



UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

“TRABAJO DE TITULACIÓN ESPECIAL”

PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE MAGISTER EN BIOQUÍMICA
CLÍNICA.

“USO DE SANGRE TOTAL CON EDTA Y HEPARINA PARA
DETERMINACION DE FRAGILIDAD OSMÓTICA Y ESTABILIDAD A
DIFERENTES TIEMPOS DE ALMACENAMIENTO”

AUTORA: BQ. LORENA MARIBEL SANTAFE SARZOSA

TUTOR: Q.F.FRANCISCA PATRICIA JIMÉNEZ GRANIZO. M.S.c.

GUAYAQUIL

2016

CERTIFICACIÓN DEL TUTOR

En mi calidad de tutor de la estudiante Lorena Maribel Santafé Sarzosa, del Programa de Maestría/Especialidad Bioquímica Clínica, nombrado por el Decano de la Facultad de Ciencias Químicas CERTIFICO: que el Trabajo de Titulación Especial titulado “ Uso de sangre total con EDTA y heparina para determinación de Fragilidad Osmótica y estabilidad a diferentes tiempos de almacenamiento” en opción al grado académico de Magíster (Especialista) en Bioquímica Clínica cumple con los requisitos académicos, científicos y formales que establece el Reglamento aprobado para tal efecto.

Atentamente

Q.F. Francisca Patricia Jiménez Granizo. Mgs

TUTOR

Guayaquil, 24 de Septiembre del 2016.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a la Universidad de Guayaquil por haberme acogido en su institución.

A mi tutor por su ayuda incondicional y haber aceptado guiar mi proyecto de investigación.

Y un agradecimiento profundo al Dr. Klever Saenz por su ayuda constante y saberme guiar
y apoyar en la culminación de una meta más en mi vida.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a Dios, a mi familia, a mi hijo y esposo,
por el apoyo incondicional, y por cada día darme fuerzas
para culminar otra etapa de mi vida,

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de este trabajo de titulación especial, me corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL”

FIRMA

Bq. Lorena Maribel Santafé Sarzosa

ÍNDICE

Resumen.....	1
Introducción.....	1
Delimitación del problema.....	3
Formulación del Problema.....	4
Justificación.....	5
Objetivo de Estudio.....	5
Campo de acción o Investigación	5
Objetivo General.....	5
Objetivo Específico.....	6
La novedad científica.....	6
Capítulo I.- MARCO TEÓRICO.....	7
1.1 Estructura de la Médula Ósea.....	7
1.2 Célula madre hematopoyética.....	9
1.3 Eritropoyesis.....	11
1.4 Glóbulos rojos.....	14
1.5. Anemia.....	18
1.6. Esferocitos Hereditaria.....	19
1.7. Fragilidad Osmótica.....	21
Capítulo II.- MARCO METODOLÓGICO.....	24
2.1 Metodología.....	24
2.2 Métodos.....	24
2.3 Premisas o Hipótesis.....	24
2.4 Universo y Muestra.....	24

2.5 CDIU.-Operacionalización de Variables.....	24
2.6 Gestión de datos.....	25
2.7. Criterios éticos de la Investigación.....	25
Capítulo III.- RESULTADOS.....	26
3.1. Antecedentes de la Unidad de Análisis o Población.....	26
3.2.Diagnostico o estudio de Campo.....	26
Capítulo IV.- DISCUSIÓN.....	32
4.1. Contrastación Empírica.....	32
4.2. Limitaciones.....	35
4.3 Líneas de Investigación.....	35
4.4 Aspectos relevantes.....	35
Capítulo V. PROPUESTA.....	36
Conclusiones y recomendaciones.....	37
Bibliografía.....	39
Anexos.....	42

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA1.-Porcentaje de hemólisis por dilución de lectura. Sangre Total EDTA. Muestra General

TABLA1.1.-Porcentaje de hemólisis por dilución de lectura. Sangre Total Heparina. Muestra General

TABLA 2.-Aparición de hemolisis al 100% por dilución de lectura por tipo de muestra. Muestra General

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig1.-Biopsia de Medula Ósea, Instituto Nacional del Cáncer, www.cancer.gov

Fig.2. Medula Ósea, Instituto Nacional del Cáncer, www.cancer.gov.

Fig.3.- Esquema Global de Hematopoyesis, Microscopia virtual, imagen tomada de la revista de Citología de la médula ósea.

Fig.4.- Diferenciación Microscopia virtual, imágenes citológicas en el apartado de citología de la médula ósea.

Fig.5.- Eritropoyesis, T.M. Pamela Carmona Ríos.

Fig.6.-Estructura del Eritrocito, Romero Cabrera, 2011)

Fig.7.- Membrana. Eritrocitaria, Estructura.

Fig.8.' Causas de Alteraciones de la Fragilidad Osmótica.

Fig9. Ilustración de Solución hipotónica.

<http://cienciasdejoseleg.blogspot.com/2013/03/importancia-de-la-osmosis-traves-de-la.html>

Fig.10 Osmosis.<http://cienciasdejoseleg.blogspot.com/2013/03/importancia-de-la-osmosis-traves-de-la.html>

RESUMEN

La Fragilidad Osmótica para el diagnóstico de Esferocitosis Hereditaria, es una prueba operador dependiente y de fácil ejecución, no se encuentra disponible en los laboratorios de rutina o de baja complejidad, por lo que es habitualmente referida a Laboratorios de mayor complejidad, sin que exista evidencia local sobre el tipo de muestra recomendada y su estabilidad.

Se realizó un estudio Observacional para establecer diferencias en los resultados de la cuantificación de fragilidad osmótica empleando sangre total EDTA y heparinizada usando técnica estándar de fragilidad osmótica (Parpart) y la estabilidad al almacenamiento.

Se estudiaron 20 muestras de pacientes sanos, empleando sangre total EDTA y sangre total heparinizada, analizadas a la primera hora, 24 y 72 horas. La edad promedio de los sujetos fue de 32.5 ± 7.8 años, con hemoglobina, hematocrito y VCM promedio de 15.6 ± 1.5 g/dL, 45.6 ± 3.5 % y 87.4 ± 5.6 fL respectivamente.

Cada muestra se analizó en 16 diluciones consecutivas con agua destilada y solución salina, medidas en su absorbancia a 450 nm y relativizadas frente a la absorbancia más alta de las 16 diluciones.

No se evidenciaron diferencias significativas en la cuantificación de fragilidad osmótica independientemente del tipo de muestra. La hemólisis se presentó inicialmente en NaCl, 0.60%, con comportamiento estable hasta las 72 horas refrigeradas.

El 95% de las muestras presentaron algún grado de hemólisis a partir de la solución NaCl 0.52%, independientemente del tipo de muestra. Se pueden transferir los valores de referencia establecidos en otras poblaciones (inicio de hemólisis entre solución 0.5% y 0.3%).

Palabras claves: Fragilidad Osmótica, Estabilidad, EDTA, Heparina, Hemólisis.

SUMMARY

The Osmotic Fragility for diagnosing hereditary spherocytosis, is operator dependent test and not as easy execution, it is not available in standard laboratories, so is commonly referred to laboratories more complex, with no local evidence on recommended type of sample and its stability.

An experimental study was conducted to establish differences in the results of the quantification of osmotic fragility using EDTA and heparinized whole blood using standard technique osmotic fragility (Parpart) and storage stability.

20 samples of healthy subjects were studied using EDTA whole blood and heparinized whole blood, analyzed the first hour, 24 and 72 hours. The average age of the subjects was 32.5 ± 7.8 years, hemoglobin, hematocrit and MCV average of 15.6 ± 1.5 g / dL, $45.6 \pm 3.5\%$ and 87.4 ± 5.6 fL respectively.

Each sample was analyzed in 16 consecutive dilutions with distilled water and saline, measures its absorbance at 450 nm and relativised facing the highest absorbance of 16 dilutions.

No significant differences were found in the quantification of osmotic fragility regardless of sample type. Hemolysis was initially presented in NaCl, 0.60%, with stable performance up to 72 hours refrigerated.

95% of the samples showed some degree of hemolysis from 0.52% NaCl solution, regardless of sample type. You can transfer the benchmarks set in other populations (start of hemolysis solution between 0.5% and 0.3%).

Keywords: Osmotic Fragility, Stability, EDTA, Heparin, hemolysis.

INTRODUCCIÓN

La Esferocitosis Hereditaria (EH), es una de las enfermedades hemolíticas más frecuentes junto con la talasemia, una de las causas está dada por mutaciones en las proteínas de membrana del eritrocito especialmente el esqueleto, da como resultado una alteración y deformación del glóbulo rojo. Ya que vida media se disminuye. .(Secretaria de Salud de México, 2014).

Las enfermedades hemolíticas, son desórdenes hemolíticos hereditarios o adquiridos. Dentro de este grupo de enfermedades se encuentran las anemias hemolíticas autoinmunes (AHAI), una de las enfermedades de interés mundial.

La Esferocitosis Hereditaria es considerada una enfermedad crónica, su alta frecuencia se la encuentra en Europa, y América del norte, y un alto grado de incidencia en regiones de Japón. Afecta a todos los grupos étnicos y raciales es poco común en afroamericanos y en personas del suroeste de Asia.(Secretaria de Salud de México, 2014).Se ha informado que 1 de cada 2.500 personas afecta a la población estadounidense. (Crips Renne 2014).

Según el “Anuario de Estadísticas Vitales, Nacimientos y Defunciones 2013, INEC”, el Ecuador tiene el 5% de casos por año, de los cuales el 2% fallecen, es una enfermedad que se presenta en ambos sexos, siendo el género femenino el más afectado, y su rango de edad oscila entre los 15-64 años, siendo más afectados los mayores de 64 años.

El diagnóstico oportuno de anemias hemolíticas permite la instauración del tratamiento adecuado y la disminución de los efectos deletéreos. Siendo una de las pruebas para el diagnóstico tradicional de las anemias hemolíticas el estudio de la fragilidad osmótica el cual evalúa la resistencia de los eritrocitos al efecto de diferentes grados de hipotonía del medio; y permite que exista una relación entre la superficie y el volumen eritrocitario, y de la HCM.(Crips Renne2014).Sin embargo, no está disponible en los laboratorios habituales de

diagnóstico clínico, remitiéndose entonces a laboratorios especializados, lo que incorpora a las variables pre-analíticas la estabilidad de la muestra asociada al tiempo de transporte, a lo que se suma el hecho de que existe escasa evidencia sobre el tipo de muestra recomendada ya sea sangre total EDTA o sangre total con heparina de litio, cómo aquella que garantice la confiabilidad de los resultados obtenidos y por ende su utilidad clínica.

En Ecuador la prueba de fragilidad osmótica no cuenta con un protocolo estandarizado; y en laboratorios de baja complejidad no se realiza, laboratorios internacionales como “Mayo Clinical Laboratories establece al tipo de muestra para este ensayo, que nos permite tener un referente internacional del tipo de muestra, la cual difiere del establecido en la literatura revisada.

Al tratarse de un ensayo operador dependiente cuenta con una mayor probabilidad de error, a lo que se suma el hecho de su falta de estandarización antes mencionada, relacionada con la estabilidad asociada al tipo de muestra usada: sangre total con ácido etildiaminotetracético (EDTA) o con sangre total con heparina y su metódica de proceso.

