras.

La velocidad y el tiempo de centrifugación determinarán la composición del componente deseado; por tanto, se deben establecer para cada centrifugación las condiciones óptimas para una buena separación.

Existen posibilidades para la selección de un proceso de centrifugación para el procesamiento de los componentes de la sangre a partir de sangre total. La selección del paso de separación inicial influye de manera marcada sobre los métodos de procesamiento ulterior de las fracciones iniciales.

### **Separación de los componentes de la sangre**

Existen varios principios de separación de los componentes de la sangre:

1. Después de la centrifugación inicial, el sistema de bolsas se retira cuidadosamente de la centrífuga. La bolsa principal se coloca a un sistema de extracción de plasma y las capas se transfieren, una por una, a bolsas satélites dentro del sistema cerrado. La sangre total puede ser filtrada para eliminar leucocitos antes de la centrifugación a alta velocidad. Este procedimiento hace posible la separación de un plasma casi libre de células y unidades de eritrocitos pobres en leucocitos y en plaquetas, lo que permite que este plasma sea congelado y guardado como plasma fresco congelado, para ser utilizado como tal o como materia prima para la obtención de otros productos.

2. Centrifugación zonal: su eficacia depende de la relación entre la fuerza centrífuga y la velocidad del flujo. A una relación alta se obtiene un plasma pobre en plaquetas, y a una relación baja se obtiene un plasma rico en plaquetas. También se utiliza para eliminar proteínas del plasma en una suspensión de eritrocitos y para la adición y retirada de crioprotectores antes de la congelación y después de la descongelación de eritrocitos en la criopreservación.
3. Centrifugación sobre un gradiente de densidad: la centrifugación de médula ósea o de células de la capa leucocitaria que se encuentran flotando sobre un gradiente de densidad de 1,077 g/mL, lleva a la obtención de una capa de células mononucleares que flotan en la interfase y a un grupo de eritrocitos y granulocitos que han penetrado a través del medio separador, de acuerdo con la densidad de las células implicadas. Generalmente se utiliza en las separaciones que se basan en las diferencias de densidad entre células.
4. Centrifugación contracorriente (elutriación): células sometidas simultáneamente a un flujo de líquido y a una fuerza centrífuga, ambas en direcciones opuestas, tienden a ser separadas en función de su tamaño. Se aplica para conseguir concentrados de plaquetas de aféresis con un contenido reducido de leucocitos y un nivel de reducción deseado (por ejemplo: menos de  $10^6$  leucocitos/unidad). Este procedimiento también se utiliza para separar subpoblaciones de células mononucleares de la sangre o de la médula ósea.
5. Filtración: existen dos tipos fundamentales de filtrado en la preparación de componentes:
  - a) Filtración de flujo cruzado: cuando fluye la sangre a lo largo de una membrana con un tamaño de poro que permite el paso libre de las proteínas del plasma pero no de células sanguíneas, se puede obtener por filtrado de plasma libre de células.
  - b) Filtración en profundidad: debido a las propiedades específicas de las plaquetas y los granulocitos, así como a la baja flexibilidad de los linfocitos, estas células son atrapadas más fácilmente en un filtro. Los filtros que se utilizan para la retirada de los leucocitos, de los eritrocitos o de las plaquetas muestran variaciones considerables en su eficacia y capacidad.
6. Técnicas de inmunoadsorción: se utilizan generalmente cuando se trata de aislar un tipo particular

de células mononucleares. Existen dos tipos de procedimiento: selección negativa (retirada específica de las células que contaminan la preparación de las células mononucleares) y selección positiva (aislamiento de las células que se desea obtener).

7. Crioprecipitación: el aislamiento de algunas proteínas del plasma, especialmente del factor VIII, la fibronectina y el fibrinógeno, se puede conseguir a bajas temperaturas aprovechando su reducida solubilidad. En la práctica, esto se realiza congelando unidades de plasma fresco, las que se someten posteriormente a descongelación y centrifugación a bajas temperaturas (4 °C).
8. Congelación y descongelación del plasma: la congelación es un paso crítico en la conservación del factor VIII del plasma. Durante la congelación se forma hielo puro, el cual depende del índice de extracción del calor, mientras que la difusión de la velocidad de los solutos determina su desplazamiento. A niveles lentos de congelación, la difusión de solutos se enfrenta a la velocidad de formación de hielo. Los solutos se concentran de manera creciente en mitad de la unidad de plasma.

Cuando se congela el plasma citratado, la velocidad de enfriamiento debe ser tan rápida como sea posible, en un plazo de 60 minutos. Si esto no es posible, se debe realizar en un plazo de 4 horas.

La experiencia ha demostrado que esto tarda a veces varias horas a una temperatura ambiente de -30 °C y una transferencia aérea de calor. El tiempo deberá ser reducido a menos de 1 hora, por ejemplo, de las siguientes maneras:

1. El plasma deberá ser presentado en una configuración regular para maximizar la exposición al proceso de congelación (ejemplo: bolsas tumbadas, o si se encuentran en posición vertical, contenidas en separadores).
2. Inmersión en un entorno de temperatura muy baja:
  - a) Si se utiliza un entorno líquido, se habrá comprobado previamente que el solvente no puede penetrar en el recipiente.
  - b) En la descongelación se debe tener cuidado con las unidades porque son frágiles y pueden romperse. El producto debe descongelarse inmediatamente después de sacarse del almacén, en un entorno controlado a 37 °C. Para preservar los factores lábiles, el plasma debe ser usado inmediatamente después de su descongelación, y nunca pasadas 6 horas. Una vez descongelado, no se debe volver a congelar.



Existen procedimientos adicionales como son:

1. Lavados de componentes celulares: los lavados de componentes celulares se realizan ocasionalmente cuando existe un requerimiento de células libres de proteínas.
2. Lavados de componentes irradiados: en los receptores inmunodeprimidos e inmunodeficientes y los que reciben transfusión sanguínea de componentes HLA idénticos, es conveniente administrar componentes en que los linfocitos tengan un nivel de activación reducido o nulo. Esto se logra mediante irradiación ionizante, la cual no causa daño significativo a otros componentes sanguíneos. Una dosis de irradiación de 25 a 50 Grays suele ser suficiente. El tiempo de irradiación necesario de cada fuente de irradiación debe ser estándar.

Los concentrados de eritrocitos pueden ser irradiados hasta 14 días después de su obtención y, en lo adelante, deben ser almacenados hasta el día 28. Los eritrocitos que se destinen a transfusión sanguínea uterina o neonatal deben ser utilizados dentro de las 48 horas posteriores a la irradiación. Las plaquetas irradiadas pueden ser utilizadas hasta su fecha de caducidad original.

#### Componentes sanguíneos libres de citomegalovirus

El citomegalovirus (CMV) es un agente infeccioso común que puede ser transmitido por la transfusión de componentes sanguíneos; el riesgo de transmisión es mayor con productos frescos que contienen leucocitos mononucleares y polinucleares. La infección por CMV es a menudo asintomática en personas sanas. Los anticuerpos aparecen normalmente de 4 a 8 semanas después de la infección y se pueden detectar por medio de pruebas de exploración estándar. Ya que la infección es común, la prueba debe ser repetida en cada donación que realice un donante previamente seronegativo.

La infección causada por este virus generalmente no es significativa en receptores inmunocompetentes, pero puede causar enfermedad grave o incluso fatal en determinados pacientes, a los que ya se ha hecho referencia con anterioridad. Estos pacientes deben recibir componentes de donantes anti-CMV negativos. El uso de componentes pobres en leucocitos es una alternativa aceptable.

#### CONSERVACIÓN DE LOS COMPONENTES DE LA SANGRE

Las condiciones de conservación de los componentes sanguíneos deben estar diseñadas para preservar

la viabilidad y la función óptima durante todo el período de conservación. El riesgo de contaminación bacteriana se reduce sustancialmente si solo se utilizan sistemas de separación cerrados.

#### COMPONENTES DE LA SANGRE

Los componentes de la sangre son:

1. Concentrados de eritrocitos sencillos (concentrados de glóbulos rojos o hematíes): se obtienen a partir de la separación del plasma de la unidad de sangre total, mediante centrifugación o sedimentación espontánea. La unidad contiene todos los eritrocitos de la unidad de sangre original, gran cantidad de leucocitos y de plaquetas, en dependencia del método de centrifugación utilizado. Cada unidad de eritrocito debe tener un volumen de  $280 \pm 50$  mL, una fracción del volumen eritrocitario (FVE) de 0,65 a 0,75 y una hemólisis menor que el 0,8 %. Se conservan de 2 a 4 °C durante 35 días.
2. Concentrados de eritrocitos en solución aditiva: es una suspensión de eritrocitos en la que se ha añadido una solución nutriente adecuada para lograr una mejor conservación. Se conservan de 2 a 4 °C durante 35 días.
3. Concentrados de eritrocitos en solución aditiva, sin capa leucocitaria: es la suspensión de eritrocitos obtenida de la sangre total mediante centrifugación y separación del plasma y de la capa leucocitaria, y la subsiguiente adición de una solución nutriente adecuada. Se conservan de 2 a 4 °C durante 35 días.
4. Concentrados de eritrocitos lavados: es la suspensión de eritrocitos a la cual se le ha retirado la mayor parte del plasma, los leucocitos y las plaquetas, y se ha lavado en una solución de NaCl isotónica. Deben emplearse antes de las 6 horas del proceso de lavado.
5. Concentrados de eritrocitos pobres en leucocitos: se obtienen al eliminar la mayoría de los leucocitos de un concentrado de eritrocitos por eliminación del *buffycoat* o con el empleo de filtros para leucocitos. Se conservan de 2 a 4 °C durante 35 días.
6. Concentrados de eritrocitos congelados y glicerolizados: componente derivado de la sangre total en la que los eritrocitos son congelados preferiblemente en un plazo máximo de 7 días desde su extracción, con el uso de una solución de sustancia crioprotectora (glicerol), y conservados a -196 °C en nitrógeno líquido. Algunas variantes de este método permiten conservar los concentrados a -80 °C. Antes de su utilización, los eritrocitos se descongelan, se lavan y se suspenden en solución salina isotónica.

La ventaja principal de los eritrocitos congelados es que se pueden mantener por períodos indefinidos, que permitan la acumulación de sangre procedente de grupos raros. De esta forma, es posible que los pacientes con uno o más aloanticuerpos, encuentren en el banco de sangre congelada, las cantidades suficientes que necesitan.

Los eritrocitos congelados (y lavados) se encuentran virtualmente libres de plasma, de leucocitos y de plaquetas. La congelación es el método apropiado de conservación para los glóbulos autólogos.

7. Concentrado de plaquetas: es un componente derivado de la sangre total fresca que contiene la mayor parte del contenido plaquetario original, de forma efectiva desde el punto de vista terapéutico.

El contenido de plaquetas por unidad variará en dependencia del método de preparación de  $0,4$  a  $0,8 \times 10^{11}$  en  $50$  a  $60$  mL de plasma. De forma similar, el contenido de leucocitos variará de  $0,05$  a  $1 \times 10^9$  por cada unidad equivalente, a menos que se tomen las medidas oportunas para reducir estas cifras.

En el caso de las plaquetas preparadas a partir de plasma rico en plaquetas, los leucocitos residuales antes de la depleción deben ser menores que  $0,2 \times 10^9$  por cada unidad simple. En el caso de las plaquetas preparadas a partir de la capa leucoplaquetaria, la cifra de leucocitos debe ser menor que  $0,05 \times 10^9$  por unidad simple equivalente.

#### **Preparación de los concentrados de las plaquetas a partir de plasma rico en plaquetas**

Para la preparación de concentrados de plaquetas a partir de plasma rico en plaquetas (PRP) se centrifuga una unidad de sangre total, de manera que un número óptimo de plaquetas permanezca en el plasma y que el número de leucocitos y de eritrocitos se reduzca a un nivel definido. Las plaquetas del PRP se sedimentan mediante una centrifugación enérgica; el plasma sobrenadante se retira y se deja de  $50$  a  $70$  mL de este con las plaquetas; finalmente las plaquetas se desagregan y se resuspenden.

#### **Preparación de plaquetas a partir de *buffycoat***

Para la preparación de plaquetas a partir de *buffycoat*, se centrifuga una unidad de sangre total de manera que las plaquetas, en primer lugar, se sedimenten (en la capa leucocitaria) junto con los leucocitos. La capa leucocitaria se separa y se suspende con el plasma sobrenadante. Tras una mezcla cuidadosa, se centrifuga la bolsa con la capa leucoplaquetaria, de

forma que las plaquetas permanezcan en el sobrenadante, pero los eritrocitos y los leucocitos se sedimenten al fondo de la bolsa.

Los concentrados de plaquetas pobres en leucocitos se pueden separar con el empleo de un desplasmatizador mediante filtrado. Se recomienda un prealmacenamiento (preferiblemente en un plazo de  $6$  horas tras su recuperación).

Las plaquetas a partir de *buffycoat* se pueden obtener también por métodos semiautomatizados con el empleo de equipos que poseen un sensor capaz de diferenciar los eritrocitos, el plasma y el *buffycoat*. Después de la centrifugación inicial, con el empleo de un sistema de tres bolsas, la bolsa con la sangre centrifugada se introduce en la cámara del equipo y, después del funcionamiento de este, se obtendrá plasma en la bolsa superior, *buffycoat* en la bolsa primaria y eritrocitos en la bolsa inferior. El empleo de estos sistemas denominados *top and bottom* implica una economía de recursos humanos, al automatizar la obtención de componentes. La bolsa con *buffycoat* obtenida se mezcla de forma estéril con una bolsa de plasma y otras  $3$  de *buffycoats* isogrupo. Esta mezcla se centrifuga para obtener los eritrocitos y los leucocitos en el fondo y en el sobrenadante, un concentrado de plaquetas que contiene el equivalente a  $4$  unidades simples de plaquetas. Algunos grupos realizan mezclas de  $6$  *buffycoats*. Los concentrados de plaquetas obtenidos por este sistema tienen una baja contaminación con leucocitos, y un menor daño y activación plaquetarios.

#### **Plaquetas obtenidas por aféresis**

Las plaquetas obtenidas por aféresis son un preparado plaquetario alcanzado con el uso de un equipo automatizado de separación celular.

En dependencia del método utilizado, el contenido de plaquetas por proceso variará de  $2$  a  $8 \times 10^{11}$ . Este método permite recolectar plaquetas de donantes seleccionados, para reducir el riesgo de aloinmunización HLA y para el tratamiento efectivo de pacientes ya aloinmunizados. Mediante la reducción del número de exposiciones a un solo donante, el riesgo de transmisión viral puede ser reducido.

Una unidad estándar de plaquetas por aféresis debe ser el equivalente a las plaquetas obtenidas en  $5$  unidades de sangre total.

Las unidades de plaquetas deben almacenarse por un período de hasta  $5$  días tras la donación, a  $22^\circ\text{C}$  en agitación.

### Plasma fresco congelado

El plasma fresco congelado es el plasma obtenido a partir de centrifugación de una unidad de sangre total o por aféresis, congelado de forma rápida antes de las 6 horas de extraído y conservado a una temperatura de  $-30^{\circ}\text{C}$  o menos para mantener de forma funcional los factores lábiles de la coagulación.

Este componente contiene niveles normales de factores de coagulación estables, albúmina e inmunoglobulinas. Contiene un mínimo del factor VIII original y, por lo menos, cantidades similares de los otros factores de coagulación lábiles e inhibidores que se dan de forma natural.

Las células residuales deben ser: eritrocitos, menor que  $6,0 \times 10^9/\text{L}$ ; leucocitos, menor que  $0,1 \times 10^9/\text{L}$ ; y plaquetas, menor que  $50 \times 10^9/\text{L}$ . El contenido de factor VIII debe ser mayor que  $0,7 \text{ U/mL}$ .

El plasma para transfusión sanguínea debe ser ABO compatible y debe utilizarse inmediatamente después de la descongelación, en el caso que se emplee como fuente de factores lábiles de la coagulación.

Se conserva a  $-30^{\circ}\text{C}$  o a temperaturas inferiores durante un año.

### Crioprecipitado

El crioprecipitado es un componente que contiene la fracción crioglobulínica del plasma, obtenida de una donación única y reciente, mediante la centrifugación intensa y su concentración a un volumen final de 10 a 20 mL, libre de células.

Este componente contiene una fracción importante de factor VIII, factor von Willebrand, fibrinógeno, factor XIII y fibronectina presentes en plasma recién extraído y separado.

Se deja que la bolsa de plasma congelado se descongele a una temperatura de 2 a  $6^{\circ}\text{C}$  mediante la técnica de sifón o mediante la descongelación lenta. Después se centrifuga y desplasmatiza, y se deja en la bolsa el crioprecipitado con 10 a 20 mL del plasma del sobrenadante.

El factor VIII puede ser administrado como crioprecipitado, como factor VIII concentrado, o como factor VIII recombinante. Su actividad se mantiene adecuada entre  $-30$  y  $-40^{\circ}\text{C}$  o en productos liofilizados. Además, se conserva a  $-30^{\circ}\text{C}$  o a temperaturas inferiores durante un año.

La bolsa de crioprecipitado se descongela en un medio controlado a  $37^{\circ}\text{C}$ , inmediatamente después de su retirada del lugar de almacenamiento e inmediatamente antes de ser utilizado. La disolución del

precipitado debe facilitarse mediante una cuidadosa manipulación durante el proceso de descongelación.

### Preparados de pequeñas mezclas

En ciertas circunstancias se agrupan, de forma estéril, varias bolsas de crioprecipitado para su uso.

### Concentrados de granulocitos obtenidos por aféresis

El concentrado de granulocitos obtenidos por aféresis es un componente compuesto principalmente por granulocitos suspendidos en plasma, obtenidos mediante aféresis de un único donante. Su principal función es la fagocitosis de las bacterias.

La leucoféresis se realiza mediante máquinas separadoras de células. Se usan métodos de centrifugación, ya sean intermitentes o continuos. El rendimiento se puede mejorar mediante la adición de un agente sedimentador de eritrocitos como el almidón de hidroxietil dextrano (HES), de bajo peso molecular o gelatina líquida modificada. El volumen debe ser menor que 500 mL y cada unidad debe tener más de  $10 \times 10^9$  granulocitos.

Cuando hay una contaminación significativa de eritrocitos, se recomienda realizar pruebas de compatibilidad para su empleo terapéutico. Los concentrados de granulocitos se conservan de 2 a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 48 h.

## INDICACIONES DE LA SANGRE, SUS COMPONENTES Y DERIVADOS

### SANGRE TOTAL

Actualmente, las indicaciones de sangre total son:

1. Transfusión masiva.
2. Exanguinotransfusión.
3. Cirugía cardiopulmonar con circulación extracorpórea.

### CONCENTRADO DE ERITROCITOS

En la actualidad, los criterios más aceptados para la transfusión de concentrados de eritrocitos son los siguientes:

1. Anemia sintomática en un paciente normovolémico, con independencia de los niveles de hemoglobina (Hb). El estado clínico del paciente, y no el resultado de laboratorio, es el factor más importante para determinar las necesidades transfusionales.

2. En las pérdidas agudas de sangre, la necesidad de la transfusión de eritrocitos se correlaciona con la cuantía de la pérdida y con el estado clínico del paciente:
  - a) Pérdidas menores que el 20 % del volumen sanguíneo estimado, no suelen ocasionar síntomas, y la transfusión de eritrocitos no es necesaria, salvo en aquellos pacientes que previamente tenían niveles de Hb menores que 100 g/L o en caso de que exista alguna enfermedad de base que determine la aparición de trastornos cardiovasculares y síntomas de hipovolemia.
  - b) Las pérdidas del 20 % o más del volumen sanguíneo estimado suelen ser sintomáticas y deben administrarse eritrocitos precedidos de sustancias cristaloides y coloides para reponer el volumen sanguíneo y la capacidad de transporte de oxígeno. Se administrarán otros componentes de la sangre según los resultados de los exámenes de laboratorio.
3. La transfusión sanguínea perioperatoria: la práctica de la transfusión sanguínea durante el acto quirúrgico, ha sido guiada por la creencia de que un valor de Hb menor que 100 g/L o un hematócrito (Hto) menor que 30 % es una indicación para transfundir. En nuestros días estos criterios son discutidos y se señala con insistencia que, en lugar de corregir un valor de laboratorio, deberán tomarse en consideración múltiples factores como la duración de la anemia, el volumen intravascular, la extensión de la cirugía, la probabilidad de una pérdida masiva de sangre, así como otras condiciones coexistentes, entre ella, deterioro de la función respiratoria, gasto cardíaco disminuido, isquemia miocárdica o cerebrovascular y enfermedad vascular periférica. Si la persona está sana y no existen factores de riesgo adicionales asociados con la naturaleza de la cirugía, los niveles de Hb iguales a 80 g/L o menos, serán bien tolerados si el paciente está bien controlado. Un estudio de 82 pacientes con un Hto medio de 24,5 % no reveló un aumento de la morbilidad intraoperatoria, ni de la mortalidad posoperatoria:
  - a) Hb de 90 g/L o menos, en un paciente en régimen de hipertransfusión crónica.
  - b) Complicaciones de la drepanocitosis: la transfusión de eritrocitos suele ser necesaria en muchas de las complicaciones como son: crisis aplásica, crisis de secuestro, accidentes vasculares encefálicos, síndrome torácico agudo y priapismo, entre otras. Teniendo en cuenta las características y la gravedad de estas complicaciones, se emplea la transfusión sanguínea simple, la exanguinotransfusión o el régimen de transfusión sanguínea crónica.

- c) Hb de 80 g/L o menos, en pacientes que reciben radioterapia o quimioterapia.
- d) No constituyen indicaciones de transfusión de eritrocitos, la promoción de la cicatrización de heridas, la prevención de infecciones o la corrección del tiempo de sangría prolongado.

## CONCENTRADO DE PLAQUETAS

La transfusión de plaquetas puede ser profiláctica o terapéutica, y los criterios para su indicación son los siguientes:

### 1. Transfusión profiláctica:

- a) Trombocitopenia hipoproliferativa con:
  - Recuento plaquetario de  $10 \times 10^9/L$  o menos, sin sangrado.
  - Recuento plaquetario de  $20 \times 10^9/L$  o menos, sin sangrado, pero con factores que favorecen su ocurrencia, como son: infecciones, fiebre, esplenomegalia, lesión anatómica, medicación anticoagulante y coagulopatía.
  - Recuento plaquetario de  $50 \times 10^9/L$  o menos, y cirugía mayor o proceder invasivo.
  - Recuento plaquetario de  $100 \times 10^9/L$  o menos, y cirugía de cerebro.
- b) Pacientes con leucemia y recuento de blastos mayor que 100 000 en sangre periférica, que deben mantener niveles de plaquetas mayores que  $50 \times 10^9/L$  por el peligro de leucoestasis cerebral o pulmonar.
- c) Pacientes con disfunción plaquetaria y cirugía inminente, parto, proceder invasivo o extracción dentaria, según las características individuales de cada paciente.

### 2. Transfusión terapéutica:

- a) Síndromes hemorrágicos en el curso de trombocitopenia. En estos casos constituye una meta razonable poder alcanzar cifras en el recuento plaquetario postransfusional de  $40 \times 10^9/L$  o más.
- b) Sangrado microvascular difuso en un paciente con coagulación intravascular diseminada o transfusión sanguínea masiva y un recuento de plaquetas no disponible o menor que  $50 \times 10^9/L$ .
- c) Sangrado microvascular difuso que se presenta posterior a un *bypass* cardiopulmonar o balón intraaórtico y recuento plaquetario no disponible o menor que  $100 \times 10^9/L$ .
- d) Sangrado microvascular y disfunción plaquetaria con tiempo de sangrado prolongado.

## CONCENTRADO DE LEUCOCITOS

La transfusión de leucocitos se indica en:

1. Pacientes con neutropenia menor que  $0,5 \times 10^9/L$ , e infección bacteriana severa que a las 48 horas no responde al tratamiento antibiótico agresivo, con hipoplasia mieloide y la posibilidad razonable de recuperar la función de la médula ósea.
2. Pacientes con disfunción granulocítica documentada (enfermedad granulomatosa crónica) y sepsis bacterianas progresivas.

## PLASMA FRESCO CONGELADO

El plasma fresco congelado debe indicarse en:

1. Pacientes con sangrado y que presentan déficit de los factores de la coagulación secundaria a una enfermedad hepática.
2. Pacientes con púrpura trombocitopénica trombótica.
3. Pacientes con coagulopatías dilucionales por transfusiones masivas que reemplazan rápidamente más de un volumen sanguíneo total.
4. Pacientes con coagulación intravascular diseminada, siempre que exista sangrado y su causa obedezca al consumo de los factores de la coagulación.
5. Pacientes con una sobredosis de warfarina con sangrado importante o cirugía inminente.
6. Pacientes con edema angioneurótico (aunque actualmente este caso está en discusión).
7. Pacientes con deficiencia de proteína C, de proteína S o de antitrombina.
8. Pacientes con enfermedad hemolítica del recién nacido.

## CRIOPRECIPITADO

El crioprecipitado se emplea en:

1. Enfermedad de von Willebrand.
2. Deficiencia de factor XIII.
3. Hipofibrinogenemia.
4. Déficit de factor VIII, cuando no se dispone de concentrados de factor VIII.

## ALBÚMINA Y FRACCIÓN PROTEICA DEL PLASMA

La fracción proteica del plasma (FPP) y la albúmina son coloides derivados del plasma, producidos a partir de mezclas de plasma con el uso del proceso de fraccionamiento en etanol de Cohn. Posteriormente se so-

meten a un proceso de pasteurización por calentamiento a  $60^\circ C$  durante 10 horas para la inactivación viral y se les adiciona sucrosa al 50 % y glicina 2 M como estabilizadores, para prevenir la desnaturalización excesiva de las proteínas. El proceso de calentamiento inactiva todos los factores de la coagulación.

La FPP contiene alrededor del 83 % de albúmina y el 17 % de globulinas  $\alpha$  y  $\beta$ . La albúmina es un producto más refinado que contiene 96 % de albúmina y 4 % de alfa globulinas. Ninguno de los dos productos contiene gammaglobulinas, por lo que no presentan Acs ABO y no requieren pruebas pretransfusionales de compatibilidad.

La FPP y la albúmina al 5 % son osmóticamente similares al plasma, mientras que la solución de albúmina al 25 % es hiperosmótica, comparada con el plasma y provoca el paso de líquido al espacio intravascular.

Las soluciones de FPP y albúmina al 5 % se indican como expansores plasmáticos en el tratamiento de la hipovolemia y el *shock*; sin embargo, son soluciones caras, por lo que para este uso debe tenerse primero en consideración las soluciones cristaloides como la salina normal y la solución de ringer.

La infusión rápida de FPP está contraindicada en el *bypass* cardiopulmonar, ya que el producto contiene precursores de la bradiquinina que, cuando están activados, producen hipotensión. La albúmina no contiene precursores de la bradiquinina.

Estos dos coloides son útiles para la elevación de la presión sanguínea en la plasmaféresis terapéutica, diálisis, *shock* y otras situaciones hipotensivas. La albúmina puede ser útil además en la enfermedad hemolítica del recién nacido, ya que se une a la bilirrubina indirecta.

No está justificado el uso de estos productos como fuente de nutrición, y es cuestionable su empleo en el tratamiento general de la hipoalbuminemia debida a una enfermedad hepática, así como en las enteropatías y nefropatías con pérdida de proteínas.

## CONCENTRADOS DE LOS FACTORES DE LA COAGULACIÓN

Los concentrados de los factores de la coagulación presentan las siguientes características.

**Concentrado de factor VIII.** Es un producto liofilizado obtenido de mezclas de plasma con el uso del método de fraccionamiento en etanol de Cohn. Posteriormente se somete a tratamiento antiviral, para el cual se han aplicado diferentes métodos, entre ellos el de exposición a solventes detergentes parece ser el más efectivo. En este método se emplea tri-n-butyl fosfato y

otro detergente cualquiera (Tween 20, Triton X-100), para inactivar virus con cubiertas lipídicas como los de las hepatitis B y C, los VIH-1 y VIH-2, HTLV-1 y HTLV-2, virus de Epstein-Barr y el CMV. Otros virus sin cubiertas lipídicas como el de la hepatitis A y el parvovirus 19 no se destruyen por este proceso.

El concentrado de factor VIII se administra por vía intravenosa a pacientes con deficiencia de factor VIII congénita, moderada o severa (hemofilia A), en caso de sangrado o de forma profiláctica. Las deficiencias leves pueden tratarse con el agente farmacológico 1-deamino-8-D-arginina vasopresina (acetato de desmopresina, DDAVP), que incrementa la producción de factor VIII y su liberación por las células endoteliales.

Los pacientes con enfermedad de von Willebrand tienen una deficiencia combinada de factor VIII y factor von Willebrand (FvW), la que produce disfunción de la agregación plaquetaria. Los episodios de sangrado de ligeros a moderados en estos pacientes se tratan generalmente con DDAVP. En pacientes con enfermedad de von Willebrand severa con sangrado, se emplea inicialmente la transfusión de crioprecipitado, ya que el DDAVP, en raras ocasiones, logra llevar los niveles del factor VIII a los niveles hemostáticos en estos casos, y el concentrado de factor VIII comercial no contiene suficiente FvW de alto peso molecular funcional. Algunos concentrados de factor VIII de pureza intermedia, sin embargo, contienen cantidades variables de FvW de alto peso molecular.

Los sangrados en pacientes con concentraciones significativas de inhibidores de factor VIII (anticuerpos) se tratan con métodos alternativos como: factor VIII porcino, concentrado de factor IX (que contiene algunos factores de la coagulación activados), complejo de coagulación antiinhibidores (factores de la coagulación activados) o plasmaféresis seguida de la administración de altas dosis de concentrado de factor VIII.

