



Material
Didáctico
para Estudiantes

GUÍA DE TRABAJOS PRÁCTICOS: BIOQUÍMICA CLÍNICA II

FQByF

Facultad de Química , Bioquímica y Farmacia



Universidad Nacional
de San Luis

SERIE DIDÁCTICA: MATERIAL DIDÁCTICO PARA ESTUDIANTES

Guías de Trabajos Prácticos: BIOQUÍMICA CLÍNICA II

Licenciatura en Bioquímica

Myriam L. FORNERIS
María Florencia FIGUEROA
María José LÓPEZ
Margarita Y. FLORES

FACULTAD DE
QUÍMICA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN LUIS

2019

Decana

Dra. Mercedes Edith CAMPDERRÓS

Vice Decana

Dra. Lucía Beatriz FUENTES

Secretaria académica

Dra. Estela Isabel GASULL

Comisión de la Serie Didáctica

Coordinadora

Dra. María Cristina ALMANDOZ

Integrantes

Departamento de Bioquímica
y Ciencias Biológicas

Dra. Susana I. SÁNCHEZ

Dra. Verónica P. FILIPPA

Departamento de Farmacia

Dr. Luis A. DEL VITTO

Dra. Alejandra O. MARIA

Departamento de Química

Dra. Yamina A. DÁVILA

Dra. María de los Ángeles ÁLVAREZ

SUMARIO

La publicación periódica Serie Didáctica ha sido creada en el ámbito de la Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional de San Luis (Ordenanza N° 008/07-CD) con el fin de proporcionar material de estudio a los estudiantes de las Carreras de grado impartidas en la Facultad.

Actualmente, la SERIE DIDÁCTICA: MATERIAL DIDÁCTICO PARA ESTUDIANTES (Resolución N° 269/16) ofrece guías de Trabajos Prácticos de Laboratorio y de campo, guías de resolución de problemas, material teórico, propuestas de estudios dirigidos y comprensión de textos, entre otros materiales, elaborados por el cuerpo docente de las diferentes Áreas de Integración Curricular de la Facultad. Estas producciones didácticas significan un aporte para cubrir necesidades académicas acorde al enfoque de cada asignatura o que no se encuentran habitualmente en bibliografía específica. Las mismas están disponibles en la página de la UNSL (<http://www.fqbf.unsl.edu.ar/mda.html>) lo que facilita la accesibilidad por parte de los estudiantes, docentes y comunidad educativa en general, garantizando la calidad de la visualización y la amplia difusión del material publicado en este sitio. De igual modo, la Serie Didáctica realiza una extensión invitando a docentes y alumnos de diferentes niveles educativos a participar, crear, producir y utilizar este espacio fomentando así el vínculo entre esta Institución y la comunidad.

En nuestra opinión, es de vital importancia producir y compartir el conocimiento con los estudiantes y la sociedad. De este modo, se tiende a facilitar los procesos de enseñanza y de aprendizaje y la transmisión de una idea directriz de conducta humana y científica, fortaleciendo los vínculos entre docentes-alumnos-conocimientos y sociedad.

Dado que la presente SERIE DIDÁCTICA resulta de la participación de numerosos actores, ante los posibles errores humanos y cambios en la ciencia, ni los editores ni cualquier otra persona que haya participado en la preparación del material didáctico garantizan íntegramente que la información sea precisa o completa.

PRESENTACIÓN DEL CURSO DE BIOQUÍMICA CLÍNICA II

La presente guía de Teórico-Práctica pertenece a la asignatura **BIOQUÍMICA CLÍNICA II** que se enmarca en el Ciclo Profesional del Plan de Estudio (11/10) de la Carrera de Licenciatura en Bioquímica. El Curso se dicta en el segundo cuatrimestre de 5° año (noveno cuatrimestre), es de carácter obligatorio y posee un crédito horario de 150 horas.

Requisitos para cursar Bioquímica Clínica II (BC II). El alumno deberá tener regularizadas las asignaturas: Bacteriología y Virología, Parasitología, Química Biológica Patológica y Bioquímica Clínica I. Para rendir BC II debe aprobar previamente las mencionadas materias y la Práctica Profesional.

Modalidad de cursada. El Programa del Curso se desarrollará mediante el dictado de *clases teóricas* y *clases prácticas*, que comprende por semana: dos clases teóricas (4 h), explicación teórica de trabajos prácticos (2 h), un trabajo prácticos de laboratorio y/o de aula para la resolución de problemas de aplicación o casos clínicos (3 h) y seminarios de integración y actualización que incluyen la discusión de casos clínicos. De acuerdo con la reglamentación vigente, la regularización de la materia se logrará con el 80% de asistencia a las actividades obligatorias y con la aprobación de dos evaluaciones parciales.

El contenido del Curso tiene como objetivo estudiar el fundamento, la realización e interpretación de los métodos analíticos a utilizar en el Laboratorio Clínico, y su integración con el conocimiento fisiopatológico de diferentes enfermedades relacionadas a Hematología, Hemostasia y Endocrinología. Además, se aplicarán los conocimientos sobre Bioseguridad en el Laboratorio y de Control de Calidad, en el caso que corresponda, adquiridos en el Curso de Bioquímica Clínica I (Guía de Bioquímica Clínica I, Ed. 2018 – ISSN 2545-7683).

Los objetivos específicos del curso son: 1) Lograr que el alumno incorpore e integre los conocimientos teóricos y prácticos sobre los contenidos de la asignatura, a través de aplicación de estrategias de enseñanza y aprendizaje. 2) Capacitar al alumno para seleccionar métodos, interpretar y evaluar los resultados en un contexto clínico. 3) Desarrollar habilidades para la utilización de equipamiento manual y automatizado en las áreas de Hematología y Endocrinología. 4) Formar un Profesional Bioquímico que en base a los conocimientos adquiridos pueda ejercer sus actividades en el ámbito oficial, privado o de investigación.

En la presente Guía el alumno encontrará los fundamentos teóricos y la metodología para la realización de los trabajos prácticos.

Los docentes del Curso de Bioquímica Clínica esperamos que los alumnos descubran la importancia que tiene esta materia en la formación del Bioquímico. Así mismo, promover el desarrollo de una actitud crítica para que los conocimientos adquiridos se conviertan en el futuro en elementos para un mejor desempeño de su actividad profesional.

INDICE

Presentación de la Asignatura	I
-------------------------------	---

MÓDULO HEMATOLOGÍA

Trabajo Práctico N° 1

EVALUACIÓN HEMATIMÉTRICA. HEMOGRAMA (parte I)

Objetivos	1
Introducción Teórica	1
Actividad Práctica	12
Bibliografía	31

Trabajo Práctico N° 2

HEMOGRAMA: RECuentOS CELULARES (parte II)

Objetivos	32
Introducción Teórica	32
Actividad Práctica	36
Bibliografía	44

Trabajo Práctico N° 3

ALTERACIONES MORFOLÓGICAS DE LA SERIE ERITROIDE.

ESTUDIO CUALI- y CUANTITATIVO

Objetivos	45
Introducción Teórica	45
Actividad Práctica	48
Bibliografía	53

Trabajo Práctico N° 4

ALTERACIONES MORFOLÓGICAS DE LOS LEUCOCITOS.

ESTUDIO CUALI- y CUANTITATIVO

Objetivos	54
Introducción Teórica	54
Actividad Práctica	61
Bibliografía	67

Trabajo Práctico N° 5

AUTOMATIZACIÓN EN HEMATOLOGÍA

Objetivos	68
Introducción Teórica	68
Actividad Práctica	84
Bibliografía	87

Trabajo Práctico N° 6

HEMOSTASIA

Objetivos	88
Introducción Teórica	88
Actividad Práctica	111
Bibliografía	127

MÓDULO ENDOCRINOLOGÍA

Trabajo Práctico N° 7

Parte 7A: ALTERACIÓN EN EL METABOLISMO DE LA GLUCOSA.

EVALUACIÓN POR EL LABORATORIO

Objetivos	128
Introducción Teórica	128
Actividad Práctica	147
Bibliografía	151

Parte 7B: ALTERACIÓN EN EL METABOLISMO DE LOS LÍPIDOS.

EVALUACIÓN POR EL LABORATORIO

Objetivos	152
Introducción Teórica	152
Actividad Práctica	171
Bibliografía	182

Trabajo Práctico N° 8

EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ENDOCRINA. GLÁNDULA TIROIDES

Objetivos	183
Introducción Teórica	183
Actividad Práctica	205
Bibliografía	210

Trabajo Práctico N° 9

SISTEMA REPRODUCTOR FEMENINO.

ENFERMEDADES MÁS FRECUENTES DEL OVARIO Y ÚTERO.

DIAGNÓSTICO POR EL LABORATORIO

Objetivos	211
Introducción Teórica	211
Actividad Práctica	251
Bibliografía	253

Trabajo Práctico N° 10

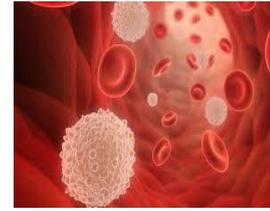
APARATO REPRODUCTOR MASCULINO.

FISIOPATOLOGÍA Y EXPLORACIÓN DE LA FUNCIÓN ENDOCRINA

Objetivos	254
Introducción Teórica	254
Actividad Práctica	302
Bibliografía	304

TRABAJO PRÁCTICO N° 1

EVALUACIÓN HEMATIMÉTRICA. HEMOGRAMA (parte I)



OBJETIVOS

- Adquirir los conocimientos básicos sobre la obtención y manejo de muestras sanguíneas para pruebas hematológicas, bajo normas de bioseguridad.
- Realizar las pruebas básicas que comprende el Hemograma. Método manual: hematocrito, eritrosedimentación y concentración de hemoglobina.
- Cuantificar los niveles de hierro y transferrina para el estudio de anemia ferropénica. Interpretar los resultados obtenidos y elaborar el Informe.

INTRODUCCION

La Hematología es la rama de la ciencia médica que estudia los elementos formes de la sangre y sus precursores, como también la coagulación sanguínea. Esta disciplina comprende desde la etiología, diagnóstico, tratamiento y pronóstico hasta la prevención de las enfermedades de la sangre y órganos hematopoyéticos. Se halla estrechamente unida a los métodos de laboratorio que posibilitan la exploración directa de la sangre mediante análisis de concentración, morfología y función de los componentes celulares como glóbulos rojos (GR), glóbulos blancos (GB), plaquetas y de sus precursores en la médula ósea, y también de los constituyentes químicos asociados presentes en el plasma. Una de las pruebas diagnósticas más utilizadas en la práctica médica habitual, es el **hemograma**.

La sangre es tejido vivo formado por el plasma que contiene agua, sales y proteínas, y por los componentes celulares, los cuales se encargan del buen funcionamiento del organismo a través de la oxigenación, eliminación de desechos biológicos, transporte de células y componentes del sistema inmunológico.

La producción de células sanguíneas **-hematopoyesis-** es un proceso complejo y en el ser humano tiene diferentes localizaciones anatómicas a lo largo del desarrollo embrionario y fetal, siendo la médula ósea, a partir del cuarto mes de gestación, la que continúa con esta función durante toda la vida de la persona. La sobrevivencia del tejido

hematopoyético depende de la vida media de cada población, que oscila entre 120 días para los GR, alrededor de 3 años para ciertos tipos de linfocitos, hasta probablemente toda la vida en una célula de memoria del sistema inmune. Ante la muerte celular, se requiere una producción periódica de células de los diversos linajes hematopoyéticos. Tal pérdida es compensada por células primitivas inmaduras conocidas como Células Madre Hematopoyéticas (CMH) encargadas del proceso de hematopoyesis (Figura 1). Las CMH poseen tres características básicas: capacidad de auto-renovarse, alto potencial proliferativo y diferenciarse a múltiples linajes. Se ubican en un nicho particular en médula ósea y tienen marcadores de superficie (CD34) y factores de transcripción, que las identifican. El microambiente hematopoyético de la médula ósea contiene células del estroma que producen y depositan elementos en la matriz extracelular, sintetizan factores de crecimiento y citoquinas locales que pueden inducir o inhibir la proliferación y diferenciación de las CMH. De esta manera, la diferenciación hacia un linaje específico depende de interacciones especializadas entre células del estroma y células progenitoras.

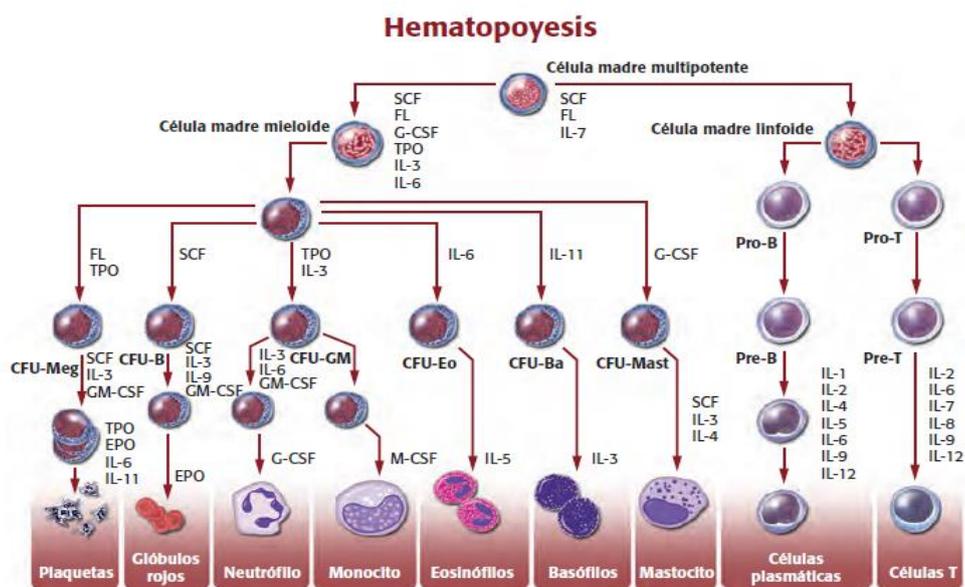


Figura 1. Esquema de la hematopoyesis y lugares de actuación de los factores de crecimiento más importantes. CFU: unidades formadoras de colonias; SCF: stem cell factor, factor estimulador de células stem; EPO: eritropoyetina; FL: ligando de flt3; IL: interleucina; TPO: trombopoyetina (Rodak, 2014).

Las enfermedades hematológicas básicamente pueden afectar los elementos celulares, plasmáticos (inmunoglobulinas, factores de la coagulación), órganos hematopoyéticos (médula ósea) y órganos linfoides (ganglios linfáticos y bazo). Los

trastornos sanguíneos comunes incluyen anemia, trastornos hemorrágicos (hemofilia) y de la coagulación, y cáncer (leucemia, linfoma y mieloma). Cabe señalar que el hallazgo de anomalías en los parámetros hematológicos más usuales (por ejemplo, descenso de hemoglobina, leucocitosis, velocidad de sedimentación globular acelerada) no traduce necesariamente la existencia de una enfermedad de la sangre, sino de otro órgano o sistema que, de forma secundaria, produce tales alteraciones.

A continuación, se detallan los procedimientos para obtener una muestra de sangre adecuada para realizar el hemograma completo y se exponen las pruebas de laboratorio que tienen especial interés en el estudio de la sangre.

OBTENCIÓN DE MUESTRAS SANGUÍNEAS

Para el procedimiento de obtención de muestras sanguíneas es importante aplicar las normas de bioseguridad en el laboratorio clínico, las cuales se detallan en la Guía de Bioquímica Clínica I (Edición 2018 - ISSN 2545-7683).

A su vez, es importante establecer y unificar criterios con un adecuado control de calidad, ya que de ello depende que el resultado de la muestra sea el correcto. En un sistema de gestión de calidad, la etapa pre-analítica ha mostrado ser la mayor fuente de errores en el laboratorio. Múltiples factores asociados con el manejo y procesamiento de las muestras de sangre pueden introducir imprecisión en las pruebas o un error sistemático antes o después que la muestra ha sido obtenida. Por ello, se debe evitar el contacto prolongado de las células con el suero o plasma, los cambios de concentración por evaporación, lisis o deterioro del analito debido a un almacenamiento inapropiado, o al uso de anticoagulantes inadecuados (Norma ISO 15.189: 2005).

Anamnesis

Como en cualquier otra determinación, antes, durante o después de la obtención de la muestra de sangre, es necesario realizar una minuciosa anamnesis al paciente que considere la edad, sexo, embarazo (indicando la edad gestacional), tipo de alimentación, medicamentos, contacto con tóxicos, quimioterapia, radioterapia, transfusiones previas, crisis hemolíticas, peso al nacer de un neonato, otros. El conocimiento de estos datos permitirá una adecuada validación e interpretación de los resultados.

Toma de muestra

La toma de muestra de sangre para análisis de laboratorio se puede realizar mediante las siguientes técnicas: venosa o periférica y capilar. El proceso mediante el cual la sangre es removida de la vena es conocido como venipuntura o flebotomía. La extracción de sangre se efectúa en ayunas o no, dependiendo de la prueba a realizar. En general, se recomienda un ayuno de al menos 8 h.

El paso más importante en el proceso de extracción de sangre es la correcta identificación del paciente, tanto en una consulta externa como hospitalizado. En ambas situaciones, el flebotomista debe solicitar al paciente que diga su nombre completo. En caso de que el paciente no pueda contestar, se pregunta a un familiar o acompañante. A su vez, un sujeto hospitalizado debe ser reconocido por un brazalete de identificación. El nombre del paciente debe coincidir con el que figura en el impreso de petición de análisis, y el número de identificación de esa petición con el número de la etiqueta de los tubos.

ELEMENTOS NECESARIOS PARA LA FLEBOTOMÍA

1- ANTICOAGULANTES

Los anticoagulantes son medios que actúan como bloqueantes de la cascada de coagulación, siendo su principal mecanismo de acción la quelación del calcio. En hematología se utilizan para obtener plasma o muestras de sangre entera, estudiar las características morfológicas y realizar los recuentos celulares, permitiendo que las células sanguíneas se encuentren en el estado más parecido al fisiológico, por ello:

- No deben alterar la morfología de los leucocitos y el tamaño eritrocitario.
- No deben producir hemólisis de las células sanguíneas.
- No deben interferir con la coloración del extendido sanguíneo.
- Deben evitar la agregación plaquetaria.
- Deben posibilitar el máximo período de conservación de la muestra (no más de 24 h incluso refrigerada a 4°C).

La elección del anticoagulante y la proporción de sangre-anticoagulante son factores de mucha importancia. Pueden emplearse en forma sólida o líquida. Los primeros están indicados para la determinación de los parámetros hematológicos ya que no producen, como los anticoagulantes líquidos, dilución de la sangre.

Anticoagulantes sólidos

- EDTA ($C_{10}H_{16}N_2O_8$) o sal disódica, dipotásica o tripotásica del ácido etilendiaminotetraacético; actúa mediante un efecto quelante sobre el calcio. Es el anticoagulante de elección para hemograma. Se utiliza fundamentalmente para la realización de recuentos celulares (manual o en contadores hematológicos), hematocrito y frotis sanguíneos hasta 2 h después de la extracción de la muestra, al mismo tiempo que impide la aglutinación de las plaquetas. Las sales de potasio tienen la ventaja respecto a las de sodio, de ser más solubles en sangre cuando se usan a partir del producto sólido. Las tres sales afectan el tamaño del eritrocito, especialmente después del almacenamiento de la sangre anticoagulada por espacio de varias horas.

- El $K_2EDTA \cdot 2H_2O$ (peso molecular de 404,1 g): 1 g quela 100 mg de calcio iónico y el pH para una solución al 1% es de $4,8 \pm 1,0$. La concentración recomendada de EDTA es de 1,5-2,2 mg/mL de sangre total. Una mayor cantidad de anticoagulante puede producir retracción celular con disminución del hematocrito y un aumento de la concentración media de la hemoglobina (CMH). En contraste, un exceso de sangre con relación al anticoagulante produce la formación de microagregados que pueden alterar los resultados.

Se pueden adquirir comercialmente:

- Tubos con EDTA en la concentración indicada.
- Tubos al vacío con una gota (50 μ L) de EDTA tripotásico para 5 mL de sangre (es cien veces más soluble facilitando la mezcla de sangre con anticoagulante).
- Solución equilibrada de sales sódicas y potásicas de EDTA (0,342 mol/L) pH 7,2; en la proporción de 1/100. Ej: 10 μ L de anticoagulante para 1 mL de sangre (990 μ L).

- HEPARINA SÓDICA y/o HEPARINA DE LITIO, es un anticoagulante fisiológico (mucopolisacárido ácido) que impide a la protrombina transformarse en trombina. Los frotis realizados con sangre anticoagulada con heparina producen en las tinciones panópticas un color azulado y pseudovaculización celular, por lo tanto no se lo recomienda para tal fin. No es APTA para estudios de inmunohematología (Test de Coombs). No se utiliza para las tinciones citoquímicas. Además, al no impedir la agregación plaquetaria no se usa para el recuento de plaquetas. La heparina de sodio o litio puede usarse en forma sólida o líquida en proporción de 10-20 UI (0,1-0,2 mg de heparina por mL de sangre).

Anticoagulantes líquidos

- CITRATO TRISÓDICO ($C_6H_5O_7Na_3$) impide que el calcio se ionice evitando la coagulación. El citrato sódico se usa a una concentración de 0,106 mol/L (31,3 g/L de

$C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$). Para determinar la velocidad de sedimentación globular (VSG) se emplea en proporción de 1:4 (0,5 mL anticoagulante para 2 mL de sangre) y para las pruebas de Hemostasia de 1:9 (0,5 mL anticoagulante para 4,5 mL de sangre).

2- MATERIALES Y EQUIPOS REQUERIDOS PARA EXTRACCIÓN SANGUÍNEA

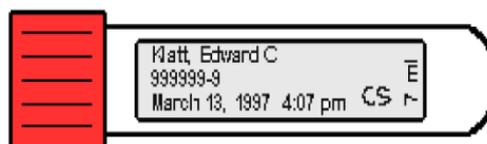
- Guantes descartables.
- Torundas de algodón.
- Banda adhesiva.
- Alcohol etílico al 70%.
- Ligadura o torniquete.
- Recipiente de recolección para desechos infecto-contagiosos.
- Jeringas plásticas descartables de 1, 5 ó 10 mL.
- Agujas desechables (19G-21G).
- Agujas Butterfly 23G y 25G.
- Gradillas.
- Tubos con y sin anticoagulante.
- Tubos y micro contenedores (niños).
- Portaobjetos, cubreobjetos de cristal y extensor.
- Adaptador para tubos-Vacutainer: se utilizan para tubos al vacío.



3- ETIQUETADO DE TUBOS

Elementos clave en el etiquetado para garantizar la calidad de la muestra pre-analítica:

- a) Nombre o iniciales del paciente.
- b) Número de identificación del paciente.
- c) Fecha y hora de la toma de muestra.
- d) Iniciales del flebotomista.



TÉCNICAS DE RECOLECCIÓN DE SANGRE

La toma de muestra de sangre se puede realizar mediante:

1) Punción venosa

2) Punción capilar

3) Punción arterial

Preparación del paciente

- a) Evaluar la existencia de problemas hemorrágicos o de circulación, o alergias al látex.
- b) Evitar la punción en un área con hematoma, fístulas, quemaduras, escoriaciones de la piel, cicatrices o del costado en que se ha realizado mastectomía reciente.
- c) Eludir la flebotomía en el brazo donde hay venoclisis, inyección intramuscular previa o administración de medicamentos vía intravenosa.

1- OBTENCIÓN DE SANGRE PERIFÉRICA POR PUNCIÓN VENOSA

A) EN ADULTOS

Las muestras venosas son obtenidas habitualmente por punción directa de las venas superficiales de la cara anterior del antebrazo: vena cefálica, vena basilíca y vena mediana cubital (Figura 2).

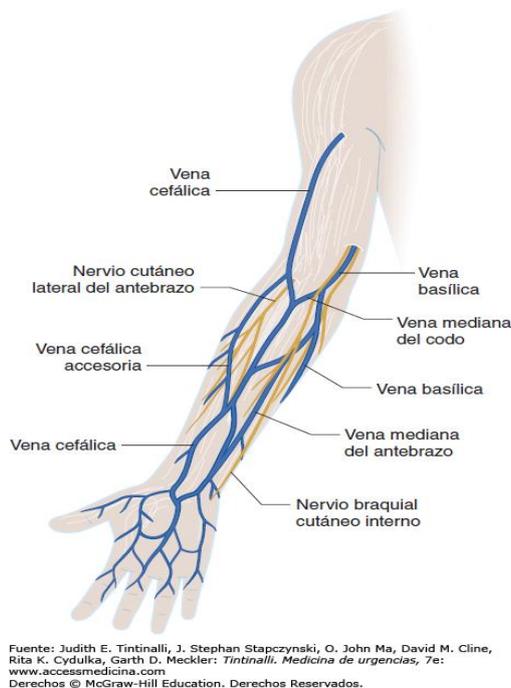


Figura 2. Localización anatómica de las venas del brazo para la toma de muestra de sangre.

Técnica de Venopunción

Consideraciones generales

- Practique las precauciones universales mínimas con todo paciente a ser atendido.
- Toda muestra debe ser considerada potencialmente infecciosa y se deben tomar las precauciones que garanticen la seguridad del flebotomista y de los pacientes.
- El material descartable a usar se abrirá sólo al momento de su utilización y, una vez manipulado, no podrá guardarse nuevamente aún cuando se le considere nuevo.
- No deje agujas y/o lancetas usadas en la mesa de trabajo.
- No coloque el protector a la aguja directamente con la mano.
- Una vez realizada la toma de muestra, descartar inmediatamente los materiales usados en recipientes para ese fin.

- g) Los recipientes que contienen algodón y los de desecho deben estar cerrados todo el tiempo y se abrirán solamente al momento de usar.
- h) Al momento de hacer la extracción colocarse los guantes desechables y mantenerlos puestos durante todo el procedimiento.
- i) Si ocurre un pinchazo accidental, informar inmediatamente al jefe de laboratorio. Mantenga la calma, y lávese con agua y jabón, y por último alcohol. Favorezca la salida de sangre por presión continua.

Procedimiento en Adultos (Figura 3)

1. Mantener durante la toma de muestra estrictas normas de higiene.
2. Disponer de todo el material preparado antes de iniciar la toma de muestra.
3. Elegir una vena bien visible en el antebrazo, localizándola visualmente y por palpación.
4. Colocar el lazo (aproximadamente 5 cm por encima del pliegue) y volver a palpar la vena.
5. Indicar al paciente que abra y cierre el puño durante algunos segundos y después lo mantendrá cerrado para facilitar la extracción.
6. Identificar la vena y limpiar el área circundante con algodón embebido en alcohol al 70%. Dejar secar.
7. Romper el sello de garantía de la aguja y colocarla en la jeringa sin tocar con los dedos, controlando el correcto funcionamiento del émbolo.
8. Fijar con los dedos pulgar e índice la vena elegida. Colocar la punta de la aguja en un ángulo de 15-30° sobre la superficie de la vena escogida con el bisel hacia arriba y atravesar la piel con un movimiento firme y seguro, hasta el lumen de la vena.
9. Dejar que la sangre fluya en la jeringa aspirando suavemente con el émbolo. La escala de la jeringa debe estar visible (hacia arriba).
10. *Si está utilizando el sistema vacutainer, introduzca el tubo deseado en el adaptador de la aguja, de forma que la aguja posterior perfora el tapón de hule del tubo. La sangre llena los tubos aspiradores automáticamente por la presión negativa. Retire el tubo. Evite presionar fuertemente la aguja durante la extracción.*
11. Indicar al paciente que abra el puño al finalizar la extracción, seguidamente se le retira el torniquete y luego la aguja, presionando el lugar de la punción con un trozo de algodón seco.
12. Colocar en el sitio de la punción un apósito una vez que no haya más sangrado.
13. Realizar el extendido sanguíneo colocando la gota de sangre que fluye de la aguja en un portaobjetos limpio y desengrasado (hacer por duplicado).

14. Descargar el resto de la sangre que está en la jeringa en tubos que contienen los anticoagulantes apropiados para hemograma o eritrosedimentación. Homogeneizar (evitar hacer espuma).
15. Rotular los extendidos (en el anverso del portaobjetos, sobre la cabeza del extendido).
16. Aclarar en el registro de muestras si algo interfirió durante el procedimiento.

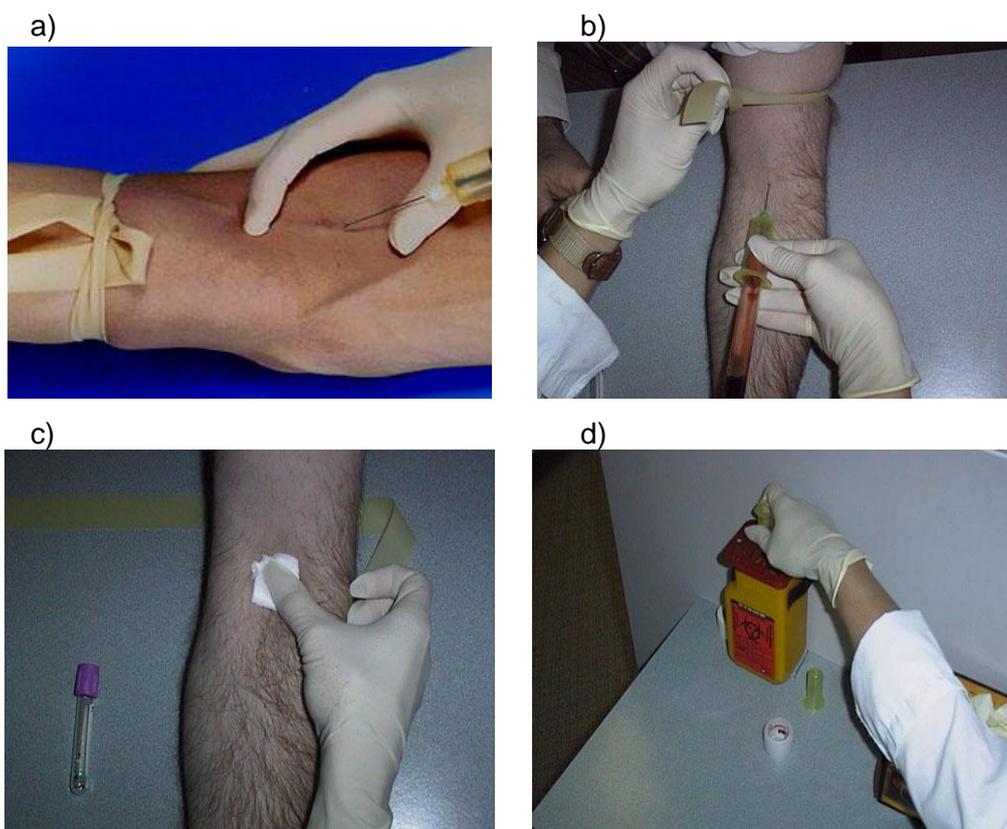


Figura 3. Secuencia del procedimiento de la punción venosa (Rodak, 2014).

A considerar: (Ver ANEXO I)

* Los tubos para extracción y colección de muestras sanguíneas deben tener un orden específico para evitar la contaminación cruzada de aditivos entre los tubos, en caso que un paciente requiera varios exámenes. Si bien existen discrepancias en el orden de llenado de los tubos, entidades internacionales como el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI: H3-A5), recomienda la siguiente secuencia: Tubo para hemocultivo, Tubo para pruebas de coagulación (tapón celeste), Tubo para suero con activador de la coagulación o sin él (tapón rojo y sus variantes), y por último, los tubos con aditivos en el siguiente orden: Tubo con heparina sódica (tapón verde oscuro) o Tubo con heparina de litio (tapón verde claro), Tubos con EDTA (tapón morado), Tubo con oxalato/fluoruro (tapón gris claro).

B) EN NIÑOS

El procedimiento de venopunción en niños y lactantes exige experiencia, destrezas especiales y tacto sensible. Con frecuencia, se utilizan las agujas de menor calibre (23 ó 25). En las venas de algunos lactantes pueden ser más adecuadas las jeringas o las sondas aladas (*butterflies*), y en niños mayores de 6 meses, se recomienda hacer la extracción del brazo. Cualquiera sea el tipo de equipo que se utiliza, es importante que un asistente sujete bien al niño, de manera que el brazo quede inmobilizado para introducir la aguja con éxito en la vena. El uso de pegatinas o vendas con diseños infantiles y los premios pueden servir como incentivo.

2) PUNCIÓN CAPILAR

La sangre capilar es una mezcla de sangre venosa, sangre arterial y líquido tisular. Cuando la cantidad de sangre que se precisa es muy pequeña o por diferentes motivos no puede practicarse una punción venosa, se puede recurrir a la punción capilar. Dado que las muestras capilares pueden generar resultados ligeramente diferentes, debe especificarse la obtención por punción venosa.

La sangre capilar se obtiene de la cara lateral del dedo medio o anular en los adultos y del dedo gordo del pie o talón en los niños (Figura 4).



Figura 4: Zonas del talón (A) y del dedo (B) para realizar punción capilar (Rodak, 2014).

- a. En el caso de niños menores de 6 meses, se procederá a extraer la muestra en una zona apropiada del talón con una lanceta descartable. Antes de la extracción conviene frotar el talón entre las manos para favorecer la irrigación de la zona.
- b. Se desinfecta la zona del talón con un trozo de algodón embebido en alcohol, se deja evaporar y se punza con la lanceta. La sangre debe fluir espontáneamente para evitar la mezcla con linfa intersticial que provocaría errores por dilución.

- c. Se limpia la primera gota y se deja gotear la sangre en el tubo con anticoagulante o en capilares heparinizados (por ej. 5 ó 6 capilares para hemograma y otros 2 para eritrosedimentación). El extendido se hace directamente a partir de la gota de sangre que fluye del talón.
- d. Se seca la zona con algodón y una vez que cesó el sangrado, se coloca un apósito.

3) PUNCIÓN ARTERIAL

Una correcta técnica para la obtención de sangre mediante punción arterial, es esencial para entender los valores de intercambio gaseoso en la ventilación y su equilibrio ácido/base. Existen dos procedimientos para la recolección de sangre arterial: **A) Punción directa de la arteria** con una jeringa heparinizada: la arteria radial a nivel del túnel carpiano es de 1ª elección, la más accesible y con menos riesgos post-punción. En 2º lugar, la arteria braquial en fosa antecubital; esta tiene más riesgo de punción de vena y nervio. La arteria femoral en zona inguinal se utilizará, si no hay otra opción, en paro cardíaco, shock sin pulsos periféricos, etc. **B)** a partir de un catéter arterial ya implantado.

El procedimiento se detalla en la Guía de Bioquímica Clínica I (TP N° 1).

(Edición 2018 - ISSN 2545-7683).



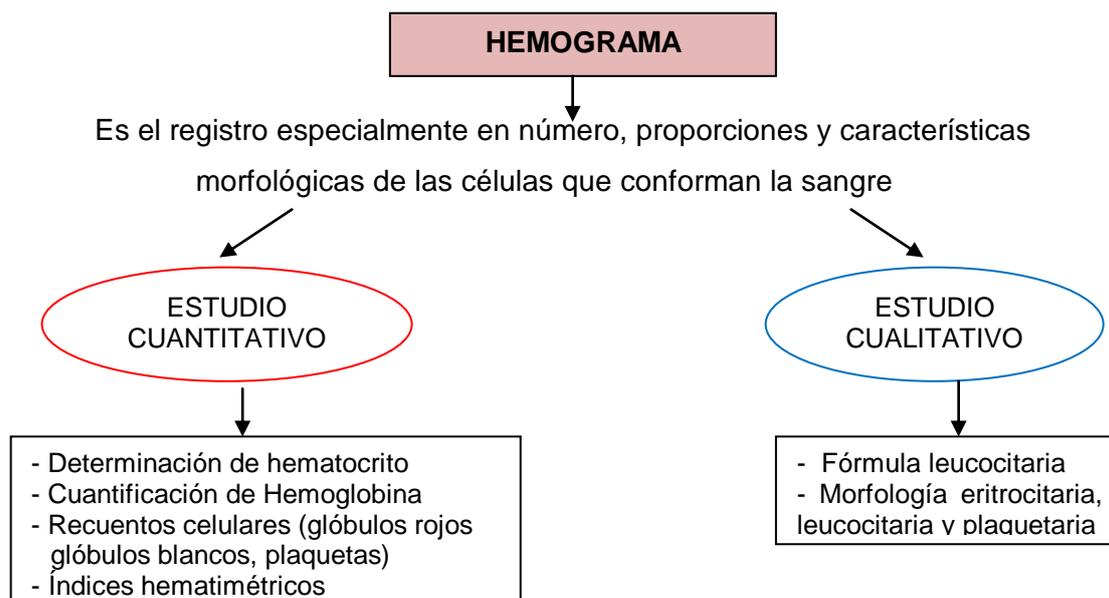
COMPLICACIONES EN LA RECOLECCIÓN DE LA SANGRE

- **Equimosis** (pérdida de una cantidad pequeña de líquido alrededor del tejido), **Hematoma** (pérdida de una cantidad grande de líquido alrededor del sitio de punción que causa tumefacción del área), **Falla en la extracción de sangre** (venas poco visibles), **Petequias**, **Tratamiento intravenoso** (diálisis, venoclisis); **Hemoconcentración**, **Hemólisis**, **Venas dañadas** (con cicatrices y ocluidas), **Desmayo**, **Convulsiones o temblores**, **Vómitos o ahogo**, **Alergias** (sustancias antisépticas o vendas aplicadas sobre la piel); **Pacientes con mastectomía**; **Edema**; **Obesidad**, otros.

ACTIVIDAD PRÁCTICA

HEMOGRAMA (parte I)

En hematología, el examen básico de la sangre incluye al **Hemograma**, que comprende un estudio cuanti- y cualitativo de sangre obtenida por punción venosa o capilar recolectada con anticoagulante EDTA (dipotásico o tripotásico).



ESTUDIO CUANTITATIVO

Desde el punto de vista técnico se reconocen distintos tipos de hemogramas, que van desde los tradicionales realizados con métodos manuales o semiautomáticos hasta los más complejos efectuados con métodos electrónicos que utilizan una combinación de tecnologías (Figura 5). Las técnicas manuales tienen, por lo general, un bajo costo en lo relativo al equipamiento y a los reactivos, pero insumen más tiempo. Las técnicas automatizadas requieren de contadores hematológicos, que permiten el procesamiento rápido de un gran número de muestras. Son más precisas, pero su exactitud depende de la calibración correcta y del uso de reactivos para ese analizador en particular.

En relación al recuento de células sanguíneas, los métodos manuales son la base de algunos métodos de referencia en el laboratorio hematológico, a los que aún es necesario

recurrir cuando se presentan discrepancias con los métodos automatizados (los recuentos celulares se realizarán en el TP de Hematología, parte II).



Figura 5. Contador Hematológico.

1) **HEMATOCRITO (Hto)**

El hematocrito indica la relación entre el volumen de eritrocitos y el volumen total de sangre, expresado como porcentaje. Está asociado directamente con la concentración de hemoglobina y su determinación constituye el procedimiento más simple para el diagnóstico de anemia (Figura 6).

El método de referencia para la determinación del Hto es la centrifugación de sangre total en tubo capilar (micrométodo). Es una técnica sencilla y accesible a laboratorios de baja complejidad. Entre sus factores de error están el plasma que queda atrapado entre los eritrocitos empaquetados y el posible efecto de leucocitos y plaquetas en la lectura.

En la actualidad, los autoanalizadores hematológicos suministran, dentro del contexto del hemograma automatizado, un valor de Hto que resulta de un cálculo electrónico a partir del Volumen Corpuscular Medio (VCM) y la concentración de eritrocitos. El valor obtenido electrónicamente difiere del obtenido por centrifugación en que no considera el efecto del plasma atrapado entre los eritrocitos ni el efecto de las restantes células sanguíneas, por lo que es siempre algo inferior (0,2-0,3%).

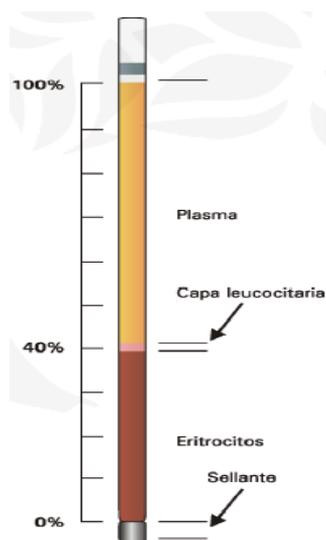
MICROHEMATORITO (Método manual - Micrométodo)

MATERIALES

- Microcentrífuga.
- Regla milimetrada o ábaco.
- Tubos capilares de vidrio de 7 a 7,5 cm de longitud por 1mm. de diámetro interno.

PROCEDIMIENTO

- Tomar la muestra en capilares heparinizados del pulpejo del dedo (se desecha la primera gota de sangre y se llena por capilaridad) o utilizar capilares sin heparina para sangre venosa con anticoagulante EDTA. Debe llenarse las 2/3 partes del capilar.
- Sellar un extremo vacío con plastilina.
- Colocar el capilar en una centrífuga de microhematocrito con el extremo sellado hacia la periferia (colocar la tapa de la microcentrífuga).
- Centrifugar aproximadamente 5 minutos a 10.000-12.000 rpm (si el Hto es superior al 50% realizar una centrifugación adicional de 5 min para asegurar que el plasma atrapado entre los GR sea mínimo).
- La lectura se realiza sobre un ábaco para microhematocrito haciendo coincidir la marca del **0** con el inicio de la capa de GR y el **100** con el menisco superior del plasma.
- La determinación del Hto debe realizarse por duplicado y la diferencia entre los dos valores obtenidos no debe ser superior a 0,01.



CÁLCULO:

$$A \text{ ----- } 100\%$$

$$B \text{ ----- } = X$$

x: hematocrito en tanto por ciento
 A: longitud total de sangre en el capilar
 B: longitud de la parte corpuscular

Figura 6: Microhematocrito con sangre periférica después de ser centrifugado. (Medicina & Laboratorio. 2007; 13: 11-12).

Fuentes de error

- Éstasis prolongado.
- Hemodilución por uso de anticoagulantes líquidos o por contaminación con líquido tisular.
- Homogenización inadecuada.
- Muestra con microcoágulos.
- Centrifugación a velocidad y tiempo no ideales.
- Lectura errónea (incluyendo la capa de GB y plaquetas), o no inmediata (el sedimento de GR adquiere forma de bisel si el capilar permanece en posición horizontal).
- Pérdida inaparente de muestra por el tubo capilar (cierre inapropiado del capilar).

Examen macroscópico

Si bien la determinación del Hto es por centrifugación, la observación macroscópica proporciona información valiosa:

- La visualización de la capa de GB puede dar una idea aproximada si el paciente presentará recuento de GB normales o alterados.
- Un color naranja o verdoso del plasma sugiere un incremento de la bilirrubina, y un color rosa o rojo sugiere hemoglobinemia.
- Si la muestra no ha sido obtenida antes de 1 ó 2 h de una comida rica en grasas, el plasma turbio puede señalar nefrosis o ciertas hiperglobulinemias anormales, crioglobulinemias.

VALORES DE REFERENCIA ($X \pm 2 DE$)

(DE: desviación estándar)

Edad y sexo	Hematocrito %	Fracción
Recién Nacidos	54 ± 10	$0,54 \pm 0,10$
Niños (hasta 10 años)	38 ± 5	$0,38 \pm 0,05$
Mujeres (18-50 años)	42 ± 5	$0,42 \pm 0,05$
Embarazadas	39 ± 5	$0,39 \pm 0,05$
Hombres (18-50 años)	45 ± 5	$0,45 \pm 0,05$

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

El valor de Hto varía con la edad y el sexo. Un valor por debajo del valor de referencia indica anemia, y un valor más alto, policitemia.

CONSIDERACIONES

El Hto refleja la concentración y no la masa total de hematíes:

1- En la hidremia del embarazo el Hto disminuye pero el número total de GR circulantes no se reduce.

2- En un paciente en estado de shock acompañado de hemoconcentración, el Hto puede ser normal o alto, aún cuando la masa eritrocitaria total disminuye por la pérdida de sangre. Por lo tanto no es confiable como indicador de anemia poco después de una hemorragia o una transfusión.

2- VELOCIDAD DE SEDIMENTACIÓN GLOBULAR (VSG)

La velocidad de sedimentación globular o eritrosedimentación se obtiene cuando la sangre anticoagulada se deja reposar durante un tiempo a temperatura ambiente y los eritrocitos sedimentan en su plasma nativo hacia el fondo del tubo. La VSG es la distancia en milímetros que sedimentan los GR en una hora.

No es una prueba específica ni definitiva de ninguna patología, ya que puede ser utilizada para detectar un amplio rango de enfermedades y para monitorear el curso evolutivo de los procesos inflamatorios crónicos (artritis reumatoidea, polimialgia reumática, tuberculosis, etc.) o la respuesta a la terapia con citostáticos (enfermedad de Hodgkin, linfomas y leucemias). Sin embargo, en ocasiones, cuadros tan graves como neoplasias y cirrosis pueden presentar una VSG normal. Constituye uno de los tests más utilizados como *screening* en el laboratorio clínico.

El mecanismo por el cual sedimentan los GR es complejo y depende de varios factores que incluyen: a) Tamaño de los glóbulos, b) Diferencia de densidad entre los eritrocitos y el plasma, c) Viscosidad del plasma, d) Temperatura, e) Interacciones electrostáticas entre la superficie de los GR, y f) Proteínas del plasma (fibrinógeno, globulinas y albúmina).

Los eritrocitos tienen una carga superficial neta negativa y por consiguiente tienden a repelerse entre sí. Las fuerzas de repulsión son neutralizadas en parte o en su totalidad si hay aumento de la cantidad de proteínas plasmáticas con cargas positivas; los eritrocitos sedimentan con mayor rapidez si se forman agregados de eritrocitos o *rouleaux* (pilas de monedas). Los ejemplos de macromoléculas que pueden producir esta reacción son el fibrinógeno, las β globulinas y las inmunoglobulinas patológicas.

Los eritrocitos tienen una masa relativamente pequeña y sedimentan con lentitud. Ciertas enfermedades pueden causar la formación de *rouleaux* por las altas concentraciones de fibrinógeno y de proteínas plasmáticas, observándose una VSG aumentada. La albúmina y la lecitina retrasan la VSG mientras que el colesterol la acelera.

La VSG está bajo la influencia de factores eritrocitarios. La anemia aumenta la VSG, debido a las variaciones en la forma y el tamaño de los GR. Esto favorece la formación de apilamientos que son independientes de la concentración de proteínas plasmáticas.

La VSG es directamente proporcional al peso del agregado celular e inversamente proporcional al área superficial. Por ello los microcitos se sedimentan más lentamente que los macrocitos. Los hematíes con forma anormal o irregular, tales como las células falciformes o los esferocitos, dificultan la formación de apilamientos y disminuyen la VSG.

Fases de la VSG

La sedimentación ocurre en 3 etapas: **1)** en los 10 min iniciales, se produce la formación de agregados en forma de "pilas de monedas", **2)** durante 40 min aproximadamente, los agregados de GR sedimentan a velocidad constante, y **3)** la sedimentación se retrasa en los 10 min finales a medida que los GR se apilan en el fondo del tubo. La etapa más importante es la primera o de aglutinación, ya que de ella dependerá la velocidad de todo el proceso. Así, cuanto mas pequeños son los agregados, más lentamente se producirá la sedimentación y viceversa.

MÉTODO

El método utilizado con mayor frecuencia en la actualidad es el de Westergren. Es la técnica de referencia recomendada por el *International Council for Standardization in Hematology* (ICSH) y el CLSI. El método de Westergren es menos sensible a pequeños aumentos de los factores que causan la sedimentación de los GR y así puede ser menos confiable.

En la actualidad, han aparecido sistemas semiautomáticos para medir la VSG que emplean soportes especiales y pipetas de material plástico desechable. Estos sistemas, aunque reproducen exactamente el método de Westergren, se diferencian por su carácter cerrado (recolección de los especímenes en tubos al vacío que incorporan una cantidad precisa de anticoagulante) y por el empleo de material complementario (bombas aspirantes) que aumentan la rapidez y precisión del llenado de las pipetas (Figura 7).

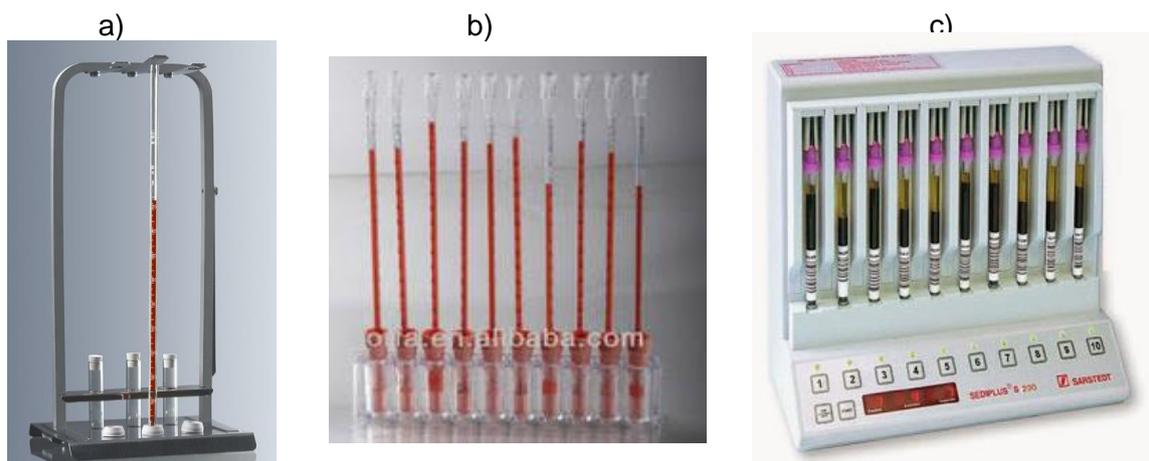


Figura 7. Ejemplo de sistema de sedimentación: a) pipeta de Westergren de vidrio, b) pipeta de Westergren descartable y c) sistema automático (Rodak, 2014; <https://www.infobioquimica.com>).

MACROTÉCNICA DE WESTERGREN

FUNDAMENTO

Este examen mide la tendencia de los eritrocitos a sedimentar, al colocar la sangre anticoagulada en un pipeta/columna graduada en posición vertical. Se lee macroscópicamente la columna de plasma al cabo de 1 h de reposo.

MATERIALES

- Anticoagulante: citrato de sodio al 3,8%.
- Pipeta de Westergren: es una pipeta de vidrio de 30 cm de longitud y 2,55 mm de diámetro interno, calibrada con exactitud en mm numerada de 200 mm en el fondo hasta 0 mm.
- Gradillas o dispositivos de sostén para sostener los tubos en una posición vertical inmóvil.

PROCEDIMIENTO

- Extraer sangre venosa que se vierte en un tubo que contiene 0,5 mL de anticoagulante citrato de sodio 3,8% (proporción de 4 vol de sangre: 1 vol de solución de citrato de sodio) y se mezcla mediante movimientos rotatorios.
- Sumergir el tubo de Westergren en la muestra obtenida dejando que la sangre ascienda mediante pro-pipeta. El nivel de la sangre se ajusta a cero ("0").
- Colocar el tubo en la gradilla que obtura ambos extremos en posición estrictamente vertical (90°) a temperatura ambiente (18-25°C), sin exposición a la luz del sol directa, libre de vibraciones y corrientes de aire, durante 60 min.
- Leer la distancia entre la superficie del menisco de la columna eritrocitaria y la parte superior de la columna de sangre situada a nivel de la marca "0" de la escala graduada. En la lectura no se incluye la capa de leucocitos y plaquetas.
- Informar la VSG como el valor de esta distancia, expresado en mm, que corresponde a la primera hora (mm/hora).

VSG: Micrométodo de Chattas

- Es útil cuando se obtiene poco volumen de muestra.
- Se utiliza una pipeta tipo capilar graduada de 0-40 que posee arriba del 0, la marca S.
- Para hacer la dilución, se carga la pipeta con citrato sódico hasta la marca **40** y a continuación la sangre hasta la marca **S**. Se descarga suavemente el contenido en una policubeta, se homogeneiza y se carga nuevamente enrasando hasta **0**. Se coloca la pipeta en forma vertical en el soporte, por 1 h.
- Ambos métodos (micrométodo y macrométodo) se correlacionan hasta los **10-12mm**. Después de éste valor la relación no es lineal. Ver la siguiente tabla:

CH	5	10	14	15	18	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	32	33	35	42
W	5	10	16	18	26	29	31	32	37	41	47	52	57	65	71	80	90	110	120	140

CH: Chattas

W: Westergren

NOTA: Para informar se deben convertir los resultados al macrométodo o aclarar el método utilizado.

VALORES DE REFERENCIA

Los valores de VSG pueden variar con la edad y el sexo.

Sexo y Edad	(mm/h)
Niños	0 - 10
Hombres (0-50 años)	0 - 15
Hombres (>50 años)	0 - 20
Mujeres (0-50 años)	0 - 20
Mujeres (>50 años)	0 - 30

(Medicina & Laboratorio. 2010; 16: 1-2).

Factores técnicos capaces de modificar la VSG

Causas de aumento

- Desviación de verticalidad de la pipeta.
- Incremento de la longitud y el diámetro de la pipeta.
- Elevación de la temperatura ambiente.
- Dilución de la sangre.

Causas de disminución:

- Reducción del diámetro de la pipeta.
- Utilización tardía de la sangre (espécimen envejecido).
- Cambio de anticoagulante.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Factores que afectan la VSG

Valores de la VSG **mayores de 100 mm/h:**

Cáncer, Leucemias, Linfomas, Mieloma múltiple, Anemias severas.

Enfermedades reumáticas, Infección bacteriana severa, Macroglobulinemia.

La VSG se encuentra con **aumento moderado** en:

Anemia intensa.

Artritis reumatoidea, Fiebre reumática, Enfermedades autoinmunes.

Enfermedades renales, Nefrosis.

Menstruación y Embarazo (en el 2º y 3º trimestre).

Infecciones agudas y crónicas, Sífilis, Tuberculosis.

Infarto de miocardio, Hepatitis agudas, Hipotiroidismo, Hipertiroidismo.

Fármacos (metildopa, anticonceptivos orales, teofilinas, vitamina A, penicilamina y procainamida).

Edad avanzada, Hiperlipidemia.

La VSG aparece **disminuida (0-1 mm/h)** en:

Descensos de proteínas en el plasma por patologías renales y hepáticas.

Hipofibrinógeno, Fallos cardíacos.

Policitemias Vera ó poliglobulias, Hemoglobinopatías, Anemia drepanocítica, Anemia falciforme.

Fármacos (aspirina, la cortisona y la quinina).

3) HEMOGLOBINOMETRÍA

La hemoglobina (Hb) es el principal componente de los glóbulos rojos y su función principal es transportar oxígeno desde los pulmones a los tejidos. Una molécula de Hb consta de dos pares de cadenas polipeptídicas (globina) y cuatro grupos prostéticos hemo, conteniendo cada uno un átomo de ión ferroso.

La valoración de la Hb es importante en el diagnóstico clínico de la anemia, donde se observa una disminución por debajo del rango normal de su concentración y en la mayoría de los casos ocurre como signo o complicación de otra enfermedad, a veces no relacionada con trastornos del sistema sanguíneo. Por el contrario, existen situaciones donde los niveles de Hb se encuentran elevados debido a una superproducción de GR (policitemia).

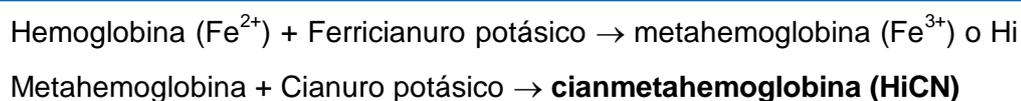
Para la cuantificación de Hb, es necesaria la preparación de un derivado estable, que incluya todas las formas de Hb existentes en sangre (Hb reducida, oxiHb, carboxiHb, metaHb). El método estandarizado y aconsejado por el ICSH es el:

MÉTODO DE LA CIANMETAHEMOGLOBINA O DE DRABKIN

FUNDAMENTO

La Hb presente en la muestra, en presencia de ferricianuro se oxida a metahemoglobina (hemiglobina; Hi), la cual reacciona con iones cianuro a pH 7,2 transformándose en cianmetahemoglobina (color canela) que tiene una absorción máxima a 540 nm.

Los distintos compuestos de hemoglobina (excepto la sulfoHb) se convierten en cianmetahemoglobina según la siguiente reacción:



MUESTRA

- Sangre venosa total: anticoagulada con EDTA K₃ (1,5 mg/mL) o heparina (10 UI/mL).

MATERIALES

- Espectrofotómetro o fotocolorímetro.
- Tubos: 12 x 100 mm.
- Pipetas volumétricas de vidrio.
- Pipetas automáticas debidamente calibradas.

- Reactivo de Cianmetahemoglobina (Drabkin).
- Patrón de referencia de Hb.

Reactivo de Cianmetahemoglobina (Drabkin)

Composición:

Ferricianuro potásico $[K_3Fe(CN)_6]$	200 mg
Cianuro potásico [KCN]	50 mg
Fosfato monopotásico $[KH_2PO_4]$	140 mg
Detergente no iónico*	1 mL
Agua destilada hasta	1.000 mL

* Detergentes no iónicos: Tritón X-100, Nonic 218, Nonidet/40, Quolac Nic 218.

La solución debe presentar un color amarillo pálido y transparente y tener un pH entre 7 y 7,4. La adición de detergente no iónico facilita la solubilidad de proteínas insolubles y acelera la transformación de la hemoglobina en HiCN. Para su conservación se utilizan botellas de vidrio de borosilicato opacas que se mantienen a temperatura ambiente (el frío modifica el color del reactivo), y es estable durante 6 meses. La Hb puede ser cuantificada cuando se compara con varias soluciones de concentraciones conocidas de hemoglobina preparadas a partir del patrón de referencia (curva de calibración).

Patrón de referencia: Es una solución comercial de HiCN cuya Abs corresponde a una concentración de Hb conocida (debe cumplir con las especificaciones del patrón primario).

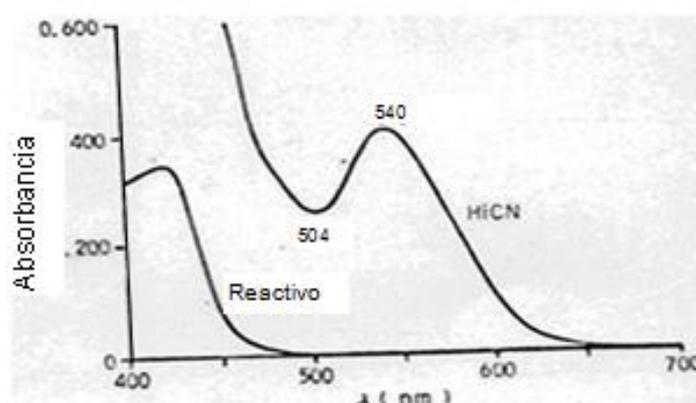


Figura 8. Espectro de absorción de la solución de HiCN (Vives Corrons, 2014).

Figura 8- Patrón primario de HiCN: Se suministra a centros o personas relacionadas con programas oficiales reconocidos para la estandarización y el control de calidad. Este patrón es una solución estable de HiCN con propiedades y características fisicoquímicas definidas

por el ICSH en base al peso molecular (64,458) y el coeficiente de extinción (44,0) de la Hb. Se suministra en ampollas cerradas al vacío que contienen 10 mL de una solución de HiCN correspondiente a una concentración de Hb entre 550 y 850 mg/L. La concentración exacta de Hb de cada lote se indica siempre en la ampolla. El valor correspondiente en g/L de Hb se refiere al que tendría una muestra de sangre diluida y preparada convenientemente para realizar la lectura fotocolorimétrica. El patrón primario posee un espectro de absorción característico con un pico de máxima Abs a 540 nm y una inflexión a 504 nm. El valor de la Abs a 540 nm varía entre 0,400 y 0,404, y a 504 nm entre 0,248 y 0,251, según el lote y el instrumento de lectura utilizados. El cociente A_{540}/A_{504} oscila entre 1,60 y 1,62.

CUANTIFICACIÓN DE HEMOGLOBINA EN UNA MUESTRA PROBLEMA

PROCEDIMIENTO

- Homogeneizar la sangre mediante agitación suave con un sistema automático (rodillos/disco giratorio) durante un tiempo mínimo de 5 min o manualmente por inversión del tubo 20 veces.
- Pipetear 5 mL de reactivo de Drabkin en un tubo de ensayo limpio.
- Añadir 20 µL de sangre homogeneizada al tubo que contiene el reactivo de Drabkin.
- Agitar el tubo mediante inversión (4 ó 5 veces) con el fin de homogeneizar bien la mezcla sangre-reactivo, dejar a temperatura ambiente y esperar un mínimo de 3 min para que se produzca la hemólisis total y se complete la transformación de toda la Hb en HiCN.
- Leer la Abs de la solución a 540 nm, utilizando agua destilada como blanco o la solución diluyente.
- Para calcular la concentración de Hb es recomendable realizar una curva de calibración (ver más adelante).
- La concentración de Hb puede calcularse con la siguiente fórmula:

$$\text{Hb (g/dL)} = \frac{\text{Abs 540 nm muestra}}{\text{Abs 540 nm Estándar}} \times \text{Estándar (g/dL)}$$

CURVA DE CALIBRACION DE HEMOGLOBINA

La gráfica de calibración tiene como finalidad calibrar el espectrofotómetro calculando la corrección existente entre los valores de absorbancia leídos en el aparato y los correspondientes valores de concentración de Hb.

PROCEDIMIENTO

- Se preparan al menos 3 tubos con soluciones de HiCN de concentración conocida y decreciente mediante diluciones sucesivas en reactivo de cianmetahemoglobina. Se procede de igual manera que se determina una muestra.

Tubo	Patrón de Referencia HiCN (mL) *	Reactivo de Drabkin (mL)	Volumen final (mL)	Dilución (g/dL)	Hb (g/dL)
1					
2					
3					

* El valor del Testigo o estándar dependerá del valor indicado en el frasco del kit utilizado.

Una vez preparadas las soluciones del patrón, se procede a leer a 540 nm el tubo que contiene solo reactivo y se continúa con el tubo de concentración más baja. Finalmente, se grafica en la ordenada los valores de Abs de las tres soluciones y la concentración de Hb en la abscisa (g/L) correspondiente. La curva obedece a la ecuación de una recta que pasa por el origen. La linealidad se conserva hasta concentraciones de Hb de 25 g/dL. La Abs obtenida de una muestra incógnita se intercepta en la curva y se proyecta al eje de las abscisas para determinar la concentración (Figura 9).

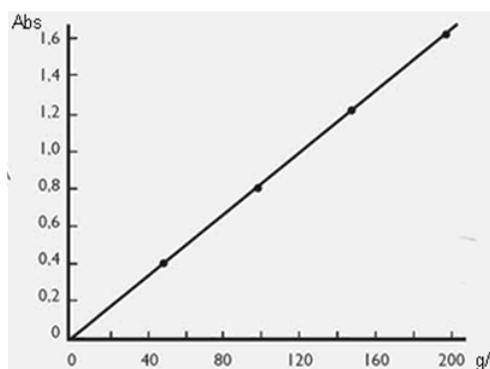


Figura 9. Curva de Calibración de Hemoglobina.

Causas de error en la determinación de la concentración de hemoglobina

La determinación de hemoglobina está sometida a posibles errores que deben ser considerados. Algunos de ellos son inherentes a la muestra, como la presencia de hiperlipemia, leucocitosis intensa ($>50.000\text{mm}^3$ ó $>50 \times 10^9/\text{L}$) o proteínas plasmáticas anormales, mientras que otros se deben a defectos técnicos en la manipulación y el análisis del espécimen.

Errores en la obtención de la muestra de sangre:

1. Errores de extracción
2. Empleo de anticoagulantes no recomendados
3. Coagulación parcial de la sangre

Errores de la dilución:

1. Empleo de pipetas automáticas descalibradas u otras pipetas sucias o húmedas
2. No eliminación del exceso de sangre adherida a las paredes externas del capilar antes de introducirlo en el reactivo
3. Dilución incompleta de la sangre en el reactivo

Errores de la transformación de la hemoglobina en HiCN:

1. Empleo de reactivo de Drabkin mal preparado o vencido
2. Lectura antes del tiempo necesario para la completa transformación de la Hb en HiCN

Errores de la determinación:

1. Empleo de instrumentos no calibrados
2. Cubetas sucias o deterioradas
3. Soluciones turbias de HiCN

Errores en la conservación del reactivo:

1. Congelación del reactivo, lo que produce transformación de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ y una oxidación parcial de la Hb.
2. Conservación del reactivo en botellas de polietileno: se pierden grupos CN con formación exclusiva de metahemoglobina, en vez de HiCN, con lo que los valores de concentración de Hb obtenidos son inferiores a los reales.

VALORES DE REFERENCIA

Hombre: $15,5 \pm 2,5$ g/dL
 Mujer: $14,0 \pm 2,0$ g/dL
 Recién Nacido: $16,5 \pm 3,0$ g/dL, a los tres meses desciende a valores de $11,5 \pm 2,0$ g/dL, para luego aumentar y alcanzar los valores del adulto.

VALORES DE HEMOGLOBINA PARA DEFINIR ANEMIA (OMS)

EDAD	VALOR INDICATIVO DE ANEMIA
6 a 59 meses	< 11 g/dL
5 a 11 años	< 11,5 g/dL
12 a 14 años	< 12 g/dL
Mujeres no embarazadas (15 años o mayores)	< 12 g/dL
Mujeres embarazadas	< 11 g/dL
Varones (15 años o mayores)	< 13 g/dL

(https://www.who.int/vmnis/indicators/haemoglobin_es.pdf; 2011).

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

- Los resultados son comparables con los métodos automatizados.
- En condiciones de rutina, el coeficiente de variación es menor al 6%.
- Valores inferiores propuestos por la OMS son indicativos de anemia.
- Se recomienda que cada laboratorio determine sus propios valores de referencia.

4- ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE ANEMIA

La evaluación de la anemia por el laboratorio requiere de exámenes básicos y específicos que dependen del tipo de anemia que se haya encontrado y de los hallazgos iniciales.

- Estudios básicos en la anemia carente de hierro

Hemograma: Hto, Hb, Índices hematimétricos: Volumen Corpuscular medio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Media (HCM), Concentración de Hemoglobina Corpuscular media (CHCM) y recuento de Reticulocitos. Extendido de sangre periférica para evaluar morfología eritrocitaria.

- Estudios específicos en la anemia carente de hierro

Estudio del Metabolismo de hierro: Ferremia, Transferrina, % de Saturación de Transferrina y Ferritina.

- Evaluación de laboratorio de los depósitos de hierro en el organismo

a) Receptores séricos de Transferrina, b) Protoporfirina del eritrocito, c) Biopsia de médula ósea o de hígado y d) Recuento de sideroblastos en médula ósea: es una evaluación directa del hierro funcional disponible.

4-1. CONCEPTOS GENERALES DEL HIERRO

El hierro es un elemento fundamental en la dieta de los mamíferos. Entre las proteínas que contienen hemo se cuentan las que transportan (hemoglobina) y almacenan (mioglobina) oxígeno, y ciertas enzimas que contienen hemo como parte de sus grupos prostéticos como catalasa, peroxidada, óxido nítrico sintetasa, citocromos microsomales y mitocondriales. Entre las proteínas sin hemo se encuentran transferrina, ferritina, etc.

El hierro debe regularse con cuidado porque en su forma libre o en cantidades excesivas, es tóxico. La deficiencia de hierro es uno de los desórdenes más comunes en los humanos. Es frecuente en niños lactantes porque la leche materna tiene bajo contenido del mineral, pero puede afectar a cualquier persona independientemente de la edad y el sexo. La determinación de hierro en suero es importante para el seguimiento de la terapia

en las anemias ferropénicas. El hierro en suero es transportado por transferrina y cada molécula de esta proteína es capaz de transportar hasta dos átomos de hierro férrico. En estado fisiológico, la fijación de cada ión férrico depende de la fijación coordinada de un anión carbonato.

Evaluación del hierro por el laboratorio

La concentración de hierro sérico es una medida del Fe^{+3} unido a la transferrina sérica y no incluye el hierro de la hemoglobina sérica libre. Se mide mediante espectrofotometría con el agregado de un cromógeno. El hierro muestra variación diurna; su concentración máxima es a la mañana y la mínima a la noche.

Las técnicas actuales para determinar hierro en suero se basan en la utilización de compuestos cromóforos que contengan el grupo reactivo $---N=C---C=N---$, como la sal sódica de batofenantrolina disulfonada o ferrozina disulfonada. Estos compuestos son capaces de quelar el ión ferroso produciendo complejos de alta absorptividad molar y alta especificidad lo que le confiere a la determinación una alta sensibilidad.

Características de cromógenos usados en la determinación de hierro		
CROMÓGENO	Máximo de absorción del complejo cromógeno Fe (II)	Absortividad molar complejo Fe (II)
Batofenantrolina disulfonada	534 nm	$22,14 \times 10^3$
Ferrozina	562 nm	$28,0 \times 10^3$

4-2. CUANTIFICACIÓN DE HIERRO EN SUERO

Método colorimétrico para la determinación de hierro sérico sin desproteinización

FUNDAMENTO

El hierro sérico se libera de su unión a transferrina, en buffer succinato de pH 3,7 y en presencia de un reductor, el ácido mercaptoacético. Posteriormente reacciona con el reactivo de color, piridil bis-fenil triazina sulfonato (PBTS), dando un color magenta que se mide a 560 nm.

MUESTRA: suero

Las muestras de plasma colectadas con anticoagulantes como EDTA, oxalato de potasio o citrato de sodio no son satisfactorias porque unen iones hierro provocando errores por defecto. La hemólisis es un impedimento para la determinación.

El material de vidrio debe estar muy bien lavado y secado con agua bidestilada para evitar cualquier contaminación con hierro.

REACTIVOS

- Reactivo PBTS: solución de piridil bis-fenil triazina sulfonato 50 mmol/L.
- Estándar: solución de iones Fe (III) equivalente a 100 µg/dL.
- Buffer succinato: solución de succinato 0,25 mol/L para pH 3,7.
- Reductor: ampolla autorrompible conteniendo ácido mercaptoacético al 70%.

PROCEDIMIENTO

En tres tubos de vidrio marcados B (Blanco de reactivos), S (Estándar) y D (Desconocido) colocar:

	B	S	D
Agua bidestilada	500 µL	-	-
Estándar	-	500 µL	-
Suero	-	-	500 µL
Buffer/reductor	2 mL	2mL	2mL

Nota: Agregar, manteniendo el frasco gotero en posición vertical, 1 gota de Reactivo PBTS a cada tubo. Mezclar. Leer la absorbancia de los tubos en espectrofotómetro a 560 nm entre 6 y 20 min. Llevar el aparato a cero con agua.

CÁLCULOS

Corregir las lecturas de S y D, restándoles los Blancos correspondientes:

$$S - B = S \text{ corregida}$$

$$D - (B + BS) = D \text{ corregida}$$

Donde $f = 100 \mu\text{g/dL}/S \text{ corregida}$

$\text{Fe } (\mu\text{g/dL}) = D \text{ corregida} \times f$
--

DESEMPEÑO DE REACTIVOS

a) Reproducibilidad: procesando la misma muestra en 10 días diferentes, se obtuvo un coeficiente de variación del 4,2%, para un nivel de Fe sérico de 129 µg/dL.

b) Recuperación: agregando cantidades conocidas de Fe (II) a alícuotas de un mismo suero, se recuperó entre 90% y 103%.

c) Linealidad: la reacción es lineal hasta 500 µg/dL.

VALORES DE REFERENCIA

Mujer en edad fértil: 60 a 160 µg/dL Hombres: 80 a 150 µg/dL Niños: 60 a 120 µg/dL Ancianos: 60 a 80 µg/dL

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Las concentraciones de hierro sérico se modifican por el ritmo circadiano y el estado clínico del paciente.

Valores disminuidos: anemia ferropénica, infecciones, neoplasias, inflamaciones, etc.

Valores aumentados: talasemia mayor, porfirias, hemocromatosis, nefrosis de células hepáticas, hemosiderosis.

4-3. **TRANSFERRINA**

Es la proteína que transporta el 50-70% del hierro absorbido en el intestino. Es una β₂-globulina que se sintetiza en hígado y en menor proporción en el sistema retículo-endotelial, testículo, glándula mamaria, linfocitos y macrófagos. Tiene una vida media de 7 días. Se conocen más de 20 variantes genéticas. La transferrina (TF) está formada por una sola cadena polipeptídica (77.000 Da) con aproximadamente 6% de carbohidratos y tiene un punto isoeléctrico comprendido entre 5,5 y 5,9. Transporta además cobre, zinc, cobalto y calcio, pero sólo el transporte de hierro y cobre tienen significado clínico.

La TF es responsable de la distribución del hierro y de su oferta a los sitios de absorción, almacenamiento, donde es incorporado a la ferritina y hemosiderina y a las células que sintetizan componentes que requieren hierro como la hemoglobina, mioglobina y citocromos.

La transferencia del hierro a los lugares requeridos se realiza mediante receptores de membrana específicos para TF (Receptor soluble de transferrina, RTFs). El complejo TF-receptor es internalizado en un proceso que depende de la fosforilación del receptor por el complejo Ca⁺²-calmodulina-PKC. La liberación del hierro se produce en el medio ácido del lisosoma y el complejo receptor-apotransferrina retorna a la superficie celular y la apotransferrina es liberada para ser reutilizada en el plasma. Los RTF pueden determinarse por métodos inmunológicos y son un indicador del hierro funcional disponible. La cantidad de receptor circulante aumenta cuando las células carecen de hierro, pero no incrementa en la enfermedad crónica.

Los niveles plasmáticos de TF están regulados por la disponibilidad de hierro: aumentan con deficiencia de hierro y caen cuando hay sobrecarga del mineral. El defecto congénito de la atransferrinemia se caracteriza por niveles muy bajos de TF acompañados de una sobrecarga férrica y una severa anemia hipocrómica resistente a la feroterapia.

En condiciones fisiológicas, alrededor de un tercio de los sitios de unión de hierro de la TF están ocupados por Fe (III), dos tercios restantes están insaturados, esto se conoce como la capacidad de unión al hierro insaturada sérica y puede medirse por métodos espectrofotométricos o con hierro radiactivo. La cantidad total de sitios se denomina **capacidad de unión al hierro total (TIBC)** y se determina en forma indirecta por métodos químicos y en forma directa por métodos inmunológicos.

La determinación de TF en suero se realiza por inmunodifusión radial, nefelometría, inmunturbidimetría y colorimetría. Se determina el hierro sérico conjuntamente con la de TF. En ese caso se informan los tres valores: Hierro Sérico, Transferrina y Porcentaje de Saturación de la Transferrina, que se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Saturación \%} = \frac{\text{Hierro sérico } (\mu\text{g/dL})}{\text{Transferrina } (\mu\text{g/dL})} \times 100$$

VALORES DE REFERENCIA

- **Transferrina (TIBC):**

Adultos: 250-400 $\mu\text{g/dL}$

Recién nacidos: 130 a 275 $\mu\text{g/dL}$

- **Saturación de la Transferrina: 20-55%**

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

5- INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

6- INFORME DE LABORATORIO



CUESTIONARIO

1. Enumere los accesos venosos empleados en la venipunción central y periférica.

2. Grafique la disposición anatómica de las venas más utilizadas para la venipunción de muestras clínicas. Descríbalas brevemente.
3. ¿Cuál es la diferencia entre venipunción y venoclisis?
4. ¿En qué casos se utiliza la punción yugular y la punción femoral? Describa brevemente los procedimientos.
5. La donación voluntaria de sangre consiste en extraer aproximadamente 500 mL de sangre venosa del organismo:
 - a) Describa el proceso de extracción, ¿cuál es el calibre de la aguja utilizada para este procedimiento?, ¿existe alguna variación con la venipunción de muestras clínicas?