DETERMINACIÓN DEL PROBLEMA.

El diagnóstico oportuno de las anemias hemolíticas permite la instauración del tratamiento adecuado y la disminución de los efectos deletéreos. Una de las pruebas para el diagnóstico tradicional de las anemias hemolíticas es el estudio de la fragilidad osmótica, que evalúa la capacidad de resistencia de los eritrocitos al efecto de diferentes grados de hipotonía del medio; depende de la relación que existe entre la superficie y el volumen eritrocitario, y de la concentración de hemoglobina corpuscular media.

La determinación de la fragilidad osmótica no es habitual en los laboratorios de diagnóstico, por lo que es remitida a laboratorios especializados y el tiempo transcurrido entre la toma y la ejecución del análisis puede influir sobre la calidad del resultado emitido y su uso clínico. Varias referencias recomiendan el uso de sangre total EDTA o Heparina de Litio ((Lewis. S.M, 2007), o que agrega un componente pre-analítico adicional que podría afectar a los resultados obtenidos.

En la práctica resulta relevante contar con herramientas diagnósticas que permitan discriminar los diferentes tipos de enfermedades hemolíticas, separando las hereditarias de las autoinmunes.

La fragilidad osmótica en particular posee una sensibilidad del 100% para diagnóstico de esferocitosis. Se trata de un ensayo descrito inicialmente por Parpart en el año 1907 y requiere varias condiciones analíticas para su ejecución, obtener la muestra del paciente en estudio, qué estabilidad tiene la muestra, qué tipo de anticoagulante utilizar, y en qué condiciones ambientales. El reporte emitido debe presentar una curva de comportamiento de la hemólisis cuantificada espectrofotométricamente y expresado en absorbancias, de frente a una muestra control y debe interpretarse en porcentaje de hemólisis.(**Del Pilar & Andrés, 1993**)

La presente propuesta de investigación procura evaluar a través de un protocolo estandarizado la estabilidad de la muestra tanto en sangre total con EDTA como sangre total heparinizada para la medición de fragilidad osmótica, para establecer las diferencias por matriz de análisis en la estimación de la fragilidad osmótica, así como verificar la transferencia de valores de referencia de uso internacional a partir de las mediciones ejecutadas en una población normal aparentemente sana. La información recopilada permitirá establecer recomendaciones relativas a la estabilidad y tipo de muestra requerida para la remisión de éste tipo de análisis.

FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

- ¿Existen diferencias significativas en los resultados obtenidos en la cuantificación de fragilidad osmótica dependiendo del uso de sangre total EDTA o sangre total heparinizada empleando la técnica estándar de fragilidad osmótica referida por Parpart.?
- ¿Existen diferencias significativas en los resultados obtenidos en la cuantificación de fragilidad osmótica a las 24H y 72H horas de almacenamiento de frente al procesamiento dentro de la primera hora posterior a la toma?

JUSTIFICACIÓN

La prueba de fragilidad Osmótica es una prueba que no se evidencian valores nacionales de referencia, ni tampoco una práctica del uso de una metodología estandarizada para esta determinación, el presente estudio permitirá dar información y contar con una guía para su realización de la prueba de fragilidad osmótica.

Sobre la base de lo expuesto y considerando la importancia diagnóstica de esta determinación para la decisión médica, el presente estudio plantea determinar el tipo de muestra y el tiempo máximo de estabilidad de la misma que generen resultados clínicamente confiables, que puedan ser considerados en la práctica cotidiana para asegurar la calidad de los informes emitidos así como su uso clínico.

CAMPO DE ACCIÓN O DE INVESTIGACIÓN

Comparabilidad en función del tiempo de la fragilidad osmótica entre sangre total EDTA y sangre total heparinizada

OBJETO DEL ESTUDIO

Evaluar a través de un protocolo estandarizado el Uso de Sangre total con EDTA como sangre total heparinizada para la medición de Fragilidad Osmótica, y la estabilidad en diferentes tiempos de almacenamiento.

OBJETIVO GENERAL

- Determinar la correlación en los resultados obtenidos en la cuantificación de fragilidad osmótica empleando sangre total EDTA y sangre total heparinizada empleando la técnica estándar de fragilidad osmótica referida por Parpart y el impacto sobre ella del tiempo de análisis.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar el tiempo de almacenamiento máximo para la realización de la fragilidad Osmótica, sin afectación de los resultados emitidos.
2. Correlacionar los resultados obtenidos empleando sangre total con EDTA y los obtenidos usando sangre total heparinizada
3. Establecer la factibilidad de la transferencia de valores de referencia internacionales empleando el protocolo de evaluación con n20 propuesto por la guía CLSI EP28 A3.

LA NOVEDAD CIENTÍFICA:

El presente estudio evalúa el comportamiento y estabilidad de muestras que habitualmente han sido usadas de manera indistinta sin evidencia científica que respalde su uso y estabilidad para la determinación de fragilidad osmótica, empleando un procedimiento estándar alineado a recomendaciones internacionales.

CAPITULO I

1.- MARCO TEÓRICO

1.1 ESTRUCTURA DE LA MÉDULA ÓSEA

La medula ósea se localiza en la cavidad medular del hueso, y es uno de los órganos más grandes del cuerpo humano, es el principal centro de producción de las células sanguíneas, y el único foco de hematopoyesis efectiva.

La Medula hematopoyéticamente activa (medula roja) experimenta una regresión tras el nacimiento hasta finales de la adolescencia, localizándose en el cráneo, vertebras, cintura escapular y pélvica, costillas y esternón, produciendo diariamente unos 2.500 millones de hematíes, 2.500 millones de plaquetas, y 1000 millones de granulocitos por kilogramo de peso corporal.

Las células hematopoyéticas son reemplazadas por las células grasas en los huesos de manos, pies, brazos y piernas (medula amarilla), y ocupa alrededor del 50% del espacio de la medula roja del adulto, y continua su cambio con la edad.

A finales del siglo XIX se creía que los glóbulos rojos se producían en los ganglios linfáticos, bazo e hígado, mientras que en 1868 Neuman y Bizzozero observaron células nucleadas en muestras extraídas de las costillas de cadáveres, estableciendo que la medula ósea es la principal fuente de células rojas y 8 años más tarde se realizaba la primera biopsia de medula ósea (MO) in vivo por Mosler, 50 años más tarde en 1929 establecieron esta técnica, como segura, sencilla y útil. **(fig 1).** *(Ernest, M.A, B.S.Coller, T.J., & Seligson, 2005) Williams, hematología, 2005)*



Fig.1 Biopsia de Medula Ósea, Instituto Nacional del Cáncer, www.cancer.gov

Uno de los estudios usados para la medula ósea son los radioisótopos y cultivos in vitro, en el cual han demostrado que las líneas celulares están formadas por células maduras, capaces de una proliferación limitada antes de su maduración completa pero sin capacidad de autorenovarse. (*Ernest et al., 2005*) (*Williams, hematología, 2005*).

Los espacios intersinusales dan lugar a la hematopoyesis la cual está controlada por una cadena compleja de citocinas estimuladoras e inhibidoras, en este entorno las células madre linfohematopoyéticas se diferencian hacia todas las líneas celulares sanguíneas (fig.2) El déficit que se puede presentar ya sea por: pérdidas hemáticas hemolisis, inflamación, citopenias inmunes, es regulado por el sistema el cual satisface la demanda de dichas pérdidas.

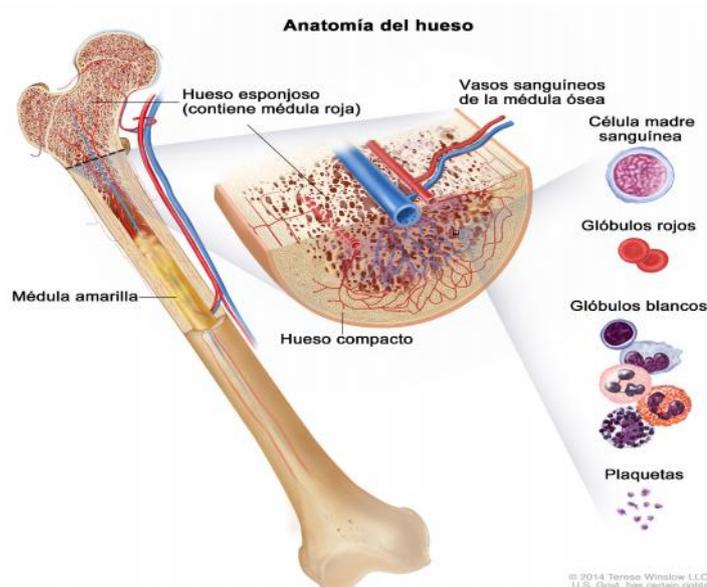


Fig.2. Médula Ósea, Instituto Nacional del Cáncer, www.cancer.gov

1.2 CÉLULA MADRE HEMATOPOYÉTICA

Las célula madre hematopoyéticas se descubrió en 1945 por primera vez, en esta época se realizó el primer trasplante de Médula Ósea, debido a que hubo individuos que estuvieron expuestos a dosis extremadamente altas de radiación, y el trasplante de médula era la única de salvar sus vidas, ya que permite la regeneración del tejido. (*Carlos Jaime Pérez & Gómez Almaguer, 2009*).

El término “Célula Madre” fue establecido en el año 1896, en el que Pappenheim habló de la que una célula precursora originaba estirpes celulares clasificándose de la siguiente manera:

- **Topi potenciales.**- Este tipo de células dan lugar a un organismo completo.
- **Pluripotenciales.**- Se desarrolla en una capa germinativa: endodermo, mesodermo, ectodermo.
- **Multipotenciales:** Generan todos los tipos de células son generados por un mismo tejido, las cuales son (células sanguíneas).

Las células Multipotenciales y pluripotenciales dan lugar a dos progenitoras mayores: célula madre linfoide y célula madre mieloide o hematopoyética, las que respectivamente son precursoras de: células B y células T y la otra granulocitos, monocitos, hematíes, y megacariocitos.(*Henry, 2014*).