**Concentrado de factor IX.** Es un producto liofilizado obtenido de mezclas de plasma con el uso del método de fraccionamiento de Cohn. Además de factor IX, contiene los factores II, VII y X. Se administra por vía intravenosa en pacientes con deficiencia congénita de factor IX (hemofilia B) con episodios de sangrado, pero es también útil en aquellos pacientes con deficiencia congénita de los factores VII y X. Se administra también a pacientes con hemofilia A e inhibidores. Debido a que contiene factores de la coagulación activados, el concentrado de factor IX puede provocar CID en pacientes con enfermedad hepática severa, en quienes la producción de antitrombina es inadecuada.

**Complejo de coagulación antiinhibidor.** Es un producto liofilizado, obtenido de mezclas de plasma con el uso del método de fraccionamiento de Cohn. Contiene factores de la coagulación dependientes de la vitamina K activados (II, VII, IX, X) y sus precursores, así como proteínas generadoras de quininas.

Este complejo se emplea para el tratamiento del sangrado en pacientes con altos niveles de inhibidores de factor VIII, ya que, debido a la gran cantidad de factores de la coagulación activados que contiene, puede provocar la coagulación sin la intervención del factor VIII. Debe usarse con precaución en la enfermedad hepática y en el estado hipertrombótico.

## GAMMAGLOBULINA

La gammaglobulina inmune (IgG inmune) es una solución o una preparación liofilizada que contiene muchos de los Acs presentes en la sangre humana. Se prepara a partir de una gran mezcla de plasma humano con el uso del método de fraccionamiento de Cohn y existe en el mercado en la forma para administración intramuscular (i.m.) e intravenosa (i.v.). Al menos el 90 % de su contenido es IgG, aunque puede contener pequeñas cantidades de IgA, IgM y otras proteínas del plasma. La vida media de la IgG inmune en el torrente sanguíneo fluctúa entre los 18 y 35 días, en dependencia de la preparación. La IgG inmune intramuscular no puede administrarse por vía intravenosa, debido a que las moléculas de agregados de IgG pueden activar el sistema del complemento y producir *shock* anafiláctico.

La IgG inmune se emplea para la reposición de las gammaglobulinas en inmunodeficiencias con déficit en la producción de estas, lo que se traduce en infecciones recurrentes, entre ellas, la inmunodeficiencia variable común, la agammaglobulinemia, el síndrome de Wiskott-Aldrich y la inmunodeficiencia combinada severa. La solución intravenosa se emplea en aquellos pacientes que no toleran las inyecciones intramusculares debido a la tendencia al sangrado o por presentar una pequeña masa muscular.

La IgG inmune intravenosa a altas dosis se emplea para bloquear el sistema fagocítico mononuclear en algunas enfermedades autoinmunes como la púrpura trombocitopénica autoinmune. Debe infundirse lentamente, ya que la infusión rápida puede causar eritema facial, taquicardia, hipotensión y anafilaxia.

Existen también IgG hiperinmunes específicas para proveer inmunidad pasiva en determinadas situaciones como las de la hepatitis B, tétanos, varicela zoster, sarampión y la gammaglobulina anti-RhD inmune.

## TRANSFUSIÓN SANGUÍNEA AUTÓLOGA

La transfusión sanguínea autóloga es aquella en la que se transfunden los propios componentes sanguíneos del individuo. Su principal propósito es evitar los riesgos asociados con la transfusión sanguínea alogénica en aquellos casos que la requieran, también es útil en pacientes con grupos sanguíneos raros o con múltiples Acs antieritrocitarios.

### VENTAJAS DE LA TRANSFUSIÓN SANGUÍNEA AUTÓLOGA

Algunas de las ventajas del empleo de las transfusiones autólogas son:

1. Evitan la transmisión de enfermedades infecciosas adquiridas por medio de la transfusión de sangre.
2. Evitan los efectos inmunológicos de la transfusión sanguínea alogénica.
3. Ayudan al suministro de sangre.
4. En algunas circunstancias, son la única fuente de una transfusión sanguínea compatible y segura.
5. Estimulan la eritropoyesis.
6. La anemia inducida por la autodonación puede ser beneficiosa, ya que permite mejorar el flujo sanguíneo capilar.

Sus detractores afirman que la transfusión sanguínea alogénica es tan segura en la actualidad, que no se justifica el costo de la transfusión sanguínea autóloga. Se basan para ello en los bajos índices de reacciones adversas conocidas a la transfusión, y en el mayor costo de la transfusión sanguínea autóloga (una unidad de sangre autóloga por predepósito cuesta el doble que una de sangre alogénica).

### TIPOS DE TRANSFUSIÓN SANGUÍNEA AUTÓLOGA

Existen 3 tipos de transfusión sanguínea autóloga: predepósito, hemodilución normovolémica y recuperación intraoperatoria de sangre. Los tres métodos no son excluyentes entre ellos y, de hecho, debe establecerse una estrategia individual para cada paciente de acuerdo con sus necesidades.

La transfusión sanguínea autóloga debe practicarse con el consentimiento del paciente, el cual debe ser informado de sus riesgos y ventajas.

#### Transfusión sanguínea autóloga de predepósito

**Indicaciones.** Debe valorarse este tipo de transfusión sanguínea autóloga en aquellos pacientes que se

van a someter a cirugía electiva, con una alta probabilidad de necesitar transfusión de sangre y que no tengan contraindicaciones para el empleo de este método. La edad no es un factor limitante, aunque no debe practicarse en niños con peso menor que 25 kg. En los pacientes con peso menor que 50 kg, la recolección de sangre debe hacerse en volúmenes de hasta 250 mL. Debe cuidarse de no extraer en cada donación, un volumen mayor del 12 % del volumen sanguíneo total.

**Contraindicaciones.** No deben seleccionarse para este proceder aquellos pacientes que, con la remoción del 10 al 12 % de su volumen sanguíneo, puedan presentar trastornos circulatorios. Constituyen contraindicaciones para la práctica de este proceder, las enfermedades cardiovasculares severas, en especial la estenosis aórtica, la angina severa, enfermedad del tronco de la coronaria izquierda, enfermedad cardiovascular cianótica y la hipertensión no controlada. También constituyen contraindicaciones la epilepsia, el embarazo complicado con deficiente flujo placentario o retardo del crecimiento intrauterino (por ejemplo: hipertensión, preeclampsia y diabetes).

La hemoglobina del paciente, antes de cada donación, debe ser superior a los 110 g/L.

No deben utilizarse para transfusión sanguínea autóloga de predepósito los pacientes con infecciones bacterianas.

**Riesgos.** Los efectos adversos de la donación de sangre incluyen: la posibilidad de contaminación bacteriana de la unidad de sangre y los errores humanos en la administración de la unidad.

**Metodología.** Ante todo, deben determinarse las unidades de sangre necesarias, obtener la sangre dentro de las 5 semanas previas a la intervención quirúrgica, con intervalos interdonación que fluctúan entre 72 horas (en los Estados Unidos) y 1 semana (en Inglaterra), hasta obtener 4 unidades de sangre que se almacenan a 4 °C hasta 35 días. La última donación debe realizarse, como mínimo, 72 horas antes de la intervención.

Además, debe administrarse hierro oral al paciente.

Las bolsas de sangre autóloga deben tener etiquetas en las que se consigne el carácter autólogo de la donación. No es recomendable emplear esta sangre para transfusión sanguínea alogénica, ya que los riesgos son mayores que con el uso de sangre de donantes sanos.

En los casos en que se desee conservar la sangre por largos períodos, por ejemplo en aquellos pacientes con grupos sanguíneos raros o múltiples Ac, puede almacenarse congelada en nitrógeno líquido por varios años.

La sangre se obtendrá según los mismos principios de la donación de sangre convencional y los estudios

que se van a realizar deben incluir el grupo ABO y Rh D, así como las pruebas de pesquisa virológica, si existen posibilidades de que luego esta sangre tenga uso para transfusión sanguínea alogénica.

La transfusión sanguínea se practica de forma convencional.

### **Recuperación de sangre en el período periquirúrgico**

La recuperación de sangre quirúrgica consiste en la aspiración de esta del campo quirúrgico y su posterior transfusión al paciente. Antes de transfundirse, la sangre obtenida será filtrada o lavada antes para eliminar fosfolípidos, complemento activado, detritus quirúrgicos y activadores hísticos del sistema de la coagulación.

La transfusión sanguínea puede realizarse por métodos manuales o automatizados. En el método manual se emplean dispositivos para la recolección de sangre, se filtra y se reinfunde. En el método automatizado, la sangre es obtenida por un catéter de succión, centrifugada, filtrada y lavada con solución salina fisiológica y se obtienen eritrocitos resuspendidos en solución salina para la reinfusión.

Este método es valioso en intervenciones quirúrgicas ortopédicas y de la cavidad torácica, no así en intervenciones en que la sangre pueda contaminarse con materia intestinal, células malignas o líquido amniótico.

Las ventajas consisten en que se administran eritrocitos frescos con buena capacidad transportadora de oxígeno, se evitan los riesgos de acidosis e hipercaliemia de la transfusión sanguínea masiva y los niveles de hemoglobina libre son menores (en el método automatizado).

Las desventajas radican en que con el método automatizado se requieren operadores entrenados y los equipos son caros. En el método manual, la sangre no se lava y puede contener detritus celulares, exceso de anticoagulante, hemoglobina libre y leucocitos activados, que pueden llevar a problemas fisiológicos si el volumen de sangre reinfundida es grande.

Con la combinación de los métodos de hemodilución y recuperación de sangre quirúrgica se estima que se puedan realizar del 40 al 50 % de las intervenciones quirúrgicas con el uso de sangre autóloga.

### **Hemodilución normovolémica**

La hemodilución normovolémica se emplea cuando se espera una pérdida quirúrgica de sangre de alrededor del 20 % del volumen sanguíneo. Los criterios de selección del paciente y los requisitos son similares a los mencionados en el método de predepósito.

En este método, el paciente donará la sangre o sus componentes en el período preoperatorio. En el caso de la donación de sangre total, el volumen extraído será reemplazado con soluciones cristaloides (3 volúmenes de solución salina normal por cada uno de sangre total) o coloides para mantener la normovolemia.

La extracción se realizará de la forma descrita en el predepósito, se podrán extraer hasta 3 unidades de sangre en un período corto, de forma ideal bajo la supervisión y monitoreo del anestesista, de inmediato antes del acto quirúrgico. El hematócrito final puede ser hasta del 20 %.

La bolsa de sangre debe rotularse con los datos del paciente y especificar que es sangre solo para uso autólogo carente de pesquisa. La bolsa puede retenerse junto al paciente hasta 6 horas a temperatura ambiente.

Las ventajas de esta forma de transfusión sanguínea son:

1. La sangre perdida durante la intervención quirúrgica tiene un bajo hematócrito.
2. La posibilidad de la suspensión de la intervención quirúrgica en este momento es casi nula.
3. La sangre obtenida es fresca, contiene plaquetas activas, con niveles normales de factores de la coagulación y de 2,3 DPG.
4. Permanece con el paciente para su inmediata reinfusión al final de la intervención quirúrgica o cuando se ha asegurado la homeostasis, lo que minimiza los riesgos de error en la selección de la unidad de sangre que se ha de administrar.
5. El costo es mínimo en el caso de la obtención de sangre total.

Las desventajas de este método de transfusión sanguínea son:

1. Si no se logra una adecuada hemodilución, la sangre perdida en el acto quirúrgico no tendrá un hematócrito bajo.
2. El procedimiento alarga el período en el salón prequirúrgico.

## **AFÉRESIS**

La hemaféresis es el procedimiento por medio del cual se extrae determinado volumen de sangre total de un individuo, se anticoagula, se separa en sus componentes, se retienen los componentes deseados y se reinfunden al donante los restantes. Este procedimiento se emplea para obtener componentes aislados para transfusión



sanguínea (plaquetas, granulocitos, plasma y células progenitoras) o para remover elementos patológicos o normales que están en exceso en la sangre, tales como: células, factores plasmáticos, inmunocomplejos, etc. La denominación del proceder variará según el componente obtenido: se denominará plasmaféresis a la obtención de plasma y citoféresis a la de componentes celulares; según el tipo de componente celular: leucoaféresis, tromboaféresis y eritrocitoaféresis.

El procedimiento de aféresis puede realizarse de forma manual o automatizada; para este último fin existen máquinas procesadoras de sangre. Estas máquinas pueden separar los componentes con el empleo de centrifugación (por la densidad diferencial de los componentes, con el empleo de diferentes fuerzas de gravedad) o membranas filtrantes (la separación se logra debido a las diferentes medidas de los poros) con sangre bajo presión. La aféresis automatizada requiere de un buen acceso venoso, con un flujo sanguíneo de 50 a 100 mL/min.

Las máquinas procesadoras de sangre pueden operar con flujo sanguíneo discontinuo o continuo. Con las máquinas de flujo discontinuo es necesario extraer determinado volumen de sangre, separar los componentes, extraer el deseado, reinfundir los restantes y una vez concluido el proceso, iniciar un nuevo ciclo. Algunas de las máquinas pueden operar con una sola vena, por lo que suelen ser más útiles para la extracción en donantes, pero tienen la desventaja de ser más lentas y mantener un mayor volumen de sangre extracorpórea (por lo general más de 500 mL). Las máquinas Haemonetic pertenecen a este grupo. Por su parte, los sistemas que emplean flujo continuo realizan todo el proceso de forma continua, por lo que requieren un menor volumen de sangre extracorpórea (200 mL), son por lo general, multipropósito, utilizan 2 venas (una para la extracción y otra para la reposición) y son más rápidos. Entre ellos se encuentran la máquina Cobe espectra y la Fenwal CS-3000.

Todas las máquinas procesadoras modernas cuentan con aditamentos de seguridad, tales como: sensores de alarma de presión, microfiltros, detectores de aire, bombas con alarmas y sensores para presión de filtración o velocidad de centrifugación, en dependencia del sistema empleado.

## OBTENCIÓN POR AFÉRESIS DE COMPONENTES DE LA SANGRE

Los procedimientos de aféresis consumen mayor tiempo que el de una donación convencional y tienen algunos riesgos adicionales.

La donación de plasma por aféresis suele emplearse en donantes útiles para la obtención de gammaglobulinas hiperinmunes. El volumen de extracción y la frecuencia de esta varía en los diferentes países. En Cuba, las cifras recomendadas son de 600 mL por donación, intervalos mínimos de una semana entre donaciones y volumen extraído máximo de 12 L por año.

La tromboaféresis tiene una duración aproximada de 2 horas. Los donantes por aféresis requieren los mismos estudios de los donantes convencionales y pueden necesitar otros adicionales. Los requerimientos de los estándares de la Asociación Americana de Bancos de Sangre (AABB) establecen que el 75 % de las plaquetas obtenidas por aféresis deben contener, al menos,  $3 \times 10^{11}$  plaquetas y que todas las unidades tengan un pH mayor que 6, al máximo tiempo de almacenamiento. El donante de plaquetas por aféresis pierde más plaquetas, pero casi la misma cantidad de plasma que un donante de sangre total (aproximadamente 250 mL). La pérdida de eritrocitos cuando se emplean sistemas de flujo continuo es de casi 3 mL, por lo que el factor limitante en la frecuencia de las aféresis es la producción de plaquetas por el donante. Después de una donación de plaquetas, el recuento de este elemento puede disminuir hasta el 50 %; de manera consecuente, los donantes con recuentos inferiores a  $150 \times 10^9$  deben ser rechazados. El recuento plaquetario preaféresis suele recuperarse en 24 horas. Los estándares de la AABB recomiendan un intervalo mínimo de 48 horas entre las tromboaféresis; otros estándares sugieren no remover más de 1 000 mL de plasma y no más de 25 mL de eritrocitos en una semana. En donantes frecuentes debe determinarse cada 4 meses la electroforesis de proteínas séricas o la cuantificación de los niveles de IgG e IgM. La pérdida de eritrocitos es mayor en los sistemas de flujo discontinuo, puede ser de 20 a 30 mL por procedimiento. La FDA (*Food and Drug Administration*) sugiere que los procedimientos de plaquetaféresis se realicen como mínimo cada 48 horas, 2 veces a la semana y 24 veces al año (FDA memorándum, 7 de octubre de 1988). Los donantes de plaquetas por aféresis que vayan a ser utilizadas en un único receptor, no deben haber ingerido aspirina, piroxicam u otros inhibidores de la agregación plaquetaria en los tres días previos a la donación.

El proceso de leucoaféresis tiene una duración aproximada de 2,5 horas. Para lograr un mínimo de  $10^{10}$  células, se le deben administrar corticoesteroides al donante, algunas horas antes de la donación, para aumentar el recuento entre 8 y  $10 \times 10^9/L$ . Estos donantes, además, están expuestos al hidroxietilalmidón necesario para separar los eritrocitos de los granulocitos.

Aunque la vida media de los granulocitos en el torrente sanguíneo es de 7,5 horas, debido al volumen de plasma recolectado, se recomienda mantener un intervalo de 48 horas entre cada proceder.

Este proceder se emplea de manera rutinaria en la actualidad, para la obtención de células progenitoras hematopoyéticas periféricas, como alternativa al trasplante de médula ósea, tanto autólogo como alogénico. En la actualidad, es posible la manipulación *ex vivo* de estas células, y lograr un producto enriquecido en células progenitoras CD3 y CD4, y su expansión con el empleo de un conjunto de citocinas.

También se están realizando ensayos clínicos de inmunoterapia adoptiva, con el uso de linfocitos T activados y/o células dendríticas obtenidas por citaféresis, y estudios de transferencia génica con el uso de células progenitoras.

La fotoféresis extracorpórea de los linfocitos, con el empleo de *psoralens* fotorreactivo y luz ultravioleta, se está investigando en el tratamiento del linfoma cutáneo de células T, en la enfermedad de injerto contra huésped y en el rechazo al trasplante.

Los donantes de aféresis están expuestos a los mismos efectos adversos de los donantes por métodos convencionales, pero pueden presentar de manera adicional:

1. Escalofríos debido a la rápida reinfusión de componentes o expansores de volumen a temperatura ambiente. Para evitar este efecto, debe realizarse una infusión lenta, emplear calentadores sanguíneos o cubrir al donante con frazadas.
2. Toxicidad por citrato, debido a la reinfusión de plasma citratado (en las citaféresis), que produce hipocalcemia con síntomas de parestesias, espasmo carpopedal, o tetania. El tratamiento consiste en la administración de calcio por vía oral o gluconato de calcio por vía intravenosa.
3. Reacciones alérgicas al hidroxietilalmidón (en las leucoaféresis). El tratamiento consiste en la administración de antihistamínicos.

## AFÉRESIS TERAPÉUTICA

La aféresis terapéutica es la remoción de uno de los factores celulares o plasmáticos de la circulación de un individuo con fines terapéuticos:

1. Eritrocitaféresis: en el sentido estricto de la palabra puede incluir la simple venisección, o la exanguinotransfusión. Esta última incluye la reposición de los eritrocitos extraídos por eritrocitos alogénicos normales. Esta forma de citaféresis se utiliza desde hace muchos años en el tratamiento de la policitemia.

2. Trombocitaféresis: está indicada para disminuir el recuento de plaquetas, de forma rápida, en pacientes con trombocitosis esencial o mielofibrosis con recuentos plaquetarios mayores de un millón por microlitro. El propósito fundamental es prevenir el desarrollo de estados trombóticos antes que la quimioterapia convencional controle la producción de plaquetas, lo que demora de 2 a 3 semanas por lo general. Una adecuada corrección del recuento de plaquetas, requiere casi siempre, de dos o más procedimientos consecutivos o en días alternos. La trombocitosis asintomática no requiere la remoción de plaquetas a menos que el paciente tenga un tiempo de sangrado prolongado y se vaya a someter a una intervención quirúrgica. La tromboaféresis mantenida en enfermedades crónicas no es efectiva.
3. Leucoaféresis: la leucoaféresis está indicada en varias formas de leucemia cuando el recuento de leucocitos es mayor que  $100 \times 10^9/L$ . Una cifra de leucocitos elevada en exceso, promueve leucoestasis con oclusión vascular en la microcirculación, la que puede resultar en anormalidades neurológicas, episodios trombóticos, disfunción pulmonar y priapismo. Se piensa que el fenómeno de la leucoestasis puede agravarse con el inicio de la quimioterapia, por lo que la leucoaféresis debe realizarse antes de iniciarla. La leucoaféresis puede reducir, de manera rápida, la cifra de leucocitos y la viscosidad sanguínea y evitar las complicaciones neurológicas y respiratorias, así como aumentar la eficacia de la quimioterapia en pacientes con leucemia mieloide aguda. Un tratamiento a largo plazo para mantener bajas las cifras de leucocitos, no es necesario.
4. Plasmaféresis/recambio plasmático: la plasmaféresis es la remoción selectiva de pequeños volúmenes de plasma (menor que 600 mL) que no requieren líquido de reemplazo. El recambio plasmático, por su parte, es la remoción de grandes volúmenes de plasma que, por tanto, requiere la administración de un líquido de reemplazo. La finalidad de este proceder es remover o reducir al mínimo aquellos constituyentes del plasma que causan o agravan una enfermedad (tabla 6.32).

Para lograr un efecto beneficioso, el recambio plasmático debe lograr remover el elemento deseado en cantidades apreciables; la remoción debe ser más rápida que la reposición en el espacio vascular y la gravedad de la enfermedad de base debe justificar los riesgos del recambio.

**Tabla 6.32** Funciones del recambio plasmático

Remoción de	Ejemplos
Aloanticuerpos	Anti HPA-1a (púrpura postransfusional)
Autoanticuerpos	Enfermedad de Goodpasture, miastenia <i>gravis</i>
Inmunocomplejos	Lupus eritematoso sistémico
Componentes normales en exceso	Paraproteínas (mieloma múltiple) hipercolesterolemia familiar
Toxinas unidas a proteínas y drogas	Envenenamiento
Antígenos	Lupus eritematoso sistémico inducido por drogas
Reposición de inmunoglobulina normal	Factores en PTT y síndrome urémico hemolítico

La mayoría de las enfermedades que requieren este proceder son de naturaleza inmunológica. En ellas es necesario remover un antígeno, un anticuerpo (IgG o IgM) o un inmunocomplejo. Para prevenir el rebote por la síntesis del elemento debe combinarse el recambio plasmático con la administración de inmunosupresores. En otras ocasiones existe una deficiencia o defecto de algún componente plasmático, que debe ser reemplazado de forma efectiva con grandes volúmenes de plasma fresco congelado; un ejemplo de esta situación lo constituye la púrpura trombocitopénica trombótica (PTT).

El tratamiento de recambio plasmático se ha aplicado a numerosas enfermedades, pero este es más exitoso cuando existe una sustancia patogénica medible, bien caracterizada, que causa daño hístico u orgánico reversible o prevenible con su disminución. En algunas enfermedades, como el síndrome de Guillain-Barré, el empleo de altas dosis de IgG intravenosa, es más exitoso que el tratamiento por plasmaféresis; sin embargo, aquellos casos resistentes al tratamiento con IgG intravenosa suelen beneficiarse con la plasmaféresis (tabla 6.33).

El desarrollo tecnológico en este campo incluye el empleo de sustancias adsorbentes como la proteína A de estafilococo para la IgG, el ADN para los inmunocomplejos del lupus eritematoso sistémico, sefariosa-antilipoproteínas de baja densidad para la hipercolesterolemia. Estos procedimientos permiten la remoción total de plasma al remover solo el elemento deseado. Otra alternativa es el empleo de una cascada de filtración con poros de diferentes medidas, en la cual el plasma obtenido pasa a través de un segundo filtro que retiene macromoléculas, pero permite el paso de la albúmina.

En cuanto al volumen y frecuencia del recambio plasmático: si se remueve más de 1 L de plasma, se necesita reponer con albúmina para evitar la caída de la presión osmótica coloidal vascular. La selección del líquido de reemplazo depende de la conveniencia, la disponibilidad, el volumen removido y el costo de este. La sustitución parcial con solución salina al 0,9 % o coloides (como el hidroxietilalmidón y la gelatina), o ambos, es recomendable.

El volumen que se debe extraer y la frecuencia de los recambios, dependen de la fisiopatogenia de los factores indeseables. La remoción excesiva de algunos componentes plasmáticos normales puede, además, provocar efectos secundarios indeseados que requieren terapia de reemplazo. Las principales proteínas del plasma que se afectan con la remoción de grandes volúmenes de plasma son la albúmina, las inmunoglobulinas, los factores del complemento, el fibrinógeno y otros factores de la coagulación. Una extracción de plasma de 40 mL/kg puede reducir las concentraciones de estos elementos entre el 50 y el 60 %, si el plasma no es reemplazado. No obstante, la mayoría de los componentes suelen normalizarse de 24 a 48 horas. La eficiencia en la remoción de Acs es a veces menor que la deseada, debido a la rápida síntesis durante la respuesta inmune.

Con la extracción de un volumen plasmático debe removerse entre el 63 y el 65% de la sustancia intravascular no deseada. Con la remoción de 2 volúmenes plasmáticos, la reducción es del 85 %, pero la eficacia de la remoción depende de:

1. La distribución intravascular/extravascular de la sustancia.
2. El recambio transcapilar entre los espacios intravascular y extravascular.

**Tabla 6.33** Enfermedades en las que el recambio plasmático es generalmente beneficioso

Enfermedad	Factores patogénicos que se deben remover
Síndrome de hiperviscosidad (macroglobulinemia de Waldestrom, mieloma múltiple)	Inmunoglobulina monoclonal
Miastenia <i>gravis</i> aguda	Anticuerpos contra receptores de acetilcolina
Síndrome de Goodpasture	Anticuerpos antimembrana basal glomerular
Síndrome de Guillain-Barré agudo	Anticuerpos antigangliósidos
Crioglobulinemia	Crioglobulinas
Púrpura trombocitopénica trombótica	Desconocido
Hemofilia con inhibidores	Anticuerpos anti-factor VIII
Enfermedad de Refsum	Ácido pitánico
Anemia hemolítica por aglutininas frías	Aglutininas frías
Envenenamientos	Toxinas
Drogas	Por ejemplo: metilparatión, digoxina

3. El ritmo de catabolismo de la sustancia.
4. El ritmo de síntesis de la sustancia.

El recambio plasmático es más efectivo en la remoción de IgM, que es de predominio intravascular, que de la IgG, que se encuentra tanto en el espacio intravascular como en el extravascular. Por lo que, cuando se remueven cantidades importantes de IgG del espacio intravascular, la IgG hística pasa al espacio intravascular. La extracción de IgG provoca, además, un fenómeno de rebote por aumento de su síntesis. En estos casos debe considerarse el empleo de inmunosupresores.

Lo usual es remover un volumen igual a 1,5 % el volumen plasmático calculado en cada procedimiento (alrededor de 3 a 4 L) y repetirlo a diario o en días alternos hasta lograr la reducción deseada, ya que la extracción de volúmenes mayores no aumenta la eficacia del proceder. El tratamiento efectivo de la enfermedad de base (por lo general con inmunosupresores) previene la producción adicional del elemento anormal. Solo en raras ocasiones es necesario reponer Igs para evitar un aumento de la susceptibilidad a las infecciones. En estos casos puede administrarse IgG intravenosa como suplemento.

Los líquidos de reemplazo más utilizados son la albúmina al 5 % y la solución salina fisiológica. Ninguna de estas soluciones contiene factores de la coagulación,

por lo que después de varios días de tratamiento se deben determinar los niveles de estos, así como los de potasio y calcio. Debe evitarse el empleo del plasma fresco congelado (PFC) como líquido de reemplazo, debido a la alta incidencia de efectos secundarios durante la infusión y el riesgo de transmisión viral. La excepción la constituyen los pacientes con púrpura trombocitopénica trombótica, en la que el PFC es el líquido de reemplazo de elección. No obstante, existen evidencias de que en estos casos puede ser más efectivo el uso de sobrenadante de crioprecipitado o de plasma tratado con solvente-detergente (debido a la ausencia de multímeros del factor de von Willebrand).

### Complicaciones de las aféresis

La aféresis es relativamente segura; sin embargo, en ocasiones pueden producirse complicaciones por el acceso vascular, problemas en el procedimiento o efectos debidos al líquido de reemplazo utilizado.

Entre los efectos debidos al acceso vascular puede observarse: daño vascular resultante en trombosis, perforación, infección, producción de fistulas y gangrena.

En relación con el líquido de reemplazo empleado puede observarse hepatitis viral, reacciones anafilácticas y toxicidad por citrato con el empleo de PFC,

desbalance electrolítico, hipoproteinemia, hemorragia e infección bacteriana.

Entre las reacciones provocadas por problemas en el proceder pueden citarse las crisis vasovagales, la hipovolemia, la hipervolemia por sobrecarga, la hemólisis mecánica y la toxicidad por citrato.

La mortalidad reportada es de 3 por 8 000 procedimientos, sobre todo cuando se emplea PFC, por distrés respiratorio.

## EXANGUINOTRANSFUSIÓN

La exanguinotransfusión consiste en la extracción de sangre total a un paciente y su reposición con sangre alogénica compatible, de manera que se logre un recambio normovolémico rápido.

### INDICACIONES DE LA EXANGUINOTRANSFUSIÓN

Las principales indicaciones de la exanguinotransfusión son:

1. La enfermedad hemolítica del recién nacido por incompatibilidad materno-fetal ABO, Rh y otras.
2. La anemia drepanocítica.
3. Las hiperbilirrubinemias no inmunológicas del recién nacido.
4. Intoxicaciones o envenenamientos: barbitúricos, nitritos, cloruros, salicilatos y otros.
5. Coagulación intravascular diseminada (CID).
6. Algunas sepsis fulminantes.
7. Casos graves de anemias hemolíticas autoinmunes.