ANEXO I

CODIFICACIÓN POR COLOR DE TAPÓN	TUBO	ADITIVO	MODO DE ACCIÓN	USOS
Tapón rojo		Ninguno	Coágulo; suero separado por centrifugación	Pruebas bioquímica, inmunología
Tapón amarillo (dorado)		Ninguno	Tubo con gel separador de suero; centrifugación.	Pruebas bioquímica, inmunología
Tapón verde claro		Heparina de litio	Tubo con gel separador de plasma	Pruebas bioquímica
Tapón rojo-gris		Activador de coágulo	Tubo con gel separador de suero; centrifugación.	Pruebas bioquímica
Tapón morado		EDTA líquido	Quelación de Ca ²⁺	Hematología y Banco de Sangre.
Tapón celeste		Citrato de sodio	Quelación de Ca ²⁺	Pruebas de coagulación
Tapón verde oscuro		Heparina sódica o litio	Inactivación de trombina y tromboplastina	Determinación de litio y/o amonio.
Tapón azul oscuro		EDTA sódico	Tubo diseñado para evitar la presencia de metales contaminantes.	Determinación de elementos traza (Zn, Cu, Pb, Hg) y toxicología
Tapón gris claro		Fluoruro sódico y oxalato de K ⁺	Antiglicolítico, preservación de glucosa por 5 días.	Determinación de litio y glucosa.
Tapón amarillo claro		ACD	Inactivación del complemento.	Pruebas de compatibilidad.
Tapón amarillo-negro		Mezcla de caldos nutritivos	Mantiene viabilidad de microorganismos	Microbiología
Tapón negro		Citrato sódico bufferado	Quelación de Ca ²⁺	Velocidad de sedimentación
Tapón naranja		Trombina	Coágulos de sangre rápidos	Bioquímicas STAT
Tapón café		Heparina sódica	Inactivación de trombina y tromboplastina	Determinación de Pb.

Fuente: Phlebotomy. Disponible en URL:

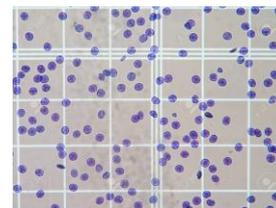
<http://www.medlib.med.utah.edu/WebPath/TUTORIAL/TUTORIAL.html#2>

BIBLIOGRAFÍA

- PREGRADO DE HEMATOLOGÍA. JM Moraleda Jiménez 4ª Edición. Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia, Madrid 2017.
- HEMATOLOGÍA. FUNDAMENTOS Y APLICACIONES CLÍNICAS. BF Rodak, GA Fritsma y EM Keohane. 4ª Edición. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires 2014.
- MANUAL DE TÉCNICAS DE LABORATORIO EN HEMATOLOGÍA. JL Vives Corrons. 4ª Edición. Ed. Elsevier, España 2014.
- GUÍA DE TRABAJOS PRÁCTICOS MÉTODOS DE LABORATORIO HEMATOLÓGICO. Edición 2011. Universidad Nacional de La Plata (Argentina).
- EL LABORATORIO EN EL DIAGNOSTICO CLINICO. JB HENRY. 20ª Edición. Ed. Marbán, 2010.
- ATLAS DE HEMATOLOGÍA CLÍNICA. JH Carr y BF Rodak. 3ª Edición. Ed. Médica Panamericana, 2010.
- HEMATOLOGÍA CLÍNICA. J Sans-Sabrafen. 5ª Edición. Ed. Elsevier, España 2006.

TRABAJO PRÁCTICO N° 2

HEMOGRAMA: RECuentOS CELULARES (parte II)



OBJETIVOS

- Realizar recuentos celulares por método manual y automatizado.
- Colorear frotis de sangre periférica. Realizar la fórmula leucocitaria manual.
- Interpretar los resultados de un Hemograma completo e informar.

INTRODUCCIÓN

RECuentOS CELULARES

La mayoría de los procedimientos de rutina en el laboratorio de hematología están automatizados, entre ellos los recuentos celulares en contadores electrónicos (ver Guía TP de Hematología, parte V). Sin embargo, es necesario conocer los métodos manuales de recuento de células para ser utilizados ante cualquier eventualidad que se presente. Éstos comprenden una serie de procedimientos que tienen por objeto determinar el número de cada uno de los tipos celulares que están comprendidos en una unidad de volumen de sangre. En general, el principio del recuento es similar para GR, leucocitos y plaquetas; solo varían la dilución, el líquido diluyente y el área a contar en el hemocitómetro o cámara de Neubauer. Así, es posible detectar anomalías en la serie roja como anemias y policitemias y en la serie blanca como leucopenias y leucocitosis.

Por convención la unidad de volumen utilizada es el milímetro cúbico (mm^3). El ICSH recomienda que la unidad de volumen sea el litro (unidades SI).

Ej: Eritrocitos: $5,0 \times 10^6/\text{mm}^3$ (convencional) ó $5,0 \times 10^{12}/\text{L}$ (SI)
 Leucocitos: $7,0 \times 10^3/\text{mm}^3$ (convencional) ó $7,0 \times 10^9/\text{L}$ (SI)
 Plaquetas: $300 \times 10^3/\text{mm}^3$ (convencional) ó $300 \times 10^9/\text{L}$ (SI)

A) RECuento DE GLÓBULOS ROJOS

En la actualidad el recuento de GR manual no se realiza debido al elevado error que presenta ($\text{CV} > 10\%$) y ha sido reemplazado por métodos de cómputo electrónico

(contadores electrónicos) que proporcionan mayor exactitud y precisión. El método automático para la determinación de GR se expresa como RBC (red blood cell) se basa en el cálculo matemático a partir del Volumen Corpuscular Medio (VCM) y el hematocrito.

$$\frac{\text{Hto}}{\text{VCM}} = \text{N}^\circ \text{ de GR}$$

VALORES DE REFERENCIA

Edad	Sexo	Intervalo de referencia
Recién nacidos	ambos	$4,7 \times 10^{12}/\text{L} - 6,3 \times 10^{12}/\text{L}$
Niños (2-12 años)	ambos	$4,0 \times 10^{12}/\text{L} - 5,3 \times 10^{12}/\text{L}$
Adolescentes (12-18 años)	mujeres	$4,1 \times 10^{12}/\text{L} - 5,1 \times 10^{12}/\text{L}$
	hombres	$4,5 \times 10^{12}/\text{L} - 5,3 \times 10^{12}/\text{L}$
Adultos (19-60 años)	mujeres	$4,1 \times 10^{12}/\text{L} - 5,2 \times 10^{12}/\text{L}$
	hombres	$4,6 \times 10^{12}/\text{L} - 5,9 \times 10^{12}/\text{L}$

ÍNDICES HEMATIMÉTRICOS

Durante muchos años los índices hematimétricos se obtenían mediante cálculo matemático a partir de magnitudes obtenidas por procedimientos manuales. La utilidad práctica de los índices eritrocitarios no fue reconocida hasta la implementación de los analizadores automáticos. Los índices hematimétricos son: Volumen Corpuscular Medio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Media (HCM) y la Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media (CHCM). El índice de mayor valor clínico es el VCM, por cuanto constituye un criterio morfológico para clasificar las anemias (ver guía TP parte V).

1) Volumen corpuscular medio (VCM): es el valor medio del volumen de cada GR. Se calcula como la relación entre el Hto y el número total de eritrocitos. Se expresa en unidades de volumen (femtolitros).

Valor de Referencia: **80 - 99 fL** (femto es $1,0 \times 10^{-15}$ L). Los GR con un VCM menor de 80 fL son microcíticos; los que presentan un VCM de más de 100 fL son macrocíticos.

$$\text{VCM} = \frac{\text{Hto}}{\text{N}^\circ \text{ de GR}}$$

2) Hemoglobina corpuscular media (HCM): es el valor medio del contenido de Hb de los GR circulantes. Relaciona el valor de Hb y el valor de glóbulos rojos. Valor de Referencia: 26-32 picogramos ($1,0 \times 10^{-12}$ g).

$$\text{HCM} = \frac{\text{Hb}}{\text{N}^\circ \text{ de GR}}$$

3) Concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM): se refiere a la concentración de Hb por unidad de volumen eritrocitario, es decir con el hematocrito (VR: 32-36 g/dL).

$$\text{CHCM} = \frac{\text{Hb}}{\text{Hto}}$$

Ejemplo:



Calcule el VCM y el HCM de un individuo con un recuento de GR de $4.000.000/\text{mm}^3$, Hto: 40% y Hb: 12 g/dL. En base a ello indique si los GR son: Normocíticos? Normocrómicos?

En caso que se requiera determinar el número de GR por método manual se procede de la siguiente manera:

a) Utilizar una pipeta diluidora **De Thoma** para glóbulos rojos (Figura 1).

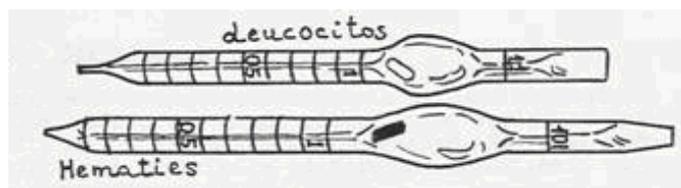


Figura 1. Pipeta De Thoma. Existen dos pipetas de dilución de la sangre: una para eritrocitos y otra para leucocitos. La de eritrocitos tiene una ampolla de dilución mayor.

b) Realizar una dilución 1/200 de la sangre con solución fisiológica o citrato de sodio 3,8% (isotónica): En un tubo de kahn se mide con una pipeta automática los volúmenes requeridos (3,98 mL del diluyente + 20 μL de sangre), se carga la cámara de Neubauer y se observa al microscopio óptico (Figura 2).

c) Calcular a partir del hematocrito (valor aproximado) cuando los GR son normocíticos/normocrómicos. Ejemplo:

$$\text{Hto} = 46\%; \quad \text{GR/mm}^3 = 46 \times 1,1 \times 10^5 = 50,6 \times 10^5 \text{ GR/mm}^3$$

$$\text{Recuento de GR/mm}^3 = \text{Hto} \times 1,1 \times 10^5 \text{ (Factor empírico)}$$

Equipo para recuento celular manual: Hemocitómetro

La **Cámara de Neubauer** consiste en un cristal grueso de forma rectangular, en cuyo centro posee dos zonas cuadradas separadas por una depresión (Figura 2). Cada una de ellas mide 3 mm de lado (superficie total 9 mm²) y está dividida en 9 cuadrados de 1 mm². Siendo los cuadrados de las esquinas los destinados al recuento de leucocitos (L), a su vez dichos cuadrados se subdividen en 16 cuadrados medianos.

El **cuadrado central** (retículo de Thoma – Figura 2) es el destinado al recuento de GR y plaquetas. Dicho cuadrado tiene una superficie de 1 mm² y una profundidad de 0,1 mm. A su vez, se encuentra dividido en 25 cuadrados medianos y cada uno de ellos subdividido en 16 cuadrados pequeños (número total: 400 cuadrados). Para el recuento de GR se deben contar 5 de los cuadrados medianos (Figura 2 - cuadrados negros). Para ello, se sella la cámara con un cubrecámara y se apoya sobre éste la punta de la pipeta, ya que el líquido (dilución apropiada) penetra por capilaridad. Se sitúa la cámara en el microscopio, y se procede al recuento con el objetivo de 40x.

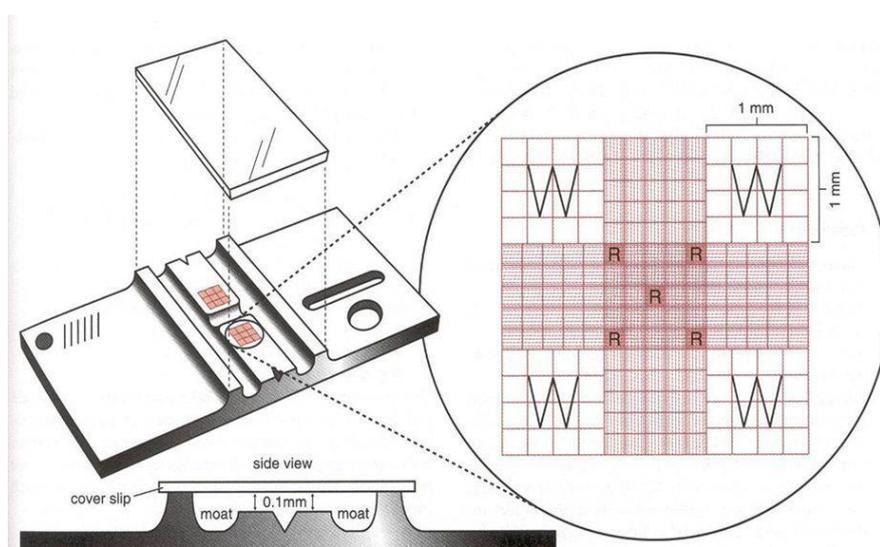


Figura 2. Recuento Celular en la cámara de Neubauer. Las áreas estándares para leucocitos están marcadas con una W y las áreas para eritrocitos con una R. Para contar plaquetas se usa todo el cuadrado central (Rodak, 2014).

CÁLCULOS

Considerando que el retículo central tiene 400 cuadrados pequeños (25 x 16), el cálculo que se debe realizar para obtener el número de GR/mm³ es el siguiente:

$$\text{GR/mm}^3 = \frac{\text{N}^\circ \text{ GR} \times 400 \times 200 \times 10}{80} \quad \text{ó} \quad \text{GR/mm}^3 = \text{N}^\circ \text{ GR} \times 10.000$$

Nº: número de eritrocitos contados

200: título de la dilución realizada

10: factor de corrección de la profundidad, para llevar a 1 mm³

400: total de cuadrados pequeños en la superficie de 1 mm²

80: total de cuadrados pequeños contados

VALORES DE REFERENCIA

Hombre: 5.500.000 ± 200.000 GR/mm³
Mujer: 4.800.000 ± 200.000 GR/mm³

Causas de error en el recuento en cámara cuentaglóbulos

1. Errores de extracción: dilución o hemoconcentración. Coagulación parcial. Hemólisis.
2. Mala homogeneización de la sangre.
3. Utilización de material mal calibrado, sucio o húmedo.
4. Cámara mal ajustada, sucia o mojada.
5. Llenado incompleto de la cámara.
6. Empleo de cubreobjetos deformable, no rígido.
7. Células mal distribuidas en el fondo de la cámara.
8. Errores del operador al realizar el recuento.
9. Errores al efectuar los cálculos.

B) RECUESTO DE LEUCOCITOS (Método Manual)

Consiste en diluir la sangre anticoagulada con EDTA en el líquido de Turk, que mantiene intacto los leucocitos y hemoliza a los GR. El número de leucocitos o GB se expresa por mm³.

MATERIALES Y REACTIVOS

- Líquido diluyente: **líquido de Turk** (solución de Ác. Acético al 2% ó 3% con el agregado de azul de metileno).
- Dilución empleada: **1/20**. Se puede realizar en un tubo de kahn midiendo con una pipeta automática los volúmenes requeridos (0,38 mL de líquido de Turk + 20 µL de sangre). En casos de leucopenia se debe realizar una dilución 1/10.
- Recuento en Cámara de Neubauer.

Nota: Se puede utilizar una pipeta **De Thoma** para glóbulos blancos (Figura 1), que a diferencia de la usada para GR, tiene una granalla en el bulbo de dilución de color blanco y con las siguientes marcas: 0,5 y 1 por debajo del bulbo y 11 por encima del mismo.

CÁLCULOS

$$\text{GB/mm}^3 = \frac{\text{N}^\circ \text{GB} \times 20 \times 10}{4} \quad \text{ó} \quad \text{GB/mm}^3 = \text{N}^\circ \text{GB} \times 50$$

Nº: número de GB contados en la cámara

20: inversa de la dilución

10: corrección de profundidad para llevarla a mm³

4: total de cuadrados contados

VALORES DE REFERENCIA

Adultos	4.000 - 11.000/mm ³
Recién nacidos	10.000 - 25.000/mm ³
Niños de 1 año	6.000 - 18.000/mm ³
Niños de 4 a 7 años	6.000 - 15.000/mm ³
Niños de 8 a 12 años	4.500 - 13.000/mm ³

Si bien el recuento manual de leucocitos es más inexacto que el obtenido por métodos automatizados, su correcta realización es importante para comprobar la validez de métodos electrónicos con propósitos de calibración o en casos de leucopenia o trombocitopenia, en el caso de muestras de sangre con interferencias para el recuento de plaquetas (eritrocitos microcíticos) y como método de apoyo.

C) RECUENTO DE PLAQUETAS (Método manual)

El recuento de plaquetas se efectúa en sangre obtenida de punción venosa anticoagulada con EDTA, y sometida a hemólisis por acción de una solución hipotónica de oxalato de amonio en agua destilada o de una mezcla de clorhidrato de novocaína/NaCl.

MATERIALES Y REACTIVOS

- Líquido diluyente: Oxalato de amonio al 1% en agua destilada.
- Dilución empleada: **1/20**. En un tubo de Kahn medir con una pipeta automática los volúmenes requeridos (0,38 mL de líquido de diluyente + 20 µL de sangre).
- Recuento en Cámara de Neubauer (atmósfera húmeda).

PROCEDIMIENTO

- Mezclar la muestra de sangre obtenida con EDTA (2%). Realizar la dilución 1/20 con el diluyente.
- Agitar y dejar reposar 10 min a temperatura ambiente para que se complete la hemólisis.
- Cargar la cámara de Neubauer y dejarla en reposo en cámara húmeda por 15 min.
- Efectuar el recuento en el cuadrado central de la cámara de Neubauer (proceder igual que el recuento de hematíes).

CÁLCULOS

Sumar las plaquetas contadas en los 5 cuadrados y multiplicar por 1.000 para obtener el número de plaquetas por mm^3 . El factor 1.000 surge del producto:

20: factor de dilución
 400: cuadraditos totales
 80: cuadraditos contados
 $0,1 \text{ mm}^3$: volumen total del cuadrante
 N°: número de plaquetas contadas

$$\frac{20 \times 400}{80 \times 0,1 \text{ mm}^3} = 1000/\text{mm}^3$$

$\text{Plaquetas}/\text{mm}^3 = \text{N}^\circ \times 1.000$
--

VALORES DE REFERENCIA

$150.000 - 400.000 \text{ plaquetas}/\text{mm}^3$

OBSERVACIONES

Actualmente, en muchos laboratorios los recuentos de plaquetas se realizan en forma automatizada (contadores hematológicos o específicos), habiéndose logrado un alto nivel de precisión incluso en valores bajos de plaquetas. En determinadas situaciones patológicas, el recuento automático no resulta efectivo, puesto que el aumento de tamaño de dichas células no permite al equipo diferenciarlas de otras células sanguíneas de volumen mayor.

El recuento manual se utiliza para la comprobación de trombocitopenias graves y en el caso de plaquetas gigantes en las que el recuento automático no es fiable. Siempre es conveniente acompañar los recuentos con extendidos coloreados con May Grunwald Giemsa, para observar su morfología y tamaño.

D) FORMULA LEUCOCITARIA

RECUESTO DIFERENCIAL DE LEUCOCITOS

La fórmula leucocitaria es una prueba que mide el porcentaje de cada tipo de GB que una persona tiene en la sangre y además revela si hay algunas células inmaduras o anormales. *Aunque el nombre de fórmula leucocitaria hace referencia a los GB, también deberán observarse los hematíes y plaquetas.*

Mediante un extendido de sangre periférica (frotis sanguíneo) es posible obtener una integración global de los datos del hemograma, y de controlar si los recuentos celulares se han realizado correctamente. Este análisis cualitativo nunca debe dejar de efectuarse, a pesar de que en el laboratorio la tendencia a la automatización es cada vez mayor.

1- FROTIS DE SANGRE PERIFÉRICA

PROCEDIMIENTO

- Sobre un portaobjetos perfectamente limpio, se coloca en un extremo una gota pequeña de sangre recién obtenida por punción digital o del talón, o de la última gota que se encuentra en la luz de la aguja cuando se extrae con jeringa). Evitar el uso de sangre con anticoagulantes porque altera la morfología de las células (Figura 3).
- Por medio de otro portaobjeto de borde pulido, al cual se le han quitado los ángulos (extensor), se realiza la extensión de la gota de sangre, conservando un ángulo menor de 45° respecto al portaobjetos horizontal. El extensor se apoya delante de la gota de sangre, se retrocede hasta alcanzar la gota (que por capilaridad se extiende a lo largo del borde de contacto), y se desliza con firmeza y suavemente en sentido longitudinal. Así, se obtiene una película fina de sangre que debe cubrir las 2/3 partes del portaobjeto. El extendido se deja secar rápidamente al aire para evitar el deterioro de las células.

En un buen extendido realizado por esta técnica se distinguen tres zonas de diferente espesor: cabeza, cuerpo y cola (Figura 3), y con distribución distinta de leucocitos:

1. Zona excesivamente gruesa: se encuentra en la región inmediata al punto de partida de la extensión (cabeza). En ella hay siempre un aumento del número de linfocitos.
2. Zona excesivamente fina: corresponde al final de la extensión (cola) y en ésta se observa un exceso de granulocitos y monocitos.
3. Zona ideal: región central (cuerpo), en ella existe un reparto equilibrado de las células.

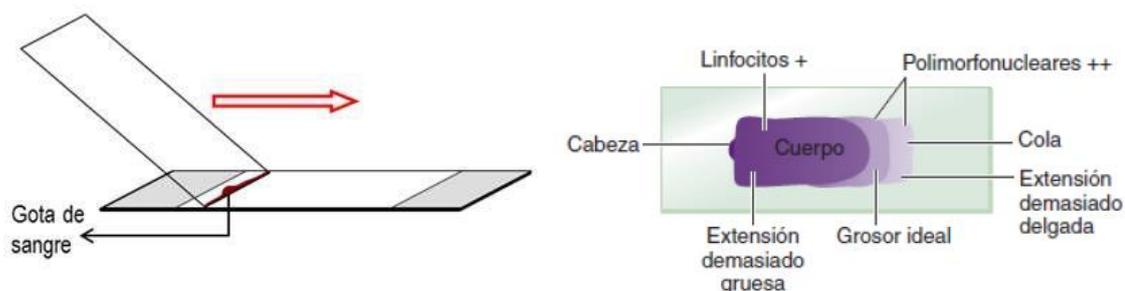


Figura 3. Frotis sanguíneo (Rodak, 2014).

2- COLORACIÓN DE FROTIS DE SANGRE

Tinción de May-Grünwald-Giemsa (MGG)

Se utiliza para teñir las células sanguíneas con el fin de realizar el recuento diferencial. La mayoría de los métodos empleados para teñir las células de la sangre se basan en el empleo de una mezcla de eosina y azul de metileno.

FUNDAMENTO

Estos colorantes son muy sensibles a las variaciones de pH de las diferentes estructuras celulares, de modo que las que tienen carácter básico fijan en mayor medida la eosina (colorante ácido) y aquellas que poseen propiedades ácidas fijan principalmente el azul de metileno (colorante básico). Esto explica que ciertas estructuras basófilas presentes en el núcleo (nucléolo) o en el citoplasma (ribosomas) se colorean de azul, y que otros componentes acidófilos como la hemoglobina adquieren color rosado.

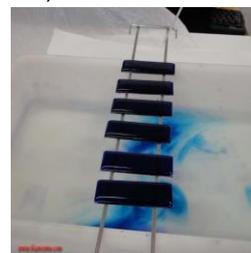
De esta manera, la diferente afinidad de ciertas granulaciones citoplasmáticas por dichos colorantes permite clasificar los leucocitos polimorfonucleares en: **neutrófilos**, en los que la granulación específica posee compuestos neutros que fijan ambos colorantes simultáneamente, resultando en un color pardo; **eosinófilos**, en los que la granulación específica contiene sustancias de intenso carácter básico que fijan fundamentalmente los colorantes ácidos, dando un color rojo-naranja; y los **basófilos**, cuya granulación específica posee sustancias de carácter ácido, que fijan colorantes básicos dando un color azul oscuro.

REACTIVOS

- **Solución May Grünwald:** Eosinato de azul de metileno en metanol.
- **Solución Giemsa:** Azul de metileno (clorhidrato de tetrametilitionina), su derivado oxidado en medio alcalino: el azur II, y eosina (tetrabromofluoresceína).
- **Solución A:** solución estabilizadora de pH: 6,8-7 (se puede adquirir comercialmente) o en su defecto agua estabilizada* (controlar el pH).
*: El agua estabilizada es una solución buffer de fosfato Sörensen (pH: 6,8): $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ (0,354 g); PO_4HNa_2 (0,580 g) y H_2O c.s.p. 100 mL. Para usar: medir 10 mL de buffer y llevar a 500 mL con agua destilada.

PROCEDIMIENTO

- Cubrir el frotis de sangre seco con varias gotas de May Grünwald (MG). Dejar 3-5 min.
(Tiempo que actúa el alcohol metílico fijando el preparado: precipita las proteínas).
- Verter sobre el MG igual volumen de solución A. Dejar 1 min.
(Tiempo y pH en el que precipita el colorante).
- Volcar para eliminar el colorante.
- Cubrir el extendido con la solución de Giemsa diluido por 10 ó 15 min.
(Dilución Giemsa: 2 gotas de colorante/mL de solución A o dilución 1/10).
- Lavar con solución A o agua corriente, limpiar el portaobjeto del reverso y secar al aire.



3) REALIZACIÓN DE LA FÓRMULA LEUCOCITARIA RELATIVA

El frotis coloreado con MGG se observa al microscopio óptico; primero a bajo aumento (10x, 40x) para un estudio global del frotis, que permite apreciar su calidad y localizar la zona más adecuada para la evaluación morfológica, y posteriormente se pasa a 100x para el recuento diferencial colocando una gota de aceite de inmersión. **Contar atravesando el portaobjeto** en banda griega.

La clasificación de las células se puede realizar analizando las que se encuentran en una trayectoria que se hace comenzando en uno de los bordes, desplazando 4 a 5 campos microscópicos siguiendo de forma paralela al borde, iniciando a continuación una recorrida transversal hasta llegar al otro borde. Allí se comienza de nuevo: 4 a 5 campos microscópicos y otra incursión hasta el borde opuesto. Se clasifican como mínimo 100 leucocitos para obtener la fórmula porcentual relativa.

Se deben contar todos los elementos de la serie blanca (incluyendo células juveniles e inmaduras) e informar la presencia de granulaciones tóxicas, neutrófilos sin lóbulos, polilobulados, formas de lisis de la serie linfocitaria (sombras de Grumprecht), hemoparásitos, etc.

VALORES DE REFERENCIA

Fórmula leucocitaria normal de un adulto

	Relativa	Absoluta
Neutrófilos en cayado	0-5 %	0 - $0,7 \times 10^9$ /L
Neutrófilos segmentados	50-70 %	1,8 - $7,0 \times 10^9$ /L
Eosinófilos	0-4%	0 - $0,4 \times 10^9$ /L
Basófilos	0-1%	0 - $0,15 \times 10^9$ /L
Linfocitos	20-40%	1,5 - $4,0 \times 10^9$ /L
Monocitos	2-11%	0,2 - $0,8 \times 10^9$ /L

- No hay variación de la fórmula según el sexo, pero sí con la edad.

OBSERVACIONES

Recién Nacidos (RN):

- Nacimiento: 70% de neutrófilos.
- Primera semana: 50% de neutrófilos y 50% de linfocitos.
- Segunda semana: 65% de linfocitos y 25% de neutrófilos.

NIÑOS

- 3-4 años: 50% de linfocitos y 50% de neutrófilos.
- En niños hasta 5 años se invierte la fórmula aumentando los linfocitos y disminuyendo los neutrófilos.
- 10-12 años: valores de referencia del adulto.

Descripción de los elementos que componen una fórmula normal (Figura 4)

1. **Neutrófilo:** núcleo lobulado (2-5 lóbulos). Los lóbulos están unidos entre sí por filamentos cromatínicos muy delgados. Cromatina condensada. Mide aproximadamente 12 μm . El citoplasma es abundante y rosado, cubierto por una granulación fina específica de color pardo rojiza.
2. **Neutrófilo en cayado:** sólo se diferencia del anterior por su núcleo no lobulado en forma de C o S. No hay una zona muy delgada de material nuclear que permita diferenciar dos lóbulos.
3. **Eosinófilo:** mide alrededor de 13 μm . El núcleo es segmentado, con predominio del bisegmentado en forma de antejo. Abundante citoplasma y cubierto de granulaciones esféricas, de mayor tamaño que las del neutrófilo, que se colorean de anaranjado.
4. **Basófilo:** mide aproximadamente 10 μm . El núcleo está irregularmente lobulado. La cromatina es densa. La masa nuclear es voluminosa con relación al citoplasma. Las granulaciones son groseras y muy irregulares en forma y tamaño pudiendo quedar superpuestas al núcleo, cubriéndolo parcialmente.
5. **Linfocito:** es una célula generalmente pequeña (7 μm), pero puede llegar hasta 12 μm . La forma más pequeña posee sólo un escaso anillo de citoplasma color celeste. Alrededor de un 10% de los linfocitos circulantes son células más grandes y con citoplasma más abundante. El núcleo por lo general es redondo, pero puede tener una escotadura. La cromatina es densa.
6. **Monocito:** es el leucocito normal de mayor tamaño (18-24 μm). El núcleo tiene forma irregular y variada, la cromatina es esponjosa. La proporción núcleo-citoplasma es semejante. El citoplasma se tiñe de celeste plomizo y no presenta granulaciones.

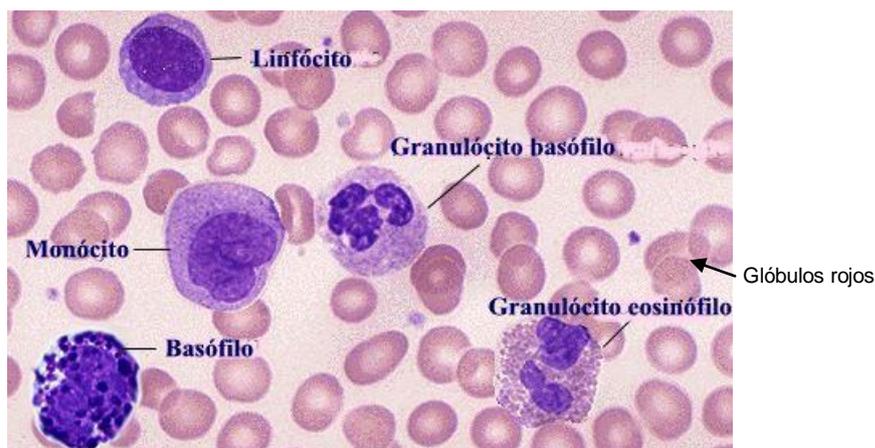


Figura 4. Frotis de sangre. Células sanguíneas: Glóbulos rojos. Glóbulos blancos: Neutrófilos, linfocitos, monocitos, basófilos y eosinófilos (Atlas de Hematología, 2010).

OBSERVACIONES

1- Ante la presencia de eritroblastos en el extendido sanguíneo cuando se realiza la fórmula leucocitaria, se procede de esta manera: se cuentan 100 leucocitos y en caso que el número de eritroblastos fuera superior a cinco es necesario efectuar una corrección en el recuento de GB de la siguiente manera:

Por ejemplo, si clasificamos 100 leucocitos y 20 eritroblastos:

120 células clasificadas.....	100 leucocitos
N° de leucocitos (valor absoluto).....	$X = N^{\circ} \text{ de GB} \times 100/120 = \text{GB}/\text{mm}^3$

2- En el extendido se debe observar la **forma** de los GR (informar si hay diferentes formas o poiquilocitosis y qué formas están presentes), el **color** (hipocromía, anisocromía) y el **tamaño** (microcitosis, macrocitosis, GR de diferentes tamaños o anisocitosis). También se debe informar si hay rouleaux (GR apilados como monedas), aglutinación, inclusiones (anillos de Cabot, punteado basófilo, cuerpos de Howell-Jolly). En todos los casos se indicará mediante el sistema de cruces: + (aislados), ++ (escasos), +++ (regular cantidad) y ++++ (abundantes).

COMPLETAR EL INFORME DE ACUERDO AL FROTIS REALIZADO EN EL TP:

Recuento Diferencial o Fórmula Relativa

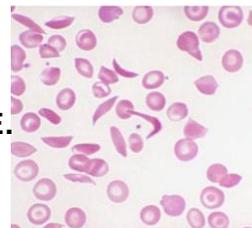
Leucocitos.....	mm ³
Neutrófilos Totales.....	%
Mieloblastos.....	%
Metamielocitos.....	%
Neutrófilos en Cayados.....	%
Neutrófilos Segmentados.....	%
Eosinófilos.....	%
Basófilos.....	%
Linfocitos.....	%
Monocitos.....	%
Linfocitos reactivos.....	%
Observaciones:	

BIBLIOGRAFÍA

- HEMATOLOGÍA. FUNDAMENTOS Y APLICACIONES CLÍNICAS. BF Rodak, GA Fritsma y EM Keohane. 4ª Edición. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires 2014.
- MANUAL DE TÉCNICAS DE LABORATORIO EN HEMATOLOGÍA. JL Vives Corrons. 4ª Edición. Ed. Elsevier, España 2014.
- ATLAS DE HEMATOLOGÍA CLÍNICA. JH Carr y BF Rodak. 3ª Edición. Ed. Médica Panamericana, 2010.
- HEMATOLOGÍA CLÍNICA. J Sans-Sabrafen. 5ª Edición. Ed. Elsevier, España 2006.

TRABAJO PRÁCTICO N° 3

**ALTERACIONES MORFOLÓGICAS DE LA SERIE ERITROIDE.
ESTUDIO CUALI- y CUANTITATIVO**



OBJETIVOS

- Adquirir cierta destreza para identificar e interpretar la citomorfología hemática a través de la observación microscópica.
- Evaluar en frotis sanguíneos: la morfología de la estirpe mieloide (eritrocitos, leucocitos y plaquetas) y linfoide (linfocitos), en condiciones normales y patológicas.
- Realizar recuento de Reticulocitos por método manual.

1- CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LA LÍNEA ERITROIDE

Nombre	Tamaño celular	Núcleo	Nucléolo visible	Relación núcleo/citoplasma	Tinción citoplasma
Proeritroblasto	20-25 μm	Redondo	1 a 2	Muy elevada	Basófilo
Eritroblasto basófilo	16-18 μm	Redondo	No	Elevada	Hiperbasófilo
Eritroblasto policromático	8-12 μm	Redondo	No	Baja (25%)	Acidófilo
Eritroblasto ortocromático	7-10 μm	Redondo/ picnótico	No	Muy baja	Muy acidófilo
Reticulocito	8-9 μm				\pm Basófilo
Hematíe	7 μm				Acidófilo

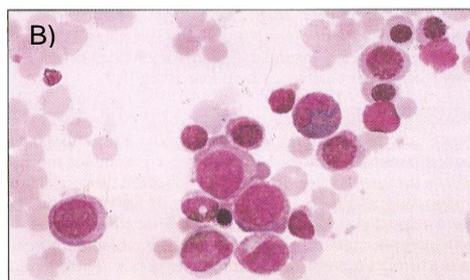
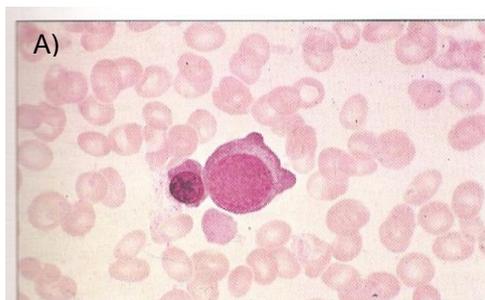
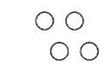


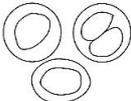
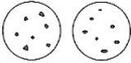
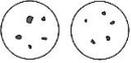
Figura 1. Células de la línea eritroide. A) Proeritroblasto B) Eritroblastos basófilos y policromáticos (May Grünwald-Giemsa, x1.000). (Extrido de Sans-Sabrafen, 2006).

2- ALTERACIONES MORFOLÓGICAS ERITROCITARIAS

Anomalia	Descripción	Morfología	Asociación a patología
I. Alteraciones de tamaño:			
Anisocitosis	Desigualdad en el tamaño de los hematíes		Inespecífico, aunque constante en los enfermos transfundidos
Microcitosis	Predominio de hematíes de diámetro < 6 µm y volumen < 80 fL		Anemia ferropénica. Talasemia. Anemia de enfermedades crónicas. Hipertiroidismo. Déficit de PK
Macrocitosis	Predominio de hematíes de diámetro entre 8-11 µm y volumen > 100 fL		Déficit de factores madurativos (vitamina B ₁₂ , ácido fólico), hepatopatías crónicas, síndromes mielodisplásicos, eritroblastosis fetal
Megalocitosis	Predominio de hematíes de diámetro ≥ 12 µm y volumen > 100 fL		Anemias megaloblásticas (A. perniciosa)
II. Alteraciones de la forma (poiquilocitosis):			
Esquistocitos	Hematíes fragmentados de 2-3 µm		Carcinomas, uremia, coagulación intravascular diseminada, hemangiomas, quemaduras graves, hemoglobinuria de la marcha. Prótesis valvulares. Anemia hemolítica microangiopática
Dacriocitos	Hematíes con una proyección elongada en un polo (forma de pera, lágrima)		Anemias graves, metaplasia mieloide agnógena
Esferocitos	Hematíes de forma esférica sin aclaramiento central		Esferocitosis hereditaria o ictericia hemolítica constitucional, postesplenectomía, anemia hemolítica autoinmune. Quemaduras graves, picaduras de insectos
Ovalocitos	Hematíes en forma de óvalo		Inespecífico, anemia megaloblástica
Eliptocitos	Hematíes en forma elíptica		Inespecífico, eliptocitosis hereditaria, anemia megaloblástica, ferropenias, talasemias
Drepanocitos	Hematíes falciformes		Hemoglobinopatías y en otros tipos de hemoglobinopatías (C-Harlem Memphis-S)
Codocitos o hematíes en diana	Hematíes con un área con mayor contenido de hemoglobina que se sitúa en la zona central clara		Talasemia (enfermedad de Cooley), hemoglobinopatía C, postesplenectomía y en anemias ferropénicas muy graves (dianas microcíticas). Hepatopatías, déficit de lecitincolesterol-aciltransferasa (LcAT)
Estomatocitos	Hematíes que en su región central clara poseen una hendidura en forma de boca		Estomatocitosis hereditaria, cirrosis hepática, hepatopatía alcohólica, anemias hemolíticas por autoanticuerpos
Hematíes espiculados:			
a) Equinocitos o hematíes crenados	Hematíes con espículas cortas distribuidas regularmente por toda la superficie		Déficit de piruvatoquinasa, uremia, hepatopatías neonatales, carcinomas gástricos, úlcera péptica, sangre conservada
b) Keratocitos o hematíes en casco	Presentan dos proyecciones en forma de espículas con forma de casco o de sombrero de polichinela		Uremia, hemólisis por valvulopatía cardíaca, hemangioma cavernoso, neoplasias, anemia hemolítica microangiopática
c) Acantocitos o spur cells	Hematíes con perfil dentellado y espinoso con espículas (3-12 y de distinta longitud)		Alfa/beta lipoproteinemia congénita, hepatopatías, postesplenectomía, administración de heparina, mielofibrosis aguda y crónica
d) Excentrocitos	Hematíes con distribución anormal de la hemoglobina. Se dispone como despegada de la parte interna de la membrana y concentrada en uno de sus extremos		Déficit de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, anemia hemolítica

(Extraído de Sans-Sabrafen, 2006)

ALTERACIONES MORFOLÓGICAS ERITROCITARIAS (continúa)

Anomalia	Descripción	Morfología	Asociación a patología
III. Alteraciones de la colaboración de la hemoglobina:			
Hipocromía	Hematíes que se tiñen débilmente		Anemias ferropénicas
Policromasia	Hematíes jóvenes que conservan parte de material basófilo del eritroblasto y se tiñen de color gris		Situación de inmadurez celular
IV. Inclusiones eritrocitarias:			
Corpúsculos de Howell-Jolly	Corpúsculos redondos únicos o múltiples de 1 µm de diámetro de color rojo violáceo		Postesplenectomía, atrofia esplénica, saturnismo, anemias megaloblásticas y hemolíticas
Anillos de Cabot	Línea muy fina en forma de anillo de color rosado		Carecen de especificidad, aunque su presencia traduce trastorno profundo de la eritropoyesis
Punteado basófilo	Agrupados de color azul grisáceo		Saturnismo, anemias hemolíticas, síndromes mielodisplásicos, leucemias, carcinomas, déficit de pirimidina-5' nucleotidasa
Cuerpos de Pappenheimer Reticulocitos*	Gránulos azul negruzco		Situaciones de gran sobrecarga férrica
Cuerpos de Heinz*	Esférulas azules (tinción vital)		Regeneración medular, alfa talasemia, hemoglobinopatías inestables, anemias hemolíticas enzimopénicas
Siderocitos*	Gránulos verdes (tinción Perls)		Postesplenectomía, anemias sideroacréticas, aplasias y hemolíticas. Sobrecarga férrica
Parásitos			Paludismo. Babesia. <i>Bartonella bacilliformis</i>

(Extraído de Sans-Sabrafen, 2006)

ACTIVIDAD PRÁCTICA

1- RECUESTO DE RETICULOCITOS

Los reticulocitos (Ret) son GR jóvenes (inmaduros) que contienen restos basófilos de ribonucleoproteínas, presentes en el citoplasma de sus precursores nucleados y forman un retículo granulofilamentoso que es identificado por colorantes vitales como el azul brillante de cresilo o el azul de metileno nuevo. La cantidad de ARN es tanto menor cuanto más madura es la célula. En condiciones normales, los Ret permanecen en la médula durante 2-3 días y terminan su maduración sangre periférica en aproximadamente 24 horas. Existen en la sangre en una proporción de cinco a diez por mil hematíes.

El recuento de Ret se realiza sólo cuando está **expresamente solicitado** por el médico. Es la técnica más simple para valorar la actividad eritropoyética de la médula ósea. Los Ret se producen por causa de algunas anemias; el organismo incrementa la producción de GR y los envía al torrente sanguíneo antes de que sean maduros. Cuando una anemia se acompaña de un número elevado de Ret circulantes (reticulocitosis) se considera regenerativa, en cambio si el número es normal o disminuido se denomina arregenerativa. El recuento de Ret se realiza a partir de sangre total con anticoagulante (EDTA) y dentro de las 3 primeras horas de la extracción cuando la sangre se conserva a temperatura ambiente.

El recuento puede efectuarse por dos procedimientos:

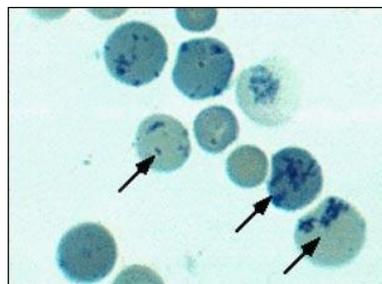
1. MÉTODO MANUAL: TINCIÓN VITAL Y MICROSCOPIO ÓPTICO

a) Colorante Azul de metileno: es considerado un método de referencia. Se usa una solución de azul de metileno nueva: 1 g/100 mL solución citratada (1 vol de citrato de sodio 30 g/L y 4 vol de NaCl 9 g/L).

b) Colorante Azul brillante de cresilo.

Reactivo Azul Brillante de Cresilo (ABC):

- 1 g Azul Brillante de Cresilo.
- 0,4 mL de Citrato de Sodio 3,8%.
- 0,2 mL de Formol al 40%.
- Llevar hasta 100 mL con solución fisiológica.



2. MÉTODO AUTOMATIZADO (ver guía TP parte V)

PROCEDIMIENTO

- Colocar en un tubo pequeño partes iguales de sangre entera y de reactivo ABC (por ej: 0,5 mL y 0,5 mL).
- Incubar a 37°C por 1 h. Realizar los extendidos por duplicado y dejar secar.
- En caso de valores muy bajos de hematocrito debe colocarse doble cantidad de sangre total que de solución colorante.
- Observar en microscopio con objetivo de inmersión. Contar en campos donde se observe una distribución uniforme de los GR. Localizar 10 campos con aproximadamente 100 GR c/u (1000 GR). Ej:

Si en 1000 GR contados 60 Ret

$$\text{en 100 GR } X = \frac{\text{N}^\circ \text{ de Ret contados} \times 100}{\text{N}^\circ \text{ de GR contados}} = \% \text{ de reticulocitos}$$

VALORES DE REFERENCIA

Adultos: 0,5-1,5% (25.000 – 75.000/mm³)
 Niños: 0,5 – 4%
 RN: 2-6%

El valor del recuento de Ret se expresa en porcentaje de GR. Esto será válido si se trata de una concentración normal de eritrocitos en sangre total. Por ello, cuando disminuye el número de GR (anemia), el valor porcentual debe corregirse según el hematocrito empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Ret corregidos \%} = \text{Ret observados (\%)} = \frac{\text{Hto del paciente}}{\text{Hto normal}^*}$$

(El hematocrito normal es el que corresponde según edad y sexo).

*Mujer = 39%; *Hombre = 42%

$$\text{Ret corregidos \%} = \text{Ret observados (\%)} = \frac{\text{Hb del paciente}}{\text{Hb normal}^*}$$

*Mujer = 13,5 g/dL; *Hombre = 14,5 g/dL

En el caso de anemia intensa, el número de Ret circulantes suele ser superior al que corresponde al grado de regeneración eritroblástica. Ello obedece a que la anemia se

acompaña siempre de un estímulo eritropoyético compensador, que facilita una salida precoz de Ret desde la médula a la sangre periférica, y un acortamiento de su período de maduración intramedular, lo que supone un aumento del período de maduración periférica. Este fenómeno se caracteriza por la aparición en el examen morfológico del extendido de sangre de eritrocitos grandes (macroцитos) y tonalidad azulada (policromatofilia).

Existe una relación inversa, aproximadamente lineal, entre el hematocrito y el período de maduración periférica de los Ret, de esta forma puede calcularse otra magnitud de interés clínico denominada **índice de producción reticulocitario (IPR)**:

$$\text{IPR} = \frac{\text{Ret del paciente (\%)} \times \text{Hto del paciente}}{\text{Período de maduración (días)} \times \text{Hto normal}}$$

$$\text{IPR} = \text{Ret corregidos (\%)} / \text{Período de maduración en días}$$

Se admite que un **IPR ≥ 3** indica aumento de actividad eritropoyética medular (anemia regenerativa: hemolítica o hemorrágica) mientras que un **IPR < 2** es índice de escasa actividad eritropoyética (anemia arregenerativa: hipoplasia eritropoyética).

Relación entre la respuesta reticulocitaria y el grado de anemia

Hematocrito (%)	45	40	35	30	25	20	15
Niveles de Hemoglobina (g/dL)	15,0	13,3	11,7	11,0	8,3	6,6	5,0
Recuento de reticulocitos (%)	1	2	5	10	15	20	30
Recuento de reticulocitos corregido (%)	1	1,8	4	7	8,3	9	10
Tiempo de maduración estimado	± 1 día			± 2 días			3 días
Índice de reticulocitos (IPR)	1	2	5	5	7,5	10	10

OBSERVACIONES

El **recuento manual de Ret** posee muy escasa fiabilidad (coeficientes de variación > 20%), debido a errores de índole subjetiva como el diferente criterio que cada observador tiene de lo que es un Ret, a la elección de campos inapropiados, distribución variable de los Ret en el extendido, bajo número de células contadas, entre otros.

Variaciones patológicas

<p>Disminución Reticulocitos (reticulocitopenia) Aplasia medular. Anemias carenciales intensas (megaloblástica y ferropénica). Mielofibrosis idiopática. Anemia inflamatoria</p> <p>Aumento Reticulocitos (reticulocitosis) Anemias hemolíticas Anemias posthemorrágicas Eritroblastosis fetal Mieloptosis (infiltración neoplásica en la médula ósea)</p>
--

1-1. INFORME DEL RECUENTO DE RETICULOCITOS REALIZADO EN EL TP



2- OBSERVACIÓN DE FROTIS SANGUÍNEOS DE LA SERIE ERITROIDE AL MICROSCOPIO ÓPTICO: NORMAL Y PATOLÓGICO

Para una correcta interpretación de los preparados se deberá contar con un atlas hematológico.

Preparado N° 1 :

Formas predominantes

Presencia de granulaciones Sí No

Presencia de vacuolas: Sí No

Características de la serie roja

Patología/s probable/s

Observaciones:

Preparado N° 2:

Formas predominantes

Presencia de granulaciones Sí No

Presencia de vacuolas: Sí No

Características de la serie roja

.....

Patología/s probable/s

Observaciones:

Preparado N° 3:

Formas predominantes.....

.....

Presencia de granulaciones Sí No

Presencia de vacuolas: Sí No

Características de la serie roja

.....

Patología/s probable/s

Observaciones:

Preparado N° 4:

Formas predominantes.....

.....

Presencia de granulaciones Sí No

Presencia de vacuolas: Sí No

Características de la serie roja

.....

Patología/s probable/s

Observaciones:

Preparado N° 5:

Formas predominantes.....

.....

Presencia de granulaciones Sí No

Presencia de vacuolas: Sí No

Características de la serie roja

.....

Patología/s probable/s.....

Observaciones:

Preparado N° 6:

Formas predominantes.....

.....

Presencia de granulaciones Sí No

Presencia de vacuolas: Sí No
 Características de la serie roja

 Patología/s probable/s
 Observaciones:

Preparado N° 7:

Formas predominantes.....

Presencia de granulaciones Sí No
 Presencia de vacuolas: Sí No
 Características de la serie roja

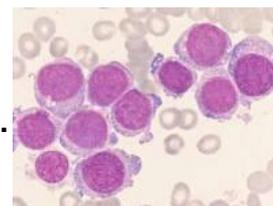
 Patología/s probable/s
 Observaciones:

BIBLIOGRAFÍA

- HEMATOLOGÍA. FUNDAMENTOS Y APLICACIONES CLÍNICAS. BF Rodak, GA Fritsma y EM Keohane. 4ª Edición. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires 2014.
- MANUAL DE TÉCNICAS DE LABORATORIO EN HEMATOLOGÍA. JL Vives Corrons. 4ª Edición. Ed. Elsevier, España 2014.
- ATLAS DE HEMATOLOGÍA CLÍNICA. JH Carr y BF Rodak. 3ª Edición. Ed. Médica Panamericana, 2010.
- HEMATOLOGÍA CLÍNICA. J Sans-Sabrafen. 5ª Edición. Ed. Elsevier, España 2006.

TRABAJO PRÁCTICO N° 4

ALTERACIONES MORFOLÓGICAS DE LOS LEUCOCITOS. ESTUDIO CUALI- y CUANTITATIVO



OBJETIVOS

- Adquirir cierta destreza para identificar e interpretar la citomorfología hemática a través de la observación microscópica.
- Evaluar en frotis sanguíneos la morfología de la estirpe mieloide (eritrocitos, leucocitos y plaquetas) y linfoide (linfocitos), en condiciones normales y patológicas.
- Determinar tipos de muestra y fijadores para las tinciones citoquímicas.

1- CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LA SERIE GRANULOCÍTICA

GRANULOPOYESIS

Los granulocitos se originan en la médula ósea a partir de un progenitor (CMH) común a todas las células sanguíneas, en un proceso escalonado de diferenciación, proliferación y maduración. La CMH bajo el influjo de factores del microambiente medular, daría lugar a células progenitoras cada vez más comprometidas hacia la serie mieloide (Unidades Formadoras de Colonia -UFC- de granulocitos, eritrocitos, monocitos y megacariocitos [GEMM]; UFC de granulocitos y macrófagos [GM] y UFC de granulocitos [G]), de las cuales, finalmente, se originan los precursores granulocíticos morfológicamente reconocibles en la médula ósea. Estos precursores continúan proliferando y diferenciándose en la siguiente secuencia madurativa: *Mieloblasto, Promielocito, Mielocito, Metamielocito, Cayado, Granulocito segmentado neutrófilo, Granulocito segmentado eosinófilo y Granulocito segmentado basófilo*; en la cual van adquiriendo las características necesarias (aparato metabólico, locomotor, propiedades de membrana) para ejercer su función como granulocito maduro.

Durante la maduración de la serie granulocítica, las células sufren cambios morfológicos como: desaparición de los nucléolos, reducción de la relación núcleo/citoplasma, condensación de la cromatina, disminución de la basofilia citoplasmática, aparición de las granulaciones primarias o azurófilas (promielocito) y de las secundarias o específicas (mielocito). Se puede apreciar en el metamielocito, el comienzo

de la segmentación nuclear, para dar origen al polimorfonuclear en banda o cayado, y por último, a la célula más madura de esta serie, el polimorfonuclear segmentado.

Es importante identificar a cada uno de estos precursores debido a que pueden encontrarse en los extendidos de sangre periférica y si no se conocen es posible que pase desapercibido el diagnóstico, como en el caso de las leucemias.

MIELOBLASTO

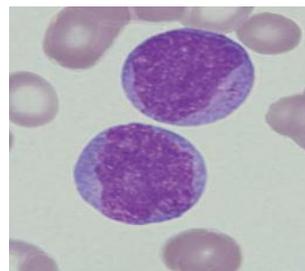
Elemento iniciador de la progenie.

Tamaño: alrededor de 15-20 μm .

Núcleo: redondo, de gran tamaño, ocupa casi toda la célula, cromatina laxa y aspecto de red. Contiene uno a cuatro nucleolos.

Citoplasma: se colorea de celeste claro (basófilo), es apenas un halo alrededor del núcleo. Al microscopio óptico no se observan granulaciones pero al microscopio electrónico se evidencian lisosomas que en otras etapas van a constituir las granulaciones inespecíficas.

(Medicina & Laboratorio 2008; 14: 411-55).



Mieloblasto en sangre periférica de paciente con leucemia mieloide crónica. Tinción MGG 1000x.

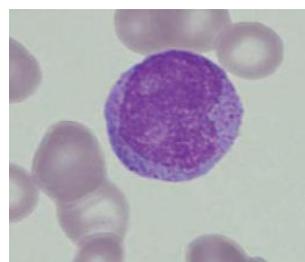
PROMIELOCITO

Tamaño: mayor que el anterior (20-25 μm).

Núcleo: grande, redondo u ovalado, posición algo excéntrica. Cromatina semidensa. Presenta hasta dos nucleolos.

Citoplasma: se observa una zona clara perinuclear (zona del complejo de Golgi y centro celular). Es basófilo y se observan al microscopio óptico granulaciones primarias (numerosos gránulos azurófilos peroxidasa positivos). Estas no permiten identificar a la célula como precursora de neutrófilo-eosinófilo-basófilo.

(Medicina & Laboratorio 2008; 14: 411-55).



Promielocito en sangre periférica de paciente con leucemia promielocítica. Tinción MGG 1000x.

MIELOCITO

Tamaño: 13-18 μm .

Núcleo: aspecto redondeado. No muestra nucléolos. Cromatina condensada.

Citoplasma: poco basófilo. A partir de este estadio comienza la formación de granulación secundaria específica (neutrófila, eosinófila y basófila) y disminuye la primaria.

El mielocito es el último elemento en el cual se presenta división.

(Medicina & Laboratorio 2008; 14: 411-55).

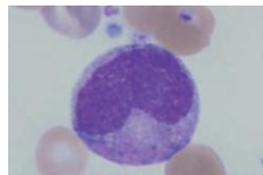


Mielocito en sangre periférica de paciente con leucemia mieloide crónica. Tinción MGG 1000x.

METAMIELOCITO

Tamaño: 12-15 μm .

Núcleo: es indentado y excéntrico, de aspecto reniforme. Cromatina con disposición parcelada, mostrando zonas condensadas. No presenta nucleolos. **Citoplasma:** policromatofilo (intermedio entre azul y rosado). Predominan las granulaciones secundarias, y las granulaciones primarias son escasas. Esta célula ha perdido la capacidad mitótica. (Medicina & Laboratorio 2008; 14: 411-55).



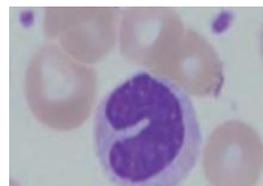
Metamielocito en sangre periférica de paciente con leucemia mieloide crónica. Tinción MGG 1000x.

GRANULOCITO EN BANDA O CAYADO

Tamaño: 12-14 μm .

Núcleo: en forma de "C" (bastón o cayado) "S" (banda). Cromatina condensada y parcelada.

Citoplasma: acidófilo (rosado) con granulaciones específicas o secundarias. Las granulaciones primarias ya no son visibles. De acuerdo a los gránulos que presenta será neutrófilo, eosinófilo o basófilo. (Medicina & Laboratorio 2008; 14: 411-55).



Cayado en sangre periférica de paciente con Sind. mielodisplásico. Tinción MGG 1000x.

GRANULOCITO MADURO: granulocito con núcleo segmentado.

GRANULOCITO NEUTRÓFILO

Tamaño: 12 a 14 μm .

Núcleo: presenta de 2 a 5 lóbulos unidos por filamentos de cromatina. La cromatina tiene zonas muy condensadas o extendidas.

Citoplasma: rosado con numerosos gránulos neutrófilos, que se tiñen de color marrón con MMG. (Medicina & Laboratorio 2008; 14: 411-55).



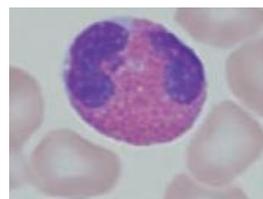
Polimorfonuclear neutrófilo normal en sangre periférica. Tinción MGG 1000x.

GRANULOCITO EOSINÓFILO

Tamaño: 12-15 μm . **Núcleo:** bilobulado. Disposición de la cromatina en mosaico.

Citoplasma: cubierto de granulaciones esféricas de mayor tamaño que las neutrófilos, coloreadas de color naranja (o pardo rojizo) con MMG.

Prácticamente cubren todo el citoplasma y se consideran lisosomas. (Medicina & Laboratorio 2008; 14: 411-55).



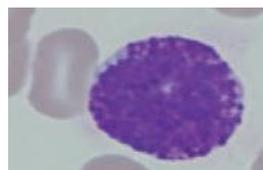
Polimorfonuclear eosinófilo normal en sangre periférica. Tinción MGG 1000x.

GRANULOCITO BASÓFILO

Tamaño: 10-12 μm .

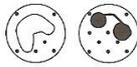
Núcleo: lobulado e irregular. Cromatina muy densa, masa nuclear voluminosa en relación al citoplasma.

Citoplasma: rosado cubierto por granulos grandes, dispuestos irregulares sobre el núcleo. Son de color azul oscuro, y contienen heparina e histamina. (Medicina & Laboratorio 2008; 14: 411-55).



Polimorfonuclear basófilo normal en sangre periférica. Tinción MGG 1000x.

1- ANOMALÍAS MORFOLÓGICAS GRANULOCÍTICAS (neutrófilos)

Anomalia	Descripción	Morfología	Asociación a patología
I. Alteraciones nucleares:			
Anomalia constitucional de Pelger-Huët	Leucocito con relativa ausencia de segmentación. Queda configurado en forma de banda o en 2 segmentos		Anomalia congénita. Seudo-Pelger en: enfermedades infecciosas, anemia aplásica, anemia perniciosa, síndromes mielodisplásicos y mieloproliferativos crónicos, leucemias mieloblásticas
Núcleos en anillo	Hiposegmentación nuclear con un gran agujero central (forma de donut)		Síndromes mieloproliferativos crónicos y mielodisplásicos. Leucemias agudas, alcoholismo crónico. Mononucleosis
Hipersegmentación nuclear	Polinucleares con 4 o más segmentos		Anemias megaloblásticas, renales y ferropénicas, síndromes mielodisplásicos
Pleocariocito	Hipersegmentación nuclear más gigantismo celular		Anemias megaloblásticas
II. Alteraciones del citoplasma:			
Granulación tóxica	Granulación primaria que se tiñe de forma pronunciada		Infecciones, carcinomatosis generalizada, quemaduras
Desgranulación	Neutrófilo sin granulación aparece azulado y agranular		Indicativo de hemopatía grave, leucemias agudas mieloides. Síndromes mielodisplásicos y mieloproliferativos crónicos
Anomalia de Alder-Reilly	Granulaciones groseras color violeta*		Suele asociarse a una mucopolisacaridosis
Anomalia de Steinbrinck Chediak-Higashi	Gránulos en forma de inclusiones azules oscuras de 3 a 9 µm		Alteración de carácter hereditario
Cuerpos de Döhle	Inclusiones basófilas y ovaladas o rectangulares		Sepsis, escarlatina, erisipela, difteria, quemaduras, síndromes mielodisplásicos y mieloproliferativos crónicos
Bastones de Auer	Estructuras azurófilas en forma de bastoncillo, de puntas afiladas (en neutrófilos y en blastos)		Leucemia aguda mieloides, síndrome mielodisplásico

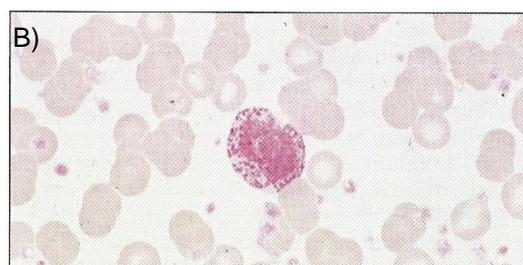
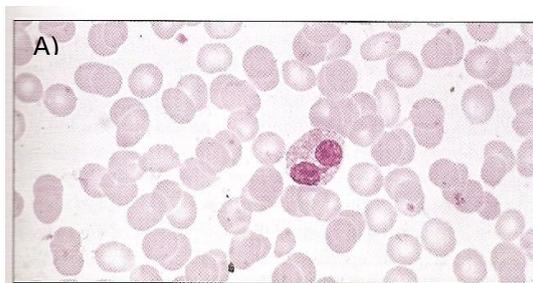


Figura 1. Características morfológicas de Los granulocitos. A) granulocito eosinófilo. B) granulocito basófilo (May Grunwald-Giemsa, x1000). (Extraído de Sans-Sabrafen, 2006).

2- CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LA SERIE MONOCÍTICA

Célula	Tamaño celular	Núcleo	Nucléolos visibles	Citoplasma
Monoblasto	15-25 μm	<ul style="list-style-type: none"> - Grande y redondo - Cromatina laxa 	5	Abundante, basofilia intensa (azul plumizo)
Promonocito	15-20 μm	<ul style="list-style-type: none"> - Contorno irregular con pliegues - Cromatina poco condensada 	0-1	Abundante, basófilo, fina granulación azurófila
Monocito	15-30 μm	<ul style="list-style-type: none"> - Central - Irregular con pliegues (adopta formas abigarradas) - Cromatina densa de aspecto «como peinado» en finas franjas 	No	Abundante, granulación azurófila, en ocasiones pequeñas vacuolas
Histiocito*				

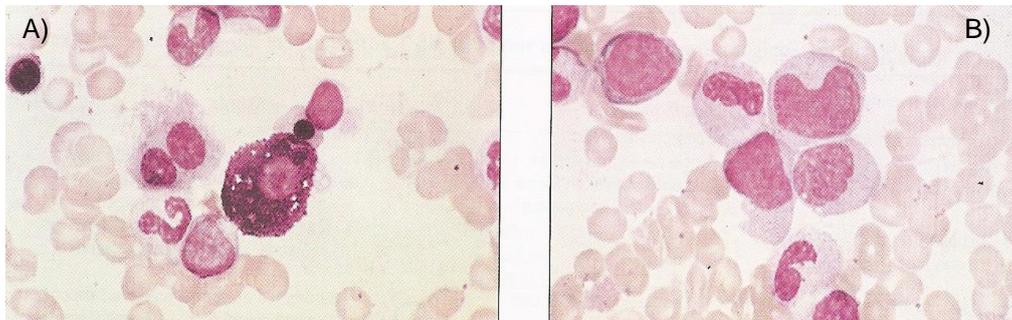


Figura 2. A) Mastocito. B) Promonocito y monocito (May Grunwald-Giemsa, x1000). (Extraído de Sans-Sabrafen, 2006).

3- CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LA SERIE MEGACARIOCÍTICA

Célula	Tamaño celular	Morfología nuclear	Citoplasma	
			Tinción	Granulación
Megacarioblasto	 15-50 μm	Compacto (lobulado)	Basófilo	Escasa
Promegacariocito	 20-80 μm	Herradura	Basofilación área central acidófila	Aumentando
Megacariocito granular	 50-80 μm	Multilobulado	Progresivamente más acidófilo que basófilo	Abundante
Megacariocito maduro liberador de plaquetas	 20-150 μm	Compacto, pero altamente lobulado	Acidófila	Abundante, organizada en campos plaquetarios
Plaqueta	 2-3 μm	Ausente	Zona periférica hialina (hialómero)	Granulación azurófila de localización central (forman el cromómero)

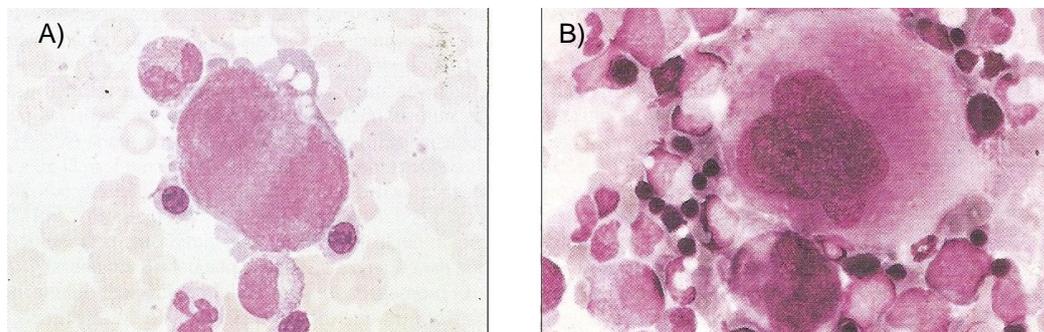
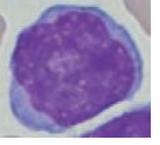
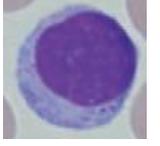
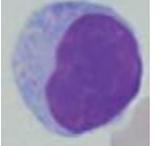
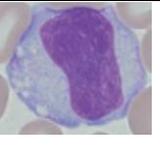


Figura 3. A) Megacariocito. B) Megacariocito maduro formador de plaquetas (May Grunwald-Giemsa, x1000). (Extraído de Sans-Sabrafen, 2006).

4- CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LA SERIE LINFOCÍTICA

Morfología serie linfoide normal

Célula	Tamaño μ	Núcleo	Nucléolos	Cromatina	Citoplasma	N/C	Rango % MO
 Linfoblasto	10-18	Redondo u oval, sin hendiduras. Membrana nuclear definida, localización central	1-2 pequeños color azul pálido	Bandas finas color rojo-púrpura claro	Escaso entre moderada e intensamente basófilo. No gránulos	6:1	Rara vez
 Prolinfocito	Igual o más pequeño que linfoblasto	Redondo, oval y en ocasiones ligeramente indentado	1, bien delimitado	Moderada tendencia a la condensación	Más abundante que el del linfoblasto, moderadamente basófilo. Puede tener algunos gránulos azurófilos	4.5:1	-
 Linfocito pequeño	7-9	Redondo u oval, puede presentar pequeñas hendiduras	-	Densa y agrupada, patrón burdo de cromatina	Escaso anillo de citoplasma azul celeste	5:1	11-23
 Linfocito mediano	10-12	Redondo u oval, puede estar ligeramente indentado	-	Patrón de cromatina agrupado pero no tan densa como el linfocito pequeño	Más abundante que en linfocito pequeño, azul pálido. Puede tener o no escasos gránulos azurófilos	variable	11-23
 Linfocito grande	12-16	Redondo u oval, puede estar ligeramente indentado y localización excéntrica	-	Menos compacta que en linfocito pequeño	Abundante y de color azul claro. Escasos gránulos azurófilos	-	11-23

1- PLATT, William. Atlas Hematología a color. 2ª ed., Barcelona, 1982.

2- Las figuras de la serie linfocítica fueron extraídas de Medicina & Laboratorio 2008: 14: 411-55). Tinción con MGG, 1.000x.

ACTIVIDAD PRÁCTICA

CITOQUÍMICA

FUNDAMENTOS BÁSICOS

La citoquímica es el estudio de los elementos químicos de las células. En hematología, constituye un complemento importante a la microscopía óptica convencional en el diagnóstico de neoplasias y otros desórdenes hematológicos.

Las técnicas citoquímicas tienen por objeto detectar componentes celulares específicos como enzimas, lípidos, hidratos de carbono, depósitos de hierro, etc.

Hay muchos tipos de muestras adecuadas para los estudios citoquímicos. Los frotis y las improntas realizados a partir de médula ósea, ganglios linfáticos, bazo o sangre periférica son los más utilizados. Para obtener mejores resultados con las técnicas enzimáticas, deben emplearse frotis frescos para garantizar la actividad enzimática. Los frotis para las tinciones no enzimáticas, como el ácido periódico de Schiff (PAS) o Sudán negro B (Sudan black B) permanecen estables durante meses si se almacenan a temperatura ambiente. Es importante utilizar el fijador adecuado para las tinciones citoquímicas. Los fijadores que contienen alcohol (metanol o etanol), acetona, formaldehído o una combinación de ellos, son los que más se emplean.

TINCIONES E INTERPRETACIONES

1- PEROXIDASA

FUNDAMENTO

La peroxidasa de los leucocitos frente a la bencidina y al peróxido de hidrógeno cataliza una reacción que desprende oxígeno naciente y este oxida a la bencidina a un óxido intermedio color azul oscuro al principio, que luego vira al negro. Para su demostración es imprescindible un catalizador metálico como el nitroprusiato de sodio.

REACTIVOS

Solución A:

- Bencidina: 30 mg
- Sol. saturada de nitroprusiato de Sodio:..... 0,1 mL
- Etanol absoluto: 9,9 mL

- Disolver la bencidina en alcohol y luego agregar la solución de nitroprusiato.

Solución B:

- H₂O₂ (20 vol).....1 gota
- H₂O dest. o sol. Fisiológica.....10 mL

NOTA: No debe usarse una concentración mayor de agua oxigenada porque se produce la rápida oxidación de la bencidina y precipita el derivado azul en forma de agujas.

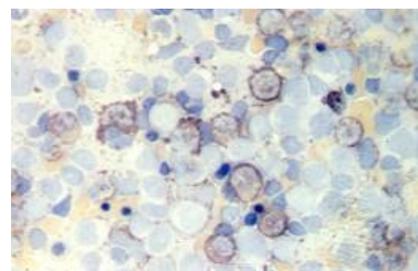
En la actualidad, dadas las propiedades carcinogénicas de la bencidina, se usan otros sustratos como 3,3'-diaminobencidina (DAB) o dicloruro de p-fenilenediamina y catecol.

PROCEDIMIENTO

- Usar un frotis de sangre sin fijar y cubrir con la solución de Bencidina durante 1 a 5 min (si es un preparado de médula ósea fijar 10 min). Permite fijar los elementos e impregnar con bencidina la totalidad de las células.
- Agregar sobre el frotis una cantidad igual de solución B, y dejar actuar por 3 a 5 min. Durante este tiempo se controla el preparado húmedo al microscopio. En los sitios donde hay peroxidasa, la bencidina es oxidada por el oxígeno liberado del agua oxigenada en presencia de nitroprusiato de sodio.
- Lavar con agua destilada.
- Dejar secar y observar con objetivo de inmersión.
- Se puede hacer una coloración de contraste con Giemsa al 10% por 20 min.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La peroxidasa es una enzima que se encuentra en los gránulos primarios de neutrófilos, eosinófilos y variable en forma dispersa, en los monocitos. Está ausente en los basófilos y en las plaquetas. En los linfocitos no hay actividad, siendo ésta una de las diferencias notables entre la serie mieloide y linfoide. Esta tinción es útil para diferenciar la leucemia mieloide aguda de la leucemia linfática aguda. La peroxidasa está presente en los gránulos de las células mieloides, desde el estadio promielocito y durante todas las etapas de maduración. Los mieloblastos leucémicos también suelen ser positivos al igual que los bastones de Auer.



Tinción peroxidasa (positiva en serie mieloide y negativa en serie monocítica).
<http://www.boloncol.com/boletin-11/leucemias>.

2- REACCIÓN DE PAS (ácido peryódico de Schiff)

FUNDAMENTO

El ácido peryódico-Schiff (PAS) colorea glucógeno plasmático. La reacción de PAS se basa en la capacidad oxidante del ácido peryódico para romper enlaces C-C de carbohidratos complejos para convertirlos en aldehídos, los cuales reaccionan con el reactivo de Schiff (incolore), y en presencia de SO₂ dan un compuesto de color rojo.

REACTIVOS

- Fijador: metanol
- Solución acuosa de ácido peryódico al 1%
- Reactivo de Schiff
 - Conservar a 4°C y proteger de la luz hasta su uso.
 - Disolver 1 g de fucsina básica p.a en 200 mL de agua destilada, llevar a ebullición durante 5 min. hasta disolución de la fucsina. Dejar enfriar a 50 °C y filtrar. Agregar 1 mL de HCl puro. Terminar de enfriar y agregar 2 g de bisulfito de sodio o metabisulfito de potasio. Mantener en oscuridad por 2 o 3 días. Clarificar agitando durante 1 min con 0,5 g de Carbón activado. Filtrar y guardar en oscuridad a 4°C. El filtrado debe ser incoloro, si tiene ligero tinte rosado agregar HCl 1N gota a gota hasta que desaparezca el color.
 - Conservar a 4°C hasta su uso.
- Contracolorante: azul de metileno al 1% o verde de metilo al 2,5%.

PROCEDIMIENTO

- Fijar con metanol 20 min.
- Lavar con H₂O de la canilla.
- Agregar ácido peryódico 1% por 5 min.
- Lavar con H₂O de la canilla.
- Cubrir toda la superficie con reactivo de Schiff 30 min, en oscuridad.
- Lavar bien con H₂O de la canilla.
- Cubrir con azul de metileno por 5 min.
- Lavar con H₂O de la canilla y dejar secar.
- Observar en microscopio óptico por inmersión.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

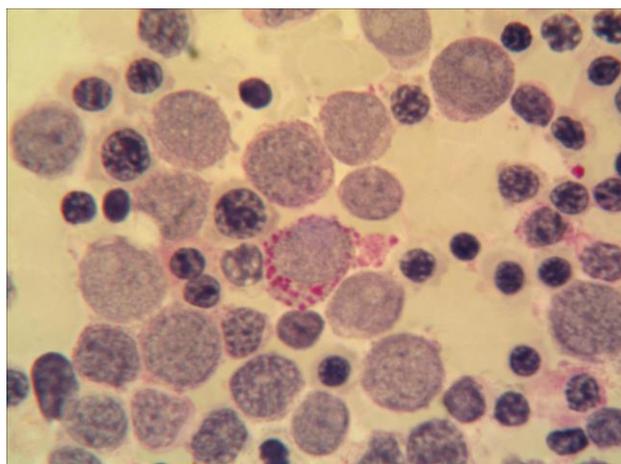
Todas las células que contienen glúcidos insolubles (glucógeno, glicoproteínas, mucopolisacáridos, etc) son positivas y se observan de color fucsia. Los granulocitos son PAS-positivos; la intensidad aumenta a medida que la célula madura. Los monocitos varían su respuesta al PAS desde negativo a un tono rosado. Las plaquetas son PAS positivas.

Menos de un 20% de linfocitos muestran gránulos PAS positivos dispuestos en anillo. La progenie eritrocítica normalmente es negativa. La tinción de PAS puede ser útil para el diagnóstico de algunas LLA y del tipo FAB M6 de la LMA.

Criterios de scorificación

El patrón de tinción con PAS puede ser fino y difuso, granular en forma de empedrado o mezcla de ambos.

Grados	Serie Granulocítica	Serie Linfoide
0	Ausencia de reacción	Ausencia de reacción
1	Fondo rosado débil	Varios puntos PAS+ sin constituir corona
2	Fondo rosado intenso	Una corona de gránulos
3	Fondo rojo intenso con gránulos	Dos coronas de gránulos
4	Rojo granate y abundantes gránulos gruesos rojos	Más de dos coronas



Aspirado de médula ósea de una leucemia mieloide aguda tipo FAB M6. Algunos eritroblastos presentan una intensa PAS positividad granular (Atlas de Hematología, 2010).

3- SUDAN BLACK B

FUNDAMENTO

El Sudán Black B ($C_{22}H_{16}N_4O$), es una coloración no enzimática. Es liposoluble y colorea intensamente fosfolípidos, lípidos neutros y esteroides. Las granulaciones sudanófilas se tiñen de color negro intenso. El patrón de coloración con Negro Sudán B se correlaciona con el patrón obtenido con la técnica de peroxidasa.