La célula madre hematopoyética origina células comprometidas la cuales son capaces de:

- Autorrenovación: se multiplican y conservan indiferenciadas.
 - Diferenciación: Las células son diferenciadas en uno o varias células. como células de piel, musculo, hígado, neuronas. etc.
 - Maduración.
- La célula hematopoyética tiene como resultado el mantenimiento del sistema hematopoyético y que es muy sensible a las necesidades variables de oxigenación, defensa y homeostasis y su control está dado por varias expresiones de genes, factores de estimulación y mecanismos de retroalimentación. (Fig. 3)

•

Dentro de la clasificación de las células por su potencial y diferenciación, las células madres hematopoyéticas totipotenciales comprenden un 0.01 a un 0.05% en su totalidad en la Medula ósea, las cuales se diferencian del resto de células

- 1.-Por producir células diferenciadas y su Capacidad producir nuevas células madre.
- 2.- Capacidad de Diferenciarse en al menos 9 tipos de células maduras. como son: eosinófilos, neutrófilos, monocitos-macrófagos, plaquetas eritrocitos, osteoclastos, linfocitos T y B, y fibroblastos. (**Cruz.M.2012**)

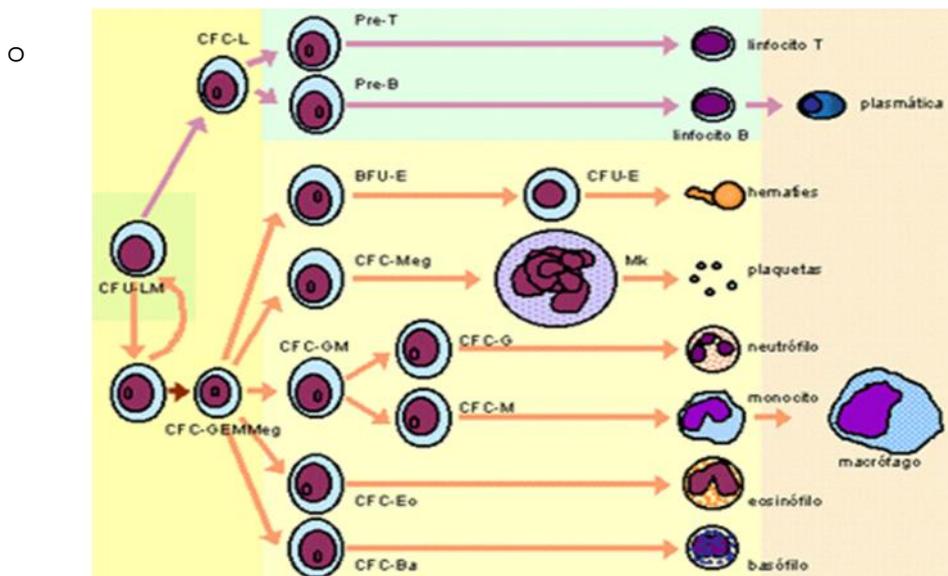


Fig.3 Esquema Global de Hematopoyesis, Microscopia virtual, (imágenes citológicas en el apartado de citología de la médula ósea).

En un adulto de aproximadamente un peso de 70 kg, el recambio celular hematopoyético, es cercano a 1 trillón de células por día.

La presencia de determinados estimulantes, proliferan y dar lugar a la formación de una colonia, a la cual se la denomina CFU o CFC (Unidad formadora de colonia, o en inglés Colonyformingunity).o (Célula formadora de colonia) son clonales y derivan de una única célula.

Cada célula la progenie se identifica y se denominan por un sufijo como por ejemplo UFC-GM. (Unidad Formadora de Colonia Granulocítica).

1.3 ERITROPOYESIS

Una característica de la eritropoyesis es la formación de diferentes células como lo es los eritrocitos, ya que es una célula indiferenciada a la cual se le da el nombre de

“célula madre o primitiva pluri-potencial”. La unidad formadora de Colonia es el eritroide más primitivo (UFCTe). Tras ella esta unidad que es UFCe.

Las células sanguíneas se diversifican en varias clases como son: Proeritroblastos, Normoblastos, Reticulocitos y Eritrocitos (**Fig.4**). Este proceso ocurre en la médula ósea. En el feto a partir del 4to mes. (*Medicina Cirugía & Hematología Grupo CTO, n.d.*).

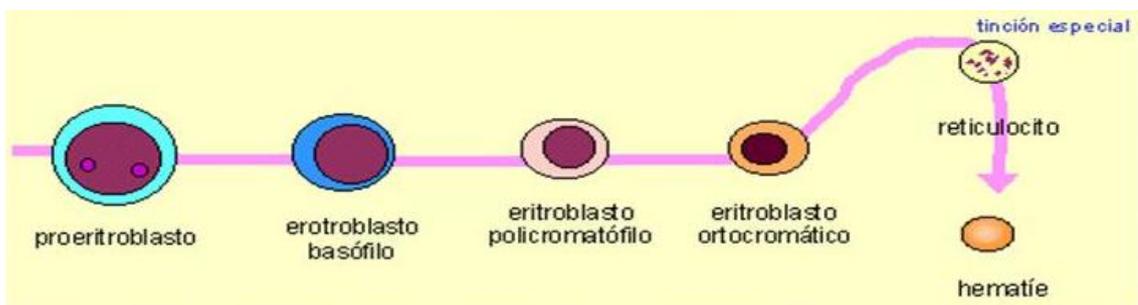


Fig. 4. Diferenciación *Microscopia virtual, imágenes citológicas en el apartado de citología de la médula ósea.*

Los Precursores de los glóbulos rojos son los eritroblastos, los mismo que sufren cuatro divisiones celulares para producir 16 células hijas, cada célula hija madura y expulsa el núcleo convirtiéndose en reticulocito, proceso en el cual experimenta un cambio progresivo de color azul a rojo ya que aumenta la hemoglobina y disminuye el contenido de ácido ribonucleico (ARN) de los ribosomas. La hormona que controla este proceso se llama Eritropoyetina. (**Dr. Brus, ANEMA 1986**) (Evatt, Lewis, del Real Colegio de Patólogos, Lothe, & McArthur, 1986)

Los progenitores eritróides y la eritropoyetina fueron los primeros estudiados en profundidad. La presencia de reticulocitos, la incorporación del hierro para marcar los hematíes recién producidos y la capacidad de inducir policitemia para interrumpir la

hematopoyesis in vivo proporciona un modelo para el estudio de la regulación eritroide.(*Ernest et al., 2005*).

En la década de los años 50, fue definida la Eritropoyetina, en la células tubulares renales, y se piensa que los hepatocitos y las células de kupffer los que sintetizan la eritropoyetina de origen hepática.

1.3.1 ESTADOS MADURATIVOS

Los estados madurativos con capacidad de mitosis son: “Proeritroblasto, eritroblasto basófilo, eritroblastopolicromático (doble mitosis), le sigue eritroblasto ortocromático, reticulocito y glóbulo rojo”. Esta maduración permite que 1 proeritroblasto produce 16 eritrocitos”(*Medicina Cirugía & Hematología Grupo CTO, n.d.*)Fig.5

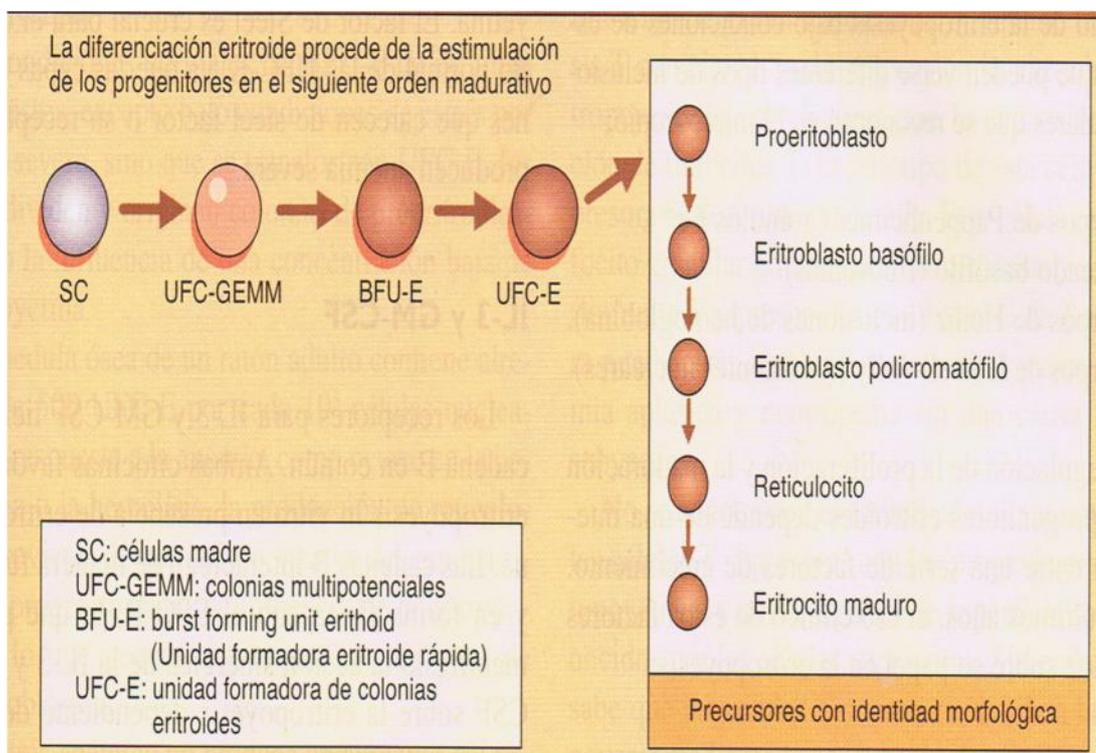


Fig. 5. ERITROPOYESIS, (T.M. Pamela Carmona Ríos)

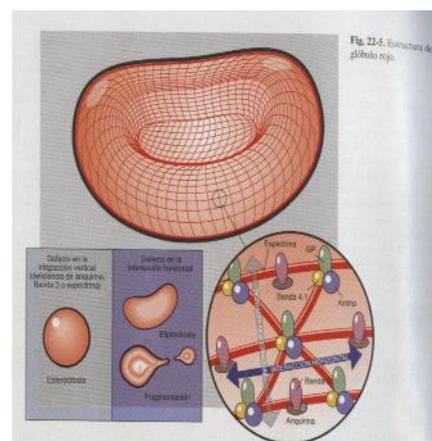
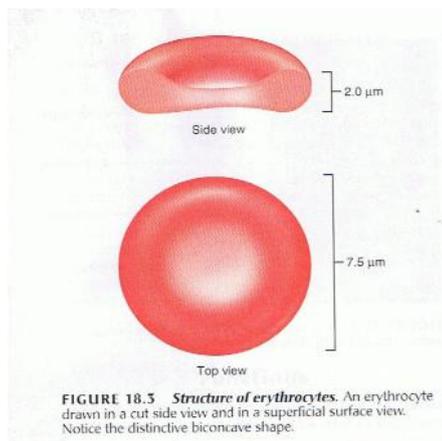
Conforme progresa la maduración se desarrolla un progenitor tardío, CFU-E el cual es sensible a la eritropoyetina.

1.4 -GLOBULOS ROJOS

En el año de 1723 el eritrocito o Glóbulo rojo fue el primer elemento que se observó por microscopía. En 1865 Hoppe Seyler descubrió que la célula era capaz de transportar oxígeno. Sin embargo en el siglo XIX se creyó que los eritrocitos se originaban y desarrollaban de manera específica en los ganglios linfáticos y/o hígado y bazo. En 1886 Neuman y Bizzazero observaron por separado la presencia de células sanguíneas nucleadas en las costillas de cadáveres humanos, y postularon que la medula ósea era la fuente principal de producción de células sanguíneas. Después de un tiempo el fisiólogo Claude Bernard señaló que era en los capilares del tejido medular donde tenía lugar la eritropoyesis. (*Rodak, 2002*).

Los eritrocitos o glóbulos rojos son los más numerosos en la sangre, uno de los componentes principales es la hemoglobina. La hemoglobina es de gran importancia en el transporte de oxígeno de los pulmones hacia los tejidos, Cuya característica de los glóbulos rojos o eritrocitos es que es un disco bicóncavo de 7.8 μm de diámetro, su periodo de maduración va de 4 a 7 días, y su vida media va de 120 días, (**Fig.6**), su metabolismo, anaeróbico aportan ATP que ayudan a mantener un equilibrio osmótico, carecen de ribosomas y núcleo no realizan síntesis proteica. Su forma bicóncava, permite favorecer el intercambio de dióxido de carbono, y el plasma de la sangre. Y mantener un equilibrio entre el volumen y la superficie.