En la exanguinotransfusión se emplean métodos manuales o automatizados. Estos pueden ser continuos o discontinuos:

1. En la enfermedad hemolítica del recién nacido: los objetivos de la exanguinotransfusión en esta entidad son: corregir la anemia, disminuir la bilirrubinemia, remover los eritrocitos sensibilizados y remover los Ac maternos circulantes. Constituye una indicación inmediata en recién nacidos hidróticos o con anemia severa; debe indicarse de forma temprana ante un aumento de la bilirrubina y puede emplearse como prevención del kerníctero. Selección de la sangre que se va a emplear: en la

incompatibilidad ABO deben administrarse eritrocitos de grupo O, Rh compatibles y en la incompatibilidad Rh, eritrocitos ABO compatibles, Rh negativos. En ambos casos, los eritrocitos deben tener menos de 5 días de extraídos para evitar una sobrecarga de potasio. De forma ideal, para lograr una mayor seguridad transfusional, la sangre debe ser desleucocitada, CMV negativa e irradiada. Las pruebas cruzadas de compatibilidad pueden realizarse con el suero materno, el suero del recién nacido o un eluato de los eritrocitos del recién nacido.

2. En la anemia drepanocítica: los objetivos de la exanguinotransfusión en los pacientes con anemia drepanocítica son: aumentar la capacidad transportadora de oxígeno, remover el mayor número de células drepanocíticas y diluir las restantes; con ello se logra aumentar el flujo sanguíneo. La exanguinotransfusión tiene en estos pacientes varias ventajas en relación con la transfusión sanguínea simple, entre ellas: permite un ajuste rápido y simultáneo del hematócrito y la Hb S; existe un menor riesgo de aumentar la viscosidad y el hematócrito; al disminuir la Hb S, mejora el estado reológico y aumenta el transporte de oxígeno, lo que produce una rápida mejoría clínica.

La exanguinotransfusión está indicada en el tratamiento y prevención de eventos que amenazan órganos o la vida y cuando se requiere una rápida corrección de la anemia sin aumento del volumen sanguíneo. Entre ellos se cuentan: la falla multiorgánica, el síndrome torácico agudo, los accidentes cerebrovasculares, el priapismo refractario, la falla hepática, la sepsis severa, la vasooclusión de las arteriolas de la retina, al inicio de un régimen de politransfusión, antes de realizarse una angiografía de contraste y previo a la cirugía mayor si existe riesgo de hipoxia.

Los eritrocitos seleccionados deben ser Hb S negativos, de menos de 7 días, fenotipados para los sistemas Rh y Kell y leucodepletados. En casos de fenotipos raros puede requerirse sangre congelada de donantes controlados. El volumen de eritrocitos para transfundir debe calcularse teniendo en cuenta el volumen extraído, el hematócrito inicial del paciente y el hematócrito de la bolsa (este último es, por lo general, del 70 %), mediante la fórmula siguiente:

$$\text{Volumen extraído} = \frac{\text{Hematócrito inicial} \times \text{Volumen de eritrocitos para transfundir}}{\text{Hematócrito de la bolsa}}$$

En las restantes indicaciones, la exanguinotransfusión tiene como finalidad la remoción de tóxicos o Acs plasmáticos o la remoción de eritrocitos dañados.

## COMPLICACIONES DE LA EXANGUINOTRANSFUSIÓN

La exanguinotransfusión puede presentar todas las complicaciones de las donaciones y las transfusiones de sangre y, en especial, en pacientes con anemia drepanocítica, aloinmunización, reacciones hemolíticas retardadas, reacciones febriles, infecciones virales y sobrecarga de hierro.

## TRANSFUSIÓN SANGUÍNEA EN SITUACIONES ESPECIALES

### TRANSFUSIONES SANGUÍNEAS DIRIGIDAS

Después del conocimiento público del riesgo de la adquisición del VIH por medio de la transfusión de sangre y sus componentes, han aumentado las solicitudes de transfusiones de sangre dirigidas. En este tipo de donación, el paciente solicita sangre obtenida de manera directa, a partir de familiares o amigos, pues asume que esta es más segura que la obtenida a partir de donantes voluntarios de sangre. Esta presunción es falsa por diferentes razones: el donante dirigido tiene mayor presión para donar que un donante anónimo ya que, de negarse, podría levantar sospechas acerca de sus condiciones para hacerlo; la presión logística que este tipo de donación entraña, puede ocasionar errores humanos con mayor facilidad, puede provocar una disminución de la donación altruista voluntaria y se pierde la confidencialidad del donante (por lo que puede estar sometido a reclamaciones o litigios por parte del receptor). La donación dirigida proveniente de donantes familiares, debe ser irradiada para evitar el riesgo de reacción de injerto contra huésped. Una posible ventaja es el efecto psicológico positivo en donantes y receptores.

### TRANSFUSIONES SANGUÍNEAS MASIVAS

Una transfusión de sangre se considera masiva cuando se transfunde una cantidad de sangre equivalente al volumen sanguíneo de un individuo en un período de 24 horas. Es, por lo general, una urgencia médica, producto de un accidente traumático, complicaciones quirúrgicas u obstétricas, o si el paciente presenta hemorragia y *shock* hipovolémico. En determinadas situaciones clínicas como el trasplante hepático, la

transfusión sanguínea masiva es predecible y puede monitorearse de manera adecuada.

La pérdida rápida de grandes volúmenes de sangre afecta la perfusión hística y requiere una corrección de urgencia, una rápida resucitación para mantener el volumen sanguíneo, la capacidad transportadora de oxígeno, la homeostasis, la presión oncótica y la bioquímica sanguínea.

La morbilidad y letalidad en estos casos es alta y por lo general está relacionada con la condición de base que crea la hemorragia. A pesar de los avances logrados en esa área, aún se registran muertes maternas en las que la principal causa es la hemorragia.

### Manejo de la transfusión sanguínea masiva

**Volumen sanguíneo.** El factor más importante en el manejo del *shock* hipovolémico es restaurar el volumen sanguíneo circulatorio tan rápido como sea posible. La hipotensión profunda y prolongada exacerba el daño hístico y orgánico y predispone a la CID. La mortalidad asociada con la transfusión sanguínea masiva aumenta con la duración y severidad del *shock*.

El volumen sanguíneo debe restaurarse, primero, con soluciones cristaloides y coloides sintéticas, tales como dextrano, gelatinas, hidroxietilalmidón o soluciones de albúmina humana.

Cuando la pérdida de sangre excede el 40 % del volumen sanguíneo, deben administrarse concentrados de eritrocitos. Cuando se han transfundido 4 unidades de estos de forma rápida y se esperan más pérdidas, deben administrarse plasma, concentrados de plaquetas y proteínas.

En el momento del diagnóstico debe realizarse un grupo de complementarios de urgencia, entre ellos: hemoglobina, hematócrito, tiempo de protrombina y tiempo parcial de tromboplastina activado; aunque en una situación urgente la falta de los resultados no impide el inicio de la terapia transfusional.

**Transfusión de sangre.** Si se conoce antes el grupo ABO y el Rh del paciente, debe administrársele sangre isogrupo. De no conocerse, debe realizarse el grupo ABO y Rh y, luego, administrar la sangre adecuada. En casos de urgencia extrema, se le administra sangre de grupo O, hasta que se identifique el grupo sanguíneo. En algunos casos puede aplicarse el método de recuperación automatizada de la sangre para reinfusión. La combinación de *shock*, sepsis, daño hístico y transfusión sanguínea masiva está asociada con la producción del síndrome de distrés respiratorio del adulto. Los microémbolos provenientes de leucocitos y plaquetas transfundidas pueden contribuir al desarrollo de estos cuadros clínicos.

**Hemostasia y terapia de los componentes de la sangre.** En individuos sanos, la deficiencia en los factores de la coagulación no suele aparecer hasta que la sangre restituida no excede el 80 % del volumen sanguíneo del individuo. La sangre almacenada sufre una pérdida progresiva de los factores V y VIII, con una disminución de la actividad del factor VIII de aproximadamente el 50 % después del primer día, 30 % después de 5 días y 6 % a los 21 días. La actividad del factor V es del 50 % a los 14 días. La pérdida de los restantes factores no es significativa durante 21 días. La función de las plaquetas se pierde de forma rápida y a las 48 horas casi no existen plaquetas viables funcionantes. Si se emplean concentrados de eritrocitos plasma reducidos, ocurre también una dilución de los factores de la coagulación, la que se potencia con el uso de soluciones cristaloides y coloides.

Un recambio equivalente a 1 volumen sanguíneo deja circulando solo el 35 % de los componentes sanguíneos originales. Un estudio prospectivo en 27 pacientes sometidos a transfusiones masivas, arrojó que las principales causas de sangrado microvascular (ligero sangrado en sábana), fueron la trombocitopenia dilucional (menos de  $100 \times 10^9$  plaquetas/L) en 5 pacientes y la CID en 3 pacientes. La caída de la cifra de plaquetas por debajo de  $100 \times 10^9$ /L solo se observó después de la infusión de 18 unidades de sangre, por lo que las recomendaciones actuales en pacientes adultos sometidos a transfusiones masivas indican realizar un recuento de plaquetas después de la transfusión sanguínea de 15 unidades de sangre (1,5 volúmenes sanguíneos) y esperar por los signos de trombocitopenia antes de transfundir plaquetas. Las plaquetas suelen caer por debajo de  $50 \times 10^9$ /L después de la reposición de 1,5 a 2 volúmenes sanguíneos.

Por lo general, los requerimientos de plaquetas preceden los de PFC o factores de la coagulación específicos. Estos últimos se requieren, casi siempre, después de la sustitución de 2 a 3 volúmenes sanguíneos, lo que se correlaciona con una prolongación del tiempo de protrombina mayor que 2 a 5 segundos el valor superior normal. Debe sospecharse CID aguda cuando los niveles de fibrinógeno caen por debajo de 1 g/dL, el tiempo de protrombina es largo en exceso (mayor que el doble del valor del control) y los niveles de PDF/dímero D están elevados. En estas circunstancias debe administrarse crioprecipitado (10 a 20 unidades) y/o concentrado de fibrinógeno. Las necesidades de terapia adicional deben valorarse de acuerdo con la respuesta clínica y de laboratorio.

**Capacidad transportadora de oxígeno.** Las soluciones anticoagulantes que se usan en la actualidad (por ejemplo, CPD-adenina) garantizan un alto nivel de 2,3 DPG y, por tanto, de transporte de oxígeno en los

concentrados de eritrocitos hasta los 14 días de conservación, por lo que la reducción importante de capacidad transportadora solo es relevante en pacientes con enfermedad cardíaca o anemia severa. Es recomendable, no obstante, emplear sangre lo más fresca posible.

**Disturbios metabólicos.** Los pacientes en *shock* hemorrágico, a los que se les restaura el volumen sanguíneo de forma rápida y en los cuales la reperfusión de tejidos y órganos restaura rápidamente la capacidad regulatoria del pH, eliminan los ácidos orgánicos producidos como metabolitos intermediarios durante el *shock*, por lo que no es necesaria la administración de bicarbonato de sodio como se acostumbraba antes. De hecho, muchos pacientes que reciben transfusión sanguínea masiva, en el período postransfusional hacen alcalosis porque metabolizan el citrato sódico contenido en las bolsas de sangre. La hipoperfusión y el *shock* prolongados pueden provocar acidosis, pero el empleo de agentes alcalinizantes debe valorarse por los resultados de laboratorio y no por el número de unidades de sangre transfundidas.

En la transfusión sanguínea masiva rápida es recomendable el uso de gluconato de calcio para evitar la toxicidad por citrato, aunque en los pacientes que no tienen disfunción hepática la eliminación del citrato por el hígado es muy rápida. El uso de calentadores de sangre puede ser útil para evitar la hipotermia producida por la infusión rápida de sangre extraída del refrigerador, pero tiene el inconveniente de enlentecer la transfusión.

La reposición masiva de cristaloides y coloides, sin plasma, puede disminuir la presión oncótica del plasma, lo que a su vez puede contribuir a la producción del síndrome de distrés respiratorio, por lo que es recomendable la administración de albúmina si los niveles de albúmina plasmática descienden de manera significativa.

**Agentes farmacológicos.** La aprotinina, inhibidor de las proteasas de origen bovino, inhibe la actividad de la tripsina, calicreína y plasmina, y puede tener un efecto directo en el mantenimiento de la función plaquetaria. Puede ser útil, además, en el tratamiento del sangrado excesivo, no controlable, del período perioperatorio, y debe administrarse por vía intravenosa en dosis de 50 000 a 100 000 U. Otro agente beneficioso en determinadas circunstancias es el ácido tranexámico (inhibidor fibrinolítico) que, a una dosis de 1 g por vía intravenosa de forma lenta, puede controlar el exceso de fibrinólisis primaria y el sangrado después de prostectomía o terapia trombolítica. La aplicación local de goma de fibrina puede ayudar al control del sangrado en las superficies sangrantes. La infusión de DDAVP (análogo de la vasopresina), a razón de 0,4 mg/mL en 100 mL de solución salina normal por vía intravenosa lenta, puede ayudar a aumentar la actividad del factor VIII y de von Willebrand circulante en el sangrado

posoperatorio generalizado. Estos agentes, por sí solos, no resuelven el sangrado, por lo que deben asociarse con la terapia transfusional y el monitoreo hematológico cuidadoso.

La posible estrategia futura incluye el empleo de sangre artificial, sustitutos de plaquetas, factores de la coagulación activados y modificación de las respuestas biológicas.

### Prioridades en la transfusión sanguínea masiva

En la transfusión sanguínea masiva existen prioridades como:

1. Reponer el volumen sanguíneo.
2. Mantener la homeostasis (recuento de plaquetas mayor que  $50 \times 10^9/L$  y mayor que  $100 \times 10^9/L$  si hay peligro de sangrado intracraneal).
3. Optimizar la capacidad de transporte de oxígeno. Mantener la presión venosa central en más de 20 %.
4. Corregir y evitar disturbios metabólicos: hipocalcemia, hipercalcemia, disturbios ácido-básicos, hipotermia.
5. Mantener la presión oncótica del plasma.
6. Investigaciones mínimas en un paciente con *shock* hipovolémico agudo:
  - a) Grupo ABO y Rh D.
  - b) Hb, recuento de plaquetas.
  - c) Tiempo de trombina, tiempo de protrombina.
  - d) Urea y electrolitos.

### TRANSFUSIÓN SANGUÍNEA EN EL BYPASS CARDIOPULMONAR

El *bypass* cardiopulmonar es un sistema esencial para la cirugía a corazón abierto. La sangre venosa heparinizada de los pacientes se recolecta en una cámara a 37 °C en la que se restaura la presión parcial de oxígeno a los niveles de la sangre arterial y se remueve el exceso de oxígeno y de dióxido de carbono, además se bombea de nuevo la sangre al paciente. También, un sistema de aspiración bombea la sangre recuperada de la cavidad torácica y la dirige a la cámara de oxigenación para luego reinfundirla al paciente. En el *bypass* cardiopulmonar, un considerable volumen de sangre se mantiene extracorpóreo (aproximadamente 20 mL/kg de peso corporal del paciente). Esto es compensado con la administración de soluciones cristaloides. La hemodilución producida tiene las ventajas de conservar la sangre y reducir las complicaciones de la transfusión sanguínea. Al final de la intervención, los eritrocitos atrapados en la bomba pueden centrifugarse, lavarse y reinfundirse al paciente. En estos casos también se utilizan las donaciones de sangre autóloga en el período

preoperatorio para su ulterior uso. Debido al empleo de estos dos métodos, se ha logrado una disminución del consumo de sangre alogénica en este tipo de intervención quirúrgica.

En el período posoperatorio inmediato es muy importante el monitoreo del sistema de la coagulación. La administración de PFC casi siempre corrige las anomalías de la coagulación.

En el *bypass* cardiopulmonar suelen ser frecuentes la trombocitopenia transitoria y la trombocitopatía, debido a la exposición de las plaquetas a superficies extrañas. La transfusión de plaquetas debe practicarse en los casos con trombocitopenia y ligero sangrado en sábana.

Los pacientes sometidos a cirugía cardiovascular tienen una mayor predisposición al sangrado que los sometidos a otros tipos de intervenciones quirúrgicas debido a la medicación previa (aspirina, coumadín) y a la práctica de algunos procedimientos previos como la angioplastia coronaria. Además, puede haber una disminución de las plaquetas y de los factores de la coagulación, debido a la hemodilución y por contacto con superficies trombogénicas del equipo de *bypass* cardiopulmonar.

Tal vez la liberación de proteasas juega un papel importante en el consumo de los factores de la coagulación y la disfunción de las plaquetas. De aquí que la aprotinina, inhibidor de la serinoproteasa, que inhibe la actividad de la plasmina y la calicreína, y preserva la adhesividad de las plaquetas, reduce de manera significativa la pérdida de sangre y sus componentes en la cirugía a corazón abierto. La desmopresina, por su parte, tiene un papel variable en la disminución del sangrado en estos casos. La prostaciclina no ha mostrado efectividad en estos casos.

### HEMOTERAPIA NEONATAL

El período neonatal se extiende hasta los 4 meses de edad. Los neonatos enfermos están sujetos a múltiples determinaciones sanguíneas y las pérdidas de sangre por este concepto pueden exceder los 10 mL/día. En el recién nacido (RN) de 1g de peso esto puede representar el 10 % del volumen sanguíneo total y necesitar entonces transfusiones de pequeños volúmenes de sangre para reemplazar la pérdida.

Para el establecimiento de la terapia transfusional en neonatología, se deben tener en cuenta aspectos particulares de la fisiología neonatal como son:

1. Volumen sanguíneo: el volumen sanguíneo de un recién nacido a término (RNAT) es de 85 mL/kg de peso y el de un recién nacido pretérmino (RNPT) puede ser 100 mL/kg de peso.
2. Eritropoyesis fetal y neonatal: la hematopoyesis comienza en el saco vitelino, hacia la mitad de la



gestación. Existe eritropoyesis en el hígado y el bazo. La médula ósea se convierte en el lugar predominante de formación de sangre solo en el último trimestre. La producción de eritrocitos fetales depende del estímulo ejercido por la eritropoyetina, cuya concentración aumenta en caso de hipoxia o anemia fetal. Después del nacimiento, el nivel de Hb se eleva de manera transitoria a las 6 o 12 horas, y disminuye más tarde a 110 g/L entre los 3 y 6 meses. Los RNPT tienen una menor Hb y la caída posnatal es más rápida. Además, la vida media de los eritrocitos fetales y neonatales es más corta (de 70 a 90 días).

3. Niveles de 2,3 difosfoglicerato (2,3 DPG): los factores más importantes que regulan la afinidad de la Hb por el oxígeno son los cambios relacionados con la concentración del 2,3 difosfoglicerato de los eritrocitos y la Hb fetal. Los RN y, aún más, los RNPT que presentan dificultad respiratoria o *shock* séptico, tienen niveles de 2'3 DPG más bajos que los RN sanos. A su vez, la alcalosis e hipotermia aumentan aún más la afinidad de la Hb por el oxígeno, y por lo tanto queda menor cantidad de oxígeno disponible para los tejidos. Por consiguiente, si el volumen de sangre que se va a transfundir representa una parte importante de la volemia del RN, la transfusión de sangre almacenada con niveles bajos de 2,3 DPG puede producirle problemas, por lo que debe transfundirse sangre de menos de 7 días para tener la seguridad de que los niveles son adecuados y de que el oxígeno es liberado a los tejidos.
4. Hipotermia: el RN y en especial el RNPT presenta una marcada labilidad térmica. Esto se debe a su mayor facilidad para perder calor (ya que posee una gran superficie corporal en relación con el peso y una menor cantidad de grasa subcutánea y, por lo tanto, menor aislamiento térmico) y a su limitación para aumentar la producción de calor (determinada por una menor cantidad de grasa parda). Las exanguinotransfusiones en las que se utiliza sangre a temperatura ambiente, pueden hacer descender la temperatura del RN, por lo que algunos autores recomiendan el calentamiento de la sangre que va a usarse en procedimientos que utilizan grandes volúmenes. Para ello debe haber un estricto control de la calidad de este para evitar el peligro de hemólisis por sobrecalentamiento.
5. Problemas metabólicos: la función renal en el neonato es diferente de la de los niños mayores y de la de los adultos, debido a que presentan una disminución de la velocidad de filtración glomerular y de la capacidad de concentración. El niño inmaduro está menos capacitado para mantener la

homeostasis, por lo que puede tener dificultades para excretar potasio, ácidos y calcio. El neonato enfermo tiene una escasa tolerancia a la pérdida de sal, la privación de agua o al comportamiento catabólico. Durante la transfusión sanguínea y después de ella pueden surgir diversas complicaciones metabólicas como: hipoglicemia, acidosis, hipocalcemia e hiperpotasemia.

6. Estado inmunológico: es inmaduro y debe tenerse presente la posibilidad que tienen los RN de desarrollar la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) y su mayor susceptibilidad a las infecciones transmitidas por la sangre.

Por esto, los componentes que se van a transfundir deben estar certificados desde el punto de vista serológico. En relación con el citomegalovirus (CMV), estos deben ser negativos (excepto para los niños de madres CMV positivas). Para lograr esto, se emplean filtros para leucorreducción, que eliminan las células blancas que puedan contener este virus.

La irradiación de los componentes celulares de la sangre es otro aspecto que se debe tener en cuenta para evitar la EICH. Los eritrocitos que se han de transfundir deben ser carentes de Hb S.

Las principales indicaciones de los componentes sanguíneos en el recién nacido son:

1. Sangre total:
  - a) Exanguinotransfusión.
  - b) *Shock* hipovolémico severo.
  - c) Cirugía cardiovascular con circulación extracorpórea.
2. Concentrado de eritrocitos:
  - a) Reemplazo de la pérdida de sangre.
  - b) Descenso progresivo del hematócrito y la hemoglobina.
3. Concentrado de plaquetas:
  - a) Sangrado clínico con recuento de plaquetas menor que  $100 \times 10^9/L$ .
  - b) RN enfermo con recuento plaquetario menor que  $20 \times 10^9/L$ .
  - c) RN normal (sin enfermedad asociada), sin alteración de la función plaquetaria y sin signos de hemorragia clínica, pueden esperarse hasta valores de  $10 \times 10^9/L$ .

La trombocitopenia inmune en este período merece especial atención, ya que el tratamiento hemoterapéutico será diferente en dependencia de si es autoinmune o aloinmune.

La dosis es de 1 unidad de concentrado de plaquetas por cada 10 kg de peso. Los concentrados de plaquetas deberán ser isogrupos ABO con el receptor, para evitar fenómenos de hemólisis. Se administrarán por vía periférica,

ya que se ha observado trombosis y gangrena en aquellos en los cuales se utilizó la vía umbilical.

4. Plasma fresco congelado:
  - a) Hemorragias en pacientes con deficiencia documentada o sospecha de déficit de los factores II, V, VII, IX, X, XI o XII.
  - b) Hemorragias secundarias a deficiencia de vitamina K.
  - c) Hemorragias o procedimientos quirúrgicos en neonatos con enfermedad hepática.
  - d) *Shock* hipovolémico severo.
  - e) Coagulación intravascular diseminada (CID).
  - f) Deficiencia congénita de factor IX.

La dosis de plasma fresco congelado es de 10 a 20 mL/kg de peso corporal.

5. Crioprecipitado (no es frecuente su uso), está indicado en:
  - a) Déficit del factor VIII.
  - b) Déficit del factor von Willebrand.
  - c) Déficit del factor XIII.
  - d) Déficit del fibrinógeno.

La dosis es: 1 unidad de crioprecipitado eleva el nivel de factor VIII en 2 %. La dosis varía en dependencia de la cuantía del sangrado.

6. Concentrado de granulocitos: su uso ha disminuido de manera notable en estos últimos años, debido al mejoramiento de la terapéutica antibiótica y a las reacciones adversas que provocan, las cuales sobrepasan los beneficios esperados. Por tal motivo, son útiles en circunstancias bien definidas:

- a) Infección bacteriana en niños con menos de 2 semanas de nacidos, con recuento de neutrófilos menor que  $3 \times 10^9/L$ .
- b) Infección bacteriana o fúngica diseminada que no responde al tratamiento antibiótico en pacientes con más de 2 semanas de nacido, y recuento de neutrófilos menor que  $0,5 \times 10^9/L$ .
- c) Infección que no responde a los antibióticos y la presencia de un defecto cualitativo de los neutrófilos independiente del recuento.
- d) Existen signos de depleción de los neutrófilos medulares.

La dosis promedio de concentrado de granulocitos es de 10 mL/kg de peso y la velocidad de infusión lenta (4 horas).

En los últimos años, la terapéutica transfusional del RN ha surgido como una especialidad, debido a las características singulares de estos pacientes, por lo que requiere una especial y cuidadosa atención dentro de la organización de los Servicios de Medicina Transfusional.

## TRANSFUSIÓN SANGUÍNEA EN LA ENFERMEDAD HEMOLÍTICA DEL FETO Y DEL RECIÉN NACIDO

La enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido (EHRN) es una afección inmunológica aloinmune, en la cual la sobrevivencia del eritrocito fetal y del recién nacido está acortada, debido a la acción de anticuerpos maternos que pasan a través de la placenta y que son específicos contra antígenos de origen paterno presentes en las células rojas fetales y del recién nacido.

La patogenia de esta enfermedad está basada en la incompatibilidad de grupo sanguíneo materno-fetal. Cuando los eritrocitos fetales poseen antígenos de origen paterno carentes en los eritrocitos de la madre, esto origina el desarrollo de una respuesta inmunitaria en la madre, y el paso de anticuerpos (del tipo IgG) a través de la placenta. Estos anticuerpos se unen a la membrana del eritrocito fetal y facilitan su hemólisis, excepto en la EHRN por ABO (EHRN-ABO), en la que los anticuerpos están preformados.

Los anticuerpos que con mayor frecuencia producen EHRN son los del sistema ABO y Rh, pero se han reportado aloanticuerpos maternos contra otros antígenos eritrocitarios. La EHRN por el sistema Rh (EHRN-Rh) suele ser severa, en particular por el antígeno D, y llegó a tener una incidencia del 18 %. Con la introducción de la inmunoprofilaxis con gammaglobulina anti-D, su incidencia disminuyó mucho, hasta aproximadamente 1 %. Su presencia se debe a:

1. Inmunizaciones producidas durante el embarazo.
2. No administración de gammaglobulina anti-D profiláctica después del parto o aborto de un hijo Rh positivo, u otro evento inmunizante (transfusiones mal compatibilizadas).
3. Administración de una dosis insuficiente de gammaglobulina anti-D para cubrir un gran estímulo antigénico.

### Prevención de la aloinmunización por Rh

Aunque existen algunos antecedentes de prevención de la isoimmunización por anti-D, anteriores a los experimentos de Stern en 1961, la prevención efectiva de la isoimmunización por anti-D no se comenzó hasta los años 1968 y 1969, y hoy se reporta una incidencia del 0,1 al 0,2 %. Se recomienda el empleo de gammaglobulina anti-Rh D en los casos de aborto y de utilización de técnicas invasivas en mujeres embarazadas Rh negativas a una dosis de 50 µg cuando el evento es en el primer trimestre. En el caso de eventos inmunizantes después de las 20 semanas de gestación, la dosis que se ha de administrar debe ser de 100 µg. Si se demuestra una hemorragia feto-materna de gran volumen (mayor que 15 mL) debe administrarse una dosis adicional.

Está establecido que después del parto de un hijo Rh positivo, la mujer Rh negativa no aloinmunizada debe recibir una dosis de 300 µg de IgG anti-D dentro de las 72 horas posteriores al parto. Ello no excluye que, en casos de no administración dentro de este período, no se deba hacer hasta 1 semana después del parto. Esta dosis protege de hemorragias feto-maternas inferiores a 15 mL. Cuando se sospecha una hemorragia de mayor volumen, es necesario cuantificarla para administrar la dosis correcta que asegure su protección (20 µg).

### Exanguinotransfusión en el recién nacido

La exanguinotransfusión es introducida por Wallerstein en 1945. Se emplea en el tratamiento de la EHRN severa, pues corrige la anemia, elimina los eritrocitos unidos a las inmunoglobulinas, así como las inmunoglobulinas libres, y reduce la carga de bilirrubina al remover los productos liberados por la hemólisis eritrocitaria.

El mayor problema de la exanguinotransfusión en la EHRN es la selección de la sangre adecuada. Como la madre y el niño pueden pertenecer a grupos ABO distintos, se utilizan entonces eritrocitos del grupo O. Si el anticuerpo problema es anti-D, los eritrocitos tienen que ser Rh negativos. Si la madre y el niño tienen el mismo grupo ABO, pueden utilizarse eritrocitos isogrupo y si el anticuerpo problema no es anti-D, los eritrocitos administrados deben estar carentes del antígeno problema.

Por lo general, para los recién nacidos se recomienda una exanguinotransfusión equivalente a 2 veces su volumen sanguíneo.

Para realizar este proceder, los concentrados de eritrocitos pueden combinarse con plasma fresco congelado, compatible con los eritrocitos del neonato y de los eritrocitos que van a transfundir, albúmina al 5 % o administrarse sangre total (de menos de 4 días), exenta del plasma y de capa leucoplaquetaria, libre de citomegalovirus (CMV) e irradiada (2 500 a 3 000 rads), para evitar el riesgo potencial de enfermedad de injerto contra huésped, así como carentes de Hb S.

Para calcular una exanguinotransfusión de doble volumen y conseguir un hematócrito (Hto) final de 0,50, se debe actuar de la forma siguiente:

1. Volumen sanguíneo total del RN (VST) = 85 mL/kg.
2. Volumen de exanguinotransfusión (VET) = 2 VST.
3. Volumen de eritrocitos que se van a infundir (VG) = VET x 0,7. Donde 0,7 es el hematócrito aproximado de los eritrocitos que se van a infundir.
4. Volumen de plasma fresco congelado que se va a infundir = VET-VG.

Para ello, las indicaciones son:

1. Bilirrubina sanguínea no conjugada entre 6 y 9 mg/dL en los RNPT.

2. Bilirrubina sanguínea no conjugada en 18 mg/dL en los RNAT.
3. Incremento rápido de la bilirrubina sanguínea no conjugada, que exceda los 8,6 µmol/L/h.