REACTIVOS

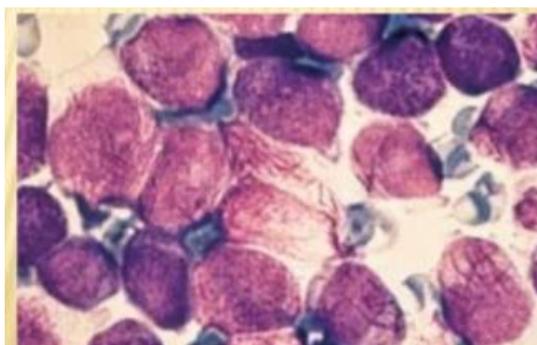
- Fijador: formol al 37%.
- Solución de Sudan Black B al 0,3% en etanol.
- Buffer: es una mezcla de fenol (16g en 30 mL de etanol) y $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (300 mg en 100 mL de agua destilada).
- Solución de trabajo: mezcla de buffer y solución de Sudán Black en proporción 2:3.
- Conservar a 4°C y proteger de la luz hasta su uso. Filtrar antes de usar.
- Contracolorante: Giemsa 1:10.

PROCEDIMIENTO

- Fijar los preparados con vapores de formol durante 10 min (en ambiente cerrado, por ejemplo caja de Petri).
- Lavar bien con H_2O de la canilla.
- Cubrir con solución de trabajo por 60 min.
- Lavar con etanol 70% (2 lavados) durante 5 min.
- Cubrir con Giemsa 1:10 por 10 min.
- Lavar con H_2O de la canilla y dejar secar.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En los blastos provenientes de leucemias mielocíticas y mielomonocíticas, el citoplasma aparece cubierto de gránulos color negro. Las células monocitoides se tiñen de forma menos intensa y las linfoides y eritroides son negativas. El patrón de positividad es idéntico al obtenido con la tinción de la mieloperoxidasa. Por lo tanto, permite diferenciar leucemias mieloides (positivas) de las linfoides.



Técnica Sudán negro B.
(www.slideshare.net/aleCEsi1/tcnicas-citoquimicas)

1- OBSERVACIÓN DE FROTIS SANGUÍNEOS DE LA SERIE LEUCOCITARIA AL MICROSCOPIO ÓPTICO: NORMAL Y PATOLÓGICO

Para una correcta interpretación de los preparados se deberá contar con un atlas hematológico.

Preparado N° 1:

Formas predominantes.....

Presencia de granulaciones Sí No

Presencia de vacuolas: Sí No

Características de la serie roja

Patología/s probable

Observaciones:

Preparado N° 2:

Formas predominantes.....

Presencia de granulaciones Sí No

Presencia de vacuolas: Sí No

Características de la serie roja

Patología/s probable/s

Observaciones:

Preparado N° 3:

Formas predominantes

Presencia de granulaciones Sí No

Presencia de vacuolas: Sí No

Características de la serie roja

Patología/s probable/s

Observaciones:

Preparado N° 4:

Formas predominantes.....

Presencia de granulaciones Sí No

Presencia de vacuolas: Sí No

Características de la serie roja
.....
Patología/s probable/s
Observaciones:

Preparado N° 5:
Formas predominantes.....

Presencia de granulaciones	Sí	No
Presencia de vacuolas:	Sí	No

Características de la serie roja
.....
Patología/s probable/s
Observaciones:

2- OBSERVACIÓN DE FROTIS SANGUÍNEOS UTILIZANDO TINCIONES CITOQUÍMICAS REALIZADAS EN EL TP.

1-1. INFORME

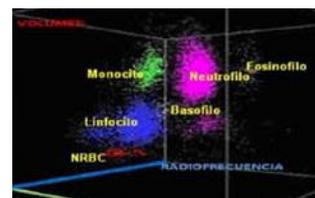


BIBLIOGRAFÍA

- HEMATOLOGÍA. FUNDAMENTOS Y APLICACIONES CLÍNICAS. BF Rodak, GA Fritsma y EM Keohane. 4ª Edición. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires 2014.
- MANUAL DE TÉCNICAS DE LABORATORIO EN HEMATOLOGÍA. JL Vives Corrons. 4ª Edición. Ed. Elsevier, España 2014.
- ATLAS DE HEMATOLOGÍA CLÍNICA. JH Carr y BF Rodak. 3ª Edición. Ed. Médica Panamericana, 2010.
- HEMATOLOGÍA CLÍNICA. J Sans-Sabrafen. 5ª Edición. Ed. Elsevier, España 2006.

TRABAJO PRÁCTICO N° 5

AUTOMATIZACIÓN EN HEMATOLOGÍA



OBJETIVOS

- Describir los principios generales del recuento automatizado de células en los contadores hematológicos.
- Identificar los parámetros que conforman el hemograma.
- Interpretar, a través de casos clínicos, los histogramas obtenidos en equipos automatizados.

INTRODUCCIÓN

El hemograma (biometría hemática) es uno de los análisis de laboratorio más solicitados y el que más aporta al clínico en la evaluación del paciente. La realización de hemogramas en forma manual (recuentos celulares en cámara, microhematocritos, determinación de hemoglobina) proporciona resultados válidos, pero están afectados por diversos factores como la variabilidad inherente al operador, las diluciones realizadas, la metodología de trabajo, entre otros. Sin embargo, los métodos tradicionales continúan siendo los de referencia.

A través del tiempo, el hemograma ha sido objeto de múltiples modificaciones en cuanto a los parámetros que lo componen, la forma de obtenerlos, los grados de precisión y exactitud, y la manera de interpretarlo. Los avances tecnológicos han conducido al desarrollo de contadores hematológicos (Wallace Coulter, 1953), los cuales presentan amplios menús de determinaciones, elevada complejidad electrónico-mecánica y mayor productividad en el procesamiento de muestras. De este modo, se han convertido en una poderosa herramienta en la orientación diagnóstica, pronóstica y terapéutica de los trastornos hematológicos.

Existen distintos tipos de instrumentos: los semiautomatizados que requieren algunos pasos previos (diluciones de la muestra antes de ser procesada), y los aparatos totalmente automatizados, a los que solo se les suministra la muestra obtenida en condiciones

apropiadas (ej: con el anticoagulante adecuado). No obstante, todos estos equipos exhiben un diseño mecánico y electrónico similar.

De acuerdo al grado de automatización, el hemograma se clasifica como: 1) *Primera generación*: cuadro hemático manual, 2) *Segunda generación*: cuadro hemático semiautomatizado, 3) *Tercera generación*: Cuadro hemático automatizado que presenta histogramas de distribución de tamaño de eritrocitos, leucocitos, y plaquetas y un recuento diferencial de glóbulos blancos y 4) *Cuarta generación*: cuadro hemático automatizado con histogramas de distribución de tamaño para eritrocitos, plaquetas y un histograma para leucocitos, a los que agrupa en cinco tipos de células, recuento de reticulocitos, otros índices (reticulocitarios, hemoglobina reticulocitaria, etc.).

Los equipos automatizados para recuentos celulares han sido diseñados teniendo en cuenta alguna de las características de las células: a) son malas conductoras de electricidad, b) tienen distinto tamaño y densidad, c) cada una refracta la luz con una intensidad diferente, d) poseen una composición histoquímica propia, y e) la relación núcleo-citoplasma es diferente para cada una. En base a ello, existen dos principios para el análisis automatizado:

- 1. Impedancia o resistencia eléctrica.**
- 2. Dispersión de luz o campo oscuro.**

En general, los componentes básicos de un contador hematológico son (Figura 1):

- *Diluidor*: sistema que reduce la concentración de las células sanguíneas y las suspende en soluciones conductoras isotónicas para adecuarla a las capacidades de medida del dispositivo.
- *Aspirador*: sistema que toma la muestra diluida y la conduce hacia el dispositivo de medida.
- *Sistema de fluidos*: transporta las suspensiones celulares hacia el dispositivo de medida o la cámara de recuento.
- *Cámara de recuento o dispositivo de medida*: constituye la parte central o zona sensible del equipo, donde ocurren los fenómenos ópticos, eléctricos o ambos, medidos posteriormente.
- *Transductor o detector*: son los dispositivos que generan linealmente pulsos eléctricos cuando las células pasan la zona sensible, óptica o eléctrica, del equipo.
- *Discriminador*: discrimina los pulsos eléctricos generados por los transductores en correspondencia con el tipo celular medido.

- *Amplificador*: amplifica la señal eléctrica que sale del discriminador para su posterior procesamiento.
- *Convertidor analógico-digital*: convierte las señales eléctricas en digitales.
- *Ordenador*: procesa las señales digitales y las convierte en datos que serán mostrados en pantalla y que pueden ser impresos.
- El *sistema electrónico* está diseñado para obtener los siguientes parámetros: índices hematimétricos, recuentos celulares, Hto, Hemoglobina y la representación grafica a través de histogramas.

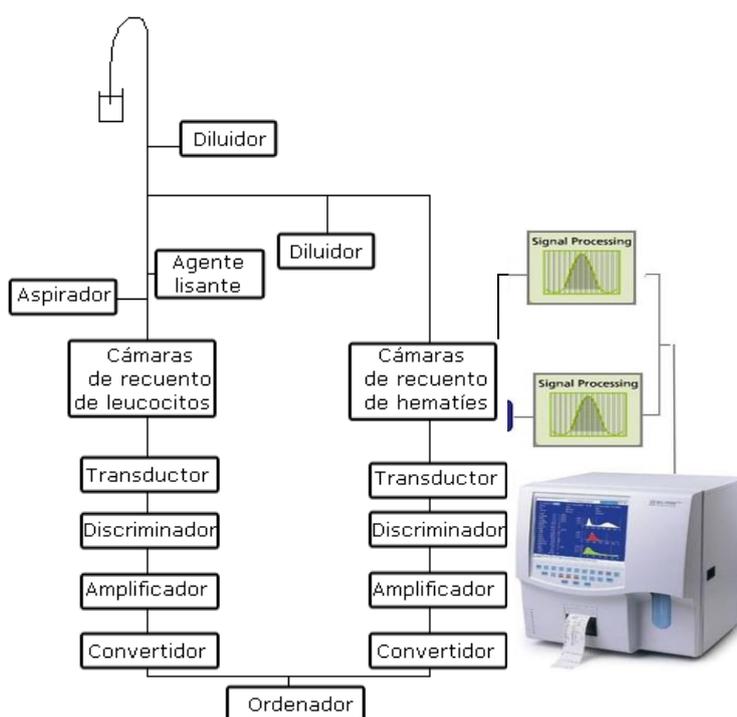


Figura 1. Componentes de un contador hematológico (Gonzalez de Buitrago, 2010).

1. Método de impedancia o de resistencia eléctrica

La impedancia eléctrica es la medida de la capacidad que tiene un objeto de oponerse al movimiento de una carga eléctrica y es el principio más empleado en los analizadores hematológicos.

La sangre total es diluida en una solución de conductividad estable y las células sanguíneas así diluidas se hacen pasar por un orificio de apertura con un área prefijada (Figura 2). Por dentro y fuera del orificio se disponen electrodos que establecen una diferencia de potencial. Cuando una célula pasa a través del orificio, se genera una resistencia entre ambos electrodos que se registra como un impulso. Este pulso se traduce en una caída del voltaje y su tamaño es proporcional al de la célula, así como el número

total de pulsos contados es igual al número de células en dilución. Permite realizar el recuento de glóbulos blancos $10^3/\text{mL}$, rojos $10^6/\text{mL}$ y plaquetas $10^3/\text{mL}$ (Figura 2).

Los impulsos se clasifican en canales distintos según su amplitud, son procesados electrónicamente, se evalúan en forma estadística y se diagraman como gráficos de distribución de frecuencias o **histogramas**. Cuando la curva no muestra una distribución normal el sistema envía alarmas indicando la zona de la curva alterada.

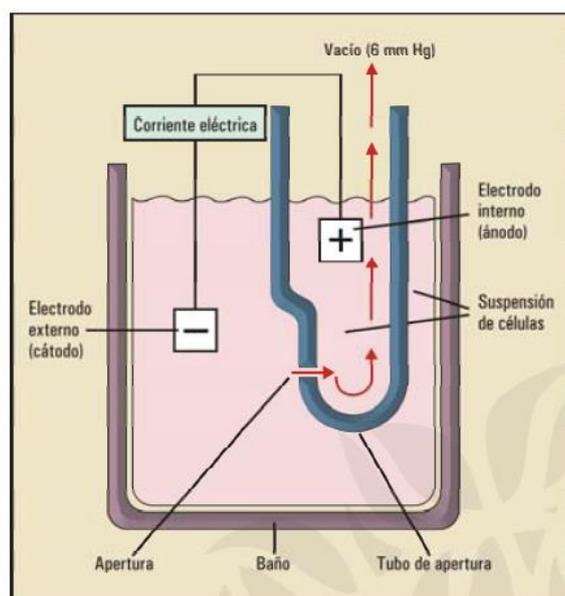
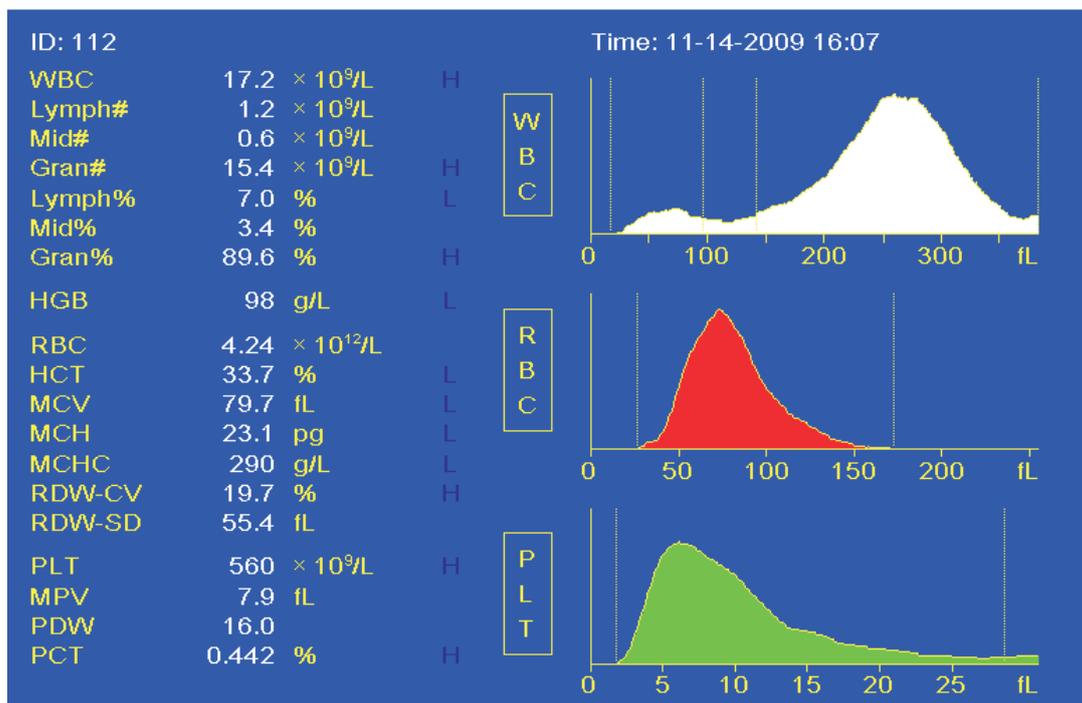


Figura 2. Principio de impedancia en un contador hematológico. El número de interrupciones (caídas de voltaje) es proporcional al número de partículas y la intensidad del voltaje es proporcional al tamaño de las mismas, que en el caso de los eritrocitos corresponde al volumen corpuscular medio (<https://www.medigraphic.com/medlab/myl-2007/myl011-12b.pdf>).

Las condiciones más importantes que se deben tener en cuenta son:

1. La intensidad de corriente entre ambos electrodos: debe ser lo suficientemente sensible para detectar la resistencia que genera la partícula cuando atraviesa el orificio. Si es muy elevada puede dañar las células y producir interferencias originadas por ruido electrotérmico.
2. El diámetro del orificio de apertura: debe estar en relación al tamaño de las partículas que se analizan. Debe ser perfectamente permeable, por lo general poseen un monitor de visualización que permite observar su permeabilidad durante el recuento. Es importante realizar periódicamente una limpieza de este orificio.
3. La concentración de la suspensión analizada: debe ser la adecuada para evitar el error de coincidencia, es decir, que varias células atravesen el orificio al mismo tiempo.

Informe gráfico de un Hemograma. Contador hematológico-principio de Impedancia (COUNTER 19)



2. Método de Dispersión de luz

Los equipos que emplean la tecnología de dispersión de luz son considerados como de cuarta generación y pueden utilizarse como metodología primaria o en combinación con otros métodos (Figura 3). El sistema permite hacer un mayor número de mediciones directas e informa por lo menos entre 22-24 parámetros en los equipos que incluyen recuento de reticulocitos.

En los sistemas de dispersión óptica (citómetros de flujo), se analiza la dispersión de luz producida por las células desde dos dimensiones a través de sensores ubicados en ángulos diferentes. A medida que las células circulan por la región sensora, a lo largo de una cámara de lectura, la luz (lámpara halógena de tungsteno o láser de helio y neón) impacta sobre ellas y se interrumpe el flujo lumínico unidireccional. La luz se irradia en todas las direcciones con ángulos de desvíos relativos a las características de la partícula (densidad y tamaño). A su vez, se generan procesos de absorción, difracción y de dispersión lumínica, que se convierten en señales eléctricas por fotomultiplicadores (FM) y en ángulos específicos. El número de pulsos generados determina el número de células y la cantidad de luz dispersada es proporcional al área celular, y por lo tanto, al volumen de

las células. La dispersión frontal de la luz (0°) o "*Forward Scatter*" se correlaciona con el volumen celular o el tamaño, debido sobre todo a la dirección de la luz. La dispersión ortogonal de la Luz (90°) o dispersión lateral "*Side Scatter*", es consecuencia de la refracción y la reflexión de la luz provenientes de las estructuras de mayor tamaño que se encuentran en el interior de la célula y se correlacionan con el grado de complejidad. La dispersión frontal de la luz en ángulo bajo (2 a 3°) y en ángulo alto (5 a 15°) también se relacionan con el volumen celular y el índice de refracción, o la complejidad interna, respectivamente (presencia de granulaciones, coloración, lobularidad nuclear, entre otros). De allí surge una dispersión diferencial que utilizan los sistemas H (Siemens), o los que utilizan los sistemas Cell-Dyn (Abbott), que generan histogramas o trazados de dispersión bidimensionales.

Sí, además, las células se someten a tinciones histoquímicas, se pueden detectar midiendo la intensidad de dicha reacción, los diferentes tipos de leucocitos (método de la peroxidasa, método de la basofilia, técnicas histoquímicas para determinar eosinófilos, etc).

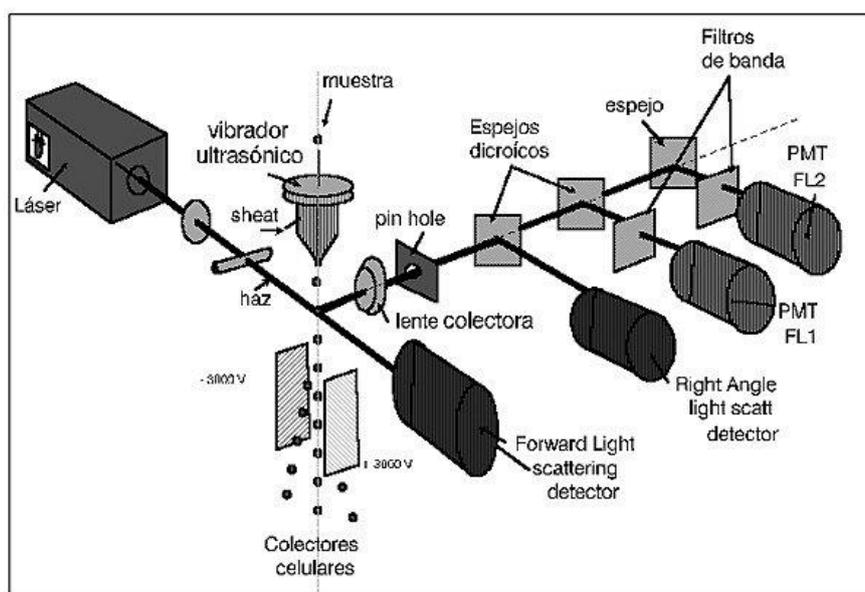


Figura 3- Principio de dispersión de luz en un contador hematológico (Vives, 2014).

La incorporación de una fuente de luz láser y la medición de su dispersión, de modo similar a la utilizada en las técnicas de citometría de flujo, ha conferido mayor calidad a las determinaciones y posibilitan la incorporación de nuevos índices hematimétricos a los ya existentes. En la actualidad, no todos los contadores cuentan con esta tecnología.

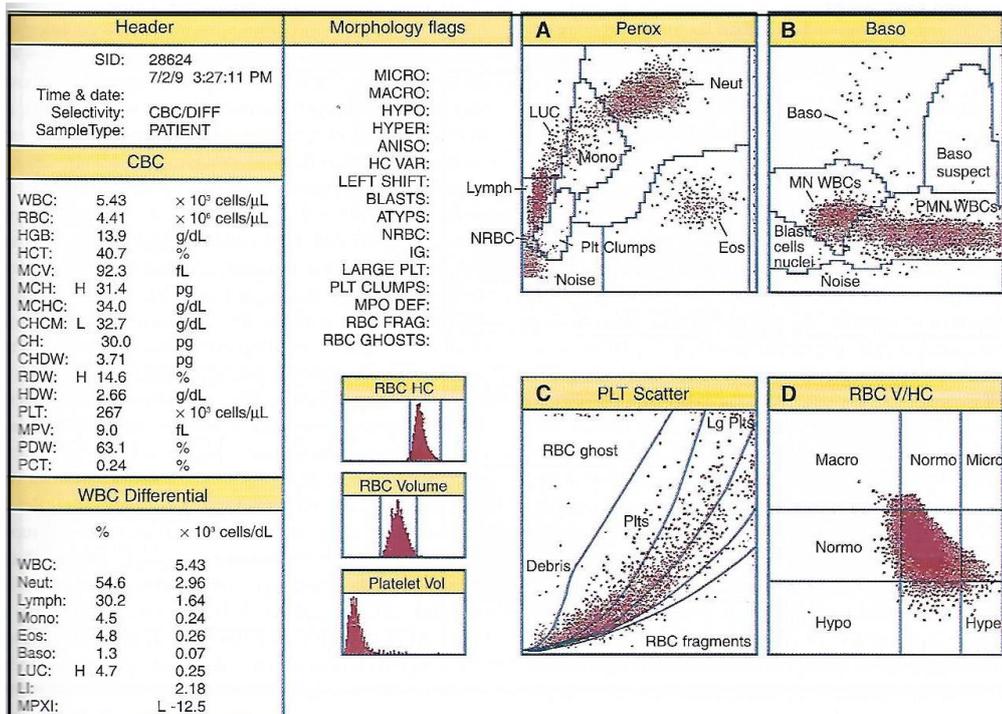
Los **recuentos automatizados de reticulocitos (Ret)** pueden determinarse en sangre total por citometría de flujo y, más recientemente, en los autoanalizadores de

hematología incorporados como un parámetro en los hemogramas de cuarta generación. El fundamento de los autoanalizadores es la sustitución del criterio morfológico inherente al método visual por el análisis cuantitativo del contenido eritrocitario en ARN. Para ello, los diferentes sistemas combinan diversos colorantes o fluorocromos con el ARN de los Ret, que incluyen la Auramina O (Sysmex), naranja de tiazol (ABX), CD4K530 (Abbott) y el colorante CPO (Coulter) mientras que los colorantes no fluorescentes son la oxazina 750 (Bayer-Technicon) y el azul de metileno (Beckman-Coulter, Abbott).

Los instrumentos automatizados proporcionan una medida de los diversos grados de maduración de los Ret, ya que los Ret más inmaduros producidos cuando los niveles de eritropoyetina están elevados, tienen más ARN y emite una fluorescencia más fuerte que los Ret maduros presentes en la sangre periférica. De esta forma, proveen una clasificación de los Ret según la intensidad de de fluorescencia o grado de maduración: fluorescencia baja, mediana y alta. La suma de la fluorescencia media y alta se conoce como *Fracción de Reticulocitos Inmaduros (FRI o IRF)* y es un parámetro que refleja la actividad eritropoyética de la médula ósea.

Valores de Referencia	
Ret. Absolutos:	68,25 ± 46,24 x 10 ³ /mm ³
FRI:	0,26 ± 0,07

Informe gráfico de un Hemograma. Contador hematológico- Dispersión de Luz (ADVIA 120)



Información gráfica relacionada con los hemogramas electrónicos

Los hemogramas automatizados además de la información relacionada con las mediciones, cálculos y alarmas, aportan información adicional gráfica cada vez más compleja, como histogramas, dispersogramas y citogramas. Los diferentes parámetros dependen de la tecnología del contador.

PARÁMETROS	ABREVIATURA	TIPO MEDICIÓN
Eritrocitarios		
Recuento total glóbulos rojos	RBC	Directa
Hemoglobina *	HGB	Directa
Hematocrito	Hct	Cálculo
Ancho Distribución Eritroide	RDW	Cálculo
Volumen Corpuscular Medio	MCV	Directa
Hemoglobina		
Hemoglobina Corpuscular Media	MCH	Cálculo
Conc. Hemoglobina Corpuscular Media	MCHC	Cálculo
Reticulocitos		
Porcentaje de Reticulocitos	Ret	Directo
Recuento absoluto de Ret	Ret	Directo
Volumen Corpuscular Medio Ret	VCMr	Directo
Hb corpuscular media Ret	HCMr	Directo
Conc. Hb corpuscular media Ret	CHCMr	Cálculo
Amplitud de la distribución de ret	ADEr o RDWr	Directo
Índice Ret Inmaduros		Directo
Leucocitarios		
Recuento total de Leucocitos	WBC	Directa
Recuento diferencial de leucocitos	WBC	Directa
Plaquetarios		
Recuento total plaquetas	Plt	Directa
Volumen Plaquetario Medio	MPV	Directa
Plaquetocrito	Pct	Cálculo
Ancho Distribución Plaquetaria	PDW	Cálculo
Plaquetas reticuladas (inmaduras)		Directa

*La hemoglobina liberada de los hematíes lisados es determinada por su conversión a HiCN.

ÍNDICES HEMATIMÉTRICOS

Wintrobe introdujo cálculos para determinar el tamaño, contenido y concentración de Hb de los GR. (Más información en el TP N° 2)

VCM: volumen corpuscular medio. Es el volumen promedio de los GR y se calcula a partir del Hto y el cómputo de GR. VR: VCM: 80-99 fL

$$\text{VCM (femtolitros)} = \frac{\text{Hto (L/L)}}{\text{N}^\circ \text{ GR (unidades SI)}}$$

Ej: Hto: 0,45; GR: 5×10^{12} L VCM: $0,45/5 \times 10^{12}$: 90×10^{-15} litros: 90 fL

HCM: hemoglobina corpuscular media. Es el contenido de hemoglobina (peso) en el promedio de eritrocitos. Se calcula a partir de la concentración de Hb y el recuento de GR.

VR: HCM: 26-33 pg

$$\text{HCM (picogramos)} = \frac{\text{Hb (g/L)}}{\text{N}^\circ \text{ GR (unidades SI)}}$$

CHCM: concentración corpuscular media de la hemoglobina. Es la concentración media de la Hb en un volumen determinado de eritrocitos. Se calcula a partir de la concentración de Hb y del Hto. VR: CHCM: 32-36 g/dL

$$\text{CHCM (g/dL)} = \frac{\text{Hb (g/dL)}}{\text{Hto (L/L)}}$$

En los autoanalizadores que utilizan impedancia eléctrica los índices se calculan en forma un tanto diferente: el VCM se determina a partir de la altura media de los impulsos de voltaje formados durante el recuento de GR, se mide colorimétricamente Hb, y el Hto, la HCM y CHCM se calculan.

Otros índices que se incorporan a los autoanalizadores:

- Amplitud de la distribución eritrocitaria (ADE) o RDW (Red Cell Distribution Width): Es una medida de la variabilidad del tamaño de los GR. Es una estimación de la anisocitosis eritrocitaria. Parámetro útil en el diagnóstico diferencial entre anemia ferropénica y talasemia. (VR: 11-14%).

$$\text{ADE (\%)} = \frac{\text{CV(\%)} \text{ GR}}{\text{N}^\circ \text{ GR}}$$

- **Ancho de distribución del volumen plaquetario (PDW):** Este parámetro puede ser usado para determinar el recuento de plaquetas así como para medir el volumen medio de la plaqueta y la anisocitosis plaquetaria.

- **Recuento de reticulocitos automatizado:** se detalla en pag 74.

En individuos sanos la variación es muy pequeña en cualquiera de los índices (no más de ± 1 unidad). Las variaciones de los valores de referencia son útiles para poder caracterizar los tipos morfológicos de anemia. En las **anemias microcíticas** los índices pueden ser tan bajos como VCM: 50 fL, HCM: 15 pg, CHCM: 22 g/dL. El VCM y el RDW juntos, permiten diferenciar entre una talasemia heterocigota no complicada (VCM bajo y RDW normal) de una anemia ferropénica (VCM normal o bajo y RDW elevado).

En las **anemias macrocíticas** los valores pueden llegar hasta VCM: 150 fL, HCM: 50 pg, pero la CHCM es normal o reducida. La CHCM aumenta de forma característica sólo en la esferocitosis, y raramente supera los 38 g/dL.

HISTOGRAMA

Son gráficas de frecuencias de volúmenes celulares representados en el eje X (femtolitros- fL) en función de un número relativo representado en el eje Y. En condiciones normales, en el informe se muestran curvas cóncavas o cóncavas, que en su mayoría son modales, excepto la de las plaquetas.

- HISTOGRAMA DE LA SERIE ERITROCITARIA

La curva normal de glóbulos rojos es cóncava, modal y se encuentra representada en tamaños de 50 a 130 fL, con una curva secundaria (dedo), ligeramente cóncava con muy poca altura que va desde 130 a 185 fL (eritrocitos aglutinados o artefactos). Figura 4.

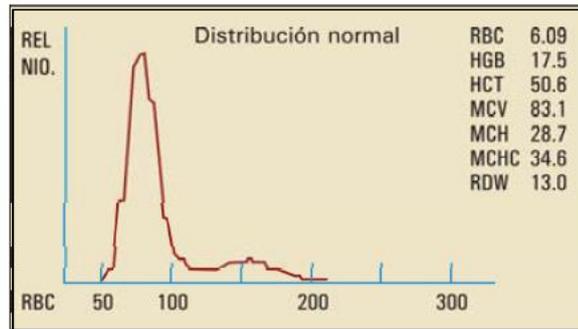
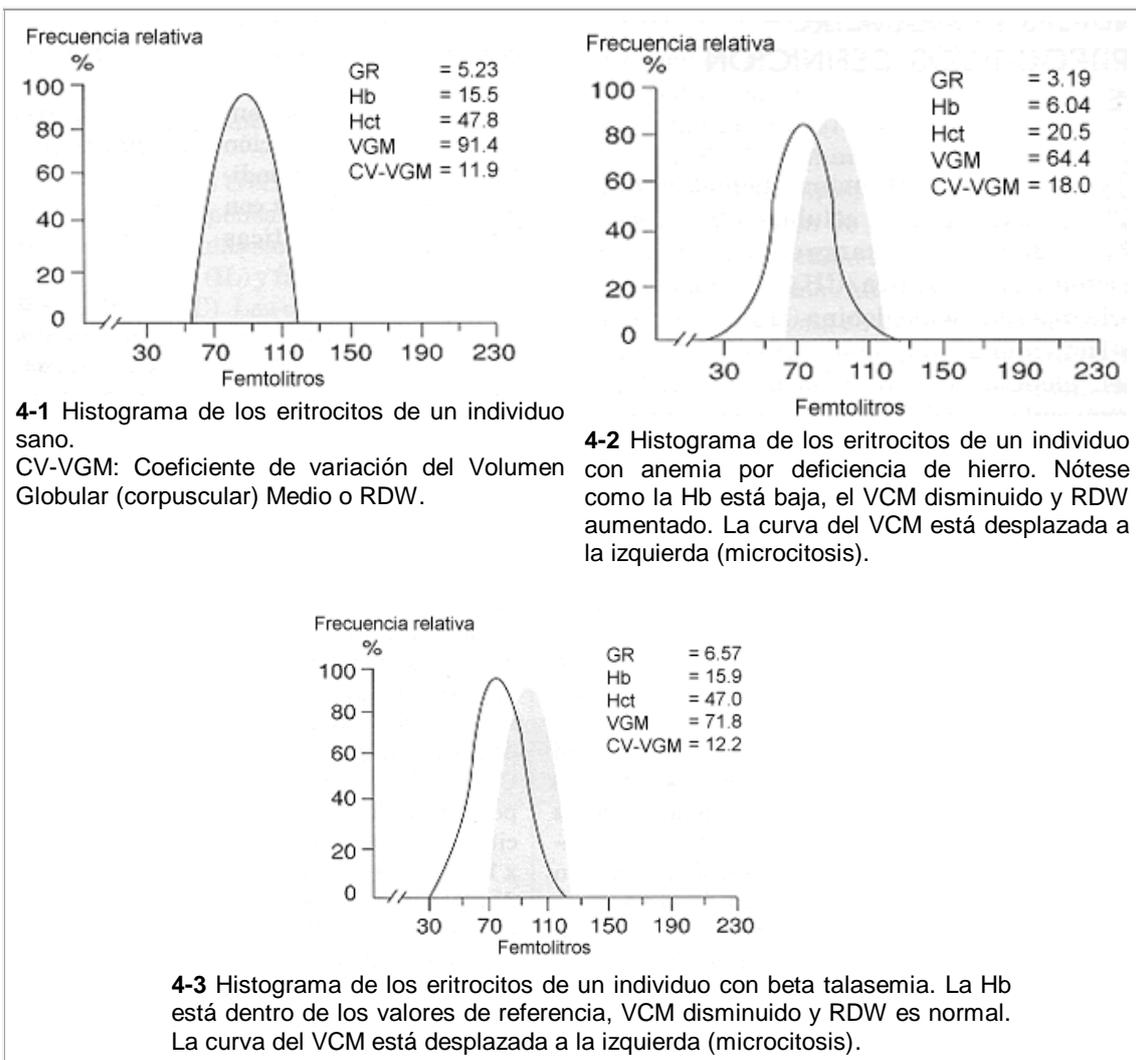
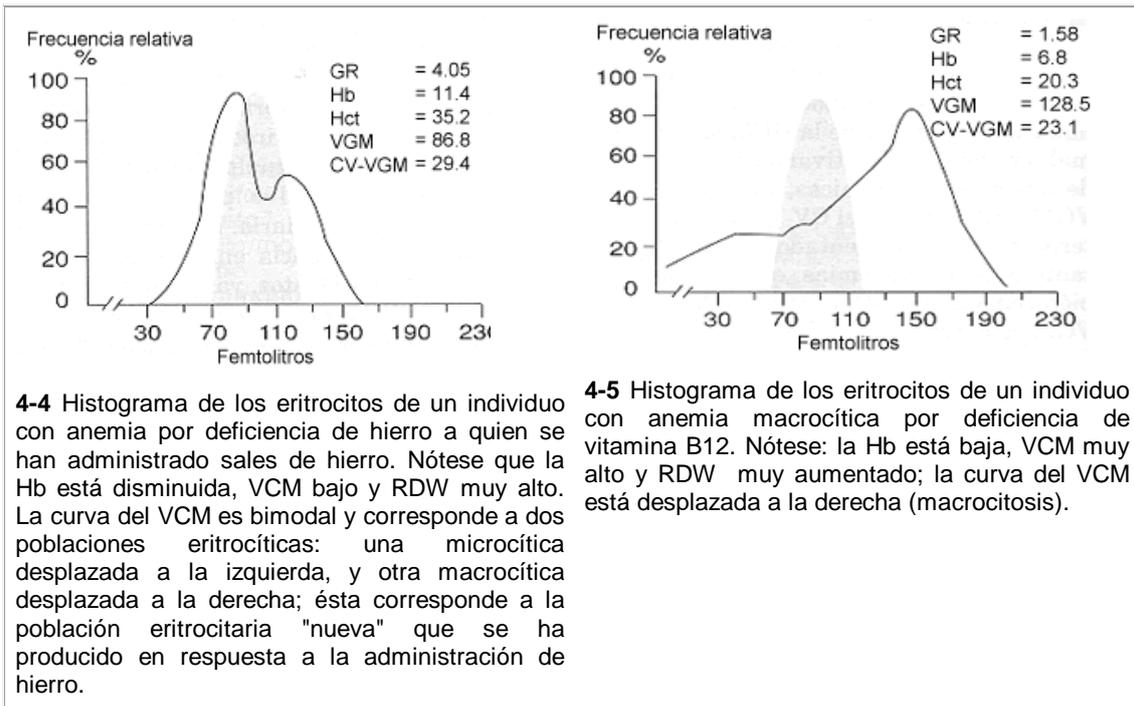


Figura 4. Histograma de eritrocitos en el hemograma obtenido por el principio de impedancia. A la izquierda se observa el cuerpo del histograma. En el extremo derecho están los parámetros del eritrograma como los reporta el instrumento: RBC (*red cell count*) en millones por μL , HGB (*hemoglobina*) en g/dL , HCT (*hematocrit*) en %, MCV (*mean corpuscular volume*) en fL , MCH (*mean corpuscular hemoglobin*) en pg , MCHC (*mean corpuscular hemoglobina concentration*) en g/dL y RDW (*red cell distribution width*) en %.

Interpretación de Histograma de eritrocitos





- HISTOGRAMA DE LEUCOCITOS

Para el recuento de leucocitos, los reactivos utilizados provocan la lisis de los GR y crean poros en las membranas de los GB ocasionando una difusión lenta del citoplasma, de modo que la membrana se adhiere al núcleo: se mide volumen nuclear (femtolitros, fL), clasificando a los leucocitos en tres poblaciones: (Figura 5)

- Menor tamaño (cónica): linfocitos (45-90 fL).
- Zona media (plana a cóncava): monocitos, eosinófilos, basófilos y blastos (90-160 fL).
- Mayor tamaño (cóncava): neutrófilos, cayados, metamielocitos, mielocitos, eosinófilos (160-450 fL).

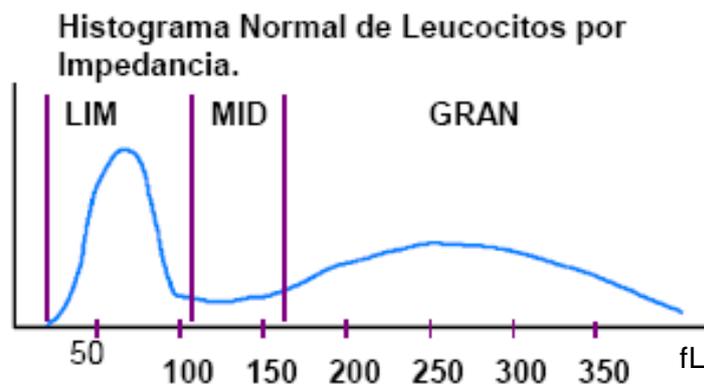
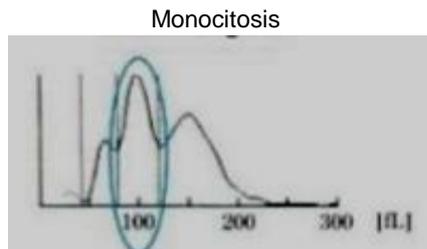
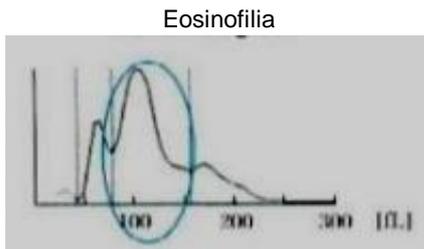
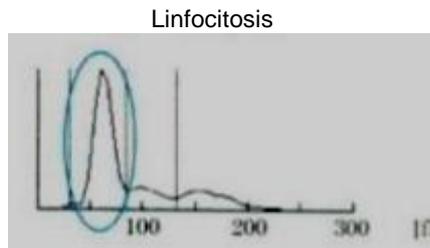
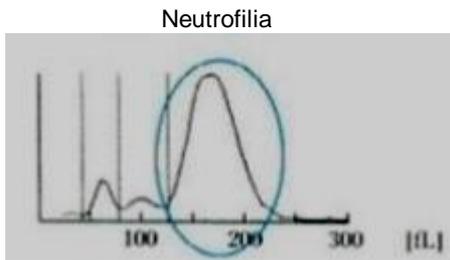
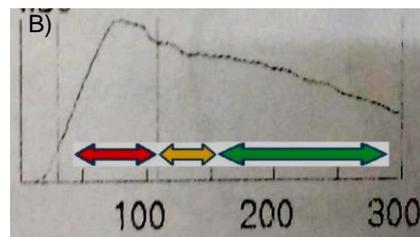
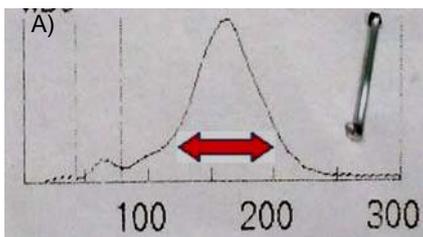


Figura 5. Recuento relativo de leucocitos. LIM (linfocitos, células pequeñas), MID (células medianas o mixtas: eosinófilos, monocitos, basófilos y blastos) y GRAN (células grandes: neutrófilos e inmaduros). (Rodak, 2014).

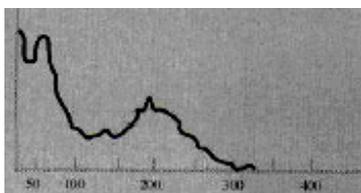
Ejemplos de alteraciones en el histograma de leucocitos



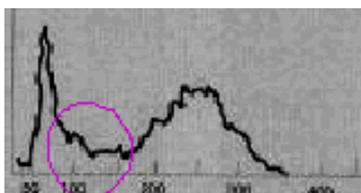
Diferentes tipos de curvas de distribución de GB en caso de: neutrofilia, linfocitosis, eosinofilia y monocitosis (<https://www.slideshare.net/imtiazamc/interpretaion-of-hemogram>).



Histograma de GB. A) la flecha roja indica la acumulación de mielocitos de una leucemia mieloide crónica. B) las células blásticas se muestran en una flecha roja, los basófilos corresponden a la flecha amarilla y las células en varias etapas de la maduración mieloide se señalan en una flecha verde (<https://www.slideshare.net/imtiazamc/interpretaion-of-hemogram>).



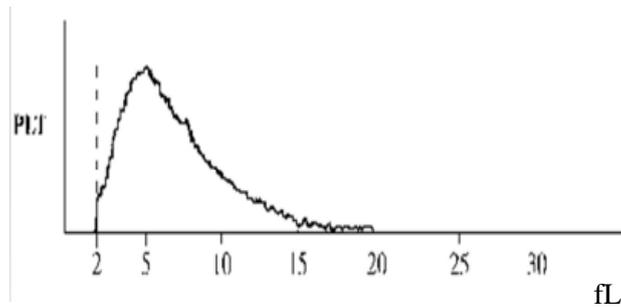
Histograma de GB característico de muestras que poseen restos de células de menor tamaño que un linfocito pequeño (macroplaquetas, agregados plaquetarios, eritroblastos, gametocitos de plasmadium).



Histograma GB con una distribución alterada en la porción derecha de la curva de linfocitos que puede ser ocasionada por linfocitos atípicos, aumento del número de monocitos o de linfocitos grandes como células NK. (<https://www.slideshare.net/imtiazamc/interpretaion-of-hemogram>)

- HISTOGRAMA DE PLAQUETAS

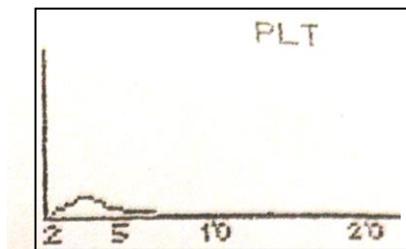
La curva normal de plaquetas es cónica, sin distribución normal y con una representación amplia en tamaños que va de 2 a 20 fL. Dado que el recuento de plaquetas se realiza en la dilución en la misma de los glóbulos rojos, el equipo realiza un doble recuento de plaquetas, disminuyendo de esta forma el coeficiente de variación. Las partículas mayores de 50 fL se cuentan como hematíes.



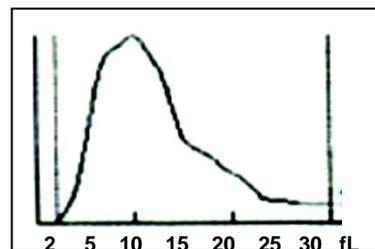
Histograma de Plaquetas (<https://www.slideshare.net/imtiazamc/interpretaion-of-hemogram>).

Ejemplos de alteraciones en el histograma de plaquetas

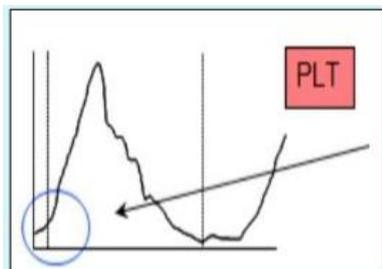
(<https://www.slideshare.net/imtiazamc/interpretaion-of-hemogram>).



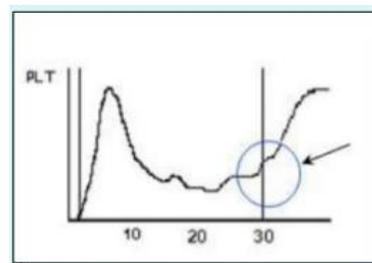
Plaquetopenia



Número de plaquetas aumentado y presencia de macroplaquetas.



Fragmentos celulares, agregación plaquetaria, contaminación.



Fragmentos GR, sangre coagulada, microeritrocitosis, agrupación de plaquetas y plaquetas grandes.

Causas de error en el recuento automatizado

Con el empleo de métodos automatizados se puede cometer errores si se olvida de realizar el control periódico y la calibración diaria de los instrumentos. En general, el error debido al propio método de recuento electrónico, cuando se procede en condiciones óptimas, suele ser inferior al 1%, pero puede incrementarse por:

1. Errores de extracción: dilución o hemoconcentración. Coagulación parcial. Hemólisis.
2. Mala homogeneización por agitación insuficiente de la sangre.
3. Uso de un diluyente incorrecto.
4. Presencia de partículas extrañas en el diluyente.
5. Defectos en el sistema electrónico de recuento:
 - a) Lisis incompleta de los eritrocitos en el orificio de leucocitos.
 - b) Presencia de agregados celulares a nivel del orificio de recuento.
 - c) Obstrucción de los capilares u orificios de recuento.
 - d) Dilución incorrecta de la muestra con el líquido diluyente.
 - e) Presencia de microburbujas, que son contadas como células.
 - f) Contaminación por arrastre de un espécimen con el siguiente (carry-over).
 - g) Presencia de interferencias electrónicas y averías de los componentes electrónicos del instrumento.

Alarmas e indicadores en un Contador Hematológico

Todos los instrumentos producen alarmas diseñadas para alertar al operador sobre circunstancias en las cuales las mediciones pueden no ser confiables o en las que puede haber presencia de células anormales, como blastos o eritrocitos nucleados en sangre periférica, y por lo tanto amerita la visualización microscópica del extendido de sangre periférica.

Indicadores en el histograma:

- Histogramas de Leucocitos:
 - R1: indica anomalías en el lado izquierdo de la protuberancia de linfocitos y la posible presencia de trombocitos, megatrombocitos, glóbulos rojos con núcleo, glóbulos rojos insolubles, residuos de proteínas y lipoides en la muestra o ruido eléctrico.
 - R2: indica anomalías entre la protuberancia de linfocitos y el área de células de tamaño medio, así como la posible presencia de linfocitos o plasmocitos de carácter anormal, linfocitos atípicos, granulocitos originales en la muestra, eosinofilia o basofilia.
 - R3: indica anomalías en el área de células de tamaño medio y los granulocitos, así como la presencia de granulocitos inmaduros o una subpoblación anormal en la muestra o bien eosinofilia.
 - R4: indica anomalías en el lado derecho de la protuberancia de granulocitos y neutrofilia.
 - Rm: indica, como mínimo, la presencia de dos indicadores R.

• Histogramas de plaquetas:

- Pm: indica la demarcación difusa entre el área de glóbulos rojos y de trombocitos, así como la posible presencia de trombocitos de gran tamaño, coagulación de trombocitos, glóbulos rojos de pequeño tamaño, fibrina o residuos celulares.
- Ps: indica PLT excesivamente pequeñas.
- PL: indica PLT excesivamente grandes.

Limitaciones debidas a la muestra

Entre las limitaciones debidas a los problemas inherentes a la muestra se incluye la presencia de factores como crioaglutininas, ictericia y lipemia. El examen detallado de los histogramas y citogramas de los equipos puede brindar indicios de esta alteración. Las crioaglutininas se presentan como un patrón clásico con VCM aumentado (mayor de 130 fL), recuento de eritrocitos notablemente disminuidos y CHCM aumentada (> 40 g/dL). La ictericia y la lipemia afectan la medición de Hb y los índices relacionados.

La automatización en el laboratorio de hematología requiere la evaluación crítica de los métodos. Los sistemas de control de calidad deben reflejar los requerimientos de calidad por el laboratorio y garantizar que el equipo trabaja dentro de sus límites especificados.

CONTROL DE LA CALIDAD EN HEMATOLOGÍA

“La garantía de calidad analítica de un laboratorio clínico se logra mediante un sistema de control de calidad interno complementado por un programa de evaluación externa”.

Los conceptos sobre Control de Calidad en el Laboratorio Clínico se detallan en la Guía de TP de Bioquímica Clínica I, Edición 2018 - ISSN 2545-7683).

PROBLEMAS Y CASOS CLINICOS

- 1- ¿Qué índices hematimétricos corresponderían a las siguientes morfologías eritrocitarias?
- macroцитos normocrómicos.
 - microцитos hipocrómicos.
- 2- De las siguientes anomalías ¿cuáles deben ser informadas al realizar la fórmula porcentual relativa?
- presencia de granulaciones tóxicas.
 - presencia de granulocitos polilobulados.
 - presencia de macroplaquetas.
 - presencia de linfocitos estimulados.
- 3- ¿Con qué informe de la Serie Roja son compatibles los siguientes índices hematimétricos: VCM: 90 fL, HCM: 25 pg, CHCM: 31 g/dL, RDW: 15,3%?
- anisocitosis (++) , con microцитosis (++) y macroцитosis (+).
 - anisocitosis (+) , con hipocromía (+).
- 4- Un paciente adulto gastrectomizado hace 8 años, sin tratamiento, presenta los siguientes datos de laboratorio:
- | | | | |
|-------------------------------|------------------------------------|----------|-----------|
| GR: 2.000.000/mm ³ | Hb: 6,5 g/dL | Hto: 21% | Ret: 0,2% |
| GB: 1.500/mm ³ | Plaquetas: 105.000/mm ³ | | |
- Indique la probable etiología.
 - ¿Qué características espera encontrar en la morfología de los GR?
 - ¿Cómo espera encontrar los índices hematimétricos?
- 5- Una mujer de 45 años presenta metrorragias desde hace largo tiempo. Usted espera encontrar:
- un hemograma con anemia de moderada a severa, GB y plaquetas normales, GR microcíticos e hipocrómicos.
 - un hemograma con anemia leve, leucocitosis con desviación a la izquierda del índice de Schilling, GR macrocíticos e hipocrómicos.
 - un hemograma con anemia moderada a severa, con GR normocíticos y normocrómicos.

6- Mujer de 42 años, sin antecedentes patológicos de interés, concurre al laboratorio para realizarse una rutina para control laboral. La paciente no refiere sintomatología, no presenta cambios en el hábito intestinal y describe menstruaciones irregulares (4-5 días cada 14-28 días). En la exploración física destaca una palidez cutáneo-mucosa. Se observa el siguiente hemograma: GB: $8.140/\text{mm}^3$, Hb: 6,8 g/dL, Hto: 20%, VCM: 58 fL, HCM: 16,2 pg, Plaquetas: $527.000/\text{mm}^3$, Ret: 0,1%.

- a) ¿Cuál es el diagnóstico probable?
- b) ¿Qué índices hematimétricos espera encontrar alterados?
- c) ¿Se trata de una anemia regenerativa o arregenerativa? ¿Qué parámetro del hemograma le permite responder a esta pregunta?
- d) ¿Qué análisis complementarios debería solicitar el médico para confirmar el diagnóstico?

7- Mujer gestante, con embarazo de 30 semanas controlado, sin patologías, ingresa a maternidad con trabajo de parto avanzado. Se asiste al recién nacido (RN) que nace en buenas condiciones pesando 900 g.

En el hemograma del RN se observa una disminución marcada en la altura de la curva del histograma de plaquetas. Hemocultivo: negativo. Se inicia tratamiento con ampicilina/gentamicina por 5 días.

Hemograma 5° día: se observa un con desviación a la izquierda en el índice de Schilling y neutrofilia. Los valores de plaquetas no se modifican con respecto al hemograma inicial. Hemocultivo: positivo para *Staphylococcus epidermidis*. Se inicia tratamiento con cloxacilina/amikacina.

Hemograma 8° día de tratamiento: normal.

- a) ¿Qué valores de plaquetas espera observar en el primer hemograma?
- b) ¿Qué alteraciones espera encontrar en el histograma de leucocitos obtenido en el segundo hemograma?

8- Una mujer de 45 años de edad concurre al laboratorio para realizarse un estudio de anemia detectada en un preoperatorio por quistes de ovario. La paciente no presentaba anemia y en la exploración no se encontró ningún hallazgo significativo.

En el hemograma se observan leucocitos y plaquetas normales, Hb: 11,8 g/dL, VCM: 81 fL, CHCM: 37,1 g/dL, reticulocitos: 8,5%. Otras determinaciones: bili total: 2 mg/dL, Bili Indirecta: 1,75 mg/dL, ferremia, transferrina y ferritina dentro de los valores de

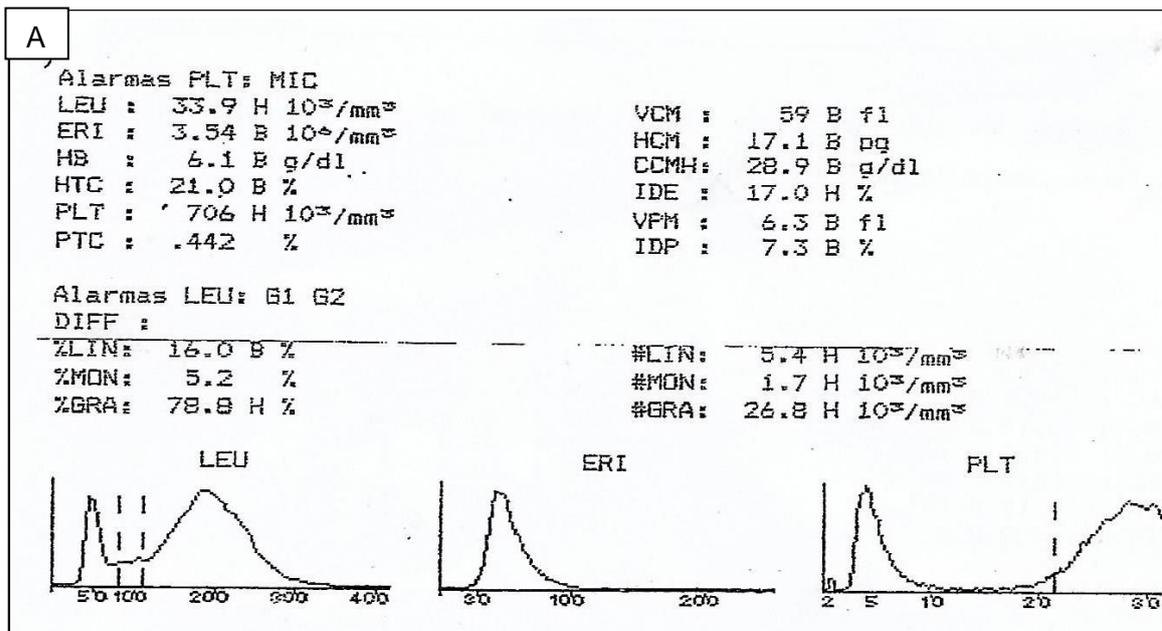
referencia, haptoglobina: disminuída, Coombs directa: negativa, resistencia osmótica: disminuída.

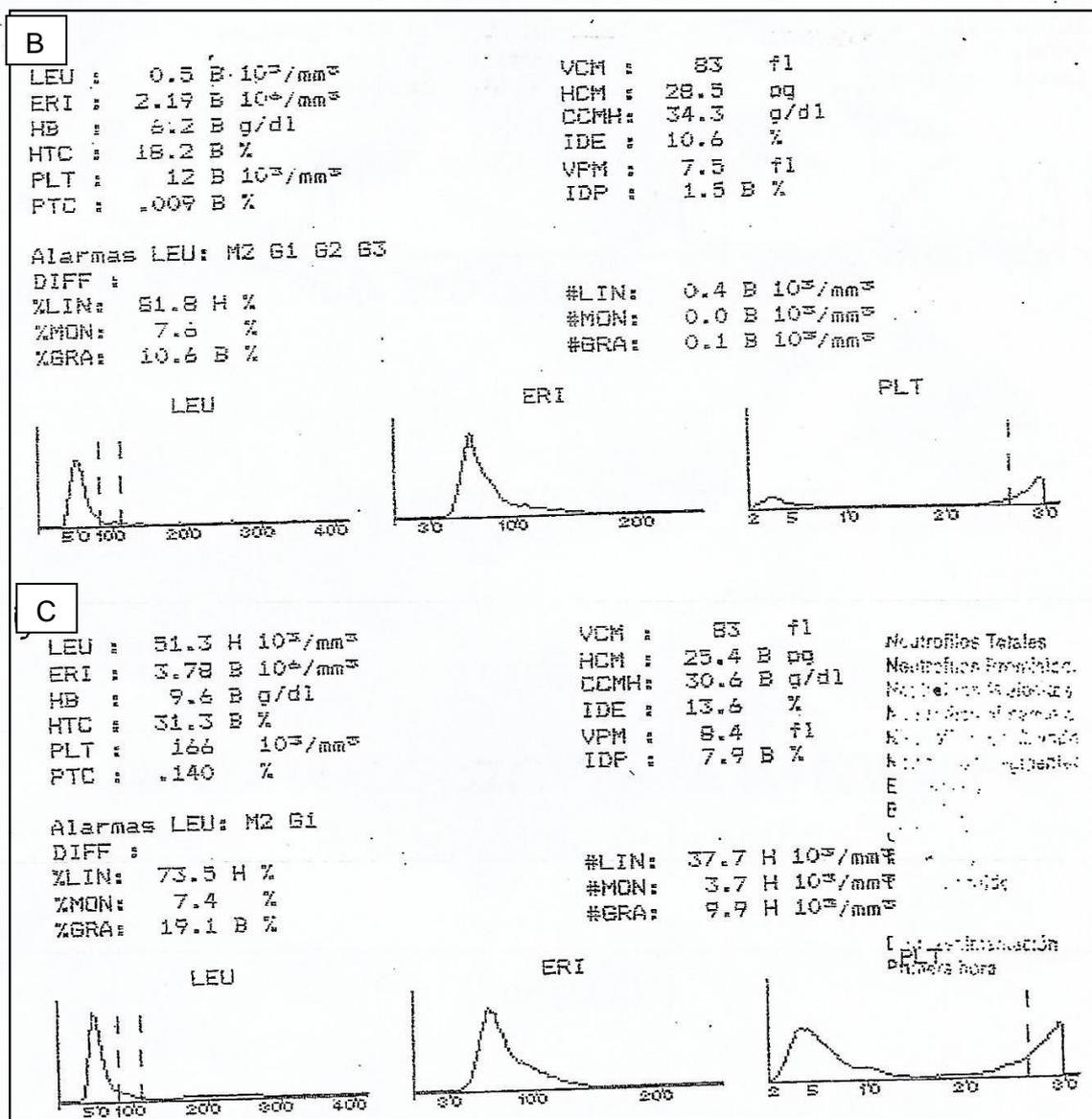
- a) ¿Cuál es el diagnóstico probable?
- b) ¿Qué espera observar en el frotis de sangre periférica?

9- Paciente con eosinofilia periférica ($>1500/\text{mm}^3$) de más de 6 meses, con ausencia de causa que justifique la eosinofilia, fibrosis endocárdica y esplenomegalia. Se trata de:

- a) Una Leucemia Eosinofílica Crónica o un Síndrome Hipereosinofílico Reactivo? **JSR**
- b) Características del frotis sanguíneo.
- c) Dibuje el Histograma.

10- Resolver los siguientes Casos Clínicos mediante los informes obtenidos del autoanalyzer Hematológico.





BIBLIOGRAFÍA

- PREGRADO DE HEMATOLOGÍA. JM Moraleda Jiménez 4ª Edición. Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia, Madrid 2017.
- HEMATOLOGÍA. FUNDAMENTOS Y APLICACIONES CLÍNICAS. BF Rodak, GA Fritsma y EM Keohane. 4ª Edición. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires 2014.
- EL LABORATORIO EN EL DIAGNOSTICO CLINICO. JB HENRY. 20ª Edición. Ed. Marbán, 2010.
- ATLAS DE HEMATOLOGÍA CLÍNICA. JH Carr y BF Rodak. 3ª Edición. Ed. Médica Panamericana, 2010.
- HEMATOLOGÍA CLÍNICA. J Sans-Sabrafen. 5ª Edición. Ed. Elsevier, España 2006.

TRABAJO PRÁCTICO N° 6

HEMOSTASIA



OBJETIVOS

- Diferenciar los procesos que forman parte de la hemostasia.
- Distinguir los componentes de las vías de coagulación intrínseca y extrínseca.
- Conocer las pruebas de laboratorio que se utilizan para evaluar ambas vías y saber interpretar los resultados en condiciones fisiológicas y patológicas.
- Resolver e interpretar casos clínicos en base a datos aportados a partir de estudios de coagulación.

INTRODUCCIÓN

El sistema hemostático constituye, junto al sistema inflamatorio y el inmune, un activo y dinámico mecanismo de defensa del organismo. Su función es mantener permeable la luz vascular, restablecerla en caso de obstrucción por un fenómeno trombótico y reparar la lesión en la pared del vaso para impedir una excesiva pérdida sanguínea.

Ante una agresión vascular, se produce la activación de los procesos de hemostasia y coagulación, que dependen de una compleja interacción entre diversos factores como la dinámica del flujo sanguíneo, el pH y la temperatura del medio, los componentes de la pared vascular, las plaquetas y proteínas plasmáticas y tisulares (factores de coagulación).

El resultado fisiológico de esta interacción es la formación del *tapón hemostático* y del *coágulo sanguíneo*, constituidos por una acumulación inicial de *plaquetas* y por la formación de una malla de proteínas insoluble, la *fibrina*, que engloba a otros elementos formes de la sangre. La formación de fibrina se debe a la acción de una enzima proteolítica que alcanza un papel esencial, la *trombina*. Se requiere, al mismo tiempo, mecanismos que controlen la formación de la fibrina. Para ello, el organismo dispone de dos líneas fundamentales: a) la inactivación de la trombina en el propio plasma, por una serie de factores endoteliales y plasmáticos y b) el proceso de la fibrinólisis, que evita el desarrollo indefinido del trombo como consecuencia de la activación de una enzima fibrinolítica, la *plasmina*. Los procesos antes mencionados se acompañan de un complejo sistema de

inhibidores fisiológicos y dispositivos de control que permiten delimitar cualquier activación excesiva o inadecuada de la hemostasia.

Cualquier falla en los mecanismos que intervienen en el control de la hemostasia puede generar un trastorno hemorrágico con sangrados anormales, o un evento tromboembólico por la formación de un coágulo en el compartimento intravascular. Las patologías relacionadas con el sistema hemostático poseen una alta relevancia clínica; la formación de un trombo es la principal causa de muerte en el mundo occidental, ya sea por un infarto de miocardio o por un evento isquémico cerebral. También un trombo, pero en este caso en territorio venoso (tromboembolismo de pulmón), es la primera causa de muerte en pacientes internados y en cualquier tipo de cirugía.

El mecanismo hemostático puede esquematizarse como constituido por pasos consecutivos (Figura 1), aunque en realidad se trata de eventos simultáneos y que ocurren en forma explosiva. Históricamente, se ha utilizado el modelo clásico, actualmente reconocido como una simplificación del modelo celular, pero muy útil para la interpretación de las pruebas de hemostasia desarrolladas en el laboratorio.

Hemostasia primaria	Hemostasia secundaria	Fibrinólisis
Vasoconstricción (inmediata)	Activación de los factores de coagulación	Activación de la fibrinólisis (minutos)
Adhesión plaquetaria (segundos)	Formación de malla de fibrina (minutos)	Lisis del coágulo (horas)
Agregación plaquetaria (minutos)		

Figura 1. Etapas del proceso hemostático. Ceresetto JM. Fisiología de la hemostasia normal. Hematología 2017; 21: 4-6.

FISIOLOGÍA DE LA HEMOSTASIA

Ante una lesión vascular, se producen sucesivamente tres fases: 1) Fase vascular, 2) Fase endotelial-plaquetaria y 3) Fase de la coagulación plasmática. La primera fase se inicia rápidamente (en décimas de segundo) con una respuesta vasoconstrictora de la pared vascular por estimulación directa de los nervios simpáticos, con el fin de disminuir el flujo sanguíneo y facilitar la adhesión plaquetaria. La segunda fase provoca la formación de un tapón inestable de plaquetas (3-5 min) y la vasoconstricción por estímulos químicos, a partir de sustancias vasoconstrictoras liberadas desde la plaqueta. La última fase corresponde a la activación proteolítica de factores plasmáticos que conducen a la formación de trombina, la cual actuando sobre el fibrinógeno dará lugar a la formación de fibrina. La estabilización y fijación del coágulo ocurre en 5-10 min.

Endotelio

La célula endotelial tiene una participación importante en la hemostasia debido a que en su superficie se desarrollan reacciones de coagulación, se sintetizan y segregan sustancias y está en contacto con el subendotelio. Las sustancias que sintetiza y segrega se dividen en 2 grandes grupos: *procoagulantes*, como trombospondina, factor tisular (FT), fibronectina, factor von Willebrand (FvW), factores relacionados con el sistema contacto, factor V; y *anticoagulantes*, como trombomodulina, receptor para la antitrombina, activador tisular del plasminógeno, prostaciclina (PGI₂), entre otros.

La integridad vascular es un elemento crucial e indispensable para impedir la activación del sistema hemostático. La pérdida de la continuidad endotelial expone una superficie trombogénica como el subendotelio vascular, a elementos celulares de la sangre, especialmente plaquetas, iniciando la interacción plaqueta-subendotelio.

Plaquetas

Las plaquetas son elementos anucleados, de 2 a 3 μm de diámetro, generados en médula ósea por fragmentación de los megacariocitos, con un tiempo de vida media de entre 7 y 10 días. El intervalo de referencia de las plaquetas es de $150-400 \times 10^9/\text{L}$. En estado de reposo las plaquetas circulan sin adherirse al endotelio y mantienen una estructura discoide, la cual se modifica tras su activación debido a la emisión de múltiples pseudópodos. La presencia de las plaquetas es esencial para el desarrollo de la fase inicial de la coagulación, a través de la:

- a) adhesión a una superficie.
- b) agregación de plaquetas entre sí.
- c) liberación de productos endógenos.
- d) iniciación y participación en la activación de la trombina.

Las plaquetas se acumulan en el lugar donde el endotelio es disfuncional o está dañado dentro de la pared arterial, lo que inicia la formación del trombo. Los cambios morfológicos y funcionales a nivel plaquetario van a estar dirigidos por la activación e interacción de glicoproteínas (GPs) de superficie plaquetaria, que actúan como receptores de membrana (Figura 2). Aunque el endotelio tiene múltiples proteínas adhesivas, la más importante para la adhesión plaquetaria es el colágeno. El FvW está embebido en las fibras de colágeno, particularmente colágeno de tipo I, III y VI.

El receptor de adhesión **GP Ib-IX-V**, es el receptor de unión de la superficie plaquetaria al subendotelio, mediante el vWF ligado al colágeno y la trombina. Además, el complejo GPIb-IX-V tiene la capacidad de unión a factores de coagulación (XI, XII,

cininógeno de alto peso molecular) y de actuar como correceptor del FVIIa. Pacientes con trastornos congénitos del complejo GP Ib-IX-V (síndrome de Bernard-Soulier, SBS) o del FvW subendotelial (enfermedad de von Willebrand) muestran desórdenes hemorrágicos por un defecto en la adhesión plaquetaria.

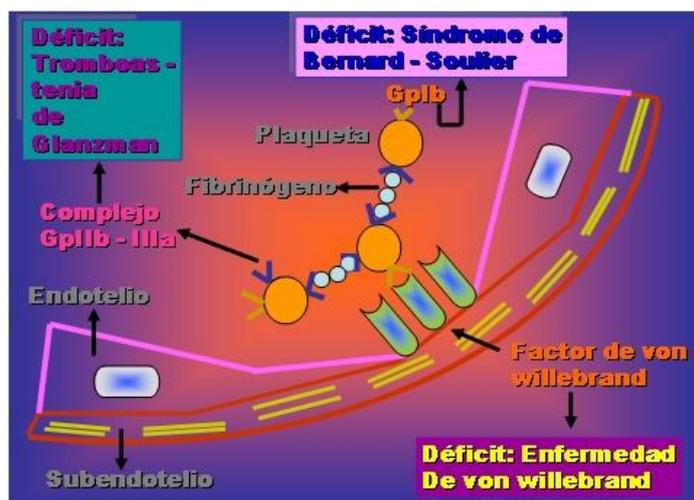


Figura 2. Glicoproteínas de superficie plaquetaria (<http://www.sld.cu/sitios/reumatologia/temas.php?idv=5149>).

Otras GPs importantes son:

► **GP α IIb β 3 (GPIIb/IIIa; CD41-CD61)**: es el receptor más abundante de la superficie plaquetaria, con capacidad para unir fibrinógeno y otras proteínas de adhesión como el FvW, fibronectina y vitronectina. La formación de puentes de fibrinógeno entre receptores GPIIb-IIIa de plaquetas contiguas es requisito indispensable para la formación de los agregados plaquetarios. La activación de GPIIb/IIIa también se produce por acción de agonistas solubles como el ADP, epinefrina, tromboxano A2 (TxA2), trombina, etc. La ausencia del complejo GPIIb/IIIa se expresa clínicamente por un cuadro hemorrágico grave denominado trombostenia de Glanzmann.

► Otras proteínas, **GPVI**: representa el principal receptor de la superficie plaquetaria para el colágeno; **GPIV (CD36)**: está implicada en la adhesión y agregación plaquetaria y, **GP α 2 β 1 (GPIa/IIa; CD49b-CD29)**: une moléculas de colágeno y potencia la acción de adhesión plaquetaria ejercida por el complejo GPIb-IX-VI y la GPVI.

Las plaquetas contienen cuatro tipos de gránulos citoplasmáticos clasificados de acuerdo a su ultraestructura, densidad y contenido: **los gránulos α** , **los gránulos densos**, **los lisosomas** y **los peroxisomas**. Estos gránulos almacenan distintos factores que son

liberados al activarse la plaqueta, los cuales a su vez estimulan aún más la actividad de la propia plaqueta.

El trombo constituido a partir de la actividad plaquetaria es la respuesta primaria en el mecanismo de la hemostasia espontánea. Su duración suele ser de 3 a 4 h, hasta que se produce su lisis.

El tercer componente que interviene en la hemostasia son los factores de la coagulación y sus inhibidores y la fibrinólisis, que incluye los elementos procoagulantes y anticoagulantes y agentes fibrinolíticos, respectivamente.

Factores de coagulación

La hemostasia secundaria se refiere al sistema de la coagulación en el que participan una serie de proteínas plasmáticas solubles llamadas factores de la coagulación, los que interactúan a través de una serie de cambios bioquímicos y reacciones enzimáticas para transformar el fibrinógeno soluble del plasma en un coágulo de fibrina, que se localiza en el sitio de ruptura vascular.

Los factores plasmáticos de la coagulación son proteínas, fosfolípidos, lipoproteínas e iones calcio (Ca^{2+}). Estos factores se identifican por números romanos (I a XIII), de acuerdo con el orden de su descubrimiento y no al orden en que intervienen en la cascada de la coagulación (Tabla 1). Para representar la forma activada de un factor, a la derecha del número romano se coloca una "a".

Según las características de los factores involucrados en la coagulación sanguínea pueden clasificarse en:

- **Enzimas proteolíticas** (serín-proteasas): la mayoría de los factores de coagulación son proteínas que circulan como precursores enzimáticos (zimógenos) y se transforman en enzimas activas durante el proceso de coagulación. A este grupo pertenecen la calicreína y los factores II, VII, IX, X, XI y XII, así como la proteína C (inhibidor).
- **Cofactores**: son necesarios para formar complejos con las enzimas, lo que facilita su fijación a la superficie celular, así como para acelerar la reacción enzimática. Este grupo incluye al cininógeno de alto peso molecular (HMWK), al FT, a los fosfolípidos, al factor VIII y al V y a la proteína S (inhibidor).
- **Otras proteínas**: como el fibrinógeno y el factor XIII, que intervienen directamente en la formación y estabilización del depósito de fibrina.

Tabla 1. Nomenclatura y función de los factores de la coagulación

Factor	Sinónimo	Función
I	Fibrinógeno	Estructural
II	Protrombina	Serino Proteasa
III	Factor tisular, tromboplastina tisular	Cofactor/iniciador
IV	Calcio	
V	Factor lábil, proacelerina	Cofactor
VI	No asignado	
VII	Proconvertina, Factor estable	Serino proteasa
VIII	Globulina o Factor antihemofílico A	Cofactor
IX	Factor Christmas o antihemofílico B	Serino proteasa
X	Factor Stuart Prower	Serino proteasa
XI	Factor antihemofílico C	Serino proteasa
XII	Factor de Hageman	Serino proteasa
PK	Precalicreína o Factor de Fletcher	Serino proteasa
HMWK	Cininógeno de alto peso molecular	Cofactor
XIII	Factor estabilizador de la fibrina	Transglutaminasa

Hematología. Fisiopatología y Diagnóstico. Ed. Universidad de Talca, 2009.

Los factores II, VII, IX y X, así como las proteínas reguladoras de la coagulación (proteína C y proteína S), son sintetizados en hígado y dependen de la vitamina K para expresar su potencial procoagulante y anticoagulante, respectivamente (Figura 3). Todos ellos contienen de 10 a 12 residuos de glutamina, los cuales son carboxilados por una carboxilasa que utiliza como cofactor a la vitamina K, para originar residuos gamma-carboxiglutámicos (Gla).

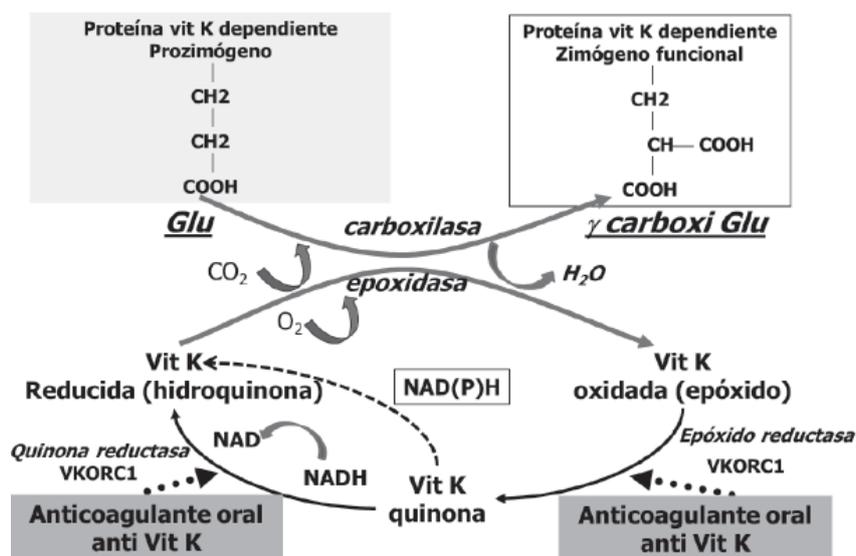


Figura 3. γ -carboxilación enzimática post transcripcional dependiente de vitamina K en el hepatocito (factores II, VII, IX y X, proteína C y proteína S). Martinuzzo M. Fisiología de la hemostasia normal. Hematología 2017; 21: 31-42.