Fig.6 Estructura del Eritrocito,



1.4.2 MEMBRANA DEL ERITROCITO

El eritrocito carece de núcleo y orgánulos, y tienen cito-esqueleto, enzimas que rodean a la membrana plasmática. La membrana es la responsable de las características discoides del eritrocito y mantiene su deformabilidad y elasticidad. Posee un modelo de mosaico fluido lo que le da la característica de tener una estructura compleja, la cual está constituida por lípidos, proteínas e hidratos de carbono. Estas propiedades le permiten soportar presiones mecánicas, y el paso por capilares estrechos. (*Palomo Ivan, 2009*).

- **Capa lipídica.-** permeabilidad entre lo exterior y el citoplasma, compuesta por Colesterol y fosfolípidos.
- **Proteínas.-** Se encuentran intercaladas en la bicapa, constituyen la flexibilidad y rigidez del eritrocito. Su deficiencia puede causar Eliptosis.
- **Esqueleto.-** proporciona integridad estructural.

El principal catión que permite mantener la integridad celular es el calcio, se asocia con la actividad del ATPasa de la espectrina y ejerce un control enzimático sobre el contenido intracelular de los iones de calcio. Fig.7. (*Palomo Ivan., 2009*)

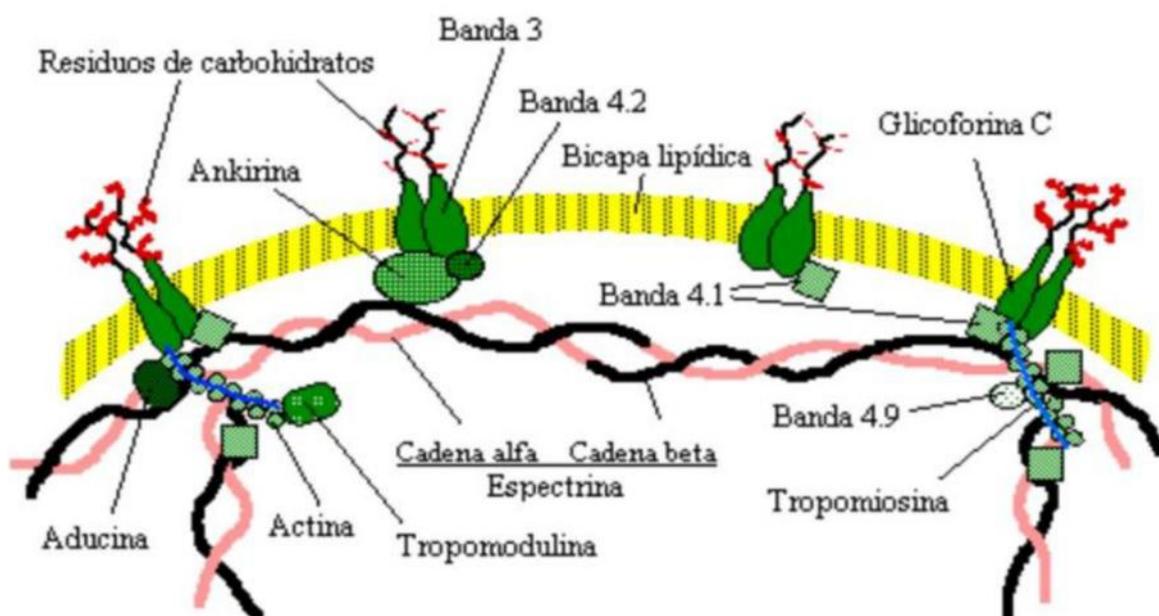


FIG. 7. Membrana Eritrocitaria (Rev. Cubana Hematol Inmunol Hemoter 2002 (García & Del Cueto, 2002))

La membrana del glóbulo rojo tiene como responsabilidad mantener sus propiedades tanto mecánicas, como fisiológicas. La bicapa lipídica plana, está compuesta por fosfolípidos y colesterol, glicolípidos y aminofosfolípidos, respectivamente... Las proteínas periféricas dan viscosidad, y estabilidad a la membrana. Las proteínas externa que destacan son: Espectrina(Sp), actina, Ankirina y están unidas por dominios hidrofóbicos, (*Del Pilar & Andrés, 1993*), .Las proteínas son medidas por la técnica de electroforesis, esto permite poder identificar la clasificación de dichas proteínas que van desde la banda 1,2,3 etc, y en su capa externa podemos encontrar antígenos eritrocitarios con implicación transfuncional. La abundancia de las proteínas es variable, desde unas 100 copias hasta más de un millón de copias de eritrocitos.(*Crisp, 2014*)

La asimetría de la membrana de la disposición de los fosfolípidos de la bicapa eritrocitaria resulta de hechos físicos como es el desplazamiento lento y simétrico de los fosfolípidos polares, por consiguiente la inmovilización de la monocapa interna, mientras que no pasa esto con el eritrocito maduro, ya que al no poder sintetizar lípidos, es capaz de considerar una considerable renovación de fosfolípidos.

Mediante hemolisis hipotónica se estudia la membrana proteica, medio que permite mantener a la membrana aislada o el estroma con su esqueleto. Las proteínas periféricas de la membrana son de fácil extracción utilizando soluciones de baja fuerza iónica, Dichas proteínas que se encuentran en su cara citoplasmática son: espectrina, actina, proteína 4.1. Mientras que las proteínas que forman parte del esqueleto son la proteína 4.2,ankirina.(*Del Pilar & Andrés, 1993*).

De acuerdo a la función se dividen en cuatro grupos: (I) transportadores de membrana, (II) moléculas de adhesión y receptores, (III) enzimas y, (IV) proteínas estructurales que ligan la membrana con el citoesqueleto.*(Crisp, 2014)*.

Otra clasificación de las proteínas de la membrana del eritrocito es Integral o periférica. Las proteínas integrales penetran la bicapa lipídica, mientras que las proteínas periféricas interaccionan con las proteínas integrales y la superficie interna sin penetrar la bicapa lipídica.

Las proteínas de membrana están sujetas a modificaciones post-traduccionales que son: fosforilación, metilación, glicosilación, deamidación, ubiquitinación, oxidación).*(Crisp, 2014)*.

1.4.4. METABOLISMO DEL ERITROCITO

El metabolismo del eritrocito es muy limitado debido a que carece de núcleo, y algunos orgánulos celulares y mitocondrias. “El ATP es la principal fuente de energía del glóbulo rojo, y se requiere para algunas funciones como es la plasticidad de las proteínas, mantener el hierro de la hemoglobina, el mantenimiento iónico, el cual requiere para hacer funcionar la Na, K⁺ y ATPasa e inicio, mantenimiento/reparación de la glucólisis o vía de Embden-Meyerhof, produce (2 moles de ATP) . Además, por este ciclo, se genera NADPH, que evita la oxidación del hierro de ferroso (Fe²⁺) a férrico (Fe³⁺)”.*(Medicina Cirugía & Hematología Grupo CTO, n.d. 2014)*

La hemoglobina disminuye su afinidad cuando se produce 2-3 DPG, con el oxígeno con el cual los tejidos no reciben adecuadamente oxígeno. La vía de las hexosas-monofosfato que da un mínimo de energía y ayuda al metabolismo del hematíe. Pero su utilidad fundamental es la generación de NADPH.

La principal y más importante fuente de energía del eritrocito es la glucosa ya que le permite ser utilizada en: las vías que a continuación se detallan:

“Vía glucolítica o de Embden-Meyerhof. Se metaboliza la glucosa hasta lactato. Se metabolizan un 80-90% de glucosa. Generan 12 moles de NADPH+H a Fosfato y un mol de glucosa. (*Medicina Cirugía & Hematología Grupo CTO, 2014.*)

- **“Vía de la hexosa-monofosfato.**(se mantiene el glutatión reducido para proteger los grupos sulfhidrilos de la hemoglobina y la membrana celular de la oxidación. El 10 % de la glucosa se metaboliza en esta vía.” (*Medicina Cirugía & Hematología Grupo CTO, n.d 2014.*)

- **Vía de la hemoglobina reductasa.-** Protege a la hemoglobina de la oxidación

1.5 ANEMIA

Se define la anemia como una concentración baja de hemoglobina. La anemia viene dado por diferentes causas, la principal por deficiencia de hierro ya que hay disminución de la masa eritrocitaria. La Anemia podemos medir y evaluar con pruebas de laboratorio, principalmente la Biometría Hemática, en la que se analiza, hemoglobina, hematocrito, y volumen corpuscular medio, etc. Componentes que aportan mucha información del estado de los glóbulos rojos.

1.5.1 CLASES DE ANEMIAS

1.5.1.1 ANEMIAS HEMOLITICAS

La anemia hemolítica es un grupo de trastornos ya sea intravascular como extravascular, que causan la disminución de la destrucción prematura del glóbulos rojos. Entre 90 y 120 días es la vida media del eritrocito glóbulo rojo en sangre periférica (normal) está acortada; en la hemolisis moderada, esta se

reduce a 20-40 días y en la hemólisis severa, de 5-20 días y las reservas eritropoyéticas están agotadas.(*Vivar Martha 2011*).

Las hemoglobinopatías, han descrito más de 700 variantes de hemoglobina. Las alteraciones de la membrana del eritrocito, está dada por una condición genética, que involucra la producción de proteínas, como la anquirina, espectrina, banda 3, y proteína 4,2. (*García & Rodríguez., 2010*).

1.6. ESFEROCITOSIS HEREDITARIA

1.6.1 ANTECEDENTES HISTORICOS

La Esferocitosis Hereditaria (EH) fue descrita en 1871 por Vanlair y Masiusque estudiaron una familia belga cuyo propósito era una mujer joven aquejada de dolor abdominal recurrente, ictericia y debilidad. Su madre y hermana mayor presentaban síntomas similares. Los autores apreciaron que algunos hematíes eran pequeños, esféricos e hiperocrómicos, y sugirieron que se trataba de corpúsculos en vías de destrucción de los que procedía un exceso de pigmentos biliares.(*Del Pilar & Andrés, 1993*)

En 1890, Wilson comunicó seis miembros de una familia con esplenomegalia y subictericia, aparentemente hereditarias. En 1893, Wilson y Sranley detallaron más el cuadro sindrómico de esta familia con episodios de mayor ictericia asociados a cólico biliar y anemia, considerando secundaria a ello la afectación del bazo. Asimismo señalaron la cronicidad de la enfermedad, que no impedía una vida duradera. Una de sus pacientes falleció, su examen postmortem del bato reveló su congestión macro y microscópicamente y la causa de la muerte dictaminada fue hemólisis activa de origen esplénico.

El Alemán Chauffard cuantificó la fragilidad osmótica por primera vez. La mayor contribución fue descrita en 1907, por el cual confirmó el aumento de la fragilidad osmótica de los eritrocitos, Observó que la presencia de hemolisis está correlacionada con la esplenectomía, y demostró la implicación del bazo en esta entidad. (*García & Del Cueto, 2002*).