### TRANSFUSIÓN SANGUÍNEA EN LA ANEMIA DREPANOCÍTICA

La transfusión de eritrocitos en la anemia drepanocítica puede emplearse para reponer el volumen sanguíneo y mantener la capacidad transportadora de oxígeno a los tejidos. Tiene, además, indicaciones específicas, como lograr la dilución de las células que contienen Hb S, para mejorar las propiedades reológicas de la sangre.

Los métodos de terapia transfusional empleados son: la transfusión sanguínea simple, la exanguinotransfusión y el régimen de transfusión sanguínea crónica. La transfusión sanguínea simple empleada en aquellas complicaciones en las que la reducción de Hb y el volumen sanguíneo es la condición fisiopatológica predominante, como en la crisis aplásica y en las crisis de secuestro. La exanguinotransfusión se emplea en complicaciones agudas con peligro para la vida del paciente, en que es necesario reducir de forma rápida los niveles de Hb S sin que haya un incremento significativo de la cifra de Hb (menos de 100 g/L) y así mejorar las condiciones reológicas de la sangre, lo que permite el restablecimiento del flujo sanguíneo a los órganos afectados, como por ejemplo, en la crisis del SNC, el priapismo y la crisis hepática severa. El régimen de transfusión sanguínea crónica se reserva para la profilaxis de complicaciones severas en pacientes con episodios previos o signos de alerta que favorezcan el desarrollo de estas. Su objetivo fundamental es mantener los niveles de Hb S por debajo del 30 %, lo que reduce de manera significativa la viscosidad de la sangre. Entre las indicaciones fundamentales está la profilaxis de la crisis del SNC y el priapismo.

Son frecuentes los efectos adversos de la transfusión sanguínea en estos pacientes. Las reacciones febriles son las de mayor frecuencia, pero la aloinmunización a Ags eritrocitarios es la de mayor importancia clínica y se presenta entre el 8 y el 30 % de los pacientes con drepanocitosis. Los Acs más frecuentes están dirigidos contra los Ags de los sistemas Rh, Kell, Duffy y Kidd. Se destacan también por su connotación, las infecciones por virus de las hepatitis B y C.

La sangre administrada a los pacientes con anemia drepanocítica no debe contener Hb S, por lo que debe detectarse su presencia en cada unidad que se va a transfundir, mediante la realización de la prueba de solubilidad.

## TRANSFUSIÓN SANGUÍNEA EN LAS ANEMIAS HEMOLÍTICAS AUTOINMUNES

En las anemias hemolíticas por anticuerpos calientes (AHAC), el aspecto clínico más crítico que se debe evaluar son los síntomas y signos de la anemia que apoyan la indicación de la transfusión.

Como manifestaciones de anemia severa se pueden presentar: angina y descompensación cardíaca. En ocasiones, es posible constatar signos como el letargo y la debilidad muscular, que pueden progresar a un estado de somnolencia, coma y muerte. Al observarse estas manifestaciones, la transfusión sanguínea tiene que ser indicada. Los pacientes con niveles de hemoglobina de 50 a 80 g/L pueden presentar síntomas de anemia, como palpitaciones y fatiga.

Si la anemia es estable y no se presentan signos y síntomas de anemia severa, no es necesaria la indicación de la transfusión. Es importante considerar que la respuesta a la terapia con esteroides puede ser satisfactoria cuando se evita la transfusión.

La transfusión sanguínea en pacientes con AHAC debe realizarse solo cuando hay riesgos para la vida y no existe otra alternativa terapéutica. Esta situación ha sido bien descrita en el planteamiento siguiente: "Debe transfundirse al paciente, no según los niveles de hemoglobina de este o según la aprehensión del médico." Los aspectos particulares sobre la selección de la sangre para la transfusión sanguínea de estos pacientes se describen en otro capítulo.

Después de seleccionar la unidad de sangre que se ha de transfundir, esta debe administrarse en forma de concentrado de eritrocitos. No existe justificación para la indicación de eritrocitos lavados, excepto cuando el paciente tiene historia de reacciones transfusionales febriles o cuando es conocida la presencia de anticuerpos leucocitarios.

La sangre debe administrarse lentamente y en pequeños volúmenes, a razón de 100 mL del concentrado de eritrocitos en un día e igual volumen al día siguiente, si es necesario. Esta práctica se justifica por varios propósitos. En primer lugar, se reduce el riesgo de sobrecarga circulatoria. En segundo lugar, si existe algún aloanticuerpo no detectado y la sangre es incompatible para el aloanticuerpo, las consecuencias son menos severas que si se administra toda la unidad. En tercer lugar, el paciente puede tener una respuesta clínica favorable a la infusión de 100 mL de concentrado de eritrocitos y no ser necesario transfundirlo de nuevo. La transfusión sanguínea de eritrocitos puede estimular la producción de autoanticuerpos, por lo que se obtienen mejores beneficios si se transfunde la menor cantidad posible.

## BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- American Association of Blood Bank-Asociación Argentina de Hemoterapia e Inmunología. Manual Técnico 12<sup>a</sup> ed. Buenos Aires: Edigraf. 1997; p. 443-60.
- American Association of Blood Bank-Asociación Española de Hematología y Hemoterapia. Manual técnico. 10<sup>a</sup> ed. Barcelona: Pecaló; 1990; p. 407-19.
- Ballester JM, González A, Bencomo A y Macías C. Procedimientos técnicos para Bancos de Sangre. Managua MINSAP-OPS/OMS, 1995.
- Boral IL and Henry JB. Transfusion medicine. En: Henry JB, ed. Clinical Diagnosis and management by Laboratory Methods, 9<sup>th</sup> ed, Philadelphia, 1996:793-844.
- Boral LI, Henry JB: Transfusion Medicine. In: Clinical diagnosis and management by laboratory methods. 9<sup>th</sup> Edition. WB Sanders Co., Philadelphia, 1996: 793-844.
- Carbonell F. Transfusión masiva. En: Lopez Borrascas A. Enciclopedia iberoamericana de hematología IV. Salamanca: Universidad de Salamanca; 1992, p. 235-9.
- Catalan MA. Conceptos actuales en diagnóstico y tratamiento de la enfermedad hemolítica del recién nacido. Rev. Arg. Transf. 1996;22:23-37.
- Clóvis P. Enfermedad hemolítica perinatal. En: López Borrascas A. Enciclopedia Iberoamericana de Hematología. Salamanca: Ediciones Universidad de Salamanca; 1992. p. 424-38.
- Contreras M (ed.). ABC of Transfusion. 3<sup>rd</sup> ed. BMJ Books 1998. Bristol, UK.
- De Alarcon P A. Transfusiones en el paciente pediátrico y neonato. Rev Arg Transf 1996;22:63-9.
- Foerster J. Alloimmune hemolytic anemias. En: Lee GR, Bithell TC, Foerster J, editores. Wintrobe's Clinical Hematology. 10<sup>a</sup> ed. Baltimore: Williams and Wilkins; 1998. p. 1210-32.
- Genetet B, Mannoni P. Antecedentes históricos. En: Genetet B, Mannoni P. La transfusión. Ciudad Habana: Científico-Técnica; 1984. p. 1-9.
- Gibbs WN, Michel G. Clinical aspects of blood transfusion in adults. Vox Sang 1994;67: 43-9.
- Hasley PB, Lave JR, Kapoor WN. The necessary and the unnecessary transfusion: a critical review of reported appropriateness rates and criterio for red cell transfusions. Transfusion 1994;34:110-5.
- Klein HG (ed.). Standards for blood bank and transfusion services, 17<sup>th</sup> ed. Bethesda, MD: American Association of Blood Bank, 1996.
- Linare J. Uso clínico de los componentes celulares. En: Lopez Borrascas A. Enciclopedia iberoamericana de hematología IV. Salamanca: Universidad de Salamanca; 1992. p. 187-98.
- Maatta TK. Management of acute blood loss. Vox Sang 1994; 67: 59-61.
- Marcos MA. Medicina transfusional en neonatología. Rev Arg Transf 1994;20:99-109.
- Martin C. Diagnóstico prenatal y estado actual de la prevención de la isoimmunización fetomaterna por anti-D. Sangre 1997;42:239-41.
- Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M (eds.). Blood transfusion in clinical Medicine. 10<sup>th</sup> Ed. Blackwell Science LTD, London, 1997.
- Morera Barrios LM. Concentrado de plaquetas: II. Evaluación in vivo. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter 1990;6:208-17.
- Queenan J T. Eritroblastosis fetal. En: Fanaroff AA, Martin RJ, Merkatz IR (eds.). Enfermedades del Feto y del Recién Nacido. La Habana: Ed. Científico-Técnica; 1986. p. 58-68.
- Sheinbaurn AJ, Herman JH. Platelet transfusion: a review of key concepts. Immunohematology 1996;12:123-6.
- Smith L G. Blood collection. En: Green T S, Steckler D, eds. Donor room policies and procedures, Arlington VA: American Association of Blood Bank, 1985:25-45.
- Stehling L, Luban NLC, Anderson KC, Sayers MH, Long A, Attar S, et al. Guidelines for blood utilization. Review. Transfusion 1994;34:438-48.

## **CONTENIDO**

---

### **Pruebas pretransfusionales de compatibilidad/ 647**

- Consideraciones generales/ 647
- Grupos sanguíneos/ 648
- Pesquisa de anticuerpos/ 648
- Prueba cruzada/ 649
- Selección de unidades/ 649
- Interpretación de las pruebas de compatibilidad/ 650

### **Infusión de los componentes sanguíneos/ 651**

- Condiciones que afectan la infusión/ 651
- Calentamiento de la sangre/ 652
- Velocidad de infusión/ 652
- Monitoreo del paciente/ 652
- Hemovigilancia/ 652

### **Reacciones adversas ante la transfusión de sangre/ 652**

- Reacciones inmunológicas inmediatas/ 653
- Reacciones inmunológicas tardías/ 655
- Reacciones no inmunológicas inmediatas/ 657
- Reacciones no inmunológicas tardías/ 658
- Medidas que se deben adoptar ante la sospecha de una reacción postransfusional inmediata/ 660
- Investigación de una reacción transfusional hemolítica inmediata/ 660
- Investigación de posibles aloanticuerpos eritrocitarios/ 661
- Investigación de una posible reacción postransfusional inmediata bacteriana/ 661

### **Bibliografía recomendada/ 661**

### Capítulo 52



## REACCIÓN TRANSFUSIONAL

*Dra. María Elena Alfonso Valdés  
Lic. Antonio Bencomo Hernández  
Dr. Lázaro Cortina Rosales  
Lic. Patricia Hernández Díaz  
Dra. María del Rosario López de Roux*

### RESUMEN

Las pruebas pretransfusionales proveen las bases para la adecuada selección del componente sanguíneo que se va a administrar al receptor y garantizan que sea efectivo y no cause daño cuando sea transfundido. En este capítulo se describen los pasos generales de este proceso, como: la determinación del grupo sanguíneo, la pesquisa de anticuerpos, la realización de la prueba cruzada en sus dos variantes, la adecuada selección de unidades y la correcta interpretación de las pruebas de compatibilidad. También se estudian los aspectos referentes a la infusión de los componentes sanguíneos, es decir, las condiciones que afectan a esta, el calentamiento de la sangre, la velocidad de infusión y el monitoreo del paciente. Por último, se dedica un espacio al análisis de la reacción transfusional, su diagnóstico, clasificación y la conducta que se debe seguir en cada caso.

### PRUEBAS PRETRANSFUSIONALES DE COMPATIBILIDAD

#### CONSIDERACIONES GENERALES

Las pruebas pretransfusionales proveen las bases para la adecuada selección del componente sanguíneo para el receptor, garantizan que este sea efectivo y que no cause daño o una pobre interacción cuando el paciente sea transfundido. Los pasos generales de este proceso incluyen:

1. La identificación apropiada del receptor y de la muestra de sangre de este.
2. Revisión de los antecedentes del receptor, si los hubiera, y comparación con los resultados actuales.
3. Determinación del grupo sanguíneo ABO y Rh D del receptor y pesquisa de anticuerpos eritrocitarios.
4. Seleccionar el componente sanguíneo que se va a administrar, ABO/Rh D compatible con el receptor.

5. Realizar pruebas para la determinación de incompatibilidad entre el suero del receptor y las células del donante.

La orden de transfusión debe consignar el nombre y apellidos del paciente, su localización, la edad, su número de historia clínica, el diagnóstico y el componente que se va a administrar, especificando el número de unidades y su frecuencia si se requiere más de una administración en el día. Las órdenes que no contengan todos los datos deben ser rechazadas.

El flebotomista debe confirmar la identidad del paciente, comparando los datos de la orden con los suministrados por el paciente, o por la enfermera o médico de asistencia en caso de que el primero esté inconsciente. La muestra de sangre debe rotularse junto a la cama del paciente e incluye el nombre y apellidos, así como el número de historia clínica (HC), la fecha de la extracción y las iniciales del flebotomista. Los datos deben reflejarse de forma clara y legible.

Si la muestra de sangre se obtiene de una vena previamente canalizada, debe limpiarse el tramo con solución salina y descartar los primeros 5 mL extraídos para prevenir la interferencia de líquido residual. De la muestra extraída deben obtenerse el suero y los eritrocitos por centrifugación. El suero es más recomendable que el plasma, debido a que pueden producirse pequeños agregados, que pueden interpretarse falsamente como una aglutinación, y porque el plasma obtenido con citrato o EDTA se une al calcio, y evita la activación del sistema del complemento y, por tanto, previene la lisis eritrocitaria. Del plasma puede obtenerse suero mediante tratamiento con trombina, protamina o perlas de cristal, en dependencia del anticoagulante empleado. No deben utilizarse muestras hemolizadas, ya que no se detectarán las hemólisis inducidas por anticuerpos.

Si el paciente ha recibido transfusiones o es una mujer que ha estado embarazada en los últimos 3 meses, la muestra de sangre no debe tener más de 3 días de obtenida.

Los pacientes neonatos deben tratarse de forma diferente. Si en la pesquisa inicial no se detectan anticuerpos y el niño no ha recibido transfusión, no es necesario realizar nuevas pruebas de compatibilidad durante los primeros 4 meses de vida. Tampoco es necesario repetir el grupo ABO y Rh D si ha recibido sangre isogrupo o autóloga.

Las muestras de sangre del receptor y del donante deben sellarse y conservarse a una temperatura entre 2 y 4 °C durante 72 horas como mínimo después de la transfusión; en algunos centros se conserva durante 7 días, teniendo en cuenta la posibilidad de la producción de una reacción hemolítica retardada.

Si en la anterior historia clínica del paciente existen evidencias de la presencia de un anticuerpo antieritrocitario de importancia clínica, debe administrarse sangre carente del antígeno contra el cual está dirigido, aunque el anticuerpo no se detecte en la actualidad, para evitar una respuesta secundaria (anamnética) en el receptor.

## GRUPOS SANGUÍNEOS

A la muestra del receptor se le determinará el grupo sanguíneo ABO y Rh D. Si existen dudas en el grupo ABO/Rh D, es conveniente administrar unidades O negativas y realizar la prueba cruzada-compatible, hasta que se resuelva el problema.

Deben determinarse los grupos sanguíneos ABO y Rh<sub>0</sub>(D) a los eritrocitos del paciente y al suero, para confirmar el grupo ABO. La tipificación ABO es esencial debido a la presencia invariable de anticuerpos

naturales hemolíticos en el plasma de los individuos que carecen del correspondiente antígeno. Por ejemplo, los eritrocitos del grupo A son siempre incompatibles con el plasma de individuos del grupo B.

La importancia de la tipificación Rh<sub>0</sub>(D) radica en que el antígeno D es altamente inmunogénico y el 10 % de la población carece de él, por lo que tiene la posibilidad de crear anticuerpos contra el antígeno después de una transfusión de sangre incompatible. El anticuerpo anti-Rh D inmune puede ocasionar reacciones hemolíticas postransfusionales y enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido, que pueden ser fatales. De aquí que las niñas o las mujeres en edad fértil, que sean Rh<sub>0</sub>(D) negativas, deben recibir solo sangre Rh negativa.

El servicio de transfusiones del hospital debe confirmar el grupo sanguíneo ABO de la sangre de todos los donantes y el Rh D en las unidades negativas. Para realizar las pruebas serológicas de la sangre del donante debe emplearse la sangre del tramo de tubo adherido a la bolsa.

## PESQUISA DE ANTICUERPOS

La pesquisa de anticuerpos es el enfrentamiento por diferentes técnicas del suero de un individuo a los eritrocitos investigados, para detectar la presencia de anticuerpos inesperados de significación clínica. Se denominan como anticuerpos inesperados aquellos dirigidos contra antígenos de grupos sanguíneos diferentes del ABO, y se consideran de significación o importancia clínica los que se conoce que causan reacciones transfusionales o disminución de la vida media eritrocitaria. Generalmente los anticuerpos detectados a 37 °C tienen significación clínica, mientras que los que reaccionan solo a temperatura ambiente suelen carecer de esta significación.

Algunos anticuerpos solo se detectan cuando se emplean células de pesquisa homocigóticas para el antígeno contra el que está dirigido, lo que se conoce como efecto de dosis, y ocurre en algunos anticuerpos dirigidos contra los sistemas de grupos sanguíneos Rh, Kell, Duffy y Kidd. Por esto, deben utilizarse células de pesquisa homocigóticas para estos antígenos.

La pesquisa o detección de anticuerpos es más importante en pacientes que en donantes, ya que la cantidad de plasma presente en el receptor es considerablemente mayor que la presente en una unidad de sangre del donante. Por otra parte, los anticuerpos débiles pueden fortalecerse después de una respuesta secundaria debida a una nueva estimulación antigénica proveniente de una transfusión. La pesquisa debe

realizarse con al menos 2 células seleccionadas para estos fines, capaces de detectar los anticuerpos de significación clínica más comunes. Las células no deben mezclarse.

La pesquisa debe incluir, de rutina, la prueba de antiglobulina indirecta (Coombs), con el empleo de controles positivos para evitar resultados falsos negativos. La negatividad de la pesquisa de anticuerpos no excluye de forma absoluta la presencia de un anticuerpo eritrocitario en el suero del paciente, ya que los anticuerpos dirigidos contra antígenos de baja frecuencia, generalmente no se detectan en la pesquisa y pueden producir una prueba cruzada positiva con la sangre del donante.

Cuando se detectan anticuerpos en la pesquisa, debe determinarse su especificidad enfrentando el suero del paciente a un panel de eritrocitos fenotipados (panel de identificación). En el caso de que se detecten anticuerpos contra antígenos comunes, la búsqueda de unidades compatibles puede tomar varios días (véase el capítulo sobre Inmunohematología).

En algunos países, si la pesquisa de anticuerpos es negativa y existe compatibilidad ABO/Rh D donante-receptor, no se realizan las pruebas cruzadas (método de tipificación/pesquisa). En Cuba no se realiza la pesquisa de anticuerpos de rutina en la práctica transfusional; pero sí es obligatoria la realización de la prueba cruzada en todos los casos en que se transfundan eritrocitos.

## PRUEBA CRUZADA

Después de realizados los grupos sanguíneos y la pesquisa de anticuerpos, la prueba cruzada tiene la finalidad de detectar incompatibilidades ABO donante-receptor o anticuerpos dirigidos contra antígenos eritrocitarios de baja frecuencia, presentes en el donante pero no en las células de pesquisa.

La prueba cruzada puede ser principal o mayor (del inglés *major*) o menor. En la prueba cruzada principal, se enfrenta el suero del receptor con los eritrocitos del donante, con la finalidad de detectar la presencia de anticuerpos en el receptor dirigidos contra antígenos eritrocitarios presentes en el donante. En la prueba cruzada menor se enfrenta el suero del donante con los eritrocitos del receptor, para buscar anticuerpos en el donante dirigidos contra los eritrocitos del receptor.

Mediante la prueba cruzada se pueden detectar anticuerpos contra el sistema ABO y anticuerpos inesperados de importancia clínica. En ella debe incluirse la prueba de antiglobulina (Coombs) indirecta. En algunos países, en caso de pesquisa de anticuerpos negativos en PAI, no se realiza esta técnica en la prueba

cruzada; solo se realiza una centrifugación rápida de las células del donante con el suero del receptor y se lee para buscar aglutinación.

En la actualidad no se realiza la prueba cruzada menor, ya que solo los anticuerpos incompatibles excepcionalmente potentes del donante son capaces de destruir eritrocitos del receptor; pero tales anticuerpos deben detectarse en la pesquisa realizada a los donantes y las unidades deben ser descartadas.

Algunos laboratorios efectúan un autocontrol para detectar si hay autoaglutinación, que es muy útil si el paciente ha recibido transfusiones recientemente.

## SELECCIÓN DE UNIDADES

Si en el hospital no hay concentrado de eritrocitos del mismo grupo ABO del receptor, pueden emplearse otros grupos compatibles. Los individuos de grupo O son donantes universales de eritrocitos, ya que los anticuerpos naturales anti-A, anti-B y anti-AB no reaccionan contra ellos. Los individuos de grupo AB se consideran receptores universales de eritrocitos y donantes universales de plasma, ya que no tienen anticuerpos contra los antígenos A y B. Consecuentemente, las personas de grupo AB pueden recibir eritrocitos de cualquier grupo ABO y donar plasma a receptores de cualquier grupo ABO.

En ocasiones es necesario transfundir con sangre de su mismo grupo a pacientes de grupo sanguíneo A, B o AB que han recibido grandes volúmenes de sangre O. En esos casos se administrará la sangre isogrupo solo si no hay incompatibilidad ABO en la prueba cruzada; de lo contrario se debe continuar empleando sangre O.

Si el componente que se va a transfundir contiene 5 mL o más de eritrocitos, deben ser ABO compatibles con el suero del receptor. Si se transfunden grandes cantidades de plasma incompatible, el paciente presentará una prueba de antiglobulina directa positiva con posibilidad de daño y acortamiento de la vida media de sus eritrocitos.

Los eritrocitos Rh D positivos se transfundirán a pacientes Rh D positivos. Los eritrocitos Rh D negativos pueden transfundirse a pacientes positivos y negativos, pero debido a su baja frecuencia (10 % en nuestro medio) deben reservarse para pacientes Rh D negativos.

Los pacientes Rh D negativos deben recibir sangre Rh D negativa. En ocasiones no hay sangre ABO compatible Rh D negativa disponible. En estos casos debe reservarse la sangre Rh D negativa para las mujeres Rh D negativas en edad fértil (menores de 45 años), para evitar la formación de IgG anti D y futura enfermedad hemolítica del recién nacido. También



debe reservarse para pacientes Rh D negativos con anti-D. En casos de que no haya disponibilidad de sangre Rh D negativa, puede emplearse sangre Rh D positiva en pacientes Rh D negativos cuando estos sean hombres o mujeres ancianas que no presenten anticuerpo anti Rh D.

Si un paciente presenta anticuerpos en su suero contra antígenos de otros grupos sanguíneos, debe determinarse su especificidad y administrarle sangre carente del antígeno de que se trate.

En la pasada década, se hicieron estudios para convertir sangres del grupo A y B en O, con el empleo de enzimas capaces de remover los grupos terminales que definen estos grupos. El éxito futuro y la generalización del proceder permitirá eliminar la barrera de la incompatibilidad ABO en la transfusión de sangre y podría abrir el camino para la eliminación de otros antígenos de grupos sanguíneos.

## INTERPRETACIÓN DE LAS PRUEBAS DE COMPATIBILIDAD

Las pruebas de compatibilidad incluyen la tipificación ABO, la pesquisa de anticuerpos y la prueba cruzada.

El 95 % de las muestras presenta una pesquisa de anticuerpos y una prueba cruzada negativa. Si la pesquisa de anticuerpos es positiva y la prueba cruzada es negativa, debe determinarse la especificidad del anticuerpo para determinar si el antígeno contra el cual está dirigido no está presente en la sangre seleccionada. De determinarse el antígeno en esta sangre debe buscarse otra unidad compatible. Si el anticuerpo detectado está dirigido contra un antígeno de alta incidencia de importancia clínica, debe buscarse la sangre en un panel de donantes raros; de no contar con él, deberá probarse con un elevado número de unidades de sangre hasta encontrar una unidad compatible.

La presencia de autoanticuerpos puede complicar las pruebas serológicas. La producción de autoanticuerpos puede estar asociada con enfermedades, ingestión de drogas o ser de causa idiopática. Los autoanticuerpos fríos pueden interferir la tipificación ABO/Rh, la pesquisa de anticuerpos y la prueba cruzada, fundamentalmente aquellos que reaccionan en un amplio rango térmico. Estos anticuerpos pueden fijar complemento y producir pruebas cruzadas positivas. Para evitar la interferencia de estos anticuerpos en la tipificación ABO, deben separarse los eritrocitos del plasma en la muestra que se va a estudiar y mantenerlos a 37 °C, y deben ser lavados con solución salina a 37 °C. El suero debe obtenerse de una muestra

coagulada, mantenida a temperatura ambiente. Adicionalmente puede precalentarse la muestra antes de la pesquisa o la prueba cruzada. En ocasiones es necesario realizar autoadsorción a 4 °C.

Los autoanticuerpos calientes se producen generalmente en enfermedades autoinmunes, secundarios a algunas drogas como la metildopa. La presencia de autoanticuerpos calientes puede también interferir la tipificación del antígeno Rh<sub>0</sub> (D) si el reactivo empleado para su determinación contiene cantidades significativas de potenciadores, en estos casos es útil el uso de reactivos anti Rh<sub>0</sub> (D) químicamente modificados. Si el paciente no ha recibido transfusiones en los últimos 3 meses, puede realizarse una autoadsorción en caliente del suero para remover los autoanticuerpos. Adicionalmente puede estudiarse el eluato para determinar la especificidad de los autoanticuerpos. Se empleará el suero autoadsorbido en caliente para la realización de los estudios serológicos de compatibilidad.

En ocasiones, la pesquisa de anticuerpos es negativa y la prueba cruzada positiva, lo que puede indicar la presencia de un anticuerpo dirigido contra un antígeno de baja frecuencia; en estos casos debe identificarse el antígeno con el empleo de un panel eritrocitario. Esta situación puede también observarse cuando el donante tiene una prueba de antiglobulina directa positiva, lo que se ha estimado que puede observarse en 1 de 1 000 o 13 000 donantes. En este caso, la sangre del donante dará resultados positivos con todos los receptores y debe descartarse. También puede observarse esta situación cuando el donante tiene un estado de poliaglutinación por activación T (T, T<sub>n</sub>, T<sub>k</sub>). Por último, lo más importante, la prueba cruzada positiva con pesquisa negativa puede deberse a una incompatibilidad ABO donante-receptor, ya que las células de pesquisa son siempre de grupo O, por lo que darían una pesquisa negativa.

Si la pesquisa de anticuerpos es positivo y la prueba cruzada negativa, puede sospecharse la presencia de un anticuerpo anti L<sub>e</sub><sup>bh</sup>. Este anticuerpo se produce en individuos con fenotipos A, B o A<sub>1</sub>B que reaccionan con células que tienen antígenos H (O o A<sub>2</sub>) y antígenos Le<sup>b</sup>.

Si se selecciona sangre al azar para transfusión sin prueba de compatibilidad, aproximadamente 2/3 de ellas serán incompatibles. Si la selección se hace teniendo en cuenta solo la compatibilidad de grupo ABO, aproximadamente el 99 % de ellas será compatible. Cuando se adiciona la compatibilidad Rh<sub>0</sub> (D), las posibilidades de éxito se incrementan en 0,4 %, mientras que la pesquisa de anticuerpos lo incrementa en 0,14 %. Las pruebas cruzadas solo incrementan la seguridad de la transfusión en 0,01 %, de aquí que en

los últimos tiempos se haga un menor énfasis en la prueba cruzada, y muchos centros solo emplean el método de la centrifugación inmediata o prueba cruzada abreviada después de una pesquisa de anticuerpos por la técnica de antiglobulina indirecta.

Más del 70 % de las indicaciones de transfusiones es para pacientes que se van a someter a intervenciones quirúrgicas electivas; sin embargo, una elevada proporción de estos pacientes no se transfunden. Cada centro hospitalario, después de un análisis de los cirujanos, los anestesiistas, los clínicos y los hematólogos, debe establecer un esquema de requerimiento de sangre en los casos quirúrgicos y centrarse en ordenar sangre para aquellos casos que realmente lo requieran. Aunque pueden existir variaciones entre diferentes hospitales, en general los consumos son similares. De manera que, generalmente no se requiere sangre en casos de colecistectomías, herniorrafias, laparoscopias, cesáreas o colostomías, mientras que la mayor parte de los hospitales requieren 3 o 4 unidades de sangre para casos de histerectomía, operaciones de cadera, mastectomía radical, prostatectomía transvesical y entre 4 y 6 para los casos de *bypass* coronario. En cualquier caso debe tenerse en cuenta las particularidades de cada paciente (dificultades en la operación, pacientes con trastornos en el sistema de la coagulación). En aquellas operaciones en que menos del 10 % de los casos requieren transfusiones de sangre, si no existen anticuerpos de importancia clínica en la pesquisa, no deben realizarse pruebas cruzadas previas. Cuando se detecten anticuerpos irregulares de importancia clínica, debe garantizarse sangre antigénica negativa, antes de acometer la intervención quirúrgica elegida.

## INFUSIÓN DE LOS COMPONENTES DE LA SANGRE

Una vez seleccionada la unidad de sangre compatible, antes de su administración, debe corroborarse la correcta identificación del donante y del receptor en la cama del paciente o en el salón quirúrgico.

La correcta identificación del receptor es una de las actividades más importantes en el acto de la transfusión, tanto en el momento de la obtención de la muestra como en el de la administración de la transfusión. Las medidas deben extremarse cuando la sangre se administra en salones de operaciones o a pacientes inconscientes, en que se requerirá la identificación por medio de familiares, personal médico y de enfermería de atención.

En algunos países, como el nuestro, se recomienda la realización del grupo ABO junto a la cabecera del receptor y a la bolsa de sangre del donante, inmediatamente antes de la infusión de la sangre, como una medida adicional para evitar la incompatibilidad.