Los dominios Gla son fundamentales para la unión de estas proteínas al Ca^{+2} y a los fosfolípidos aniónicos de las superficies celulares activadas, especialmente a nivel plaquetario. Los antagonistas de la vitamina K (dicumarínicos) inhiben esta carboxilación, lo que se traduce en la síntesis de factores descarboxilados o parcialmente carboxilados, y con escasa o nula función procoagulante.

MECANISMOS PROPUESTOS DE LA COAGULACIÓN SANGUÍNEA

1- Teoría clásica: la cascada de la coagulación

En la década de los años sesenta, se describió la cascada de la coagulación como una secuencia de eventos enzimáticos iniciada por dos **vías, la intrínseca y la extrínseca** (Figura 4), las cuales convergían en una vía común para generar la activación de la protrombina (FII) a trombina (FIIa). Este esquema continúa siendo útil para interpretar las pruebas en el laboratorio de hemostasia. Entre estas pruebas están el Tiempo de Protrombina (TP), para evaluar la vía extrínseca; el Tiempo de Tromboplastina Parcial activado (TTPa) para la vía intrínseca y el Tiempo de Trombina (TT), que evalúa la vía común (Figura 4).

En la **vía intrínseca**, los factores que en ella participan se encuentran en la sangre circulante, en cambio la vía extrínseca utiliza un factor procedente de los tejidos lesionados (tromboplastina o FT). La vía intrínseca se inicia tras un daño vascular, con la exposición de superficies con carga negativa, como el colágeno. En esta reacción interviene como cofactores la calicreína y el HMWK, constituyendo el sistema de contacto. En condiciones *in vitro*, la superficie de contacto corresponde al vidrio del tubo de ensayo y se utilizan activadores como el caolín o la sílica. Así, la precalicreína es activada a calicreína. Luego, la calicreína, potenciada por los HMWK, actúa sobre el FXII para convertirlo en FXIIa. El FXIIa transforma el FXI en FXIa. El FXIa, en presencia de Ca^{+2} , convierte el FIX en FIXa. El factor IXa generado junto al FVIIIa, Ca^{+2} y fosfolípidos plaquetarios conforman el complejo “*tenasa intrínseca*”, que transforma el FX en FXa.

La **vía extrínseca** se activa cuando la sangre se pone en contacto con la tromboplastina o FT (FIII) que se libera de las células endoteliales al producirse un daño tisular. El FT, junto con el FVIIa, Ca^{+2} y fosfolípidos forma un complejo “*tenasa extrínseca*” capaz de activar al FX, desencadenando así la coagulación.

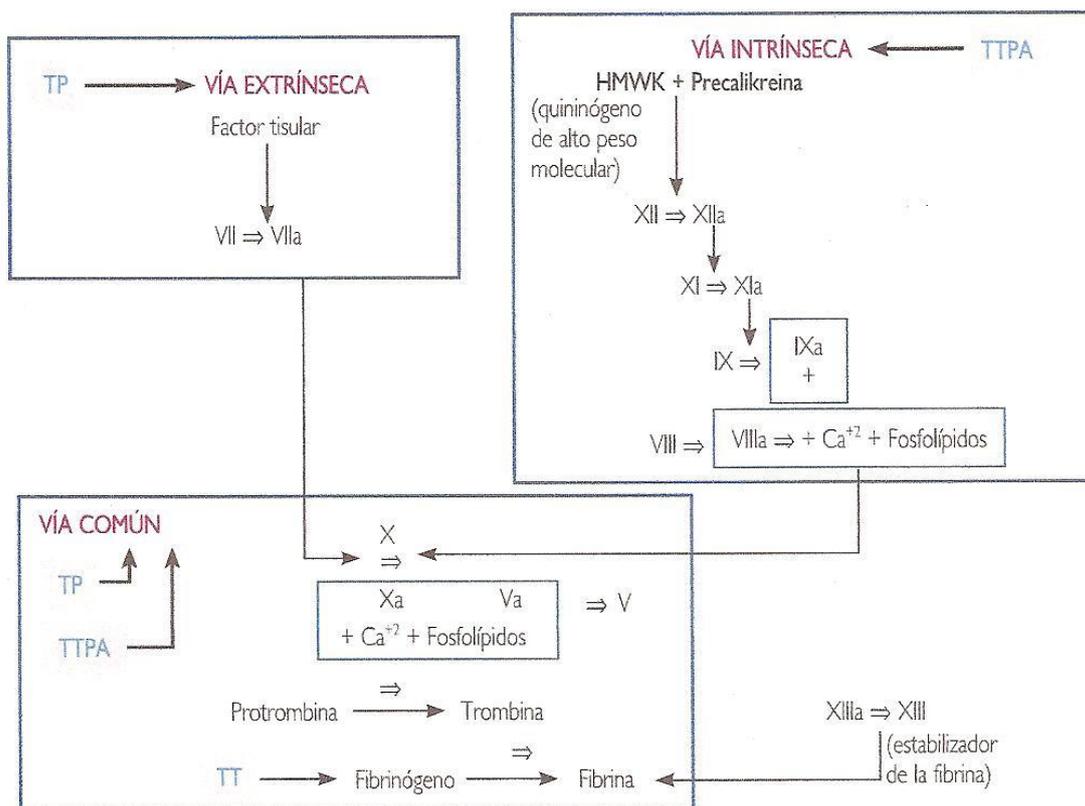


Figura 4. Modelo clásico de activación de la coagulación. Este modelo es útil para la interpretación de las pruebas básicas de la coagulación: tiempo de protrombina (TP), tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA) y tiempo de trombina (TT). (Cervera Bravo A. *Pediatr Integral* 2016; XX (5): 318-30).

El mecanismo extrínseco está afectado por alteraciones cuali- y/o cuantitativas de los Factores II, V, VII, X y fibrinógeno.

En la **formación del FXa**, convergen las dos vías y las etapas siguientes son comunes. El FXa junto con el cofactor Va y la protrombina (II) como sustrato, iones de Ca²⁺ y fosfolípidos, conforman el complejo “*protrombinasa*”, que genera la trombina activa (FIIa). La trombina actúa sobre el fibrinógeno y lo convierte en fibrina, separando primero cuatro pequeños fibrinopéptidos, denominados productos de degradación del fibrinógeno (PDF). Los monómeros de fibrina se polimerizan y forman una red que es estabilizada por la fibrinasa (FXIII) mediante enlaces covalentes disulfuro, dando origen el tapón hemostático o coágulo. Los pacientes con déficit de fibrinasa pueden sufrir hemorragias postoperatorias y presentar dificultades en la cicatrización de heridas.

2- Teoría Celular de la Hemostasia (Modelo celular de Hoffman y Engelman, 2001)

El modelo clásico de cascada de la coagulación es útil para comprender la hemostasia *in vitro*, pero no explica algunos fenómenos que se observan *in vivo*, como por ejemplo los distintos grados en la tendencia a la hemorragia que resultan de la deficiencia de diferentes componentes en ambas vías. Asimismo, comprobar que el complejo FT/VII no sólo activa el factor X, sino también al IX, llevó a la conclusión de que la vía extrínseca sería la de mayor relevancia fisiopatológica.

Por ello, se desarrolló un modelo, de carácter global, en el cual la coagulación está regulada por las propiedades de las superficies celulares, que representan el ambiente natural donde se desarrollan las reacciones de coagulación. El proceso requiere la participación inicial de al menos 2 células: una, que es la fuente del FT (fibroblastos y músculo liso) y la otra, las plaquetas. En este modelo las proteínas y los factores de coagulación son necesarios para la respuesta fisiológica a la injuria, pero las células son las que aportan los fosfolípidos aniónicos y los receptores de membrana para que las reacciones enzimáticas se lleven a cabo, regulando la duración, intensidad y localización de la formación del coágulo. Se considera que la trombina actúa en forma diferencial de acuerdo a la concentración en que esté presente.

El FT, una glicoproteína integral de membrana, es el principal iniciador de la coagulación *in vivo*. En condiciones normales el endotelio y los monocitos no expresan FT, pero sí en respuesta al daño endotelial o a la presencia de estímulos inflamatorios como toxinas, citoquinas, etc. Según el modelo celular, la coagulación ocurre en tres fases, que acaban solapándose (Figura 5):

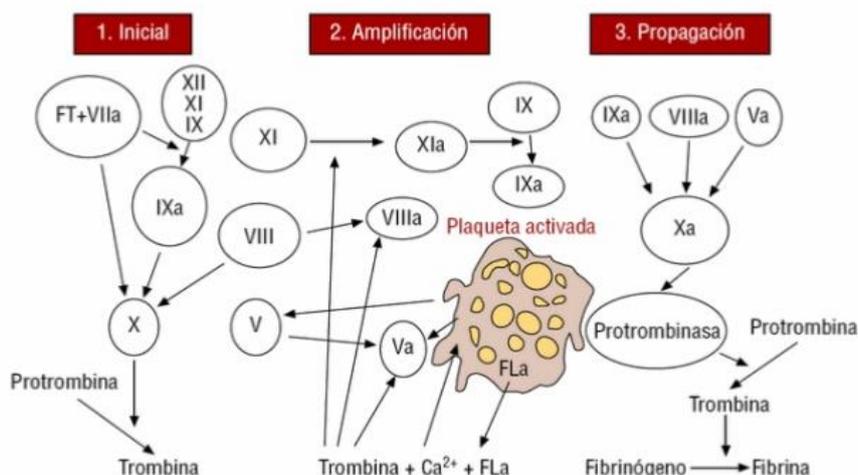


Figura 5. Modelo celular de la hemostasia. a: activado; FLa: fosfolípidos ácidos; FT: factor tisular. Pérez-Gómez F y col. La nueva cascada de la coagulación y su influencia en el equilibrio entre trombosis y hemorragia. Rev Esp Cardiol. 2007; 60:1217-9.

a) **Iniciación.** Luego de la lesión en la pared vascular, las células subendoteliales que contienen FT entran en contacto con el plasma y se inicia el proceso de generación de trombina al unirse al FVII formando el complejo FVIIa/FT, el cual aumenta la actividad catalítica del FVII, activando a su vez a los factores IX y X. La activación del FXa inicia la producción de pequeñas cantidades de trombina (FIIa), que se mantiene e incrementa por activación del FIXa. El FXa se combina en la superficie celular con FVa (liberado de los gránulos plaquetarios o activado por el FXa) para producir FIIa, aunque será insuficiente para completar el proceso de formación de la fibrina.

b) **Amplificación.** La cantidad de trombina generada es capaz de amplificar la señal procoagulante inicial activando FV, FVII y FIX, que se ensamblan en la superficie plaquetaria para promover reacciones ulteriores. Esta fase es dependiente de la adhesión de las plaquetas al colágeno subendotelial y de su activación por las trazas de trombina. La activación plaquetaria genera un cambio rotacional en algunos lípidos de membrana, exponiendo una superficie cargada negativamente que, por medio del Ca^{2+} , adhiere y activa los factores de coagulación de la secuencia intrínseca y común, de modo que cada factor puede ser activado por su antecesor en la vía, pero también de manera alterna, por la superficie de la plaqueta activada.

c) **Propagación.** Durante esta fase, el complejo “tenasa” (VIIIa, IXa, Ca^{2+} y fosfolípidos) cataliza la conversión de FXa, mientras que el complejo “protrombinasa” (Xa, Va, Ca^{2+} y fosfolípidos) promueve, a nivel de la superficie plaquetar, la conversión de protrombina en grandes cantidades de trombina (explosión de trombina), necesaria para la formación de un coágulo estable de fibrina. La fibrino-formación involucra tres etapas:

- 1- Escisión proteolítica del fibrinógeno por acción de trombina, generando los fibrinopéptidos A y B y monómeros de fibrina.
- 2- Polimerización espontánea de los monómeros de fibrina.
- 3- Estabilización del coágulo de fibrina por formación de enlaces covalentes entre los monómeros de fibrina por acción de una transglutaminasa (FXIII), activado por trombina.

Una vez cumplida la función hemostática, la generación de trombina es atenuada y neutralizada por la acción de inhibidores como la antitrombina III, el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) y el sistema de la Proteína C activada (PCa).

La trombina es la enzima principal de la coagulación. La velocidad y el pico máximo de producción de trombina son determinantes para que todas sus funciones se lleven a cabo: activación de las plaquetas, de los cofactores V y VIII, del FXI y FXIII, activación de la vía del inhibidor de la fibrinólisis por trombina (TAFI), transformación del fibrinógeno a fibrina, agregación plaquetaria (por su acción sobre los receptores PAR1 y PAR4) y

participación en los procesos de inflamación y cicatrización de heridas. Los efectos procoagulantes de trombina representan un sistema de retroalimentación positiva que favorece la generación de más trombina.

La importancia de los FVIII y FIX en las fases de amplificación y propagación está dada por las serias manifestaciones hemorrágicas que presentan los pacientes con deficiencias severas de FVIII y FIX, hemofilia A y B, respectivamente.

Control de los Factores de Coagulación

El proceso de coagulación debe autolimitarse al lugar de la lesión. Para ello actúan, por un lado, inhibidores de los factores activos de la coagulación y, por el otro, la plasmina, enzima que rompe la red de fibrina (fibrinólisis). Asimismo, en condiciones basales, se producen sustancias antitrombóticas (prostaciclina, óxido nítrico, trombomodulina, etc.) que impide la formación de coágulos sobre la pared vascular.

Los principales inhibidores de la coagulación son:

1. **Inhibidor del factor tisular (TFPI)**, producido por las células endoteliales y las plaquetas ante la lesión de un vaso. Inhibe directamente el FXa (la proteína S actúa como cofactor) o bloqueando el complejo del FT/VIIa/Xa.
2. **Antitrombina (AT)**, anticoagulante natural y se activa fisiológicamente por proteoglicanos de origen endotelial (dermatán sulfato, heparán sulfato y condroitín sulfato) y farmacológicamente por la heparina. Actúa inhibiendo a la trombina y al FXa, y en menos a los FIXa, FXIa y XIIa. El sistema AT-heparina es el mecanismo principal de neutralización de los factores activados de la vía intrínseca.
3. **Sistema de la proteína C**, constituido por la proteína C, la proteína S y la trombomodulina. La trombina se autorregula al unirse a la trombomodulina y así activa a la proteína C. La PCa se une a la proteína S sobre la superficie de la célula endotelial o de la membrana plaquetaria, e inactiva proteolíticamente a los cofactores Va y VIIIa, disminuyendo la generación de trombina. Las deficiencias congénitas de proteínas C y S se asocian con el incremento del riesgo trombótico. La resistencia a la PCa es la trombofilia hereditaria más habitual, y el factor V Leiden es la causa más común de resistencia a la PCa. Existen deficiencias adquiridas, asociadas a hepatopatías, consumo excesivo (sepsis, coagulación intravascular diseminada, etc.) o tratamientos con anticoagulantes orales. La proteína S disminuye fisiológicamente durante el embarazo y por efecto de anticonceptivos orales o terapia de reemplazo hormonal.

4. El sistema retículo endotelial, elimina de la sangre circulante los factores activados de la coagulación (en el hígado, bazo y pulmón).
5. La α 2-macroglobulina y la α 1-antitripsina tienen actividad antitrombina.

Finalmente, la restauración de la permeabilidad vascular se establece por la fibrinólisis. El **sistema fibrinolítico** (Figura 6) está constituido por el plasminógeno (proenzima inactiva) que en presencia del activador tisular del plasminógeno (tPA) liberado en respuesta a diversos estímulos (trombina, oclusión venosa, ejercicio físico, etc), se transforma en plasmina. La plasmina promueve la lisis de la fibrina, dando lugar a la formación de productos de degradación de la fibrina (PDF) y dímeros D (DD). En la coagulación intravascular diseminada (CID) aumentan los PDF, hecho que junto a la disminución progresiva y rápida del recuento plaquetario y la prolongación de los tiempos de coagulación (TP y TTPA), contribuyen al diagnóstico. Los PDF tienen acción inhibitoria sobre la trombina, inhiben la polimerización de la fibrina e inhiben la agregación plaquetaria. Por lo tanto, una fibrinólisis extensa conduce a hipocoagulabilidad.

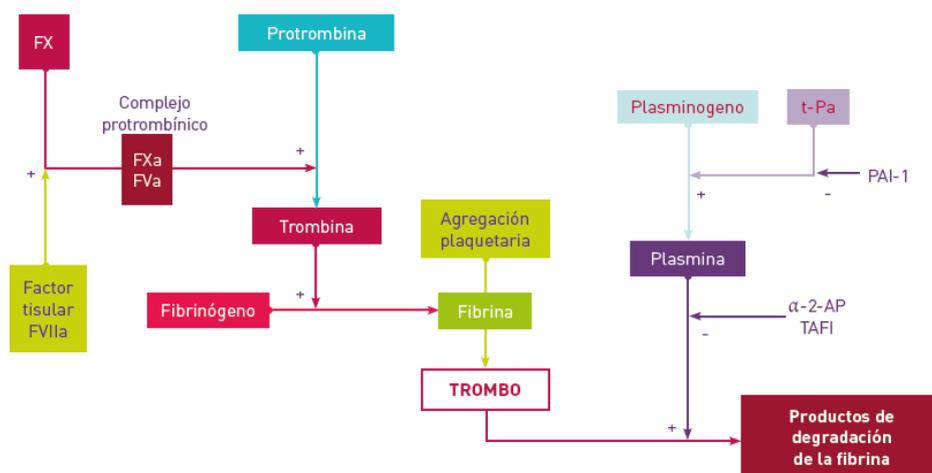


Figura 6. Representación esquemática del proceso fibrinolítico. Hemostasia. (catedratrombosis.com/wp-content/uploads/2016/10/cursoTROMBOcap1.pdf).

La plasmina activa en el plasma se inhibe por la α 2-antiplasmina. Se pueden medir los complejos de α 2-antiplasmina-plasmina por técnicas inmunológicas, las cuales indican activación *in vivo* de la fibrinólisis.

La trombina puede activar otro inhibidor fibrinolítico, el TAFI, el cual elimina residuos de lisina de la fibrina, impidiendo la unión del plasminógeno y la degradación del coágulo.

TERAPIA ANTICOAGULANTE

La anticoagulación es un procedimiento que evita la formación de coágulos. Aunque el organismo posee mecanismos naturales de anticoagulación, se considera la utilización de métodos externos en circunstancias en las que se clasifica al paciente como de alto riesgo trombótico, por ejemplo: fibrilación auricular, angina inestable, infarto agudo de miocardio, pacientes con prótesis valvulares mecánicas, pacientes con endoprótesis coronaria (stent), tromboembolia pulmonar, trombosis venosa profunda, accidente vascular cerebral trombótico, etc. Existen tres métodos artificiales de anticoagulación:

- Intravenosa con heparina no fraccionada (HNF).
- Subcutánea con heparina no fraccionada y fraccionada (o bajo peso molecular, HBPM).
- Oral (warfarina, acenocumarol).

El objetivo del monitoreo de laboratorio de la terapia anticoagulante es seleccionar la dosis que logre el efecto anticoagulante óptimo, previniendo la formación de trombos o su progresión mientras que paralelamente se minimiza el riesgo de sangrado.

Tanto la HNF como la HBPM ejercen su actividad anticoagulante a través de la unión a antitrombina (AT). De acuerdo al tipo de heparina, será el momento de realizar la extracción de sangre. Para la HNF en infusión continua, el momento es indistinto. Si la infusión es endovenosa intermitente, se debe extraer una hora antes de la siguiente aplicación. Si es subcutánea, deberá controlarse en la mitad del intervalo entre dos aplicaciones. El tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPA) es la prueba de laboratorio más utilizada para el monitoreo de la terapia con HNF. En determinados pacientes se prefiere monitorear el tratamiento con HNF midiendo la heparinemia por el ensayo de actividad anti-Xa (resistencia a la heparina, pacientes con un TTPA basal prolongado por anticoagulante lúpico positivo o deficiencia de factores de la fase de contacto, etc.). Su determinación se realiza por cuantificación de actividad enzimática mediante métodos cromogénicos. En ella se aporta el factor Xa y se mide la actividad Xa residual no inhibida por el complejo heparina/antitrombina de la muestra.

Por otra parte, los anticoagulantes orales dicumarínicos inhiben la enzima epóxido reductasa, necesaria para la conversión de la vitamina K desde su forma oxidada hasta la reducida (Figura 3). El control terapéutico de los fármacos anti-vitamina K se realiza con el TP, expresando su resultado mediante la razón internacional normalizada (RIN).

TRASTORNOS DE LA HEMOSTASIA

En un paciente que presenta trastornos de la hemostasia manifestado por hemorragias y/o trombosis, se debe determinar si el proceso es congénito (hemofilia, enfermedad de von Willebrand, etc.) o adquirido. En el primer caso, es de vital importancia una anamnesis donde se interrogue al paciente sobre la presencia de signos y síntomas similares en algunos de los miembros de su familia. De resultar negativo, se comienza a sospechar que el problema es de carácter adquirido y el interrogatorio se debe dirigir hacia la ingesta de medicamentos (anticonceptivos orales, anticoagulantes orales o heparínicos, aspirina, corticoides, antibióticos, etc.) o a la presencia de enfermedades (falla hepática, insuficiencia renal, enfermedades autoinmunes, etc).

En el caso de las hemorragias, es importante evaluar el tipo de sangrado que se observa, el cual puede ser dividido en dos grupos (Tabla 2):

a) Las alteraciones vaso-plaquetarias o púrpuras, cuyos signos característicos son las Petequias y la equimosis. Se pueden presentar en forma aislada o agrupadas.

Tabla 2. Diferencias clínicas entre las alteraciones hemostasia primaria y secundaria

Manifestaciones	Alt. H. primaria (plaquetas)	Alt. H. secundarias (factores de coagulación)
Inicio sangrado postraumatismo	Inmediato	Tardío (horas o días)
Localización el sangrado	Superficial (piel, mucosas)	Profundas (articulaciones, músculos, retroperitoneo)
Exploración física	Petequias, equimosis	Hematomas, hemartrosis
Historia familiar	Autosómica dominante	Autosómica recesiva
Respuesta al tratamiento	Medidas locales efectivas	Requieren terapia sistémica

b) Las alteraciones plasmáticas se distinguen de las púrpuras por la ausencia de Petequias y la frecuente aparición de hematomas, equimosis intensas y hemartrosis. La pérdida de sangre por cavidades serosas, sitios de punción o la coexistencia de hemorragias y fenómenos tromboembólicos son característicos en este tipo de trastornos.

El **Coagulograma** contempla un conjunto de pruebas globales que evalúan de forma orientadora el funcionamiento de los diferentes componentes del sistema hemostático (Tabla 3). Incluye la evaluación del sistema vascular y plaquetario a través de la determinación del tiempo de sangría y el recuento de plaquetas, el sistema de coagulación medido por el tiempo de protrombina (TP) y el tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA o KPTT) y el sistema fibrinolítico determinado por el tiempo de lisis de las euglobulinas.

Tabla 3. Evaluación de las pruebas globales de coagulación

Tiempo de sangría	Número y función plaquetaria/endotelio
Tiempo de Protrombina	Vía extrínseca: II-V-VII-X (en menor medida factores de la vía común)
TTPA	Vía intrínseca VIII-IX-XI-XII (en menor medida factores de la vía común)
Tiempo de Trombina	Fibrinoformación (Fibrinógeno, PDF, heparina)
Recuento de plaquetas	Número de plaquetas. Se recomienda realizar el frotis de sangre periférica para evaluar distribución y características plaquetarias.

Una vez realizadas estas determinaciones y encontrada alguna alteración se deben analizar en forma selectiva los factores o elementos que intervienen o forman parte del comportamiento que se halló anormal, mediante técnicas más específicas.

LABORATORIO EN HEMOSTASIA. ETAPA PREANALÍTICA

Los componentes del sistema hemostático varían desde el momento que se inicia la venopuntura hasta el instante de su determinación. La estandarización de la etapa preanalítica es indispensable para minimizar estos efectos. Asegura la calidad de los resultados y permite su correcta interpretación, brindando elementos para un manejo clínico y terapéutico adecuado.

1- Indicaciones al paciente

Las instrucciones para las pruebas de coagulación deben ser comprensibles y precisas. El paciente debe tener en lo posible un ayuno de 8 h y haber descansado al menos 30 min antes de la venopunción, para evitar el efecto de la activación del endotelio. Sin embargo, en los casos de urgencia se deben realizar las pruebas básicas de coagulación sin importar el cumplimiento de los mencionados requisitos. Dejar asentado un registro de la medicación que emplea el paciente, previo a la toma de la muestra. El tratamiento con fármacos que produzcan una inhibición irreversible de la agregación plaquetaria (por ejemplo aspirina), debe ser suspendido por lo menos 10 días antes de la toma de muestra, excepto en aquellos casos en donde se solicite el estudio de función plaquetaria para el control de la terapia antiagregante.

2- Extracción y preparación de la muestra

En hemostasia, la extracción de sangre es un procedimiento importante para conseguir óptimos resultados. Es aconsejable la utilización de una aguja de 21 a 19G para adultos y 23G en muestras de pacientes pediátricos. El material del tubo de colección puede ser plástico (polipropileno) o tubos de vidrio recubiertos en silicona, para evitar la activación por contacto. Cuando se realizan pruebas que miden los tiempos de coagulación (por ejemplo, TTPA) se utilizan tubos de vidrio, para aprovechar la propiedad de este material de activar la vía intrínseca. Se deben descartar aquellos tubos que presenten ralladuras, ya que afectarán los tiempos de coagulación.

La punción debe ser única (buena canalización) evitando el éstasis venoso prolongado (idealmente menos de 1 min). La aguja no debe moverse excesivamente para no remover tejidos subendoteliales. La aspiración debe ser suave (sin forzar un flujo acelerado para el llenado de la jeringa), pero no en extremo lenta, ya que esto induce a la activación de la coagulación con formación de microcoágulos. No se aconseja utilizar sangre capilar ni se recomienda la extracción mediante catéteres (dado que generalmente contienen heparina). Si las muestras han sido obtenidas con mariposas, descartar para pruebas de coagulación el volumen de sangre contenido en la tubuladura. Una vez obtenida la sangre, se coloca la jeringa pegada a la pared del tubo de plástico (tapón azul) y se deja correr la sangre evitando la formación de espuma.

3- Recolección de muestra

El tubo recomendado por el ISTH para pruebas de coagulación contiene un volumen medido de citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a una concentración de 3,2% (0,109 mol/L) en una relación al décimo entre anticoagulante/sangre (1 parte de anticoagulante por 9 partes de sangre). La razón teórica por la cual sería más conveniente utilizar citrato al 3,2% es que, comparado con el citrato al 3,8%, aquel posee una osmolaridad más cercana a la plasmática y por lo tanto otorgaría mayor estabilidad a la muestra. Un correcto volumen de llenado de tubo permite la formación de un espacio (*headspace*) que facilita la turbulencia necesaria para la homogenización correcta entre la sangre y el anticoagulante; dicha homogenización corresponde a 10 inversiones completas (sin agitar). La omisión de este paso genera una anticoagulación parcial de la muestra, mientras que una agitación muy vigorosa producirá hemólisis y activa las plaquetas. El laboratorio debe rechazar aquellos tubos llenados por defecto o por exceso.

El tubo de citrato destinado a pruebas de coagulación debe cargarse siempre antes que los que llevan otros anticoagulantes, de manera que no se contamine con EDTA o heparina de litio, lo cual puede interferir en el estudio de coagulación.

El plasma de la muestra sanguínea obtenido por centrifugación, dependerá de las pruebas a realizar:

- **Plasma Rico en Plaquetas (PRP):** Centrifugar 10 min a 1000 rpm. Se utiliza para pruebas de funcionalidad plaquetaria.
- **Plasma Pobre en plaquetas (PPP):** Centrifugar 10 min a 3000 rpm. Se utiliza para pruebas de coagulación.

4- Conservación de la muestra

La muestra de sangre se debe centrifugar antes de los 10 min de extraída, luego separar el plasma del paquete globular. Conservar:

- Hasta 30 min a temperatura ambiente.
- Hasta 4 h a 2-8°C.
- Hasta 2 semanas en freezer a -20°C.
- Hasta dos meses a -80°C, ya que se congela rápidamente.

NOTA: No deben utilizarse muestras congeladas y descongeladas más de una vez.

5- Lavado del material de vidrio

La limpieza del material de vidrio se debe realizar mediante un exhaustivo cepillado con detergente (no iónico), un enjuague con abundante agua corriente, pasaje por una mezcla sulfocrómica o hipoclorito de sodio, enjuague nuevamente con agua corriente, luego varias veces con agua destilada y finalmente secar en estufa.

Recordar! La trombina y la heparina se absorben al vidrio y no son removidas totalmente con los lavados comunes. Ambas sustancias afectan el tiempo de coagulación.

6- Interferencias

Antes de comenzar el procesamiento de las muestras, es importante realizar una cuidadosa observación de las mismas, a fin de detectar errores groseros que pudieron haberse cometido durante la recolección (tubos mal enrasados, muestras parcialmente coaguladas, etc.) o presencia de interferentes (hemólisis, bilirrubina, lipemia).

Los eritrocitos contienen fosfolípidos, los cuales pueden acortar el TP en las muestras hemolizadas. Si se emplean técnicas ópticas, la lipemia puede interferir en la detección de

la formación del coágulo. Cualquier coágulo en la muestra -no importa su tamaño-, invalida los resultados obtenidos.

Los errores de dilución causan resultados variables. La concentración de citrato de sodio empleada como anticoagulante puede variar el tiempo de coagulación del plasma, porque la cantidad de citrato presente afecta la concentración de calcio que se utiliza en determinadas pruebas. A mayor concentración de citrato, menor concentración de calcio disponible para promover la formación del coágulo, lo que genera tiempos de coagulación más largos. Para hematocritos (Hto) que varían entre 25% y 55% no es necesario modificar la proporción de citrato de sodio. Si el Hto es >55% o < 25%, se debe corregir la proporción sangre: anticoagulante, de acuerdo a la Tabla 4.

Tabla 4. Ajuste del volumen de anticoagulante conforme al hematocrito del paciente (vol final = 5 mL)

Hematocrito (%)	Volumen de anticoagulante (mL)	Volumen de sangre (mL)
80	0,19	4,81
75	0,24	4,76
70	0,29	4,71
65	0,33	4,67
60	0,37	4,63
28-55	0,50	4,50
25	0,66	4,34
20	0,70	4,30
18	0,71	4,29
15	0,73	4,27

Rev Med Inst Mex Seguro Soc 2008; 46: 339-48.

7- Cloruro de Calcio

La concentración del cloruro de calcio empleada para las pruebas de coagulación es 0,025M. Esta concentración permite que el orden de la reacción enzimática sea cero y que el tiempo de formación del coágulo dependa de la concentración de factores de la muestra.

AUTOMATIZACIÓN EN EL LABORATORIO DE COAGULACIÓN

La automatización en hemostasia comienza en la década del setenta con la aparición de los equipos semiautomáticos que detectaban la formación del coágulo, primero en forma electromecánica y posteriormente, los de segunda generación, en forma foto-óptica.

Estos equipos permitieron estandarizar la observación del punto final, uno de los mayores problemas de las pruebas de coagulación manuales, ya que en estas últimas se

requiere de experiencia, particularmente si el tiempo de coagulación es prolongado o si la concentración de fibrinógeno es baja, y el coágulo es delgado y tenue.

Más tarde se desarrollaron los coagulómetros totalmente automatizados que cuentan con sistemas de medición de volúmenes que transfieren en forma automática el plasma y los reactivos a los recipientes de reacción y determinan el punto final sin intervención del operador. La guía de la CLSI *Protocol for the Evaluation, Validation, and Implementation of Coagulometers, H57-A (2008)* sugiere los puntos tener en cuenta para elegir un coagulómetro. Independientemente de la tecnología alcanzada, los analizadores ofrecen mayor exactitud y precisión que los métodos visuales.

En la actualidad, los laboratorios cuentan con algún tipo de equipo automatizado o semiautomatizado para análisis de la coagulación. Los dispositivos semiautomatizados requieren que el operador agregue el plasma y los reactivos en forma manual a la cubeta de reacción y limitan la capacidad de prueba a una o dos muestras por vez.

Los analizadores automatizados permiten analizar múltiples muestras simultáneamente, brindan la posibilidad de automatizar diferentes procesos como la toma de muestra a partir de tubos primarios, repeticiones y diluciones automáticas, calibraciones, entre otras.

Otras ventajas de los equipos totalmente automatizados incluyen:

- Utilización de menores volúmenes de muestras y de reactivos.
- Disminución del error humano, lo cual se traduce como una reducción de la imprecisión y aumento de la reproducibilidad.
- Estandarización de los procesos que involucran pruebas de rutina y test especiales.
- Expansión de las prestaciones del área. Permiten realizar, junto con la detección del coágulo, distintas pruebas con puntos finales diferentes (ensayos cromogénicos, inmunturbidimétricos, etc.) a partir de una única muestra.
- Facilita el almacenamiento y recuperación de los datos, así como la realización y visualización de cartas de control.
- Incorporación del área de hemostasia en el flujo de trabajo del laboratorio a través de la interfase con el LIS.

Según el principio de detección del punto final, los coagulómetros pueden dividirse en dos grandes grupos: aquellos que utilizan la detección clásica electromecánica o por viscosidad y los que utilizan la detección óptica del coágulo. Existen equipos que ofrecen la posibilidad de la doble detección, mecánica u óptica.

1- Detección mecánica (métodos electromagnéticos):

Se basan en el aumento de la viscosidad del plasma cuando se produce la formación de la fibrina. Monitorea la formación del coágulo a través del cambio de amplitud del movimiento de una bolilla que oscila libremente gracias a un campo magnético hasta que la formación de fibrina la detiene (al formarse el coágulo, la viscosidad aumenta y la amplitud decrece). Un algoritmo emplea estas variaciones del campo magnético para deducir la amplitud de la oscilación y determinar con precisión los tiempos de coagulación en la cubeta (Figura 7). La ventaja de este sistema de detección es que elimina las interferencias ópticas de las muestras lipémicas, ictericas o hemolizadas.

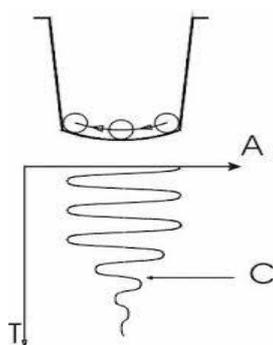


Figura 7. Diagrama de movimiento de la bolilla en coagulómetros con detección mecánica. A: Amplitud de oscilación de la bolilla T: Tiempo C: Coagulación. Duboscq C. Programa de evaluación externa de calidad-Fundación Bioquímica Argentina, 2012.

2- Detección foto-óptica:

Se basa en que la formación del coágulo modifica la densidad óptica del plasma. A medida que se forma el coágulo, se produce un cambio en las características ópticas respecto a la lectura inicial del plasma o de los reactivos. La lectura puede ser óptica o nefelométrica. Es posible acceder a datos adicionales mediante la gráfica de reacción y formación del coágulo, lo cual posibilita saber si una muestra se encuentra previamente activada, contaminada con heparina, si presenta poco fibrinógeno, etc.

2a- Lectura óptica o turbidimétrica: estos sistemas se basan en que la formación del coágulo genera un cambio en la densidad óptica (DO) del plasma. Se hace incidir un haz de luz a través de la cubeta de reacción, y un detector mide los cambios de DO recibidos durante un período de tiempo definido para cada test.

2b- Lectura nefelométrica: la nefelometría es una modificación de la detección óptica del punto final, en la cual se mide la dispersión de la luz lateral (90°) o frontal (180°), en lugar de la DO. Se hace incidir un haz de luz monocromática a través de la cubeta de

reacción; cuando el haz se enfrenta a las fibras de fibrina se difunde en distintos ángulos de dispersión y un detector recibe esta luz. El cronómetro se detiene cuando la cantidad de luz dispersada llega a un nivel predeterminado. La diferencia entre la luz dispersada antes y después de la formación del coágulo es proporcional a la cantidad de fibrina. Cada coagulómetro utiliza un algoritmo diferente para calcular el punto final.

Cabe destacar que pueden existir errores en la detección del coágulo con ambos tipos de coagulómetros, dependiendo de las características intrínsecas de la muestra. Si no se detecta el punto final con un método, es menester chequear la muestra con otro método de detección del coágulo o en forma manual. Lógicamente, con los equipos automatizados se obtienen CV% mucho menores que con la técnica manual, aunque ésta se utilice aún hoy para calibrar los ISI de las tromboplastinas.

Desde 1990, los fabricantes han integrado con éxito distintos métodos de detección en un mismo analizador (coagulométrico, cromogénico e inmunológico), lo que permite a partir de un único instrumento, realizar múltiples pruebas, tanto básicas como específicas.

El análisis **cromogénico** es una forma de medir la actividad de un factor de coagulación específico aprovechando las propiedades enzimáticas del factor (proteasa). Emplea un sustrato sintético conjugado con un cromóforo (p-nitroanilina). La proteasa escinde el sustrato y el producto es coloreado y se mide con un fotodetector a 405 nm.

Los ensayos **inmunológicos** son los más nuevos y se basan en reacciones antígeno-anticuerpo. Se recubren partículas de látex con anticuerpos dirigidos contra el analito elegido. El aumento de la absorbancia de la luz es proporcional al tamaño de los aglutinados, que a su vez es proporcional a la cantidad del antígeno (Figura 8). Se usan para determinar gran número de factores de coagulación y proteínas.

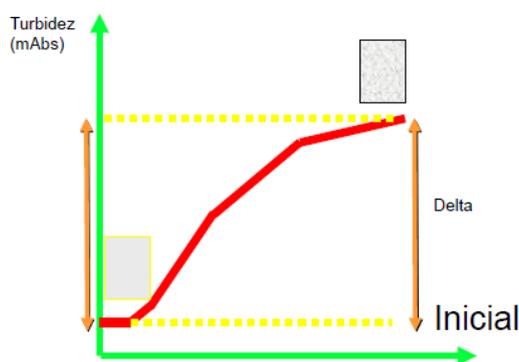


Figura 8. Curva de reacción inmunoturbidimétrica. Medida de la turbidez inicial y de la turbidez final producida por la aglutinación de las partículas de látex.

Debe resaltarse el creciente uso de las «pruebas al pie de la cama del paciente» o *Point of Care Test* (POCT), cuyo éxito radica en la reducción en el tiempo de espera del resultado en caso de manejo de hemorragia crítica, cirugía, transfusiones, etc. Resultan de la miniaturización de los grandes equipos de laboratorio favorecidos por la informática, química seca y otras herramientas tecnológicas. Las pruebas que con más frecuencia se encuentran disponibles en dispositivos portátiles incluyen el TP/INR, TTPA, tromboelastograma (TEG) y tromboelastometría de rotación (ROTEM), diversas pruebas para evaluar la función plaquetaria e incluso dímeros D.

CONTROL DE CALIDAD EN HEMOSTASIA

Es necesario implementar medidas para garantizar que los procedimientos realizados en el laboratorio de coagulación permitan entregar resultados confiables y reproducibles. La calidad total de un laboratorio depende de tres factores: las variables pre-analíticas, la calidad analítica y la calidad post-analítica (Ver Guía de Control de Calidad en el Laboratorio Clínico-Bioquímica Clínica I-ISSN 2545-7683).

Etapas Analíticas

El término calidad analítica se refiere a la veracidad del dato obtenido enfocándose en la etapa de análisis exclusivamente. Consideraciones a tener en cuenta en esta etapa:

- 1- Todo laboratorio debe verificar si el desempeño del método es consistente con las especificaciones del fabricante.
- 2- La elección de los reactivos debe tener en cuenta la sensibilidad procurada, en función del tipo de muestras que se procesa. Se debe mantener un registro para la gestión de los reactivos, controles y calibradores en torno a cambios o variaciones que pueden afectar las determinaciones (marcas, proveedores, lotes, fecha de vencimiento, etc.).
- 3- Los coagulómetros deben recibir mantenimiento preventivo regularmente, con registros documentados que demuestren cada una de las intervenciones realizadas. Procesar materiales de control de calidad interno integrados en cada corrida analítica.
- 4- Participar en programas de control externo. Evaluación de desempeño.
- 5- Contar con manuales de procedimientos.
- 6- Se recomienda determinar los valores de referencia estableciendo rangos para cada técnica en función de la población del laboratorio.

Planificación del Control de Calidad Interno

► Los materiales de control interno deben ser lo más similares a las muestras que se procesan, para disminuir el efecto matriz. Pueden emplearse:

- Controles comerciales liofilizados, se reconstituyen con agua destilada (pH 6,8-7,2) y debe transcurrir al menos 30 min desde la reconstitución hasta el procesamiento.
- Pool de plasma citratado, se recolecta sangre al menos de 20 donantes sanos, se realiza un pool, se fracciona en alícuotas y se conserva a -80°C . Descongelar a 37°C .

En ambos casos, para el cálculo de los límites de control se sugiere utilizar el modelo N20 o similar.

► Se recomienda utilizar al menos dos niveles de control por corrida analítica, uno normal y otro patológico, en el rango de interés clínico. Para definir la longitud de una corrida analítica, puede considerarse que:

- En laboratorios que funcionan durante las 24 h, se sugiere correr el control cada 6 h para las pruebas básicas (TP, TTPA, TT, fibrinógeno).
- En laboratorios que procesan gran cantidad de muestras en batch se debe procesar el control interno cada 50 muestras en el caso de trabajar manualmente o cada 100 muestras en el caso de coagulómetros automáticos.

► El resultado de la muestra control se analiza en función de las cartas de control (reglas de Westgard). La evaluación diaria del material control permite la validación de la corrida analítica y el seguimiento de la fiabilidad metrológica a través de la imprecisión analítica.

- En las pruebas globales es aceptable que el coeficiente de variación porcentual (CV%) intra-laboratorio sea $<5\%$ para técnicas automatizadas, considerando un mismo lote de control, normal o patológico ($<10\%$ para técnicas manuales).
- Para el dosaje de factores por método coagulable el CV% aceptable es $<10\%$ y para las técnicas amidolíticas, como el dosaje de ATIII, $<5\%$.

Etapa Post-analítica

Es responsabilidad del personal de laboratorio validar clínicamente los resultados, combinando los datos clínicos con los hallazgos de laboratorio para corroborar si el dato del paciente corresponde a su estado clínico, a sus antecedentes familiares, a un tratamiento de anticoagulación o es la confirmación de un dato obtenido previamente (delta check). Es importante que el laboratorio establezca un sistema de registro y notificación de valores críticos. A modo de recomendación puede considerarse como valor crítico un TP $< 25\%$ de actividad y un TTPA >180 segundos.

ACTIVIDAD PRÁCTICA

El desarrollo del trabajo práctico consistirá en la realización de pruebas básicas (técnicas manuales) para el estudio de la Hemostasia:

- Tiempo de Sangría
- Tiempo de Quick o de protrombina (TP)
- Tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA)
- Determinación de fibrinógeno

EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN PLAQUETARIA

Para el recuento de plaquetas se emplean métodos manuales (cámara de Neubauer) y automatizados (Ver el procedimiento en la guía de TP de Hematología, parte II).

1- TIEMPO DE SANGRÍA

a) Método de IVY

FUNDAMENTO

El tiempo de sangría mide el tiempo que tarda en detenerse la salida de sangre, provocada por una incisión estandarizada, realizada en el brazo. Es una de las pruebas fundamentales en la evaluación pre-quirúrgica. Es indispensable en un estudio básico de hemostasia, ya que es la única prueba sencilla que proporciona un cálculo global de la integridad del tapón hemostático primario, al medir la interacción entre los capilares y las plaquetas y evaluar el efecto corrector de distintas terapéuticas.

MATERIALES

- Esfigmomanómetro, Cronómetro, Lanceta descartable y Papel de filtro.

PROCEDIMIENTO

Es importante un operador entrenado y un interrogatorio exhaustivo acerca de la toma de medicamentos para evitar un examen innecesario. El sujeto debe tener el codo a igual nivel del corazón o levemente más abajo. Se coloca el brazalete del esfigmomanómetro en el antebrazo del paciente, a una presión constante de 40 mmHg para llenar los capilares y eliminar la variabilidad del tono muscular. Se limpia con alcohol la cara interna del antebrazo (en una zona libre de vello y sin capilares visibles) y se efectúan

3 incisiones con lancetas descartables de 1 mm de profundidad. A continuación se pone en marcha el cronómetro y sin tocar los bordes de la herida, cada 30 segundos se seca la gota de sangre con el disco de papel de filtro hasta que cese el sangrado. El punto final requiere experiencia para valorarlo. No debe aparecer más sangre en la herida (a veces continúa manchando el papel del filtro un líquido incoloro que no debe computarse dentro del tiempo de sangrado).

MODIFICACIÓN DE MIELKE: se efectúa en el antebrazo una incisión de 5 mm de longitud y 1 mm de profundidad. Existen en el mercado dispositivos en forma de guillotina (estériles y descartables) que permiten una incisión de la longitud y profundidad señaladas. Presentan un tope para que el corte sea realmente estandarizado. La forma de cronometrar es la misma que la descrita para la técnica de Ivy.

VALOR DE REFERENCIA: 1 - 4 min.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Los tiempos de sangría prolongados se observan en trombocitopenias, enfermedad de Von Willebrand y en algunas trombocitopatías congénitas o adquiridas, como también en desórdenes vasculares, uremia, macroglobulinemias, déficit de fibrinógeno, etc. La ingesta de ácido acetil salicílico (aspirina) prolonga el tiempo de sangría por un lapso variable, que se puede extender hasta 7 días post ingesta.

El tiempo de sangría por esta técnica logra resultados más exactos y reproducibles que la técnica de Duke. Sin embargo, la prueba está afectada por factores técnicos como profundidad, ubicación y dirección de la incisión, tipo de piel del paciente y la habilidad del operador. En presencia de trombocitopenia ($< 80.000 \text{ mm}^3$) el tiempo de sangría debe interpretarse con cautela. Se recomienda que cada laboratorio, en sus condiciones de trabajo, establezca su propio rango de referencia.

b) Método de DUKE:

Se limpia el lóbulo de la oreja con alcohol y sin presionar se realiza una incisión de 4 mm de profundidad, con una lanceta descartable. Cada 30 segundos se absorbe la gota de sangre con un papel de filtro, sin tocar la oreja, hasta que cese el sangrado.

Desventajas: problemas de estandarización y escasa sensibilidad.

VALOR DE REFERENCIA: 1 - 4 min.

Tabla 5. Patologías asociadas con tiempos de sangría prolongados

TIEMPO DE SANGRÍA PROLONGADO (Anomalía de la hemostasia primaria)	Con Rto. Disminuido	Trombocitopenias		
	Con Rto. Aumentado	Trombocitosis con Trombopatía		
	Con Recuento de Plaquetas Normal	Factor Von Willebrand alterado Factor VIII disminuido Adhesividad plaquetaria disminuida	Enfermedad de Von Willebrand	
		Fibrinógeno muy disminuido	Hipo - Afibrinogenemia	
		Con anomalías funcionales plaquetarias	Trombocitopatías congénitas o adquiridas	
		Fragilidad Vascular	Deficiencia de Vit. C Vasculitis	
		Con deficiencia aislada y severa de factores de coagulación.	II – V- VII – IX – X – XI	
Sin otras anomalías	Ingesta de ácido acetil salicílico u otros antiinflamatorios no esteroideos			

2- PRUEBA DEL LAZO (Rumpel Leede)

FUNDAMENTO

Mide fragilidad y permeabilidad vascular, además de la función plaquetaria. Normalmente, la pared vascular no permite extravasación de sangre. Sin embargo, en presencia de trombocitopenia, uso prolongado de corticoides, infecciones virales, hipoestrogenemia, etc., puede presentarse fragilidad del endotelio capilar o pared vascular, lo que permite una salida anormal de sangre hacia los tejidos circulantes y la aparición de petequias. Por lo tanto, la prueba del lazo es una medida de la integridad de los componentes vascular y plaquetario.

PROCEDIMIENTO

Se coloca el brazal del esfigmomanómetro en el brazo del paciente, aplicando una presión de 100 mmHg que se mantiene durante 5 min, al impedir el retorno venoso, se aumenta la presión intracapilar. Al cabo de este tiempo, se quita el brazal y por 5 min se cuentan las petequias aparecidas.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Una cifra superior a 6 petequias en un área de 5 cm de diámetro en la región del antebrazo, por debajo del pliegue del codo, se considera positiva. Se informa por cruces:

- +**: > 6 petequias.
- ++**: Muchas petequias en la cara anterior del antebrazo.
- +++**: Muchas petequias en el antebrazo y la mano.
- ++++**: Petequias de gran tamaño y confluentes en todo el antebrazo y mano.

Se produce mayor formación de petequias en presencia de trombocitopenia, trombostenia, púrpura vascular, escorbuto, hemofilia, etc. Esta prueba también puede ser positiva por fragilidad capilar en presencia de recuento plaquetario normal.

EVALUACIÓN DEL SISTEMA DE COAGULACIÓN

PRUEBAS A REALIZAR:

- 1- Tiempo de Coagulación (Tiempo de Lee - White).
- 2- Tiempo de Coagulación del Plasma Recalcificado (Tiempo de Howel).
- 3- Tiempo de Tromboplastina Parcial Activado (TTPA o KPTT).

1- TIEMPO DE COAGULACIÓN (Método de LEE-WHITE)

FUNDAMENTO

La sangre fuera del organismo coagula espontáneamente inducida por materiales como el vidrio de los tubos de ensayo, por activación de los factores de contacto. Este fenómeno dio lugar a otra prueba conocida como tiempo de coagulación de Lee-White, que es el tiempo que tarda en formarse el coágulo en una muestra de sangre entera, al ponerse en contacto con una superficie de vidrio. Es un método de pesquisa de alteraciones del mecanismo intrínseco de la coagulación y para monitorear la terapia con heparina.

MATERIALES

- Sangre sin anticoagulante.
- Tubos de hemólisis 10 mm x 10 mm.

PROCEDIMIENTO

La sangre se obtiene por punción venosa. Previamente se rotulan 3 tubos y se vacía en cada tubo 1 mL de la sangre extraída, comenzando por el tubo 1, momento en el que se activa el cronómetro (todos los tubos deben tener el mismo volumen para que la prueba sea válida). Se incuban a 37°C en posición vertical. A los 4 min se retira el tubo 1 y se revisa inclinándolo suavemente, se regresa a incubar, y se continúa revisando cada 30 segundos hasta detectar la coagulación. Luego se revisará el tubo 2 de la misma forma y una vez coagulado éste, se procede a revisar el tubo 3. Al final se reporta el tiempo del tubo 3 que es el menos manipulado.

VALOR DE REFERENCIA: 5 - 15 min.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Debido a que esta prueba es poco sensible, un tiempo de coagulación normal no descarta la existencia de una alteración en el sistema de coagulación, pero un tiempo de coagulación prolongado señala la existencia de un defecto severo.

Las causas que pueden producir una prolongación del tiempo de coagulación pueden ser: afibrinogenemia, hipofibrinogenemia, disfibrinogenemia, deficiencia de factores XII, XI, VIII, X, V, y II, tratamiento con heparina, inhibidores circulantes o errores técnicos.

2- TIEMPO DE COAGULACIÓN DEL PLASMA RECALCIFICADO (Tiempo de Howell)

FUNDAMENTO

Es el tiempo de coagulación del plasma, luego del agregado del cloruro de calcio. La prueba se realiza en ausencia de tromboplastina tisular. Está influenciada por todos los factores del mecanismo intrínseco, pero es poco sensible.

MATERIAL Y REACTIVOS

- Plasma citratado rico en plaquetas (PRP).
- Cloruro de calcio 0,025M.

PROCEDIMIENTO

- Se emplea plasma rico en plaquetas.

- Extraer sangre con citrato de sodio (2H₂O) 3,2% en proporción 9:1 y centrifugar antes de haber transcurrido 30 min de la extracción a 1000 rpm durante 10 min.
- Colocar en un baño de agua a 37°C, un tubo de vidrio no siliconado, y agregar 0,2 mL de plasma (PRP) y 0,2 mL de CaCl₂ 0,025 M, y accionar en ese momento el cronómetro.
- Observar la aparición de la malla de fibrina y registrar el tiempo transcurrido.

VALOR DE REFERENCIA: 70 - 170 segundos.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Valores mayores de 170 segundos pueden deberse al defecto de los factores de la vía intrínseca, afibrinogenemia, hipofibrinogenemia, disfibrinogenemia, tratamiento anticoagulante con heparina, inhibidores circulantes o errores técnicos.

CAUSAS DE ERROR

Esta prueba es afectada por errores experimentales como: condiciones de la extracción, limpieza del material utilizado y temperatura a la cual se realiza la prueba.

3- TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADO (TTPA o KPTT)

(Método de Proctor y Rapaport)

FUNDAMENTO

Consiste en determinar el tiempo de coagulación de un plasma citratado a 37°C en presencia de un sustituto de los fosfolípidos plaquetarios (cefalina), de un activador (celite, caolín, ácido eláxico) y de calcio. Esta prueba es sensible a niveles disminuidos de los factores de la vía intrínseca (incluyendo inhibidores de estos factores) y permite monitorear el tratamiento con heparina no fraccionada. Se expresa mediante segundos y una razón normalizada (TTPA paciente/TTPA medio normal).

MATERIAL Y REACTIVOS

- Cefalina diluida en tampón pH 7,6. La dilución de cefalina se ajusta de modo tal que el tiempo de tromboplastina parcial activado de un plasma deficiente en FVIII (menos de 1 U/dL) es por lo menos 2,5 veces el tiempo del plasma normal (estándar de trabajo). La dilución de cefalina debe prepararse a partir de la suspensión de cefalina madre y puede utilizarse durante todo el día de labor.
- Suspensión de caolín al 1% P/V en solución fisiológica.

- Cefalina-caolín: mezclar en partes iguales la suspensión de cefalina diluida y el caolín. La mezcla, mantenida en un baño de hielo debe usarse dentro de las 2 h de preparada.
- Tampón pH 7,6.
- Cloruro de calcio 0,025 M.
- Plasma citratado fresco, pobre en plaquetas (PPP).

(Esta metodología no se utiliza en coagulómetros foto-ópticos por la presencia de caolín, para éstos se deben emplear activadores no particulados).

PROCEDIMIENTO

- Pipetear en tubo de vidrio en baño de agua a 37°C los siguientes reactivos:

- 0,1 mL de PPP
- 0,1 mL de la suspensión cefalina-caolín

- Incubar durante 2 min exactamente agitando cada 30 segundos.

- Agregar 0,1 mL de cloruro de calcio y accionar el cronómetro.

- A partir de los 30 segundos observar, a intervalos de 5 segundos, la formación del coágulo. Registrar el tiempo de coagulación de la mezcla en segundos.

VALOR DE REFERENCIA: 35 - 50 segundos.

Nota: el valor de referencia depende de la combinación reactivo/sistema de detección. Cada laboratorio debe verificar su rango de referencia determinando el TTPA de al menos 20 individuos sanos (ambos sexos, entre 20-80 años). Si el valor hallado coincide con el descrito en el inserto, se puede adoptar el rango determinado por el fabricante. En caso contrario, el laboratorio debe evaluar al menos 140 pacientes normales y establecer su propio rango de referencia. En pacientes tratados con heparina, el rango terapéutico sugerido es de 1,5 a 2,5 veces el valor basal que tenían antes del inicio del tratamiento.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Pacientes con déficit de los factores XII, XI, IX, VIII, FX, FII y FV muestran valores prolongados de TTPA (mayores de 50 segundos). Algunos reactivos comerciales no detectan déficit ligeros de factores. Por esta razón, si el paciente presenta una fuerte sospecha clínica de alteraciones del sistema de coagulación, se debe realizar la determinación de factores aunque el TTPA sea normal.

La prolongación del TTPA puede deberse también a: contaminación de la muestra con heparina, enfermedad hepática severa, déficit prolongado de la vitamina K, CID, terapia con HNF, anticoagulante lúpico, inhibidores de factores de coagulación,

cefalosporinas, etc. Valores menores de 35 segundos indican hiperactividad (concentración aumentada de factores, muestra activada por un error preanalítico).

PRUEBA DE CORRECCIÓN CON PLASMA NORMAL

Ante un TTPA prolongado debe realizarse siempre el estudio de mezcla con un *pool* de plasmas normales. Determinar el valor de TTPA en una mezcla constituida por:

- 1 vol de plasma del paciente (PP)
- 1 vol de plasma normal (PN)

Corroborar si la prueba corrige o no frente al agregado del plasma normal mediante el ÍNDICE DE ROSNER (IR%): $[(TTPA \text{ mezcla} - TTPA \text{ PN} / TTPA \text{ PP}) \times 100]$.

Cada laboratorio debe establecer sus valores de corte.

- Corrige (IR% < valor de corte): déficit de factores de la vía intrínseca.

Realizar dosaje de factores.

- No corrige (IR% > valor de corte): inhibidor específico de factor, anticoagulante lúpico, inhibidor de interferencia, heparina no fraccionada.

4- TIEMPO DE QUICK o TIEMPO DE PROTROMBINA (TP)

FUNDAMENTO

Esta prueba permite la evaluación del sistema extrínseco de la coagulación. Consiste en medir el tiempo de coagulación de un plasma citratado en presencia de un exceso de fosfolípidos (tromboplastina) e iones calcio. Esta prueba es sensible a los factores del complejo protrombínico (II, V, VII y X), a la disminución de fibrinógeno y a la presencia de inhibidores adquiridos. Cuanto mayor es el número de factores deficientes mayor es la prolongación del TP. El grado de prolongación depende de la fuente de tromboplastina y del sistema de detección. Se expresa en segundos, razón normalizada o ratio (tiempo de protrombina del paciente/tiempo de protrombina control) y como actividad (ratio x 100).

MATERIAL Y REACTIVOS

- Tromboplastina de cerebro humano u otro origen.
- Cloruro de calcio 0,025M.
- Plasma citratado pobre en plaquetas (PPP).
- Solución fisiológica.

PROCEDIMIENTO

- Colocar en un tubo de vidrio en un baño de agua a 37°C los siguientes reactivos:
 - 0,1 mL de tromboplastina
 - 0,1 mL de PPP
- Incubar de 1 a 3 min a 37°C.
- Adicionar 0,1 mL cloruro de calcio.
- Registrar el tiempo de coagulación de la mezcla.

EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Se realiza el TP y se determina en la curva de Quick, la concentración expresada en porcentaje de actividad en relación a un plasma normal, correspondiente a ese tiempo.

Curva de Quick:

- Preparar una mezcla de plasmas normales y realizar diluciones en solución fisiológica, correspondiente a las siguientes concentraciones (expresadas en por ciento de actividad): 100, 90, 80, 70, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15 y 10.
- Determinar el TP para cada dilución y graficar en papel milimetrado el tiempo de coagulación (en segundos), en función de la concentración (en por ciento de actividad). Se obtiene una hipérbola que corresponde a la curva de Quick (Figura 9).

VALOR DE REFERENCIA

- 70 - 110%.
- 10 - 14 segundos (orientativo, depende del sistema de medición).

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

EL TP prolongado en segundos (porcentaje de actividad < 70%) se encuentra en pacientes con deficiencia congénita o adquirida de uno o más factores (FVII, FX, FV, FII), hipofibrinogenemia severa, enfermedad hepática, déficit de vitamina K, terapia con dicumarínicos, CID, etc.

La mayoría de las tromboplastinas comerciales contienen un antagonista de heparina que neutraliza la heparina a dosis terapéuticas. Sin embargo, altas concentraciones de heparina prolongan ligeramente el TP. Los pacientes anticoagulados con *fondaparinux* (químicamente relacionado con las heparinas de bajo peso molecular), *rivaroxabán*

(inhibidor reversible, directo y selectivo del FXa), y *dabigatrán* (inhibidor directo de la trombina), pueden presentar distintos grados de prolongación del TP.

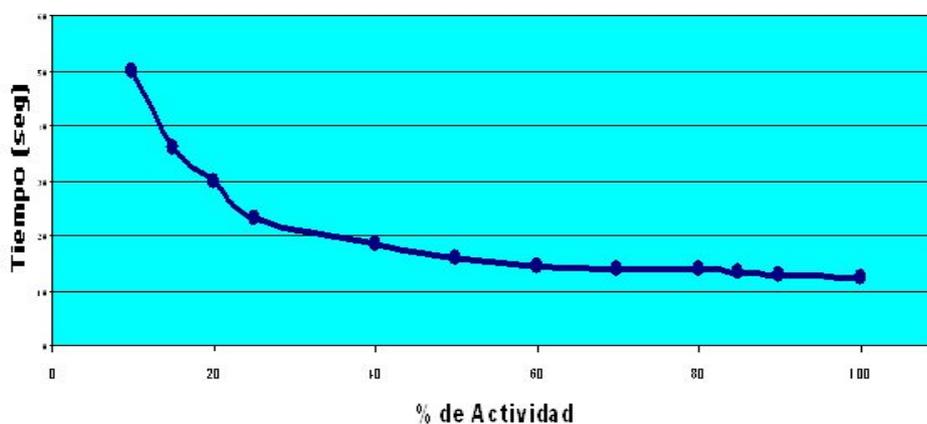


Figura 9. Curva normal de Tiempo de Protrombina.

PRUEBA DE CORRECCION CON PLASMA NORMAL

Cuando el TP está alargado se realiza la prueba de corrección con plasma normal (1 vol plasma paciente + 1 vol plasma normal). Si la prueba corrige, la prolongación es debida al déficit de uno o más factores que intervienen en el TP. Si la prueba no corrige, sugiere la presencia de un inhibidor. Los inhibidores específicos de los factores o los inhibidores de interferencia que afectan el TP son poco frecuentes.

Ejemplo:

TP Paciente (P): 40%
 TP Normal (N): 100%
 TP Mezcla (P+N): 50%

$$\text{TP Mezcla teórico} = \frac{\text{TPP} + \text{TPN}}{2} = 70\% \quad \text{NO CORRIGE}$$

- Corrige → TP Mezcla obtenido ≥ TP Mezcla teórico.
- No Corrige → TP Mezcla obtenido < TP Mezcla teórico.

CONVERSIÓN DEL TIEMPO DE PROTROMBINA EN PORCENTAJE DEL NORMAL

En ciertas condiciones es útil o necesario expresar el resultado en forma porcentual para lo cual se puede utilizar la fórmula propuesta por Quick:

$$\text{Actividad Protrombínica} = \frac{\text{TPN} - 8,7}{\text{TPP} - 8,7} \times 100$$

USO DE TROMBOPLASTINAS CALIBRADAS PARA EL CONTROL DE PACIENTES BAJO TRATAMIENTO CON ANTICOAGULANTES ORALES

El tratamiento y la profilaxis de los trastornos trombóticos se realiza mediante la administración oral de anticoagulantes basados en cumarinas. La dosis correcta de estos fármacos se ajusta según el resultado de la prueba de TP o tiempo de Quick, en la cual se utiliza como reactivo la tromboplastina.

La disponibilidad de tromboplastinas calibradas, quizás sea el punto clave para normalizar el control del tratamiento con anticoagulantes orales, lo cual permite relacionar, en una escala común, los TP obtenidos con diferentes tromboplastinas y por lo tanto comparar el efecto anticoagulante, independientemente de la tromboplastina utilizada. Cada lote de tromboplastina debe ser calibrado contra una preparación estable de referencia, que debe ser similar y del mismo origen (especie) que el lote a calibrar.

La tromboplastina (sustancia proteico-fosfolipídica) se extrae industrialmente de cerebro, pulmón o placenta. Esta diversidad de origen hace que la sensibilidad a las variaciones en los factores I, II, V, VII y X también sea diferente; o sea que para un mismo nivel de anticoagulación deseado, una tromboplastina poco sensible prolonga poco el TP, mientras que otras más sensibles debido a su origen lo prolongan más.

La sensibilidad de un lote de tromboplastina, en relación con la referencia internacional, se expresa mediante el **índice de sensibilidad internacional (ISI)** y los resultados del control de anticoagulación en **razón internacional normatizada (RIN)**, que es independiente de la tromboplastina utilizada para la realización del TP. Si bien el ISI fue desarrollado con el objetivo de unificar el control de la anticoagulación oral (fue creado por la OMS para pacientes en tratamientos con dicumarínicos), actualmente se lo utiliza para todo tipo de paciente como un parámetro más estandarizado para expresar el TP. En resumen, ISI refleja la sensibilidad del reactivo frente al patrón internacional.

Un ISI cercano a 1 indica una tromboplastina muy sensible a la deficiencia de factores; las tromboplastinas con ISI cercano a 2 muestran grandes niveles de imprecisión

en la determinación del RIN. La recomendación internacional OMS indica usar tromboplastinas con ISI menor a 1,4 ya que son las más sensibles y las sugeridas para controlar la terapia con anticoagulantes.

La media geométrica normal al igual que la curva de calibración del TP debe obtenerse cada vez que se cambia el lote del reactivo o de marca de reactivo. En esos casos indicar o introducir en el equipo coagulométrico el ISI que le corresponde. El cálculo es directo cuando se usan equipos automáticos o se puede hacer manualmente con los datos que se mencionan en las siguientes fórmulas:

Primero se calcula el cociente (r):

$$r = \frac{\text{TP del plasma del paciente anticoagulado}}{\text{MNTP}}$$

- TP paciente: media del Tiempo de Protrombina del paciente en segundos.
- MNPT: media geométrica del TP de la población normal adulta. Se calcula para cada lote de reactivo con al menos 20 muestras de plasmas frescos de individuos adultos sanos.

Luego, conociendo el ISI de la tromboplastina usada en la determinación, se calcula la RIN mediante la fórmula:

$$\text{RIN} = r^{\text{ISI}}$$

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

No existe acuerdo, a nivel internacional, sobre cuál es el rango terapéutico ideal. La intensidad de la anticoagulación varía según el tipo de patología que motiva el tratamiento. Para tromboembolismo pulmonar, trombosis venosa profunda, profilaxis del tromboembolismo en la enfermedad mitral, fibrilación auricular, miocardiopatías dilatadas y trombos murales, se suele utilizar un rango de 2 a 3. En cambio, para prótesis valvulares mecánicas el rango es de 2,5 a 3,5. En aquellos pacientes con doble reemplazo valvular, o reemplazos simples que presentan el antecedente de cuadros isquémicos cerebrales de origen embólico, con o sin secuela, el rango utilizado es de 3,5 a 4. En Europa se usa una RIN de 3,5 a 5 para prótesis valvulares, en nuestro medio, en el cual se agrega aspirina al tratamiento anticoagulante oral, un rango de 3,5 a 5 implica un mayor número de complicaciones hemorrágicas.

5- DETERMINACIÓN DEL FIBRINÓGENO (precipitación por calor)

Se trata de un modelo rápido que no requiere más de 30 min para obtener la cuantificación del fibrinógeno. Se debe controlar frente al método por pesada.

MATERIALES

- Tubos capilares.
- Reglilla en microescala.
- Baño María (BM) 56 - 58°C.
- Microcentrífuga.
- Plasma citratado a estudiar.

PROCEDIMIENTO

Llenar un tubo capilar hasta las 2/3 partes con plasma, cerrar a la llama y llevar a BM 58°C por 15 min. Después se centrifuga el tubo capilar en microcentrífuga durante 3 min para que el fibrinógeno precipitado se empaquete en el fondo del capilar. Se mide luego la altura del precipitado de fibrinógeno (HF) y la altura del plasma (HP) referido a 100 utilizando un ábaco. La lectura del precipitado expresa el fibrinógeno en g/L.

Existe una constante de conversión comparando este método con el gravimétrico, cuyo valor se aproxima a 0,92. Cada laboratorio debe determinarla. Se puede hacer una curva de calibración trabajando con plasma diluido en SF y determinando el tenor de fibrinógeno por pesaje y por micrométodo.

CAUSAS DE ERROR

Los productos de degradación del fibrinógeno son precipitables. Trabajar a temperaturas inapropiadas causa error por exceso (> 58°C) o error por defecto (< 56°C).

VALOR DE REFERENCIA: 2- 4 g/L

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Los niveles plasmáticos de fibrinógeno están disminuidos en estados congénitos (disfibrinogenemia y afibrinogenemia) y adquiridos (hepatopatías severas, en terapias con L-asparaginasa y en terapia trombolítica). Valores aumentados de fibrinógeno se relacionan con procesos inflamatorios e infecciosos. Además se elevan con la edad, masa corporal, embarazo, tabaquismo, estrés y el uso de anticonceptivos orales.

El fibrinógeno circulante en plasma puede medirse también por el método coagulante de Clauss (medición del tiempo de coagulación de un plasma diluido en presencia de

exceso de trombina), el método derivado del Tiempo de Protrombina (empleado en equipos automatizados), así como por métodos turbidimétricos e inmunológicos.

6- TEST DEL ETANOL

FUNDAMENTO

El test del Etanol determina la presencia en el plasma de monómeros de fibrina y complejos solubles, significativos en un proceso de coagulación “*in vivo*”.

REACTIVOS

- Plasma pobre en plaquetas (PPP).
- Etanol 96°.
- Agua destilada.

PROCEDIMIENTO

La prueba debe efectuarse antes de transcurrida 1h de la extracción. Colocar en un tubo de hemólisis:

- 0,5 mL de PPP.
- Añadir 0,22 mL de Etanol de 50°.
- Dejar en reposo 10 min, a temperatura ambiente.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La aparición de un gel es expresión de monómeros o de complejos solubles en el plasma. Un test del etanol positivo conduce al diagnóstico de CID, un test negativo no autoriza a excluir dicho diagnóstico. Es más sensible el Test de la protamina.

+ Fibras finas ++ Fibras densas +++ Gel

Las pruebas de aglutinación que detectan los complejos solubles de monómeros de fibrina como el fibrinógeno o los productos de degradación de fibrinógeno/fibrina, pueden ser positivas en una serie de patologías. Han sido utilizadas en el diagnóstico de CID como un indicio de activación de la fibrinólisis secundaria a la activación de la coagulación. Tiene el inconveniente de ser poco sensibles y dar numerosos falsos positivos (elevados niveles de fibrinógeno) y negativos (redisolución).

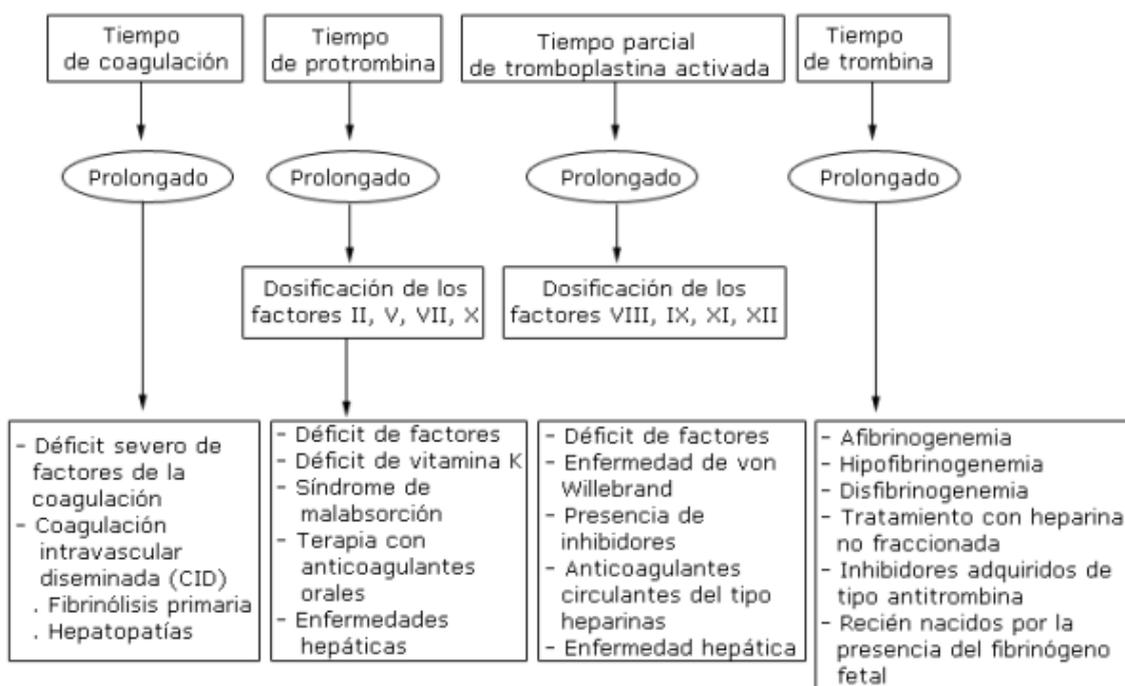


Figura 10. Zamora-González Y. Revista Cubana Hematología, Inmunología y Hemoterapia 2012; 28:141-50.

DISCUSIÓN DE CASOS CLINICOS

Caso N° 1

Paciente de 28 años, gestante de 34 semanas, que ingresa al Hospital por presentar rotura prematura de membranas. Tras 18h se induce el parto. En el período expulsivo (duración: 15 min) presentó fiebre (39,5°C), por lo que se inició antibioterapia, ampicilina (i.v) y tratamiento antitérmico. Durante su estancia en la sala de partos la paciente continuó con fiebre (40°C), no cediendo el sangrado de cavidad uterina. Datos de Laboratorio: TP 10%, KPTT: 106", PDF: positivo, fibrinógeno: no detectable. Hemocultivo: negativo. A la paciente se le realiza transfusión de plasma, crioprecipitado, y se la translada a unidad de terapia intensiva (UTI). Los parámetros al ingreso en UTI: T.A 120/50; F.C. 130 p.m.; T^a 38°C; palidez, discreto edema palpebral, piel caliente; ventilación pulmonar bilateral sin patología; radiografía de tórax normal; E.C.G.: taquicardia sinusal y alteraciones inespecíficas de la repolarización. Es tratada con antibioterapia, administración de líquidos y expansores del plasma, gluconato cálcico, vitamina K, antitrombina III. Se continúa con transfusiones. En su 2° día de estancia en UTI, evidencia mejoría del estado general,

disminuyendo la hemorragia y recuperando las constantes fisiológicas. El 3^{er} día se encuentra clínicamente asintomática, estable hemodinámicamente.

- Qué parámetros de laboratorio se encuentran alterados en la paciente?
- Según la sintomatología y el laboratorio observado, qué diagnóstico propone?
- Cuál es el objetivo del tratamiento instaurado?
- Qué otras determinaciones de laboratorio sugeriría?
- Cómo explicaría el resultado del hemocultivo negativo realizado a la paciente?

Caso N° 2

Mujer de 22 años de edad, sin antecedentes familiares de diátesis hemorrágicas. Gesta 2, Partos 2. No presentó complicaciones durante el embarazo ni el puerperio. Cuatro meses posteriores a su segundo parto inició con un cuadro clínico caracterizado por aparición súbita y espontánea de equimosis y hematomas en múltiples áreas corporales, con predominio en las extremidades superiores e inferiores. Ocho meses después acudió a la Urgencias por tener un importante aumento del volumen de la mano izquierda, comprometiendo la región dorsal y palmar, acompañado de dolor intenso. A la exploración física la mano se presentó con tumefacción y tensión, parestesias y zonas de hipoestesia y anestesia. La TA de ingreso: 120/80 mmHg, FC: 101 lpm y temperatura: 36°C. Laboratorio: Leucocitos 6,670/mm³, Hb: 11 g/dL, Hto: 33,7%, plaquetas: 301.000/mm³, Na⁺ sérico: 141 mEq/L, K⁺ sérico: 3,8 mEq/L, glucosa: 91 mg/dL, creatinina 0,8 mg/dL. Coagulograma: TP: 11,5 seg, TTPA: no detectable. Perfil viral para hepatitis C y B: no reactivos, VDRL negativo, VIH: no reactivo. La paciente fue intervenida quirúrgicamente para liberar la presión de la mano. A las 24 h del post-operatorio presentó abundante sangrado y requirió de transfusiones. Se solicitaron estudios complementarios de Laboratorio:

AC. IgG Anticardiolipina	4.20	GPL
AC. IgM anti-cardiolipina	2.00	MPL
AC. IgG Anti-fosfolípidos	3.02	GPL
AC. IgM Anti-fosfolípidos	3.18	MPL
PERFIL VON WILLEBRAND:		
- T. tromboplastina parcial		+ 57 seg.
- Actividad del Factor VIII		- 1.0 %
- Ag. de Factor de Von Willebrand		93 %
- Ristocetin Co-factor		113 %
- Factor VW unido a colágeno		94 %
	(diluciones)problema/testigo	(correcciones)problema
TTPa	92.2/30 seg.	58.7 seg.
Factor VIII	0.312 UI/dL (%)	
Fibrinógeno	201 mg/dL	
Inhibidor (método de Nijmegen)	32 Unidades Bethesda	

- Con qué patología es compatible el caso clínico presentado?
- Analice los parámetros de laboratorio iniciales y complementarios en función del diagnóstico propuesto.
- Porqué se solicita la determinación de los Ac anti-fosfolípidos y de antígeno de VW?
- Proponga una posible explicación a la patología que presenta la paciente.