Posteriormente se identificó que en la enfermedad Minkowski-Chauffard (denominada también esferocitosis hereditaria) la mayoría de pacientes presentaban una disminución de Sodio (Na^+) intracelular y una pérdida de lípidos de la membrana, lo que explica la disminución del área superficial de la célula., y la ruptura del eritrocito. (*García & Del Cueto, 2002*)

Otros trabajos revelaron anomalía en el transporte de membrana de cationes monovalentes y en la fosforilación de varias proteínas de membrana, así como reducción de la superficie celular por pérdida de lípidos, pero anteriores estudios demostraron que tales anomalías eran debidas a defecto subyacente de las proteínas del esqueleto. (*Maria del Pilar, Madrid. 1993*).

1.6.2. DEFINICION Y PREVALENCIA

La Esferocitosis Hereditaria (EH) es el trastorno hemolítico hereditario más prevalente en la población.” Es la anemia hemolítica congénita más frecuente con una incidencia mundial de 1/2000-3000 nacimientos.”.

Es una entidad heterogénea, de herencia autosómico dominante generalmente, en EEUU tiene una prevalencia de 1/2000 nacidos. (*García & Rodríguez 2010*), caracterizada por una disminución de la relación superficie/volumen de los hematíes,

con hemólisis, presencia de esferocitos en sangre periférica, presenta una elevación de la concentración de hemoglobina corpuscular media (HCM), en la mitad de los casos, aumento de la fragilidad osmótica y respuesta clínica favorable a la esplenectomía. Sus heterogéneas bases moleculares residen en defectos primarios de las proteínas de la membrana eritrocitaria o, que aún se desconocen en la mayor parte de los casos.

Su prevalencia estimada en la población occidental es 1; 5000, dada la frecuencia de casos leves y asintomáticos que se detectan solamente con ocasión del estudio familiar de un caso de EH. La intensidad de cómo la enfermedad se presenta y sus manifestaciones clínicas, es muy amplia, en los que unos pacientes pueden ser asintomáticos, y otros presentar anemias más graves. (*Crisp 2013*),(*Sociedad Argentina de Pediatría, 2015*).

17 FRAGILIDAD OSMÓTICA

El proceso de Osmosis, es un proceso en el que la membrana permite el paso del agua e impide el paso de los solutos. Y hacen que el eritrocito absorba agua cuando está en un medio hipotónico.(*Katheleen, 2014*),

La prueba de fragilidad osmótica nos sirve para detectar esferocitosis hereditaria y talasemia, identificando hemolisis intra-vascular, y sobre todo evalúa la capacidad de resistencia de los eritrocitos. El aumento de la fragilidad Osmótica que provoca una hinchazón del eritrocito está dado por una acumulación del catión sodio y pérdida de potasio y por poli anión (DPG) por cloro. El 70 % es aceptable la entrada de agua al eritrocito, cuando sobrepasa este porcentaje se produce la hemolisis.(*Vives & Aguilar, 2006*). “La prueba se realiza exponiendo los eritrocitos del paciente y de un testigo normal a soluciones hipotónicas de NaCl de diversa concentración de 0 a 100% y midiendo cuantitativamente la hemoglobina liberada y la magnitud de la hemolisis”

dicha prueba permite obtener una información valiosa de la normalidad del hematócrito. *(García & Rodríguez 2010)*

Los Esferocitos es una principal característica de un aumento de la fragilidad osmótica o una disminución en la resistencia a la hemólisis (fig.8). Así mismo la fragilidad osmótica permite determinar varias patologías entre ellas Esferocitosis Congénita, Anemia hemolítica idiopática adquirida, enfermedad hemolítica del recién nacido,

FRAGILIDAD OSMOTICA	
DISMINUCIÓN	AUMENTO
Hemoglobina S	Esferocitosis Hereditaria
Hemoglobina C	Anemia Hemolítica Angiopática
Talasemias	Anemia Hemolítica Autoinmune
Anemias Ferropénicas.	Estomatocitosis Congénita

Fig.8 Causas de Alteraciones en la Fragilidad Osmótica.

Proporciona una medida precisa de que tan esférico es un eritrocito en el momento de la exposición al medio hipotónico y esta hemólisis se alcanza a concentraciones de NaCl más altas en eritrocitos con tendencia a la esfericidad.

“Un resultado positivo es cuando el porcentaje de NaCl del paciente es 10 puntos mayores que el porcentaje del testigo de hemólisis; lo cual es compatible con esferocitosis hereditaria. Si el porcentaje de NaCl del testigo es mayor que el porcentaje de NaCl del paciente al 50% de hemólisis, indica eritrocitos resistentes en el paciente, característico de la talasemia”. *(García & Rodríguez, 2010)*

1.7.1. MEDIO HIPOTÓNICO

Se denomina hipotónica a una solución que tiene baja concentración de soluto en el medio externo y menor en el interno. Las células se hinchan y aumenta el volumen en el interior del hematíe apreciándose una alteración de la membrana, y empieza una fuga masiva de hemoglobina y provocándose hemólisis, la cual es absoluta si es al 100% (Fig.8)

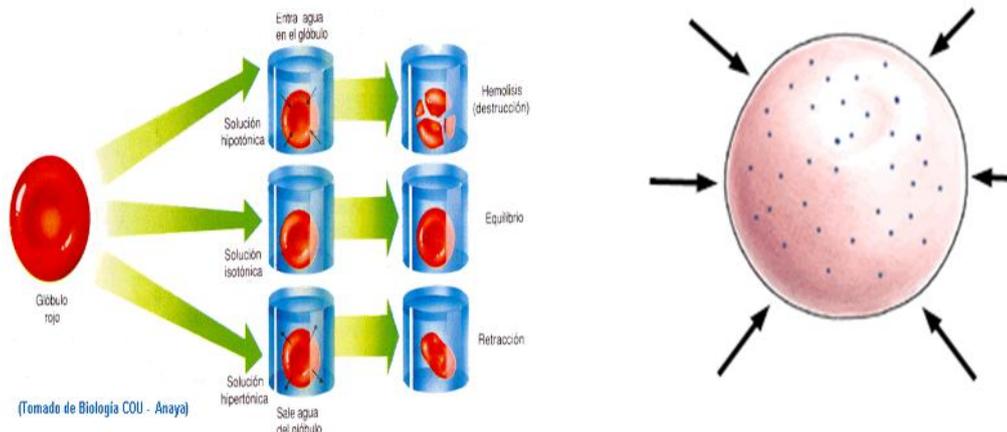


Fig9. Ilustración de solución hipotónica.<http://cienciasdejoseleg.blogspot.com/2013/03/importancia-de-la-osmosis-traves-de-la.html>

2.8.2. ÓSMOSIS

Se denomina difusión de agua a través de la membrana eritrocitaria. El agua viaja de desde una área de baja concentración de solutos a una de alta concentración de soluto. (fig9)

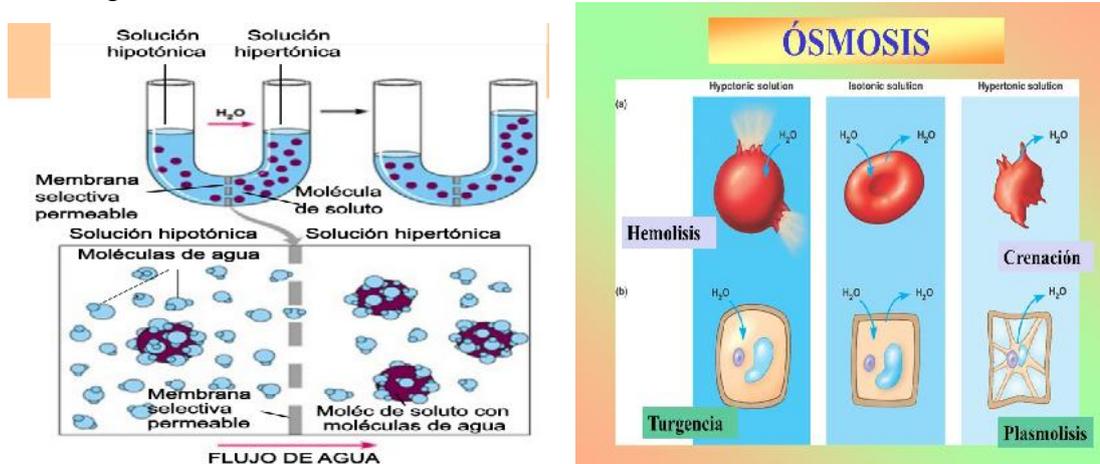


Fig.10 Osmosis.<http://cienciasdejoseleg.blogspot.com/2013/03/importancia-de-la-osmosis-traves-de-la.html>

CAPITULO II

MARCO METODOLÓGICO

2.1- Metodología: Diseño analítico transversal.

2.2 Método: Observacional.

2.3 Premisas e Hipótesis

Existen diferencias significativas en la cuantificación de fragilidad osmótica empleando sangre total EDTA y sangre total heparinizada con la técnica estándar de fragilidad osmótica referida por Parpart y varían en relación con el tiempo de almacenamiento de las mismas previo al análisis.

2.4. Universo y Muestra

Al tratarse de un ensayo no controlado de evaluación de prueba diagnóstica, se trabajará con una muestra probabilística de un n20, de ambos sexos, en base a las recomendaciones de la guía CLSI-EP28A3, en su componente preliminar para transferencia de valores de referencia.

Los sujetos del presente estudio serán hombres y mujeres con un rango de edad de 20 a 45 años aparentemente normales.

2.5.CDIU – Operacionalización de variables.

- **INDEPENDIENTE.**-Matriz de Análisis
- **DEPENDIENTE.**-Grado de hemólisis
- **MODERADORA.**-Tiempo de almacenamiento
- **CONTROLADAS.**- Pacientes aparentemente sanos

2.6. Gestión de datos

Los datos obtenidos en el presente estudio fueron ingresados en una base de datos en Microsoft Excel 2010™ donde se verificó la información completa y se corrigió potenciales errores de digitación para su posterior análisis. Distribución normal y se consideraron aquellas variables cuantitativas con curtosis > 1 .

Las variables cuantitativas fueron expresadas en promedio y desviación estándar en el caso de ser paramétricas, en tanto que se presentaron en medianas y percentiles 2.5 y 97.5 las no paramétricas (Unidades Ópticas Espectrofotométricas).

Para el análisis inferencial entre las Unidades Ópticas recuperadas para las diferentes matriz de análisis y tiempos, se empleó Test de Wilcoxon, aceptando como válido un nivel de significación del 95% ($\alpha=0.05$).

2.7. Criterios éticos de la investigación

El presente estudio se ejecutó sobre 20 muestras obtenidas de sujetos voluntarios aparentemente sanos, respetando los preceptos para Investigación Biomédica establecidos en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. Todos los sujetos voluntarios fueron informados acerca de los objetivos y fines del presente estudio, así como de los análisis que se ejecutarían sobre las muestras a ellos extraídas. Al no tratarse de un estudio de intervención y al ser el único riesgo potencial el estándar habitual de una flebotomía de rutina, únicamente se obtuvo su consentimiento verbal, aclarando la estricta confidencialidad de su identidad tanto en bases de datos como en publicaciones relacionadas que surjan de la investigación.