## CONDICIONES QUE AFECTAN LA INFUSIÓN

**Fluido intravenoso.** Generalmente se emplea la solución salina normal (0,9 %) para comenzar la infusión por la línea intravenosa antes de la transfusión. La dextrosa al 5 % es hipotónica y puede causar agregación y hemólisis de los eritrocitos, mientras que el ringer lactato puede producir coágulos, debido a su contenido de calcio. Estos dos últimos productos no deben nunca mezclarse con la sangre que se va a transfundir.

Los concentrados de eritrocitos pueden diluirse en solución salina normal y, raramente, en plasma ABO compatible o albúmina al 5 %, para disminuir la viscosidad y permitir ritmos de infusión más rápidos. Aunque con el más reciente empleo de soluciones de resuspensión de eritrocitos, incorporadas al sistema de bolsas, esta práctica ha caído en desuso.

Además, no se deben adicionar medicamentos a los componentes de la sangre, ni administrarse en la misma línea de infusión de esta, ya que el pH excesivamente alto o bajo de algunas drogas puede provocar la lisis de los eritrocitos. Por otra parte, si el medicamento es añadido a la transfusión de sangre y la unidad es retirada, como consecuencia de una reacción transfusional, no se administrará la dosis completa del medicamento. Si se produce una reacción adversa, no podrá distinguirse si es de causa transfusional o por medicamentos.

**Empleo de filtros.** Los componentes de la sangre deben administrarse a través de un filtro para remover coágulos de fibrina y otras partículas. La mayoría de los equipos de transfusión cuentan con filtros de primera generación, con poros de una medida aproximada de 170  $\mu$ m. El área de superficie de los filtros varía. En condiciones normales puede emplearse un filtro para la administración de 2 a 4 unidades de sangre. Sin embargo, deben considerarse las condiciones del filtro y el tiempo total de infusión (menos de 4 horas) en el momento de decidir la sustitución de este.

Los microagregados se forman progresivamente en la sangre total y sus concentrados de eritrocitos, a partir de los 5 días de almacenamiento y están compuestos por plaquetas, detritus de leucocitos, fragmentos celulares, núcleos y fibrina. Los microagregados pueden tener un diámetro tan grande como 100  $\mu$ m. Los filtros para microagregados, de segunda generación, tienen poros de entre las 20 y 40  $\mu$ m y están compuestos

fundamentalmente de fibras de lana plástica. Estos filtros son útiles cuando se requiere evitar el paso de un gran número de agregados, como en la transfusión masiva en el *bypass* cardiopulmonar, o para prevenir la hipoxia inducida por microagregados en pacientes con trastornos de la función pulmonar que requieren transfusiones.

Los filtros para microagregados no remueven leucocitos y no deben emplearse en la transfusión de concentrados de plaquetas y leucocitos, ya que pueden retener un porcentaje de estas células viables.

Los filtros de leuorreducción, de tercera generación, remueven de modo selectivo el 99,9 % (3 logaritmos de base 10) de leucocitos de concentrados de eritrocitos y plaquetas, y dejan menos de  $5 \times 10^6$  leucocitos contaminantes. Las aplicaciones potenciales de estos filtros incluyen la prevención de la sensibilización HLA, de las reacciones febriles, de la transmisión de virus (como CMV y HTLV-1), de la inmunosupresión asociada con la transfusión y de la enfermedad de injerto contra huésped.

## CALENTAMIENTO DE LA SANGRE

La infusión rápida de grandes volúmenes de sangre fría puede producir arritmia ventricular, e incluso, la muerte. Se recomienda el empleo de calentadores de sangre en los pacientes que deben recibir un elevado número de unidades de sangre en un período breve, transfusiones masivas, exanguinotransfusión, transfusión de recién nacidos prematuros y en pacientes con fuertes aglutininas frías. La temperatura del calentador de sangre debe ser de 37 °C; con una temperatura superior a 42 °C puede producirse hemólisis. En pacientes con aglutininas frías es recomendable también abrilarlos mientras reciben la transfusión.

## VELOCIDAD DE INFUSIÓN

En la mayoría de los equipos de transfusión, 15 gotas equivalen a 1 mL. A un ritmo de 60 gotas por minuto pueden transfundirse 250 mL de sangre en 1 hora. De este modo, la duración de la transfusión puede calcularse teniendo en cuenta el ritmo de infusión. En condiciones normales para un adulto promedio sin alteraciones cardiopulmonares, debe transfundirse una unidad de sangre en 1 a 2 horas. Si la unidad debe transfundirse de forma lenta, la transfusión debe concluir en 4 horas. La sangre es un medio de cultivo ideal y la permanencia prolongada de la sangre a temperatura ambiente puede provocar el crecimiento bacteriano en el sistema.

En el sangrado masivo, puede acelerarse el ritmo de infusión con el empleo de agujas grandes y más de un sitio de infusión. En pacientes con anemia severa o

falla cardíaca, debe reducirse el ritmo de infusión y puede ser útil el empleo concurrente de diuréticos, digitales o ambos; también puede ser necesario fragmentar la transfusión en varias dosis. Como regla, el ritmo de infusión en los primeros 15 minutos de transfusión debe ser lento y supervisado por el personal encargado de la transfusión, para permitir la observación de cualquier reacción, especialmente cuando existen antecedentes de reacciones previas. En caso de presentarse, debe detenerse inmediatamente la transfusión e investigar la causa.

## MONITOREO DEL PACIENTE

La transfusión es un tratamiento serio y potencialmente riesgoso. Si no se adoptan las precauciones requeridas, se pueden producir reacciones fatales. Debe monitorearse al paciente durante el acto transfusional por médicos o por el personal de enfermería; muchas reacciones fatales pueden abortarse con la intervención rápida de personal calificado. Cualquier reacción transfusional debe reportarse de inmediato al servicio de transfusiones.

## HEMOVIGILANCIA

Comúnmente se identifican como riesgos de la transfusión los relacionados con la transmisión de agentes infecciosos; sin embargo, existen muchas posibilidades de errores y de efectos adversos vinculados con la transfusión, incluso antes de que esta se lleve a cabo. Para la detección de estos errores debe establecerse un sistema nacional de hemovigilancia.

Los errores pueden ocurrir en el etiquetado de la muestra del donante y en la identificación de la muestra del paciente, en las pruebas del laboratorio (transposición de tubos, errores en el informe de los resultados), en la selección de la sangre del donante y en el chequeo de la documentación para la administración de la sangre.

Los comités hospitalarios de transfusión deben monitorear y revisar los riesgos locales de la transfusión en su medio y asegurar que se reporten a los organismos centrales para poder establecer los riesgos nacionales.

## REACCIONES ADVERSAS ANTE LA TRANSFUSIÓN DE SANGRE

En la actualidad, la transfusión de sangre se ha convertido en una práctica relativamente segura, pero no exenta de riesgos que pueden llevar a efectos indeseados e incluso a la muerte.

Para su mejor estudio, las reacciones transfusionales pueden clasificarse en: inmunológicas y no inmunológicas, y cada una de ellas, a su vez, en inmediatas y tardías.

## REACCIONES INMUNOLÓGICAS INMEDIATAS

### Reacción hemolítica inmune aguda

La reacción hemolítica inmune aguda es la destrucción de los eritrocitos incompatibles transfundidos, por anticuerpos eritrocitarios naturales o inmunes presentes en el receptor.

La incompatibilidad ABO es la principal causa de las reacciones hemolíticas inmediatas, debido a que:

1. Los anticuerpos anti-A y anti-B son los anticuerpos de grupo sanguíneo más frecuentes. Están presentes en el plasma de todos los sujetos que carecen de estos antígenos. Por ejemplo, una persona del grupo O tiene anti-A, anti-B y anti-AB en el plasma.
2. Si se comete un error al identificar a un paciente y se le transfunde una sangre de manera errónea, las posibilidades de que sea ABO incompatible es de 1:3 casos.
3. Por lo general, los anticuerpos anti-A y anti-B son IgM potentes (fundamentalmente en los individuos del grupo O), que producen una rápida lisis intravascular de los eritrocitos incompatibles por la activación completa de la cascada del complemento, por lo que con frecuencia las reacciones son severas; sin embargo, la mortalidad resultante es aproximadamente menor del 10 %.

Otros anticuerpos eritrocitarios activos a 37 °C pueden provocar reacciones hemolíticas inmediatas. El más común después de los anticuerpos ABO es el anti-Rh D. Los anticuerpos anti Rh no activan el complemento y los eritrocitos unidos a anticuerpos anti-D se destruyen mayoritariamente por macrófagos del bazo. Las reacciones causadas por estos anticuerpos suelen ser más débiles que las causadas por incompatibilidad ABO.

### Características de la hemólisis por incompatibilidad ABO

En la mayoría de los casos, la causa de la hemólisis por incompatibilidad ABO, es la falla en la identificación correcta del receptor. Esto ocurre, sobre todo en los casos de emergencia en los cuales los pacientes no son bien conocidos por el personal que los está atendiendo, frecuentemente en salones de operaciones o unidades de cuidados intensivos. Algunas veces, estos

pacientes están inconscientes, por lo que no refieren síntomas que puedan alertar.

### Mecanismos de destrucción eritrocitaria

La hemólisis inmune *in vivo* se presenta en dos formas: intravascular y extravascular. En la hemólisis intravascular los anticuerpos son capaces de fijar y activar el sistema del complemento y producir hemólisis de los eritrocitos. La hemoglobina liberada de los eritrocitos destruidos se combina con la haptoglobina y se deposita generalmente en el hígado, donde es degradada en hierro y bilirrubina. Debido a que la cantidad de haptoglobina sanguínea es limitada, parte de la Hb toma otras vías alternativas: el grupo hem liberado se combina con la albúmina, y forma metahemalbúmina o se combina con la hemopexina. Posteriormente es procesado por el hígado. En el laboratorio puede detectarse:

1. Hemoglobina libre en plasma.
2. Hemoglobinuria.
3. Disminución de los niveles de haptoglobina y de hemopexina.
4. Disminución de la capacidad de unión de la albúmina.
5. Aumento de lactato-deshidrogenasa.
6. Hemosiderinuria.
7. Una prueba de antiglobulina directa positiva de campo mixto.
8. Aumento de la bilirrubina sérica después de 6 horas de iniciada la reacción.

Entre los anticuerpos capaces de producir hemólisis intravascular se encuentran los dirigidos contra el sistema ABO. Cuando el anticuerpo es potente, prácticamente todas las células transfundidas son destruidas en el torrente sanguíneo.

*Hemólisis extravascular.* Otros anticuerpos de grupo sanguíneo activan el complemento, pero por lo general solo lo hacen parcialmente, hasta C3b y las células son ingeridas o destruidas por macrófagos del hígado y el bazo. Entre estos anticuerpos se encuentran los dirigidos contra antígenos de los sistemas Kidd, Duffy y Kell. Otros anticuerpos como los anti-Rh no activan el complemento, por lo que los eritrocitos unidos a ellos son removidos por macrófagos esplénicos, los que provocan su destrucción por los mecanismos de fagocitosis o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

*Citocinas involucradas en la hemólisis inmune.* Las citocinas inflamatorias juegan un importante papel en el desarrollo de la fiebre y la CID en la hemólisis inmune. Los pirógenos interleucina-1B (IL-1B) y el factor de necrosis tumoral (FNT) producen hipotensión,

*shock* y muerte cuando se inyectan en altas dosis en animales de experimentación. Estas dos citocinas, además, tienen un efecto sinérgico. Cuando se incuban eritrocitos ABO incompatibles con sangre total se produce una rápida producción de FNT por fagocitos de la sangre periférica. El pico de la producción se observa a las 2 o 4 horas con concentraciones mayores de 1 ng/mL y retorna a la línea basal a las 24 horas. La cantidad de FNT producido es proporcional al grado de hemólisis y, tanto la hemólisis como la producción del FNT, requieren la presencia de proteínas lábiles al calor (probablemente factores del complemento). El incremento del FNT produce fiebre y se piensa que también inicia la CID, por inducción de la adhesión leucocitaria a las superficies endoteliales, lo que lleva a que los leucocitos queden atrapados, y a la isquemia hística. Adicionalmente, tanto la IL-1B como el FNT pueden disminuir la trombomodulina e inducir producción del factor hístico por las células endoteliales, lo que favorece la trombosis. En el modelo *in vitro* antes descrito, hay también un aumento de la IL-8, que comienza a las 4 horas y hace un pico a las 24 horas. La IL-8 recluta leucocitos de la médula ósea y es probablemente la responsable de la leucocitosis clínica de la hemólisis inmune intravascular.

Estudios similares con el empleo de eritrocitos RhD negativos unidos a IgG anti-D incubados a 37 °C, con monocitos humanos, mostraron bajos niveles (100 pg/mL) de IL-1B, IL-6 y FNT en 24 horas, o sea, una respuesta menor y más lenta que la observada en la incompatibilidad ABO. Por esta razón, se ha sugerido que las diferencias clínicas entre ambos tipos de reacciones (intravascular y extravascular) se debe a la mayor cantidad y más rápida formación de FNT en la primera, lo que lleva a una respuesta sistémica de CID generalizada, hipotensión y *shock*.

**Síntomas y signos de la hemólisis por incompatibilidad ABO.** En el paciente consciente, la transfusión de unos pocos mililitros de sangre ABO incompatible puede causar síntomas en 1 o 2 minutos. El paciente se torna intranquilo y puede referir sensación de opresión, frecuentemente acompañada de dolor subesternal o lumbar. El paciente puede, además, presentar rubor facial, dolor abdominal y vómitos.

En el paciente inconsciente, los signos más importantes son la hipotensión y el sangrado incontrolable.

La principal causa de los síntomas y de la hipotensión es la liberación de productos del complemento (C3a y C5a) en el plasma. Estos polipéptidos de peso molecular de alrededor de 20 000, que causan contracción del músculo liso, producción de óxido nítrico, radicales de oxígeno y citocinas como el FNT y la IL-1, causan además degranulación de los mastocitos, con la subsiguiente liberación de sustancias vasoactivas (bradiquinina y serotonina).

El sangrado es causado por la coagulación intravascular diseminada, la cual se piensa que es provocada por la liberación de sustancias procoagulantes del estroma eritrocitario después de la lisis y además posiblemente por la activación directa del sistema de la coagulación por complemento, complejos Ag-Ac y citocinas.

La oliguria es común después de la transfusión de eritrocitos ABO incompatibles y se piensa que es el resultado de cambios en el flujo sanguíneo renal precipitados por la hipotensión más que por la hemoglobinuria.

En cuanto se sospecha que una transfusión es incompatible, debe detenerse y comenzar la infusión de solución salina normal para mantener el flujo urinario. Debe administrarse furosemida en dosis entre 80 y 200 mg por vía intravenosa durante 4 horas. Deben revisarse las etiquetas de la bolsa transfundida y notificarse al servicio de transfusiones, para evitar que se administre la bolsa errónea a otro receptor.

Si se produce una falla renal, debe instaurarse el tratamiento inmediato, ya que puede causar la muerte.

La transfusión de unos pocos mililitros de sangre incompatible puede causar afectación severa en receptores con anticuerpos potentes; sin embargo, en pacientes con anticuerpos débiles, la transfusión de varias unidades de sangre, solo puede causar efectos triviales. Los niños pequeños y los ancianos suelen tener anticuerpos ABO débiles.

### **Características de la hemólisis por anticuerpos no ABO**

Puede ocurrir hemólisis extravascular aguda por anticuerpos no activadores del complemento, tales como los de los sistemas Rh, Kell, Kidd y Duffy. Generalmente la reacción es menos severa que la producida por los anticuerpos ABO. Por lo general no ocurre CID y los signos más frecuentes son fiebre, anemia, aumento de la bilirrubina indirecta y prueba de antiglobulina directa positiva.

En la incompatibilidad Rh, con frecuencia se detecta fiebre como único signo de reacción adversa, aunque más tarde puede observarse íctero y algunas veces hemoglobinuria, debido a la destrucción eritrocitaria en el bazo por ADCC.

### **Anafilaxia**

La reacción de anafilaxia es poco frecuente y se caracteriza por hipotensión e incluso *shock*, sensación de “estrechamiento de la garganta”, estridor, dolor

subesternal, opresión torácica, disnea y síntomas gastrointestinales que incluyen dolor abdominal. Estos trastornos resultan de la reacción entre la IgA normal del donante y anti-IgA clase-específica del receptor. Este anticuerpo se encuentra en algunos sujetos con deficiencia de IgA (menos de 1 mg/L de plasma); la incidencia de estos individuos en la población normal es de 1/1 000. Las reacciones anafilácticas severas pueden conducir a la muerte y deben tratarse de urgencia, se debe detener la transfusión y administrar adrenalina en dosis de 0,5 a 1 mg por vía subcutánea o intramuscular y 100 a 200 mg de hidrocortisona. Esta reacción se evita al administrar a los pacientes con anti-IgA en plasma, sangre de donantes con déficit de IgA. Si no se cuenta con ello, deben lavarse los productos de la sangre que se va a transfundir.

### Urticaria

La urticaria es la reacción adversa más común a la transfusión de plasma (o a cualquier componente que contenga plasma). De hecho, la presentan del 1 al 3 % de los pacientes que reciben transfusión de plasma. La causa invocada es la reacción contra proteínas plasmáticas o a alérgenos presentes en el plasma del donante y la IgE del receptor. La urticaria es generalmente ligera, pero si es severa debe enlentecerse la transfusión y administrar antihistamínicos por vía intravenosa o intramuscular (por ejemplo: 10 mg de clorfeniramina). A los pacientes con antecedentes de urticaria en transfusiones previas debe administrárseles antihistamínicos antes de la transfusión.

### Reacción febril no hemolítica

La reacción febril no hemolítica se produce en pacientes que presentan anticuerpos antileucocitarios potentes, que reaccionan con los leucocitos presentes en la sangre o los componentes sanguíneos que se van a transfundir, generalmente de especificidad HLA. La característica más común en este tipo de reacción es la fiebre, a veces precedida por escalofríos, que comienza de 30 a 60 minutos de comenzada la transfusión. La causa de la fiebre es la liberación de citocinas y otros pirógenos liberados de los granulocitos y monocitos del receptor, estimulados por los productos de activación del complemento (C3a, C5a) o por activación de estas células al endocitar o lisar los leucocitos transfundidos unidos a anticuerpos. En ocasiones se producen reacciones febriles secundarias a citocinas y otras sustancias biológicas liberadas en los leucocitos presentes en sangre almacenada o concentrados de

plaquetas. Las reacciones febriles son comunes en pacientes que han tenido embarazos o transfusiones previas, los cuales han estimulado la generación de anticuerpos antileucocitarios.

La mayoría de las reacciones son ligeras y pueden manejarse con el enlentecimiento del ritmo de transfusión y la administración de antipiréticos. En aquellos pacientes que han tenido al menos dos reacciones febriles postransfusionales severas, debe administrarse sangre o concentrado de plaquetas desleucocitado (por remoción del *buffy coat* o con el empleo de filtros para leucodepleción).

### Daño pulmonar relacionado con la transfusión

El daño pulmonar relacionado con la transfusión se produce cuando el plasma del donante contiene leucoaglutininas potentes incompatibles con los granulocitos del receptor. La reacción puede ser severa y se caracteriza por escalofríos, fiebre, tos no productiva y disnea. En rayos X de tórax pueden observarse numerosos nódulos, predominantemente perihiliares, con infiltración de las bases pulmonares. Los donantes con estos anticuerpos son generalmente mujeres múltiples que desarrollaron leucoaglutininas durante sus embarazos.

## REACCIONES INMUNOLÓGICAS TARDÍAS

### Reacción hemolítica retardada

La reacción hemolítica retardada ocurre en individuos previamente inmunizados con antígenos extraños por una transfusión o un embarazo, pero en aquellos en los que la concentración del anticuerpo contra el antígeno extraño es tan baja que no puede detectarse por las pruebas pretransfusionales. En una próxima transfusión que contenga el antígeno para el que el individuo está inmunizado, se producirá una respuesta secundaria y, en unos pocos días, la concentración del anticuerpo se habrá elevado lo suficiente para causar destrucción de los eritrocitos transfundidos que contengan el antígeno de que se trate.

Los signos de la hemólisis retardada son la fiebre, caída de la concentración de Hb e ictero o hemoglobinuria, generalmente de 5 a 10 días después de la transfusión.

Las reacciones transfusionales hemolíticas retardadas ocurren en alrededor de 1 en 500 transfusiones, no suelen ser graves pero pueden producir serios efectos adversos en pacientes gravemente enfermos.

## Púrpura postransfusional

La púrpura postransfusional es una reacción grave, pero poco frecuente, producida por la presencia de anticuerpos antiplaquetarios (generalmente anti HPA-1a) en el receptor, que reaccionan con las plaquetas del donante. En estos casos, el receptor está inmunizado previamente a este antígeno plaquetario en un embarazo y, rara vez, por medio de una transfusión. Durante la nueva transfusión con plaquetas HPA-1a positivas, el receptor inmunizado desarrolla una respuesta secundaria que lleva a la destrucción de las plaquetas transfundidas y a las propias plaquetas HPA-1a negativas del paciente (por causas no bien precisadas, aunque se ha invocado la llamada lisis del espectador). La frecuencia del Ag HPA-1a en caucásicos es de alrededor del 2 %. El tratamiento para esta reacción es la administración de gammaglobulina intravenosa o la exanguinotransfusión.

## Refractariedad a las plaquetas

Entre el 10 y el 40 % de los pacientes que reciben múltiples transfusiones de plaquetas, desarrollan anticuerpos contra los antígenos del sistema principal de histocompatibilidad, presentes en estas células, y se vuelven refractarios a la transfusión de plaquetas de los donantes seleccionados al azar. A estos pacientes se les debe administrar plaquetas HLA compatibles o plaquetas compatibles por prueba cruzada.

## Reacción injerto contra huésped

Cuando se transfunden linfocitos T alogénicos inmunocompetentes a un individuo inmunodeprimido o inmunodeficiente, los linfocitos trasplantados pueden injertarse en el tejido linfoide o hematopoyético del receptor y convertirse en funcionales. Los linfocitos T trasplantados reconocen los antígenos de las células del receptor como extrañas y desarrollan una respuesta inmune humoral o celular contra el huésped, lo que produce el síndrome conocido como enfermedad de injerto contra huésped. Esta reacción puede producirse también cuando un receptor inmunocompetente recibe linfocitos T de un familiar o donante histocompatible, el cual comparte uno de sus haplotipos HLA para el cual el receptor es homocigótico. De este modo, el receptor reconocerá al donante como idéntico, pero el donante lo reconocerá a él como extraño.

Los componentes celulares de la sangre contienen un número considerable de linfocitos: la sangre total contiene  $100 \times 10^7$ /unidad; los eritrocitos lavados,  $25 \times 10^7$ /unidad; los concentrados de plaquetas,  $4 \times 10^7$ /unidad; las plaquetas por aféresis de donante único,  $30 \times 10^7$ /unidad y los granulocitos, alrededor de  $500 \times 10^7$ /unidad.

La reacción suele presentarse antes de los treinta días de recibir la transfusión. El primer signo es generalmente la fiebre, seguida de un *rash* maculopapular generalizado, el cual puede evolucionar a la formación de bulas y descamación. Otras manifestaciones clínicas incluyen diarrea acuosa profusa, y hepatomegalia con elevación de las transaminasas hepáticas e hiperbilirrubinemia. El diagnóstico puede confirmarse por biopsia de piel. En la reacción de tipo postransfusional puede observarse, además, pancitopenia, debido a la reacción de los linfocitos T del donante con las células de la médula ósea del receptor, la que puede llevar a manifestaciones hemorrágicas e infecciones, e incluso a la muerte.

La reacción puede prevenirse:

1. Si se administran productos de la sangre irradiados a 25 Gy (2 500 rads) para inactivar los linfocitos, lo que impide su respuesta proliferativa ante la estimulación antigénica.
2. Si se disminuye el número de leucocitos transfundidos a menos de  $1 \times 10^7$ /unidad, que es la cifra requerida para producir reacción de injerto contra huésped.

Deben recibir productos celulares de la sangre irradiados: los receptores de trasplante de médula ósea, los pacientes con síndromes de inmunodeficiencia congénita, los fetos, los recién nacidos prematuros, los pacientes con enfermedades hematológicas malignas, los pacientes que reciben altas dosis de quimioterapia por tumores sólidos y los pacientes que van a recibir sangre de familiares.

## Inmunomodulación

Algunos estudios en seres humanos y en animales de experimentación, plantean un efecto inmunosupresor de la transfusión de sangre o sus componentes, reflejado en algunos efectos negativos como: el incremento de la frecuencia de las infecciones bacterianas posoperatorias, y el aumento de la recurrencia del carcinoma colorrectal; o en efectos positivos, como la mayor sobrevida de los trasplantes renales. Al parecer, son los leucocitos, y fundamentalmente los linfocitos, los generadores de este efecto inmunosupresor.

## REACCIONES NO INMUNOLÓGICAS INMEDIATAS

### Transfusión de sangre infectada

La contaminación bacteriana de los componentes sanguíneos es rara, y en los concentrados de eritrocitos se debe fundamentalmente al crecimiento en frío de bacterias gramnegativas productoras de toxinas, como las *Pseudomonas*, la *Escherichia coli*, la *Citrobacter* *freundii* y la *Yersinia enterocolitica*. En las plaquetas, los organismos contaminantes pueden ser grampositivos y gramnegativos.

La reacción transfusional debida a sangre contaminada se caracteriza por enrojecimiento facial, fiebre alta, *cramps* abdominales, vómitos, diarreas y *shock*. A veces ocurre CID. El tratamiento consiste en antibióticos y esteroides.

La contaminación bacteriana de la sangre puede prevenirse con una cuidadosa preparación del sitio de venipuntura durante la donación, si se siguen correctamente las normas de preparación de los componentes y no se excede en 4 horas el tiempo de administración de la transfusión. Deben adoptarse otras medidas, tales como evitar perforaciones de las bolsas durante el proceso de preparación de componentes, no exponer la bolsa directamente al agua de los baños a 37 °C en el proceso de descongelación de plasma o crioprecipitado (introducirla en otra bolsa). Debe interrogarse cuidadosamente a los donantes para explorar si no han tenido traumas de mucosas que puedan haber producido bacteriemia por algunos días (procedimiento estomatológico, colonoscopia o sigmoidoscopia y manipulación del tracto genitourinario, entre otros).

El que realice la transfusión debe observar la sangre antes de su administración para buscar signos de contaminación visible tales como alteraciones en la coloración de la sangre, presencia de coágulos o agregados, color oscuro del plasma debido a hemólisis, o la presencia de gas en la unidad.

### Hemólisis no inmune

Existen diferentes causas de hemólisis no inmune, entre ellas:

1. El sobrecalentamiento de la sangre, debido al uso de un calentador o a un refrigerador no bien controlados.
2. La congelación accidental.
3. La dilución de los eritrocitos con solución hipotónica de dextrosa al 5 % en agua.
4. La dilución de los eritrocitos en solución de ringer lactato, que puede revertir la acción anticoagulante

del citrato y causar la formación de coágulos y la subsecuente hemólisis.

5. La entrada accidental de agua destilada en el torrente sanguíneo producirá hemólisis intravascular.
6. La transfusión de eritrocitos por medio de agujas de calibre estrecho, a presión.
7. La contaminación bacteriana de la unidad de sangre puede provocar hemólisis de esta.
8. Aunque poco frecuente, si un paciente con tratamiento con quinina recibe sangre de un donante con deficiencia de glucosa-6 fosfato deshidrogenasa (G6PD), puede hemolizar los eritrocitos del donante.
9. Un paciente con hemoglobinuria paroxística nocturna puede hemolizar sus propios eritrocitos, especialmente después de recibir una transfusión de productos sanguíneos que contengan complemento.

Si se demuestra hemólisis y se detectan eritrocitos residuales de la unidad transfundida sin hemolizar, debe sospecharse una reacción hemolítica inducida por anticuerpos.

### Sobrecarga de citrato

Cuando se transfunden grandes volúmenes de sangre total o plasma, pueden elevarse los niveles de citrato proveniente del anticoagulante. El citrato depleta los niveles de calcio, y produce hipocalcemia, lo que puede provocar signos tales como sensación de adormecimiento en los labios, calambres, alteraciones del ritmo cardíaco y tetania. Esta situación puede verse en casos de transfusiones masivas. La reacción se revierte con la administración de gluconato de calcio por vía intravenosa.

### Sobrecarga de potasio

En la sangre almacenada por períodos mayores de los 5 días, comienza a liberarse el potasio intracelular, por lo que aumenta la concentración de potasio extracelular. Si se administra en grandes volúmenes a un paciente, puede producir hiperpotasemia con la consiguiente hipocalcemia. Esto evita el empleo de sangre de más de 5 días para las transfusiones masivas, la exanguinotransfusión y la transfusión a fetos y neonatos.

### Sobrecarga de volumen

La sobrecarga de volumen, producto de la transfusión de sangre o sus componentes, es más común en pacientes con compromiso cardiovascular, enfermedad



pulmonar o anemia crónica normovolémica, así como en los recién nacidos, fundamentalmente los prematuros. Los síntomas incluyen disnea y tos por edema pulmonar, así como un súbito incremento de la presión sistólica.

En los pacientes con alto riesgo de desarrollar reacción postransfusional hipervolémica, debe administrarse la transfusión de forma lenta y evitar el empleo de sangre total.

## REACCIONES NO INMUNOLÓGICAS TARDÍAS

### Transmisión de infecciones

**Hepatitis.** Es la infección más común transmitida por la transfusión y no es más que la inflamación del hígado. Puede ser causada por muchos agentes tóxicos e infecciosos diferentes, que incluyen virus de la hepatitis A, B, C, D y E, así como CMV, virus de Epstein-Barr (EBV) y otros. Los agentes infecciosos que plantean una amenaza grave para los que reciben una transfusión son los que persisten en la circulación de individuos asintomáticos que se encuentran suficientemente sanos como para ser donantes de sangre.