Caso N° 3

Mujer de 54 años con antecedentes de asma bronquial. Un mes atrás presentó fiebre (38-39°C) y tos con expectoración blanquecina-verdosa. La Rx de tórax mostró infiltrado inflamatorio en la base del pulmón. Es tratada en forma ambulatoria con cefalexina (2g/d), mejorando la sintomatología clínica con control radiológico negativo. Tiempo después acude a Urgencias por presentar fiebre, cefalea, disnea ligera, tos sin expectoración, visión doble, taquicardia e hipotensión arterial. Examen físico de piel: lesiones petequiales y equimóticas en tórax, abdomen y extremidades superiores e inferiores, con mucosas hipocoloreadas y húmedas. Evaluación de vías respiratorias: murmullo vesicular disminuido. Laboratorio: Hemograma: Hb: 5,7 g/dL, hipocromía, macrocitosis y anisocitosis. Leucocitos: 2.900/mm³. Plaquetas: 13x10⁹/mm³. Coagulograma: Tiempo de Coagulación: 6 min; Tiempo de sangría: 6 min; Coágulo irretráctil; TP: 14 seg (valor control: 13 seg); Reti: 79x10⁹/mm³. Medulograma: integridad de los tres sistemas con hiperplasia megacariocítica.

- a) Qué parámetros de laboratorio se encuentran alterados en la paciente?
- b) En función de la sintomatología y del laboratorio observado, qué diagnóstico propone? Explique la fisiopatología.
- c) El tratamiento inicial con cefalexina, se relaciona con el cuadro que posteriormente presentó la paciente?
- d) Qué otras determinaciones de laboratorio sugeriría?

BIBLIOGRAFIA

- HEMATOLOGÍA PRÁCTICA: INTERPRETACIÓN DEL HEMOGRAMA Y DE LAS PRUEBAS DE COAGULACIÓN. J Huerta Aragonés, E Cela de Julián. Congreso de Actualización Pediatría 2019. Madrid: Lúa Ediciones 3.0; p. 507-528, 2019.
- AVANCES EN HEMOSTASIA. PROECO - Programa de Educación Continua Fundación Bioquímica Argentina (<http://campus.fba.org.ar/>), 2018.
- PRUEBAS DE LABORATORIO PARA LA EVALUACIÓN DE LA HEMOSTASIA: FUNDAMENTOS BÁSICOS. ME Martinuzzo. Hematología 21: 56-68, 2017.
- GUÍA LABORATORIO SERVICIO DE HEMATOLOGÍA Y HEMOTERAPIA. Hospital Universitario Virgen de las Nieves, España, 2011.
- INTERFERENCE IN COAGULATION TESTING: FOCUS ON SPURIOUS HEMOLYSIS, ICTERUS, AND LIPEMIA. G Lippi, M Plebani, E Favaloro. Sem Thromb Hemost; 39:258-66, 2013
- COAGULACIÓN INTRAVASCULAR DISEMINADA. C Fondevila. Hematología 16: 36-40, 2012.
- EL LABORATORIO EN EL DIAGNOSTICO CLINICO. JB HENRY. 20ª Edición. Ed. Marbán, España, 2010.

TRABAJO PRÁCTICO N° 7 – Parte A

ALTERACIÓN EN EL METABOLISMO DE LA GLUCOSA. EVALUACIÓN POR EL LABORATORIO



OBJETIVOS

- Identificar los aspectos más importantes de la patogénesis de la Diabetes.
- Realizar las pruebas de laboratorio relacionadas al metabolismo de la glucosa.
- Interpretar los resultados obtenidos de una prueba de tolerancia oral a la glucosa.

INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM), enfermedad crónica no transmisible, representa en la actualidad un problema de salud pública que alcanza proporciones de pandemia. La prevalencia mundial de la DM en adultos ha aumentado de manera constante en los tres últimas décadas, y lo ha hecho con mayor rapidez en los países de ingresos medianos y bajos. Diversos factores explican esta situación, entre ellos: los procesos de envejecimiento de la población, la creciente urbanización, y la alta prevalencia de obesidad y sedentarismo. Se considera una enfermedad sistémica y con una connotación crónico-degenerativa; junto con las enfermedades cardiovasculares, los tumores malignos y las enfermedades crónicas de las vías respiratorias inferiores, la DM se encuentra entre las entidades con mayor tasa de mortalidad.

La DM es un desorden metabólico caracterizado por hiperglucemia crónica con alteraciones del metabolismo de los carbohidratos, grasas y proteínas, resultante de la disminución de la secreción y/o acción de la insulina por parte de las células β pancreáticas. La DM no controlada se asocia con trastornos micro- y macrovasculares a largo plazo como retinopatía, insuficiencia renal, neuropatía, aterosclerosis y enfermedad cardiovascular, entre otros.

Las formas más frecuentes de DM son: (Tabla 1)

- **DM tipo 1** (DM1; anteriormente denominada insulino dependiente): se caracteriza por una destrucción progresiva de la célula beta, en su mayoría de origen autoinmune, que

conduce a un déficit absoluto de insulina. Representa aproximadamente el 10% de los casos de DM y por lo general aparece en la etapa infanto-juvenil. También puede desarrollarse durante la edad adulta, denominándose LADA (del inglés *Latent Autoimmune Diabetes in Adults*). Se asocia a la presencia de auto-anticuerpos anti-insulina (IAA), y contra distintos componentes del islote: descarboxilasa del ácido glutámico (GAD65), tirosina-fosfatasa 2 (IA-2), isoforma 8 del transportador de zinc (ZnT8). El déficit de insulina junto con el incremento en las hormonas de contra-regulación (glucagón, catecolaminas, etc.) predispone al desarrollo de cetoacidosis.

- **DM tipo 2 (DM2)** es una entidad de carácter silencioso en las primeras etapas de la enfermedad y comprende aproximadamente el 90% de todos los casos de DM. Es más frecuente en adultos mayores de 40 años con antecedentes familiares de DM y se asocia con obesidad y a factores de riesgo cardiovascular (hipertensión arterial y dislipemia, etc). Se desarrolla como consecuencia de la incapacidad del páncreas endócrino de producir suficiente insulina para cubrir el incremento de su demanda debida a una menor respuesta de los tejidos periféricos a la hormona (resistencia a insulina; RI*). Su comienzo es lento y asintomático, se observa un incremento inicial de los niveles séricos de glucosa postprandiales, para luego desencadenarse una hiperglucemia franca en ayunas, sin embargo, su expresión más grave conduce a cetoacidosis y síndrome hiperosmolar no cetósico.

Si bien la mayor parte de los pacientes logra un control metabólico adecuado mediante adopción de estilos de vida saludables (práctica regular de actividad física y plan de alimentación) e hipoglucemiantes orales, durante el transcurso de la enfermedad un porcentaje variable de pacientes puede requerir insulina para lograr dicho control. Además, marcadores inflamatorios como IL-6 o PCR están a menudo elevados en pacientes con DM tipo 2.



**Resistencia a la Insulina*: se define como la disminución de la captación de glucosa mediada por transportador (GLUT- 1, GLUT-2, GLUT-4) en tejido adiposo, hígado y músculo estriado, que lleva a un aumento de secreción de insulina para mantener la concentración de glucosa en niveles fisiológicos.

- **Otros tipos específicos:** son poco frecuentes y se relacionan con defectos genéticos que afectan la función de la célula β , alteraciones del páncreas exocrino (como la fibrosis quística), endocrinopatías, drogas e infecciones. En este grupo se encuentran

las denominadas MODY (*maturity-onset diabetes of young*), que incluye múltiples desórdenes monogénicos de herencia autosómica dominante.

La diabetes tipo MODY se caracteriza por presentar hiperglicemia no cetósica familiar, de inicio en la niñez, adolescencia o adultez. Un indicador para estos casos es la presencia de DM en al menos tres generaciones.

En la actualidad se conocen mutaciones específicas para trece tipos de MODY, siendo los más estudiados:

- MODY 1: mutación en el gen del factor nuclear hepático 4 alfa (HNF-4 α).
- MODY 2: mutación en el gen de la enzima glucocinasa (GCK).
- MODY 3: mutación en el gen del factor nuclear hepático 1 alfa (HNF-1 α).
- MODY 4: mutación en el gen del factor promotor de insulina 1 (IPF-1).
- MODY 5: mutación en el gen del factor nuclear del hepatocito 1 beta (HNF-1 β).
- MODY 6: mutación en el gen del factor de diferenciación neurogénico 1.

Todo lactante diagnosticado de DM antes de los 6 meses debe realizarse un test genético. Se debe considerar realizar pruebas genéticas para descartar MODY a aquellos adolescentes o adultos jóvenes con una hiperglucemia estable sin características de DM1 o DM2 y antecedentes familiares de DM en diversas generaciones (sugestivo de autosómico dominante).

- **DM Gestacional:** se define como cualquier grado de intolerancia a la glucosa que es reconocida durante el embarazo en curso, especialmente durante el 3° trimestre. Esta definición es válida independientemente del tratamiento que requiera, de si se trata de una diabetes previa al embarazo que no fue diagnosticada o de si la alteración del metabolismo hidrocarbonado persiste al concluir la gestación.

Tabla 1. Clasificación etiológica de la Diabetes

I. Diabetes tipo 1
A. Inmuno mediada B. Idiopática
II. Diabetes tipo 2
III. Otros tipos específicos
A. Defectos genéticos de la función de la célula beta B. Defectos genéticos en la acción de la insulina C. Enfermedades del páncreas exocrino D. Endocrinopatías E. Inducida por drogas o químicos F. Infecciones G. Formas no comunes de diabetes inmuno-mediada H. Otros síndromes genéticos a veces asociados con la diabetes
IV. Diabetes mellitus gestacional

Criterios Diagnósticos de DM

Dado que la glucemia es una variable continua, no existe un valor de corte que permita separar la población sana de la enferma, por lo tanto debe recurrirse a estudios epidemiológicos que brinden la evidencia necesaria para establecer un valor diagnóstico. Actualmente el punto de corte utilizado se basa en el umbral del comienzo de la enfermedad microvascular.

Los criterios clínicos actuales están definidos por la OMS y la Asociación Americana de Diabetes (ADA). La OMS considera la glucosa plasmática en ayunas (GPA) y la glucosa plasmática post-carga (PTOG) mientras que la ADA, fomenta el uso de la hemoglobina glicada (HbA1c), la GPA y el PTOG. El motivo para seleccionar GPA o HbA1c sobre PTOG se basa en su factibilidad, aunque este proceder sigue siendo objeto de debate. La inclusión de la determinación de HbA1c dentro de los criterios diagnósticos de diabetes implica necesariamente el empleo de un método certificado por el *National Glicohemoglobin Standardized Program* (NGSP) y estandarizado según el ensayo *Diabetes Control and Complication Trial* (DCCT). En este sentido, valores de referencia superiores a 6,5% para HbA1c se considerarían marcadores de enfermedad (Tabla 2).

Tabla 2. Criterios Diagnósticos de DM

1- Glucosa plasmática en ayunas	≥ 126 mg/dL (7 mmol/L)
2- Glucosa plasmática 2 h post-carga (PTOG)	≥ 200 mg/dL (11,1 mmol/L)
3- Glucosa plasmática al azar (en presencia de síntomas de hiperglucemia)	≥ 200 mg/dL (11,1 mmol/L)
4- Hemoglobina A1c	≥ 6,5% (48 mmol/mol)

La OMS recomienda mantener el punto de corte para GAA de 110 mg/dL (6,1 mmol/l) (Tabla 3). En nuestro país, la Sociedad Argentina de Diabetes (SAD) recomienda:

- 1- Mantener el valor de corte de GAA en 110 mg/dL (6,1 mmol/L) en personas sin factores de riesgo.
- 2- Proponer un valor de GAA de 100 mg/dL (5,6 mmol/L) en personas con factores de riesgo: edad mayor de 45 años, historia familiar de diabetes, índice de masa corporal > 25 kg/m², hipertensión arterial, síndrome de ovario poliquístico, dislipemia e historia de diabetes gestacional.

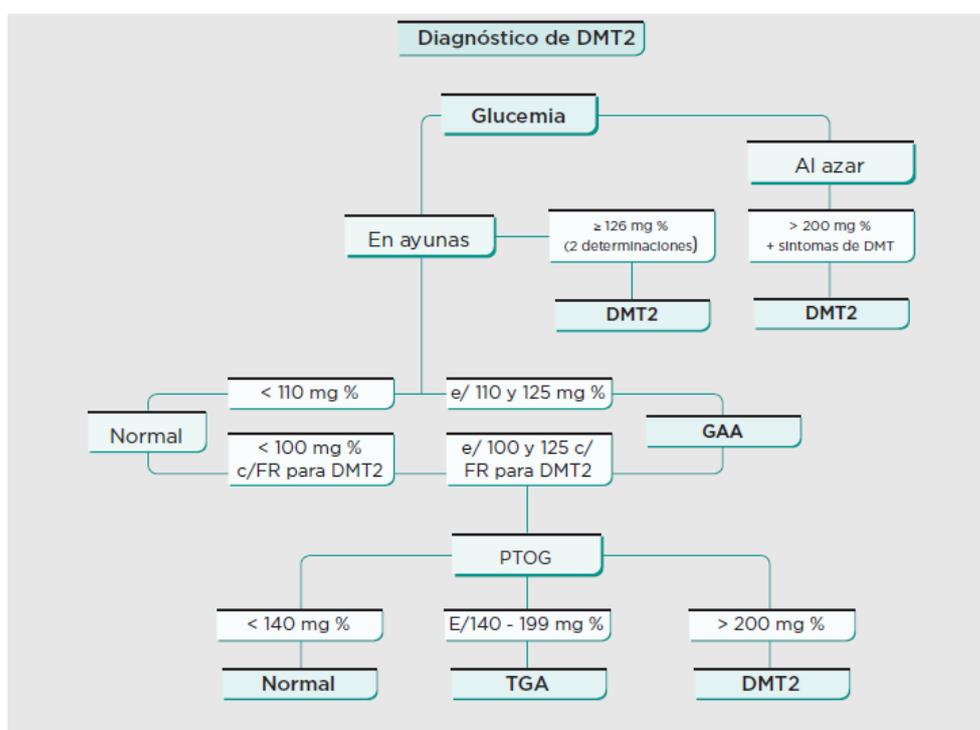
Tabla 3. Criterios para definir el riesgo incrementado a desarrollar DM según OMS

1- Glucosa plasmática en ayunas*	110-125 mg/dL (6,1-6,9 mmol/L)
2- Glucosa plasmática post-carga (PTOG)**	140-199 mg/dL (7,8-11,1 mmol/L)
3- Hemoglobina A1c	5,7- 6,4% (48 mmol/mol)

*Glucosa en ayunas alterada (GAA)

**Tolerancia a la glucosa alterada (TGA)

Tanto la GAA como la TGA no deben ser vistas como entidades clínicas por sí mismas, sino como factores de riesgo de progresión hacia DM y enfermedad macrovascular.



Guía de Práctica Clínica Nacional sobre prevención, diagnóstico, y tratamiento de la DMT2 en el primer nivel de atención. Ministerio de Salud de la Nación (2012).

DETERMINACIÓN DE GLUCOSA: CONSIDERACIONES PRE-ANALÍTICAS

1. Se procede a la extracción de sangre durante la mañana luego del ayuno de una noche (sin ingesta calórica durante al menos 8 h), tiempo durante el cual se puede consumir agua a voluntad. Se evidencia variación diurna de GPA, siendo el valor medio de GPA más elevado durante la mañana que a la tarde.

2. La pérdida de glucosa de los recipientes de muestras constituye un problema serio y subvaluado. La disminución de la concentración de glucosa en sangre *ex vivo* se deben a la glucólisis. La tasa de glucólisis (alrededor del 5%-7%/h, equivalente a 10 mg/dL ó 0,6 mmol/L), varía con la concentración de la glucosa, la temperatura, el recuento de leucocitos, y otros factores.
3. Los inhibidores de glucólisis usados comúnmente son incapaces de prevenir la glucólisis en el corto plazo aunque puede ser atenuada inhibiendo la enolasa con fluoruro de sodio (2,5 mg/mL de sangre).
4. La pérdida de glucosa puede ser minimizada tras una separación inmediata del plasma de las células sanguíneas luego de la obtención de la sangre (la concentración de glucosa es estable durante 8 h a 25°C y 72 h a 4°C en suero separado, no-hemolizado y estéril sin fluoruro).
5. La glucosa puede medirse en sangre, suero, o plasma, pero para el diagnóstico se recomienda plasma. Los anticoagulantes más utilizados son EDTA, heparina de litio y fluoruro de sodio.
6. Las concentraciones de glucosa varían con la edad en los individuos sanos. El intervalo de referencia para niños (3,3–5,6 mmol/L; 60-100 mg/dL), difiere del intervalo para adultos (4,1–6,1 mmol/L; 74-110 mg/dL).
7. Sobre la base de la variabilidad biológica, la medición de glucosa debe tener una imprecisión analítica $\leq 2,9\%$, un sesgo $\leq 2,2\%$, y un error total $\leq 6,9\%$. Para evitar clasificar a los pacientes de manera errónea, la meta del análisis de glucosa es minimizar el error analítico total, y los métodos no deben tener sesgo mensurable.
8. Para la pesquisa de DMT2, se recomienda medir la glucemia con pruebas de laboratorio y no utilizar métodos rápidos.



La variabilidad biológica intraindividual para la glucemia es del 5-7%, por ello se recomienda determinar la glucemia en ayunas por lo menos en **dos ocasiones** antes de establecer el diagnóstico de diabetes o glucemia en ayunas alterada.

Sobre la base de nuevos datos recabados, la ADA en 2019 ha propuesto que el diagnóstico de diabetes podría realizarse a partir de dos resultados anormales obtenidos con dos pruebas diferentes de una única muestra (por ej. GPA y HbA1C).

DIABETES GESTACIONAL (DG)

En el embarazo se produce un estado transitorio de RI, más acentuado durante el segundo y tercer trimestre donde se observa una elevación de la glucemia posprandial e hiperlipemia en ayunas, con aumento de los triglicéridos, LDL colesterol y ácidos grasos libres. La célula β responde a la RI aumentando la secreción de Insulina entre 1,5 a 2,5 veces (hiperinsulinemia fisiológica) para mantener la glucemia dentro de los límites normales. Las mujeres que desarrollan DG son aquellas cuyo páncreas es incapaz de responder al aumento en la demanda de insulina que se genera durante el embarazo. Después del parto, en la mayoría de los casos se produce un retorno al estado euglicémico, pero persiste un riesgo elevado de sufrir DM2 en el futuro. Los fetos de madres con DG poseen mayor riesgo de presentar macrosomía, ictericia e hipoglucemia al nacimiento, por ello la importancia del diagnóstico precoz y seguimiento de la DG.

Dentro de los factores de riesgo para el desarrollo de DG se incluyen: mujer mayor de 30 años, DG previa, historia familiar de diabetes e índice de masa corporal mayor a 27.

Criterios Diagnósticos

Según los criterios de la OMS, se diagnostica DG cuando la embarazada presenta dos o más glucemias en ayunas \geq a 100 mg/dL, asegurando un ayuno de 8 h. A todas las embarazadas se le debe solicitar una GPA en la primera consulta:

- Si el resultado es de 100 mg/dL o más se realiza una nueva determinación dentro de los 7 días y si se reitera un valor \geq a 100 mg/dL, se diagnostica **DG**. Si la 2° determinación es menor de 100 mg/dL, se solicita una PTOG con 75 g de glucosa anhidra (p75) sin tener en cuenta la edad gestacional. Si el valor de glucemia a las 2 h es menor a 140 mg/dL se considera normal y la prueba se repite en la semana que corresponda (24-28 ó 31-33).
- En cambio, sí el nivel de la primera glucosa plasmática es menor de 100 mg/dL se considera normal y se solicita una PTOG entre la semana 24 y 28. Si la p75 realizada entre la 24 y 28 semanas está alterada, se diagnostica **DG**.
- Si la p75 es normal y la paciente tiene factores de riesgo para el desarrollo de DG, debe repetirse entre la semana 31 a 33. Si este estudio está alterado se diagnostica **DG**.
- *Aclaración:* Si la paciente tiene factores de riesgo importantes se puede considerar efectuar la p75 antes de la semana 24.

DIAGNÓSTICO DE DIABETES GESTACIONAL
<ul style="list-style-type: none"> • 2 determinaciones de Glucosa plasmática en ayunas \geq 100 mg/dL
<ul style="list-style-type: none"> • Valor de Glucosa plasmática a las 2 h de la PTOG \geq 140 mg/dL

- A fin de simplificar el diagnóstico, en especial en países en desarrollo, la OMS recomienda como prueba de *screening* realizar una PTOG en todas las embarazadas entre las semanas 24 y 28 de gestación, usando 75 g de glucosa y tomando dos muestras de sangre, a los 0 y 120 min postcarga.

PRUEBA ORAL DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA (PTOG) – NORMALIZADA

La PTOG evalúa la eficiencia con que metaboliza la glucosa y es considerada más sensible que la determinación de GPA para el diagnóstico de diabetes. Además, permite distinguir entre individuos sanos y aquellos con intolerancia a la glucosa, un estado caracterizado por RI periférica y alteración del segundo pico secretorio de insulina, que se asocia con un riesgo incrementado de desarrollar DM2.

A los pocos min de haber ingerido la solución de glucosa, la glucemia se eleva indicando una rápida absorción a nivel duodenal. LA velocidad de absorción es dependiente de la concentración de glucosa y es mediada por el transportador SGL1. El valor pico de glucemia se alcanza entre los 30 y 60 min luego de la ingesta, comenzando a decaer a los 90 min debido al aumento en la secreción de insulina (Figura 1).

Preparación del paciente: el paciente deberá:

1. Realizar actividad física habitual (No se debe guardar reposo, y no incrementar la actividad física que habitualmente desarrolla en los 3 días previos).
2. Realizar una dieta libre: este concepto implica que 3 días previos a la prueba el paciente deberá consumir un mínimo de 150 g/día de hidratos de carbono.
3. Informar si está medicado con corticoides o beta adrenérgicos. No comenzar en ese momento terapia anticonceptiva oral. Deberá evitar 12 h antes:
 - *Gastrocinéticos:* Mosapride, Metoclopramida, Domperidona.
 - *Anticolinérgicos*
 - *Antidepresivos con efecto anticolinérgico:* Olanzapina.
 - *Benzodiazepinas:* Diazepam, Bromazepam, Clonazepam.
4. Suspender la prueba ante la presencia de un cuadro agudo: síndrome febril, enfermedades infecciosas, enfermedades del aparato digestivo (vómitos, diarrea, síndrome de mala absorción), traumatismo agudo, etc. No debe estar internado, inmovilizado o desnutrido.

Toma de Muestra

Debe realizarse un ayuno previo de 8 h, siendo importante que la última comida se haya efectuado antes de las 00:00 h. Se puede consumir agua. Para la extracción de sangre venosa, se emplea como anticoagulante Heparina o EDTA. Previa administración de la solución glucosada, se debe determinar la glucemia basal. **De ser mayor a 126 mg/dL, no se debe continuar con la prueba con fines diagnósticos.**

Administrar:

- Adultos: 75 g de glucosa *anhidra* en 375 mL de agua (o el equivalente: 80 g de glucosa pentahidratada de los preparados comerciales en polvo; en los *preparados líquidos* debe completarse hasta 375 mL, según el fabricante). En todos los casos la solución final es al 20%.

- Niños hasta 12 años: 1,75 g de glucosa anhidra por kg de peso o su equivalente en los otros preparados (no debe superar los 75 g de glucosa).

La solución de glucosa debe tomarse dentro de los 5 min, realizándose la extracción a los 120 min, a partir del comienzo de la ingesta.

INTERPRETACIÓN

- Glucosa post-carga a las 2 h: < 140 mg/dL: PTOG normal
- Glucosa post-carga a las 2 h: 140 mg/dL - 199 mg/dL: PTOG alterada
- Glucosa post-carga a las 2 h: ≥ 200 mg/dL: diagnóstico de diabetes

Cabe mencionar que la variabilidad biológica intraindividual para la PTOG es de 14%, por ello se recomienda realizar la prueba por lo menos en dos ocasiones antes de establecer el diagnóstico de diabetes o tolerancia a la glucosa alterada.

Mientras que la PTOG implica sólo 2 determinaciones (0 y 120 min), la **Curva de Tolerancia Oral a la Glucosa** involucra 3 o más determinaciones (por lo general, 30, 60, 90 y 120 min). Esta prueba se reserva para investigaciones puntuales y, en caso de ser requerida, el médico debe dejarlo aclarado en su solicitud.

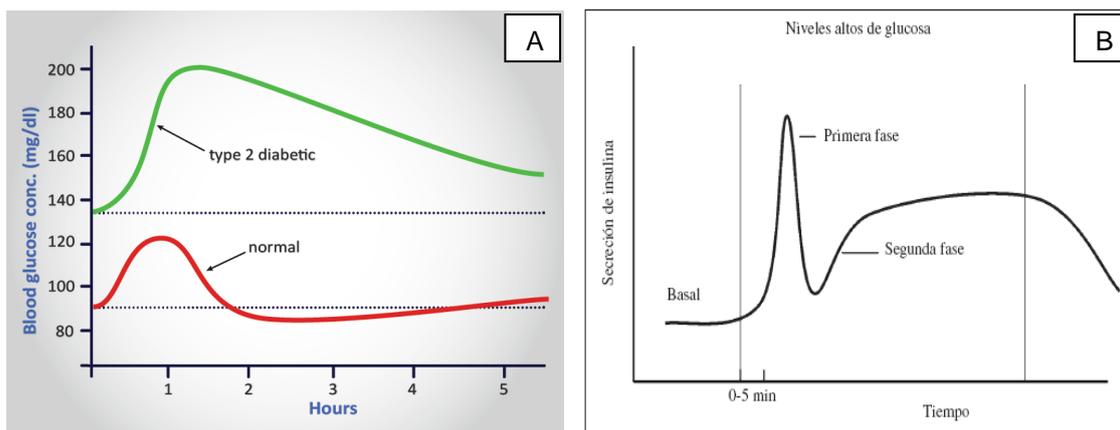


Figura 1. A) Curva de tolerancia a la glucosa en una persona normal respecto a un paciente con diabetes tipo 2. Las líneas punteadas indican el rango de la concentración de glucosa en una persona normal. 1B) Secreción bifásica de Insulina. La secreción endógena de insulina consta de una primera fase con un pico plasmático a los 5 min del estímulo secretorio y de una segunda fase que alcanza niveles plasmáticos inferiores, pero se mantienen en el tiempo (<https://themedicalbiochemistryge.org/es/index.php>).

GLICACIÓN DE PROTEÍNAS

La glucosa circulante tiene la capacidad de reaccionar con los grupos amino de las proteínas para formar derivados glicosados. En condiciones fisiológicas, esta reacción de adición transcurre en forma lenta y no involucra la participación de enzimas. Las proteínas con sitios reactivos pueden ser glicosadas y la concentración de productos de glicación es un reflejo de los niveles de glucosa circulantes durante un determinado periodo de tiempo, lo que revierte interés desde el punto de vista diagnóstico. Si la reacción de adición se realiza sobre una molécula de hemoglobina, el producto final se denomina hemoglobina glicada. En cambio, si la reacción de adición ocurre en una molécula de albúmina u otra proteína del suero, la cetoamina resultante se conoce como fructosamina.

En la diabetes, el estado de hiperglucemia crónica genera un exceso de productos de glicación, los cuales poseen la capacidad de reaccionar con otras proteínas, alterando su estructura y función. Resultan especialmente susceptibles las proteínas que conforman la matriz extracelular, membrana basal glomerular y paredes de los vasos sanguíneos. Estos derivados glicosados también pueden unirse a receptores de superficie (AGE-binding receptors) en distintos tipos celulares, desencadenando reacciones pro-inflamatorias que contribuyen a las complicaciones micro- y macrovasculares en la DM.

En contraste, el término glicosilación representa la unión catalizada enzimáticamente de un resto de glucosa a grupos hidroxilos de la proteína. Esta reacción ocurre sobre restos de 5-hidroxilisina, serina o treonina presentes en la molécula de colágeno. La glicosilación

involucra la formación de UDP-glucosa a partir de UTP y glucosa 1-fosfato por una pirofosforilasa, seguida de la transferencia del residuo de glucosa a los grupos hidroxilos aceptores por una glucosil transferasa.

Aunque la denominación de hemoglobina glicada es la correcta se ha generalizado el uso del término hemoglobina glicosilada en los laboratorios y en los kits comerciales.

- HEMOGLOBINA GLICADA

La hemoglobina humana adulta (Hb) comprende a la HbA (97% del total), HbA2 (2,5%) y HbF (0,5%). Está formada por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas α y dos cadenas β . El análisis cromatográfico de HbA identifica Hb menores llamadas HbA1a, HbA1b, y HbA1c.

La **HbA1c**, también conocida como hemoglobina glicada, se origina por la condensación de glucosa con el grupo amino terminal de un resto del aminoácido valina de cada cadena β de la HbA para formar una base de Schiff inestable (aldimina, pre HbA1c), la cual sufre un reordenamiento llamado *reordenamiento de Amadori*, formándose una cetamina estable: HbA1c. Esta forma la mayor parte de las hemoglobinas rápidas constituyendo aproximadamente el 80% de las hemoglobinas A1.

La glicación de la Hb es un proceso relativamente lento, que sucede durante los 120 días de la vida media del eritrocito. Por ello, la HbA1c refleja la glucemia media del individuo en los tres o cuatro meses previos a la toma de la muestra siendo en la actualidad el principal parámetro para definir el grado de control y los objetivos del tratamiento hipoglucemiante en la DM.

La HbA1c representa del 3 al 6% de la hemoglobina total de los individuos sanos, y puede duplicarse o triplicarse en pacientes con DM según sus niveles de glucemia.

Bases Bioquímicas de los métodos para Hb glicada

Existen en el mercado diferentes métodos para la determinación de la HbA1c, lo que conlleva a una sensible diferencia entre los resultados e intervalos de referencia que nos ofrecen los distintos laboratorios. Algunos miden el total de las HbA1 y otros, sólo la concentración de la HbA1c.

Los métodos de análisis de HbA1c pueden dividirse en dos categorías: métodos basados en las diferencias de carga (cromatografía líquida de intercambio iónico y electroforesis) y los métodos basados en las diferencias estructurales (cromatografía de afinidad con columnas de boronato, inmunoensayos y espectrometría de masa). En la

actualidad, la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, *high performance liquid chromatography*) de intercambio catiónico es considerada el método de referencia del *National Glycohemoglobin Standardization Program* (NGSP) para determinación de HbA1c en los laboratorios clínicos.

Cabe destacar que los laboratorios deben usar solo métodos certificados por el NGSP para cuantificar la HbA1c, con trazabilidad al método de referencia de *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT). En Argentina, la mayoría de los laboratorios no usan métodos certificados para determinar HbA1c y la variabilidad de resultados no permite recomendar por el momento, a la HbA1c como método diagnóstico de diabetes.

Para la determinación de HbA1c, si bien HPLC tiene una alta precisión y exactitud, su procedimiento es técnicamente complejo y no se usa como rutina en la práctica clínica. En la actualidad, en los laboratorios se emplean métodos inmunológicos como los inmunturbidimétricos.

Los **métodos inmunológicos** utilizan anticuerpos contra una secuencia de aminoácidos que varían de 3 a 8 de la fracción N-terminal de la hemoglobina glicada. Tienen como ventaja que son específicos contra la HbA1c y pueden ser incorporados a los autoanalizadores de química clínica mediante métodos de inmunturbidimetría (Figura 2).

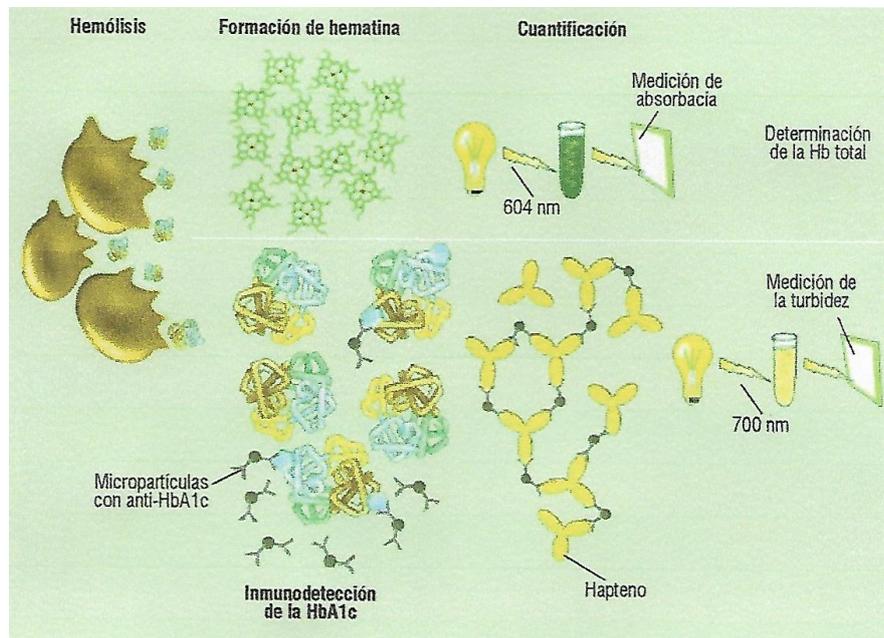


Figura 2. Determinación de HbA1c por inmunturbidimetría. En esta técnica se cuantifican hemoglobina total y HbA1c. Para cuantificar hemoglobina total se hemoliza la muestra y la solución se somete a un buffer alcalino de un detergente no iónico, convirtiendo la hemoglobina en hematina. La hematina torna la solución de color verde, que es medida a 604 nm. Para la determinación de la HbA1c también se hemoliza la muestra; y se procede en dos pasos: 1) la solución es incubada con micropartículas cubiertas con anticuerpos específicos

dirigidos contra la HbA1c; en esta reacción se une un solo anticuerpo a cada sitio de glicación presente en la hemoglobina. 2) una vez finalizado este paso, se adiciona en la solución un hapteno aglutinante que posee varios sitios inmunorreactivos, que unirá las micropartículas con anticuerpos que han quedado libres; en este paso se pueden unir varios anticuerpos a una sola molécula de haptenos y darse el fenómeno de aglutinación. La determinación requiere de la cuantificación de la turbidez de la suspensión a 700 nm. Así, a mayor aglutinación mayor cantidad de anticuerpos libres y menor concentración de HbA1c disponible para unir las micropartículas a los anticuerpos, en consecuencia HbA1c compete con el hapteno por la unión del anticuerpo. Medicina y Laboratorio (2010). 16:211-241.

VALORES DE REFERENCIA

De acuerdo a las recomendaciones internacionales, los resultados de HbA1c pueden ser informados de manera simultánea en unidades según la International Federation for Clinical Chemistry (**IFCC**; mmol/mol) y **NGSP** (%). Se utiliza la ecuación (1) para calcular el equivalente en unidades IFCC a partir de unidades NGSP/DCCT (%):

$(1) \text{ IFCC (mmol/mol)} = (\text{NGSP \%} - 2,15 / 0,915) \times 10$	- VR IFCC: 20 - 44 mmol/mol - VR NGSP: 4 - 6,2 %
---	---

La HbA1c se informa como el por ciento total de hemoglobina, tomando los valores del NGSP. Por ejemplo, un resultado de HbA1c de 7% (en unidades NGSP) es equivalente a 53 mmol/mol (en unidades IFCC), y a un promedio glucémico de 9,5 mmol/L (150 mg/dL)

La HbA1c no refleja los niveles de la glucosa sanguínea en el momento de la toma de muestra, ya que es un promedio y, por lo tanto, no puede mostrar los valores puntuales de hipo o hiperglucemia (Tabla 4).



La ADA recomienda, al igual que otras asociaciones, que la hemoglobina glicada se realice al menos 2 veces al año en pacientes con un control glucémico estable y trimestral en aquellos que ha sido necesario modificar tratamiento, o en los que no alcanzan las metas para el control glucémico.

Tabla 4. Relación aproximada entre los niveles de glucosa promedio en sangre venosa y el valor de HbA1c

HbA1c (%)	Estimación de la glucosa promedio (mg/dL)
5	97
6	126
7	154
8	183
9	212
10	240
11	269
12	298

Factores que interfieren en la interpretación de los resultados

Los resultados pueden diferir dependiendo de la técnica utilizada, la edad del sujeto y las variaciones biológicas entre individuos.

Niveles de HbA1c disminuidos pueden encontrarse en persona que recibieron recientemente una transfusión de sangre, o con un conteo subnormal de hematíes, como en los individuos con anemias crónicas (déficit de hierro, déficit de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, drepanocitosis, pérdida de sangre crónica, o alguna otra condición que cause muerte prematura de las células rojas). Asimismo, niveles de HbA1c más altos de lo esperado se relacionan con una mayor vida media del hematíe (sujetos esplenectomizados, con deficiencia de vit B12).

CONTROL DE CALIDAD

Todos los laboratorios clínicos que cuantifican HbA1c deben:

- a) Implementar procedimientos de CCI que permitan validar los resultados de pacientes analizando al menos dos niveles de control, uno de ellos cercano al valor 6,5% de HbA1c en cada corrida analítica.
- b) Calcular el coeficiente de variación analítico (CV%) mensual para el seguimiento de la variabilidad de sus mediciones. Se recomienda un CV intra-laboratorio < 2% e inter-laboratorio < 3,5%).
- c) Participar en algún programa de evaluación externa de calidad de las mediciones de HbA1c.

- FRUCTOSAMINA

Las proteínas glicosiladas se forman por enlace covalente de la glucosa con residuos lisina de las proteínas sanguíneas (principalmente albúmina) dando lugar a bases de Schiff que en una segunda etapa son transformadas irreversiblemente en cetoaminas (fructosamina).

En algunos pacientes diabéticos, durante el monitoreo de DG o cuando se realiza un cambio a nivel terapéutico utilizando una droga diferente, es necesario realizar un ensayo que sea un indicador más sensible de los niveles de glucosa circulante a corto plazo. Por esta razón, se utiliza la determinación de fructosamina teniendo en cuenta que la vida media de las proteínas plasmáticas es menor que la del hematíe. Si consideramos que la proteína más abundante es la albúmina y su vida media oscila entre 18 a 20 días, la

concentración de albúmina glicada refleja el valor promedio de los niveles de glucosa en las últimas 2 a 3 semanas. La determinación de fructosamina también es útil cuando existen desórdenes relacionados con la Hb (hemoglobinopatías) que impidan la cuantificación de HbA1c.

Si bien los niveles de proteínas glicadas son un complemento a las determinaciones de glucosa en la valoración del control glucémico, estas proteínas no son fiables para el diagnóstico de la DM.

El método de análisis que frecuentemente se emplea es el colorimétrico, y tiene la ventaja de ser un método simple, rápido y factible de automatizar.

VALORES DE REFERENCIA: 205 a 275 $\mu\text{mol/L}$.

En caso de hipo-proteinemias muy marcadas, se recomienda referir los valores de fructosamina al valor de las proteínas totales.

Grupos	VR ($\mu\text{mol /L}$)
Adultos	hasta 275
Niños 1 a 6 años	" 239
Niños 7 a 12 años	" 263
1er trimestre embarazo	" 259
2do trimestre embarazo	" 231
3er trimestre embarazo	" 221

INSULINA

Es una hormona que se sintetiza en la célula β pancreática a partir de un precursor, la pro-insulina. Esta molécula sufre distintos clivajes en el aparato de Golgi, derivando en la formación de Insulina, péptido C y aminoácidos básicos. Además, pequeñas cantidades de pro-insulina y productos intermedios de conversión son normalmente liberados a circulación.

La valoración de la insulina en sangre se realiza generalmente en forma asociada a la POTG para evaluar el estado del páncreas del paciente respecto de su capacidad secretora. Se ha descrito que el hiperinsulinismo está presente años antes de que se produzca la alteración en la secreción de insulina. También es importante determinar la insulina en situaciones de hipoglucemias de ayuno para detectar un probable insulinoma.

La insulina puede determinarse por distintos métodos (RIA, electroquimioluminiscencia, ELISA), sin embargo todavía existen serios problemas de

estandarización que hacen diferir sustancialmente los valores de un laboratorio a otro. Algunos ensayos, por ejemplo, presentan reactividad cruzada con pro-insulina y otros intermediarios de secreción, llevando al informe de resultados erróneos, especialmente en los casos en que la pro-insulina se halla incrementada (DM2, intolerancia a la glucosa).

Por otra parte, no existe aún un nivel concreto universalmente aceptado de insulinemia, tanto basal como 2 h poscarga de glucosa, que permita identificar y separar adecuadamente normalidad de patología, por lo que la selección de un valor de insulina plasmática es en definitiva arbitraria. Esto es particularmente importante en un parámetro con tanta variabilidad biológica (VR: 2-15 μ UI/mL).

Una forma indirecta de medir IR es el HOMA (*Homeostasis Model Assessment*), basado en un modelo matemático que emplea la determinación de glucosa e insulina en ayunas. Permite obtener una medida semi-cuantitativa de la sensibilidad a la insulina y de la función de la célula β . Estudios prospectivos en la población adulta demuestran que sujetos con índice HOMA e insulinemia por encima del percentil P₉₀, conlleva a alteraciones cardiovasculares.

$$\text{HOMA} = [\text{Glucemia basal (mmol/L)} \times \text{Insulinemia basal (\mu U/mL)}] / 22,5$$

- Factor de conversión de glucosa mg/dL a μ mol/L: 0,0555

VALORES DE REFERENCIA

- En general el valor promedio de HOMA en sujetos normales es aproximadamente de 2,0.
- El valor asociado a RI puede variar en distintas poblaciones aunque en la mayoría de los estudios se asocian valores mayores a 2,5 ó 3 como indicadores de RI.
- Tener presente que los rangos de referencia dependen mucho del método empleado para la determinación de insulina.
- Los valores bajos de HOMA indican sensibilidad a insulina elevada.

PEPTIDO C

El Péptido C (PC) se utiliza como marcador de actividad de la célula β , y es secretado en concentraciones equimolares junto con insulina y, a diferencia de ella, no es removido de circulación por el fenómeno de primer paso hepático, presentando una vida media de alrededor de 30 min. Bajas concentraciones de PC se relacionan con secreción disminuida de insulina, tal como ocurre en la DMI y LADA. Por el contrario, en estados asociados a hiperactividad de la célula β como son el hiperinsulinismo y el insulinoma, las concentraciones de PC se hallan elevadas. También se emplea en la evaluación de la

reserva y secreción de insulina en diabéticos tratados con insulina, ya que los métodos de valoración no distinguen entre la hormona endógena y la exógena. El PC se determina en suero, plasma u orina de 24 h.

VALORES DE REFERENCIA: 0,3-1,3 nmol/L

ALBÚMINA URINARIA

La determinación de albúmina urinaria (antes microalbuminuria) resulta fundamental para detectar aquellos pacientes en riesgo de desarrollar lesión renal en una etapa en la cual todavía no existen evidencias clínicas de nefropatía. La presencia de albúmina urinaria se define como una excreción de albúmina por encima del rango normal para sujetos sanos no diabéticos, pero no detectable con las tiras reactivas utilizadas normalmente para la detección de proteínas en orina. Las muestras empleadas pueden ser orina ocasional, primera orina de la mañana, segunda orina de la mañana, orina en un tiempo definido (nocturna de 8, 10 ó 12 h) u orina de 24 h.

Tabla 5. Definiciones de anomalías en la excreción de albúmina

Clasificación	Primera orina de la mañana ajustada a creatinina (relación albúmina/creatinina)
Normal	< 30 mg/g
Albuminuria (antes microalbuminuria)	30-299 mg/g
Albuminuria Clínica	> 300 mg/g

Consideraciones generales

- La recolección de la primera muestra matinal de orina proporciona menos variabilidad intraindividual que la obtenida al azar y el valor de referencia es semejante al de la orina de 24 h cuando se expresa en relación a la creatinina (relación albuminuria/creatininuria).
- La albúmina urinaria debe medirse en muestras de orina que no hayan sido congeladas. La albúmina urinaria es adecuadamente estable cuando se almacena entre 2-8°C, durante 7 días, antes de medirla.
- Cualquier opacidad debida a precipitados o a componentes celulares debe ser removido por centrifugación, antes de refrigerar.
- Antes de la medición, la orina refrigerada debe calentarse a temperatura ambiente para disolver el precipitado que se pudiera haber formado y que adsorbe albúmina. Debe

verificarse visualmente la no existencia de precipitado y, de haberlo, eliminarlo por centrifugación.

- En todas las mediciones de albúmina urinaria debe informarse la relación de excreción albuminuria/creatininuria, ya que muestra la menor variabilidad biológica intraindividual.

- Se recomienda adoptar las unidades del Sistema Internacional de Medidas (SI) en el informe de los resultados.

- Una de las limitaciones más importantes en la evaluación de este analito es la variabilidad biológica que alcanza el 40%.

Procedimientos rutinarios para la medición de la albúmina urinaria

Una concentración de albúmina menor a 150 mg/L se encuentran por debajo del límite de detección de las tiras reactivas usadas rutinariamente en el análisis de orina. Los inmunoensayos disponibles (incluyendo los procedimientos turbidimétricos y nefelométricos) tienen límites de detección entre 2 y 10 mg/L.

Los formatos de los métodos incluyen:

- Tiras específicas para albúmina urinaria de flujo lateral con inspección visual semicuantitativa.

- Reactivos líquidos con mediciones cuantitativas mediante nefelometría o espectrofotometría.

Los métodos de rutina utilizan tanto anticuerpos monoclonales como policlonales, lo que puede influenciar su sensibilidad para medir las formas alteradas y los fragmentos de albúmina.

Otros métodos

La cromatografía líquida por exclusión de tamaño (tamizado molecular) ha sido utilizada como un método alternativo y da, consistentemente, resultados más altos que los inmunoensayos para la mayoría de los tipos de muestra. Este hecho ha llevado a la controvertida hipótesis que el método detecta formas que no se detectan mediante los inmunoensayos, la cual ha sido cuestionada sobre la base de la reactividad documentada de los antisueros policlonales con múltiples sitios antigénicos en la albúmina y por que el método incluye otras proteínas con un tamaño molecular similar al de la albúmina, incluyendo varias proteínas urinarias. Otros métodos disponibles incluyen a los: RIA, enzoinmunoensayos (ELISA, EMIT, CEDIA); fluoroinmunoensayos, inmunoensayos quimioluminiscentes y electroquimioluminiscentes; electroforesis con chip y cromatografía líquida con detección por espectrometría de masas.

Observaciones

- Si la relación albuminuria/creatinuria (RAC) es igual o mayor a 300 mg/g, el laboratorio deberá proponer al médico investigar proteinuria.
- Se sugiere no realizar la determinación de albuminuria en caso de infección urinaria, hematuria o flujo vaginal.
- Al interpretar los resultados el médico deberá tener en cuenta la presencia de insuficiencia cardíaca descompensada, HTA descontrolada, diabetes descompensada, ingesta de medicamentos que influyen sobre la hemodinamia renal o sobre la excreción de albúmina por orina (IECA , ARA II, AINEs, etc.).

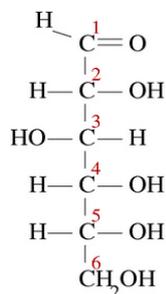
DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO DE LABORATORIO

Actualmente existen numerosas pruebas de laboratorio para el diagnóstico y el seguimiento de los pacientes con DM: determinación de glucemia en ayunas y post-carga, presencia de cuerpos cetónicos, hemoglobina glicada y fructosamina, albuminuria y determinación de marcadores genéticos y de autoinmunidad. Así mismo, la determinación periódica de lípidos (colesterol de las LDL y las HDL y triglicéridos), en el contexto de la valoración de factores de riesgo de enfermedad cardiovascular en personas con DM, ha demostrado la máxima utilidad (nivel de evidencia A). La técnica considerada de referencia para la determinación de glucosa es la de la **hexoquinasa**.

En esta técnica la glucosa es fosforilada por ATP en presencia de hexoquinasa y Mg^{+2} . La glucosa-6P formada es oxidada por Glucosa 6-P deshidrogenada (G-6-PD) a 6-fosfogluconato en presencia de nicotinaminadeninucleotido fosfato ($NADP^{+}$). La cantidad de NADPH formada es directamente proporcional a la cantidad de glucosa presente en la muestra, midiéndose la absorbancia a 340 nm. Si la G-6-PD utilizada es purificada a partir de la bacteria *Leuconostoc mesenteroidees* puede utilizarse NAD^{+} , como cofactor.

ACTIVIDAD PRÁCTICA

1) DETERMINACIÓN DE GLUCOSA PLASMÁTICA EN AYUNAS



Glucosa

La *glucosa plasmática en ayunas* es considerada por muchos autores como la mejor prueba para el diagnóstico de DM, dada su simplicidad, bajo costo, reproducibilidad y disponibilidad generalizada. El hallazgo de valores por encima de 126 mg/dL en más de una ocasión es diagnóstico de DM, siempre y cuando la determinación de glucosa haya sido realizada por métodos específicos (glucosa-oxidasa, glucosa deshidrogenada o hexoquinasa).

Toma de Muestra

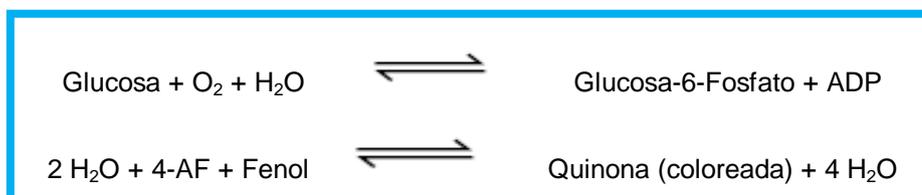
Para el análisis de la glucosa plasmática en ayunas la sangre debe ser extraída después del ayuno nocturno (por lo menos 8 h), entre las 7:00 y 9:00 h. Puede emplearse heparina o EDTA como anticoagulante. El plasma debe ser separado de las células en un plazo menor de 60 min. Si esto no es posible, la muestra debe recogerse en un tubo que contenga un inhibidor glucolítico como el fluoruro sódico. Las concentraciones de glucosa en sangre disminuyen con el tiempo, su índice se sitúa en el 5-7% (alrededor de 10 mg/dL)/h a temperatura ambiente, y varía con la concentración de glucosa, el hematocrito, el recuento de células blancas y otros factores menos conocidos. Cualquier otro líquido biológico como líquido ascítico, exudado pleural o líquido cefalorraquídeo (en caso de tratarse de un líquido con sangre) debe ser centrifugado y trabajar con el sobrenadante.

- Técnica de la Glucosa Oxidasa

FUNDAMENTO

La enzima glucosa-oxidasa cataliza la oxidación, en presencia de agua, de glucosa a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. Si al sistema se le agrega la enzima peroxidasa y un aceptor de oxígeno cromogénico como 4-amino-fenazona u orto-dianiscidina, resulta en la formación de un compuesto coloreado cuya concentración es proporcional a la cantidad de glucosa presente en la muestra. La glucosa oxidasa es específica para la β-D-glucosa y teniendo en cuenta que en solución la glucosa se encuentra alrededor del 34% en la forma α- y 64% en la forma β, la reacción completa requiere de la muta-rotación de la forma α a la

β. Por esa razón, algunos kits comerciales incluyen en su formulación la enzima mutarotasa, con el fin de acelerar la reacción. El segunda reacción, que involucrada a la peroxidada, es mucho menos específica que la de glucosa oxidasa y existen muchos interferentes como ácido úrico, ácido ascórbico, bilirrubina, tetraciclinas y glutatión, que inhiben la reacción por competir con el cromógeno por el peróxido de hidrógeno, produciendo error por defecto. El producto coloreado se lee en espectrofotómetro a 505 nm.



PROCEDIMIENTO

	Blanco	Testigo	Muestra
Testigo (T)		20 μL	
Muestra (M)			20 μL
Reactivo de trabajo	2 mL	2 mL	2 mL

- Incubar todos los tubos durante 10 minutos en baño a 37°C y luego leer en espectrofotómetro a 505 nm. Si utilizamos un testigo que contiene 100 mg/dL, el cálculo se realiza de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} \text{Abs T} & \dots\dots\dots 100 \text{ mg/dL} \\ \text{Abs M} & \dots\dots\dots X = \frac{\text{Abs M} \times 100}{\text{Abs T}} = \text{Concentración M} \end{aligned}$$

2) PRUEBA DE TOLERANCIA ORAL A LA GLUCOSA (PTOG)-NORMALIZADA

- Determinar la glucemia a partir de las muestras obtenidas durante la realización de la PTOG.
- Graficar (concentración de glucosa en función del tiempo).
- Interpretar los resultados obtenidos y elaborar conclusiones.

RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

1) Un paciente de 20 años de edad realiza una consulta médica porque siente que su rendimiento universitario y físico ha disminuido, tiene mucho sueño, sed y deseos de orinar. Su alimentación últimamente es muy desordenada, a base de comidas rápidas. El médico solicita una rutina cuyos resultados son:

- Hemograma: GB: 7.500mm³; GR: 5.100.000mm³; Hto: 45%; Hb: 15g/dL; PLT: 180.000mm³. Fórmula: N: 65%; B: 0%; E: 0%; L: 33%; M: 2%.

- Glucosa: 124mg/dL; Urea: 65mg/dL; Creatinina: 13mg/L

- Análisis físico-químico de orina: ámbar/límpido/pH:5/densidad:1020. Glucosa: (+); cetonas: no contiene; proteínas: trazas; bilirrubina y urobilinas: normal.

- Sedimento urinario: células: 1 a 2/campo; leucocitos: 1 a 2/campo; hematíes: (-).

- a) ¿Cómo interpreta estos resultados?
- b) ¿Se puede dar un diagnóstico?
- c) ¿Qué prueba realizaría para arribar al diagnóstico?

- Luego de realizar una PTOG el resultado hallado a las 2h es de 200mg/dL. Ahora:

- d) ¿Puede dar un diagnóstico? ¿Por qué?
- e) ¿Puede clasificar su patología? ¿Por qué?

-Si el paciente tuviera glucosas basales superiores a los 300 mg/dL y serología: anticuerpos anti-células de los islotes (ICAs) reactivos (positivos),

- f) ¿Qué diagnóstico propone?

2) Un paciente diabético concurre al médico luego de 6 meses para realizarse un control.

- a) ¿Qué análisis le conviene solicitar al médico para valorar el control glucémico?
- b) ¿Qué rango de tiempo le abarca? JSR
- c) ¿Sirve para diagnóstico? ¿Cuál es su utilidad?

- Si el paciente sufriera una anemia hemolítica:

- d) ¿Qué análisis le conviene más al médico solicitar para valorar la glucosa? JSR
- e) ¿Qué rango de tiempo le abarca? JSR
- f) ¿Sirve para diagnóstico? ¿Cuál es su utilidad?

3) Una niña de 11 años entra a sala de emergencia en el hospital a las 20h, manifestando decaimiento, escalofríos y fuertes dolores al orinar. Al momento del ingreso tiene 38°C. Durante la revisión médica, la paciente presenta buen estado general y el médico

solicita: recuento de blancos, glucemia y sedimento urinario, indicando previa higiene frente a la toma de muestra. Los resultados fueron:

GB: 15.000/mm³ y Glucemia: 1,18 g/L

Sedimento urinario: Células: 1-2/campo; Leucocitos: 50-70/campo; Hematíes: 10-15/campo; Píocitos: (++)

- a) ¿Cómo interpreta los resultados?
- b) Es relevante el resultado de glucosa? ¿realizaría otra determinación? ¿Por qué?
- c) Por los resultados expuestos, ¿cuál sería el diagnóstico probable?

4) Paciente de sexo masculino de 40 años de edad, se realiza dosaje de glucosa en ayunas. El resultado fue de 120 mg/dL.

- a) ¿Cómo interpreta este resultado?
- b) ¿Realizaría otra determinación? ¿Cuál? JSR

Luego de realizar la determinación que usted propuso, el resultado de glucosa fue de 95mg/dL.

- c) ¿Cómo interpreta este resultado?
- d) ¿Realizaría otra determinación? JSR

5) Paciente embarazada de 30 semanas se realiza una orina completa. Los resultados son:

- Físico-Químico de orina: Ámbar/límpido/pH:6/densidad:1.020. Glucosa (+); cetonas: no contiene; proteínas: no contiene. Bilirrubina y urobilina: normal.

- Sedimento urinario: células: 2-3/campo; leucocitos: 1-2/campo; hematíes: no se observan.

- a) ¿Cómo piensa que estaría la glucosa sanguínea?
- b) ¿Cómo se encuentra el umbral renal en la mujer embarazada?

Cuando la ginecóloga ve el resultado, si bien la paciente presentó una PTOG normal, solicita una glucemia en ayunas y una nueva orina completa. Los resultados fueron: Glucemia: 89 mg/dL.

- Físico-Químico de orina: Ámbar/límpido/pH:6,5/densidad:1025; glucosa: no contiene; cetonas: no contiene; proteínas: no contiene; Bilirrubina y urobilina: normal.

- Sedimento urinario: Células: 1-2/campo; Leucocitos: 1-2/campo; Hematíes: (-).

- a) ¿Cómo interpreta los resultados? Plantee las posibles situaciones.

VALORES DE REFERENCIA	
Sangre	Orina
Creatinina: 0,9-1,5 g/24h	Clearance de creatinina: 80-120 mL/min
Urea: 10-50 mg/dL	Diuresis: alrededor 1.500 mL/24h
Creatinina: 0,8-1,4 mg/dL	Proteinuria: menor de 150 mg/24h
Colesterol: < 200 mg/dL	
HDL: > 45 mg/dL	
LDL: < 140 mg/dL	
Triglicéridos: 35-150 mg/dL	
Hb Glicosilada: 4,4-6,7%	
Insulina: 2-15 µUI/mL	

BIBLIOGRAFÍA

- GUÍAS Y RECOMENDACIONES PARA EL DIAGNÓSTICO Y MANEJO DE LA DIABETES MELLITUS. DB Sacks. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana 46: 303-336, 2012.
- STANDARDS OF MEDICAL CARE IN DIABETES. Diabetes Care 33: 1-7, 2010.
- EL LABORATORIO EN EL DIAGNOSTICO CLINICO. JB HENRY. 20ª Edición. Ed. Marbán, 2010.
- PRIMERAS JORNADAS CONJUNTAS DE CONSENSO DEL LABORATORIO EN DIABETES. SAD, 2009.
- ENDOCRINOLOGY. Kronenberg and Williams. 11ª Edición, 2008.
- DIABETES MELLITUS: CLASIFICACIÓN, DIAGNÓSTICO Y BASES FISIOPATOLÓGICAS. Separatas Montpellier, 2007.
- CLINICAL CHEMISTRY AND MOLECULAR DIAGNOSIS. Burtis and Ashwood. 4º Ed. Elsevier 2006.
- LABORATORY DIAGNOSIS AND MONITORING OF DIABETES MELLITUS. World Health Organization, 2002.

TRABAJO PRÁCTICO N° 7 – Parte B

ALTERACIÓN EN EL METABOLISMO DE LOS LÍPIDOS. EVALUACIÓN POR EL LABORATORIO



OBJETIVOS

- Revisión del metabolismo de los lípidos, lipoproteínas, enzimas y receptores involucrados.
- Describir los métodos de diagnóstico de dislipoproteinemias.
- Realizar un perfil lipídico y su interpretación clínica. Relacionar con factores de riesgo cardiovascular y diabetes.

INTRODUCCIÓN

El término dislipidemia hace referencia a cualquier alteración en la síntesis, transporte o metabolismo de las lipoproteínas que altere la concentración plasmática de colesterol total o sus diferentes fracciones transportadoras, así como los niveles plasmáticos de triglicéridos (TG). El estudio de estas anomalías es de importancia, debido a que su alteración cuantitativa o cualitativa en su composición, representan factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, por su participación en la génesis de partículas muy aterogénicas como las lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y quilomicrones (Qm).

Por otro lado, un nivel de lipoproteínas de alta densidad (HDL) inferior a 40 mg/dL se asocia a mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares y la elevación de TG se ha señalado como causante de pancreatitis.

Los trastornos endógenos del metabolismo de las lipoproteínas se clasifican según su etiología en primarias (o hereditarias) y secundarias (o adquiridas) a otra enfermedad o tratamiento farmacológico. Las dislipoproteinemias comprenden las **hiperlipoproteinemias** y las **hipolipoproteinemias**. Fredrickson (1987) dieron a conocer una clasificación fenotípica de las hiperlipoproteinemias asumida por la OMS. (Tabla 1).

HIPERLIPOPROTEINEMIAS PRIMARIAS

Son afecciones de origen genético, que producen elevación de los niveles de lipoproteínas, ya sea por sobreproducción o por fallas en el catabolismo:

A) Hipercolesterolemias, B) Hipertrigliceridemias y C) Hiperlipemias mixtas

Tabla 1. Clasificación de hiperlipoproteinemias

Fenotipo	Anormalidad lipídica	Anormalidad lipoproteica	Aspecto del suero
I	Hipertrigliceridemia exógena	Exceso de quilomicrones	Lechoso
Ila	Hipercolesterolemia	Exceso de LDL	Límpido
Ilb	Hipercolesterolemia + Hipertrigliceridemia endógena	Exceso de LDL + VLDL	Opalescente o turbio
III	Hipertrigliceridemia mixta + Hipercolesterolemia	Aumento de β -VLDL o IDL	Turbio
IV	Hipertrigliceridemia endógena	Exceso de VLDL	Opalescente o turbio
V	Hipertrigliceridemia mixta	Exceso de VLDL + quilomicrones	Turbio o lechoso

A- Hipercolesterolemia

Pertenece al fenotipo Ila de la clasificación de Fredrickson y las causas más comunes son:

A1) Deficiencia del receptor de LDL

Los pacientes con hipercolesterolemia familiar presentan una reducción de la actividad o ausencia de los receptores-LDL. Se caracteriza por la acumulación de las LDL en el plasma debido a mutaciones que afectan a los receptores de LDL (carencia de receptores, afinidad disminuida o dificultades en el proceso de endocitosis mediada por receptor). El aumento de las LDL en el plasma favorece su depósito en la piel y en los tendones formando xantomas tendinosos y/o xantelasmas (depósito lipídico en los párpados), y ateromas al depositarse en las arterias, razón por la cual estos pacientes presentan un riesgo aterogénico elevado.

La enfermedad se expresa con el fenotipo Ila de hiperlipoproteinemias, sin embargo, con menor frecuencia algunos pacientes pueden presentar fenotipo Ilb dado que las partículas de VLDL e IDL (lipoproteínas de densidad intermedia) también son catabolizadas por el receptor LDL. Se hereda en forma autosómica dominante, siendo la forma homocigota la más severa con valores de colesterol que pueden superar los 1.000 mg/dL de plasma. Esta forma puede ocurrir con una frecuencia de 1 en 1.000.000 entre la

población norteamericana y europea. Estos pacientes presentan hipercolesterolemia grave desde el nacimiento y mueren por cardiopatía isquémica en la adolescencia o juventud. En cambio, la forma heterocigota, con valores de colesterol alrededor de 500 mg/dL de plasma, tiene una incidencia de 1 en 500.

A2) Defecto familiar de Apo B-100

Otra mutación que altera el metabolismo de LDL es la presencia de una Apo B-100 mutada en la zona que interviene en el reconocimiento y unión al receptor de LDL. Esta patología se hereda en forma autosómica dominante dando lugar a una hipercolesterolemia similar a la observada en pacientes con mutación del receptor de LDL.

A3) Hipercolesterolemia poligénica

Es la más frecuente dentro de las hipercolesterolemias primarias con fenotipo IIa y dentro de este grupo se debe incluir a los individuos con colesterol total y c-LDL elevados, en los que no se haya demostrado la presencia de las hipercolesterolemias previamente descritas. Se han observado mutaciones que afectan distintos pasos del metabolismo lipídico que junto con factores ambientales desencadenan esta enfermedad. Se expresa a partir de los 20 años de edad, con valores variables de c-LDL siendo la aterosclerosis coronaria la manifestación clínica más importante con ausencia de las manifestaciones cutáneas.

B- Hipertrigliceridemia

B1) Hiperquilomicronemia

a) Deficiencia familiar de LPL (Fenotipo I de la Clasificación de Fredrickson)

Tiene una incidencia muy baja, se transmite en forma autosómica recesiva y las manifestaciones clínicas, como los xantomas eruptivos, comienzan en la primera década de vida. Existe un marcado aumento de los Qm, con la consiguiente elevación de los TG que otorga un característico aspecto lechoso al suero. Los niveles de HDL se encuentran disminuidos. Si bien la LPL cataboliza tanto Qm como VLDL, la deficiencia familiar de lipoproteína lipasa (LPL) debería traducirse en un aumento de ambas partículas. Sin embargo, las VLDL no se hallan elevadas sino que sus niveles suelen ser normales o disminuidos, debido quizás a que su síntesis se encuentra relativamente disminuida.

b) Deficiencia familiar de Apo C-II (Fenotipo I o V de la clasificación de Fredrickson).

El déficit de apo C-II, cofactor de la LPL, genera una hipertrigliceridemia semejante al déficit de dicha enzima. Los pacientes con esta deficiencia genética pueden presentar un fenotipo I o V según que la elevación de Qm se acompañe o no de aumento de VLDL.

La complicación más grave de la hiperquilomicronemia es la pancreatitis aguda que se generaría por la lenta circulación inducida por los Qm en los capilares pancreáticos.

Son frecuentes los dolores abdominales difusos y con frecuencia hay hepato y esplenomegalia, y presencia de xantomas eruptivos en nalgas y extremidades. Los pacientes por lo general son obesos y el metabolismo de glúcidos es normal.

c) Hipertrigliceridemia familiar (Fenotipo IV de la clasificación de Fredrickson).

Su prevalencia se estima entre 0,5-1% de la población general. Se hereda en forma autosómica dominante y se manifiesta en la segunda década de vida. Se caracteriza por aumento de VLDL que puede acompañarse con aumento de QM. Esta patología puede originarse por un trastorno en el metabolismo de carbohidratos, una ingestión excesiva de carbohidratos o un aumento en la producción de VLDL. Se observa la presencia de partículas de VLDL con mayor contenido de TG, que las convierte en un sustrato menos adecuado para la LPL.

C- Hiperlipemias mixtas

Se caracterizan por cursar con aumento tanto de colesterol como de TG. Dentro de las hiperlipoproteinemias primarias se distinguen:

C1) Hiperlipemia familiar combinada (Fenotipos IIa, IIb, IV y V de la clasificación de Fredrickson).

Es la forma familiar más común de hiperlipemia en sobrevivientes de infarto de miocardio jóvenes. Su prevalencia es del 1% de la población general. El defecto genético y la fisiopatología en detalle aún se desconocen. La alteración fundamental consiste en un aumento en la síntesis hepática de Apo B-100 y VLDL asociado frecuentemente a TGs elevados. Los individuos afectados presentan aumento de LDL, VLDL o ambos, frecuentemente acompañados por disminución de HDL y prevalencia de LDL pequeñas y densas. Se observa un aumento en la concentración plasmática de Apo B-100, que refleja un mayor número de partículas. Es característico que se detecten distintos fenotipos

lipoproteicos entre los miembros de una misma familia y que puedan modificarse a lo largo de la vida.

C2) Disbetalipoproteinemia (Hiperlipoproteinemia tipo III de Fredrickson)

Esta enfermedad se caracteriza por la acumulación de lipoproteínas resultantes de la acción de la LPL, las IDL, los Qm remanentes y eventualmente VLDL. Estas lipoproteínas presentan cambios en sus características físico-químicas (movilidad electroforética, enriquecimiento en colesterol). Este conjunto heterogéneo de lipoproteínas es denominado β -VLDL, que presenta movilidad $\beta - \text{pre}\beta$ y se visualiza como una banda ancha en la electroforesis. Una de las alteraciones por la que se produce una eliminación disminuida de estas lipoproteínas residuales es debida a una alteración estructural de la Apo E (presencia de la isoforma E2) que le impide ser reconocida adecuadamente por el receptor hepático.

Como resultado se acumulan estas lipoproteínas en plasma, aunque pueden ser captadas por los macrófagos. Las LDL están reducidas pero como todas las partículas remanentes son ricas en ésteres de colesterol, la concentración de colesterol total está aumentada. Los adultos muestran la presencia de xantomas tuberosos o planares y pliegues cutáneos color naranja por el depósito de caroteonides y otros lípidos.

Las manifestaciones clínicas se observan en 1 cada 10.000 individuos. Se propone que la expresión completa de la enfermedad requiere un factor disparador como el hipotiroidismo, la diabetes u otra hiperlipoproteinemia familiar.

HIPERLIPOPROTEINEMIAS SECUNDARIAS

Algunas enfermedades, estados fisiológicos, ingesta de alcohol o tratamientos farmacológicos pueden alterar el metabolismo lipídico y presentar como manifestación secundaria una hiperlipoproteinemia. Por ello, debe realizarse el diagnóstico o exclusión de una hiperlipoproteinemia secundaria antes de la investigación de una hiperlipoproteinemia primaria (Figura 1).

Diabetes mellitus

Los trastornos del metabolismo de los lípidos que se observan en los pacientes diabéticos están relacionados con el tipo de diabetes, el tratamiento aplicado y el control de la enfermedad. Si bien es posible encontrar valores de lípidos basales normales, se puede afirmar la existencia de alteraciones en el metabolismo intermedio de las lipoproteínas, que se traducen en acumulación de VLDL, disminución de los niveles de HDL, persistencia de

IDL en el plasma y/o formación de LDL de composición alterada. Estas situaciones contribuyen, junto a otros factores de riesgo, a que los pacientes presenten una aterosclerosis acelerada y una morbi-mortalidad cardiovascular de dos a tres veces mayor que la población normal. Hoy en día se considera a la diabetes, especialmente la de tipo 2, como un factor de altísimo riesgo para el desarrollo de enfermedades vasculares (infarto agudo de miocardio, accidente cerebrovascular, etc). Los pacientes diabéticos presentan el mismo riesgo de padecer un infarto de miocardio que los pacientes que ya lo han sufrido. Los mecanismos que producen las alteraciones lipoproteicas van a diferir según el tipo de diabetes:

- *Diabetes tipo 1*: la dislipoproteinemia ocurre como consecuencia de la deficiencia de insulina. La actividad de la LPL está disminuida por lo tanto el catabolismo de las lipoproteínas ricas en TG (Qm y VLDL) se encuentra reducido. Un mecanismo adicional que contribuiría a la hipertrigliceridemia, sería la falta de inhibición de la lipasa hormono-sensible ubicada en el tejido adiposo. Esta enzima en condiciones normales es inhibida por la insulina e hidroliza los TG almacenados aportando así ácidos grasos libres que son utilizados por el hígado como fuente de energía mediante la beta-oxidación, a fin de poder realizar la síntesis de glucosa por gluconeogénesis. En la diabetes tipo 1 descontrolada, el destino principal del acetil-CoA formado será la síntesis de cuerpos cetónicos.

Los niveles de HDL en el paciente diabético tipo 1 pobremente controlado, están disminuidos como consecuencia del escaso catabolismo de las VLDL y los Qm, lo cual impide la maduración de las HDL. Otra característica del cuadro lipoproteico en la diabetes tipo 1, es la presencia de IDL varias horas después de la ingesta. Esta lipoproteína se acumula al no poder ser degradada por la lipasa hepática, ya que esta enzima también es estimulada por la insulina. Además, se debe tener en cuenta que estas lipoproteínas tienen alteraciones, como un mayor contenido en Apo C, que impide su captación por los receptores.

- *Diabetes tipo 2*: este tipo de diabetes se halla frecuentemente asociada a la obesidad y a la hiperinsulinemia. En respuesta a un estado de resistencia a la insulina, existe una mayor producción de precursores para la síntesis hepática de TG y la formación y secreción de VLDL. En estos pacientes, cuando la remoción de VLDL del plasma es incompleta, se acumulan remanentes, persistiendo IDL aumentada en ayunas.

Es frecuente encontrar niveles elevados de LDL, debidos principalmente al aumento de su precursor (VLDL) que se cataboliza por la LPL, cuya actividad es normal en los primeros

estadios de la enfermedad. Otra razón que contribuye a elevar los niveles de LDL, consiste en la disminución de la capacidad de interacción con los receptores de LDL dado que se altera la estructura de esta lipoproteína por glicosilación. La presencia de LDL glicosilada es común a ambos tipos de diabetes dado que la glicosilación de LDL es consecuencia de la hiperglucemia.

Un subtipo de LDL asociado con la DM2 y otros estados de resistencia a la insulina, es la aparición de LDL pequeña y densa, asociada a alto riesgo aterogénico. Los niveles de HDL en la DM2 se encuentran disminuidos, en estrecha relación con la hiperTG, la obesidad asociada y el grado de control de la diabetes. Además, la lipasa hepática, como consecuencia de la hiperinsulinemia, acelera la remoción de la HDL.

Obesidad

Las alteraciones lipoproteicas en la obesidad son consecuencia, en parte, de la hiperplasia e hipertrofia del tejido adiposo, que llevan a la hiperinsulinemia y a la insulinoresistencia. Considerando al metabolismo lipídico, el hígado responde a los niveles elevados de insulina, con un aumento de síntesis de TG y secreción de VLDL. En general los niveles de HDL se encuentran disminuidos. Este hecho estaría relacionado con la hiperTG unida a otro factor como es el sedentarismo.

Síndrome Metabólico

Es un conjunto de desórdenes metabólicos asociado a alto riesgo de desarrollar DM2 y de padecer enfermedad cardiovascular. La obesidad de localización abdominal se asocia con alteraciones del metabolismo de los hidratos de carbono (intolerancia a la glucosa o DM2), con hipertensión y dislipemia, en un marco de la resistencia a la insulina y se manifiesta con aumento de TG y disminución de HDL. Subyacente a las alteraciones del perfil lípido-lipoproteico básico, característico del síndrome metabólico, también se observa:

- Aumento de TG en ayunas y post-prandiales.
- Aumento de VLDL y remanentes post-prandiales.
- Aumento de ApoB.
- c-LDL normal con predominio de LDL pequeñas y densas.
- Aumento de ácidos grasos libres circulantes.
- Aumento en la actividad de la enzima lipasa hepática.

Hipotiroidismo

La hipercolesterolemia es un hallazgo muy frecuente en el hipotiroidismo, así como los niveles bajos de colesterol en el hipertiroidismo. Las hormonas tiroideas estimulan la síntesis de los receptores-LDL, de la enzima lipasa hepática y en menor medida de la LPL.

La hipercolesterolemia que frecuentemente se observa en los pacientes hipotiroideos, se debe a una disminución en el catabolismo de LDL, como consecuencia de la disminución del número de receptores. Por otro lado, como consecuencia de la disminución en la actividad de la lipasa hepática, se observa permanencia de lipoproteínas intermedias en la circulación, con gran dificultad para continuar su camino metabólico. Esto explica los hallazgos de una lipoproteína rica en colesterol, con características de β -VLDL, en el suero de algunos pacientes hipotiroideos. Finalmente, ante un descenso en la actividad de LPL, se manifiesta una hipertrigliceridemia con aumento de VLDL. Los niveles de HDL no disminuyen dado que la actividad baja de la lipasa hepática se asocia con un menor catabolismo hepático de la HDL2.

Síndrome nefrótico

El aumento en la concentración de lipoproteínas plasmáticas es una característica del síndrome nefrótico. La síntesis hepática de proteínas y lipoproteínas se encuentra incrementada, en respuesta a la disminución de la presión oncótica causada por la hipoalbuminemia. Esto incluye una sobreproducción de VLDL y, por lo tanto, de IDL y LDL. Suele observarse también aumento de las concentraciones de Lp(a). Además existe una disminución del catabolismo de las lipoproteínas ricas en TG, posiblemente por pérdida de cofactores o activadores de la LPL (como Apo C-II), por la orina. Las HDL, por su menor tamaño, son las únicas lipoproteínas que pueden atravesar el riñón, por lo tanto es frecuente encontrar los niveles de HDL descendidos. Dado que también se produce aumento de su síntesis y de Apo A-I, hecho que compensaría la pérdida, los niveles de HDL frecuentemente se encuentran normales.