CAPITULO III

RESULTADOS

3.1. Antecedentes de la unidad de análisis o población

Se estudiaron un total de 20 muestras de pacientes sanos de ambos sexos, las cuales fueron sometidas a determinación de fragilidad osmótica empleando dos matrices de análisis diferentes a saber: sangre total EDTA y sangre total heparinizada, las cuales fueron analizadas dentro de la primera hora de obtenida, a las 24 y a las 72 horas.

3.2. Diagnóstico o Estudio de Campo:

La edad promedio de los sujetos seleccionados fue de 32.5 ± 7.8 años (Rango: 20 – 55 años), con una hemoglobina promedio de 15.6 ± 1.5 g/dL (Rango: 11.8 – 17.7 g/dL), con un hematocrito promedio de 45.6 ± 3.5 % (Rango: 37.7 – 50.8%) y un VCM promedio de 87.4 ± 5.6 (Rango: 67.3 – 94.8).

Cada muestra se analizó en 16 diluciones consecutivas con agua destilada y solución salina conforme se detalla en la metodología, mismas que fueron luego medidas en su absorbancia a 450 nm y relativizadas de frente a la absorbancia más alta obtenida de las 16 diluciones, con la finalidad de establecer la dilución a la cual habitualmente se presente hemólisis en población sana.

Las medianas e Intervalos de confianza al 95% del porcentaje de hemólisis por tipo de muestra y tiempo de proceso, se presenta en las siguientes tablas.

Tabla I.

Porcentaje de hemólisis por dilución de lectura. Sangre Total heparina y EDTA. Muestra General

Tipo de Muestra/Tiempo de Análisis	Dilución de Lectura (% NaCL)															
	0.76 L1	0.72 L2	0.68 L3	0.64 L4	0.60 L5	0.56 L6	0.52 L7	0.48 L8	0.44 L9	0.40 L10	0.36 L11	0.32 L12	0.28 L13	0.24 L14	0.20 L15	0.16 L16
Heparina1 hora																
• Mediana	0,00	0,00	0,0	0,0	18,33	48,33	67,70	77,50	80,00	83,33	83,33	91,66	91,98	93,88	97,36	100,0
• p2.5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	17,64	35,29	29,41	35,29	57,89	64,28	70,00	83,33	83,33	75,00
• P97.5	33,33	66,66	72,22	94,73	89,47	88,88	93,33	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Heparina24 horas																
• Mediana	0,0	0,0	0,0	0,0	15,47	50,00	75,00	74,17	83,97	88,14	83,97	82,50	84,16	79,28	83,97	83,97
• p2.5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	9,58	10,95	12,64	10,95	12,64	10,95	10,95	12,32	12,64
• P97.5	6,66	6,66	14,28	91,66	100,0	92,85	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Heparina72 horas																
• Mediana	0,00	0,00	0,00	7,41	27,88	50,00	76,97	81,25	81,80	86,19	88,56	83,48	86,19	86,60	84,96	79,91
• p2.5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,55	42,85	9,52	12,69	12,69	12,69	14,28	14,28	11,11	14,28	12,69
• P97.5	6,25	6,25	52,63	62,50	81,25	93,75	100,00	100,00	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Tabla I.

Porcentaje de hemólisis por dilución de lectura. Sangre Total heparina y EDTA. Muestra General (Continuación)

Tipo de Muestra/Tiempo de Análisis	Porcentaje de Hemólisis / Dilución de Lectura															
	0.76* L1	0.72* L2	0.68** L3	0.64* L4	0.60* L5	0.56*** L6	0.52* L7	0.48 [€] L8	0.44* L9	0.40* L10	0.36* L11	0.32* L12	0.28 [€] L13	0.24 ^φ L14	0.20 [€] L15	0.16 [∞] L16
Edta 1 hora																
• Mediana	0.0	0.0	0.0	6.90	28,20	62,01	74,16	90,27	80,90	92,58	86,05	91,60	91,60	92,30	93,90	100,0
• p2.5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,25	68,75	50,00	43,75	50,00	71,42	75,00	71,43	84,21	76,92
• P97.5	52,63	68,42	73,68	78,68	89,47	100	93,33	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Edta 24 horas																
• Mediana	0,00	0,00	0,00	0,00	24,03	50,0	72,79	76,92	72,11	79,51	79,90	84,61	80,62	87,08	87,50	91,98
• p2.5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	72,79	76,92	72,11	79,51	79,90	84,61	14,08	16,90	18,31	15,49
• P97.5	7,69	16,66	40,00	31,25	50,00	100,0	100,0	100,00	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Edta 72 horas																
• Mediana	0,00	0,00	3.49	14,35	30,95	50,00	75,00	84,62	85,17	84,41	90,12	86,66	84,44	87,45	87,45	93,33
• p2.5	0,00	0,00	0,00	0,00	1,47	7,35	11,76	1,47	1,47	10,75	11,82	11,82	13,23	8,82	11,82	10,75
• P97.5	6,66	13,97	40,00	66,66	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

* p>0.05 Heparina 1 hora vs EDTA o Heparina Otras Horas (Test de Wilcoxon) /

** p<0.05 Heparina 1 hora vs Heparina 24 horas / *** p<0.05 Heparina 1 hora vs EDTA 1 hora / [€] p<0.05 Heparina 1 hora vs EDTA 1 hora

[€] p<0.05 Heparina 1 hora vs EDTA 24 horas; Heparina 1 hora vs Heparina 24 horas; Heparina 1 hora vs EDTA 72 horas;

^φ p<0.05 Heparina 1 hora vs EDTA 1 hora; Heparina 1 hora vs EDTA 24 horas; Heparina 1 hora vs Heparina 24 horas; Heparina 1 hora vs EDTA 72 horas; Heparina 1 hora vs Heparina 72 horas;

[€] p<0.05 Heparina 1 hora vs EDTA 24 horas / Heparina 1 hora vs Heparina24 horas / Heparina 1 hora vs Heparina72 horas /;

[∞] p<0.05 Heparina 1 hora vs EDTA 24 horas / Heparina 1 hora vs Heparina24 horas / Heparina 1 hora vs EDTA72 horas / Heparina 1 hora vs Heparina72 horas /

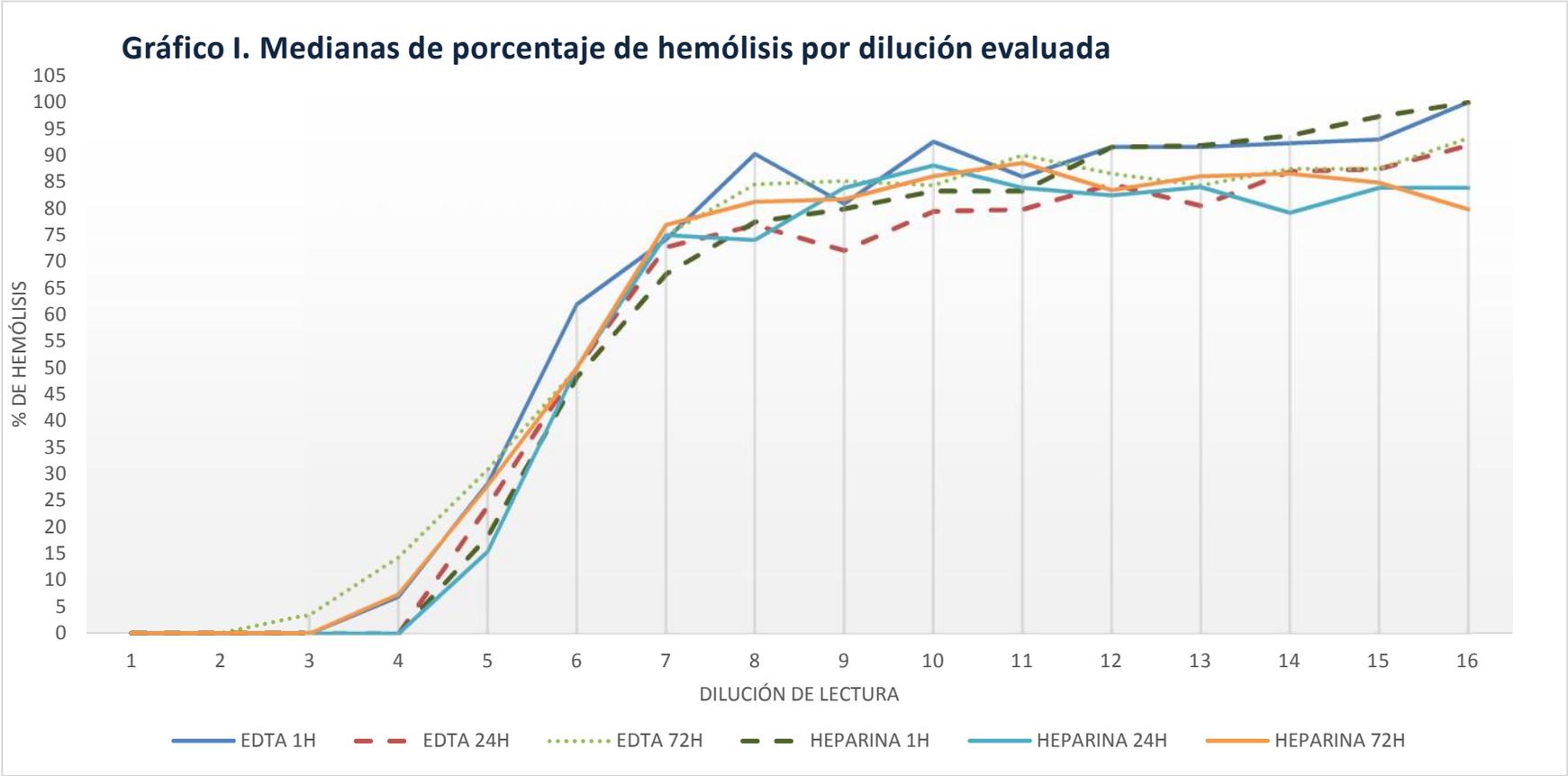
La dilución en la cual se inició el 100% de hemólisis, por tipo de muestra usada, se muestra en la siguiente tabla.

Tabla II.