El virus de la hepatitis A circula solo transitoriamente. Tiene un período de incubación de 15 a 50 días y la viremia puede estar presente hasta 28 días antes del desarrollo de los síntomas. La sangre donada durante esta fase virémica podría ser infecciosa, pero solo se han documentado algunos casos transmitidos por transfusión. Su cronicidad es muy rara.

El virus de la hepatitis B es un virus de tipo ADN con una cubierta lipoproteica, en la cual se encuentra el antígeno de superficie (antígenos HB). La hepatitis B puede ser transmitida por personas que tienen una hepatitis viral aguda o que son portadoras del antígeno de superficie de forma parenteral, sexual o de madre a hijo. El período de incubación varía de 4 a 12 semanas. Del 20 al 40 % de los adultos que adquieren hepatitis B pueden ser asintomáticos y entre el 0,2 y el 0,5 % desarrollan una hepatitis fulminante y fatal.

Las personas con antígeno de superficie positivo deben ser consideradas potencialmente infecciosas y son excluidas como donantes de sangre. En otros países, por ejemplo en los Estados Unidos, las pruebas de pesquisa incluyen, además, determinaciones de anticuerpos contra el antígeno nuclear del virus. Este comienza a aparecer en el estado de infección aguda y permanece en el período de convalecencia y años después. El riesgo de transmisión de hepatitis B por transfusión en Cuba está en 1:200 000 unidades.

El virus de la hepatitis C ocupa el primer lugar de los virus transmitidos por la sangre. Es un virus ARN, tiene una envoltura lipídica, susceptible a la inactivación por solventes/detergentes. Tiene un período de incubación de 7 a 8 semanas. Cerca del 75 % de los casos son anictéricos y pueden presentar alteraciones como fiebre y anorexia. Los pacientes ictericos desarrollan una hepatitis aguda. El aspecto más importante de esta infección es su cronicidad. Se plantean las mismas vías de transmisión que para la hepatitis B. Las pruebas de pesquisa serológica que existen en la actualidad determinan anticuerpos contra el virus y se ha logrado acortar el período para detectar estos anticuerpos a 15 semanas. Las personas con una prueba de anticuerpos contra hepatitis C positiva, deben ser excluidas como donantes de sangre.

El riesgo de transmisión de hepatitis C por transfusión, está en 1:3 300 unidades en nuestro país.

**Virus de inmunodeficiencia humana (VIH).** El VIH es un lentivirus, perteneciente a la familia retrovirus, de tipo ARN, de 100 nm, con una envoltura (gp41) y un núcleo o core (p24), que infecta preferencialmente los linfocitos CD4 positivos, aunque también infecta otras células que expresan este marcador. Existen 2 tipos de virus, el VIH-1 y el VIH-2. El núcleo viral contiene una enzima, la transcriptasa reversa, que permite que el virus copie su RNA en ADN; el ADN viral es integrado al ADN del huésped. El virus se replica entonces y se disemina inicialmente. Después de un período corto de exposición al virus, se detecta por primera vez la viremia en plasma y en esta etapa aparece el antígeno p24. Durante esta viremia, del 20 al 50 % de las personas con infección aguda tienen una enfermedad similar a la mononucleosis, con fiebre, adenopatías, odinofagia, erupción, artralgias y mialgias con cefalea o sin ella, vómitos y diarreas. El virus puede ser transmitido por sangre o secreciones genitales en esta fase. También puede transmitirse de madre a hijo. Más tarde aparece la respuesta de anticuerpos contra proteínas de la envoltura (gp41 y gp120).

Después del establecimiento de las pruebas de donantes para prevenir la infección por VIH postransfusión en 1985, el riesgo de VIH transmitido por transfusión de componentes sanguíneos ha declinado notablemente.

El riesgo de las donaciones seronegativas variará en proporción con la incidencia de infección por VIH en la comunidad de los donantes. Las estimaciones globales recientes de riesgo de VIH postransfusión en los Estados Unidos se aproximan a 1:420 000 transfusiones y en Cuba el riesgo de infección por VIH-1 está

entre 1:40 000-1:400 000. Para realizar la pesquisa de VIH-1 y VIH-2 se utiliza un enzimoimmunoensayo en todos los bancos de sangre y para realizar el confirmatorio. La prueba más utilizada es el *Western-blot* (WB). En esta prueba se separan los componentes proteicos (material viral antigénico) en bandas, según el peso molecular, y son transferidas a una membrana de nitrocelulosa. El (los) anticuerpo (s) en el suero de prueba reacciona (n) con bandas individuales, según la (s) especificidad (es) presente (s).

Un suero de prueba completamente reactivo debe reaccionar con las proteínas gag p17, p24, p26, p55; las proteínas pol p31, p56 y p66 y las glicoproteínas env gp41, gp120 y gp160. Una muestra se define como anti-VIH positiva si se presentan como mínimo 2 de las siguientes bandas: p24, gp41, gp120/160.

Los resultados del WB clasificados como indeterminados, tienen algunas bandas presentes, pero no las del criterio para la positividad del VIH. En el caso de donantes sanos que muestran resultados indeterminados por más de 6 meses pueden ser tranquilizados en cuanto a que es improbable que tengan una infección por VIH, pero no son elegibles para donar sangre.

**Virus linfocitotrópico humano de células T (HTLV).** Es un retrovirus. Se desconoce su período de incubación y puede transmitirse de manera sexual, perinatal y parenteral, aunque a diferencia de los anteriores no es transmitido por el uso de plasma. El virus linfocitotrópico de células T humanas de tipo I, fue el primer retrovirus humano aislado y el primero en estar causalmente asociado con una enfermedad maligna de los seres humanos, el linfoma-leucemia de células T del adulto; también se asocia con la paraparesia espástica tropical o mielopatía asociada con HTLV.

La prevalencia de la infección por HTLV-I muestra un agrupamiento geográfico notable, endémicos sobre todo en el sur de Japón, África, el sur del Sahara, la Cuenca del Caribe y Brasil. La transmisión es por contacto sexual, por exposición parenteral a la sangre y de madre a hijo por medio de la leche materna.

El virus linfocitotrópico de células T humanas tipo II, fue descubierto varios años después del HTLV-I. También muestra agrupamiento, pero en diferentes poblaciones. Se ha observado una prevalencia elevada entre algunas poblaciones de nativos americanos. La única enfermedad asociada ha sido la mielopatía asociada con HTLV.

La infección con el HTLV-I y HTLV-II persiste toda la vida y existe una probabilidad de transmisión por medio de la transfusión de 1 x 50 000 en países desarrollados. En nuestro país es de 1:69 272.

**Citomegalovirus (CMV).** Es un virus ADN perteneciente a la familia de los herpes virus. La infección primaria puede ser asintomática o dar un cuadro parecido a la mononucleosis. Permanece en estado latente en los leucocitos y en ocasiones es difícil determinar si la infección activa es producto de la transfusión o si es una reactivación de una infección por CMV latente. En personas sanas, la infección puede ser asintomática o no; en los individuos inmunocomprometidos, es devastadora y causa problemas multiorgánicos que incluyen neumonía, hepatitis y citopenias. Por tal motivo, los componentes celulares de la sangre CMV negativos deben ser administrados a pacientes CMV negativos, sobre todo si estos están inmunocomprometidos como: recién nacidos pretérmino (RNPT), pacientes con trasplantes de órganos o de médula ósea, pacientes con inmunodeficiencias congénitas o con SIDA, mujeres en estado de gestación CMV negativas. Los eritrocitos congelados, una vez desglícerolizados pueden ser usados como fuente alternativa de sangre CMV negativa. El uso de filtros para leucorreducción es otra alternativa para la prevención de infección por este virus.

**Parvovirus B19.** Es un virus envuelto, no lipídico, resistente a los tratamientos de inactivación viral. Ha sido encontrado en concentrados del factor VIII y del factor IX, por lo que el uso de filtros para leucorreducción no disminuye su infectividad. El parvovirus B19 causa la llamada “quinta enfermedad”. Su receptor es el antígeno P de las células rojas. En pacientes con anemias hemolíticas crónicas puede causar una crisis aplásica aguda. La incidencia de seropositividad para el parvovirus B19 es de aproximadamente el 10 % en niños menores de 5 años y del 60 % en adultos mayores de 20 años de edad. La principal vía de transmisión es la respiratoria, pero también por transfusión de sangre.

Se estudia la transmisibilidad y la importancia clínica de otros virus como el virus de Epstein-Barr, virus del herpes humano 6, así como del agente de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob. En relación con esta última, se plantea que es una infección fatal del sistema nervioso, causada por una partícula proteica más pequeña que un virus, denominado prion. En Estados Unidos existe alrededor de 1 caso de esta enfermedad por millón de personas. En la mayoría de los casos se desconoce el modo de adquisición, aunque se ha transmitido la enfermedad mediante la administración de la hormona del crecimiento derivada de hipófisis humana, trasplante de córnea, aloinjerto de duramadre e inserción de electrodos intracerebrales contaminados. Hasta el momento no se ha comunicado

si existe transmisión de esta enfermedad por la transfusión de sangre, pero debe tenerse en cuenta que los individuos con riesgo elevado de esta enfermedad deben ser excluidos de la donación de sangre.

Además de la contaminación viral, la sangre puede sufrir la contaminación bacteriana y parasitaria, lo que constituye una causa importante de morbilidad y mortalidad por transfusión.

Los microorganismos que se multiplican en la sangre y componentes refrigerados se describen como psicrofílicos y a menudo son gramnegativos. La infusión de componentes con contaminación bacteriana puede causar un *shock* séptico, con tasas de mortalidad de hasta el 26 %. Se han reportado reacciones postransfusión por *Pseudomonas*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli* y *Yersinia enterocolitica*, *Bartonella* y especies de *Brucella*.

Otra enfermedad transmitida por la sangre es el paludismo, el cual es causado por varias especies del protozoario intraeritrocíticos del género *Plasmodium*. En los Estados Unidos, el paludismo es probablemente la complicación parasitaria más reconocida de la transfusión: se estima que el riesgo es de 0,25 casos por millón de transfusiones. Las normas de la Asociación Americana de Bancos de Sangre (AABB) rechazan la donación de eritrocitos de las personas que han tenido paludismo en los 3 años precedentes. Los viajeros casuales a regiones donde el paludismo es endémico son rechazados por 1 año.

La sífilis, la babesiosis, la toxoplasmosis y la enfermedad de Chagas también pueden ser transmitidas por la transfusión de sangre.

### Hemosiderosis

Cada unidad de sangre contiene alrededor de 200 mg de hierro (Walter, 1993) y el organismo tiene la capacidad de eliminar 1 mg diario. La hemosiderosis es una condición causada por la deposición de hierro en órganos vitales, tales como el hígado y el corazón, lo que provoca su mal funcionamiento. Ocurre en pacientes sometidos a regímenes crónicos de transfusiones como los talasémicos. Para evitar la hemosiderosis se utilizan los quelantes de hierro como la desferroxamina y la transfusión de neocitos (eritrocitos jóvenes obtenidos por aféresis) para lograr un espaciamiento de las transfusiones en los pacientes de riesgo.

## MEDIDAS QUE SE DEBEN ADOPTAR ANTE LA SOSPECHA DE UNA REACCIÓN POSTRANSFUSIONAL INMEDIATA

Cualquier síntoma o signo adverso que se presente durante la transfusión de sangre, debe considerarse como una reacción potencialmente fatal. La responsabilidad en el reconocimiento de una reacción recae en la persona encargada de administrar la sangre (técnico transfusionista, médico o enfermera). Ante cualquier reacción deben emprenderse las siguientes acciones:

1. Detener inmediatamente la transfusión.
2. Avisar al médico responsable.
3. Mantener la línea venosa con solución salina fisiológica.
4. Comprobar las etiquetas, formularios e identificación del paciente para verificar si este ha recibido el componente previsto.
5. Comunicar inmediatamente al servicio de transfusiones la sospecha de reacción postransfusional.
6. Enviar al servicio de transfusiones lo antes posible muestras de sangre del receptor, junto con la bolsa de sangre interrumpida, el equipo de transfusión y todos los formularios y etiquetas.

## INVESTIGACIÓN DE UNA REACCIÓN TRANSFUSIONAL HEMOLÍTICA INMEDIATA

Adicionalmente, deben realizarse las siguientes investigaciones:

1. Comprobar el grupo sanguíneo del paciente y de la bolsa de sangre transfundida. Si hay alguna discrepancia, advertir inmediatamente al médico del paciente. Después de comprobar si el paciente se encuentra en situación de riesgo y adoptar las medidas terapéuticas correspondientes, se debe seguir cada paso del proceso transfusional para encontrar el error.
2. Comparar la muestra pretransfusional con la postransfusional, en cuanto a color del suero o el plasma. La coloración rosado-rojiza presente en la muestra postransfusional, pero no en la pretransfusional puede indicar la presencia de Hb libre por destrucción de los eritrocitos. La observación de una coloración pardo amarillenta por la presencia de productos de degradación de la Hb como la bilirrubina, pueden indicar hemólisis reciente en muestras extraídas de 5 a 7 horas después de la transfusión.

3. Realizar la prueba de antiglobulina directa en la muestra postransfusional. Si los eritrocitos incompatibles transfundidos no se destruyen inmediatamente, esta prueba será positiva con patrón mixto. Debido a que los eritrocitos circulantes recubiertos con anticuerpos o complemento pueden destruirse muy rápidamente, la prueba de antiglobulina directa puede ser negativa si se extrajo la muestra varias horas después de la reacción.
4. Los resultados positivos de cualquiera de estos procedimientos deben investigarse para determinar si existen anticuerpos antieritrocitarios.
5. Examen de la orina postransfusional. Observar si tiene coloración oscura y, de ser así, determinar si hay hemoglobinuria.
6. Si se sospecha CID, determinar en una muestra postransfusional anticoagulada, el tiempo de protrombina, el tiempo parcial de tromboplastina, recuento de plaquetas, fibrinógeno y productos de degradación de la fibrina.
7. Si se observa hemólisis determinar a intervalos frecuentes la Hb/Hto.

### INVESTIGACIÓN DE POSIBLES ALOANTICUERPOS ERITROCITARIOS

La investigación de posibles aloanticuerpos eritrocitarios debe seguir los pasos siguientes:

1. Repetir la tipificación ABO y RhD en la muestra pretransfusional del paciente y en la bolsa.
2. Analizar los sistemas ABO y RhD en la muestra postransfusional, un patrón mixto de aglutinación sugiere la presencia de donante incompatible.
3. Si la tipificación ABO y RhD de las dos muestras del paciente no concuerdan, se ha producido un error en la identificación de este, en la tipificación o en la extracción de sangre. Si la muestra del donante no pertenece al grupo ABO indicado, se ha producido un error en las pruebas de compatibilidad.
4. Repetir las pruebas de compatibilidad con una fase de antiglobulina y analizar los sueros de la muestra pretransfusional y postransfusional frente a una muestra de eritrocitos de la bolsa o de un segmento de esta.
5. Realizar pruebas de detección de anticuerpos eritrocitarios en las muestras pretransfusional y postransfusional. Si cualquiera de las pruebas es positiva, identificar los anticuerpos. Si se identifican anticuerpos, fenotipar los eritrocitos de la muestra pretransfusional del paciente para asegurarse de la ausencia del antígeno correspondiente.

6. De ser necesario, transfundir nuevamente al paciente, administrarle sangre carente del antígeno específico para los anticuerpos del receptor.

### INVESTIGACIÓN DE UNA POSIBLE REACCIÓN POSTRANSFUSIONAL INMEDIATA BACTERIANA

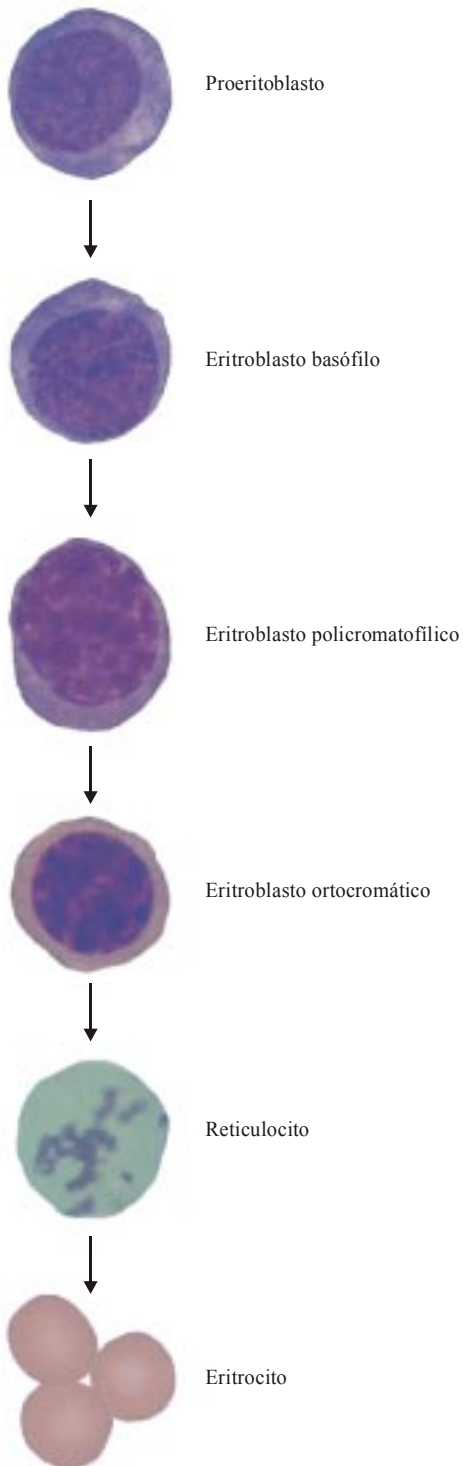
La investigación de una posible reacción postransfusional inmediata bacteriana debe seguir los pasos siguientes:

1. Antes de manipular excesivamente la bolsa, se deben obtener muestras de esta para cultivos a 4 °C, de 20 a 24 °C y de 35 a 37 °C. Examinar un frotis de sangre teñido con tinción de Gram para la búsqueda de bacterias.
2. Examinar el plasma del sobrenadante de la bolsa para detectar Hb libre. Si se encuentra presente, la unidad de sangre puede haber sufrido hemólisis por temperaturas de conservación o transporte incorrectas o por la inyección de fármacos, soluciones hipotónicas o contaminación bacteriana.
3. Considerar la posibilidad de hemólisis mecánica, que puede producirse al utilizar bombas peristálticas como las que se emplean en cirugía cardiovascular.

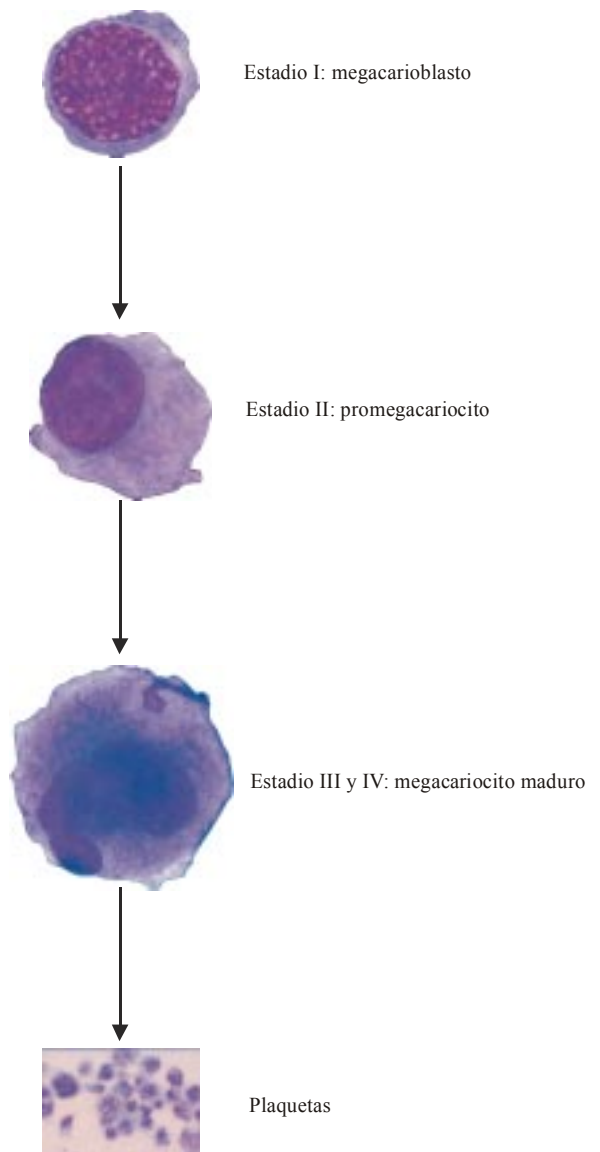
Las restantes reacciones postransfusionales inmediatas, aunque requieren la adopción de medidas, no suelen necesitar estudios urgentes de laboratorio.

### BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

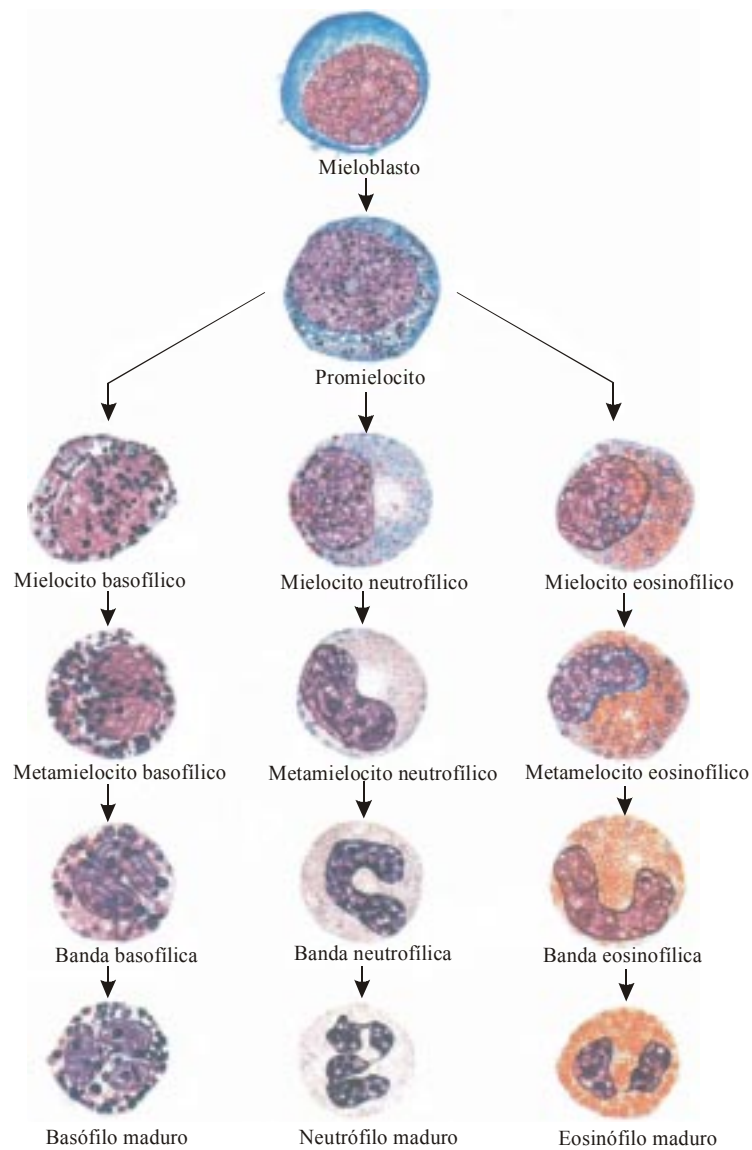
- American Association of Blood Bank-Asociación Española de Hematología y Hemoterapia. Manual técnico. 10ª ed. Barcelona: Pecaló, 1990, p. 407-19.
- Blumberg N, Triulzi DJ, Heal JM. Transfusion-induced immunomodulation and its clinical consequences. *Transfus Med Rev* 1990;4:24-5.
- Boral LI, Henry JB: Transfusion Medicine. In: Clinical diagnosis and management by laboratory methods. 9th edition. WB Sanders Co., Philadelphia, 1996:793-844.
- Genetet B, Mannoni P. Antecedentes históricos. En: Genetet B, Mannoni P. La transfusión. Ciudad de La Habana: Ed. Científico-Técnica, 1984, p. 1-9.
- Kasper CK. Transfusion risks: What's necessary? *Hemophilia Bull.* 1998, November; 1-4.
- Marcela Contreras, Ed. ABC of transfusion. 3rd ed. BMJ Books. 1998, Bristol, UK.
- Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M. Blackwell: Blood transfusion in clinical Medicine. 10th ed. Science LTD, London, 1997.
- Stehling L, Luban NLC, Anderson KC, Sayers MH, Carbonell F. Transfusión masiva. En: López Borrascas A. Enciclopedia iberoamericana de hematología IV. Salamanca: Universidad de Salamanca; 1992. p. 235-9.



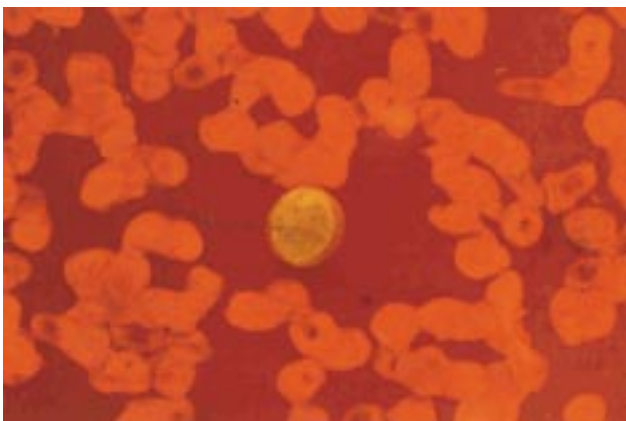
**Figura 3.3** Serie eritropoyética. Secuencia de maduración.



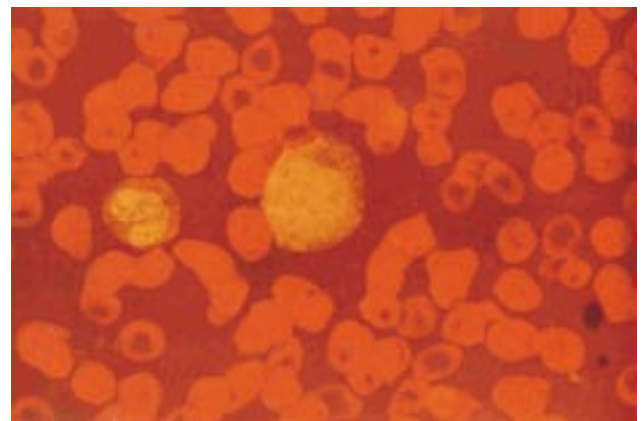
**Figura 3.10** Serie megacariopoyética. Secuencia de maduración.



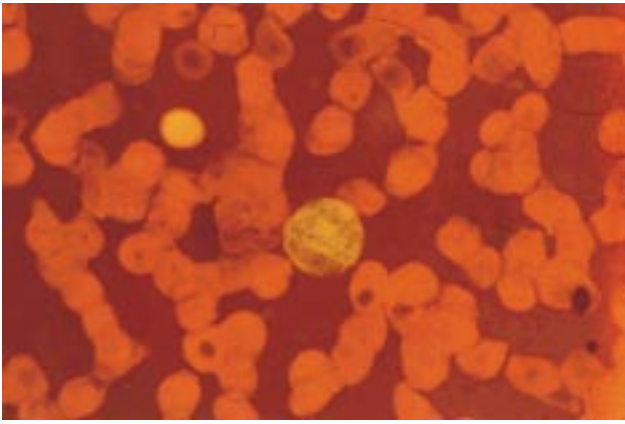
**Figura 3.11** Serie granulopoyética. Secuencia de maduración.



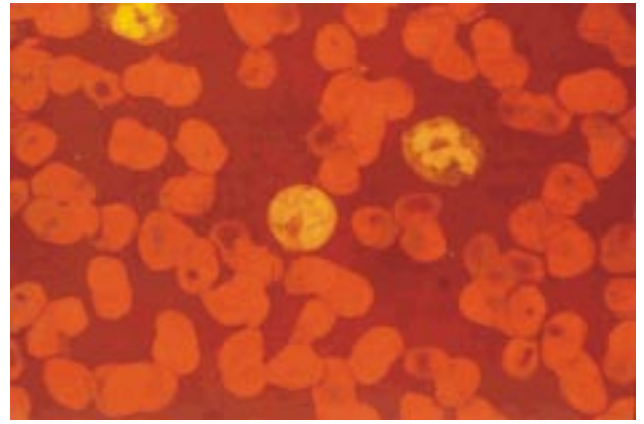
**Figura 3.12** Mieloblasto.



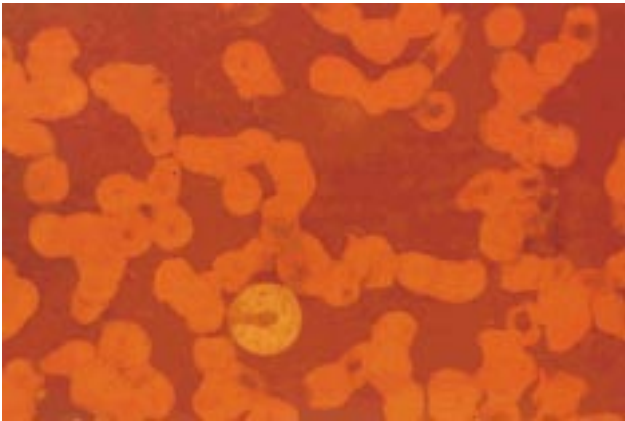
**Figura 3.13** Promielocito.