Cabe destacar que además del aumento del colesterol en sus fracciones más aterogénicas (LDL, IDL y Lp(a)) la composición de las lipoproteínas en el síndrome nefrótico es anormal, tanto en su contenido lipídico como lipoproteico generando en estos pacientes un riesgo cardiovascular aumentado.

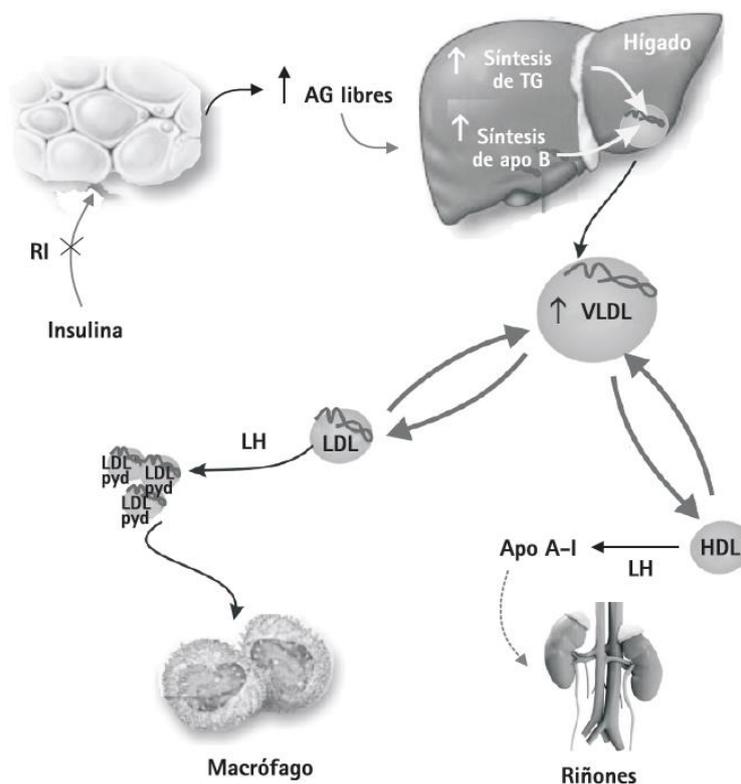


Figura 1. Fisiopatología de la dislipemia de la resistencia insulínica Referencias: RI: resistencia a la insulina; AG: ácidos grasos; TG: triglicéridos; VLDL: lipoproteína de muy baja densidad; LDL: lipoproteína de baja densidad; HDL: lipoproteína de alta densidad; LH: lipasa hepática; CETP: proteína transportadora de colesterol esterificado; CE: colesterol esterificado; pyd: pequeña y densa. Adaptado de Lender D y col. Pharmacotherapy 2006; 26: 3S-12S.

Obstrucción biliar

Dado que el hígado es el lugar de síntesis y catabolismo de gran parte de las lipoproteínas y de enzimas fundamentales para el metabolismo lipoproteico, cualquier enfermedad hepatobiliar traería aparejada anomalías en la síntesis lipoproteica y/o su catabolismo.

La colestasis intra- o extrahepática cursa con concentraciones muy aumentadas de colesterol y fosfolípidos. Los ácidos biliares se acumulan e inhiben la degradación del colesterol por retroalimentación negativa. Esto unido a un aumento de la síntesis de colesterol hepático, explicarían la hipercolesterolemia.

La anomalía lipoproteica característica de la colestasis es la aparición de la lipoproteína x (LpX). Esta es de estructura discoidal, contiene fosfolípidos y colesterol libre en igual relación, mientras que la albúmina y apoproteínas del grupo C conforman su contenido proteico. Esta lipoproteína se formaría ante la necesidad de transportar el exceso de fosfolípidos y colesterol acumulados.

La actividad de la enzima lecitina colesterol acil transferasa (LCAT) es variable, dependiendo en gran parte del grado de obstrucción, de la injuria hepática, y del aporte de su cofactor Apo A-I. La disminución de la enzima determina que la hipercolesterolemia se produzca a expensas del colesterol libre. En la colestasis, las lipoproteínas presentan alteraciones relacionadas, tal vez, con la deficiencia de LCAT. Las VLDL tienen una composición apoproteica y lipídica alterada. Las HDL se presentan en forma discoidal o naciente y son ricas en colesterol libre y fosfolípidos. Ambas lipoproteínas, al igual que la LpX, tienen movilidad beta en la electroforesis, coincidente con la LDL que, a su vez, es rica en TG.

Ingesta de Alcohol

Existe una relación inversa entre el consumo moderado de alcohol y la incidencia de enfermedad cardiovascular. El alcohol es oxidado a acetaldehído y por acción del aldehído deshidrogenasa se forman acetato y NADH. Así, el aumento del poder reductor que se genera, es el responsable de la mayoría de los efectos del etanol sobre el hígado. Los ácidos grasos libres aumentan, ya sea por incremento de su síntesis como por disminución de su catabolismo, conduciendo a un aumento de la síntesis de TG y de VLDL.

Para interpretar el efecto del alcohol, se debe tener presente la cantidad y forma de consumo. La ingesta de más de 170 g de alcohol en un período menor a 6 hs, lleva a una hipertrigliceridemia aguda, por disminución de la LPL. Esta hipertrigliceridemia es más severa si el consumo agudo de alcohol ocurre conjuntamente con una dieta rica en grasas. El alcoholismo crónico moderado, considerado como la ingesta de 15 a 40 g/día durante 2 años, logra mantener un perfil lipoproteico favorable con TG-VLDL normales, LDL normal o disminuida y HDL aumentada. Esto último responde a la inducción hepática de la síntesis de Apo A-I y Apo A-II y por ende de HDL.

Cuando la ingesta de alcohol es más severa aumentando a 60-80 g/día durante más de 2 años, incrementa la síntesis y secreción de TG, pero también la actividad de LPL, por lo tanto su nivel puede mantenerse normal. La concentración de HDL y Apo A-I va a depender de la funcionalidad hepática. Cuando comienza el daño hepático, decae la secreción de TG-VLDL y se instala el hígado graso, que puede conducir a la hepatitis alcohólica, y/o a la cirrosis. Este cuadro se acompaña de una frecuente malnutrición del individuo alcohólico, disminuyendo aún más el aporte proteico necesario para la funcionalidad hepática. El consumo moderado de alcohol protege de la enfermedad cardiovascular no sólo por el aumento de Apo A-I y de HDL sino también, por tener un efecto antiagregante plaquetario y de vasodilatación, así como la presencia de

antioxidantes adjudicados a componentes no alcohólicos contenidos en vinos, cervezas y licores que poseen polifenoles y flavonoides.

Hormonas sexuales

Es bien conocida la menor incidencia de enfermedad cardiovascular en la mujer premenopáusica con respecto al hombre. Las mujeres presentan niveles más bajos de LDL y más elevados de HDL que los varones. Esto se debe al papel de los estrógenos que estimulan la síntesis de los receptores LDL y de Apo A-I, principal constituyente de HDL. Además los estrógenos inhiben la actividad de la lipasa hepática contribuyendo al aumento de HDL.

Como consecuencia de la disminución estrogénica en la menopausia se produce un marcado deterioro del perfil lipoproteico, asociado a un elevado riesgo cardiovascular. La dislipemia más frecuentemente observada en la mujer post-menopáusica es la hipercolesterolemia, aumento de c-LDL, c-IDL e incremento de Apo B-100, sin grandes variaciones en el c-HDL.

La progesterona y los andrógenos tienen un efecto opuesto al de los estrógenos ya que producen disminución de las HDL.

Otra situación fisiológica donde se producen alteraciones hormonales es durante el **embarazo**. El marcado aumento estrogénico característico del tercer trimestre conduce a un aumento en la síntesis de TG que lleva a una mayor secreción de VLDL. Por lo tanto, es frecuente observar hiperTG en este trimestre, que no es considerada de riesgo, salvo que la mujer embarazada presente antecedentes de dislipemia o diabetes, que agraven el cuadro. En estos casos la hiperTG debe ser controlada cuidadosamente para prevenir el desarrollo de una pancreatitis aguda. En la mayoría de las mujeres, el colesterol y los TG se mantienen elevados hasta la cuarta semana del postparto y el descenso posterior de los niveles lipídicos es más marcado en las mujeres que amamantan.

Hipolipoproteinemias

Las hipolipoproteinemias son mucho menos frecuentes que las hiperlipoproteinemias. Su presencia puede responder a causas primarias o secundarias.

Hipolipemias primarias

1. *Abetalipoproteinemia*: es una enfermedad de transmisión autosómica recesiva de muy baja incidencia que se manifiesta desde la infancia. El defecto radica en una modificación

post-traducciona de Apo B-100 que impide su normal incorporación a las lipoproteínas. Se caracteriza por total ausencia de producción de Qm, VLDL, IDL y LDL, con concentraciones plasmáticas de TG y colesterol extremadamente bajas. Se produce acumulación de TG en hígado e intestino. Las manifestaciones clínicas consisten en esteatorrea, mala absorción de vitaminas liposolubles y graves alteraciones neurológicas, oculares, musculares y hematológicas.

2. Hipoalfalipoproteinemia: esta patología es poco frecuente y se han descrito distintas mutaciones que causan hipoalfalipoproteinemia. Entre las más conocidas se encuentran la **enfermedad de Tangier**, donde se produce un defecto en la síntesis de HDL a partir de una síntesis defectuosa de Apo A-I que es destruida rápidamente de forma tal que la vida media de la HDL es muy corta. Esta carencia se traduce en una alteración del metabolismo de otras lipoproteínas fundamentalmente los Qm y las VLDL debido a la disponibilidad reducida de Apo C-II. Su riesgo aterogénico no es claro.

3. Deficiencia de LCAT: Otro trastorno relacionado con una disminución de las HDL es la deficiencia en la lecitina colesterol acil transferasa. Los pacientes tienen TG plasmáticos elevados, el colesterol es normal o está aumentado pero en mayor proporción el colesterol no esterificado. Las VLDL y Qm son muy ricas en colesterol no esterificado y parecen tener monocapas anormales en la superficie. Las LDL poseen TG. Los depósitos de colesterol no esterificado y fosfolípidos en los vasos sanguíneos llevan a la destrucción de las nefronas y a la insuficiencia renal. También se produce anemia, los glóbulos rojos presentan un aumento del colesterol no esterificado y lecitina en sus membranas.

Hipolipoproteinemia secundarias

Las hipolipemias secundarias se relacionan principalmente con alteraciones hepáticas graves, neoplasias, desnutrición, infecciones agudas, anemias graves, hipertiroidismo, talasemia mayor, lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoidea.

LIPOPROTEÍNAS y ATEROGÉNESIS

La enfermedad coronaria es la principal causa de muerte en los países industrializados de Occidente. A su vez, la mayoría de los casos de enfermedad coronaria están asociados a otra patología: la aterosclerosis (acumulación de depósitos de lípidos en las paredes arteriales). El crecimiento de estos depósitos o placas ateroscleróticas provoca la formación de coágulos que impiden el flujo sanguíneo. Si un coágulo llega a ocluir una arteria se produce la isquemia del tejido por falta de irrigación. Si el proceso es sostenido y se acompaña de necrosis (muerte celular) se produce un infarto.

Se conocen algunos factores que pueden predisponer a la aterosclerosis y posterior enfermedad coronaria. La hipertensión arterial (HTA), la diabetes, el hábito de fumar y otros factores parecen aumentar la probabilidad de una enfermedad coronaria prematura. Las dietas ricas en colesterol y en ácidos grasos saturados contribuyen a la elevación de los niveles de lípidos en la sangre y a la progresión de la aterosclerosis. La constitución genética de un individuo desempeña también cierto papel: algunas personas pueden ingerir cantidades enormes de grasa en su dieta durante períodos prolongados sin que se produzca una elevación de la colesterolemia. Abundan sin embargo, quienes con valores de colesterol extraordinariamente elevados, jamás padecerán de enfermedad coronaria y por último sí pueden sufrirla aquellos que tienen un bajo perfil de riesgo.

Debido al riesgo cardiovascular que representa la hipercolesterolemia, es de suma importancia la medición de distintas lipoproteínas que transportan colesterol. Como las HDL remueven el colesterol desde los tejidos periféricos, mientras que las LDL lo depositan en ellos, el riesgo cardiovascular está en relación inversa a las cifras de colesterol unido a las HDL y en relación directa con el colesterol unido a las LDL.

La acción pro-aterogénica de las lipoproteínas no solamente depende de su concentración plasmática sino también de su heterogeneidad (tamaño, densidad y composición). La vida media de las LDL en plasma es de 3 días. Durante este tiempo, estas lipoproteínas pueden sufrir modificaciones como glicosilación (considerar en los pacientes diabéticos), oxidación y carbamilación (importante en los pacientes con insuficiencia renal). Si la vida media aumenta, aumentan aún más las modificaciones de las mismas, lo que disminuye la capacidad de interacción con sus receptores fisiológicos en los tejidos, lo cual resulta en un metabolismo incrementado a través de vías metabólicas alternativas que aceleran el proceso aterogénico (Figura 2).

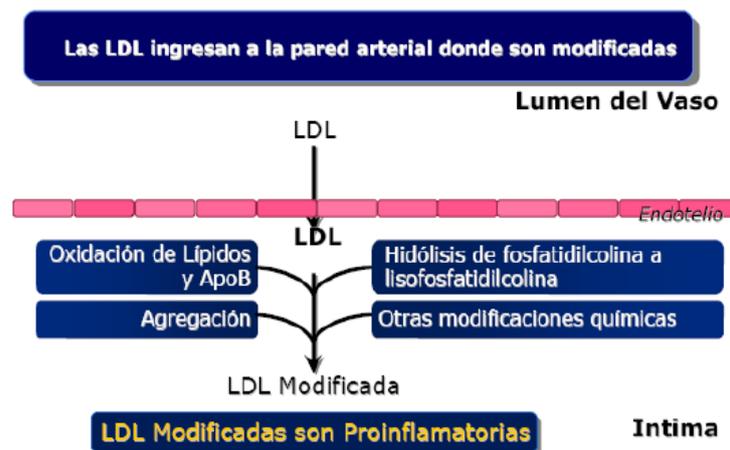


Figura 2. LDL y aterogénesis.

Lipoproteínas modificadas

Entre las subfracciones de mayor importancia fisiopatológica se destacan:

- LDL pequeña y densa: Las LDL pueden interactuar con las VLDL, tomando TG y entregando colesterol esterificado. Por acción de la lipasa hepática, los TG son hidrolizados, disminuyendo el tamaño de las LDL y transformándolas en "LDL muy pequeñas y densas" (small dense LDL o sLDL), que presentan gran capacidad para atravesar el endotelio y alcanzar a las células musculares lisas, y mayor capacidad de unión a los proteoglicanos favoreciendo su retención en la pared arterial. Estas sLDL son particularmente sensibles a los procesos de oxidación y glicosilación. Pierden afinidad por el receptor de Apo B-100 y son atrapadas por los macrófagos que se cargan de colesterol esterificado, modifican su metabolismo y se convierten en células espumosas.

Se ha encontrado que la presencia de partículas sLDL se asocia con un aumento de riesgo de enfermedad coronaria. El aumento de sLDL ocurre raramente como un desorden aislado, se acompaña frecuentemente de hiperTG, niveles de HDL disminuidos, obesidad abdominal, resistencia a insulina, y otras alteraciones metabólicas.

- LDL ricas en triglicéridos: Son partículas de LDL con un ligero aumento en la proporción de TG, lo que distorsiona el reconocimiento de la lipoproteína por el receptor fisiológico. Su presencia se asocia con disminución o ausencia de la actividad de la lipasa hepática (diabetes tipo 1 o en insuficiencia renal crónica) o por un aumento en la actividad de la proteína transportadora de ésteres de colesterol (común en las hipertrigliceridemias) dado que facilita los intercambios de TG por colesterol entre lipoproteínas y por lo tanto el enriquecimiento en TG de las LDL.

- LDL glicosiladas: Se forma como parte del proceso de glicosilación no-enzimática de las proteínas estructurales y circulantes, de manera proporcional a la magnitud de la hiperglucemia, mediante la unión covalente de la glucosa a la Apo B-100 de la LDL.

- LDL oxidadas: La oxidación de LDL ocurre en el subendotelio. Si bien la producción de especies reactivas del oxígeno es inherente al metabolismo celular normal, los diversos factores de riesgo cardiovascular producen un incremento del estrés oxidativo que acelera marcadamente este proceso. Por ejemplo; oxidantes como el superóxido, peróxido de hidrogeno, óxido nítrico, favorecen la oxidación de las LDL mientras que compuestos como la vitamina E, ácido ascórbico, beta-caroteno protegen contra la oxidación.

Cabe destacar, que la sLDL, LDL rica en TG y LDL glicosilada, presentan una mayor tendencia a la oxidarse.

- Lipoproteína a: Es sintetizada por el hígado y sus cifras plasmáticas están genéticamente determinadas puesto que no dependen de factores dietarios (ingesta rica en colesterol o alteraciones metabólicas de los lípidos). La Lp(a) es comparable en tamaño y contenido de colesterol esterificado a la LDL, pero posee mayor densidad. Se trata de una Apo B-100 enlazada covalentemente por puentes disulfuro a una molécula proteica símil plasminógeno (Apo(a)).

El papel fisiológico de la Lp(a) aún no se conoce, aunque se encuentra aumentada en sangre de individuos cuya vulnerabilidad a la enfermedad cardíaca no podía atribuirse a otros factores. El metabolismo es independiente de la LDL y la forma de eliminación es poco comprendida puesto que se une escasamente a los receptores para B-100.

La Lp(a) incrementa el riesgo cardiovascular porque suma el depósito de colesterol endotelial a su acción procoagulante, dado que compite con el plasminógeno en su unión al endotelio.

La Apo(a) es muy parecida al plasminógeno, que es el componente principal del sistema fibrinolítico o de disolución del coagulo sanguíneo, pero a diferencia de éste carece de actividad enzimática.

Algunas hormonas pueden modificar su concentración plasmática: hormonas tiroideas, los estrógenos y los esteroides anabólicos la reducen, en tanto que la hormona de crecimiento la incrementa mientras no se modifica por medicamentos hipolipemiantes o por la dieta.

Diagnóstico de las Dislipoproteinemias y Evaluación del riesgo cardiovascular

La enfermedad cardiovascular (CV) es una de las principales causas de morbimortalidad en los países occidentales. Esta alteración de las grandes arterias, es lentamente progresiva y comienza a temprana edad, en general, produce síntomas a partir de la cuarta década de la vida. Se caracteriza por la presencia en las paredes arteriales de depósitos ricos en lípidos, que son la causa de la oclusión parcial o total de las arterias; con tres localizaciones principales: cerebro, corazón y extremidades.

Varios factores de riesgo se han identificado y asociados con la enfermedad CV, entre ellos, el hábito de fumar, la hipertensión arterial y la dislipoproteinemia (alteración de las lipoproteínas plasmáticas), diabetes mellitus y obesidad. Otros factores a considerar son la presencia de antecedentes familiares de infarto de miocardio, inactividad física, aumento de fibrinógeno, etc. El riesgo es mayor en hombres que en mujeres, se incrementa con la edad y tiene un fuerte componente genético.

Estudios epidemiológicos han demostrado que el incremento de colesterol plasmático aumenta el riesgo de enfermedad CV. *El principal objetivo del laboratorio de lípidos y lipoproteínas es la detección precoz de la dislipoproteinemia, el diagnóstico y la clasificación del paciente y el seguimiento una vez instaurado el tratamiento.*

Cabe destacar que alrededor del 70% de las dislipemias detectadas en el laboratorio son secundarias a otras patologías, siendo posible su corrección a través del tratamiento de la enfermedad base. En todos los adultos mayores de 20 años, el perfil básico de lípidos y lipoproteínas comprende las siguientes determinaciones: **colesterol total**, **triglicéridos**, **colesterol-HDL (c-HDL)** y **colesterol-LDL (c-LDL)**.

El colesterol total es el punto de partida del estudio de lípidos pero insuficiente por sí solo, dado que es necesario conocer su distribución en por lo menos las dos lipoproteínas más importantes que lo transportan: c-HDL y c-LDL. Así mismo, se considera al aumento de **triglicéridos** como un factor de riesgo CV y se lo correlaciona con la presencia de lipoproteínas modificadas con potencial aterogénico elevado (LDL pequeñas y densas).

Las recomendaciones propuestas por el National Cholesterol Education Programme (NCEP) han reconocido que las c-LDL es el objetivo primario a modificar para reducir al mínimo el riesgo cardiovascular. Por ello, la corrección tanto de los niveles disminuidos de c-HDL como los elevados de TG, son otros parámetros para alcanzar el mismo fin.

Determinaciones lipídicas y lipoproteicas complementarias

- C-noHDL: representa el colesterol de las lipoproteínas que contienen Apo B, las cuales en su mayoría son consideradas aterogénicas. Es un parámetro secundario para la decisión en el tratamiento de pacientes con TG = 200 mg/dL.
- Electroforesis de lipoproteínas: se reserva para las muestras de sueros hiperTG con el objeto de detectar la presencia de quilomicrones y sus remanentes, β -VLDL y aumento de VLDL. Su evaluación es semicuantitativa y debe realizarse teniendo en cuenta los datos de TG y colesterol total.
- Apolipoproteína B: junto con otros parámetros es fundamental para la identificación de la hiperapobetalipoproteinemia y de la hiperlipemia familiar combinada. Posee un elevado valor pronóstico que en ciertos grupos etéreos supera al C-LDL.
- Apolipoproteína A-I: su medida no supera la utilidad diagnóstica del c-HDL.
- Lp(a): debe medirse en hipercolesterolemia familiar para categorizar el riesgo y fijar las metas de c-LDL. En pacientes sin hipercolesterolemia familiar y en los cuales no se han alcanzado las metas deseables, la medida de Lp(a) contribuye a modular el juicio clínico para favorecer el uso de fármacos.

Índices de riesgo aterogénico

- Colesterol total/c-HDL: también llamado de Riesgo Aterogénico o de Castelli, permite pronosticar el riesgo de enfermedad CV.
- c-VLDL/TG: permite estimar la calidad de las VLDL. Su valor puede ser de aproximadamente 0,2 para VLDL típicas, $\geq 0,35$ para VLDL ricas en colesterol (β -VLDL) y $\leq 0,17$ para VLDL muy ricas en TG.
- TG/c-HDL: cuando este índice es $\geq 3,5$ puede ser utilizado como marcador de resistencia insulínica y del predominio de las LDL pequeñas y densas, altamente aterogénicas.

Otros estudios

Todo lo mencionado antes se complementa con otros estudios de laboratorio que deben aplicarse a los pacientes que presenten alteraciones en su perfil lipídico. Es creciente la frecuencia de hipotiroidismo, ya sea manifiesto o subclínico, que produciría aumento en la IDL y LDL. Por lo tanto, la medida de las hormonas tiroxina y tirotrófina contribuiría a elucidar la causa del aumento de esas lipoproteínas. La determinación de la glucemia en ayunas, así como una curva de tolerancia a la glucosa permitirá una evaluación primaria del metabolismo hidrocarbonado, relacionado con el metabolismo

lipídico. Otras determinaciones de laboratorio que pueden aclarar en algunos casos la causa de la dislipemia son: análisis de orina y creatininemia, para detectar falla renal, hepatograma incluyendo parámetros de funcionalidad hepática y FSH para el diagnóstico de menopausia. También es de utilidad conocer las medidas de peso y altura del paciente, así como de cintura y cadera, para estimar el grado de obesidad con el índice de masa corporal y la distribución de grasa abdominal con el índice cintura/cadera.

CONSIDERACIONES PRE-ANALÍTICAS

• Preparación previa del Paciente

- Para el estudio de lípidos y lipoproteínas, al paciente se le debe indicar la necesidad de realizar un ayuno de 12 h previo a la extracción. Este ayuno es necesario para la determinación basal de triglicéridos puesto que las concentraciones de este analito varían en los períodos posprandiales.

- Un estudio básico debe realizarse en individuos en condiciones metabólicas estables. En pacientes que han sufrido situaciones de estrés (infarto de miocardio, cirugía de revascularización o una intervención quirúrgica), es recomendable evaluar el perfil lipídico después de transcurridos 3 meses el infarto.

- Debido a que modificaciones drásticas en la dieta pueden afectar las concentraciones de lípidos, es aconsejable que los individuos conserven su hábito normal en la ingesta de alimentos y el peso corporal sin modificaciones sustanciales al menos 2-3 semanas previo al estudio. Se ha observado en personas que han sufrido pérdida de peso, los niveles encontrados serán menores a las concentraciones que habitualmente presenta el individuo.

- Indicar la suspensión de la ingesta de alcohol 12-16 h previas al estudio, debido a que es un poderoso agente que moviliza lípidos.

- Numerosos agentes farmacológicos afectan el metabolismo lipídico: diuréticos, agente beta-bloqueantes, inmunosupresores, hormonas esteroideas, etc. Por lo tanto, en condiciones ideales, la medicación deberá ser suspendida (previa consulta a su médico) previo al estudio por un lapso de tiempo que oscila entre varios días a semanas, según el caso. Si por el contrario, una medicación que afecta el metabolismo lipídico no puede suspenderse, este aspecto deberá ser registrado en el reporte del laboratorio. En la práctica diaria, no se recomienda suspender los fármacos hipolipemiantes ni otros medicamentos que constituyan un tratamiento prolongado o de por vida (por ej: hormonas tiroideas).

- **Obtención de la muestra**

- La muestra de elección es **suero**, obtenido por retracción del coágulo en tubo seco y separado dentro de los 30 min desde la extracción de sangre. Alternativamente puede utilizarse **plasma** obtenido con heparina o Na₂EDTA. No obstante, el uso de Na₂EDTA (1mg/mL sangre) como anticoagulante presenta varias ventajas: permite una rápida separación y enfriamiento del plasma, inhibe la hidrólisis espontánea de triglicéridos y fosfolípidos así como la oxidación lipídica inducida por metales divalentes (Cu⁺²). También actúa como inhibidor de la proteólisis, preservando la estructura de las apoproteínas. Sin embargo los valores de los triglicéridos y colesterol hallados en plasma obtenidos con Na₂EDTA son aproximadamente un 3% más bajos que los observados en sueros. En el caso de electroforesis (lipidograma), los anticoagulantes como heparina, oxalato o citrato no son utilizados debido a su interferencia.

- En general, las situaciones de estrés están asociadas con un incremento en los niveles de colesterol total sérico. Para minimizar este efecto es recomendable que el paciente permanezca en reposo al menos 5-10 min previos a la obtención de la muestra de sangre.

- Debido a que el estasis venoso puede inducir hemoconcentración y en consecuencia una modificación en los niveles de los lípidos, es aconsejable una ligadura no superior a 1 min.

- **Conservación de la muestra**

El suero o plasma debe ser preferentemente fresco. En caso de no procesarse en el día puede ser conservado a 4°C durante no más de 4 días (debido a la frágil naturaleza de la estructura lipoproteica) o hasta dos meses a -20°C. Puede utilizarse como conservador NaN₃ (0,1%) u otros agentes antibacterianos. Para realizar el lipidograma por electroforesis las muestras deben ser frescas (en lo posible del día), pueden conservarse a 4°C y no deben ser congeladas. La derivación del suero o plasma a distancia debe realizarse manteniendo la cadena de frío.

CONTROL DE CALIDAD

Para el control de calidad del estudio químico de los lípidos plasmáticos puede emplearse un “*pool*” de sueros o plasmas frescos, adecuadamente filtrado, alícuotado y preservado a -80°C. Este debería contener los principales analitos (TG, colesterol, c-HDL, c-LDL) en rangos cercanos a los límites de decisión médica. Existen materiales de control disponibles comercialmente. Se debe tener presente que poseen modificaciones en la matriz que pueden alterar sus características analíticas.

ACTIVIDAD PRÁCTICA

Perfil lipídico y lipoproteico básico

- 1) Observación del aspecto del plasma/suero luego de la extracción.
- 2) Determinación en suero: **a)** Triglicéridos, **b)** Colesterol total, **c)** c-HDL y **d)** c-LDL.
- 3) Cálculo del Índice de riesgo aterogénico.
- 4) Resolución de Problemas.

1) OBSERVACIÓN DEL ASPECTO DEL SUERO

El aspecto del suero/plasma debe observarse luego de haber separado del coágulo sanguíneo y varias horas después (período 12-16 h a 4°C), a través de un haz de luz sobre un fondo oscuro, y se clasifica de la siguiente manera: **Límpido, Opalescente, Turbio y Lechoso.**

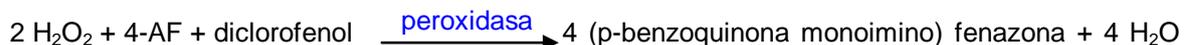
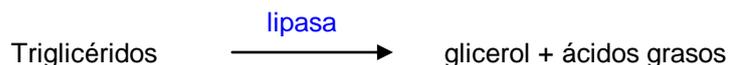
Con los sueros turbios o lechosos se realiza una segunda observación después de dejar reposar el suero una noche en la heladera. En caso de quilomicrones presentes, éstos forman una capa superior que sobrenada, siendo conveniente también observar si el infranadante queda límpido o permanece turbio. Es importante informar también si el suero está hemolizado o si es icterico (indicador de bilirrubinemia elevada).

2a) MÉTODO ENZIMÁTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE TRIGLICÉRIDOS

(Trinder, P; *Ann Clin Biochem* 6:24-27, 1969)

FUNDAMENTO

Los triglicéridos (TG) son desdoblados en glicerol ácidos grasos mediante una lipasa fungal específica. El glicerol se determina en forma enzimática por medio de una secuencia de reacciones que incluye su fosforilación a glicerol-1-fosfato en presencia de glicerolkinasa y la oxidación mediante glicerol fosfato oxidasa, con producción de agua oxigenada. A su vez, esta última produce la copulación oxidativa del fenol y la 4-aminofenazona, en reacción catalizada por la peroxidasa, con formación de una quinonimina roja con máximo de absorción a 505 nm.



MATERIALES

- Tubos de ensayo cortos.
- Pipetas automáticas.
- Espectrofotómetro.

REACTIVOS

- Buffer: solución de buffer Tris con diclorofenol, pH 7,7.
- Reactivo enzimático (liofilizado): lipasa (> 5000 U/L), glicerolkinasa (> 250 U/L), glicerolfosfatooxidasa (> 1500 U/L), peroxidasa (> 900 U/L), ATP (2mM), 4-aminofenazonal (1mM).
- Estándar: solución de glicerol 2,26 (equivalente a 200 mg/dL de trioleína).

Preparación de Reactivo de trabajo

- Resuspender cada reactivo enzimático con 20 mL de buffer. Estas soluciones son estables por 15 días en refrigerador. El reactivo de trabajo puede desarrollar un ligero color rosado que no afecta su funcionamiento. Sin embargo, absorbancia del blanco superiores a 0,160 o lecturas bajas del estándar, indican deterioro del reactivo.

MUESTRA

a) **Suero** o plasma con heparina o EDTA. Separa los glóbulos rojos dentro de las dos horas siguientes a la extracción. Los TG en suero son estables en refrigerador 3-4 días.

a) Interferentes

- Hemólisis intensa, producen error por exceso
- Bilirrubina (> 20 mg/dL)
- Ácido ascórbico (> 75 mg/dL)
- Ácido Úrico (> 20 mg/dL)

PROCEDIMIENTO

Homogeneizar la muestra antes de usar, especialmente frente a sueros lechosos.

En tubos de ensayo colocar:

	Blanco	Estándar	Muestra
Estándar	-	10 µL	-
Muestra	-	-	10 µL
Reactivo de trabajo	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

Mezclar. Incubar 5 min a 37°C ó 30 min a temperatura ambiente. Medir la absorbancia en espectrofotómetro a 505 nm. Llevar a cero con el blanco de reactivo. El color es estable por 60 min.

CÁLCULO

$$\text{Triglicéridos (mg/dL)} = \frac{\text{Abs Muestra}}{\text{Abs Estándar}} \times \text{concentración del Estándar}$$

NOTA:

- La contaminación con reductores disminuyen la respuesta de color, mientras que los oxidantes colorean el reactivo aumentando los blancos.
- La reacción es lineal hasta 1.000 mg/dL.
- La técnica puede ser adaptada para su ejecución mediante el uso de autoanalizadores, modificando las fracciones de ensayo de la muestra y del reactivo de trabajo.
- Las contaminaciones con glicerol producen resultados falsamente aumentados.

VALORES DE REFERENCIA (Triglicéridos - ATP III)

Deseable:	≤ 150 mg/dL
Límite elevado:	150 - 199 mg/dL
Elevado:	200 - 499 mg/dL
Muy elevado:	≥ 500 mg/dL

2b) DETERMINACIÓN DE COLESTEROL TOTAL

Método Enzimático-Colorimétrico (Trinder P. Ann Clin Biochem 6: 24-27; 1969).

FUNDAMENTO

El colesterol presente en la muestra de suero o plasma, es oxidado a Δ -4 colestenoína previa hidrólisis enzimática de los ésteres mediante una lipasa de origen fúngico. El peróxido de hidrógeno generado en la oxidación, produce la copulación oxidativa del fenol con 4-aminofenazona (4-AF) catalizada por la enzima peroxidasa (POD),

con formación de una quinonimina que posee un pico de absorción espectral a 505 nm. La concentración de color (rosado) formado es proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra.]



MUESTRA

- a) Suero o plasma obtenido con heparina o EDTA.
- b) Interferentes
 - Hemólisis intensa
 - Bilirrubina (> 20 mg/dL)
 - Ácido úrico (> 20 mg/dL)
 - Hipertrigliceridemia severa
- c) Estabilidad y almacenamiento: el suero se conserva una semana en refrigerador.

MATERIALES

- Tubos de ensayo cortos.
- Pipetas automáticas.
- Espectrofotómetro.

REACTIVOS

- Estándar: solución de colesterol de concentración: (2g/L).
- Enzimas: lipasa fungal (300 U/mL), colesterol oxidasa (3 U/mL) y peroxidasa (20 U/mL).
- 4-Aminofenazona (25 mmol/L).
- Fenol (55 mmol/L).

Preparación del reactivo de trabajo

- De acuerdo al volumen de trabajo, colocar en una probeta 50 partes de agua destilada, 5 partes de 4-aminofenazona, 5 partes de Fenol y llevar a 100 partes con agua destilada. Agregar 2 partes de enzimas, homogenización. Mezclar por inversión sin agitar. Rotular y fechar.

- Estabilidad del reactivo de trabajo: En refrigerador y en frasco de vidrio color caramelo, es estable un mes a partir de la fecha de la preparación.

PROCEDIMIENTO

En tubos de ensayo colocar:

	Blanco	Estándar	Muestra
Estándar	-	20 µL	-
Muestra	-	-	20 µL
Reactivo de trabajo	2 mL	2 mL	2 mL

Mezclar. Incubar 15 min a 37°C ó 30 min a temperatura ambiente. Medir la absorbancia en espectrofotómetro a 505 nm, llevando a cero con el blanco de reactivo. El color es estable por 2 h.

CÁLCULO

$$\text{Colesterol Total (mg/dL)} = \frac{\text{Abs Muestra}}{\text{Abs Estándar}} \times \text{concentración del Estándar}$$

NOTA

- Volúmenes de muestra y reactivo pueden aumentarse o disminuirse proporcionalmente.
- La reacción es lineal hasta 500 mg/dL.
- Lavar y enjuagar bien el material, porque los detergentes son inhibidores enzimáticos.

VALORES DE REFERENCIA (Colesterol – ATP III)

Óptimo: ≤ 200 mg/dL
Límite: 200 - 239 mg/dL
Elevado: ≥ 240 mg/dL

2c) DETERMINACIÓN DE COLESTEROL-HDL (c-HDL) (Método de Precipitación)

FUNDAMENTO

Las lipoproteínas que contienen apo B: VLDL, IDL, LDL y quilomicrones (si estuviesen presentes), precipitan selectivamente en presencia de un polianión (ácido fosfotúngstico, dextrán sulfato, etc) y un catión divalente (magnesio, manganeso, etc). De esta manera se obtiene HDL aislada en el sobrenadante donde se determina su contenido de colesterol por el método enzimático-colorimétrico.

MUESTRA

- a) **Suero** o plasma heparinizado.
- b) Interferentes: hipertrigliceridemia, bilirrubina (> 50 mg/L), anticoagulantes diferentes a la heparina.
- c) Estabilidad y almacenamiento: Separar el suero dentro de la hora de extracción. En caso de no procesarse en el momento, puede conservarse en el refrigerador (2-10°C) durante no más de 24 h.

MATERIALES

- Tubos cónicos de vidrio o de centrifuga.
- Pipetas automáticas.
- Espectrofotómetro.

REACTIVOS

- Sulfato de Dextrán (PM 50.000): 0,032 mmol/L.
- Solución de Cloruro de Magnesio: 1,5 mol/L.
- Estándar: solución de Colesterol de concentración conocida.
- Reactivo de trabajo para determinar Colesterol enzimático.

Preparación del reactivo precipitante

- En un frasco provisto, medir partes iguales de Sulfato de Dextrán y Cloruro de Magnesio. Mezclar por inversión y colocar la fecha de preparación.
- Estabilidad del reactivo precipitante: estable 6 meses a temperatura ambiente.

PROCEDIMIENTO

En un tubo de centrifuga medir 0,5 mL (500 µL) de muestra y agregar 50 µL de reactivo precipitante. Homogeneizar agitando (sin invertir) durante 20 segundos y dejar 30-40 min en refrigerador (4-10°C) o 15 min en baño de agua a la misma temperatura. No colocar en congelador. Centrifugar 15 min a 3.000 rpm. Usar el sobrenadante límpido como muestra.

En tubos de ensayo colocar:

	Blanco	Estándar	Muestra
Sobrenadante	-	-	100 µL
Estándar	-	20 µL	-
Reactivo de trabajo	2 mL	2 mL	2 mL

Mezclar. Incubar 15 minutos a 37°C o 30 min a temperatura ambiente. Medir la absorbancia a 505 nm frente al blanco de reactivo.

CÁLCULO

$$c\text{-HDL (mg/dL)} = D \times f^*$$

$$f^* = \frac{0,457}{\text{Abs Estándar}}$$

$$0,457 = 2 \text{ (g/L)} \times \frac{V_{F_E}}{V_M} \times \frac{V_{R_E}}{V_{R_S}} \times \frac{V_S}{V_E}$$

- D = Desconocido (absorbancia)
- V_{F_E} = Volumen final del extracto = 0,55 mL
- V_M = Volumen de muestra procesada = 0,50 mL
- V_{R_E} = Volumen de reacción con el extracto = 2,1 mL
- V_{R_S} = Volumen de reacción con Estándar = 2,02 mL
- V_S = Volumen de Estándar en la reacción = 0,02 mL
- V_E = Volumen de extracto en la reacción = 0,1 mL

Nota: Si se emplean volúmenes diferentes, el factor 0,457 varía y debe ser calculado nuevamente.

VALORES DE REFERENCIA (c-HDL – ATP III)

Óptimo: ≥ 40 mg/dL

2d) DETERMINACIÓN DE COLESTEROL-LDL (c-LDL) (Método de Precipitación selectiva con polivinil sulfato, PVS)

FUNDAMENTO

Las lipoproteínas de baja densidad (LDL o β -lipoproteínas) pueden ser separadas por precipitación con polímeros de alto peso molecular como el PVS. Luego de centrifugar, en el sobrenadante quedan VLDL y HDL. El colesterol de dichas lipoproteínas se mide utilizando el método enzimático-colorimétrico (item 2a). Por diferencia entre el colesterol total y el determinado en el sobrenadante, se obtiene el c-LDL.

MUESTRA

- b) **Suero** o plasma heparinizado.
- c) Interferentes: hipertrigliceridemia y bilirrubina (> 50 mg/L).
- d) Estabilidad y almacenamiento: el suero debe ser preferentemente fresco. En caso de no procesarse en el momento, puede conservarse en el refrigerador ($2\text{-}10^\circ\text{C}$) durante no más de 24 h.

MATERIALES

- Tubos de ensayo cortos o de centrifuga.
- Pipetas automáticas.
- Espectrofotómetro.

REACTIVOS

- Reactivo precipitante: Solución de sulfato de polivinilo (1 g/L) disuelto en polietilenglicol (PM: 600) al 25%, pH: 6,7.
- Reactivo para colesterol.

PROCEDIMIENTO

- En un tubo de centrifuga colocar 200 µL de suero mas 100 µL de reactivo precipitante. Homogenizar agitando (sin invertir) durante 20 segundos y dejar reposar durante 15 min a temperatura ambiente.
- Centrifugar 15 min a 3.000 rpm. Usar el sobrenadante como muestra para el ensayo colorimétrico.

En tubos de ensayo colocar:

	Blanco	Estándar	Muestra
Sobrenadante	-	-	100 µL
Estándar	-	20 µL	-
Reactivo de trabajo	2 mL	2 mL	2 mL

Mezclar. Incubar 15 min a 37°C ó 30 min a temperatura ambiente. Medir la absorbancia a 505 nm frente a blanco de reactivo.

CÁLCULO

$$c\text{-LDL (mg/dL)} = D \times f^*$$

$$f^* = \frac{0,624}{\text{Abs Estándar}}$$

$$0,624 = 2 \text{ (g/L)} \times \frac{V_{F_E}}{V_M} \times \frac{V_{R_E}}{V_{R_S}} \times \frac{V_S}{V_E}$$

V_{F_E} = Volumen final del extracto = 0,3 mL

V_M = Volumen de muestra procesada = 0,2 mL

V_{R_E} = Volumen de reacción con el extracto = 2,1 mL

V_{R_S} = Volumen de reacción con el Estándar = 2,02 mL

V_S = Volumen de Estándar en la reacción = 0,02 mL

V_E = Volumen de extracto en la reacción = 0,1 mL

NOTA: Si se emplean volúmenes diferentes, el factor 0,624 varía y debe ser calculado nuevamente.

VALORES DE REFERENCIA (c-LDL – ATP III)

Óptimo:	< 100 mg/dL
Cercano al óptimo:	100 – 129 mg/dL
Límite:	130 – 159 mg/dL
Elevado:	160 – 189 mg/dL
Muy elevado:	≥ 190 mg/dL

2d-1) Determinación de la concentración plasmática de colesterol LDL según la Fórmula de Friedewald

La fórmula de Friedewald permite efectuar una estimación de la concentración de c-LDL a partir de los valores de colesterol total, triglicéridos plasmáticos y c-HDL.

$$\text{Colesterol total} = \text{c-HDL} + \text{c-LDL} + \text{c-VLDL}$$

TG: Esta relación estima el contenido de colesterol de VLDL cuando los niveles de TG son ⁵ normales.

$$\text{c-LDL} = \text{colesterol total} - (\text{TG}/5 + \text{c-HDL})$$

La desventaja de la aplicación de esta fórmula reside en que la relación TG/ Colesterol en las VLDL es variable y, sobre todo, en los casos patológicos se aleja de 5. Además, esta fórmula desprecia el colesterol transportado por las IDL, el cual podría llegar a ser considerable. No obstante, se acepta que esta fórmula puede utilizarse si el valor de concentración de TG es menor de 200 mg/dL. Con TG entre 200 y 400 mg/dL, la fórmula puede dar origen a valores distorsionados. Con TG superiores a 400 mg/dL, la fórmula no debe ser utilizada, siendo imprescindible el empleo de un método analítico. La Tabla 2 muestra como al aumentar la concentración plasmática de TG la concordancia entre el c-LDL calculado por fórmula y el método de referencia disminuye.

Tabla 2. Concordancia entre el c-LDL calculado por la fórmula de Friedewald y el método de referencia

Nivel de Triglicéridos (mg/dL)	Concordancia con el método de referencia
< 200	90%
200 - 300	75%
300 - 400	60%
400 - 500	41%

Guías FAC III. Recomendaciones Bioquímicas para Médicos. Duymovich y col. 2005.

Por ello, es importante determinar químicamente el c-LDL, ya sea para conocer la concentración de esta lipoproteína aterogénica y evaluar el riesgo cardiovascular, como para poder tipificar algunas dislipemias. Así, ante valores de TG elevados y colesterol total moderadamente aumentados, la concentración elevada de LDL determina que la hiperlipemia es de tipo II b y no de tipo IV.

3) CÁLCULO DEL ÍNDICE DE RIESGO ATEROGÉNICO O ÍNDICE DE CASTELLI

La posibilidad de un individuo de sufrir un proceso aterosclerótico depende de múltiples factores, entre ellos el metabolismo lipoproteico. Desde este punto de vista, el índice de riesgo aterogénico o Índice de Castelli permite efectuar una mejor estimación del riesgo aterogénico de un paciente más que la concentración del colesterol total o del c-HDL en forma aislada.

$$\text{Índice de riesgo aterogénico} = \frac{\text{Colesterol Total}}{c - \text{HDL}}$$

VALOR DE REFERENCIA

HOMBRE	MUJER	RIESGO IAM
≤ 3,5	≤ 3,5	0,5
3,5-5,0	3,4-4,5	1
5,1-9,6	4,5-7,1	2
9,7-24	7,2-11	3

Índice de Castelli (Am J. Med. 1986). IAM: Insuficiencia Aguda de Miocardio

4) RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

1- Niño de 11 años es llevado a un centro hospitalario con un cuadro de fuertes dolores abdominales aproximadamente 4 h después de la ingesta de una comida con abundante contenido graso. El niño presenta los siguientes antecedentes clínicos: dolores abdominales con frecuencia (6 meses) y una pancreatitis. El laboratorio informa que la muestra de sangre (obtenida 20 min después que el niño concurre a la consulta) presenta un plasma de aspecto lechoso, el que centrifugado 15 min a 1500 rpm de "limpió" considerablemente y presentó una capa cremosa. El médico instaura una dieta pobre en grasas y balanceada en proteínas (30%) y carbohidratos (55%). A los 15 días se toma una

nueva muestra de sangre con ayuno de 14 h, la que arrojó los siguientes resultados: aspecto del suero al momento de la extracción: lechoso; después de 12 h a 4°C: límpido con pequeña capa cremosa, Triglicéridos: 900 mg/dL; Colesterol: 200 mg/dL; HDL-Colesterol: 30 mg/dL. Después de la instauración de una nueva dieta (estricta) por un mes, balanceada en proteínas e hidratos de carbono y un suplemento de ácidos grasos de cadena media (C10-C12), una muestra en ayunas de plasma del individuo resultó con valores de triglicéridos < 300 mg/dL. Responda:

- Qué partículas serían las responsables del “aspecto lechoso” y “capa cremosa del plasma”?
- En qué lapso de tiempo se “depuran” normalmente dichas partículas?
- Qué otra prueba de rutina en el laboratorio sería útil para el diagnóstico?
- Porqué responde a un tratamiento con ácidos grasos de cadena media?

2- En un laboratorio se recibe una muestra para un estudio de lípidos y lipoproteínas que presenta aspecto turbio, los resultados del estudio son:

Colesterol total: 330 mg/dL
 Triglicéridos: 700 mg/dL
 c-HDL: 85 mg/dL
 c-LDL: 105 mg/dL (realizado por fórmula de Friedwald)

¿Qué errores cree se pueden haber cometido durante el procesamiento de esta muestra?

3- Dados los siguientes casos considere:

	Caso 1	Caso 2	Caso 3
Aspecto:	Opalescente	Límpido	Turbio
TG:	132 mg/dL	87 mg/dL	412 mg/dL
Col-total:	330 mg/dL	260 mg/dL	330 mg/dL
c-HDL:	35 mg/dL	17 mg/dL	28 mg/dL
c-LDL:	273 mg/dL	223 mg/dL	103 mg/dL

- Cómo interpreta los resultados en cada caso y qué sugerencias realizaría al médico?
- En cuáles puede ser de utilidad el lipidograma electroforético? Qué información adicional puede suministrar la observación de las bandas en la electroforesis?

4- Paciente: Mujer de 45 años.

Datos generales: No fuma. Consume vino tinto con la cena. Es dueña de una ferretería y trabaja como cajera 10 h por día. No toma ninguna medicación. Antecedentes: madre diabética fallecida hace 2 años.

Datos antropométricos obtenidos en la consulta: Peso: 73,6 Kg. Altura: 165 cm. Circunferencia de cintura: 106 cm. Presión arterial: 160/95 mmHg.

Datos de laboratorio: Glucemia: 118 mg/dL. Perfil lipídico: Aspecto suero: límpido. Colesterol total: 167 mg/dL; TG: 135 mg/dL; c-HDL: 45 mg/dL.

5- Paciente: Hombre de 53 años.

Datos generales: Fumador de 20 cigarrillos/día desde hace muchos años. Trabaja como taxista turno diurno. Toma suplementos dietarios ricos en omega 3 en forma esporádica; no refiere otro tipo de medicación.

Datos antropométricos obtenidos en la consulta: Peso: 93,2 Kg. Altura: 169 cm. Circunferencia de cintura: 120 cm. Presión arterial: 165/90 mmHg.

Datos de laboratorio: Glucemia: 106 mg/dL. Perfil lipídico: Aspecto suero: opalescente. Colesterol total: 294 mg/dL; TG: 335 mg/dL; c-HDL: 32 mg/dL.

Cuestionario: Las mismas preguntas para cada uno de los pacientes (4 y 5)

- Considerando los criterios diagnósticos del ATP III, ¿qué paciente presenta síndrome metabólico?
- Calcule para cada paciente, el índice de masa corporal: Peso/Talla^2 .
- Calcule el riesgo aterogénico utilizando el índice de Castelli (col-total/c-HDL).
- Calcule el Col no HDL (col no HDL= Col total – c-HDL)
- En qué caso puede calcular la fracción c-LDL usando la Fórmula de Friedwald (FF)? Justifique la respuesta

$$\text{c-LDL} = \text{Col Total} - \text{c-HDL} - \text{TG}/5$$

- En caso de no poder usar la FF, que método usaría para calcular el c-LDL?
- Qué valor de glucemia en ayunas recomendaría en ambos pacientes? JSR
- Con respecto al riesgo de Diabetes Mellitus, recomendaría otras pruebas de laboratorio?
- Qué recomendaciones no farmacológicas le daría a cada uno de los pacientes?
- Calcule el riesgo total a 10 años utilizando el score de la OMS.

BIBLIOGRAFÍA

- GUÍA TEÓRICA DE LÍPIDOS Y LIPOPROTEÍNAS. LE Schreier, G Berg, F Brites y col. Química Clínica II. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA. 2011.
- EL LABORATORIO EN EL DIAGNOSTICO CLINICO. JB HENRY. 20ª Edición. Ed. Marbán, 2010.
- GUÍAS Y RECOMENDACIONES PARA EL DIAGNÓSTICO Y MANEJO DE LA DIABETES MELLITUS. DB Sacks. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana 46: 303-336, 2012.
- PRINCIPIOS DE MEDICINA INTERNA. M Harrison, et al. XVII edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. Madrid, 2008.
- CLINICAL CHEMISTRY AND MOLECULAR DIAGNOSIS. Burtis and Ashwood. 4º Ed. Editorial Saunders, 2006.

TRABAJO PRÁCTICO N° 8

EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ENDOCRINA. GLÁNDULA TIROIDES



OBJETIVOS

- Integrar los conocimientos teóricos adquiridos relacionados a la glándula tiroides.
- Interpretar los resultados de laboratorio mediante la resolución de casos clínicos.

INTRODUCCIÓN

La tiroides es una glándula endocrina muy vascularizada, ubicada en la región anterior del cuello, a la altura de las vértebras C5 y T1. Consta de dos lóbulos simétricos adosados a los lados de la tráquea y la laringe, conectados por el istmo. Normalmente existen dos pares de glándulas paratiroides, que regulan la homeostasis del calcio, en la cara posterior de ambos lóbulos o debajo de ellos.

La unidad funcional de la glándula tiroides es el folículo tiroideo, una estructura esférica formada por una capa de células epiteliales dispuestas alrededor de una cavidad central llena de coloide que contiene a las hormonas tiroideas (HT). La tiroides secreta principalmente 3,5,3,5' tetraiodotironina (tiroxina; T4), la cual es convertida en una molécula más potente, la 3,5,3'triiodotironina (T3), por acción de desiodinasas de tejidos periféricos (DIO 1 y 2). La producción de HT depende de la disponibilidad de yodo exógeno, que se mantiene por los aportes dietéticos (alimentos y agua). Las funciones de las HT varían de acuerdo a los períodos de la vida. En la infancia, estimulan el crecimiento y la maduración de distintos sistemas, mientras que en la etapa adulta intervienen en la totalidad de las funciones orgánicas, activando el metabolismo de órganos y sistemas.

Las HT se vehiculizan en plasma unidas de manera reversible a proteínas transportadoras, principalmente a TBG (*thyroid-binding globulin*) y, en menor medida, a transtiretina y albúmina. Existe un permanente equilibrio entre la asociación y disociación de HT a estas proteínas, dependiendo de su afinidad por las mismas. Sólo un pequeño porcentaje circula en forma libre: la fracción libre de T4 es alrededor del 0,03% de la hormona total y la de T3 cerca del 0,3%. Los niveles de hormona libre son los que

expresan la potencialidad biológica, ya que reflejan su disponibilidad para incorporarse a las células e interactuar con los receptores específicos. Dado que existen fármacos y enfermedades que pueden alterar las concentraciones de las proteínas ligadoras o la unión de éstas a T4 o T3, los niveles de hormonas libres y totales pueden no ser concordantes.

La secreción de T4 es promovida por la hormona estimulante de la tiroides (TSH), producida en la adenohipófisis en respuesta a la hormona liberadora de tirotrófina del hipotálamo (TRH). A su vez, las HT inhiben por retroalimentación negativa la secreción de TSH, para mantener los niveles de T4 libre (T4L) dentro de un rango estrecho. Debido a la relación log/lineal inversa entre las concentraciones de TSH y T4L, pequeños cambios en los niveles de T4L, aún dentro del intervalo de referencia, se traducen en una respuesta exponencial, amplificada en las concentraciones de TSH (Figura 1). Las concentraciones de TSH y T4L son más altas en niños, en la primera semana de vida y durante el primer año, por ello deberían usarse valores de referencia ajustados por edad para todos los ensayos. Los métodos actuales de tercera y cuarta generación para medición de TSH, utilizan ensayos inmunométricos con una sensibilidad funcional de 0,01-0,02 mUI/L y 0,001-0,002 mUI/L, respectivamente.

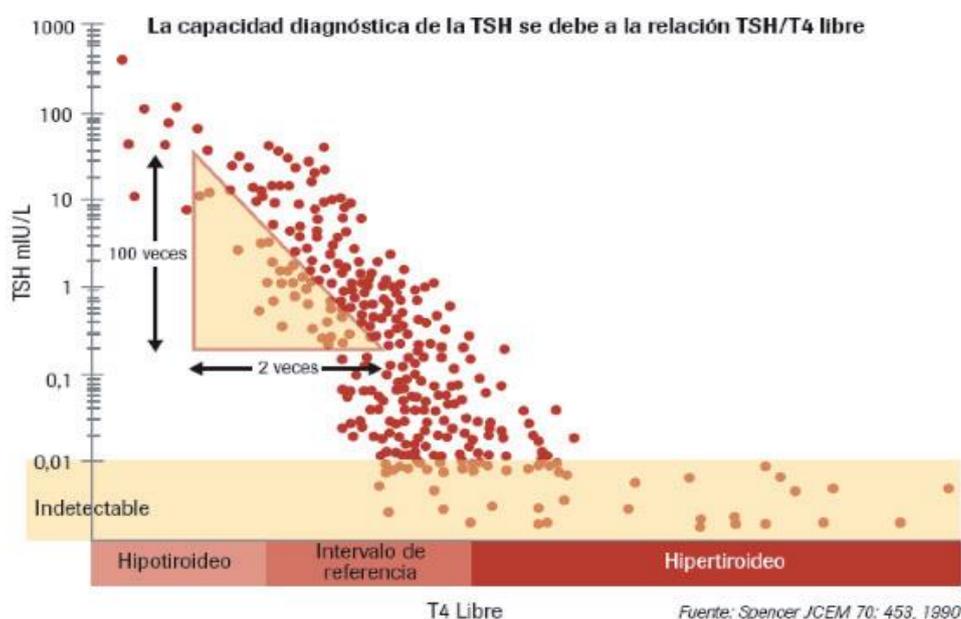


Figura 1. Reacción entre TSH y FT4 en sujetos que presentan un estado tiroideo estable y la función del eje hipotálamo-hipofisis conservada. Causas de resultados discordantes entre TSH y hormonas tiroideas Ed Cont Lab Clín 2013; 17: 23-31.

El diagnóstico de las enfermedades tiroideas se basa en los hallazgos clínicos, la palpación minuciosa de la glándula, las pruebas de laboratorio y los métodos de imagen.

En ausencia de enfermedad hipotálamo-hipofisaria, la determinación de TSH (ensayo ultrasensible) es el test de elección para el estudio inicial de la función tiroidea. Los valores de referencia para TSH oscilan entre 0,4 y 4,4 mUI/L, aunque existen controversias en cuanto al límite de corte superior. Sobre la base de su resultado, se proseguirá en forma sistemática con las determinaciones bioquímicas que resulten necesarias para arribar al diagnóstico definitivo (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros útiles para el diagnóstico etiológico de las alteraciones tiroideas

PARÁMETROS BIOQUÍMICOS	OTROS PARÁMETROS
Anticuerpos antitiroideos: aTPO, aTG, TRAb	Centellografía (¹³¹ I, ⁹⁹ Tc)
Tiroglobulina	Prueba de perclorato
Yoduria	Ecografía
TBG	Ecodoppler tiroideo
Prueba de TRH	PAAF

TBG: globulina ligadora de T4; PAAF: punción-aspiración con aguja fina; TRH: hormona liberadora de tirotrófina.

Las determinaciones de T4 total (T4T) y T3 total (T3T) son útiles en situaciones clínicas en las que no existen anomalías relativas a los niveles circulantes y afinidad de las proteínas transportadoras. La cuantificación directa de los niveles de T4L y T3L es técnicamente compleja. Por ello, la mayor parte de los laboratorios clínicos utilizan kits comerciales que permiten una estimación indirecta de los niveles de hormona libre (inmunoensayos competitivos automatizados).

El reconocimiento de la autoinmunidad como causa de disfunción tiroidea ha conducido al desarrollo de metodologías para la determinación de autoanticuerpos antitiroideos: anticuerpo antiperoxidasa tiroidea (aTPO), anticuerpo antitiroglobulina (aTG) y anticuerpo antireceptor de TSH (TRAb). Estos autoanticuerpos son heterogéneos y reaccionan con sus autoantígenos blanco, uniéndose a epitopes “conformacionales” (estructura tridimensional específica). En consecuencia, los resultados de los ensayos dependen fundamentalmente de la estructura molecular del antígeno utilizado en el mismo. La prevalencia y los valores de corte de los distintos anticuerpos antitiroideos dependen de la sensibilidad y especificidad del método de ensayo.

Además, el monitoreo de los niveles séricos de tiroglobulina (TG) y calcitonina (marcadores tumorales) contribuye al seguimiento de pacientes con cáncer diferenciado de tiroides y carcinoma medular de tiroides, respectivamente.

La yoduria es útil en el diagnóstico de hipertiroidismo yodo inducido, aunque hoy su principal aplicación es en estudios epidemiológicos. Dado que la mayor parte del yodo ingerido se excreta a través de la orina, la determinación de la excreción urinaria de yodo brinda una aproximación precisa de su ingesta.

PRINCIPALES ALTERACIONES DEL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISO-TIROIDEO

A partir de la determinación de los niveles séricos basales de TSH y HT, se pueden presentar las siguientes situaciones:

1) TSH alta, T4L baja

Este es el patrón característico del hipotiroidismo primario, es decir, del hipotiroidismo, cuya causa radica en la propia glándula tiroidea; la concentración sérica de T4L se encuentra disminuida en mayor o menor grado, mientras que la de TSH está elevada. En esta entidad la determinación T3 carece de valor, porque es normal en un número considerable de casos. La sistemática diagnóstica varía en función de si el hipotiroidismo primario es congénito o adquirido.

Hipotiroidismo congénito

El hipotiroidismo congénito (HC) es el trastorno endocrino hallado con mayor frecuencia en el período neonatal. Entre los factores causales se destaca la disgenesia tiroidea (85% de los casos de HC) (Tabla 2).

La importancia de diagnosticar el HC radica en que es una causa prevenible de retraso mental si se inicia el tratamiento en forma precoz. El *screening* neonatal (Ley 26.279; 2007) consiste en medir la concentración de TSH en sangre total obtenida del talón de los recién nacidos (RN) entre las 48h y el 5° día de vida (previo al alta neonatal), 24h después de que el niño haya comenzado a alimentarse. Se recomienda realizar un segundo tamizaje a las 2 semanas de vida extrauterina en aquellos neonatos de alto riesgo: prematuros (edad gestacional <35 semanas), RN de bajo peso (<1500g), críticamente enfermos, nacimientos múltiples, etc., ya que pueden presentar un retraso en la elevación de la TSH por inmadurez del eje o por el uso de fármacos como dopamina o glucocorticoides. Si el RN requiere plasmaféresis o transfusión, se debe tomar la muestra previo al procedimiento o luego del 7° día de realizado.

Tabla 2. Etiología de los hipotiroidismos congénitos

<p>Hipotiroidismos congénitos permanentes</p> <p>Anomalías de la tiroides</p> <ul style="list-style-type: none"> • Anomalías del desarrollo: aplasia, hipoplasia con/sin ectopia, defectos receptor TSH • Anomalías en la biosíntesis de hormonas tiroideas (NIS, TPO, DUOX2, DUOX2, pendrina) <p>Anomalías extratiroideas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Insuficiencia hipotálamo-hipofisaria (panhipopituitarismo, hipotiroidismo aislado) • Resistencia periférica a las hormonas tiroideas • Alteraciones en el transporte (MCT8)
<p>Hipotiroidismos congénitos transitorios</p> <ul style="list-style-type: none"> • Exposición materna a yodo • Transferencia de anticuerpos bloqueadores del receptor de TSH de la madre al niño • Administración de fármacos antitiroideos a la madre • Prematuridad • Deficiencia de yodo

Los métodos para la determinación de TSH a partir de la muestra obtenida en papel de filtro incluyen inmunoanálisis ligados a enzimas (ELISA) y fluoroinmunoanálisis (DELFA). Valores superiores al punto de corte (10 mUI/L) implican estudios adicionales de confirmación diagnóstica (niveles séricos de TSH + T4L o T4T + TBG, determinación de TG, anticuerpos antitiroideos, yoduria, gammagrafía-ecografía tiroidea, estudio de la maduración ósea y de biología molecular). La ecografía tiroidea permitirá definir el subgrupo de HC (disembriogénesis o dishormonogénesis) frente a la presencia o ausencia de glándula tiroides, mientras que el centellograma con ^{99}Tc permitirá definir la localización exacta de una glándula ectópica.

Los pacientes con HC en general pueden ser atendidos por el pediatra, pero es recomendable que los menores de tres años sean evaluados por un endocrinólogo pediatra, debido a que es el periodo de mayor vulnerabilidad en el desarrollo neurológico.

Hipotiroidismo adquirido

La causa más frecuente de hipotiroidismo adquirido es el déficit de yodo (hipotiroidismo endémico), y en áreas suficientes de yodo, la tiroiditis autoinmune (TAI), denominada también tiroiditis linfocítica crónica o tiroiditis de Hashimoto. Se han descrito dos variantes de la TAI: la forma bociógena (referida por Hashimoto en 1912) y no bociógena (también llamada tiroiditis atrófica o mixedema primario).

En la TAI existe infiltración linfocitaria (que conduce progresivamente a la destrucción de la glándula), junto con anticuerpos antitiroideos circulantes (aTPO en 90-95% y aTG en 20-50%). Los aTPO son la primera anomalía de laboratorio que aparece en la evolución del desarrollo de hipotiroidismo asociado a tiroiditis de Hashimoto. La TAI es más usual en el

sexo femenino, aumentando su prevalencia con la edad, y puede asociarse con la presencia de otras enfermedades autoinmunes (celiaquía, diabetes tipo 1, etc.). El hipotiroidismo primario puede manifestarse también como parte del síndrome autoinmune poliglandular tipo II.

El hipotiroidismo es un fenómeno gradual que comprende desde casos muy leves en las que el individuo apenas manifiesta síntomas y la expresión es sólo bioquímica, hasta casos severos en los que se pone en riesgo la vida por el mixedema y la afección cardiovascular. En forma general, el paciente puede presentar obesidad moderada, aspecto somnoliento de la facies, piel seca, gruesa y fría, color pálido o amarillento de la piel, presencia de edema pretibial, voz ronca y lentitud mental.

Los criterios diagnósticos de TAI incluyen: bocio palpable, gammagrafía con captación irregular del contraste, aTPO y/o aTG positivos, TSH elevada o respuesta elevada a la prueba de TRH y test de perclorato positivo. Otros hallazgos frecuentes de laboratorio son:

- Hemograma: anemia normocítica normocrómica, en ocasiones microcítica. En caso de existir, en forma concomitante, autoanticuerpos contra las células parietales gástricas que afecten la absorción intestinal de la vitamina B12, puede presentarse anemia perniciosa o macrocítica.
- Perfil lipídico: hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia.
- Enzimas musculares: elevación de GOT, CPK y LDH (secundaria a la presencia de mixedema intersticial e intrafibrilar, por fragmentación de las miofibrillas musculares).

Otros

El exceso de yodo puede causar hipotiroidismo mediante la inhibición de la organificación del yodo y consiguiente síntesis de HT (efecto Wolff-Chaikoff). En general, la tiroides sana puede compensar este efecto inhibiendo el transporte de yodo (fenómeno de escape). Sin embargo, en pacientes que presentan alguna alteración tiroidea subyacente que altera el fenómeno de escape, puede desarrollarse hipotiroidismo ante un exceso de yodo (dieta, suplementos vitamínicos, antisépticos tópicos, amiodarona, contrastes yodados, etc.).

En la tiroiditis subaguda de De Quervain, entidad frecuentemente precedida por un cuadro infeccioso del tracto respiratorio superior, puede existir una segunda fase de hipotiroidismo transitorio, con descenso de las HT en suero y baja captación de yodo.

La tiroiditis posparto es una disfunción tiroidea de etiología autoinmune que se presenta en el primer año post-parto en mujeres sin enfermedad tiroidea conocida antes

del embarazo. Puede cursar con síntomas de tirotoxicosis seguida de hipotiroidismo y recuperación posterior de la función tiroidea, o como tirotoxicosis o hipotiroidismo aislados.

En la tiroiditis crónica de tipo fibroso (tiroiditis de Riedel) existe una inflamación severa de la glándula y el reemplazo del parénquima tiroideo normal por un infiltrado de tejido conectivo que se disemina a estructuras adyacentes del cuello. El hipotiroidismo acontece en el 30% de los casos, los anticuerpos antitiroideos pueden estar presentes, pero el papel de la autoinmunidad en la patogenia no está establecido. También pueden producir hipotiroidismo procesos infiltrativos como amiloidosis y sarcoidosis, tumores primarios, fundamentalmente linfomas, o metástasis.

2) TSH alta; T4L, T3L normales

Hipotiroidismo adquirido

El hipotiroidismo subclínico (hipoSC) se define por concentraciones séricas de TSH por encima del límite superior del rango de referencia (para algunos autores entre 4,5 y 10 mUI/L), con valores normales de HT. Por lo tanto, se trata de una entidad cuyo diagnóstico está basado únicamente en parámetros bioquímicos. Se sugieren 2 determinaciones de TSH separadas por un intervalo de 4 a 12 semanas. En general, la etiología del hipoSC es la misma que la del hipotiroidismo clínico:

- Tiroiditis crónica autoinmune (enfermedad de Hashimoto)
- Tiroiditis subaguda (viral, posparto, etc.)
- Injuria tiroidea: tiroidectomía parcial, radioyodo, radioterapia externa del cuello
- Fármacos: antitiroideos, amiodarona, litio, interferón α
- Tratamiento sustitutivo con levotiroxina (dosis inadecuada, tratamiento intermitente)

La prevalencia del hipoSC posee un rango muy variable (1 a 10% de la población general, pudiendo llegar al 20% en mujeres mayores de 60 años). Entre el 2 y el 5% de los adultos con hipoSC progresará en el transcurso de un año al hipotiroidismo franco, especialmente en presencia de aTPO positivos. El HipoSC se asocia a trastornos cardíacos, disfunción endotelial y riesgo incrementado de aterosclerosis. Si bien existe cierto grado de controversia, se sugiere iniciar tratamiento sustitutivo con levotiroxina en casos de depresión, embarazo, infantes, bocio, TSH>10 mUI/L, sintomatología (astenia o déficit cognitivo) o dislipemia, entre otros.

Hipertirotropinemia transitoria

En los RN, si se trata de prematuros, es posible observar hipertirotropinemias de carácter transitorio, donde las concentraciones de TSH permanecen altas tras la elevación fisiológica de las primeras horas de vida extrauterina, con niveles de tiroxina dentro del intervalo de referencia. La duración de este trastorno es variable, entre unos días y varios meses. Se ha relacionado con situaciones de déficit o de exceso de yodo, aunque la etiología es desconocida.

Interferencias metodológicas

Cuando existe discordancia entre variables fisiológicamente dependientes (paciente con valores de TSH francamente elevados - Ej: >20 mUI/L -, con T4L normal), podría deberse a la presencia de anticuerpos heterófilos (AHet) que interfieren con el ensayo utilizado para medir la TSH. Los AHet son anticuerpos humanos dirigidos contra inmunoglobulinas de otras especies animales. En esos casos se sugiere: procesar la muestra tras sucesivas diluciones, emplear otro inmunoanálisis que utilice anticuerpos de un animal distinto o utilizar tubos conteniendo agentes bloqueantes de AHet, a fin de inactivarlos.

3- TSH alta o normal; T4L elevada

Se trata de un patrón hormonal poco frecuente. Las dos entidades más importantes asociadas a este perfil hormonal son la resistencia a las hormonas tiroideas (RHT) y los tumores hipofisarios secretores de TSH.

Síndrome de resistencia a las hormonas tiroideas (RHT)

Es un desorden genético con un modo de transmisión dominante que se caracteriza por una respuesta reducida de los tejidos a la acción de las HT circulantes. La T3 regula la expresión de sus genes blanco positiva o negativamente a través de los receptores tiroideos (TRs) nucleares. La RHT se asocia con una mutación en el gen del receptor de HT β (TR β), que le confiere una afinidad reducida por T3 o interacción anormal con alguno de los cofactores de transcripción relacionados con la acción de las HT. La presentación clínica es variable; es frecuente la presencia de bocio, aunque la mayoría de los pacientes están metabólicamente estables a expensas de un nivel elevado de HT. La relación T3/T4 está conservada, a diferencia de lo que ocurre en la tirotoxicosis autoinmune. El

diagnóstico definitivo se efectúa por biología molecular, una vez excluidas otras causas de secreción inapropiada de TSH.

Tumor productor de TSH

Estos tumores son macroadenomas y pueden presentar síntomas de masa ocupante encefálica (defectos del campo visual, cefalea, hipopituitarismo, etc). La secreción de TSH es autónoma y refractaria al *feedback* negativo de las HT (secreción inapropiada de TSH). La actividad biológica de la tirotrófina secretada es muy variable debido a modificaciones en su glicosilación. Los pacientes suelen encontrarse clínicamente hipertiroideos y el diagnóstico bioquímico se realiza en base al hallazgo de T4L y T3L elevadas en presencia de TSH detectable (hipertiroidismo central). También puede encontrarse un aumento desproporcionado de subunidad α de las hormonas glicoproteicas, el cual suele ser mayor que el aumento de la TSH, resultando en una relación subunidad α /TSH mayor a 1.

Interferencias metodológicas

Otra probable causa para explicar este patrón hormonal es la existencia de anticuerpos anti-HT (anti-T4 y anti-T3) que interfieren el ensayo utilizado para su medida. Esta situación debe sospecharse ante la discordancia entre los valores de HT y el estado clínico del paciente. En presencia con enfermedad tiroidea autoinmune, la prevalencia de anticuerpos anti-HT puede llegar a ser del 30%. Se pueden determinar por incubación del suero con ^{125}I -T4 y con ^{125}I -T3 y posterior precipitación con polietilenglicol.

4- TSH baja o normal; T4L o T3L bajas

Este perfil de secreción hormonal caracteriza al hipotiroidismo hipotálamo-hipofisario o de origen central, en el que el déficit de HT se produce por falta de estímulo hipotálamico (déficit de TRH) o hipofisario (déficit de TSH). Según el problema esté o no presente en el momento del nacimiento, hablamos del carácter congénito o adquirido de la patología. (Tabla 3). El hipotiroidismo terciario suele ser esporádico y el hipotiroidismo secundario puede ser esporádico o familiar: deficiencia aislada de TSH, panhipopituitarismo (mutaciones de los genes PROP1, POU1F1, LHX3, LHX4, etc.), agenesia hipofisaria familiar y silla turca vacía.

Cuando el grado de aumento de la TSH asociado con un nivel bajo de HT parece inapropiadamente bajo, se debería descartar insuficiencia hipofisaria. El test de TRH permite distinguir el origen hipotalámico (respuesta de TSH fuerte y sostenida) o hipofisario

(ausencia de respuesta), aunque en ocasiones la prueba puede no ser discriminativa. La RMN permite evidenciar las anomalías anatómicas hipotálamo-hipofisarias.

Entre las causas adquiridas se encuentran tumores, enfermedades infiltrativas, traumatismos, autoinmunidad, etc., y conducen con frecuencia a la disminución de la liberación de una o más hormonas hipotalámicas o hipofisarias, entre ellas TRH, TSH o ambas.

Tabla 3. Entidades que cursan con TSH baja o normal y HT bajas

**HIPOTIROIDISMO HIPOTÁLAMO-HIPOFISARIO:
Terciario (déficit de TRH) y Secundario (déficit de TSH)**

CONGÉNITO:

Permanente: déficit de TRH, deficiencia aislada de TSH, panhipopituitarismo esporádico y genético.

Transitorio: prematuro, recién nacido de madre hipertiroidea por enfermedad de Graves.

ADQUIRIDO:

Lesiones hipotálamo-hipofisarias: infecciones, tumores, traumatismos, radioterapia, accidentes vasculares, enfermedad granulomatosa, cirugía, etc.

**Hipotiroxemia del recién nacido prematuro
Enfermedad no tiroidea (síndrome del eutiroides enfermo)
Tratamiento reciente del hipertiroidismo**

Mayayo E y col. Interpretación de las pruebas tiroideas. An Esp Pediatr 2002; 56: 42-52.

5- TSH baja; T4L o T3L normales

Hipertiroidismo subclínico (hiperSC)

El hipertiroidismo subclínico (hiperSC) se define por el hallazgo de una concentración sérica de TSH baja asociada a HT dentro del rango de referencia. El diagnóstico, por definición, al igual que en el caso del hipoSC, es bioquímico. En la práctica clínica pueden distinguirse dos grupos de pacientes con hiperSC: aquellos con una alteración ligera del perfil tiroideo (TSH entre 0,44 y 0,1 mUI/L) y aquellos que presentan una alteración más marcada (TSH <0,1 mUI/L).

Una causa frecuente de hiperSC es el sobret ratamiento con suplementos de L-tiroxina. En el hiperSC de origen endógeno, la fuente del exceso de HT circulante es la propia glándula tiroidea (enfermedad de Graves, bocio multinodular, tiroiditis, adenoma tóxico). La captación de ¹³¹I, el dosaje de TRAb, TG y la clínica se utilizan para descartar exceso de HT. Es necesario conocer la medicación del paciente, ya que algunos fármacos como los esteroides, dopamina o tolbutamida pueden suprimir la liberación de TSH.

El hiperSC cobra relevancia por la posibilidad de que ocurra la progresión a un hipertiroidismo franco. Además, no siempre es asintomático y puede afectar la calidad de vida, sobre todo en el adulto mayor, por incremento del riesgo de morbimortalidad cardiovascular y la mayor incidencia de fracturas óseas.

Síndrome del eutiroides enfermo

Las enfermedades graves pueden provocar cambios profundos en el metabolismo de las HT, lo que se traduce en anomalías en las pruebas de laboratorio, aunque normalmente no exista disfunción de la glándula. Esto se conoce como síndrome del eutiroides enfermo o enfermedad no tiroidea (NTIS, non-thyroidal illness syndrome). El NTIS afecta a alrededor de 70% de los pacientes hospitalizados con enfermedades de diversa etiología. Los valores de las pruebas de función tiroidea en el NTIS pueden variar, dependiendo de la gravedad de la enfermedad.