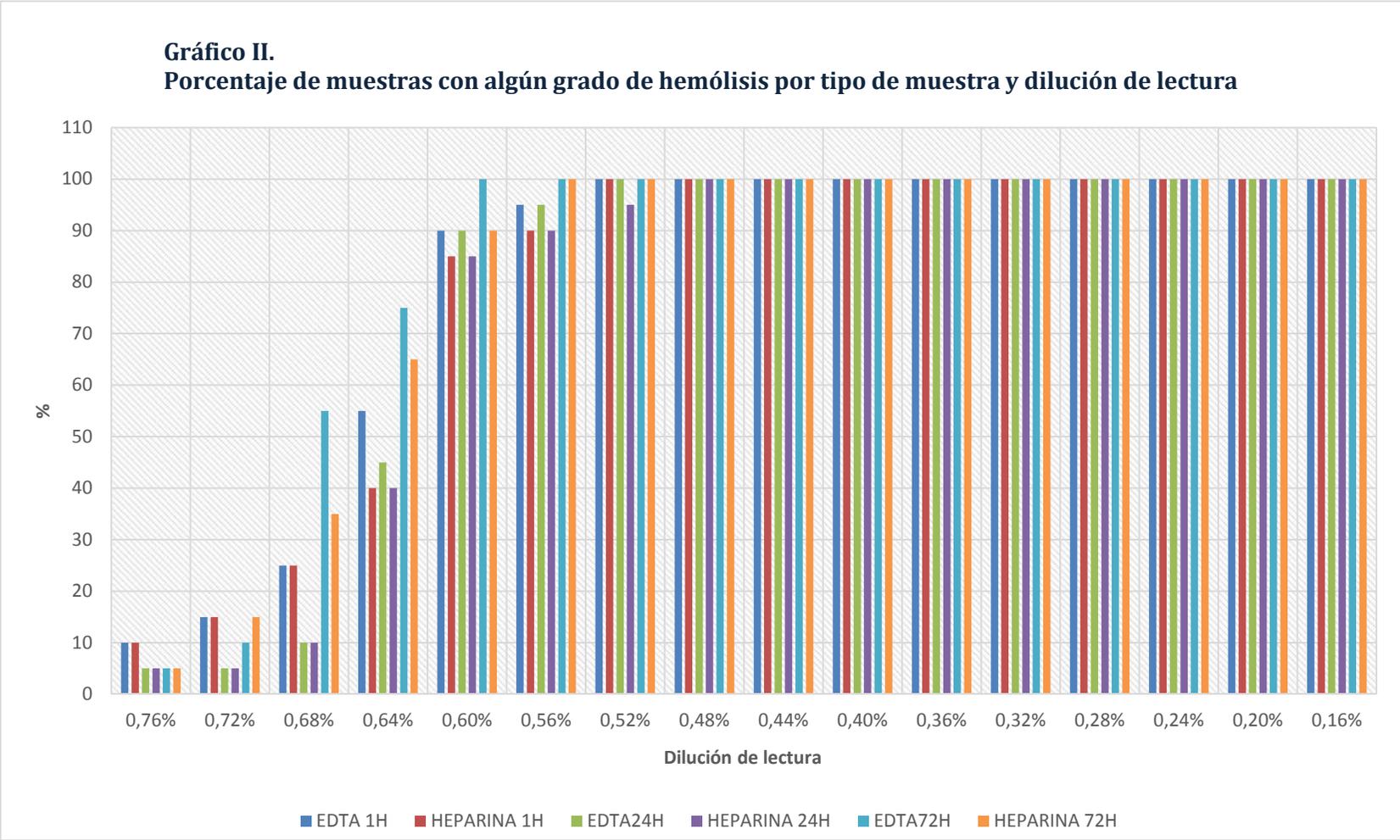
Aparición de hemólisis al 100% por dilución de lectura por tipo de muestra. Muestra General

Tipo de Muestra/Tiempo de Análisis	Hemólisis al 100% en dilución de lectura n (%)											
	0.60% L5	0.56% L6	0.52% L7	0.48% L8	0.44% L9	0.40% L10	0.36% L11	0.32% L12	0.28% L13	0.24% L14	0.20% L15	0.16% L16
• EDTA1 hora	0 (0)	1 (5)	0 (0)	3 (15)	2 (10)	4(20)	1(5)	2 (10)	0 (0)	3(15)	1 (15)	3 (15)
• EDTA24 horas	0(0)	1 (5)	1(5)	2(10)	2 (10)	2(10)	2 (10)	2(10)	0 (0)	2(10)	2 (10)	4(20)
• EDTA72 horas	2(10)	1(5)	0 (0)	3 (15)	5 (5)	3 (15)	2(10)	0 (0)	1(5)	0 (0)	2 (10)	1 (5)
• Heparina1 hora	0 (5,0)	0 (10)	0 (10)	1 (20)	2 (25)	1(5)	2(10)	4(10)	5 (20)	0 (25)	0 (0)	0 (15)
• Heparina24 horas	1 (5)	0 (0)	1 (5)	2 (10)	3 (15)	2 (10)	0 (10)	0 (20)	0 (15)	0 (5)	0 (0)	0 (5)
• Heparina72 horas	0 (0)	0 (0)	3(15)	3 (15)	3 (15)	0(12,5)	0 (8,3)	0(12,5)	0 (6,7)	0 (10)	0 (5)	0 (0)

El comportamiento de la mediana del porcentaje de hemólisis por dilución de lectura y tipo de muestra, se presenta en el siguiente gráfico.



El porcentaje acumulado de muestras que presentaron hemólisis de cualquier grado por tipo de muestra evaluada, se presentan en el siguiente gráfico,



CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

4.1. Contrastación Empírica: La Esferocitosis Hereditaria es una enfermedad de baja frecuencia en el Ecuador. Es la patología más común de los defectos en la membrana eritrocitaria ocurrida por una alteración en la proteínas y por ende una reducción de la superficie del eritrocito, lo que hace que éste cambia su forma de disco bicóncavo a esferocitos. (*Attie , 2012*). (*Campus, 2012*).

Al ser una enfermedad que presenta hemólisis por la ruptura de la membrana eritrocitaria, requiere ser evaluada a través de ensayos de laboratorio que permitan evaluar el grado de hemolisis e identificar si se trata de esferocitosis hereditaria u otra enfermedad hemolítica. Una de las principales pruebas de laboratorio para el diagnóstico de esferocitosis hereditaria es la Fragilidad Osmótica (*Peña, 2011*)

El estudio de fragilidad Osmótica consiste en enfrentar a los eritrocitos a soluciones hipotónicas con grado descendente y evaluar la presencia de hemolisis en las distintas concentraciones de la solución usada, habitualmente de NaCL.

La evaluación de la fragilidad osmótica, si bien es un método de fácil realización, no suele estar implementado en los laboratorios de rutina, por lo que sus muestras se refieren a centros de mayor complejidad. En este contexto la evidencia acerca de la estabilidad de la muestra es escasa y el tipo de muestra empleada varía, pues en algunos casos se requiere sangre total EDTA y en otros sangre total heparinizada, siendo esta última la de recomendación habitual (*Lewis. S.M, 2007*), con recomendaciones de estabilidad que oscilan hasta las 24 horas. (*Vives & Aguilar, 2006*)

El presente estudio evaluó el comportamiento de la fragilidad osmótica en dos matrices de análisis (Sangre total EDTA y Sangre Total Heparinizada) a diferentes tiempos de evaluación: dentro de la primera hora, 24 y 72 horas post toma en condiciones de refrigeración (2-8 °C), con la finalidad establecer la estabilidad de estas dos matrices de análisis en las condiciones especificadas y su impacto sobre el comportamiento de la hemólisis en sujetos adultos aparentemente sanos.

Para cuantificar el porcentaje de hemólisis en las diferentes concentraciones, la hemólisis fue relativizada de frente a las absorbancias obtenida dentro de las diluciones consecutivas, en base a lo recomendado por Parpat. *(Lewis. S.M, 2007) (García & Rodríguez., 2010)*

El comportamiento de las medianas del porcentaje de hemólisis por dilución empleada de NaCl se muestran en la Tabla I, evidenciándose no diferencias significativas en las medianas de porcentaje de hemólisis entre las concentraciones de 0.76% hasta 0.60 %, exceptuando en la dilución 0.68%, donde se evidenciaron diferencias entre la muestra de heparina 24 horas. Para todos los casos la muestra considerada como de comparación fue la muestra de heparina, por ser aquella recomendada por Lewis como la matriz de análisis para este tipo de ensayo. *(Lewis. S.M, 2007)*

En las siguientes soluciones hipo-osmolares por debajo de 0.60%, las diferencias encontradas en los diferentes tipo de muestras es variada, sin embargo resulta relevante la estabilidad demostrada entre ellas en las primeras cinco diluciones, considerando un potencial error aleatorio sobre la diferencia de la dilución 0.68%. Internacionalmente, la hemólisis se espera inicie habitualmente en la dilución 0.50%, *(Katheleen 2014, Frances Fischbach, 2009)*, por lo que observar un comportamiento homogéneo entre las diferentes matrices de muestra es relevante para establecer su uso para diagnóstico, exceptuando el

hallazgo hecho sobre la heparina 24 horas, la cual mostró una diferencia en la mediana de hemólisis en la dilución 0.68, pero que sin embargo puede considerarse como un evento aleatorio una vez observado el comportamiento posterior.

En cuanto al comportamiento de los porcentajes de hemólisis por solución usada, se aprecia en el Gráfico II que el 95% de las muestras presentaron algún grado de hemólisis a partir de la solución 0.52% de NaCL, independientemente del tipo de muestra, dilución a partir de la cual el 100% de muestras alcanzan algún grado de hemólisis, lo que permite establecer que en esta población la dilución límite para inicio de hemólisis es 0.52% de NaCL, encontrándose dentro del intervalo reportado en otras publicaciones, donde la hemólisis inicia entre la solución 0.5% y 0.3% (**Frances Fischbach, 2009**).

En base al comportamiento encontrado tanto al analizar las medianas, en donde hasta la dilución 0.60% no se evidencian diferencias significativas y considerando además que el sobre el 95% de las muestras presentan algún grado de hemólisis desde la dilución 0.52%, se puede concluir que esta dilución podría ser considerada como el límite de referencia, lo que además permite asumir los valores de referencia establecidos en otras poblaciones (inicio de hemólisis entre solución 0.6 y 0.48%), al parecer sin afectación importante dada por el tipo de muestra y el almacenamiento en refrigeración por hasta 72 horas, de hecho el comportamiento de las curvas de respuesta a hemólisis que se presenta en el gráfico I, evidencian un comportamiento homogéneo independiente del tipo de muestra y condición de almacenamiento.

Pese a los hallazgos encontrados, sería deseable realizar un estudio similar con una muestra superior a 120 sujetos, conforme lo recomienda la guía CLSI C28 A3 ,(CLSI, 2010) con la finalidad de ratificar los valores de inicio de hemólisis encontrados.

Si bien al parecer el tipo de muestra y la conservación de la misma no afecta sensiblemente el desempeño de la prueba, debe mantenerse la recomendación de que el estudio de fragilidad se lo haga a la brevedad posible y en caso de remitirse, se emplee la muestra universalmente evaluada (sangre total heparina), sin superar las 72 horas entre la recolección y el análisis, manteniendo a la sangre total EDTA, dada la poca evidencia con la que se cuenta en el estado del arte, únicamente como una muestra alterna.

4.2.Limitaciones:

Si bien el estudio aporta sobre la estabilidad y el valor de uso de las matrices de análisis estudiadas, no permite establecer conclusiones relativas a los valores de referencia extrapolables a la población

4.3. Líneas de investigación:

Una vez que se ha establecido la utilidad y estabilidad de las dos matrices de análisis, se puede emplear esta información, para ejecutar estudios de prevalencia de esferocitocis en población de riesgo y comparar sus hallazgos de frente a otras técnicas como el glicerol acidificado.

4.4.Aspectos relevantes

El presente estudio es la primera evidencia local sobre la validez y estabilidad de las matrices de muestra evaluadas (sangre total EDTA – sangre total heparinizada), para ser usada como referente para la implementación de la técnica en laboratorios de análisis médicos.

CAPÍTULO V

PROPUESTA

La propuesta, se ha apegado al estado del arte relacionado con la evaluación de fragilidad osmótica como una herramienta diagnóstica para evaluar la condición de hemólisis, además de generar evidencia sobre el uso de dos matrices de análisis y el comportamiento de las mismas en tiempos diferentes de almacenamiento, generando información que permita establecer recomendaciones tanto sobre la muestra a usar como su estabilidad.