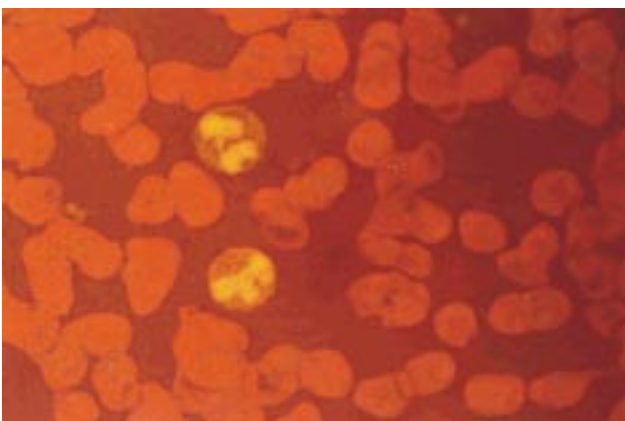
**Figura 3.14** Mielocito.



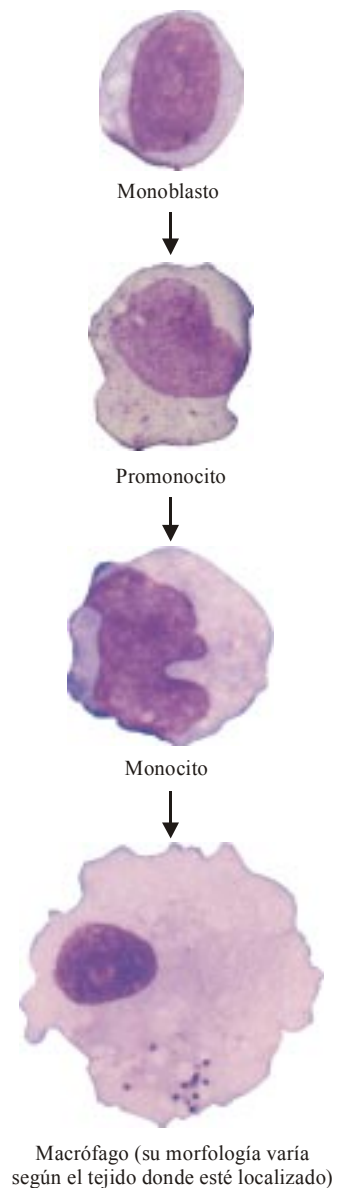
**Figura 3.15** Metamielocito.



**Figura 3.16** Stab o banda o cayado.

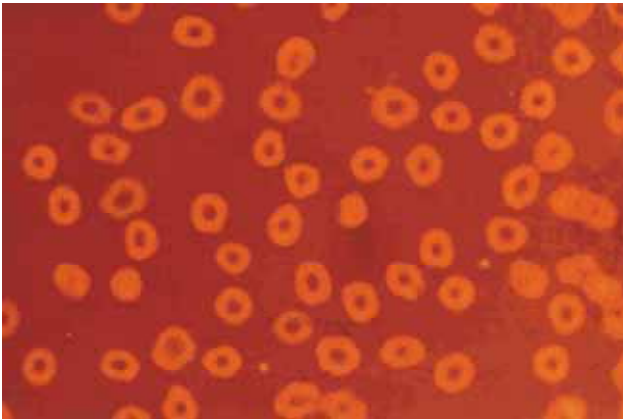


**Figura 3.17** Segmentado.

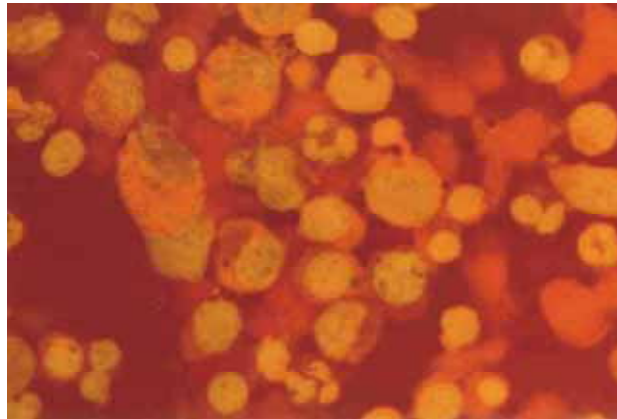


**Figura 3.18** Serie monocítica. Secuencia de maduración.

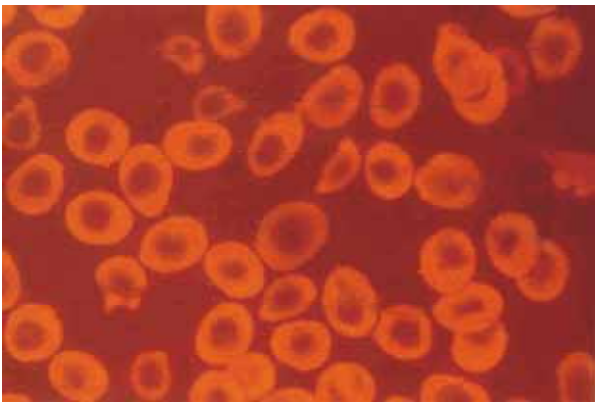




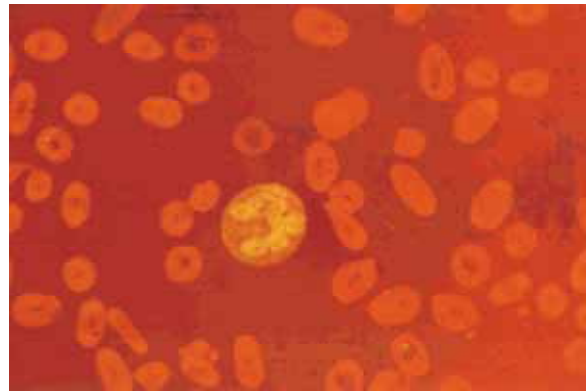
**Figura 3.25** Anemia ferropénica (lámina periférica).



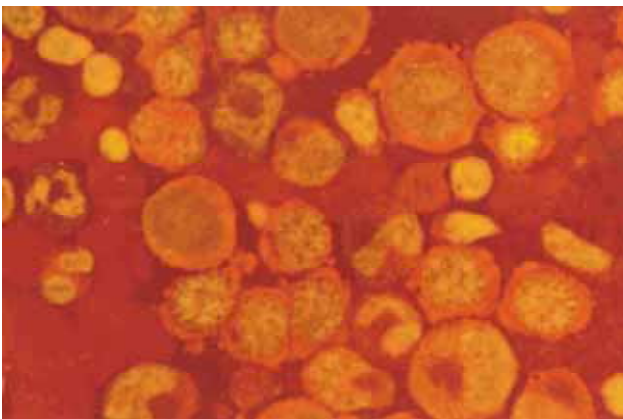
**Figura 3.26** Anemia ferropénica (medulograma).



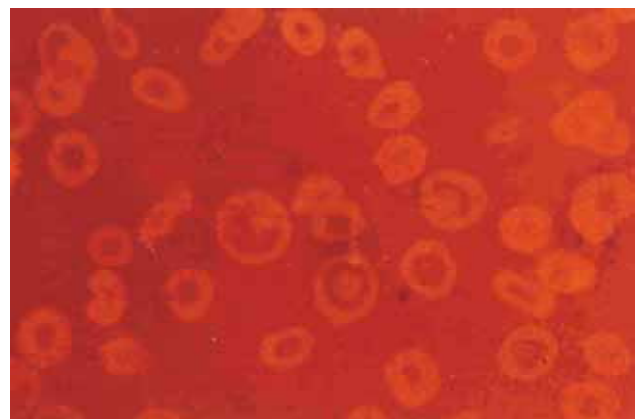
**Figura 3.28** Anemia megaloblástica (lámina periférica).



**Figura 3.29** Hipersegmentación de los neutrófilos (lámina periférica).

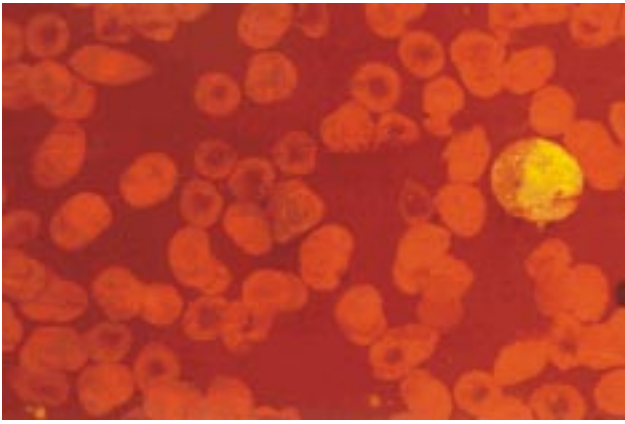


**Figura 3.30** Anemia megaloblástica (medulograma).

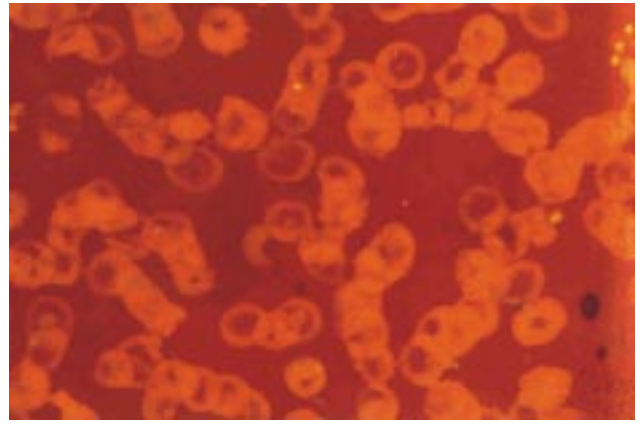


**Figura 3.32** Alteraciones eritrocitarias en la anemia hemolítica (lámina periférica).

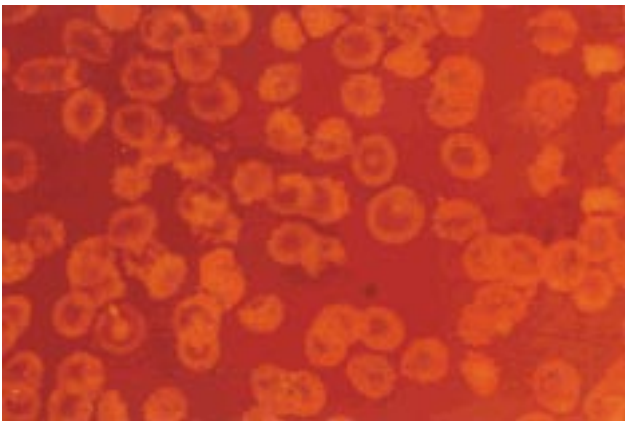




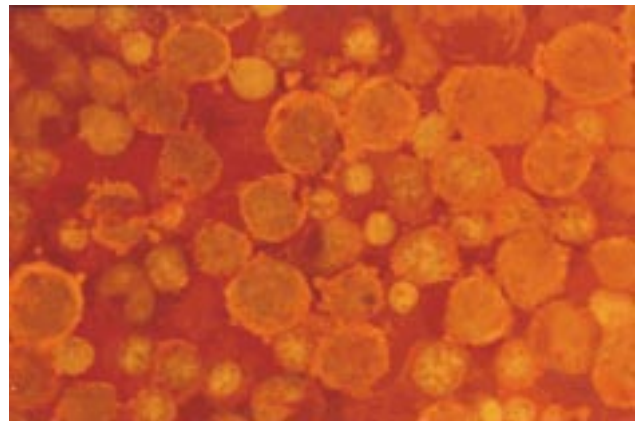
**Figura 3.33** Anillos de Cabot en la anemia hemolítica (lámina periférica).



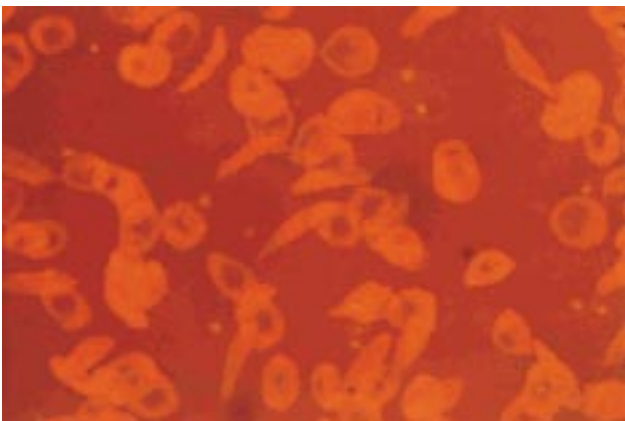
**Figura 3.34** Corpúsculos de Jolly-Howell en anemia hemolítica (lámina periférica).



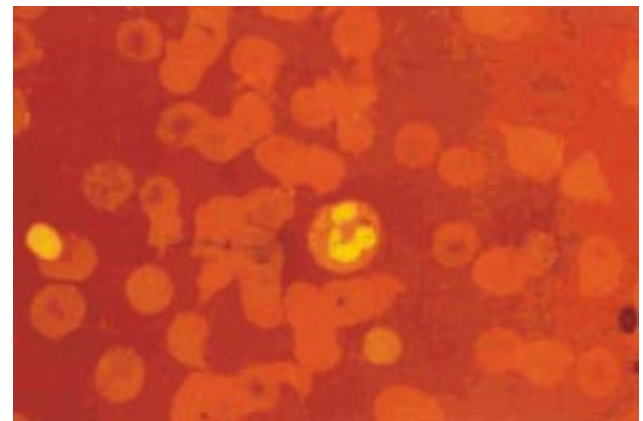
**Figura 3.35** Crenocitos en la anemia hemolítica (lámina periférica).



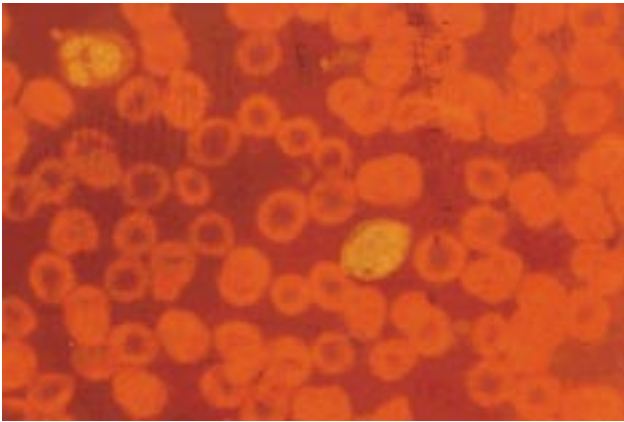
**Figura 3.36** Anemia hemolítica (medullograma).



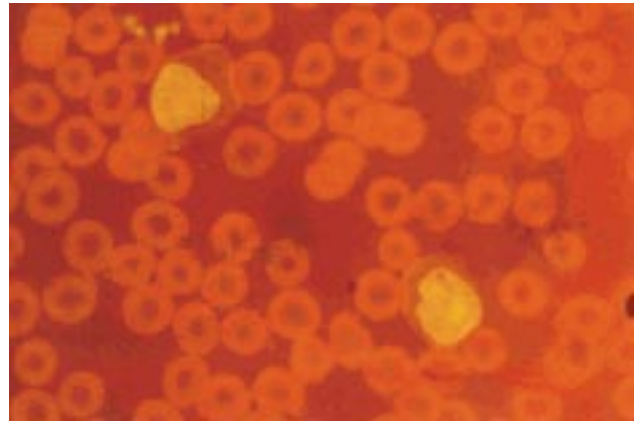
**Figura 3.40** Drepanocitos en la anemia hemolítica (lámina periférica).



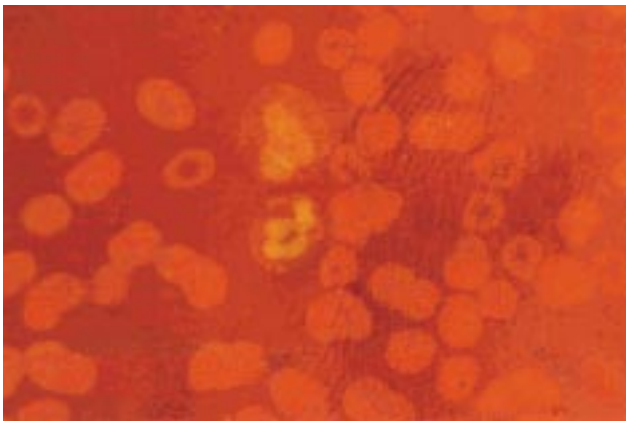
**Figura 3.41** Anemia microangiopática (lámina periférica).



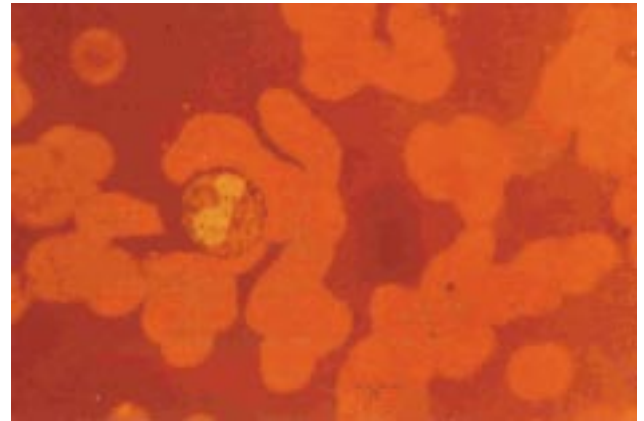
**Figura 3.42** Leucocitos normales (lámina periférica).



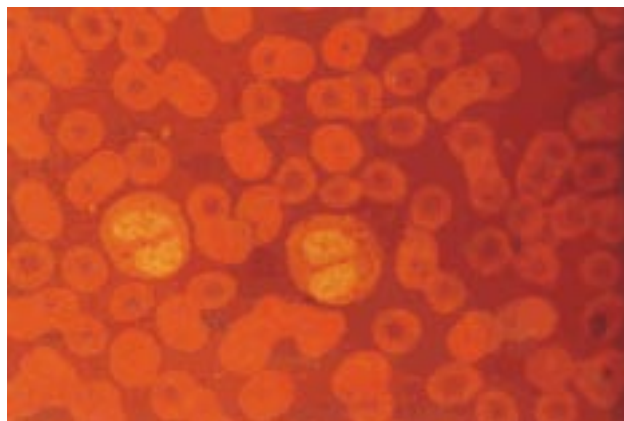
**Figura 3.44** Células linfomonocitarias (lámina periférica).



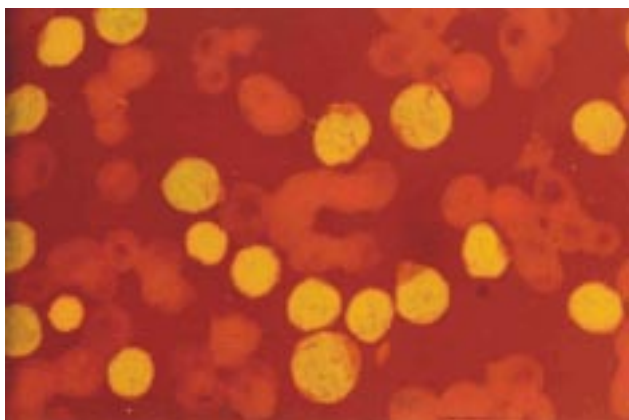
**Figura 3.45** Cuerpos de Döhle (lámina periférica).



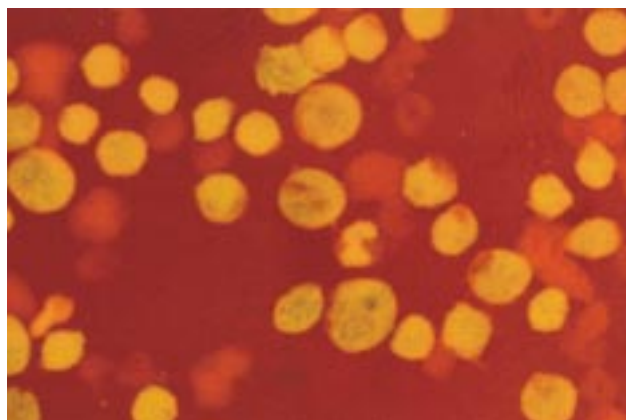
**Figura 3.46** Gránulos tóxicos y vacuolas citoplasmáticas en los neutrófilos (lámina periférica).



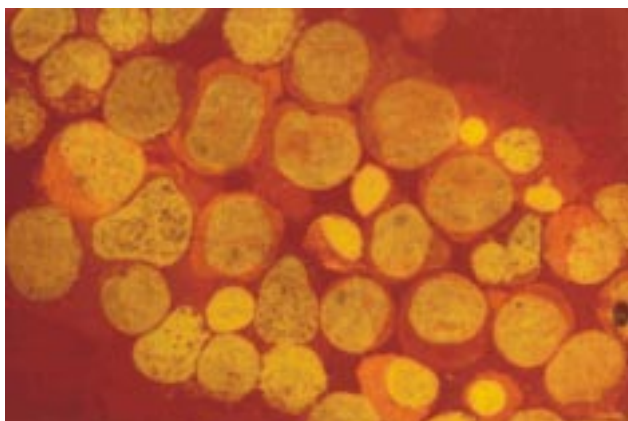
**Figura3.47** Eosinófilo con vacuolas citoplasmáticas (lámina periférica).



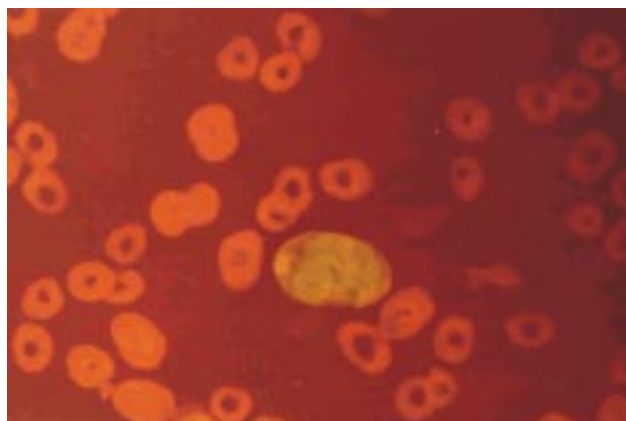
**Figura 3.50** Leucemia linfoide aguda LLA ( $L_2$ ) (lámina periférica).



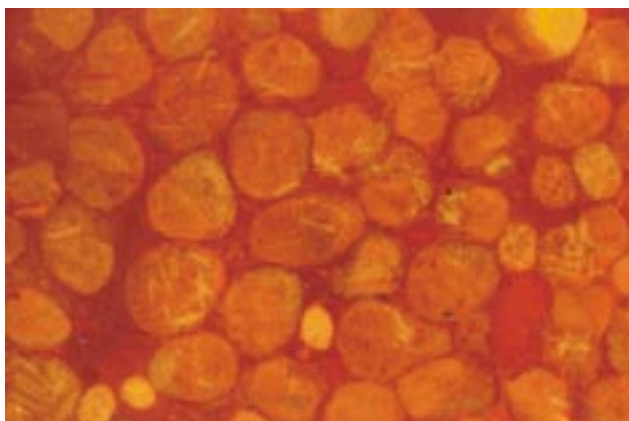
**Figura 3.51** Médula de leucemia linfoide aguda LLA ( $L_2$ ).



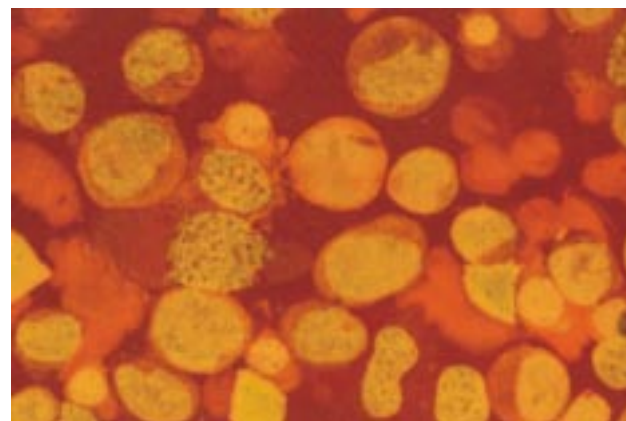
**Figura 3.52** Médula de leucemia mieloide aguda ( $M_2$ ).



**Figura 3.53** Leucemia mieloide aguda ( $M_3$ ) hipergranular (lámina periférica).

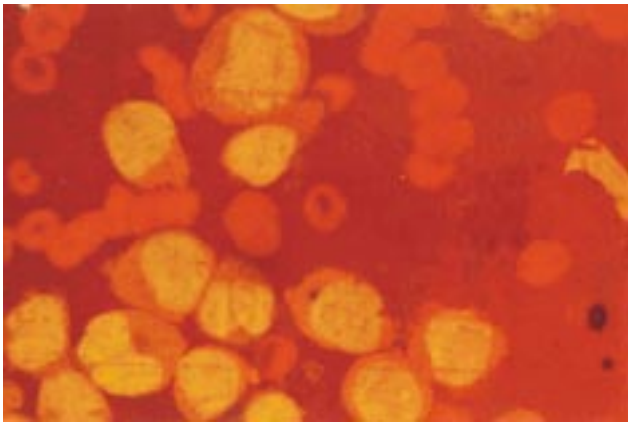


**Figura 3.54** Médula de leucemia mieloide aguda ( $M_3$ ) hipergranular.

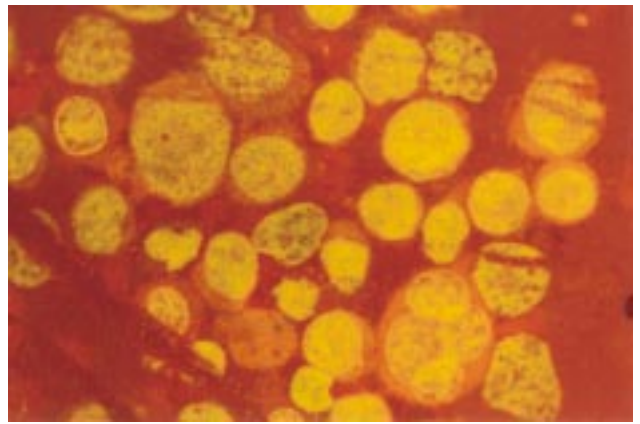


**Figura 3.55** Médula de leucemia mieloide aguda ( $M_4$ ).

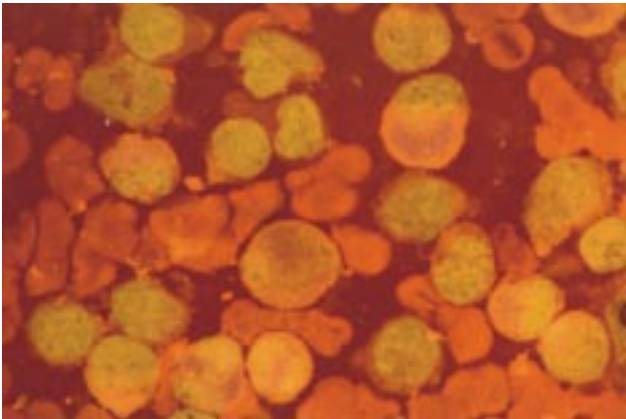




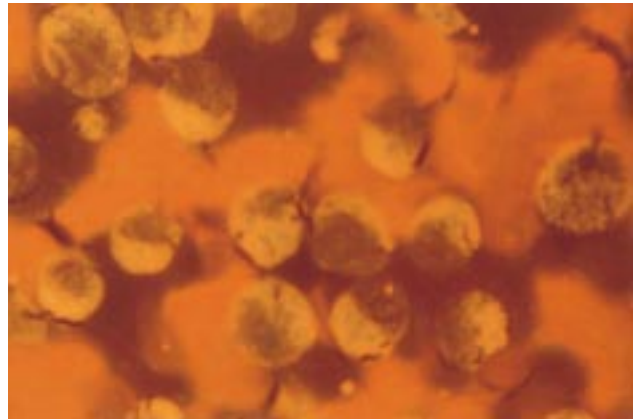
**Figura 3.56** Médula de leucemia mieloide aguda ( $M_5$ ).



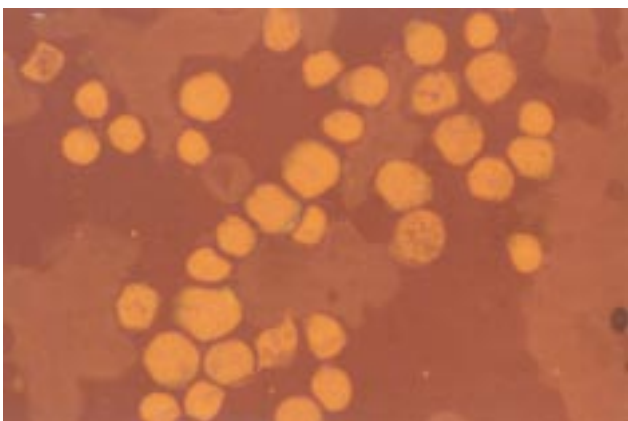
**Figura 3.57** Médula de leucemia mieloide aguda ( $M_6$ ).



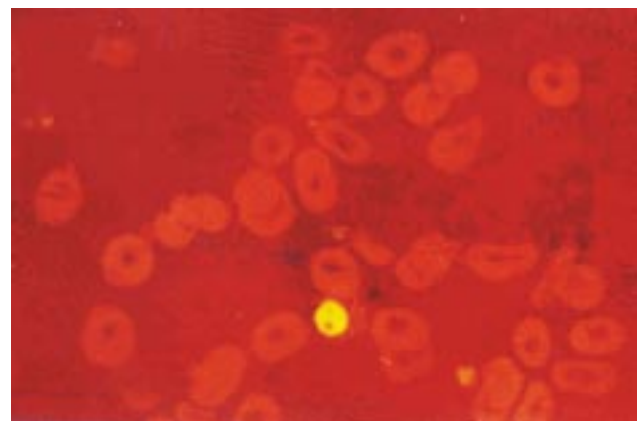
**Figura 3.58** Peroxidasa (coloración citoquímica).