La alteración más frecuente que ocurre en el eje tiroideo durante la fase aguda de una enfermedad crítica es la disminución de la concentración de T3 por menor conversión periférica de T4, debido a la inhibición de la DIO 1. La TSH suele ser normal-baja y, a medida que aumenta la severidad de la enfermedad, generalmente cae también la T4T (Figura 2). La concentración sérica de T3 reversa (T3r) y el cortisol también se elevan. Se trataría de un mecanismo adaptativo para disminuir el catabolismo proteico ante una situación biológica desfavorable.

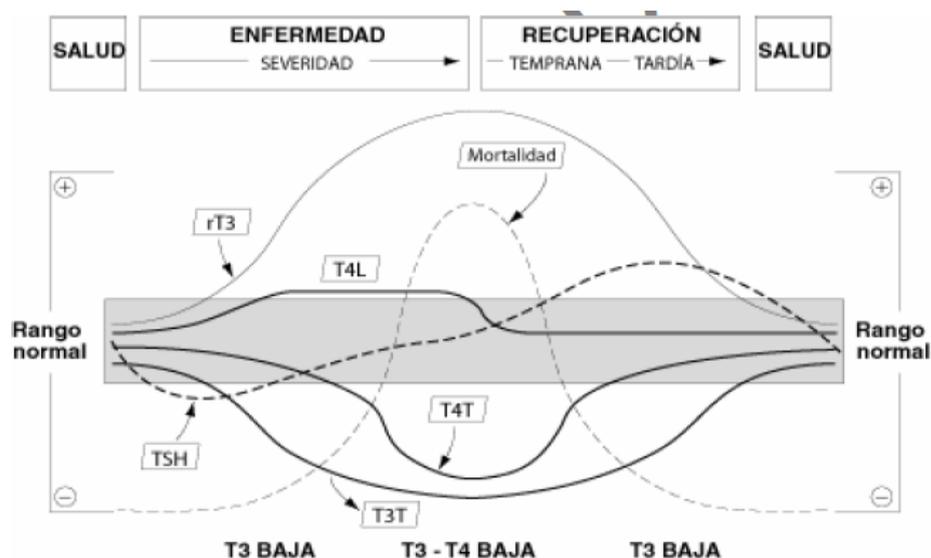


Figura 2. Cambios en los resultados de los ensayos tiroideos durante el curso de una NTIS. NACB: Guía de Consenso para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad tiroidea. Bergoglio LM y Mestman JH, 2002.

Las razones que explican la especificidad reducida de los ensayos tiroideos en estas circunstancias son diversas. Así, por ejemplo, muchos de estos pacientes reciben fármacos que inhiben directamente la secreción hipofisaria de TSH o indirectamente la unión de T4 a proteínas transportadoras (dopaminérgicos, glucocorticoides, furosemida, heparina, etc.). Por ello, se sugiere posponer las pruebas diagnósticas de función tiroidea en pacientes críticos hasta resolución de la enfermedad, excepto cuando los antecedentes del sujeto o su cuadro clínico señalen la presencia de una patología tiroidea concreta.

6- TSH baja; T4L o FT3L altas

El hipertiroidismo puede describirse como la producción sostenida o sobreproducción de HT por la propia glándula tiroides. Cursa con captación normal o aumentada de yodo radiactivo. Se produce con mayor frecuencia por enfermedad de Graves-Basedown (EG) y en menor medida por bocio multinodular, adenoma tóxico, hipertiroidismo inducido por gonadotropina coriónica, etc.

La tirotoxicosis, por otra parte, hace referencia a los cambios fisiopatológicos que se producen por el exceso de HT, sin que éstas provengan necesariamente de la glándula tiroides. Cuando la tirotoxicosis se produce por la liberación de hormona preformada a la circulación general o por la existencia de una fuente de HT extraglandular, la captación de yodo radiactivo es nula (Tabla 4). La tormenta tiroidea es la máxima expresión de la tirotoxicosis, y representa una emergencia endocrina rara, pero potencialmente mortal.

Tabla 4. Causas de hipertiroidismo y tirotoxicosis

<p>HIPERTIROIDISMO (captación normal o aumentada de yodo radiactivo)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Enfermedad de Graves • Bocio multinodular hiperfuncionante • Nódulo tóxico • Adenoma hipofisario productor de TSH • Tumores trofoblásticos • Inducido por yodo (Jod Basedow) • Inducido por amiodarona • Mutaciones activadoras del receptor de TSH (TSH-R)
<p>TIROTOXICOSIS (captación nula o prácticamente nula de yodo radiactivo)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Hormona tiroidea exógena • Tiroiditis infecciosa • Tiroiditis postparto • Inducida por litio • Inducida por interferón o interleucina-2 (tratamiento de hepatitis C o infección por VIH) • Exacerbación aguda de tiroiditis autoinmune

La EG se caracteriza por presentar un infiltrado linfocitario intratiroideo. El hipertiroidismo resulta de la producción de anticuerpos IgG circulantes (TRAb) que se unen al receptor de TSH (TSH-R) en la superficie de las células foliculares tiroideas. Se han descrito tres tipos de TRAb en pacientes con EG (de estimulación, de bloqueo y de escisión o neutrales), los cuales inducen efectos que varían desde la proliferación celular hasta la apoptosis. En la EG clásica la mayoría de los TRAb actúan como agonistas (TSI): promueven la hipertrofia e hiperplasia folicular, dando lugar al crecimiento glandular y al aumento de la producción de HT. En ocasiones pueden estar presentes aTPO y aTG.

En general, en la EG están elevadas tanto la T4L como la T3L, pero en un pequeño porcentaje de los casos sólo se halla elevada la T3L (tirotoxicosis por T3). Este patrón podría corresponderse con fases tempranas del hipertiroidismo o con la presencia de un nódulo funcionante autónomo

El espectro clínico de la EG es amplio e incluye bocio difuso, oftalmopatía, mixedema pretibial y acropaquia. Un número importante de pacientes puede manifestarse con taquicardia, diarrea o pérdida de peso en forma aislada. Al evaluar el funcionamiento glandular con ^{131}I o ^{123}I se encuentra un aumento de la captación del trazador, con una imagen habitualmente homogénea.

El tratamiento de primera elección son los antitiroideos. Los más empleados son los derivados de la tiourea: metimazol, carbimazol y propiltiouracilo. Tratamientos alternativos (cirugía y ablación con ^{131}I) están indicados en pacientes con efectos secundarios o falta de respuesta a las drogas antitiroideas.

El nódulo tiroideo autónomo o el bocio polinodular son más frecuentes en zonas geográficas con aporte bajo o marginal de yodo en la alimentación y se detectan a través de la exploración física y la ecográfica de la tiroides. La autonomía del nódulo se establece mediante la gammagrafía (Tabla 5). Un nódulo único con inhibición total o parcial del resto de tejido tiroideo permite el diagnóstico de adenoma tóxico, y si existen varias áreas de captación el diagnóstico es bocio multinodular hiperfuncionante.

Tabla 5. Diagnóstico de autonomía tiroidea

• Hipertiroidismo + bocio nodular o polinodular + centello (captación aumentada): nódulo/s caliente/s.
• Eutiroidismo + bocio nodular o polinodular + centello (captación difusa o parcialmente inhibida): Prueba de Werner → positiva.

El hipertiroidismo inducido por yodo ocurre, sobre todo, en pacientes con autonomía tiroidea subyacente (especialmente en aquellos que residen en áreas con déficit del mineral), cuando se administran grandes cantidades de yodo. La amiodarona es uno de los fármacos más usados para la profilaxis y el control de las taquiarritmias. Por su alto contenido de yodo, tiene la capacidad de alterar el metabolismo de las HT, pudiendo causar tanto hipo como hipertiroidismo, lo que se conoce como disfunción tiroidea inducida por amiodarona. La tirotoxicosis ocurre en alrededor del 10% de los individuos tratados con amiodarona.

CÁNCER DE TIROIDES

Los nódulos tiroideos son comunes en la práctica clínica; su prevalencia aumenta con la edad, en el sexo femenino, cuando existe carencia de yodo y antecedentes de radiación local. La importancia clínica de un nódulo tiroideo radica en la posibilidad de tratarse de un cáncer. Por lo tanto, se recomienda realizar una ecografía tiroidea en pacientes con:

- Incidentaloma tiroideo
- Historia de irradiación en la zona del cuello
- Historia familiar de cáncer tiroideo o de neoplasia endocrina múltiple tipo 2
- Presencia de uno o varios nódulos tiroideos palpables
- Adenopatía cervical no explicada

La punción-aspiración con aguja fina (PAAF) complementa la evaluación inicial y permite diferenciar entre nódulos benignos y malignos en la mayoría de los casos.

El cáncer de tiroides es la malignidad más común del sistema endocrino. Los carcinomas tiroideos primarios pueden ser clasificados en dos variedades dependiendo de si las lesiones se originan en el epitelio folicular o en el parafolicular o de las células C.

Carcinomas del epitelio folicular

- Carcinoma papilar (CP) comprende el 85% de los cánceres tiroideos y el de mejor pronóstico. Posee un crecimiento lento y representa la malignidad tiroidea que puede desarrollarse por exposición a radiaciones de la región cervical en la infancia.
- Cáncer folicular (CF) comprende el 10-15% de los cánceres tiroideos y su pronóstico de largo plazo es algo peor que el del CP debido a su tendencia a dar metástasis a distancia.

La TG es un marcador tejido específico y está presente en el suero de la mayoría de los pacientes con carcinoma diferenciado de tiroides (CDT). Los aTG se encuentran aproximadamente en el 25% de los sujetos con antecedentes de CDT. Por ello, la

determinación de aTG (por metodología ultrasensible) en la evaluación prequirúrgica se considera de suma relevancia para conocer su probable interferencia en la medición de TG durante el seguimiento a largo plazo del paciente.

Tumores pobremente diferenciados de la tiroides

El carcinoma anaplásico representa el 1% o menos de todos los cánceres tiroideos y está constituido por células indiferenciadas (células fusiformes y células gigantes), es de crecimiento rápido y altamente maligno. Dado que se trata de un tumor que no concentra el yodo, es refractario a la terapia con radioyodo. La TG sérica no tiene valor diagnóstico como marcador tumoral. La tinción inmunocitoquímica para queratina y para la proteína citoesquelética vimentina es positiva.

Carcinomas del epitelio parafolicular

El carcinoma medular (CMT) comprende alrededor del 5% de los cánceres tiroideos y se origina en las células C. El CMT tiene un pronóstico intermedio entre el cáncer de tiroides bien diferenciado (papilar y folicular) y el cáncer de tiroides anaplásico poco diferenciado. El CMT posee cuatro presentaciones: una es la forma esporádica, que representa el 80% de los casos, y las otras tres son formas autosómicas dominantes hereditarias (Tabla 6). Como el CMT produce calcitonina, ésta es usada como marcador tumoral en el seguimiento de pacientes con CMT para detectar recurrencia.

Tabla 6. Entidades asociadas al carcinoma medular de tiroides hereditario

CMT familiar (CMTF)	NEM-2a	NEM-2b
CMT	Feocromocitoma Hiperparatiroidismo CMT	Feocromocitoma Hábito marfanoide Neuromas mucosos

CMT: carcinoma medular de tiroides. NEM: neoplasia endocrina múltiple. Wartofsky L. Cáncer de tiroides: enfoque clínico. Separata 2018; 26 (4):1-32.

PRUEBAS FUNCIONALES

Test de TRH:

La prueba consiste en administrar 200 µg de TRH e.v y dosar TSH basal y a los 30 min, aunque se puede prologar la prueba hasta los 60 y 90 min cuando se sospecha hipotiroidismo terciario. Dado que en el hipotiroidismo primario la hipófisis se encuentra liberada de la inhibición ejercida por las HT, su estimulación con TRH producirá un aumento aún mayor de los valores de TSH, es decir que habrá una hiperrespuesta. En el

hipotiroidismo terciario (disfunción hipotalámica) también se observa un incremento de los valores de TSH post-estímulo, pero de menor magnitud. En el hipotiroidismo secundario, dado que existe disfunción hipofisaria que afecta a las células tirotropas, no se producirá modificación de los valores bajos o nulos de la tirotrófina en respuesta a TRH.

Test de descarga con perclorato ($KClO_4$)

Explora la capacidad de la glándula para utilizar el yodo de los alimentos en la síntesis de HT. La organificación del yodo implica su captación, oxidación e incorporación a tirosinas (MIT y DIT). Tanto el perclorato como el tiocianato tienen la capacidad de desplazar el yodo no organificado del folículo tiroideo. La prueba consiste en determinar la captación basal de ^{131}I , administrar en forma oral 0,4-1g de $KClO_4$ y realizar un segundo ensayo de captación a las 2 y 4h. Un valor inferior al 10% es el resultado esperado en el paciente eutiroideo, indicando escasa descarga por correcta organificación. Un valor superior al 10% indica un fallo en la capacidad de retener el ^{123}I dentro de la glándula, lo cual señala un probable defecto en la organificación, que puede ser total o parcial (dishormonogénesis por mutaciones en los genes TPO, DUOX2 y DUOXA2 o bocios asociados a enfermedades autoinmunes).

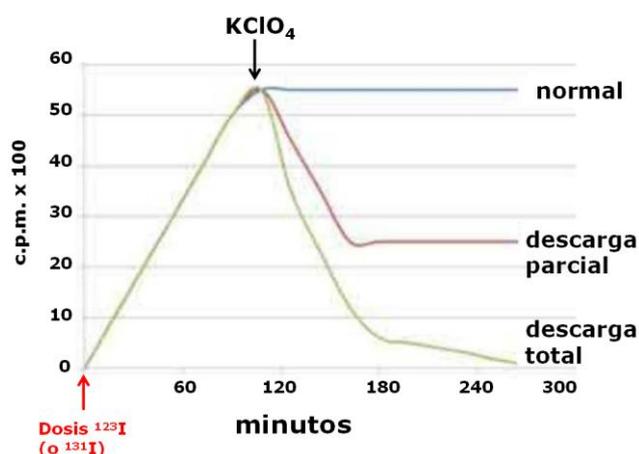


Figura 3. Prueba de descarga con perclorato por acción competitiva, (1) bloquea la captación de radioyodo por la tiroides y (2) libera el yodo inorgánico intratiroideo, pero no el organificado (Anales Españoles de Pediatría 2002; 56 (4): 42-52).

Test de Werner

Busca determinar la existencia de autonomía “preclínica” (áreas de autonomía con TSH normal). Se fundamenta en que la administración de T3 exógena debe inhibir la TSH y disminuir la función tiroidea. Para ello se efectúa una prueba de captación tiroidea basal y

posteriormente se administra, por vía oral, 75 µg/día de T3 durante 8 días, realizando una nueva captación al final. En pacientes eutiroideos la captación de radioyodo desciende aproximadamente al 50 % del valor basal. La prueba posee especial valor en el diagnóstico de casos dudosos de hipertiroidismo.

TIROIDES Y SISTEMA REPRODUCTOR FEMENINO

El sistema reproductor requiere una cantidad adecuada de HT para que funcione en forma adecuada. Las HT ejercen su acción de forma directa sobre las gónadas y demás órganos reproductivos o indirectamente modulando la secreción y/o la acción de las hormonas gonadotróficas, factores de crecimiento y otras proteínas que participan en la regulación de la función gonadal, dado que se ha descrito la presencia de receptores de HT en distintas poblaciones celulares del ovario. La disfunción tiroidea, clínica o subclínica, puede afectar la fertilidad de la mujer, el curso del embarazo establecido, la salud fetal y el estado materno y del recién nacido en el posparto.

La determinación de la TSH se recomienda de forma sistemática en pacientes embarazadas que tienen un alto riesgo para enfermedad tiroidea como:

- Antecedentes familiares de enfermedad tiroidea.
- Bocio.
- Anticuerpos AAT positivos.
- Síntomas o signos clínicos de disfunción tiroidea (anemia, hipercolesterolemia, etc).
- Diabetes tipo 1 u otra enfermedad autoinmune.
- Historia de aborto o parto prematuro.
- Infertilidad.
- Historia de radioterapia en cabeza o cuello.
- Tratamiento con amiodarona, litio o interferón.
- Provenientes de área deficitaria de yodo.
- Mayores de 30 años.

En estos casos, se recomienda determinar la TSH antes de la semana 10 de embarazo; si es elevada, se medirá T4L y aTPO. Si resultara de que los niveles séricos de TSH son elevado y aTPO negativos, se determinan los aTG y se sugiere la realización de una ecografía tiroidea.

Hipotiroidismo y fertilidad

Frecuentemente, el hipotiroidismo se asocia con alteraciones menstruales, anovulación y esterilidad. Se ha observado que la severidad de las anormalidades menstruales guarda relación con el grado de elevación de los niveles de TSH. Los receptores de HT están presentes en los folículos, donde actúan en sinergismo con los receptores de gonadotropinas estimulando las células de la granulosa y la diferenciación del trofoblasto. El hipotiroidismo puede alterar la secreción de gonadotropinas al influir sobre el metabolismo de estradiol, un regulador del eje hipotálamo-hipofisario. El hipotiroidismo primario también se relaciona con un aumento de los niveles séricos de Prolactina (PRL), resultante de un incremento de la concentración infundibular de TRH, un factor que estimula la secreción hipofisaria de PRL. La hiperprolactinemia interfiere con la secreción pulsátil de la Hormona liberadora de Gonadotropinas (GnRH). El hipotiroidismo severo se puede asociar también con la presencia ovarios poliquísticos.

Hipotiroidismo en el embarazo

Las enfermedades tiroideas son la segunda alteración endocrina en las mujeres en edad reproductiva después de la diabetes, por lo que es frecuente la asociación entre gestación y disfunción tiroidea. La causa más común de hipotiroidismo es la autoinmunidad (50-80% en países desarrollados) o el déficit de yodo (en países en desarrollo).

La tiroides experimenta cambios fisiológicos desde el comienzo de la gestación, consistentes en aumento del tamaño, vascularización e hiperplasia glandular. Durante el esta etapa, diferentes factores como el aumento de la producción hepática de TBG secundaria al incremento en los niveles plasmáticos de estrógenos, el estímulo ejercido por la gonadotropina coriónica humana (β -hCG) sobre los receptores de TSH, así como el aumento del metabolismo hormonal y del aclaramiento renal de yodo, inducen a la glándula tiroides a una mayor producción de HT (Figura 4).

La sobrecarga funcional comienza a los pocos días de la concepción y se mantiene durante todo el embarazo. El volumen tiroideo aumenta en función de las reservas de yodo: 10% si son óptimas; 20-40% si existe déficit, con la subsiguiente aparición de bocio. La ingestión diaria de yodo recomendada es de 30 μ g en recién nacidos prematuros, 90 μ g desde el nacimiento hasta los 6 años, 120 μ g hasta la pubertad, 150 μ g para los adultos y 250–500 μ g durante el embarazo y la lactancia. La gestación representa, por tanto, un test de estrés para la glándula tiroides, que provocará hipotiroidismo en mujeres con una reserva tiroidea limitada o una deficiencia de yodo.

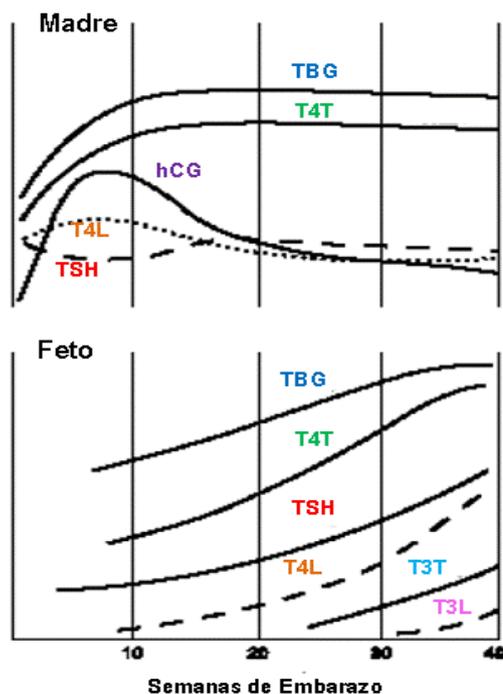


Figura 4. Cambios en la función tiroidea materna y fetal durante el embarazo. Después del parto los cambios en la función tiroidea gradualmente revierten. Burrow y col. Maternal and Fetal Thyroid function. N Engl J Med 1994; 331:1072-8.

La evaluación de la función tiroidea durante el embarazo requiere rangos de referencia (RR) específicos para cada trimestre, para cada método, aplicables a poblaciones yodo-suficientes, sin autoinmunidad tiroidea y acordes a la etnia. El RR de la TSH durante la gestación, bajo la influencia de la hCG, es inferior al rango normal de referencia de la TSH fuera del embarazo. Esto sucede debido a que la hCG posee homología estructural con la TSH y actúa estimulando la glándula cual TSH, lo que provoca una disminución de la tirotrofina materna en el primer trimestre, con recuperación posterior. Guías internacionales recomiendan que si no existieran RR propios disponibles para TSH deberían usarse los valores que figuran en la Tabla 7.

Sin embargo, publicaciones recientes han encontrado que el percentil 97,5 para el límite superior de TSH durante el embarazo podría ser más alto que el descrito en las guías y, por lo tanto, si se aplicaran los criterios anteriormente mencionados, un porcentaje no despreciable de pacientes podría ser tratado innecesariamente. La realización de la prueba de TRH podría ayudar a definir las pacientes que van a ser tratadas. Se recomienda que la identificación de gestantes con hipotiroidismo tenga lugar durante la visita prenatal o en el momento del diagnóstico del embarazo. En mujeres con hipotiroidismo pregestacional se

debe ajustar la dosis farmacológica de HT antes del embarazo para conseguir una TSH igual o inferior a 2,5 mUI/L.

Tabla 7. Valores de referencia de TSH maternos según trimestre de gestación

Trimestre de gestación	TSH (mUI/L)
Primero	0,1-2,5
Segundo	0,2-3,0
Tercero	0,3-3,0

(American Thyroid Association y American Endocrine Society)

El suministro de HT maternas en las primeras semanas de vida resulta crítica para el desarrollo cerebral del feto (10-12 semanas). La T4 materna atraviesa la placenta, y en menor cantidad lo hace la T3, que se obtiene por desyodación de T4 materna, y que es imprescindible para el desarrollo neurológico. En este sentido, casi toda la T3 presente en los receptores nucleares de la corteza cerebral fetal desde el primer trimestre de embarazo se genera por la desyodación local de la T4 de origen materno. A partir de la semana 22-24, la tiroides fetal comienza a sintetizar HT, pero las hormonas maternas son imprescindibles hasta el final del embarazo.

El hipotiroidismo materno tiene efectos adversos graves sobre el feto y se asocia a un aumento de la morbilidad perinatal. La gestante con hipotiroidismo no tratada tiene mayor riesgo de complicaciones obstétricas, como preeclampsia, desprendimiento prematuro de placenta y hemorragia posparto, y sus hijos de prematuridad, bajo peso y alteraciones en el desarrollo neuropsicomotor.

Hipotiroidismo subclínico materno

Se ha reportado que el hipoSC y la TAI se vinculan a alteraciones reproductivas en la mujer. Los factores inmunológicos juegan un papel importante en los procesos de implantación, fertilización y desarrollo placentario. Los anticuerpos antitiroideos son detectables hasta en el 20% de gestantes con eutiroidismo. La TAI, aún con normofunción glandular, aumenta el riesgo de aborto o prematuridad, tanto en embarazos espontáneos como productos de fertilización in vitro. Además, una alta concentración de aTPO durante el primer trimestre del embarazo constituye un factor de riesgo para el desarrollo de tiroiditis posparto. La prevalencia de TAI es mayor en mujeres infértiles, especialmente cuando la causa es endometriosis, síndrome de ovarios poliquísticos e insuficiencia ovárica

primaria. Sin embargo, a pesar de que se ha demostrado la asociación entre la presencia de TAI y subfertilidad, esto no prueba causalidad.

Hipotiroxinemia materna aislada

La hipotiroxinemia aislada descubierta en el embarazo se define con T4L por debajo del percentil 2,5 (o del p10 de acuerdo a otros autores) con TSH dentro del rango de referencia para el primer trimestre de gestación. La hipotiroxinemia es más frecuente en áreas yodo-deficientes y en los casos en que no se mantienen la ingesta de yodo recomendada por la OMS. Se ha demostrado que la hipotiroxinemia materna en etapas precoces del desarrollo (previas a la semana 20 de gestación) determina en el feto alteraciones irreversibles en la citoarquitectura de la corteza somatosensorial y del hipocampo, porque afecta el proceso de migración neuronal. Estas lesiones no tienen traducción clínica perinatal (no ocasionarían alteraciones obstétricas), sino que se manifiestan más tarde en el niño con alteraciones psiconeurointelectuales como disminución del coeficiente intelectual, defectos motores y del lenguaje.

Hipertiroidismo y embarazo

El hipertiroidismo produce frecuentemente oligo u amenorrea en mujeres en edad fértil. Durante la gestación se presenta en un 0,1-0,4% de gestantes, siendo con mucho la causa más frecuente la EG. El pasaje transplacentario de TSH de la madre al feto es despreciable. Sin embargo, los autoanticuerpos cuantitativamente más significativos (inmunoglobulina G) cruzan libremente placenta, al igual que el yodo, los antitiroideos y los β -bloqueantes.

El hipertiroidismo clínico no impide la concepción, pero puede condicionar severas consecuencias materno-fetales y neonatales. Se trata con fármacos antitiroideos que bloquean la síntesis de HT al impedir la organificación del yodo (metimazol, carbimazol, propiltiuracilo). La EG no controlada se asocia a mayor riesgo de aborto, prematuridad, hipertensión gestacional, tirotoxicosis e insuficiencia cardiaca congestiva materna.

Enfermedad de Graves neonatal

El paso transplacentario de anticuerpos TRAb puede provocar hipertiroidismo fetal (HF) y neonatal debido a la activación del receptor de la TSH en la tiroides del feto y del recién nacido. El HF se desarrolla en la segunda mitad de la gestación, cuando la tiroides fetal es capaz de responder a la TSH. Debe sospecharse ante la presencia de niveles elevados de TRAb (>3-5 veces el límite superior de referencia) a partir de la semana 20 en

madres con hipertiroidismo activo o en remisión, antecedentes de pérdidas fetales o neonatales e hipertiroidismo neonatal previo. Las manifestaciones clínicas del HF incluyen bocio, restricción del crecimiento intrauterino, taquicardia e insuficiencia cardiaca fetal. Debido a su pasaje placentario, la administración materna de metimazol constituye el tratamiento de elección.

El hipertiroidismo neonatal (HN) puede presentarse desde el nacimiento (taquicardia, bocio, exoftalmos, irritabilidad, baja ganancia de peso, etc.) o puede tener un inicio diferido (hasta el día 29 de vida) debido a los efectos de los antitiroideos maternos o a la coexistencia de anticuerpos bloqueadores del receptor de TSH. El diagnóstico de HN se debe considerar si los TRAb son > 5 UI/L en sangre de cordón, con T4L elevada entre el 2º y 4º día de vida.

La presencia de bocio en estos niños puede tener dos orígenes: 1) paso placentario de antitiroideos que controlan la enfermedad materna, pero causan hipotiroidismo fetal, o 2) estimulación de la tiroides fetal por los TRAb maternos. No se han descrito efectos tirotóxicos significativos sobre el feto por pasaje transplacentario de anticuerpos aTg o aTPO.

Otras causas menos frecuentes de hipertiroidismo en el embarazo son el adenoma tóxico, el bocio multinodular tóxico y la hiperemesis gravídica.

CONSIDERACIONES DE LABORATORIO

Debido al aumento de las concentraciones de TBG secundario al incremento de estrógenos circulantes, las HT totales (T4T y T3T) son más elevadas durante el embarazo. Este cambio en TBG se relaciona, en gran parte, al aumento en el grado de sialilación de la molécula, que modifica su velocidad de clearance y produce un aumento en su vida media en circulación. Los valores de referencia para T4T y T3T se pueden calcular en el 2º y 3º trimestre multiplicando por 1,5 los de la población general.

El comportamiento de los valores de hormonas tiroideas libres durante el embarazo es un tema controvertido; para algunos autores aumentan, disminuyen o no cambian, y esto varía según el método de determinación y el momento de la medida. El método de referencia para medir T4L durante el embarazo es la espectrometría de masas a partir de un dializado del suero. En la mayoría de los laboratorios clínicos la determinación de T4L y T3L se lleva a cabo por técnicas de inmunoensayo.

ACTIVIDAD PRÁCTICA

Problemas de Aplicación

Para lograr un mayor aprovechamiento de las clases teóricas y prácticas, los alumnos deberán revisar con antelación los siguientes temas:

- Anatomía, embriología e histología de la glándula tiroidea.
- Metabolismo del yodo: fuentes, absorción, distribución, excreción. Captación tiroidea.
- Mecanismo de acción de las hormonas tiroideas.
- Regulación de la función tiroidea: componentes del eje hipotálamo-hipófisis-tiroidea, su interrelación funcional; factores de crecimiento, autorregulación tiroidea.

REVISIÓN

1) Esquematizar y describir el funcionamiento de los mecanismos de control que forman parte del eje hipotálamo-hipófisis-tiroideo.

2) Describa los efectos fisiológicos y los mecanismos de acción de las hormonas tiroideas sobre los siguientes eventos:

- Desarrollo y crecimiento:

- Consumo de oxígeno:

- Termogénesis:

- Balance mineral:

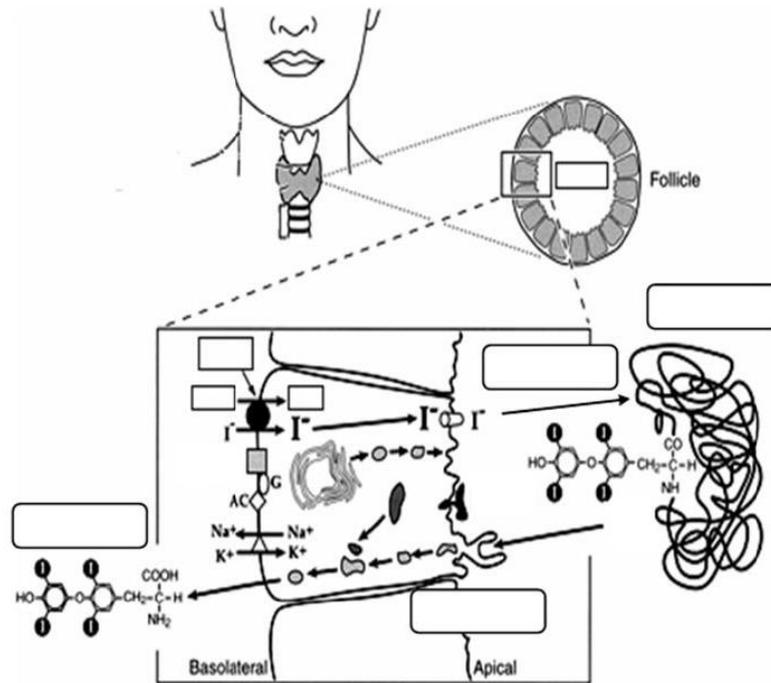
- Metabolismo intermedio:

- Circulación sanguínea:

- Regulación hipotalámica e hipofisaria:

- Regulación autonómica:

3) Completar el siguiente esquema sobre la síntesis y secreción de las hormonas tiroideas:



- En qué consiste la Prueba de Captación de Iodo Radioactivo?.
- ¿Cuál es el fundamento de esta prueba?
- ¿De qué factores depende el resultado de la captación?
- ¿En una persona sana, cómo afectaría a la captación tiroidea, la administración de TSH? ¿Sobre qué efectores celulares e intracelulares actuaría?

CASOS CLÍNICOS DE LA GLÁNDULA TIROIDES

Caso 1

Mujer de 25 años, presenta desde hace 4 años bocio difuso de 30g y eutiroidismo. Laboratorio: TSH: 0,8 μ UI/mL; T3: 150 ng/dL; T4L: 1,4 ng/dL; y anticuerpos anti-tiroideos (AAT): positivos a títulos bajos.

Dos años más tarde, después de 2 abortos espontáneos, se confirma embarazo de 8 semanas. Se mantiene clínica y bioquímicamente eutiroides durante el embarazo y posparto inmediato.

A las 12 semanas postparto refiere intranquilidad, intolerancia al calor, diaforesis, palpitations, debilidad muscular y polidefecación. Al examen físico destaca: frecuencia cardíaca 108 latidos/minuto (lpm); presión arterial 150/90 mmHg; leve exoftalmia bilateral; tiroides difusamente aumentada (35g), firme e indolora y tono muscular disminuido. Función tiroidea: TSH: <0,01 μ UI/mL; T3: 350 ng/dL; T4L: 2,0 ng/dL. La ecografía tiroidea evidencia bocio, con múltiples áreas hipoecoicas, pequeñas y confluentes de 2 a 4 mm, sin evidencia de lesiones focales.

A las 20 semanas postparto cursa con cuadro depresivo y al examen el bocio se estima en 25 g. TSH: 9,8 μ UI/mL; T4L: 0,9 ng/dL. A los 9 meses postparto se encuentra en tratamiento con levotiroxina 100 μ g/día por hipotiroidismo.

1. ¿Cuál es su diagnóstico probable?
2. ¿Qué exámenes solicitaría para confirmarlo?
3. ¿Cómo explicaría el hipotiroidismo post-parto?

Caso 2

Paciente nuligesta de 20 años, que consulta por 4 años de oligomenorrea seguidos por 2 de amenorrea; relata estreñimiento, incremento de 4 kg de peso en el último año y cefalea frontal en las últimas 2 semanas. No manifiesta aumento de vello, intolerancia al frío o alteraciones visuales. Antecedentes: menarquia a los 13 años; madre con hipotiroidismo espontáneo en tratamiento. Examen físico: piel normal, desarrollo sexual Tanner V. Glándula tiroides: aumento difuso al doble de tamaño; galactorrea bilateral.

Laboratorio: prolactina: 82 ng/mL; FSH: 9 mUI/mL; TSH: 42 μ UI/mL; T4: 2,0 μ g/dL; Estradiol: < 20 pg/mL.

- a) ¿A qué atribuye la presencia de galactorrea?
- b) ¿Cómo explica la elevación conjunta de TSH y prolactina?
- c) ¿Cómo interpreta el binomio FSH/estradiol y la amenorrea?

Caso 3

Mujer de 51 años que consulta a su médico por aumento de tamaño de la zona frontal del cuello. Como antecedentes de importancia, la mujer remite una ganancia de peso de 10 kg en el último año y fatiga crónica. La paciente describe que su madre de 78 años recibe medicación tiroidea, pero no puede especificar el motivo. Se solicitó: hemograma completo, perfil metabólico básico, TSH y T4L. Todos los resultados se hallaron dentro de los VR, excepto: Colesterol total 267 mg/dL (VR: < 200 mg/dL); T4L: 0,4 ng/dL y TSH: 9,3 μ UI/mL.

- a) ¿Cuál es su diagnóstico probable?
- b) ¿Qué exámenes solicitaría para confirmarlo?
- c) ¿Qué metodología emplearía para su determinación?

Caso 4

Paciente de sexo femenino, de 17 años de edad con antecedente de meduloblastoma de fosa posterior, diagnosticado a los 8 años de edad. Luego de la exéresis total del tumor recibió radioterapia cráneo-espinal. Los estudios de función tiroidea durante la evolución post-quirúrgica mostraron: TSH: 30 μ UI/mL; T4: 4 μ g/dL; T4L: 0,2 ng/dL, por lo que se inicia tratamiento con levotiroxina.

Nueve años más tarde se detecta por estudio ecográfico la presencia de un nódulo tiroideo en tercio medio del lóbulo derecho, sólido, hipoecogénico, no encapsulado, con microcalcificaciones y vascularización intranodular. Ganglio laterocervical superior bilateral inespecífico, menor a 1 cm. Se practica la punción-aspiración con aguja fina (PAAF) del nódulo, cuyo análisis histológico revela la presencia de carcinoma papilar. Se realiza tiroidectomía total con vaciamiento ganglionar regional.

- a) ¿Cuál es el diagnóstico inicial que presentó la paciente y por el que debió ser medicada?
- b) ¿Qué utilidad posee la ecografía tiroidea y la PAAF en la evaluación de los nódulos tiroideo?
- c) ¿Qué antecedente de la paciente predispone al desarrollo de cáncer de tiroides?

Caso 5

Recién nacida hija de madre con enfermedad de Basedow Graves, que recibió propiltiouracilo hasta el término del embarazo, con buen control del hipertiroidismo. Al nacer su peso era de 3.000 g, frecuencia cardíaca 100 lpm y temperatura corporal normal. No se palpaba bocio.

A los 5 días se realizan exámenes que muestran: TSH: 80 μ UI/mL, T4: 5 μ g/dL, T3: 60 ng/dL, anticuerpos anti-receptor de TSH (TRAb) 20%. Se inicia levotiroxina 37,5 μ g/día mostrando a los 12 días de vida T4: 9 μ g/dL, T3: 150 ng/dL y TSH: 6 μ UI/mL. A los 35 días de vida se suspende la levotiroxina por tener TSH: 0,5 μ UL/mL, T4: 10 μ g/dL y T3: 180 ng/dL.

En un nuevo control a los 2 meses de vida se constata mal incremento de peso, polidefecación, mirada brillante y frecuencia cardíaca de 170 lpm. El control de exámenes mostraba TSH: < 0,1 μ UI/mL, T4: 23 μ g/dL, T3: 370 ng/dL. Se inició tratamiento con propiltiouracilo el que se mantuvo por 1 mes. En controles posteriores esta niña mantiene crecimiento y hormonas tiroideas normales.

- a) ¿Cuál es la causa más probable del hipotiroidismo transitorio que presentó al nacer?
- b) ¿Cómo explica desde el punto fisiopatológico la ocurrencia posterior de hipertiroidismo?
- c) ¿Cuál es el pronóstico a corto y largo plazo del hipertiroidismo neonatal?

Caso 6

Catalina, de 56 años, consulta al endocrinólogo porque nota, desde hace cuatro meses, lagrimeo fácil y congestión conjuntival; “se despierta con los ojos hinchados” y “no tolera la luz solar ni las corrientes de aire”. Un familiar cercano notó que el ojo derecho aparecía como “más saliente”. Simultáneamente, relata nerviosismo e irritabilidad, no duerme bien y experimenta palpitaciones frecuentes. Ha perdido 4 kg de peso pese a mantener un apetito normal y refiere un aumento en el número de deposiciones y diarrea ocasional. Se visualiza un aumento en la región anterior e inferior del cuello que se desplaza con la deglución y que, a la palpación, se revela como un bocio difuso, firme, irregular, con el lóbulo derecho mayor que el izquierdo. El pulso es regular, con una frecuencia de 118 lpm. La maniobra de Plummer es positiva. El laboratorio de la función tiroidea mostró: T3: 318 ng/mL, T4: 15,6 µg/dL y TSH: < 0,01 µUI/mL. Se solicitó el perfil de anticuerpos tiroideos, con los siguientes resultados: aTG negativos; aTPO 1/400 y TRAb >20%.

a) ¿Qué diagnóstico sugiere la presencia de alteraciones oculares y el patrón tiroideo presente en esta mujer?

b) Explique qué acciones de la hormona tiroidea se relacionan los síntomas que presenta la paciente:

Diarrea:

Debilidad muscular:

Taquicardia:

Exoftalmia:

VALORES DE REFERENCIA

TSH (mUI/L): 0,4 - 4

T4L (ng/dL): 0,8 - 1,8

TRAb (UI/L): ≤ 10

PRL (ng/mL): 9-29

FSH (mUI/mL): 3,3-11,3 (Fase folicular)

LH (mUI/mL): 1,6-7,9 (Fase folicular)

Estradiol (pg/mL): 25-195 (Fase folicular)

T3T (ng/dL): 60 - 200

T3L (ng/dL): 0,30 - 0,51

aTPO (UI/mL): ≤ 60

T4T (µg/dL): 4,5 -12,5

Tiroglobulina (ng/mL): < 50

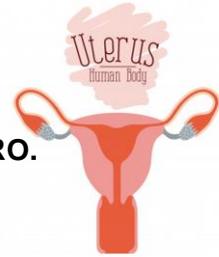
aTG (UI/mL): ≤ 40

BIBLIOGRAFÍA

- CÁNCER DE TIROIDES: ENFOQUE CLÍNICO. L Wartofsky. Separata Montpellier. 26 (4) :1-32, 2018.
- BIOCHEMICAL TESTING IN THYROID DISORDERS. H Nazanene, M Papaleontiou. Endocrinol Metab Clin N Am. 2: 44-50, 2017.
- GUÍA DE TIROIDES Y EMBARAZO. M Abalovich y col. Rev Argent Endocrinol Metab. 5: 5-15, 2016.
- ENFERMEDAD TIROIDEA Y GESTACIÓN. PROTOCOLOS SEGO. Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia. Prog Obstet Ginecol. 58: 101-111, 2015.
- THYROID DISEASES DURING PREGNANCY: A NUMBER OF IMPORTANT ISSUES. G Krassas et al. Hormones 14: 59-69, 2015.
- GREENSPAN. ENDOCRINOLOGÍA BÁSICA Y CLÍNICA. DG Gardner, D Shoback. 9ª Edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. Madrid, 2013.
- EFECTOS DE LAS HORMONAS TIROIDEAS SOBRE LA FUNCIÓN OVÁRICA. G Jahn y col. Revista SAEGRE XVII: 11-15, 2010.
- TERCER CONSENSO ARGENTINO SOBRE PATOLOGÍAS ENDOCRINOLÓGICAS DISFUNCIÓN TIROIDEA SUBCLÍNICA. DISFUNCIÓN TIROIDEA Y AMIODARONA. RAEM; 46: 19-24, 2009.

TRABAJO PRÁCTICO N° 9

SISTEMA REPRODUCTOR FEMENINO. ENFERMEDADES MÁS FRECUENTES DEL OVARIO Y ÚTERO. DIAGNÓSTICO POR EL LABORATORIO



OBJETIVOS

- Introducir al alumno en el área del conocimiento de la Endocrinología Ginecológica.
- Estudiar las patologías más frecuentes del aparato reproductor femenino a través de información teórica y de resolución de casos clínicos.
- Diagnosticar por el laboratorio enfermedades gineco-endocrinas: importancia de variables pre-analíticas y clínicas.

INTRODUCCIÓN

En la mujer, el control de la función reproductiva requiere una regulación precisa, cuantitativa y temporal del eje hipotálamo-hipófisis- gonadal.

A nivel de **hipotálamo**, las neuronas que fabrican la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) se encuentran principalmente en el núcleo arqueado, situado por fuera de la barrera hemato-encefálica, lo que le permite responder a estímulos aferentes de originados en distintos órganos. Estas células se originan en el área olfativa, en una placa engrosada del ectodermo, y migran durante la embriogénesis a lo largo de los pares craneales que conectan la nariz y los núcleos septales preópticos del encéfalo.

La GnRH es un decapeptido que se secreta en forma pulsátil y se libera en el torrente sanguíneo portal hipofisiario, a nivel de la eminencia media. La sangre portal lleva la GnRH a la **glándula pituitaria** (adenohipófisis), que contiene células gonadotropas, donde la GnRH activa su propio receptor. Esto resulta en la activación de proteínas implicadas en la síntesis y secreción de las gonadotropinas, hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH). Ambas son hormonas glucoproteicas constituidas por 2 subunidades, alfa y beta. Mientras que la subunidad alfa es común para FSH, LH, TSH y hCG, la subunidad beta es específica de cada hormona y le confiere sus propiedades biológicas. Se necesita la liberación pulsátil de GnRH para lograr una secreción sostenida de gonadotropinas.

En el **ovario**, FSH y LH se unen a sus receptores en las células de la granulosa y la teca respectivamente, para estimular la **foliculogénesis** y la producción de **esteroides sexuales** (estrógenos, progesterona y andrógenos), péptidos gonadales (activina, inhibina y follistatina) y factores de crecimiento. Entre otras funciones, los distintos factores derivados del ovario retroalimentan al hipotálamo y a la hipófisis para inhibir o estimular (en la mitad del ciclo) la secreción de GnRH y gonadotropinas. Durante la vida fértil de la mujer, la liberación periódica de gametos y la producción de hormonas esteroideas se integran en un ciclo continuo de maduración folicular, ovulación, formación y regresión del cuerpo lúteo, que finaliza con la menopausia.

Los esteroides ováricos producen proliferación y diferenciación del endometrio para facilitar la implantación del embrión. Si la fertilización no tuvo lugar, el descenso en los niveles de progesterona no puede sostener el endometrio secretor y se produce la menstruación (Figura 1).

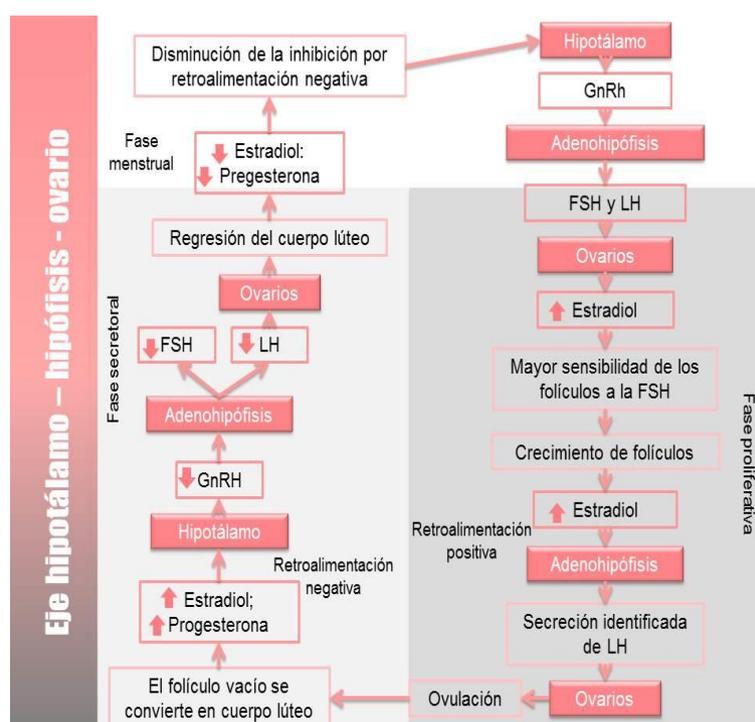


Figura 1. Regulación del eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario (Harrison's Endocrinology- 2013 by McGraw-Hill Education, Section 2. Reproductive Endocrinology, pg 126 a 224).

Hormonas esteroides y su acción en el tracto genital femenino

Los tipos de esteroides sintetizados y secretados dependerán de la actividad enzimática de la célula esteroideogénica y de su condición fisiológica. La vía Δ^4 -3-cetona es

la predominante en el cuerpo lúteo, mientras que la vía $\Delta 5$ - 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa es característica de tejidos no lúteos. Por consiguiente, el cuerpo lúteo secreta principalmente progesterona y estrógenos por la vía $\Delta 4$, mientras que en el folículo, dehidroepiandrosterona (DHEA) y androstenediona sirven como precursores para la síntesis de estrógenos (Figura 2).

Estrógenos (estradiol, estrona y estriol). Promueven la regeneración del epitelio después de la menstruación y producen la fase de la proliferación del estroma y vasos de glándulas como ovario, útero y mamas. Su acción en la adolescencia es impulsar el desarrollo del miometrio.

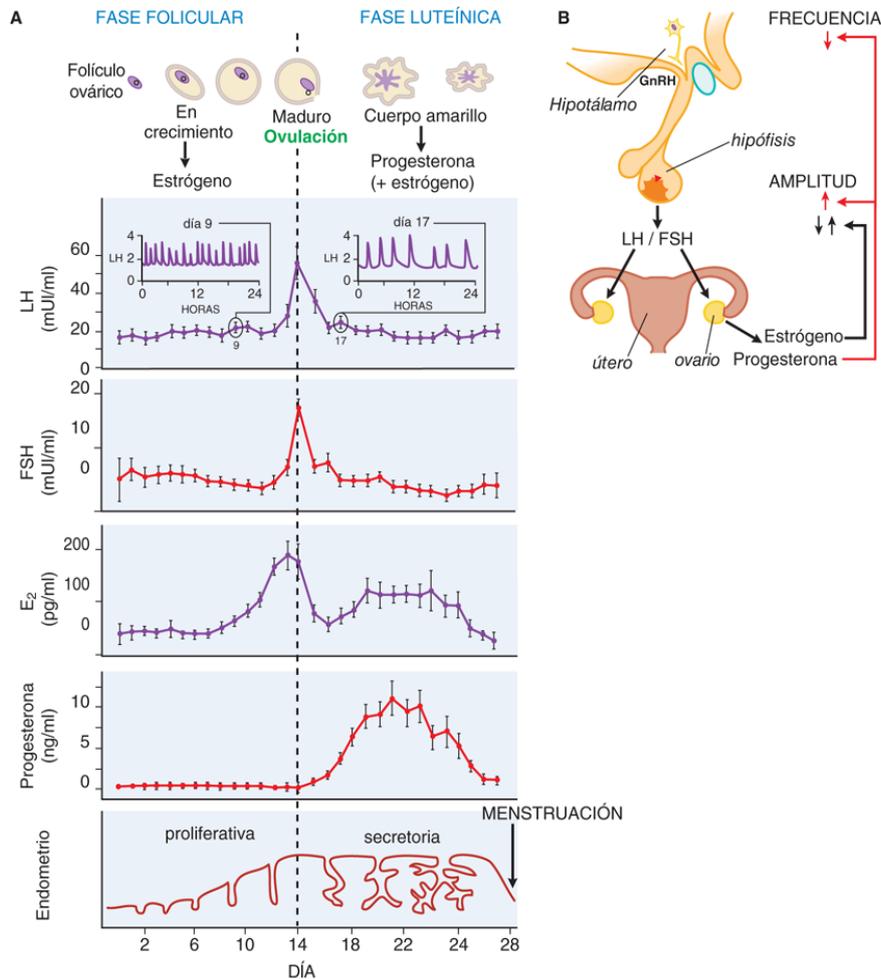
El **estradiol** (E2) es el principal estrógeno ovárico durante la vida reproductiva. Es sintetizado por las células de la granulosa del folículo ovárico a partir de los andrógenos (androstenediona y testosterona), sustratos provenientes de las células tecales ováricas cuya reacción es catalizada por la enzima aromatasa. La secreción de E2 al plasma es variable durante el ciclo menstrual, con valores alrededor de 30 pg/mL en la fase folicular temprana que llegan a 300 pg/mL en la fase peri-ovulatoria, disminuyen marcadamente en los 2-3 días siguientes a la ovulación y alcanzan los 200 pg/mL durante la fase lútea.

El estrógeno fundamental en la post-menopausia es la **estrona** (E1), que procede de la conversión periférica de la androstenediona de origen suprarrenal (95%) y ovárico (5%). Sus niveles varían de una mujer a otra según el peso, el porcentaje de grasa corporal, la edad y según la fase del ciclo (entre 40 a 170 pg/mL).

En el climaterio, y como consecuencia del cese de la función ovárica, existe una disminución de los niveles circulantes de estrógenos alcanzando valores entre 13-15 pg/mL de E2 y 30 pg/mL de E1. Este hipo-estrogenismo es fundamental en la fisiopatología del síndrome climatérico. El **estriol** es producido exclusivamente por la placenta en el embarazo, y puede haber pequeñas cantidades por conversión periférica en mujeres no grávidas.

Progesterona (P4): es producida por el ovario bajo la influencia de las hormonas LH y FSH, principalmente por el cuerpo lúteo, presente en la segunda mitad del ciclo menstrual (prepara el útero para anidar al óvulo fecundado), y a partir del tercer mes del embarazo, por la placenta. Ejerce múltiples efectos fisiológicos, en particular sobre los órganos diana previamente sensibilizados por los estrógenos: gestágena, antiestrogénica, no androgénica y antialdosterona. Además, se sintetiza en el cerebro (neuroesteroide) afectando a la sinapsis y la mielinización (mejora memoria y habilidad cognitiva). En las mujeres, los niveles de P4 son bajos durante la fase pre-ovulatoria o folicular del ciclo menstrual (< 2 ng/mL), aumenta después de la ovulación (> 5 ng/mL), y se mantienen elevados durante la

fase lútea. Con el inicio de la fase lútea-placentaria los niveles de P4 se elevan aún más y puede llegar a 100-200 ng/mL. Una disminución en los niveles de la hormona es fundamental para el inicio del trabajo de parto. Tras la expulsión de la placenta y durante la lactancia, los niveles de P4 son muy bajos. Los hombres adultos tienen niveles similares a los de las mujeres durante la fase folicular.



Fuente: Laurence L. Brunton, Bruce A. Chabner, Björn C. Knollmann: *Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica*, 12e: www.accessmedicina.com. Derechos © McGraw-Hill Education. Derechos Reservados.

Figura 2. Niveles circulantes de hormonas durante el ciclo menstrual.

Andrógenos: poseen un importante rol como prohormona en la síntesis de estrógenos por acción de aromatasa. La mayor parte de los andrógenos en las mujeres en edad reproductiva surgen de la corteza suprarrenal y las células de la teca y estroma ovárico. Un tercio de la producción de testosterona se efectúa en el ovario, mientras que el resto se explica por la conversión extragonadal de androstenediona (tejido adiposo y piel). Los niveles de andrógenos exhiben cambios cíclicos, con un pico en mitad del ciclo sexual.

Ambos, el exceso y la disminución de andrógenos afectan negativamente la fertilidad femenina, ya que alteran la folículo-genesis.

Las hormonas esteroides ejercen su acción por medio de su unión a receptores miembros de la superfamilia de receptores nucleares de factores de transcripción, entre los que se encuentran los receptores de estrógenos (RE), progesterona (RP) y andrógenos (RA), entre otros. Según la descripción tradicional, estos receptores se localizan en el citoplasma y al unirse a su ligando, dimerizan y traslocan al núcleo donde actúan como factores de transcripción. A su vez, las hormonas esteroides inducen efectos que parecen no necesitar de la actividad transcripcional de los receptores clásicos, como la activación de la adenilato ciclasa, de la tirosina quinasa Src, de las MAPKs, y la PI3K; la producción de segundos mensajeros y el incremento de las concentraciones de calcio intracelular. Dado que estos efectos ocurren en tiempos muy cortos como para ser mediados por la síntesis de ARN o nuevas proteínas, han sido denominados efectos no genómicos.

El E2, principalmente durante la fase folicular del ciclo, induce la síntesis y el desarrollo de los receptores para estrógenos y P4, aumentando su concentración. La P4 por el contrario, ejerce un efecto negativo, inhibitorio, sobre el número de sus propios receptores en el endometrio.

PATOLOGÍAS MÁS FRECUENTES DEL SISTEMA REPRODUCTOR FEMENINO

A) Trastornos de la Pubertad

La pubertad es un estadio del desarrollo durante el cual se completa el crecimiento y la maduración gonadal hasta conseguir la fertilidad. Es un proceso complejo que implica la activación y maduración del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal (HHG), y la aceleración y finalización del crecimiento somático (Figura 2). A su vez, durante este período tienen lugar profundos cambios conductuales y psicológicos.

Los cambios puberales son secundarios a la activación de los mecanismos neuroendocrinos liderados por el SNC en una cascada de señales, en la cual participan genes y factores de transcripción, células gliales, neurotransmisores, sensores periféricos de reserva energética, entre otros. La secreción pulsátil de GnRH se inicia antes que se observen los primeros signos físicos puberales; se produce la liberación pulsátil primero de LH nocturna y después de FSH, y luego estos picos aparecen también durante el día. La gónada responde produciendo los esteroides sexuales que son los responsables de todos los cambios físicos. Algunos genes han sido identificados en la regulación del complejo

neuroendocrino que controla el inicio de la pubertad, entre ellos el gen Kiss1 que codifica una familia de neuropéptidos llamada kisspeptinas, cuya expresión es alta en regiones cerebrales. Kisspeptina (a través de su receptor GPR54), activa la secreción de GnRH para iniciar la pubertad y mantener la función reproductiva del adulto.

La secuencia de eventos que caracterizan la pubertad requiere un promedio de 4,5 años (rango 1,5-6 años), e incluye:

- Aceleración de la velocidad de crecimiento.
- Desarrollo mamario.
- Desarrollo del vello pubiano y axilar.
- Aparición de la menarca.

Existe una amplia variación en el rango de edad de inicio de la pubertad en la población mundial sana, esto sugiere que factores genéticos y ambientales modulan el tiempo de la pubertad. Es importante conocer a qué edad se desarrollaron los padres, pues en general el patrón familiar se repite.

Los trastornos de la pubertad se producen porque ésta comienza antes, **-pubertad precoz-**, o porque sucede en forma más tardía, **-pubertad retrasada-**. La telarquía prematura aislada y la pubarquia precoz aislada se consideran variantes del desarrollo puberal normal y no se acompañan de otros signos de desarrollo puberal (Tabla 1).

Tabla 1. Variaciones de la Pubertad normal

<p>Telarquia prematura aislada</p>	<p>Se refiere al desarrollo de los senos en ausencia de otros signos clínicos de pubertad o de secreción de estrógenos.</p> <p>El inicio de la telarquía prematura aislada está generalmente presente dentro de los primeros tres años de vida y puede continuar a través de la pubertad o retroceder en el tiempo.</p> <p>Cuando la telarquía es el único signo de inicio de la pubertad y no es seguido por el progreso en otras características sexuales secundarias, la condición se considera una variante puberal natural que no requiere tratamiento adicional.</p> <p>La ecografía pélvica puede resultar útil en las primeras etapas para distinguir entre las formas aisladas y progresivas de la telarquía.</p>
<p>Pubarquia precoz</p>	<p>Es una manifestación común de adrenaarquía (etapa puberal marcada por el aumento de la secreción de andrógenos suprarrenales). Los niños afectados pueden mostrar alguna evidencia de una mayor velocidad de crecimiento o de edad ósea avanzada, así como la aparición de vello axilar, olor corporal y acné.</p>

La edad cronológica tiene poca correlación con la maduración sexual y el crecimiento puede ser muy variable; por ello el índice de maduración sexual se evalúa mediante los estadios de Tanner (1962), los cuales se basan en el desarrollo de los órganos genitales y caracteres sexuales secundarios (Anexo 1). Esto permite diferenciar la pubertad normal de la patológica.

1- Pubertad precoz

Se define la **pubertad precoz** (PP) a la aparición de los caracteres sexuales secundarios antes de los 8 años en las niñas (ya sea botón mamario o vello púbico) y de los 9 años en los niños ($\approx 2,5-3$ DE por debajo de la edad media para el sexo y población estudiada). La PP puede evolucionar en forma progresiva y comprometer tanto el desarrollo físico como la maduración ósea y la talla final objetivo genética (predicción de talla adulta). La PP es 10 veces más frecuente en niñas que en niños, y en la mayoría de los casos es de origen central. Los factores asociados con la PP incluyen obesidad, disruptores químicos endocrinos y restricción del crecimiento intrauterino.



Los *disruptores endocrinos* son sustancias químicas que alteran el equilibrio hormonal y la regulación del desarrollo embrionario y, por tanto, con capacidad de provocar efectos adversos sobre la salud de un organismo o de su progenie [Atrazina (herbicida), Bisfenol (resina epoxi), percloratos (carburantes), etc].

Causas más frecuentes de PP:

- a) Pubertad Precoz Central (PPC). Activación del eje HHG.
- b) Pubertad Precoz Periférica (PPP). Incremento de esteroides sexuales no regulados por gonadotrofinas. Isosexual o heterosexual.
- c) Forma mixta. Inicio periférico y desencadenamiento posterior de una PPC.

I. PP Central o pubertad precoz verdadera (gonadotropina-dependiente)

El incremento de esteroides sexuales es el resultado de una reactivación normal pero precoz del eje HHG y, por ello, siempre es isosexual (desarrollo de los caracteres sexuales secundarios, acorde con el sexo genético). La PPC predomina en niñas, y su etiología habitualmente es desconocida (idiopática), aunque siempre debe descartarse una patología endocraneal. Las causas de PPC pueden clasificarse en:

- a) Idiopática
- b) Secundaria
 - Tumores del SNC: hamartomas, astrocitomas, gliomas, germinomas, craneofaringioma.
 - Malformaciones del SNC: quistes aracnoideos, hidrocefalia, displasia septo-óptica
 - Agresiones al SNC: secuelas de infecciones, radiación, traumatismos, neurofibromatosis
- c) Mutaciones genéticas
 - Activadoras: KISS1, GPR54
 - Inactivantes: MKRN3 (makorin RINGfinger protein 3)

La irradiación intracraneal y otras lesiones orgánicas alteran los ritmos neuronales que inhiben el generador de pulsos GnRH y ocasionan PPC. El mecanismo por el cual un insulto endocraneal produce una activación precoz de la pubertad se desconoce, aunque se especula, en que por un lado, puede existir un factor mecánico que altere la inhibición de las neuronas liberadoras de GnRH y, por otro, en función del tipo de lesión, pueda predominar uno u otro tipo celular con capacidad de secretar sustancias que activen la secreción de gonadotropinas.

II. Pubertad precoz periférica (gonadotropina-independiente)

La PPP se caracteriza por la aparición de mamas o vello púbico sin el patrón cronológico habitual, debido a la presencia de esteroides sexuales cuya fuente puede ser exógena o endógena, gonadal o extragonadal, pero sin evidenciarse activación del eje central hipotálamo-hipofisario. Es más infrecuente que la PPC. En las niñas, la PPP pueden ser isosexual, dependiendo si las manifestaciones son por exceso de estrógenos, o heterosexual si las manifestaciones están dadas por un aumento en la secreción de los andrógenos (se desarrollan caracteres sexuales del sexo opuesto).

Etiología de la PPP:

- a) Gonadal: tumores de la teca, de la granulosa, quistes autónomos, gonadoblastomas
- b) Suprarrenal: hiperplasia suprarrenal congénita, adenoma, carcinoma.
- c) Gonadotrofinas de origen ectópico: corioepitelioma, teratoma, hepatoma, disgerminoma.
- d) Alteraciones genéticas:
 - Síndrome de McCune-Albright (SMA): Mutación activadora en el gen que codifica la subunidad alfa de la proteína G. Cursa con displasia fibrosa polioestótica y manchas café con leche en piel. Existe desarrollo mamario asociado a sangrado vaginal por elevación intermitente de estrógenos procedentes de los quistes foliculares ováricos. Puede asociarse a otras endocrinopatías hiperfuncionantes como hipertiroidismo, gigantismo hipofisario, hipercortisolismo o raquitismo hipofosfatémico.
- e) Fuente exógena: ingesta accidental de anticonceptivos orales o esteroides anabolizantes, contacto (a través de la piel) con preparados que contienen estrógenos o testosterona, alimentos, cosméticos, disruptores endocrinos.
- f) Hipotiroidismo: niñas con tratamiento insuficiente o tardío pueden presentar desarrollo mamario, galactorrea y sangrado vaginal, con quistes foliculares ováricos. El trastorno se atribuye al aumento de la secreción de gonadotrofinas secundario a los niveles altos de TSH.

Las manifestaciones clínicas de la PPP dependen, fundamentalmente, del tipo de esteroide sexual involucrado. El hallazgo de hiperpigmentación areolar precoz con desarrollo mamario incompleto es sugerente de rápida y marcada elevación de los niveles séricos de estrógenos. La presencia de un sangrado vaginal en ausencia completa de telarquia es más sugerente de una causa local (agresión sexual, cuerpo extraño o tumor vaginal) que de una verdadera PP. Un acné severo, de rápida progresión y, especialmente, el agrandamiento del clítoris (virilización) es sugerente de la presencia de un tumor productor de andrógenos.

III. Forma mixta

Se trata de casos muy raros, debidos a la exposición prolongada a niveles elevados de esteroides sexuales como consecuencia de una PPP de larga data (SMA, hiperplasia suprarrenal congénita no diagnosticada). Se ha especulado que los esteroides sexuales podrían “impregnar” el hipotálamo, causando la maduración del eje HHG y desencadenando una PPC. Otra posibilidad es que el hipotálamo, acostumbrado a una inhibición por niveles incrementados de esteroides sexuales, al disminuir estos como resultado de un tratamiento efectivo de la PPP, se reactivaría ocasionando la PPC.

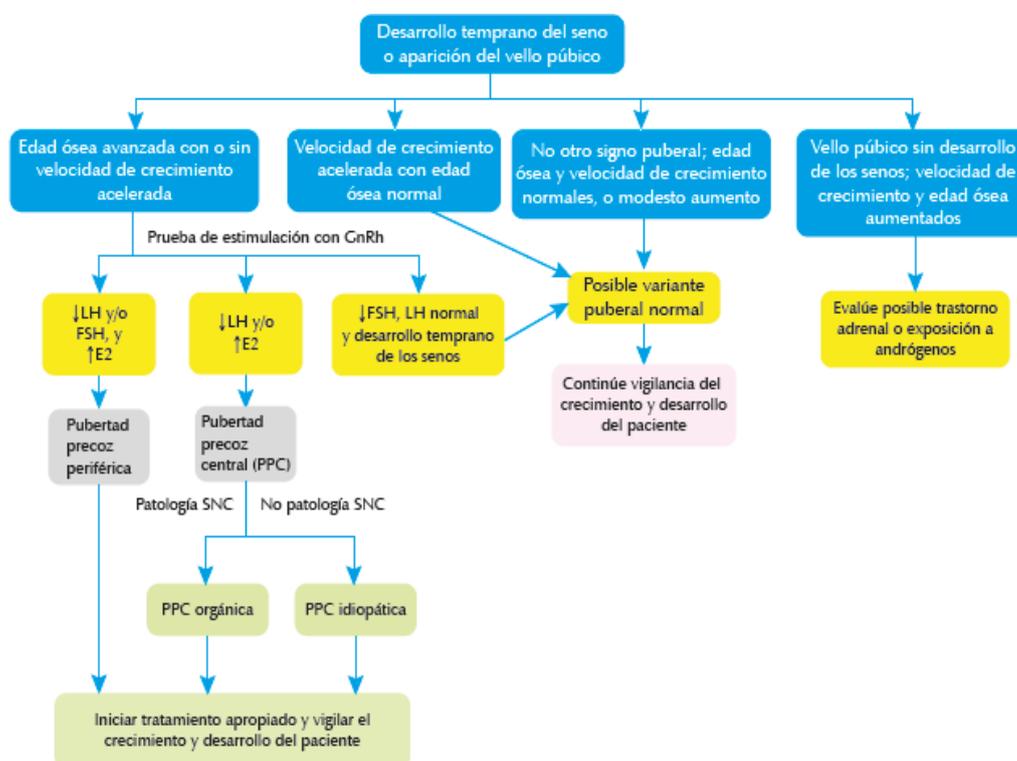
Evaluación hormonal (Diagnóstico de PP)

Se basa en verificar la precocidad puberal e identificar las causas subyacentes.

1. *Historia clínica completa*: antecedentes de exposición a tóxicos, fármacos, curva de crecimiento, edad de comienzo y progresión de los cambios puberales, síntomas neurológicos, antecedentes personales de traumatismo craneoencefálico, infecciones del SNC, etc.
2. *Exploración física*: estadio puberal de Tanner (ver Anexo I) y aspecto de los genitales (maduración vulvar y tamaño del clítoris), peso, talla, proporciones corporales, piel (manchas, acné, vello corporal), palpación tiroidea y exploración neurológica.
3. *Determinaciones hormonales*: la determinación de gonadotropinas basales, aun empleando ensayos ultrasensibles, muchas veces no discrimina entre niñas prepuberales y aquellas que presentan pubertad precoz, especialmente en estadios iniciales (Tanner II).

El test de estímulo con GnRH constituye la prueba *gold estándar* para el diagnóstico de PPC (Figura 3). Consiste en la administración de GnRH exógena (100 µg/m² por vía intravenosa), o en su defecto un análogo de GnRH como el acetato de leuprolide, y la posterior determinación de LH a intervalos regulares. Existen controversias en torno al punto de corte de LH a partir del cual considerar la existencia de una activación central del

eje HHG, que condicionan la sensibilidad y especificidad de la prueba. A nivel internacional, se admite como punto de corte valores de LH entre 5-10 UI/L, según la metodología empleada. Sin embargo, en menores de 2 años el punto de corte se eleva a 10UI/L por la activación transitoria del eje gonadal que acompaña en esa etapa del desarrollo. Otros criterios incluyen una relación LH/FSH mayor a 0,66 después de la estimulación con GnRH.



GnRH: hormona liberadora de gonadotropina LH: hormona luteinizante FSH: hormona estimulante del folículo E2: estradiol PPC: pubertad precoz central SNC: sistema nervioso central

Fuente: Kletter GB, Klein KO, Wong YY. A pediatrician's guide to central precocious puberty. Clin Pediatr (Phila) 2015;54(5):414-24. Adaptado de Sultan et al. (2012) y Berberoglu (2009).

Figura 3. Diagnóstico de Pubertad precoz en niñas.

Otras determinaciones de laboratorio que contribuyen al diagnóstico de PP son:

- 17β-estradiol: si bien valores dentro del intervalo de referencia no descartan pubertad precoz, se encuentran niveles muy elevados en presencia de tumores ováricos y adrenales productores de estrógenos, así como ante quistes ováricos aislados o asociados al SMA.
- Andrógenos: La determinación en suero de andrógenos suprarrenales o de sus precursores (sulfato de dehidroepiandrosterona (S-DHEA), Δ4-androstenediona y 17-OH-progesterona), puede ser de utilidad en el diagnóstico diferencial de la PP en niñas, especialmente en aquellas situaciones clínicas sugerentes de incremento de andrógenos

circulantes. Niveles elevados implican descartar tumor suprarrenal o hiperplasia adrenal congénita.

- TSH: para descartar hipotiroidismo primario, causa excepcional de pubertad precoz.

Pruebas de imagen de utilidad para el diagnóstico diferencial de PP

- Cálculo de la edad ósea (EO) mediante radiografía de mano-muñeca izquierda: el diagnóstico de PP no sólo se basa en la aparición de los caracteres sexuales secundarios sino también en la aceleración de la velocidad de crecimiento y del grado de maduración ósea, que llevan finalmente a la fusión epifisiaria y en algunos casos a baja estatura. Ante signos de desarrollo puberal precoces, la determinación de la EO servirá de guía dentro del proceso diagnóstico. Esto se debe a que en condiciones normales, el grado de desarrollo puberal se correlaciona mejor con la EO ($r = 0,82$) que con la edad cronológica ($r = 0,72$). En la verdadera PP, la EO está normalmente acelerada en más de 2 DE con respecto a la edad cronológica. Cabe destacar dos excepciones: cuando la PP mediada por gonadotrofinas se asocia a un déficit de hormona de crecimiento (GH) (pudiendo la EO en ese caso ser muy variable), y cuando se asocia a un hipotiroidismo, que cursa con EO retrasada. Además, en casos de PPP de diagnóstico reciente, la EO puede ser similar a la edad cronológica.

- RM craneal: de obligada realización en todos los casos de PPC para evaluar la anatomía de la región hipotálamo-hipofisaria y descartar patología orgánica.

- Ecografía abdominal: evaluación del área suprarrenal ante la sospecha de patologías virilizantes como causa de PP.

- Ecografía pélvica: permite descartar patologías asociadas a PPP y valora la existencia de signos de impregnación estrogénica, ya que provee información acerca del tamaño ovárico, existencia de folículos, tamaño y maduración del útero, presencia de quistes o masas tumorales.

Tratamiento

La terapia con agonista de GnRH es eficaz para mejorar la estatura adulta en pacientes con PP central clásica (< 8 años de edad), sin causar efectos adversos sobre la composición corporal, la deficiencia de masa corporal y la función reproductiva.

2- Retraso Puberal. Hipogonadismos

Se considera **pubertad retrasada** (PR) cuando no se ha iniciado el desarrollo puberal en una edad 2-2,5 DE por encima de la edad media en la que se inician en la población de referencia. A efectos prácticos, cuando hay ausencia de desarrollo mamario (botón mamario) en las niñas a una edad de 13 años.

El concepto de PR incluye también la detención de la pubertad ya iniciada, o si su progresión es muy lenta y no alcanza el estadio final en tiempo normal. La presencia o aparición del vello púbico no es un criterio válido de inicio de pubertad, debido a que su presencia puede ser indicativa de actividad del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal. Se considera que existe un desarrollo incompleto de la pubertad cuando trascurren más de cinco años entre los primeros signos de pubertad y la menarquia en la mujer. El término de amenorrea primaria indica ausencia de la menarquia a los 15 años de edad.

Clasificación de la pubertad retrasada

1. *Retraso constitucional del crecimiento y desarrollo (RCCD)*: es la causa más frecuente de PR y se considera una variante cronológica de la normalidad. Aunque puede presentarse de forma esporádica o idiopática, lo hace habitualmente en un contexto familiar de maduración tardía (60-90% de los casos). Es más frecuente en varones que en mujeres (relación 9:1). No hay prueba diagnóstica específica para la variante del *RCCD* y es difícil establecer el diagnóstico diferencial con el déficit de GH idiopático y los **hipogonadismos hipogonadotropos (Hh)**. Si bien finalmente se consigue una maduración sexual completa y una talla adecuada, puede tener un impacto psicológico negativo.

Se ha establecido que el *RCCD* cursa con déficit de GH transitorio y en general los pacientes se tratan con esta hormona por diagnósticos erróneos. Igual razonamiento puede aplicarse con el Hh, debido a que el *RCCD* produciría una falta de actividad de FSH y LH de carácter temporal, con niveles prepuberales de estradiol en las niñas. El test de GnRH combinado con el test de hCG puede tener cierta significación diagnóstica, ya que se ha observado que en el Hh se obtiene una respuesta inferior a la normal para ambas pruebas.

2. *PR secundaria a enfermedades crónicas*: son resultado de trastornos funcionales en el eje HHG secundarios a patologías crónicas o endocrinopatías (Hh funcional o transitorio).

3. *Hipogonadismo hipogonadotrófico (Hh)*: desarrollo puberal ausente por anomalías en los mecanismos de control hipotálamo-hipofisarios de la pubertad.

4. *Hipogonadismo hipergonadotrófico*: desarrollo puberal ausente por fallo gonadal primario.

El **hipogonadismo femenino** se caracteriza por un fallo gonadal debido a la alteración del propio ovario o secundario a un fallo hipotálamo-hipofisario, que puede ocurrir en distintos momentos de la vida y por causas diversas, lo que va a condicionar una presentación clínica diferente. En la infancia, se pueden encontrar signos fenotípicos turnerianos. Durante el periodo prepuberal, el crecimiento y la maduración ósea suelen ser normales, pero al llegar a la edad puberal, la ausencia de esteroides gonadales determina que no se desarrollen los caracteres sexuales secundarios (puede aparecer vello pubiano escaso por acción de los andrógenos suprarrenales) y se retrase el cierre de los cartílagos de crecimiento, lo que favorece el desarrollo de proporciones corporales eunucoideas (crecimiento desproporcionado de las extremidades con respecto al tronco). Por el contrario, si el hipogonadismo aparece en la edad adulta, ocurrirá una involución de los caracteres sexuales secundarios, y amenorrea secundaria en la mujer. Clínicamente, las alteraciones hipotálamo-hipofisarias y las formas congénitas se caracterizan por infantilismo sexual, y las formas adquiridas presentan los síntomas de la causa (tumor) y con frecuencia síntomas de otros déficits hormonales hipofisarios asociados.

Clasificación de los hipogonadismos según su etiología:

I. Hipogonadismo Hipergonadotrófico (primario o gonadal): deficiente producción de esteroides sexuales (estrógenos en la mujer). La incapacidad de la gónada para producir cantidades adecuadas de hormonas esteroideas e inhibina determina la falta de retroinhibición de estos sobre el hipotálamo y la hipófisis, por consiguiente se incrementa tanto la secreción pulsátil de GnRH como la de LH y FSH. Las causas pueden ser:

I.I- Síndromes de Turner (ST) y sus variantes: es la causa más frecuente de ausencia de desarrollo sexual debido a fallo gonadal primario (1/2500 RN). El 50-60% de los casos presenta una pérdida total de un cromosoma X, constituyendo la monosomía clásica 45X. La ausencia de un cromosoma no impide la migración de las células germinales a la cresta gonadal, pero acelera la atresia. La ausencia en el desarrollo puberal es uno de los signos clínicos más frecuentes, sin embargo, entre un 20-30% de las pacientes presentan un desarrollo puberal espontáneo con cese de la función ovárica posterior (menopausia precoz con amenorrea secundaria). Las niñas con ST pueden presentar diferentes alteraciones, incluyendo hipocrecimiento, fallo gonadal, rasgos sindrómicos (pterigium colli, linfedema, tórax en coraza, hipoplasia areolar, cubitus valgo, alteraciones ungueales, acortamiento de metacarpianos, implantación baja del cabello y de las orejas, etc.), cardiopatías y malformaciones del sistema urinario.