La evidencia recuperada, aporta a la validez de la prueba diagnóstica e indirectamente a la seguridad del paciente, sobre la base del uso de la muestra apropiada en las condiciones demostradas, para asegurar información clínicamente confiable para la toma de decisión médica.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

- En base al ensayo realizado en las instalaciones del Laboratorio especializado Netlab, las muestras mostraron un comportamiento estable para la determinación de fragilidad osmótica hasta las 72 horas en refrigeración, independientemente del tipo de muestra empleada.
- No se evidenciaron diferencias significativas en los resultados obtenidos en la cuantificación de fragilidad osmótica empleando sangre total EDTA y sangre total heparinizada presentando hemólisis a una concentración inicial de NaCl, 0.60 por ciento.
- Las muestras presentaron algún grado de hemólisis a partir de la dilución L5 cuya concentración 0.60 de NaCl y agua destilada, independientemente del tipo de muestra, dilución a partir de la cual todas las muestras alcanzan algún grado de hemólisis, dato este concordante con el rango de referencia publicado de inicio de hemólisis en soluciones a una concentración de NaCl y agua destilada 0.60, por lo que se pueden transferir los valores de referencia establecidos en otras poblaciones (la hemólisis inicia en un rango de 0.3 a 0.5 por ciento).
- El tipo de muestra y la conservación de la misma no afecta sensiblemente el desempeño de la prueba hasta las 72 horas de tiempo de almacenamiento.
- El uso de las matrices de análisis estudiadas, no permite establecer conclusiones relativas a los valores de referencia extrapolables a la población

RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio similar con una muestra superior a 120 sujetos, conforme a lo que recomienda la guía CLSI C28 A3 con la finalidad de establecer los valores de referencia de inicio de hemólisis en población alto andino.
- Debe mantenerse la recomendación de que el estudio de fragilidad se lo haga a la brevedad posible y en caso de remitirse, se emplee sangre total heparinizada, sin embargo y dado los hallazgos del presente estudio se puede emplear como muestra alterna sangre total EDTA.
- La fragilidad osmótica, al ser una prueba altamente demandante de tiempo, operador dependiente y por ende susceptible a errores humanos, requiere de un alto grado de estandarización técnica – instrumental y de operación, por lo que se recomienda su derivación a laboratorios especializados que dado el nivel de control y estandarización aseguren la confiabilidad de los resultados emitidos.

BIBLIOGRAFÍA

- Attie, M., Cocca, A., Basack, N., Schwalb, G., Drelichman, G., & Aversa, L. (2012). Actualización en Esferocitosis Hereditaria. *Hematología Pediátrica*, 16(2), 106–113.
- Campus, D. (2012). *Génética Molecular de la Deficiencia Eritrocitaria Humana en Piruvato Quinasa*, [http://doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00220-5](http://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00220-5).
- Clsi. (2010). EP28-A3c: Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline—Third Edition, 28(October), 12. <http://doi.org/56238-682-4>
- Crisp R.L, Gammella. D., L, S., Mc, R., G, S., & Donato H. (2013). Utilización de sangre capilar. Un aporte para el diagnóstico precoz de esferocitosis hereditaria. *Artículo Original*, artículo Original hematología, 17(1), 8–14.
- Crisp, R. L. (2014). *Esferocitosis hereditaria: avance en la metodología diagnóstica, estudios demográficos e investigación de mecanismos involucrados*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Universidad de Buenos Aires. Retrieved from http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_5630_Crisp.pdf
- Del Pilar, M., & Andrés, R. (1993). *La Esferocitosis Hereditaria y su Diagnostico en la práctica Clínica*. Universidad Compluten sede Madrid..
- Coller Ernest, *Hematología de Williams* (Marban, Ed.) (6ta ed.). España (2005).
- Evatt, B. L., Lewis, S., del Real Colegio de Patólogos, M., Lothe, F., & McArthur, J. R. (1986). *Anemia Hematología para un diagnóstico básico Organización Panamericana de la Salud* (Organización Panamericana de la Salud Ed.). Washington, D.C. Retrieved from [file:///C:/Users/lsantafe/Downloads/Anemia hematologia para un diagnostico basico.pdf](file:///C:/Users/lsantafe/Downloads/Anemia%20hematologia%20para%20un%20diagnostico%20basico.pdf)
- Frances Fischbach, M. B. D. (2009). *A Manual of laboratory and Diagnostic tests*. (L. W. & Wilkins, Ed.) (8th ed.). china: 2009.
- García-Rodríguez, F., Nely Rodríguez-Romo, L., Gómez-Peña, Á., Martínez-González, O., Aide Martínez-Cabriales, S., González-Llano, Ó., ... Gómez-Almaguer, D. (2010). Anemias hemolíticas hereditarias desde la perspectiva de un laboratorio de referencia del Norte de México. *Artículo Original Hematología*, 1111(33), 136–140.

- García, M. H., & Del Cueto, M. E. (2002, January). Esferocitosis hereditaria: Aspectos clínicos, bioquímicos y moleculares. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología Y Hemoterapia*, 7–24.
- Henry, J. B. (2014). *El Laboratorio en el Diagnóstico Clínico*. (Marban, Ed.) (original). Madrid: 2014.
- INEC. (2013). *Anuario_Nacimientos_y_Defunciones_2013*. (S. C. Jhon Usiña, Ed.). Retrieved from www.ecuadorcifras.gob.ec
- Joan Lluís Vives Corrons, & Josep Lluís Aguilar Bascompete. (2006). *Manual de técnicas de laboratorio en hematología*. (Masson, Ed.) (3rd ed.). España: 2006. Retrieved from https://books.google.com.ec/books?id=dLaPFGPaEwsC&printsec=frontcover&source=gs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- Lecumberri R. (2010). *Hematología Clínica*. In Prieto Valtueña J.M. & Yuste Ara J.R. (Eds.), *La Clínica y el Laboratorio* (21st ed., pp. 3–19). Barcelona: Elsevier Masson.
- Lewis. S.M, B. J. . (2007). *Hematología Práctica*(Elsevier, Ed.) (10th ed.). Madrid: 2008. Retrieved from <https://www.mendeley.com/viewer/?fileId=214f8b2f-b347-2e79-6b71-c4690fa4e8ee&documentId=b5b43705-5ef1-3ff2-a19b-57234e6bf5ae>
- Mayo medical Laboratories. (2016). *Osmotic Fragility, RBC*. EEUU. Retrieved from http://www.mayomedicallaboratories.com/test-catalog/setup.php?unit_code=9064&format=pdf
- Medicina Cirugía, de, & Hematología Grupo CTO, edición. (n.d.). *Manual CTO*. (CTO, Ed.) (8va) 2014.
- OMS. (2006). *Talasemia y otras hemoglobinopatías Informe de la Secretaría Prevalencia de las Hemoglobinopatías*, 5.2, 8. <http://doi.org/EB118/5>.
- Pagana Deska Kathleen (2014). *Guía de Pruebas Diagnósticas y de Laboratorio*. (E. Mosbi, Ed.) (11th ed.). Barcelona.
- Palomo G.Ivan, Pereira G.Jaime, & Palma.B:Julia. (2009). *Hematología, Fisiopatología y Diagnostico*. (Universidad de Taca, Ed.). chile. Retrieved from <http://es.slideshare.net/carhicar/hematologia2005-palomo>

- RODAK. (2002). Hematología, Fundamentos y aplicaciones clínicas. (Editorial Medica Panamericana, Ed.) (2da ed.). Uruguay. Retrieved from <http://myslide.es/documents/bf-rodak-hematologia-fundamentos-y-aplicaciones-clinicaspdf.html>
- Pérez Carlos Jaime, J., & Gómez Almaguer, D. (2009). Hematología. Esferocitosis hereditaria. In S. A. D. C. V. McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES (Ed.), HEMATOLOGIA (2nd ed., p. 35). Mexico. Retrieved from <https://hematologiacelular2015.files.wordpress.com/2014/12/hematologia-la-sangre-y-sus-enfermedades.pdf>.
- Romero Cabrera, A. (2011). Fragilidad y enfermedades crónicas en los adultos mayores. *Med Int Mex*, 27(5), 455–462.
- Secretaria de Salud de México. (2014). Guía de Práctica Clínica GPC. (Cenetec, Ed.) Diagnóstico y Tratamiento de la Esferocitosis Hereditaria. México: Cenetec. Retrieved from www.cenetec.salud.gob.mx
- Sociedad Argentina de Pediatría. (2015, January). Esferocitosis hereditaria. Revisión. Parte I. Historia, demografía, etiopatogenia y diagnóstico. 2015, 69–80. Retrieved from <http://www.sap.org.ar/docs/publicaciones/archivosarg/2015/v113n1a22.pdf>
- Yanzaguano Vivar, Martha A. (2011). Anemias hemolíticas adquiridas autoinmunes- TESIS. Universidad Católica de Cuenca .

ANEXOS

ANEXO 1

Esquema de las Diluciones utilizadas en la investigación, tomando como modelo el de Parpart.

#	concentración	Solución salina 0.9%	Agua destilada
1	0,76	3,8	1,2
2	0,72	3,6	1,4
3	0,68	3,4	1,6
4	0,64	3,2	1,8
5	0,60	3,0	2,0
6	0,56	2,8	2,2
7	0,52	2,6	2,4
8	0,48	2,4	2,6
9	0,44	2,2	2,8
10	0,40	2,0	3,0
11	0,36	1,8	3,2
12	0,32	1,6	3,4
13	0,28	1,4	3,6
14	0,24	1,2	3,8
15	0,20	1,0	4,0
16	0,16	0,8	4,2

Diluciones Decrecientes, con sus respectivas concentraciones

ANEXO 2

❖ Espectrofotómetro, GEG -3000 Chemistry Analyzer.

Medición: Absorbancias.



Ubicación: Laboratorio Especializado Netlab.

Controlado: Gerencia de Calidad.

ANEXO 3.

❖ Refrigerador

Almacenamiento de Muestras. y Reactivos.



Ubicación: Laboratorio Especializado Netlab

Control: Gerencia de Calidad.: Refrigerador en el cual se almacena las muestras ,a una temperatura de 2-8 grados centigrados,cuando presenta algun daño los termómetros digitales dan una alarma, ya sea pitando o enviando un mensaje a los celulares al personal del área de Calidad y su control es constante.

ANEXO.4

- ❖ **Termómetro Digital**
- ❖ **Medición:** Temperatura



Ubicación: Laboratorio Especializado Netlab

Control: Gerencia de Calidad.: Su control es remotamente y emite un mensaje al área de Calidad cuando la temperatura esta por debajo o sobre el estandar requerido.

ANEXO.5

- ❖ **Centrífuga**
- ❖ **Medición:** 1000 a 3000 RPM



Ubicación: Laboratorio Especializado Netlab

Control: Gerencia de Calidad.: Su control es constante esta a cargo del área Calidad.

ANEXO 6

Esquema de las diluciones realizadas.



Almacenamiento de Muestras para procesamiento



Imágen de las Diluciones a diferente concentración, y la presencia visual de hemólisis.