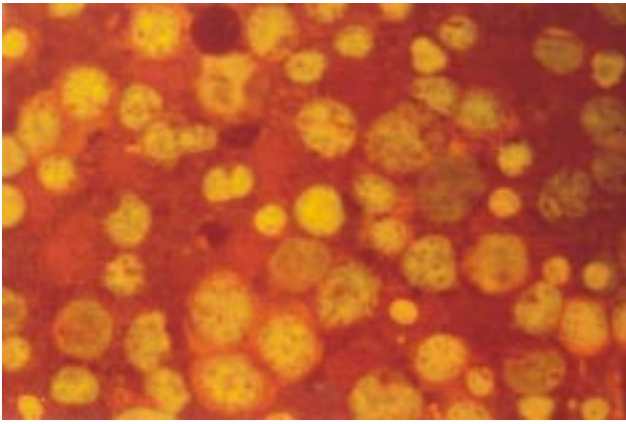
**Figura 3.59** Negro Sudán (coloración citoquímica).



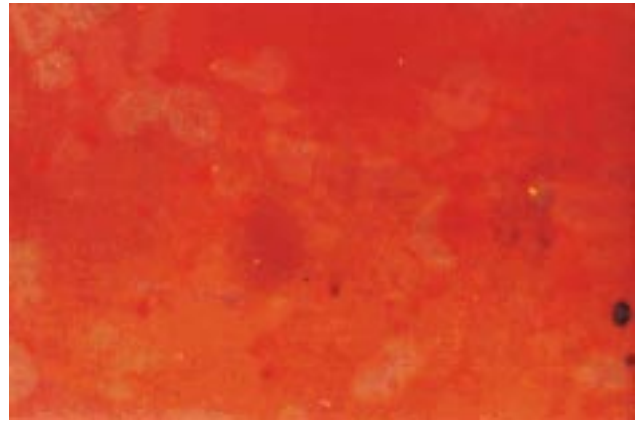
**Figura 3.60** PAS (coloración citoquímica).



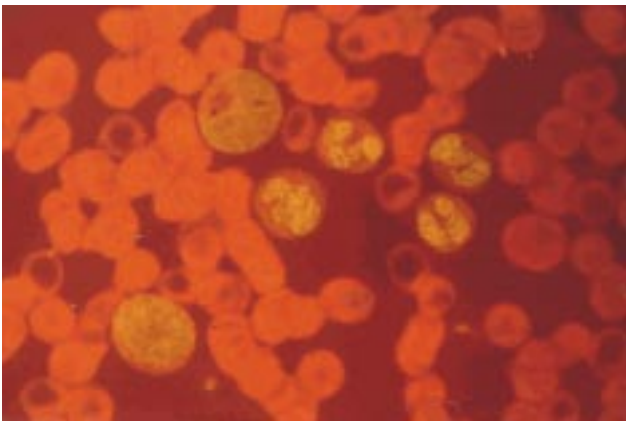
**Figura 3.61** Síndrome dismielopoyético (SDMP) (lámina periférica).



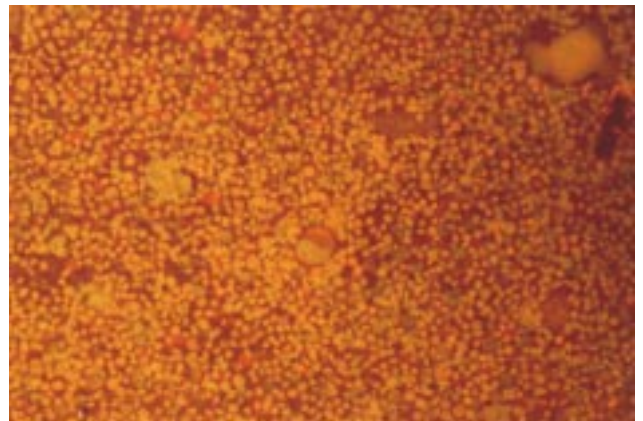
**Figura 3.62** Médula del síndrome dismielopoyético.



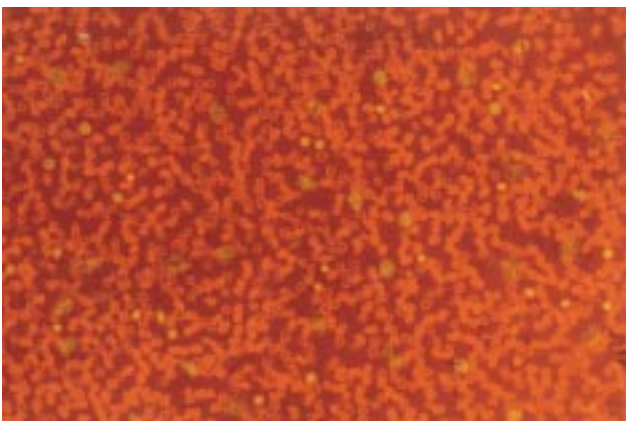
**Figura 3.63** Sideroblastos anillados.



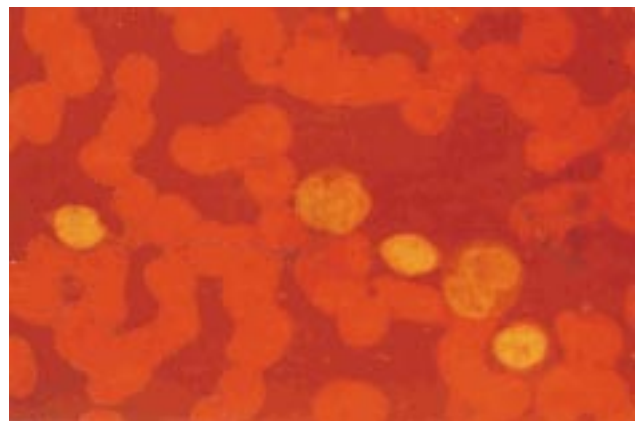
**Figura 3.64** Leucemia mieloide crónica (lámina periférica).



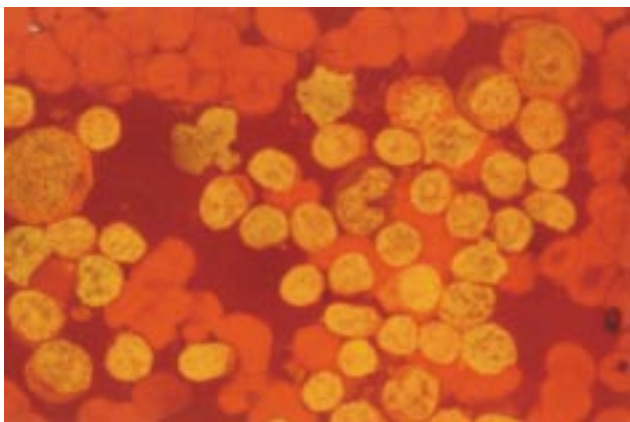
**Figura 3.65** Médula de leucemia mieloide crónica.



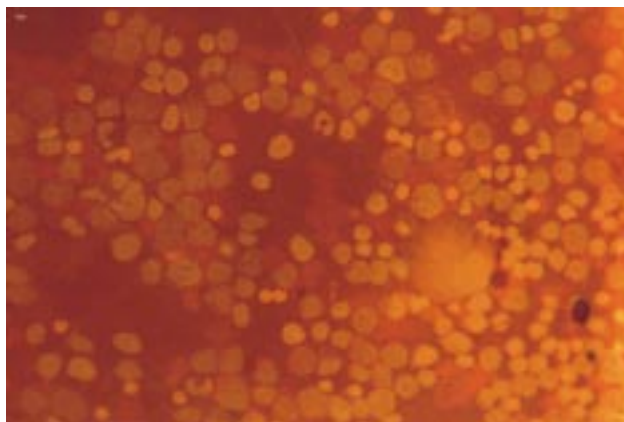
**Figura 3.67** Leucemia linfóide crónica (lámina periférica).



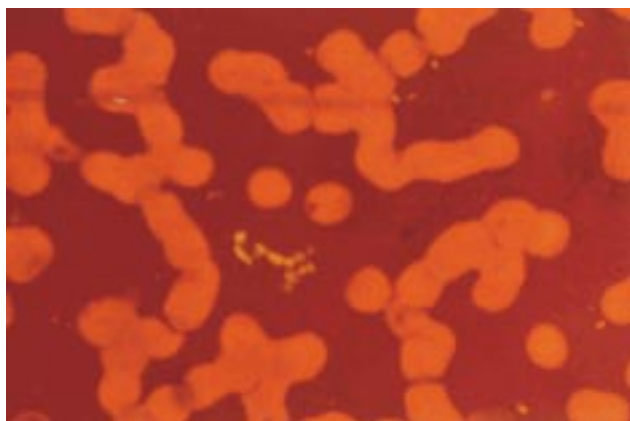
**Figura 3.68** Células de Sézary (lámina periférica).



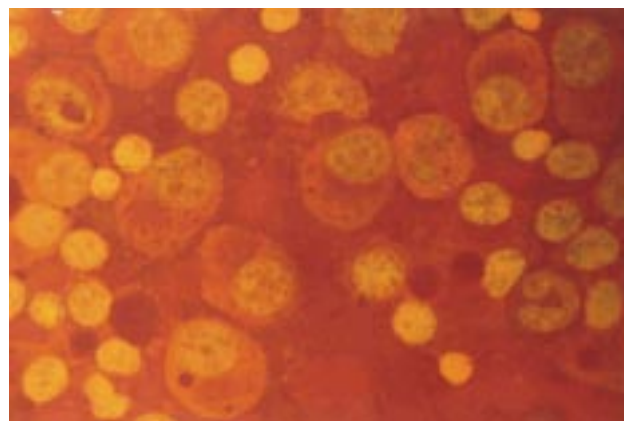
**Figura 3.69** Médula de leucemia linfoide crónica.



**Figura 3.70** Médula del síndrome linfoproliferativo crónico asociado con los síndromes dismielopoyéticos.

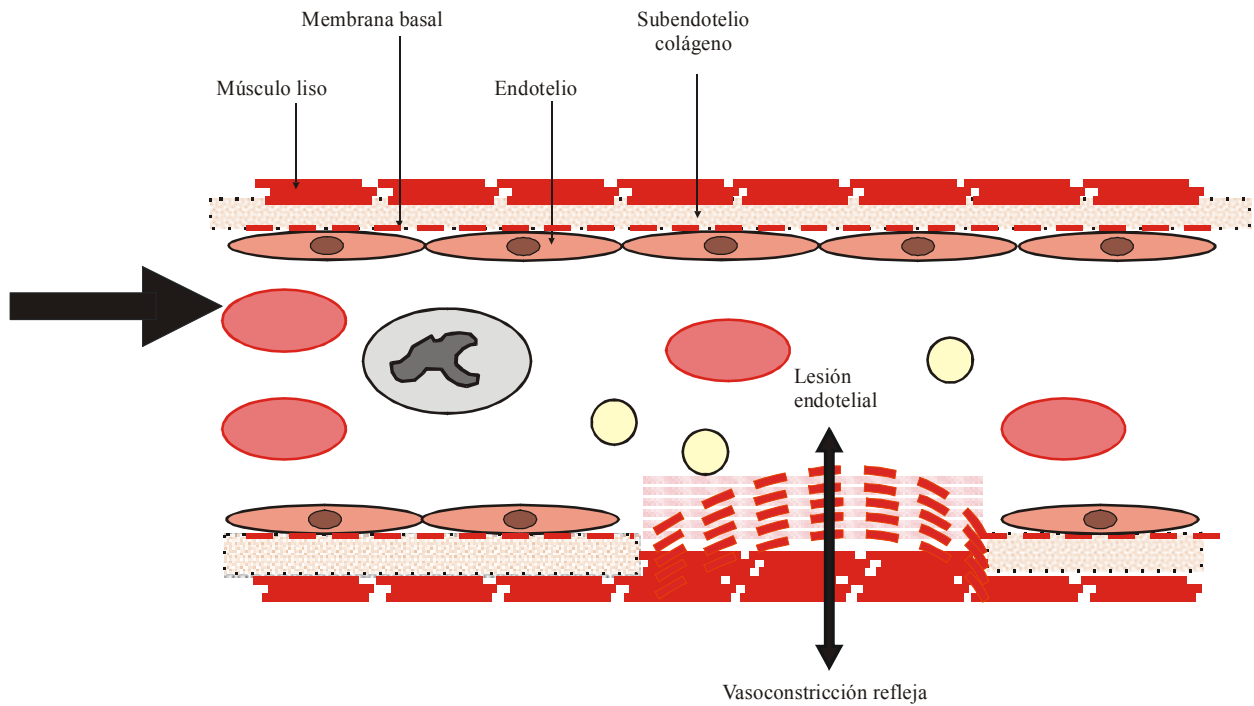


**Figura 3.71** Mieloma múltiple (lámina periférica).

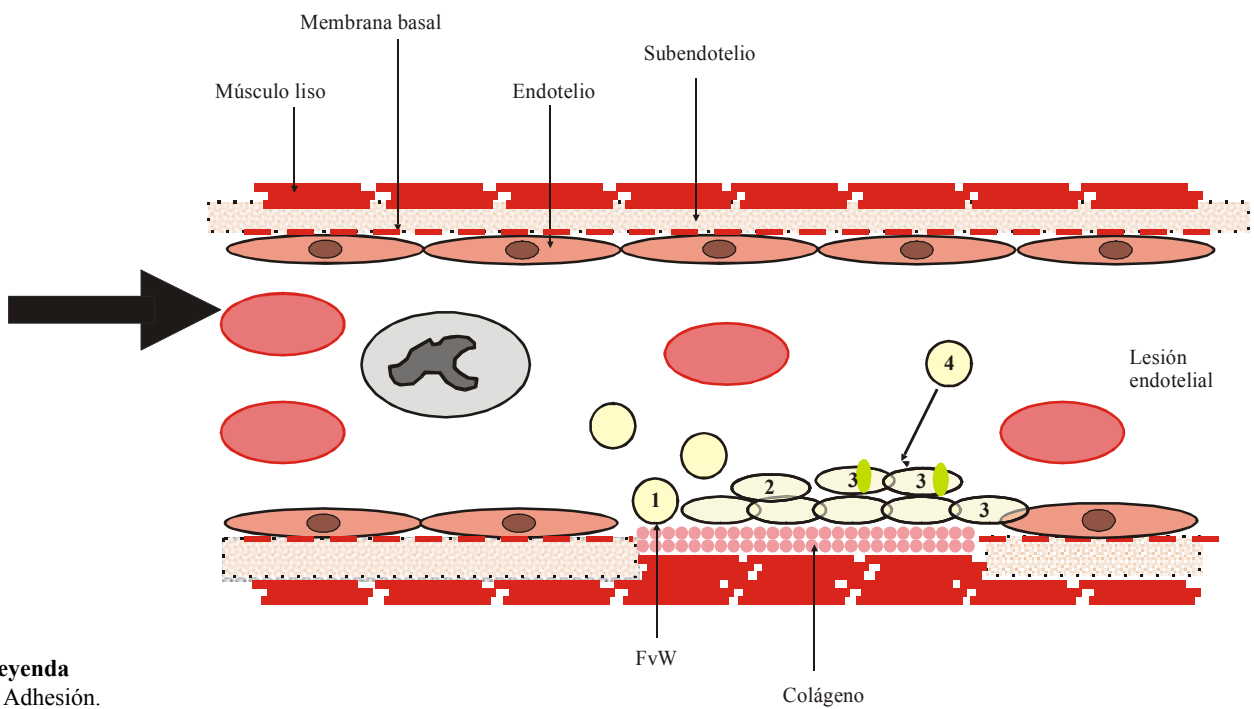


**Figura 3.72** Médula de mieloma múltiple.

### Vasoconstricción



### Hemostasia primaria

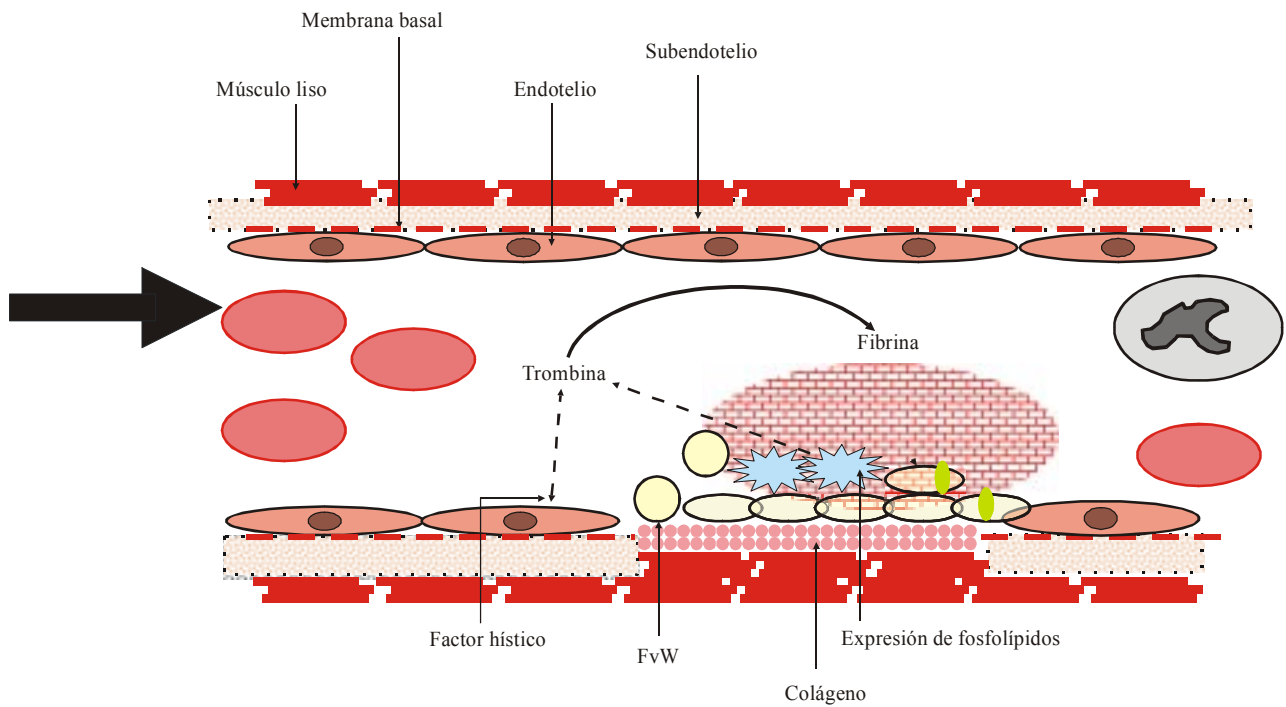


#### Leyenda

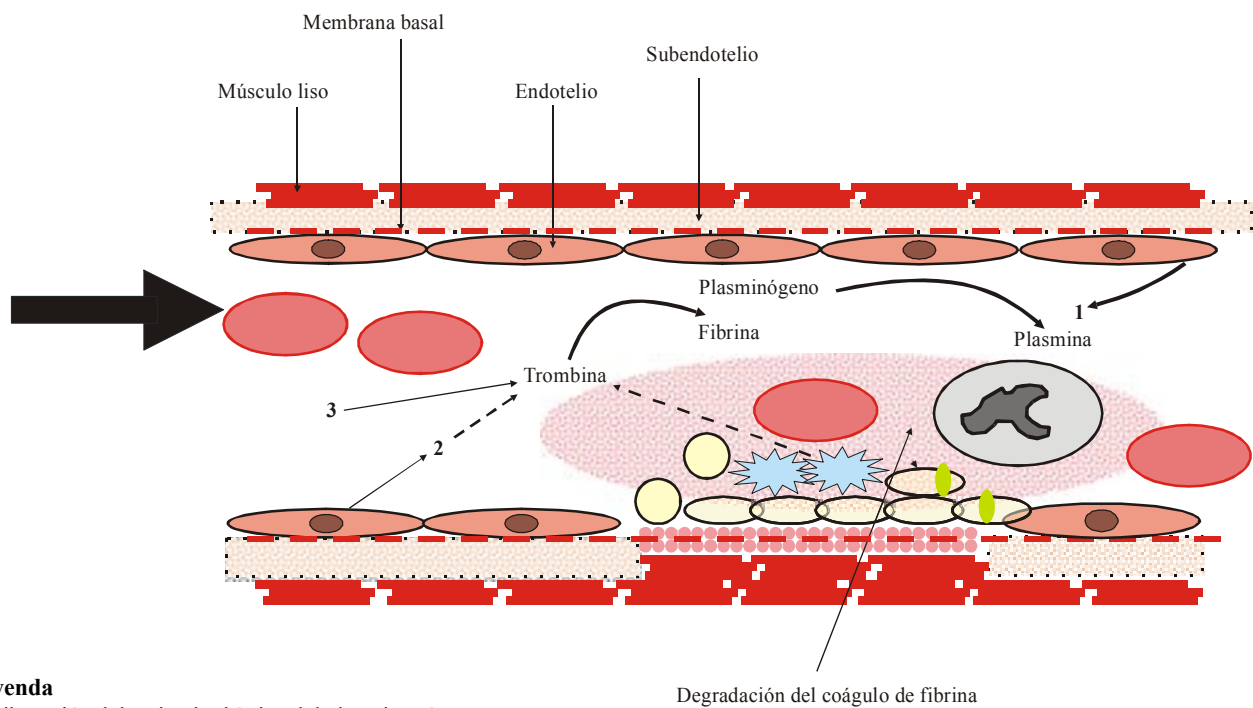
1. Adhesión.
2. Cambio de forma.
3. Liberación.
4. Reclutamiento.



## Hemostasia secundaria



## Trombo y mecanismos antitrombóticos

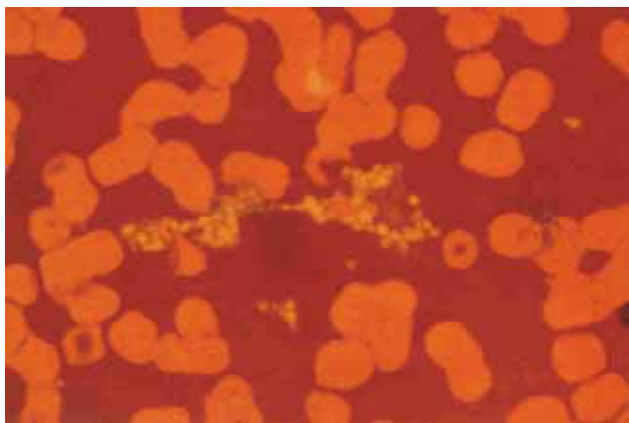


### Leyenda

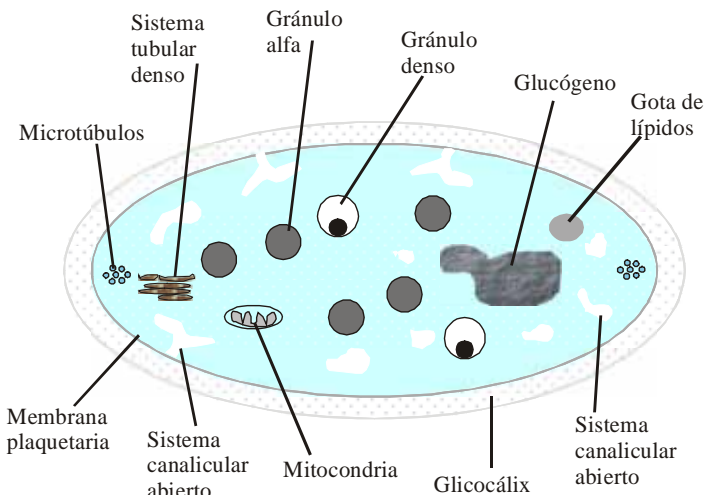
1. Liberación del activador hístico del plasminógeno.
2. Expresión de trombomodulina y activación de la proteína C.
3. Activación de la coagulación.

**Figura 3.73** Mecanismo de la hemostasia. Se presentan todas las fases del proceso, desde la adhesión plaquetaria hasta la fibrinólisis.

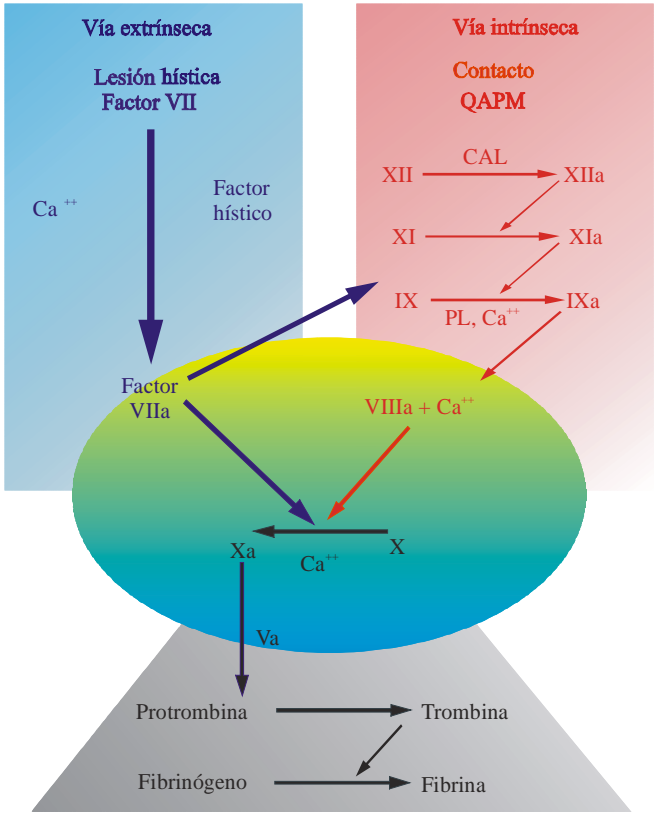




**Figura 3.74** Plaquetas normales en una lámina de sangre coloreada con May-Gründwald-Giemsa (1 000 X).



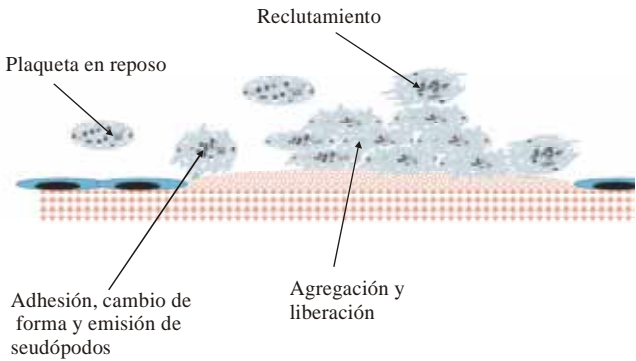
**Figura 3.75** Esquema de una plaqueta vista a través del microscopio electrónico de transmisión.



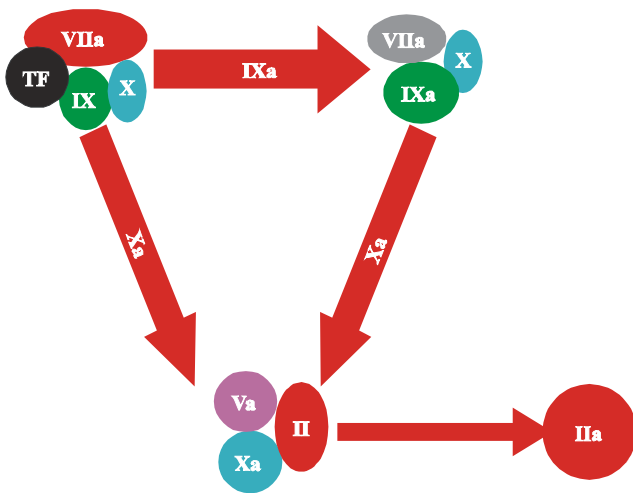
**Leyenda**

● Fosfolípidos.  
QAPM: quinínógeno de alto peso molecular.  
CAL: caliceína.

**Figura 3.78** Mecanismo de la coagulación.



**Figura 3.76** Proceso de activación plaquetaria.



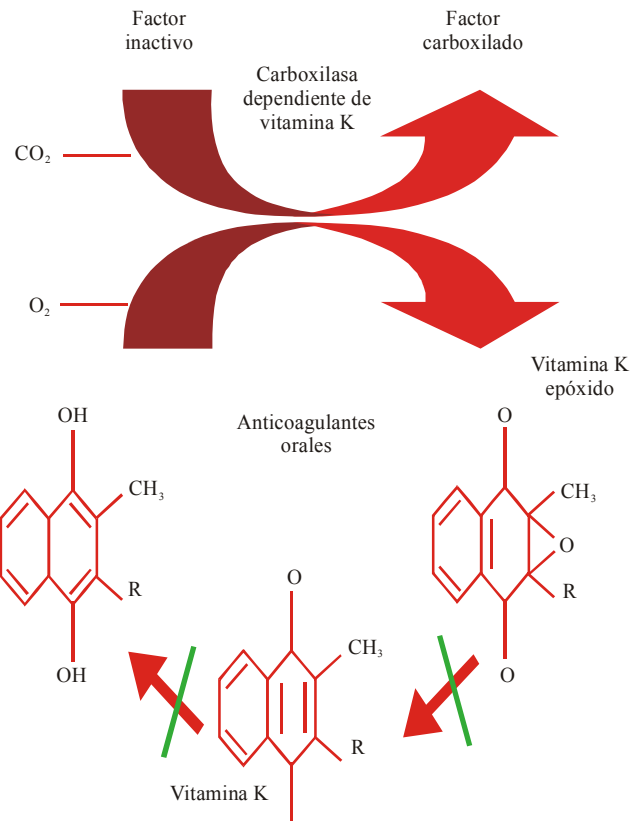
**Complejos procoagulantes**

	1	2	3	4
Enzimas	XIa	IXa	VIIa	Xa
Cofactor	?	VII	TF	V
Superficie	Plaquetas/endotelio	Plaquetas/endotelio	Plaquetas/endotelio	Plaquetas/endotelio
Substrato	IX	X	X	II

#### Leyenda

- 1: complejo activador del factor IX.
- 2: complejo activador del factor X (vía intrínseca).
- 3: complejo activador del factor X (vía extrínseca).
- 4: complejo activador del factor II.
- Plaquetas/end: plaqueta/endotelio.
- TF: factor tisular.
- ?: se desconoce.

**Figura 3.79** Complejos macromoleculares que intervienen en la generación de trombina.



**Figura 3.80** Proceso de gammacarboxilación. Ciclo de la vitamina K.