I.II- Disgenesia gonadal pura o Síndrome de Swyer: Se caracteriza por cariotipo 45XY, sin mosaicismo, y la ausencia total de determinación testicular. La gónada fetal no se diferencia en sentido masculino (debido a mutaciones en el gen SRY ubicado en el cromosoma Y) y queda reducida a una cintilla fibrosa, los genitales internos y externos son femeninos, así como también el fenotipo. Existe un riesgo marcado de gonadoblastoma.

I.III- Causas adquiridas: secundario a quimioterapia o radioterapia en el tratamiento de neoplasias sólidas y hematológicas en la infancia, galactosemia.

I.IV- Otras: falla ovárica precoz (etiología idiopática o asociado a ooforitis autoinmune).

II. Hipogonadismo Hipogonadotrófico (Hipotalámico o Pituitario): deficiente producción de las hormonas hipotálamo-hipofisarias que regulan la actividad hormonal en las gónadas.

Son responsables de alrededor del 10% de los retrasos puberales. Las causas pueden ser:

II.I- Adquiridas: tumores (craneofaringioma, germinomas, gliomas o prolactinomas), radiación, procesos infiltrativos (histiocitosis, sarcoidosis, hemocromatosis), traumatismos craneales, procesos infecciosos o inflamatorios (hipofisitis autoinmune) que afecten al área hipotálamo-hipofisaria. Además, pueden provocar Hh patologías crónicas como: enfermedad inflamatoria intestinal, celiacía, anorexia nerviosa, hipotiroidismo y ejercicio físico excesivo (Tabla 2). Los Hh adquiridos son los más frecuentes y muchas veces originan deficiencias hipofisarias múltiples.

Tabla 2. Patologías relacionadas con el hipogonadismo

<i>Patología</i>	<i>Etiología</i>
Insuficiencia renal crónica	Hipogonadismo hipogonadotropo
Síndrome nefrótico	Hipergonadotropo secundario a lesión gonadal
Fibrosis quística, enfermedad inflamatoria intestinal crónica, enfermedad celíaca	Malnutrición
Insuficiencia hepática	Malnutrición
Neuropatías: asma grave	Corticoides, hipoxia, infecciones de repetición, malnutrición
Leucemia	Tratamiento
Anemias hemolíticas crónicas: talasemia mayor	Depósito de hierro en las glándulas
Endocrinopatías: hipotiroidismo juvenil no tratado, hipertiroidismo, déficit de HGH, diabetes, hiperprolactinemia, déficit congénito de leptina, hiperandrogenismo, hipercortisolismo	Variable
Fármacos	Afectación a diferentes niveles
Factores ambientales; fitoestrógenos	Desconocido
Anorexia nerviosa	Insuficiencia del eje HHG, producción reducida de GnRH
Bulimia	Alteración eje HHG

II.II- Congénitas: la mayoría son casos esporádicos, con un predominio en varones (3-5:1). Las formas familiares pueden heredarse de forma autosómica dominante, recesiva o ligada al X. Los Hh congénitos pueden presentarse aisladamente, asociados a deficiencias combinadas de hormonas hipofisarias o en el contexto de otros cuadros sindrómicos.

- *Hh congénitos aislados asociados a anosmia/hiposmia*: Síndrome de Kallman (secundario a defectos en la migración de las neuronas productoras de GnRH). Puede asociarse con agenesia renal, defectos atriales septales, ceguera para los colores, lesiones de línea media (labio-paladar hendido), etc. El gen KAL1 (Xp22.31) se descubrió en 1992 y desde entonces se han descrito diferentes genes asociados al síndrome (FGFR1, PROKR2, PROK2, CHD7, FGF8, NELF, WDR11, HS6ST1, SEMA3A, SPRY4, IL17RD, DUSP6, FGF17, FLRT3 y FEZF1), que determinan diversos cuadros con una marcada heterogeneidad fenotípica.

- *Hh congénitos aislados sin anosmia*: mutaciones en genes como GnRH1 (GnRH), GnRHR (receptor de GnRH), KISS1 (kisspeptina), KISS1R (receptor de las kisspeptinas), LEP (leptina), LEPR (receptor de leptina), PC1 (prohormona convertasa-1), TAC3 (neurokinina B), TAC3R (receptor de TAC3), LH β y FSH β (subunidad β de la LH y FSH).

- *Hh asociados a otras deficiencias hipofisarias*: anomalías congénitas en el desarrollo del SNC (displasia septo-óptica, holoprosencefalia, etc.) o mutaciones en factores de transcripción involucrados en el desarrollo de poblaciones celulares hipofisarias (LHX3, LHX4, PROP1 y POU1F1). El gen más frecuentemente afectado es PROP1, cuyas mutaciones determinan una deficiencia combinada de GH, PRL, LH, FSH y TSH.

- *Hh asociado a síndromes específicos*: Prader-Willi, Laurence-Moon, Bardet-Biedl.

Además, completan el espectro etiológico fenómenos poco frecuentes como la resistencia periférica a la acción de las hormonas esteroidea y/o gonadotróficas.

3- Trastornos menstruales

El ciclo menstrual comienza con la **menarquia**, se mantiene durante la edad reproductiva y cesa con la menopausia. La menstruación normal dura entre 4 y 7 días, provoca una pérdida de sangre de unos 30 mL y la mayoría de los ciclos duran entre 21 y 25 días. La fase folicular varía de una mujer a otra mientras que la fase lútea normal tiene una duración fija de unos 14 días.

- **Oligomenorrea**, definida como falta de periodicidad en las menstruaciones, pero con intervalos menores a 3 meses.

- **Polimenorrea**, definida como períodos inter-menstruales inferiores a 25 días que pueden traducir anovulación u ovulación disfuncional.

- La **infertilidad**, puede ser definida por el fracaso en el logro de un embarazo clínico después de 12 meses o más de relaciones sexuales regulares sin protección, sin una razón determinada, como la lactancia materna o la amenorrea posparto.

- Los términos **esterilidad e infertilidad** en ocasiones son usados de manera intercambiable y algunas veces definen poblaciones diferentes. En la literatura hispana, la definición de la palabra esterilidad es la dificultad de lograr un embarazo (concebir), al tiempo que el término infertilidad es utilizado cuando se desarrolla el embarazo pero es interrumpido en algún momento. Por el contrario, en la literatura inglesa la definición de estos términos difiere.

Amenorrea

La amenorrea se caracteriza por ausencia o interrupción de la menstruación. La anovulación es frecuente en las niñas de edad ginecológica joven (primeros años de la menarquia) debido a la inmadurez innata del eje hipotálamo-hipófisis. Al aumentar la edad ginecológica, este eje madura y se establece un patrón regular que se mantiene durante la mayor parte de la vida reproductora de una mujer. Los ciclos menstruales se acortan en los últimos años reproductores y terminan siendo esporádicos en los años previos a la menopausia.

I. Amenorrea primaria: se define como la ausencia de menstruación a los 16 años en presencia de otras características sexuales secundarias, o cuando la menstruación no se ha producido a los 14 años en ausencia de características sexuales secundarias. Tiene una incidencia del 0,1%. Alrededor del 60% son debidas a anomalías genéticas que afectan al desarrollo genital mientras que el 40% restante son por un trastorno endocrinológico (Figura 4). Si los niveles de gonadotropinas son normales o bajos, lo primero que se debe sospechar es un retraso constitucional del desarrollo. Pero si existe sintomatología neurológica o si la menstruación no aparece a partir de los 16 años, se debe descartar la existencia de patología orgánica a nivel hipotálamo-hipófisis.

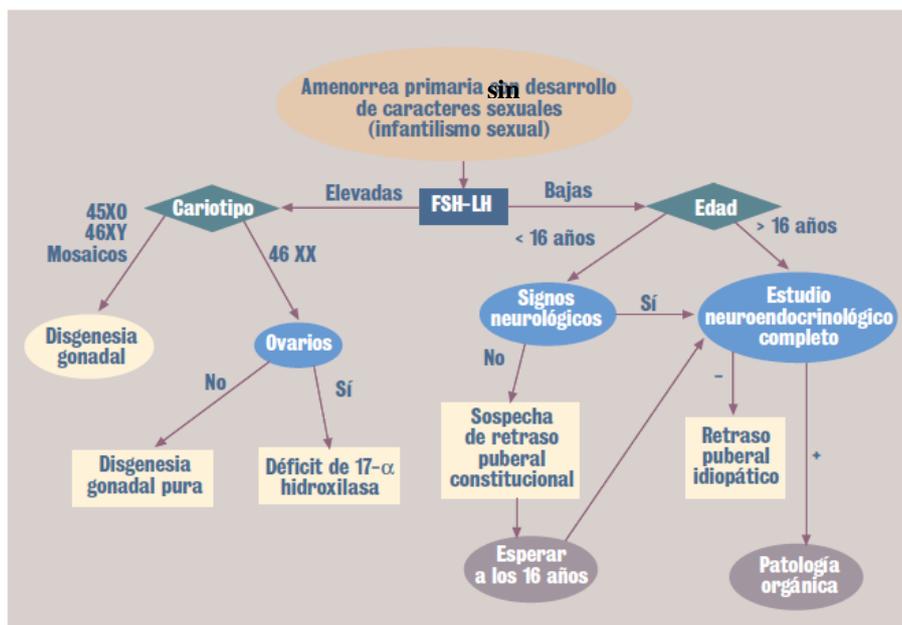


Figura 4. Esquema diagnóstico de amenorrea primaria sin desarrollo de caracteres sexuales secundarios. Gómez Marcos MA, García Ortiz L, Diego Robledo FJ, Orobón Martínez ML. Amenorrea. Jano. 2001; 61: 61-4.

II. Amenorrea secundaria: se define en el contexto de una mujer que ya ha tenido menstruaciones, como la desaparición de las mismas por un período superior a 6 meses. Su incidencia es alrededor del 0,7%. Una vez descartado el embarazo, que es la causa más frecuente de amenorrea, habrá que realizar determinaciones analíticas y exploraciones complementarias. En la anamnesis se investigará la existencia de otras enfermedades endocrinológicas o sistémicas, el aumento o disminución de peso y las situaciones de estrés. En la exploración se hará hincapié en la detección de hiperprolactinemia y/o signos de hiperandrogenismo como vello con patrón de distribución masculina y acné.

La causa de la amenorrea tanto primaria como secundaria puede tener lugar en cualquier lugar del eje hipotálamo-hipófisis-ovario-endometrio. Dado el enfoque totalmente distinto que poseen ambos tipos de amenorreas, es necesario ubicarlas en base a su etiología principal en un compartimento central (hipotálamo-hipofisario), gonadal (ovárico) o genital (útero-vaginal) (Tabla 3).

Si bien la lista de las causas potenciales de amenorrea y/o anovulación crónica es extensa, en la mayoría de los casos se deben a seis condiciones especiales: amenorreas hipotalámicas, anovulación hipotalámica funcional, síndrome de ovario poliquístico, hiperprolactinemia, alteraciones tiroideas y falla ovárica prematura.

Tabla 3. Clasificación y causas de Amenorreas

AMENORREA CENTRAL	AMENORREA GONADAL	AMENORREA GENITAL
<p>Hipotalámica</p> <ul style="list-style-type: none"> - Déficit de GnRH (síndrome de Kallman) - Malformaciones hipotalámicas (PraderWilli, Lawrence Moon Bield) - Lesiones destructivas del área hipotalámica (tumores, infecciones, etc) - Funcionales (pérdida de peso excesiva, psicógenas, ejercicio, etc) <p>Hipofisaria</p> <ul style="list-style-type: none"> - Síndrome de silla turca vacía - Adenoma hipofisario - Hipofisitis linfocítica - Lesiones post cirugía o post irradiación - Síndrome de Sheehan <p>Hiperprolactinemia</p>	<p>Patología ovárica</p> <ul style="list-style-type: none"> - Disgenesia gonadal - Fallo ovárico precoz - Ovario refractario - Iatrogénicas (radiación, cirugía) <p>-SOP y otras endocrinopatías</p>	<p>Patología Uterina</p> <ul style="list-style-type: none"> - Síndrome de Asherman - Agenesia uterina o cervical <p>Patología Vaginal</p> <ul style="list-style-type: none"> - Síndrome de Morris - Síndrome de Rokitansky - Tabiques vaginales - Hímen imperforado

Evaluación diagnóstica de amenorrea (Figura 5)

Debe realizarse de forma rápida, optimizando las pruebas a solicitar de manera que sean lo menos invasivas para la paciente. De esta manera, en una primera consulta se debería realizar:

- Anamnesis detallada y exploración general y ginecológica.
- Determinaciones hormonales: cuando se sospecha disfunción ovulatoria se deben cuantificar los niveles de FSH y E2 en fase folicular temprana (día 3 del ciclo), PRL y TSH. Por otra parte, la determinación de P4 sérica en fase lútea media (día 22-24 del ciclo), se considera el mejor método para confirmar ovulación (concentraciones > 4 ng/mL).
- Estudios de imagen: ecografías, RMN.
- Cariotipo: la integridad del cromosoma X es de fundamental importancia en el desarrollo, dado que alteraciones numéricas o estructurales resultarán en la aparición futura de una amenorrea.
- Test de progesterona, Test de estrógenos y gestágenos: si es positivo confirma la existencia de un tracto genital intacto y que se trata de un fallo del eje hipotálamo-hipófisis-ovario. Si es negativo se confirma que se trata de una amenorrea genital (ver pruebas en Anexo I).

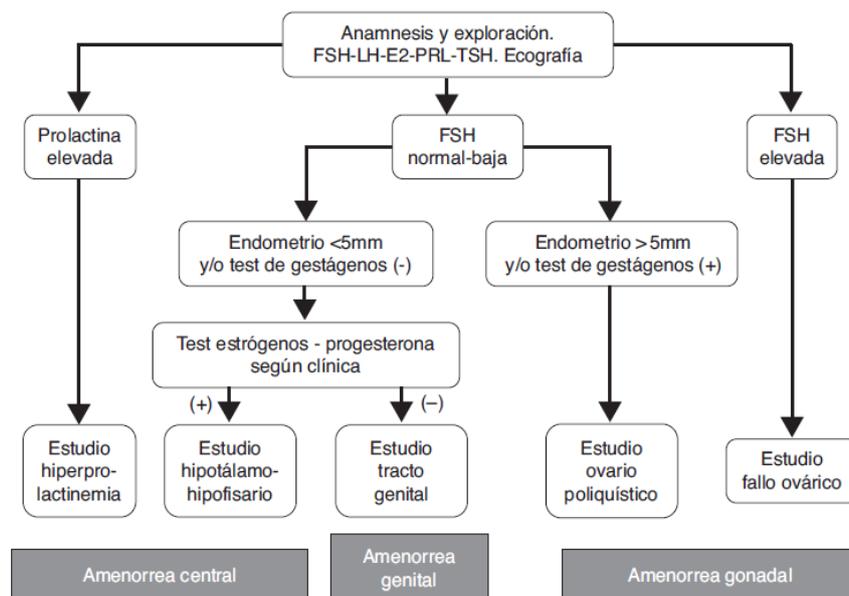


Figura 5. Algoritmo diagnóstico. Endocrinología Reproductiva (Soc. Española de fertilidad 2010). Amenorrea primaria y secundaria. Prog Obstet Ginecol. 2013; 56: 387-92.

3.1 Amenorrea Central

- Amenorrea **hipotalámica**: sucede por una alteración en la biosíntesis o liberación de GnRH endógena. Generalmente es un diagnóstico de exclusión, y la mayoría tiene un origen funcional (pérdida importante de peso, estrés, ejercicio y fármacos). En raras situaciones existirá en hipotálamo una patología orgánica local (tumoral o vascular) que sólo ocasione amenorrea. Algunos autores recomiendan el diagnóstico por imagen de la región selar, mientras que otros se limitan a los casos en los que la anamnesis no ha detectado ninguna causa funcional.

- Lesiones malformativas: Síndrome de Prader-Willi (enfermedad genética caracterizada por obesidad con hipotonía e hipogonitalismo y retraso mental), y Síndrome de Lawrence-Moon-Bield (obesidad, retardo mental, polidactilia, alteraciones retineales e hipoplasia genital).
- Lesiones destructivas que afectan a la zona del núcleo arcuato o sus vías eferentes secundarias a:
 - Procesos infecciosos: tuberculosis, meningitis, sarcoidosis.
 - Traumatismos
 - Tumores: glioma, craneofaringioma, astrocitoma.
 - Post-irradiación: SNC, cara, nasofaringe.

- Déficit congénitos relacionados con GnRH: síndrome de Kallman y sus variantes. Las neuronas de la GnRH y las neuronas olfativas migran juntas durante el desarrollo embriológico hacia el hipotálamo medio basal. La interrupción de este proceso provoca el Hh idiopático con anosmia/hiposmia. Se manifiesta principalmente como pubertad retrasada, infertilidad y amenorrea primaria.

En general, los trastornos hipotalámicos son una causa muy frecuente de amenorrea secundaria, y cursan sin galactorrea, con PRL normal, gonadotrofinas bajas o normales, test de gestágenos negativo, test de estrógenos-gestágenos positivo y silla turca normal. Respecto al tratamiento, éste será etiológico si existe una lesión orgánica hipofisaria o hipotalámica. Para suplir la falta de hormonas endógenas se recurrirá a terapias hormonales de sustitución, de modo que no se afecte la densidad mineral ósea.

- Amenorrea **hipofisaria**: se origina por un defecto en la síntesis o secreción de gonadotrofinas en la adenohipófisis. La forma más común de insuficiencia hipofisaria en la mujer, suele ser la consecuencia de una hemorragia obstétrica importante (necrosis hipofisaria o síndrome de Sheehan). Se acompaña de un panhipopituitarismo. Otras causas hipofisarias de amenorrea serán diagnosticadas por estudios de imágenes.

La supresión en la producción o la alteración en la pulsatilidad de secreción de GnRH puede observarse en los casos de estrés, depresión o alteraciones alimentarias como la anorexia o la bulimia nerviosa, debido al incremento en la liberación de CRH, con la consiguiente activación del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal. Esto inducirá un incremento de los corticoides, los cuales afectan tanto la secreción de GnRH como la de LH y provocará resistencia a nivel de los tejidos estrógeno-sensibles.

- **Hiperprolactinemia**: es la hipersecreción de PRL por las células lactotropas adenohipofisarias. Se presenta tanto en varones como en mujeres y se manifiesta clínicamente por disfunciones sexuales o reproductivas y galactorrea. Llega a producir un estado de Hh al suprimir la pulsatilidad de la secreción de GnRH y de FSH y LH en la hipófisis, con la consiguiente disminución de las concentraciones en sangre de P4 y E2 en la mujer y testosterona en el varón. La hiperprolactinemia patológica se define como una elevación consistente de los niveles de PRL >20 ng/mL, aunque depende de los valores de referencia del laboratorio.

Si existe una hiperprolactinemia, debe descartarse una elevación iatrógena por medicación o por un aumento de la TSH. Si el valor de PRL es muy elevado se solicitará

una RMN para diferenciar entre su origen funcional o por un adenoma hipofisario. Ante un valor elevado de TSH hay que recordar que el hipotiroidismo primario se asocia a amenorrea e hiperprolactinemia. El tratamiento con levotiroxina provocará un descenso en los niveles de PRL.

3.2 Amenorrea Gonadal

- Disgenesia gonadal: es el trastorno del desarrollo embrionario que impide la diferenciación completa del tejido gonadal. Los ovarios que son sustituidos por cintillas fibrosas (*streak gonads*), no existiendo folículos. Los genitales internos son femeninos, los genitales externos son femeninos pero infantiles y se acompaña de FSH y LH elevadas. La disgenesia gonadal puede ser pura 46,XX; pura 46,XY (Síndrome de Swyer) o mixta (45,X0-46,XY, fenotípicamente son mujeres, pero presentan un testículo y en el otro lado contralateral, una cintilla gonadal atrófica). Si se detecta la presencia de un cromosoma Y, se debe extirpar la gónada por riesgo de malignización.
- Falla ovárica prematura (FOP): es una entidad clínica de etiología variada que afecta aproximadamente al 1% de la población. Su etiología puede involucrar alteraciones genéticas, metabólicas, autoinmunes, infecciosas, ambientales, farmacológicas (como consecuencia de tratamientos gonadotóxicos, que provocan la destrucción folicular, básicamente quimioterapia con agentes alquilantes) y radioterapia local (Figura 6).

La pérdida precoz de la función ovárica se asocia con un estado prolongado de hipoestrogenismo; se inicia con una amenorrea secundaria, antes de los 40 años, con aumento de FSH en rangos menopáusicos (mayor de 25 mU/mL) en dos determinaciones seriadas (con un intervalo de 1 mes).

Otros estudios complementarios aparte de los niveles de FSH, LH y E2 y prueba inmunológica del embarazo son:

- Determinación sérica de PRL, TSH, T4L y aTPO.
- La determinación de la hormona antimulleriana (AMH) es de utilidad en el diagnóstico de la depleción folicular ovárica, habiendo correlación en sus niveles con el tamaño de los antros foliculares, lo que ayuda en el pronóstico reproductivo.
- Inhibina B.
- Cariotipo (30 células, para descartar mosaicismo).
- Búsqueda de mutación del gen FMR1 (relacionado al síndrome X frágil).
- Determinación de anticuerpos anti suprarrenales (21-hidroxilasa) y cortisol.
- Densitometría ósea.

- Ecografía pélvica: los ovarios muestran volumen disminuido y no se encuentra folículos o son muy escasos.

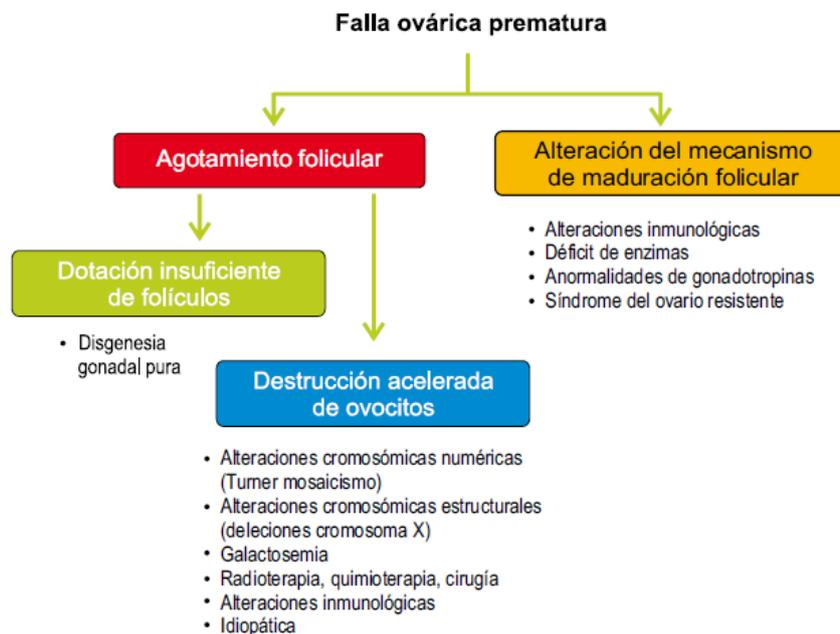


Figura 6. Mecanismos involucrados en la falla ovárica prematura. Falla ovárica precoz. José Pacheco. An Fac Med. 2010; 71: 191-200.

La IOP se asocia con trastornos de la fertilidad, incremento del riesgo cardiovascular (niveles de triglicéridos elevados y c-HDL disminuido), reducción de masa ósea, y alteraciones clínicas como los síntomas vasomotores, atrofia genital y alteraciones psicoafectivas. Se puede indicar pruebas de reserva ovárica con citrato de clomifeno, agonistas de GnRH y FSH (Anexo I).

Para el tratamiento del hipoestrogenismo se recurre a la terapia hormonal sustitutiva siendo necesario su uso hasta la edad promedio de la aparición de la menopausia en la población, valorando su continuidad de acuerdo a las características clínicas de las pacientes. Se debe considerar el deseo o no de fertilidad. Un diagnóstico y tratamiento oportuno es importante para reducir la morbi-mortalidad asociada a la deficiencia estrogénica temprana.

Anovulación crónica debida a una retroalimentación inapropiada secundaria a una disfunción central-periférica combinada.

- Síndrome de ovario poliquístico (SOP)

El SOP es un trastorno endocrino-metabólico, heterogéneo en su presentación clínica, de probable origen genético, influenciado por factores ambientales como la nutrición y la actividad física. El SOP es la disfunción endocrina más frecuente en la mujer en edad reproductiva con una prevalencia del 5-10%. Es un síndrome heterogéneo caracterizado por anovulación crónica hiperandrogénica, secundaria a una disfunción ovárica intrínseca. Las pacientes afectadas se ven muy perturbadas por las manifestaciones cutáneas, que incluyen acné, hirsutismo, alopecia y acantosis nigricans. Además, el SOP causa irregularidades menstruales e infertilidad y está agravado debido a una hiperinsulinemia por resistencia a la insulina, con el consecuente riesgo de diabetes mellitus y síndrome metabólico.

Uno de los criterios diagnósticos más utilizados es el de Rotterdam (2003). Este consenso determinó que el diagnóstico debe realizarse por la presencia de dos de los tres siguientes criterios: 1) Oligo o anovulación; 2) Signos clínicos y/o bioquímicos de hiperandrogenismo y 3) Ovarios poliquísticos por ecografía; luego de la exclusión de otras enfermedades relacionadas, tales como: hiperplasia suprarrenal congénita, tumores secretores de andrógenos, hiperprolactinemia, síndrome de Cushing, disfunción tiroidea.

En la compleja fisiopatología del SOP se destacan alteraciones interrelacionadas entre sí: disfunción neuroendocrina (hipersecreción de LH), un trastorno metabólico (resistencia insulínica e hiperinsulinemia) y una disfunción de la esteroidogénesis y de la foliculogénesis ovárica.

Evaluación del componente endocrino en el SOP

Las pacientes con SOP tienen andrógenos elevados en forma discreta o moderada ya sea testosterona, androstenediona, DHEA-S, o una combinación de éstos. Si bien el aumento de andrógenos es muy frecuente, algunas determinaciones caen dentro del rango de normalidad y ello no implica exclusión diagnóstica. Debe considerarse además la metodología utilizada por el laboratorio y el hecho de que a partir de los 35 años los niveles de andrógenos disminuyen en la mujer.

La evaluación de la concentración de testosterona libre (To L) es más sensible que la medición de testosterona total (To total) para establecer la existencia de exceso de andrógenos. Las mediciones de To L requieren técnicas de diálisis en equilibrio asociada,

aunque muchos laboratorios comerciales utilizan inmunoensayos que son notoriamente inexactos. En consecuencia, si la calidad del ensayo de To L no es la adecuada, puede ser preferible calcular la To L a través de la fórmula de Vermeulen a partir de los valores de To total, globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG), utilizando una concentración de albúmina estándar de 43 g/L. La To L calculada tiene una buena concordancia y correlación con la To L medida por diálisis en equilibrio. Un parámetro indirecto de la To L, el índice de andrógenos libres (IAL), calculado por la relación entre la To total y SHBG se utiliza también para la evaluación de la hiperandrogenemia en el SOP (VR < 4,5).

$$\text{IAL} = \text{Testosterona (nmol)} / \text{SHBG (nmol)} \times 100$$

Para transformar la T en ng/mL a nmol/L debe multiplicarse el valor x 3,467

Los exámenes de laboratorio deben ser analizados en conjunto con la clínica, tomando en cuenta el tipo de ensayo utilizado para su medición, la edad de la paciente y el momento del ciclo en que fue efectuado.

- Dehidroepiandrosterona sulfato (DHEAS). Esta hormona tiene su origen en las glándulas suprarrenales por lo que se la utiliza como marcador de hiperandrogenismo suprarrenal.
- Androstenediona. Es un andrógeno fundamentalmente de origen ovárico y puede ser el único andrógeno elevado en una mujer con SOP. En comparación a la testosterona, este andrógeno se mantiene elevado hasta etapas tardías de la transición menopáusica.
- 17 hidroxiprogesterona (17-OHP). Es el mejor metabolito para descartar déficit de la enzima 21-hidroxilasa; su valor normal en ayunas en fase folicular temprana del ciclo menstrual es inferior a 2 ng/mL. Valores superiores a 6 son indicadores de bloqueo enzimático; niveles entre 2 y 4 ng/mL hacen necesario efectuar un test de ACTH, el cual consiste en la administración endovenosa de 0,25 µg de ACTH (valores de 17-OHP superiores a 10 ng/mL a los 60 min post ACTH establecen el diagnóstico). Alrededor del 50% de las pacientes con SOP pueden presentar elevaciones discretas de 17-OHP.
- Relación LH/FSH. Las pacientes con SOP frecuentemente (60%) tienen una relación LH/FSH aumentada (mayor de 2), la cual por lo general se observa en mujeres de peso corporal normal. Debido a que su normalidad no descarta el diagnóstico, en la actualidad se utiliza sólo como un elemento orientador.

Debe completarse el estudio hormonal del SOP con la determinación de PRL, cortisol y hormonas tiroideas, cuyas alteraciones pueden cursar con irregularidades menstruales.

Evaluación del componente metabólico del SOP

La mayoría de las pacientes con SOP presentan resistencia insulínica con hiperinsulinemia compensatoria, obesidad y dislipidemia (aumento de TG y c-LDL, y disminución del c-HDL), independiente del peso corporal. Por ello es importante la evaluación de la enfermedad metabólica mediante un perfil lipídico para descartar una dislipidemia y una prueba de tolerancia oral a la glucosa con medición de insulina para evaluar el metabolismo de la glucosa y resistencia insulínica (test de HOMA).

3.3 Amenorrea Genital

Las amenorreas llamadas “normogonadotropas” (FSH dentro de los rangos de referencia) son aquellas en que el eje hipotálamo-hipófisis-ovario está indemne y lo que falla es el tracto de salida del órgano efector. Se trata de amenorreaa primaria con caracteres sexuales secundarios normales (Figura 7). Deben sospecharse en pacientes con desarrollo de caracteres sexuales secundarios completos y en edad de la menarca, que presentan dolor y tensión abdominal en forma cíclica y progresiva. Se puede encontrar: himen imperforado, septo vaginal transverso o ausencia congénita de vagina. La investigación debe dirigirse a verificar la existencia de un tracto de salida permeable y un útero normal. En estos casos, el flujo menstrual que no se expulsa al exterior puede dar lugar a hematocolpos o hemoperitoneo. Requieren tratamiento quirúrgico.

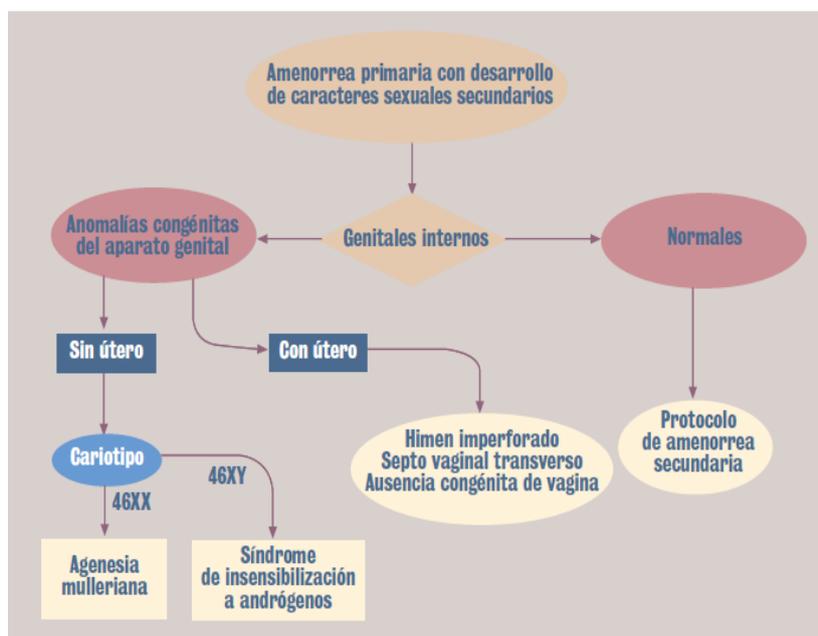


Figura 7. Esquema diagnóstico de amenorrea primaria con desarrollo de caracteres sexuales secundarios. Gómez Marcos MA, García Ortiz L, Diego Robledo FJ, Orobón Martínez ML. Amenorrea. Jano. 2001; 61: 61-4.

Si el útero está ausente o es rudimentario, hay que sospechar de los dos cuadros que cursan con fenotipo femenino y ausencia de útero: el síndrome de Rockitansky-Küster-Hauser (agenesia mulleriana), con cariotipo 46,XX y el síndrome de insensibilidad a los andrógenos, con cariotipo 46,XY. Si el aparato genital externo e interno es normal, se continuará como en el protocolo de estudio de la amenorrea secundaria. La negatividad del test de estrógenos y gestágenos confirma que se trata de una amenorrea genital.

- *Síndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser*: es la segunda causa más frecuente de amenorrea primaria. Consiste en la ausencia parcial o completa del desarrollo de los conductos de Muller, lo que da lugar a la ausencia congénita parcial o total de útero y/o vagina, con gónadas normales y funcionales y desarrollo puberal normal. Se asocia a anomalías renales (30%) y esqueléticas (12%) (Figura 8).



Figura 8. Diferenciación sexual normal. Hughes I, Davies J, Bunch T, Vickie P. Androgen insensitivity syndrome. The Lancet. 2012; 380:1419-28.

- *Síndrome de insensibilidad a los andrógenos (Síndrome de Morris)*: afección genética ligada al cromosoma X producida por un desorden en el receptor de andrógenos (RA), que impide el desarrollo normal de los genitales internos y externos en sujetos genéticamente masculinos (cariotipo 46,XY). La fisiopatología es la falta de respuesta completa o parcial a los andrógenos en los tejidos diana. La forma completa se caracteriza por fenotipo femenino con desarrollo mamario normal, escaso vello púbico y axilar, genitales externos femeninos y vagina en fondo de saco ciego, amenorrea primaria y presencia de testículos en lugar de ovarios. Las gónadas se localizan en el labio mayor, en el canal inguinal o

intraabdominal. En cuanto a la presentación endocrina de estos pacientes se puede encontrar: LH normal o aumentada, y To levemente aumentada respecto a lo normal en el primer mes de vida. A partir del segundo mes, la LH y To adquieren niveles normales hasta la pubertad, debido a la insensibilidad de los andrógenos y la falta de *feed-back* negativo de los sexuales en el hipotálamo e hipófisis. La To circulante se aromatiza a estrógenos por acción de la aromatasa, por esta razón los pacientes con insensibilidad completa cuentan con niveles más altos de estrógenos que los varones normales y desarrollan crecimiento mamario. Los niveles de AMH son normales, por lo cual presentan falta de caracteres sexuales femeninos internos (útero, trompas y parte superior de la vagina).

Tumores de ovario

Aunque es el cuarto cáncer más frecuente en ginecología oncológica (detrás del de mama, endometrio y cérvix), el cáncer de ovario sigue siendo la primera causa de muerte; esto se debe a la dificultad para realizar un diagnóstico precoz ya que el 65% de las pacientes se diagnostican en estadios avanzados, III y IV. La demora en el diagnóstico, con el consecuente aumento de la mortalidad, puede ser atribuida a una serie de factores como localización intraperitoneal profunda del tumor, inespecificidad de sus síntomas iniciales, ausencia de síntomas precoces y de pruebas de cribado efectivas.

El mecanismo patogénico que explica el vínculo entre muchos de los factores de riesgo y el desarrollo de cáncer de ovario no ha sido determinado. Existen algunas hipótesis propuestas:

- Las repetidas ovulaciones producen pequeños traumas en la corteza ovárica, lo cual conduciría a la producción de clones anormales y a la transformación maligna. Lo que apoya esta hipótesis es que mujeres con supresión periódica de la ovulación (uso de anticonceptivos orales), múltiparas, y mujeres con lactancia prolongada, tienen una menor incidencia de cáncer de ovario.
- La exposición persistente a gonadotrofinas y concentraciones elevadas de estradiol podrían ser carcinogénicas. Esta hipótesis se basa en la observación de tumores ováricos inducidos experimentalmente, que poseen receptores para gonadotrofina y estrógenos, en los que estas hormonas podrían estimular la proliferación celular.

Los tumores de ovario son un grupo de neoplasias diversas por su histogénesis, epidemiología e historia natural. Existen tres grupos principales (cada uno de ellos histogenéticamente relacionado con uno de los compartimentos ováricos). Son difíciles de clasificar sobre la base de los parámetros tradicionales de comportamiento benigno o maligno. En general, pueden ser benignos, *borderline* o de malignidad intermedia y

malignos. La clasificación más utilizada es la realizada por la OMS en su revisión de 1995 (Figura 9):

■ Tumores del epitelio superficial o tumores del epitelio mülleriano (CaOE): derivan del epitelio celómico de revestimiento ovárico. El 85% de los tumores primarios de ovario corresponde a este grupo.

- Serosos (40%)
- Mucinoso (15%)
- Endometriode (15%)
- De células claras (5%)
- Transicional o de Brenner

■ Tumores del estroma y de los cordones sexuales: son un grupo heterogéneo de neoplasias compuestas de células derivadas de los cordones sexuales (células de Sertoli y de la granulosa), del estroma gonadal especializado (células de Leydig y de la teca) y fibroblastos.

- Tecoma
- Fibroma
- Tumor estromal esclerosante
- Células de la granulosa.
- Tumor de las células de Sertoli-Leydig (su patrón histológico es una combinación de células de Sertoli, células de Leydig y fibroblastos en cantidades variables).

Los *tumores de la célula de la granulosa* (TCG) comprenden del 2 al 5% de los tumores malignos de ovario y del 20 a 30% muestran características clínicas e histopatológicas de malignidad. De acuerdo con sus características clínicas e histológicas, se dividen en TCG del adulto (TCGA) y juvenil (TCGJ). Los TCGA son más comunes y se observan en mujeres peri- y pos-menopáusicas, con un pico de incidencia a los 50-55 años de edad. Los TCGJ son tumores raros, representan el 5% de todos los TCG y están presentes en mujeres pre-menárquicas y menores de 30 años. Se pueden asociar con pubertad precoz, secreción vaginal, hemorragia uterina, hipertrofia clitoriana y crecimiento de vello en pubis y axila. En ocasiones, los TCGJ se relacionan con el síndrome de Potter (alteraciones congénitas múltiples), Ollier (encondromatosis múltiple) o síndrome de Maffucci (encondromatosis y hemangiomas).

■ *Tumores germinales*: constituyen el segundo grupo más frecuente de tumores malignos ováricos.

- Disgerminoma
- Tumor del saco vitelino o seno endodérmico
- Carcinoma embrionario
- Coriocarcinoma
- Teratomas malignos

Pueden presentarse como patrones histológicos aislados o como una combinación de los patrones histológicos anteriores

■ *Tumores ováricos metastásicos*: el ovario es un lugar común de afectación por metástasis. Alrededor del 50% son bilaterales y los orígenes más frecuentes son estómago, intestino grueso, mama, pulmón y piel.

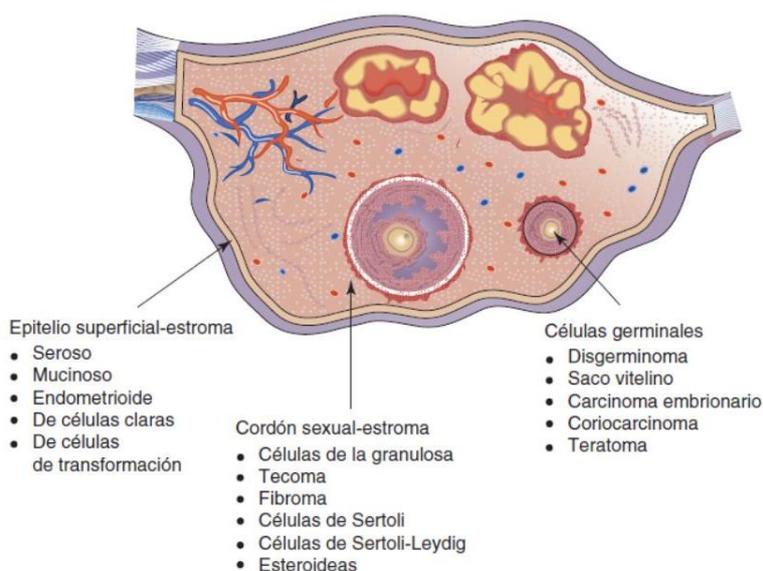


Figura 9. Origen de los tres tipos principales de tumores ováricos (Chen, 2003).

El 90% de los tumores malignos de ovario son de origen epitelial, un 5-6% provienen de los cordones sexuales/estromales y 2-3% de las células germinales.

Factores de riesgo

- Menarca temprana y/o menopausia tardía
- Nuligesta
- Hormonoterapia de reemplazo y terapias de hiperestimulación ovárica (controversias).

- Factores genéticos (mutaciones en genes involucrados en la reparación del ADN como BRAC, MSH-2, MLH-1, PMS 1 y 2).
- Síndrome de cáncer ovario-mama: ligado a la presencia de los genes BRAC 1 y 2 (alrededor del 5-10% de los CaOE son de origen familiar y se identifican 3 patrones hereditarios: cáncer ovárico aislado, asociación de cáncer ovárico y de mama, y cáncer de mama asociado a cáncer de colon).
- Factores exógenos: tabaquismo, dieta rica en grasas, alcohol, sobrepeso.
- Otras patologías: anemia de Fanconi, Síndrome Li-Fraumeni, Síndrome de Cowden.

Existen factores que disminuyen el riesgo como la menarca tardía, la multiparidad, el uso de anticonceptivos orales durante 5 años o más, salpingectomía, salpingooforectomía, salpingoligadura e histerectomía.

Signos y síntomas

La detección de tumores epiteliales de ovario en los primeros estadios, cuando se encuentra confinado a la pelvis, suele ser incidental durante un examen ginecológico efectuado por rutina o un estudio por imagen indicado por algún otro motivo. Menos frecuente se presenta con síntomas inespecíficos: dolor pelviano, distensión abdominal secundaria a efecto de masa, metrorragia disfuncional, dispareunia, urgencia miccional, síntomas gastrointestinales inespecíficos.

Cabe recordar que en las mujeres en edad fértil, solo el 5% de las masas ováricas palpables corresponden a un cáncer de ovario. En la pre-menarca y en la post-menopausia la presencia de una masa en los anexos obliga a profundizar el estudio, ya que la asociación con enfermedad maligna en estas circunstancias es mucho más frecuente.

Marcadores tumorales

Tumores epiteliales

- Ca 125: se pueden detectar niveles séricos elevados en el 80–90 % de los estadios III–IV. En estadios iniciales la sensibilidad y la especificidad son bajas, ya que puede encontrarse elevado en otras patologías malignas (cáncer de endometrio, pulmón o páncreas), benignas (endometriosis, miomatosis y enfermedad pélvica inflamatoria) o situaciones fisiológicas (menstruación y embarazo).
- CEA (antígeno carcinoembrionario) no es tumor específico. Es un marcador más específico de tumores mucinosos.

■ Glicoproteína 4 del epidídimo humano (HE4): no se expresa en el epitelio normal del ovario y su elevación sugiere posible malignidad. El HE4 tiene una sensibilidad similar al CA 125 pero una mayor especificidad, especialmente en el diagnóstico diferencial con los tumores ováricos benignos, aunque se puede encontrar elevado en cáncer de endometrio así como en fallo renal.

Tumores de los cordones sexuales y el estroma

■ Los tumores de Sertoli-Leydig y los tumores de las células de Leydig representan menos del 0,5% y del 0,1% de todos los tumores ováricos, respectivamente. Estos tipos de tumores virilizantes tienen la capacidad de secretar 17-OHP, testosterona y androstenediona, desencadenando hiperandrogenismo, con manifestaciones clínicas características. Si bien los tumores de Sertoli-Leydig causan el 40% de la virilización clínica, esto no debe considerarse como una manifestación obligatoria, y en la mayoría de los casos, la amenorrea secundaria llega a ser el único signo clínico (Figura 10).

■ Los niveles de inhibina B y/o AMH son considerados marcadores confiables para la detección temprana de enfermedad residual o recurrente. Las mediciones de dichos marcadores son útiles en el monitoreo de pacientes con TCG después del tratamiento, pero deben interpretarse junto con la clínica y los estudios de imagen.

	E ₂	Inhibina	Testosterona	Andro
Tecoma-fibroma	-	-	-	-
Células de la granulosa	±	+	-	-
Células de Sertoli-Leydig	-	±	+	+
Gonadoblastoma*	±	±	±	±

Figura 10. Marcadores secretados por tumores del estroma del cordón sexual del ovario. J Clin Oncol 2007; 25: 2944-51.

Tumores de células germinales

Debido a que los tumores de células germinales se derivan de las células pluripotenciales, ellos pueden verse anticipados o asociados con una variedad de productos intracelulares o

extracelulares que sirven como marcadores tumorales, y cuyo rol está muy bien establecido:

- Oncofetoproteínas: alfafetoproteína (AFP) y subunidad beta de la gonadotropina coriónica humana (β hCG).
- Enzimas celulares: lactato deshidrogenasa (LDH) y fosfatasa alcalina (FAL), cuyos niveles al diagnóstico pueden estar elevados en algunos subtipos histológicos, tienen valor pronóstico y sirven para evaluar la respuesta al tratamiento.

ENFERMEDADES DEL ÚTERO

Endometriosis

La endometriosis (END) es una enfermedad crónica benigna caracterizada por la presencia de tejido endometrial funcionalmente activo (epitelio glandular y estroma) fuera de la cavidad uterina. Afecta a entre un 5 a 10% de las mujeres en edad reproductiva, siendo diagnosticada hasta en el 50% de las mujeres sometidas a estudios de infertilidad. Tiene en su etiopatogenia un importante componente genético, epigenético, de hormono-dependencia e inflamatorio, que requiere un plan de tratamiento a lo largo plazo, ya que altera la calidad de vida de las pacientes, con un alto costo personal, social y económico.

Características de las lesiones

Las lesiones endometriósicas se encuentran a nivel pélvico (peritoneo, ovarios, tabique rectovaginal, sigmoides, recto, apéndice, uréter, vejiga), aunque pueden afectar sitios anatómicos extra pélvicos tales como SNC, pulmones, órganos genitales externos, entre otros. La END peritoneal se caracteriza por la presencia de implantes en la superficie del peritoneo que pueden ser rojos, negros o blancos, los que representan distintos estadios de la evolución de la lesión. La END ovárica puede ser superficial o presentarse en forma de quistes de contenido achocolatado, conocidos como endometriomas.

La END se ha denominado una patología estrógeno dependiente, ya que una vez establecidos los implantes endometriósicos, la persistencia y multiplicación de los mismos requiere de la acción de los estrógenos.

El grado de severidad de la enfermedad se instaura mediante una clasificación quirúrgica según el tipo y extensión de las lesiones en la cavidad pelviana utilizando el sistema de puntaje propuesto por la American Society for Reproductive Medicine (ASRM). En estadios avanzados la END compromete la fertilidad a través de una severa distorsión

anatómica de los órganos reproductivos, producto de la formación de adherencias y/o destrucción de los órganos genitales.

Los síntomas clásicos con los que se manifiesta la endometriosis incluyen dispareunia, dolor pélvico no cíclico y dismenorrea. El dolor, al principio, en estadios leves, es progresivo, premenstrual y con exacerbaciones, probablemente producido por liberación de prostaglandinas, mientras que en estadios avanzados se relaciona más con la presencia de adherencias y fenómenos de compresión. Sin embargo, un porcentaje no despreciable de mujeres con endometriosis pueden ser asintomáticas.

Etiopatogenia

Desde su descripción inicial en 1860, diversas teorías tratan de explicar la fisiopatología de la endometriosis, dado que una teoría por sí misma no puede explicar todos los aspectos de este trastorno (Figura 11).

A. *Teoría de Sampson* (menstruación retrógrada): de acuerdo a esta teoría la endometriosis es consecuencia del reflujo de fragmentos endometriales a través de las trompas de Falopio durante la menstruación, los cuales posteriormente se depositan en la cavidad peritoneal. Si bien el flujo menstrual retrógrado puede explicar la mayoría de las localizaciones anatómicas de las lesiones, aproximadamente un 80% de las mujeres presentan reflujo durante la menstruación, aunque no todas desarrollan END. Por lo tanto, este mecanismo requeriría de alteraciones inmunológicas y moleculares adicionales que promuevan la supervivencia e implantación del tejido endometrial refluído a través de las trompas.

B. *Teoría de Meyer* (metaplasia celómica): dado que las células que conforman el peritoneo, la superficie ovárica y el tejido endometrial provienen de un precursor embriológico común (la célula celómica), esta teoría propone que por un proceso de metaplasia las células germinales ováricas y las células peritoneales pueden ser potencialmente transformadas en tejido endometrial, dando de esta forma origen a las lesiones endometriósicas.

C. *Teoría de Halban* (metástasis vascular y linfática): propone que las lesiones endometriósicas ocurren de manera secundaria a un proceso en el cual células endometriales viables se introducen en los vasos linfáticos y sanguíneos de la capa basal del endometrio y son embolizados a sitios ectópicos. Logra explicar aquellos casos en los que se documenta la presencia de END en sitios extra pélvicos, pero no es capaz de resolver la capacidad de adhesión y progresión del tejido ectópico.

D. *Teoría de la inducción*: es una extensión de la teoría de la metaplasia celómica que propone que uno o más factores endógenos inducen a las células peritoneales indiferenciadas para transformarse en tejido endometrial.

E. *Teoría de los restos Müllerianos*: sugiere que las células residuales en el recorrido durante el desarrollo embrionario mantienen la capacidad de desarrollar lesiones endometriósicas influenciadas por estímulo estrogénico.

Participación del sistema inmune

Se propone que las pacientes con END cursan con una alteración en el balance entre macrófagos M1-M2 lo que resulta en una disminución de la función citotóxica y un incremento en la producción de factores que promueven la angiogénesis y la implantación de células endometriales. Además, el desequilibrio en los niveles de citoquinas peritoneales secretados por los macrófagos activados como: factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), prostaglandinas e interleuquinas (IL-1, IL-6 e IL-8), provocan alteraciones en el funcionamiento de linfocitos T y NK. Estas células contribuyen a la formación del ambiente propicio para el establecimiento de implantes endometriósicos.

Diagnóstico

Procedimientos quirúrgicos: la laparoscopia constituye el pilar básico del manejo diagnóstico actual de la END, pues facilita el diagnóstico diferencial con otras masas anexiales, la estadificación, la cromopertubación, la revaloración y, sobre todo, el abordaje terapéutico. Es factible identificar implantes peritoneales o retroperitoneales, adherencias o endometriomas.

Laboratorio: determinación de la concentración sérica de CA 125

El CA 125 es un antígeno de la superficie celular expresado por derivados del epitelio celómico. Aproximadamente el 40-50% de las mujeres con END, y más del 70% de las que se encuentran en estadios avanzados (III-IV), presentan concentraciones superiores a 2 DE por encima de la media de concentración en la mujer normal. Sin embargo, la experiencia ha demostrado que este marcador es poco sensible para la enfermedad mínima o leve y poco específico; además de elevarse en casos de CaOE, pueden observarse cifras incrementadas de CA 125 al principio del embarazo, durante la menstruación normal y en mujeres con inflamación pélvica o leiomiomas.

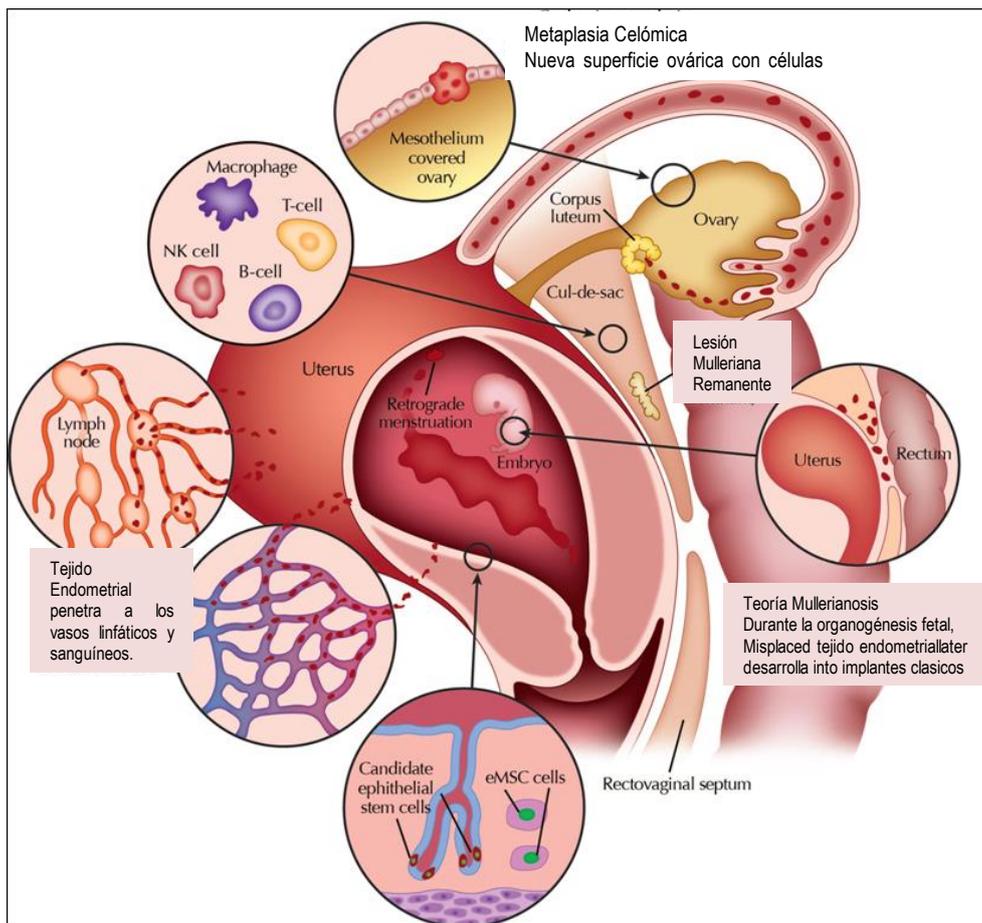


Figura 11. Representación esquemática de las diferentes teorías que ocasionan la endometriosis. Predisposiciones moleculares para el desarrollo de la endometriosis. La menstruación retrógrada deposita en la superficie peritoneal focos de tejido endometrial. A partir de la parte inferior y en sentido horario, estos son: 1) células progenitoras epiteliales y mesenquimales del estroma endometrial o células madre (eMSCs) que pueden poseer una mayor propensión de invadir lugares ectópicos, 2) y 3) la diseminación metastásica del tejido endometrial a través de vasos sanguíneos y canales linfáticos, y 4) la funcionalidad y población de células inmunitarias alteradas 5) la diferenciación de metaplasia de epitelio ovárico celómico; 6) reflujo de tejido endometrial atrapado entre la pared pélvica y el ovario, que luego coloniza un cuerpo lúteo hemorrágico; 7) Remanente de Müller rectovaginal es raro, y 8) Mullerianosis: hipótesis de tejido endometrial embrionario ectópico colocado durante la organogénesis (Obstet Gynecol 2011;118: 691–705).

Miomas

Los miomas o leiomiomas uterinos son los tumores más frecuentes del tracto genital femenino. Corresponden a neoplasias benignas producto de la proliferación monoclonal de células de músculo liso. Son diagnosticados en 20 a 30% de las mujeres mayores de 35 años, llegando esta cifra a un 40 a 50% a los 50 años. Los miomas pueden ser únicos o múltiples y según su distribución se clasifican en submucosos, intramurales, subserosos, cervicales, intraligamentosos y parásitos.

Se ha asociado la presencia de miomas con la infertilidad, aunque la evidencia no es concluyente. Los miomas podrían causar infertilidad por distorsión y elongación de la cavidad uterina, aumento de la contractilidad, alteraciones de la perfusión uterina, compresión tubaria y ovárica.

Cáncer de endometrio

El cáncer de cuerpo uterino ocupa el séptimo lugar en frecuencia en el mundo. Su incidencia varía, representando el primer cáncer del tracto genital femenino en los países desarrollados, posición que es ocupada por el cáncer de cuello uterino en los países en vías de desarrollo. El 90% de los cánceres de endometrio son esporádicos pero aproximadamente un 10% tienen bases hereditarias. Se han sugerido dos modelos genéticos en el desarrollo del cáncer de endometrio: el síndrome de carcinoma colo-rectal no poliposo (Síndrome de Lynch II) y la predisposición sólo para el cáncer de endometrio, ambos síndromes autosómicos dominantes causados por una mutación germinal en genes reparadores del DNA (MMR).

Los factores de riesgo más importantes para el cáncer de endometrio son el estado postmenopáusico, un índice de masa corporal $\geq 25 \text{ mg/m}^2$, excesivo consumo de grasas, nuliparidad, anovulación y uso de estrógenos sin oposición progestacional. No obstante, hasta un 50% de las pacientes con cáncer de endometrio se presentan sin estos factores.

Sintomatología

El sangrado vaginal intermitente es el síntoma más frecuente (90%) del cáncer de endometrio y aparece por lo general en etapas tempranas de su evolución. Se presenta como metrorragia de la postmenopausia o en forma de sangrado intermenstrual en las pacientes premenopáusicas. Otros síntomas menos frecuentes son el flujo maloliente (generalmente en estadios avanzados) y el dolor pelviano difuso por compromiso extrauterino o de tipo cólico por la existencia de una hemato/piometra. Es excepcional el debut con una metástasis a distancia.

El cáncer endometrial comprende un grupo heterogéneo de tumores con distintos factores de riesgo, presentación clínica, características histopatológicas y moleculares.

- El adenocarcinoma endometriode de tipo I comprende el 75 % de todos los casos. Son estrógeno dependientes, de bajo grado y provienen de la hiperplasia endometrial atípica.
- Los cánceres tipo II casi siempre tienen rasgos histológicos serosos o de células claras, no existe lesión precursora y tienen una evolución clínica más agresiva.

La sistemática diagnóstica estándar incluye:

- Ecografía transvaginal
- Biopsia endometrial
- Dilatación y raspado uterino fraccionado con/sin histeroscopia

Se recomienda valoración endometrial mediante ecografía transvaginal en mujeres sintomáticas o con factores de riesgo, teniendo siempre en cuenta su estado hormonal.

- Premenopáusicas: la desviación anormal de la estructura del endometrio en las diferentes fases del ciclo menstrual no es suficiente para establecer un diagnóstico. Solamente un engrosamiento superior a 18 mm sugiere una patología endometrial. Las causas principales del sangrado anormal en estas mujeres son los trastornos funcionales, pólipos y miomas.

- Postmenopáusicas: ante la existencia de sangrado en la mujer menopáusica se debe sospechar la existencia de un carcinoma de endometrio. Un endometrio de un grosor superior a 10 mm sugiere fuertemente la existencia de un carcinoma, mientras que uno inferior a 5 mm raramente presenta un carcinoma.

- Dosaje de CA 125: es útil como predictor de invasión extrauterina del cáncer de endometrio y para el seguimiento de las pacientes después de iniciado el tratamiento. Pero no es suficientemente sensible ni específico para ocupar el lugar de la estadificación quirúrgica.

ANEXO I

TESTS DIAGNÓSTICOS

1- Test de gestágenos

• Valora: si tras la administración de progesterona se produce una hemorragia por privación. Esto será posible si se produce una proliferación endometrial adecuada secundaria a niveles de estrógenos suficientes.

• Administración de:

- Acetato de medroxiprogesterona (MAP) 10-15 mg/día vía oral 5-7 días.

- Progesterona natural micronizada 100-200 mg/día 5-7 días.

• Interpretación:

Positivo:

- El canal genital está intacto.

- Descarta amenorrea central y/o fallo ovárico prematuro.

Negativo:

- Posible canal genital está alterado.
- No hay suficiente proliferación endometrial (alteración Hipotálamo-Hipofisaria o gonadal más severas).
- Limitaciones:
 - Falsos positivos: más de un 20% de mujeres con oligo o amenorrea en las que los estrógenos están presentes no presentan sangrados por privación.
 - Falsos negativos: el sangrado por privación puede ocurrir en más del 40% de mujeres con amenorrea inducida por estrés, pérdida de peso, ejercicio o hiperprolactinemia en donde la producción estrogénica está reducida y en más de un 50% de mujeres con fallo ovárico.

2- Test de estrógenos-progesterona

- Valora: si tras la administración secuencial de estrógenos y progesterona, se consigue una proliferación endometrial adecuada y con ello una hemorragia por privación.
- Administración de:
 - Preparados secuenciales que contengan estrógenos y progesterona.
 - Administración de forma secuencial, estrógenos seguidos de progesterona:
 - Estrógenos conjugados 2,5 mg/día 3 semanas + 10 mg MAP vía oral los últimos 5-7 días.
 - Valerianato de estradiol 2 mg/día vía oral, 3 semanas + progesterona micronizada 300 mg/día 10 últimos días.
- Indicación: cuando el test de progesterona es negativo.
- Interpretación:

Positivo:

- Explica la existencia de un estado hipoestrogénico gonadal (amenorrea central).
- Confirma un tracto genital intacto.

Negativo:

- Sospechar alteraciones en el tracto genital.

3-Test de estimulación de GnRH

- Indicación: Sospecha de alteración hipotalámica/hipofisaria.
Diagnóstico diferencial entre etiología hipotalámica e hipofisaria.
- Administración de 100 µg GnRH en bolo endovenoso: determinación de LH y FSH basal a los 30 min y 60 min.

• Interpretación:

Positivo:

- Si se doblan los niveles de FSH y LH a los 30 min y a los 60 min.
- Se confirma la integridad hipofisaria.

Negativo:

- Probable etiología hipofisaria

• Limitaciones:

- Existen pocas formas puras de amenorrea hipofisaria.
- Elevado porcentaje de falsos negativos. La hipófisis precisa impregnación previa de GnRH y estrógenos.
- Si es negativo, repetir el test previa impregnación estrogénica.

La utilidad de este test es controvertida puesto que la incidencia de cuadros puros de origen hipofisario es muy baja en relación a las causas hipotalámicas y en segundo lugar existe un porcentaje de falsos negativos no despreciable, debido a que la hipófisis precisa para su correcto funcionamiento la impregnación previa de GnRH y estrógenos, que incrementan la síntesis de gonadotrofinas.

Es por eso que, estando íntegra la función hipofisaria, la respuesta a la GnRH es baja si no existe un cebado previo de la célula gonadotropa. Si esto se sospecha, deberá repetirse el test tras la administración de estrógenos o de la bomba pulsátil de GnRH.

Test Positivo: origen hipotalámico.

Test Negativo: proseguir con estudios de hipófisis.

4- Test del Citrato de Clomifeno

La prueba con citrato de clomifeno (CC) y la determinación basal de los niveles séricos de FSH son los auxiliares diagnósticos que se utilizan en la evaluación de la reserva ovárica.

Fundamento de la Prueba CC:

Cuantificar los niveles basales de FSH (día 3, 4 ó 5 del ciclo menstrual), administrar CC (100 mg/día) del día 5 al 9 del ciclo menstrual, y al décimo día medir la FSH.

El CC se utiliza por sus propiedades antiestrogénicas, puesto que antagoniza los receptores estrogénicos en la hipófisis y modula la foliculogénesis promoviendo el reclutamiento folicular, la producción de estradiol y la disminución de FSH. En mujeres con poca reserva ovárica, las células de la granulosa producen escasa inhibina, la retroalimentación ovárica-hipofisaria está alterada y, si se administra citrato de clomifeno,

los niveles de FSH sérica se mantendrán elevados. Se considera una prueba anormal o baja reservaovárica cuando los valores basales de FSH son superiores a 12 UI/dL o la suma de FSH en el día 10 del ciclo es mayor de 24 UI/mL. La prueba con citrato de clomifeno se considera un indicador pronóstico de utilidad en la predicción de embarazo y de la respuesta a la hiperestimulación ovárica controlada, específicamente en pacientes mayores de 35 años.

<i>Escalas de Tanner en niñas.</i>		
		Estadio 1. Pecho infantil, no vello púbico.
		Estadio 2. Botón mamario, vello púbico no rizado escaso, en labios mayores.
		Estadio 3. Aumento y elevación de pecho y areola. Vello rizado, basto y oscuro sobre pubis.
		Estadio 4. Areola y pezón sobreelevado sobre mama. Vello púbico tipo adulto no sobre muslos.
		Estadio 5. Pecho adulto, areola no sobreelevada. Vello adulto zona medial muslo.

Tomado de Tanner 1962.

Temboury Molina MC. Desarrollo puberal normal. Pubertad precoz. Rev Pediatr Aten Primaria 2009; 11: 127-42.

ACTIVIDAD PRÁCTICA

Resolución de Casos Clínicos

Caso 1

Una joven de 23 años acude a la consulta por falta de menstruación que data de seis meses. Según su madre no presenta antecedentes relevantes en su infancia, tuvo un rápido crecimiento entre los 11 y los 13 años con desarrollo mamario adecuado y su menarca ocurrió a los 12 años. Al examen físico llama la atención un franco adelgazamiento (la paciente pesa 46 kg y tiene una talla de 170 cm), sin otras alteraciones significativas. En una entrevista posterior los padres refieren obsesión por el peso corporal, y actividad física excesiva, acompañados de modificaciones de la conducta con episodios de depresión e irritabilidad. Los dosajes hormonales muestran los siguientes resultados:

β -hCG (-); Estradiol < 20 pg/mL; LH y FSH por debajo del límite de detección.

Prolactina 4,0 ng/mL; Progesterona 0,2 ng/mL.

- a) ¿Qué tipo de amenorrea presenta la paciente?
- b) ¿Cuál sería el diagnóstico más probable? JSR

Caso 2

Paciente de 25 años que consulta por esterilidad primaria de 3 años de evolución. Entre sus antecedentes de interés, el padre es diabético en tratamiento con insulina. Tuvo la menarquia a los 12 años y presenta menstruaciones irregulares y no dolorosas de 3 días de duración cada 2-6 meses. No fuma ni bebe ni refiere consumo de drogas. En la exploración general, se observa hirsutismo leve y obesidad, con un índice de masa corporal de 30.

La exploración ginecológica, la citología cervical, el hemograma y la serología (VIH, VHB, VHC, Sífilis y Toxoplasma negativas), son normales. Por ecografía se aprecia un útero regular, en anteversión, normal y ovarios con aspecto poliquístico.

La determinación hormonal en 2º día de ciclo fue: FSH: 2,47 mUI/mL, LH: 16 mUI/mL y Estradiol: 25 pg/mL; glucemia: 92 mg/100 mL, insulina basal: 49,30 μ UI/mL, e índice HOMA (Insulina basal x Glucemia/405): 11,19 (VR: hasta 3).

- 1) ¿Cuál es el diagnóstico presuntivo?
- 2) ¿Qué otras valoraciones hormonales realizaría y en qué momento del ciclo?
- 3) ¿Cómo diferencia esta patología de una hiperplasia suprarrenal congénita?

Caso 3

Paciente de 17 años de edad, raza blanca, que acudió a consulta de Endocrinología refiriendo inicio de aparición de caracteres sexuales (mamas y vello pubiano) alrededor de los 14 años de edad y menarquia a los 16 años, con ciclo de 7 días de duración, sangrado

moderado, posterior al cual no ha tenido más sangrado. Se inicia estudio de la paciente constatándose: fascie normal, apiñamiento dental, conducta infantil, talla 142 cm y alteraciones somáticas: talla corta, cuello corto, cubitus valgus, metatarsianos y metacarpianos cortos, escoliosis, teletelia, implantación baja del cabello. Con respecto a los caracteres sexuales secundarios, se observa: mamas Estadio III Tanner, con areolas hipopigmentada; genitales externos femeninos y vello pubiano: Estadio III-IV Tanner.

- 1) ¿Cuál es su diagnóstico presuntivo?
- 2) ¿Qué determinaciones de laboratorio ayudarían a su diagnóstico?
- 3) ¿Cómo confirma el diagnóstico?

Caso 4

Una mujer de 18 años consulta por amenorrea primaria. En la exploración se observa un fenotipo femenino normal pero con ausencia de desarrollo de los caracteres sexuales secundarios. Los genitales externos son femeninos de aspecto infantil y los genitales internos femeninos e hipoplásicos. La talla es normal. El cariotipo es 46,XX. Los niveles plasmáticos de gonadotropinas (FSH y LH) están muy elevados. ¿Cuál de los siguientes diagnósticos corresponde probablemente a este cuadro?

- 1) Síndrome de insensibilidad a los andrógenos (feminización testicular).
- 2) Disgenesia gonadal tipo Síndrome de Turner.
- 3) Disgenesia gonadal pura.
- 4) Defecto congénito de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH).
- 5) Síndrome adrenogenital.

Caso 5

Una mujer de 36 años consulta por infertilidad de origen inexplicado, de 5 años de evolución. Posee menstruaciones regulares, niveles plasmáticos de progesterona en fase lútea normales, sin alteraciones uterinas estructurales. Ausencia de enfermedades orgánicas y disfunción ovulatoria. Como antecedente, refiere que hace cuatro años presenta hipermenorrea, dismenorrea, dolor pélvico en cercanías de la ovulación y dispareunia. Se solicita evaluación de la reserva ovárica y anticuerpos anti-fosfolípidos, resultando normales.

- a) Defina los términos: hipermenorrea, dismenorrea y dispareunia.
- b) ¿Qué marcadores sugiere para evaluar la reserva ovárica?
- c) ¿Cuáles son los anticuerpos anti-fosfolípidos que conoce y por qué fueron solicitados en esta paciente?
- d) En función de los datos clínicos y de laboratorio ¿Qué diagnóstico sugiere para esta paciente y cómo podría confirmarse?
- e) ¿Existe algún marcador tumoral de utilidad para el diagnóstico y/o seguimiento de la patología propuesta?

Preguntas guía para el análisis del trabajo: Evaluación de la reserva ovárica

(Vital Reyes VS, Revista Mexicana de Medicina de la Reproducción 2010; 2 (4): 89-95)

- 1) ¿Qué utilidad posee la evaluación de la reserva ovárica?
- 2) ¿Qué patologías se asocian con disminución prematura de la reserva ovárica?
- 3) ¿Qué ventajas posee la determinación de AMH sobre el resto de los marcadores de reserva ovárica? ¿En qué otras patologías es de utilidad su determinación?
- 4) ¿Qué perfil de marcadores esperarías encontrar en una mujer post-menopáusica?
- 5) ¿Qué metodologías se emplean en la determinación de hormonas esteroideas y peptídicas?
- 6) ¿Qué perfil de gonadotrofinas se asocia frecuentemente al SOP?
- 7) Fundamente y analice las pruebas dinámicas (Citrato de Clomifeno y GnRH).
- 8) ¿Qué otro uso posee en endocrinología la prueba con análogos de GnRH?

VALORES DE REFERENCIA

TSH (mUI/L): 0,4 - 4	T3T (ng/dL): 60 - 200	T4T (µg/dL): 4,5 -12,5
T4L (ng/dL): 0,8 - 1,8	T3L (ng/dL): 0,30 - 0,51	Tiroglobulina (ng/mL): <50
TRAab (UI/L): ≤ 10	aTPO (UI/mL): ≤ 60	aTPG (UI/mL): ≤ 40
PRL (ng/mL): 9-29	Insulina (µU/mL): 3-20	
FSH (mUI/mL): 3,3-11,3 (Fase folicular)	LH (mUI/mL): 1,6-7,9 (Fase folicular)	
Estradiol (pg/mL): 25-195 (Fase folicular)		
Progesterona (ng/mL): <1,6 (Fase folicular)	Progesterona (ng/mL): 1,1 a 21 (Fase Lútea)	

BIBLIOGRAFÍA

- TRATADO DE MEDICINA. M Koskas, E Azria. Amenorreas EMC, 21: 1-7, 2017.
- LABORATORIO DE HORMONAS: ASPECTOS PRÁCTICOS. RE Díaz, J Véliz, N Wohlk. REVISTA MÉDICA CLÍNICA LAS CONDES, 26: 776-787, 2015.
- CÁNCER DE OVARIO: DIAGNÓSTICO, EVALUACIÓN Y ESTRATEGIA TERAPÉUTICA. A Le Roch y col. EMC-Ginecología-Obstetricia, 51: 1-10, 2015.
- PUBERTAD PRECOZ Y RETRASO PUBERAL. J Pozo Román, MT Muñoz Calvo. Pediatr Integral, XIX (6): 389- 410, 2015.
- EPIDEMIOLOGY, DIAGNOSIS, AND MANAGEMENT OF POLYCYSTIC OVARY SYNDROME. SM Sirmans, K Pate. Clinical Epidemiology, 6: 1-13, 2014.
- GREENSPAN. ENDOCRINOLOGÍA BÁSICA Y CLÍNICA. DG Gardner, D Shoback. 9ª Ed. Editorial McGraw-Hill Interamericana. Madrid, 2013.
- Protocolo SEGO. Amenorrea primaria y secundaria. Sangrado infrecuente. Prog Obstet Ginecol. 56: 387-392, 2013.
- PREMATURE OVARIAN FAILURE. AN Shelling. Reproduction, 140: 633–641, 2010.
- ENDOMETRIOSIS. LC Giudice. New England Journal of Medicine, 362: 2389-98, 2010.
- PATOLOGÍA UTERINA Y SU IMPACTO EN LA FERTILIDAD. VJ Albornoz, AG Duque. Revista Médica Clínica Las Condes, 21: 409-415, 2010.

TRABAJO PRÁCTICO N° 10

APARATO REPRODUCTOR MASCULINO. FISIOPATOLOGÍA Y EXPLORACIÓN DE LA FUNCIÓN ENDOCRINA



OBJETIVOS

- Conocer las principales alteraciones funcionales del aparato reproductor masculino.
- Evaluar desde el laboratorio endocrinológico la función hormonal del varón.
- Interpretar un estudio de Espermograma.
- Integrar los resultados de laboratorio mediante la resolución de casos clínicos.

Consideraciones Anatómo-Fisiológicas

Las gónadas masculinas, denominadas testículos, se localizan en la bolsa escrotal y son las estructuras encargadas de producir hormonas sexuales y de formar las células destinadas a la reproducción. Si bien el sexo genético se determina en el momento de la concepción y el sexo gonadal está definido ya a nivel fetal, la plenitud morfológica y funcional de las gónadas no se alcanza hasta la pubertad, momento a partir del cual se expresan sus funciones reproductora y hormonal.

Desde un punto de vista anatómico-funcional, en el testículo se distinguen dos componentes esenciales:

a) Los *túbulos seminíferos*: se organizan en compartimentos llamados lobulillos testiculares y están formados por las *células germinales* y las *células de Sertoli*. Ocupan el 80% del volumen testicular y constituyen el sitio en donde se producen los espermatozoides. Las células germinales, por medio de los conos eferentes, desembocan en el conducto epidídimo, sitio en el que los espermatozoides prosiguen su maduración y se almacenan. De allí, estas células pasarán al conducto deferente y recibirán de las vesículas seminales y de la glándula prostática el plasma seminal, que constituye el medio nutritivo y de transporte de los espermatozoides en la eyaculación. El eyaculado se compone de secreciones epididimarias (5%), prostáticas (30%) y de las vesículas seminales (65%).

b) Las *células intersticiales* o *células de Leydig* son las células productoras de andrógenos necesarios para el desarrollo y mantenimiento de los caracteres sexuales masculinos y la espermatogénesis.

Espermatogénesis

Los testículos del adulto normal producen más de 100 millones de espermatozoides por día. La **espermatogénesis** es un proceso continuo que comienza en la pubertad y dura entre 65 a 72 días. Comprende tres etapas mediante las cuales las espermatogonias se transforman en espermatozoides: 1) *Proliferación*, las espermatogonias a través de divisiones mitóticas mantienen la población celular; 2) *Reducción cromosómica*: el *espermatocito primario* realiza división meiótica originando células haploides (*espermatidas*) y 3) *Diferenciación*: las espermatidas se transforman en *espermatozoides* (Figura 1). La temperatura óptima para la espermatogénesis es de 34,5°C, dos grados por debajo de la temperatura corporal normal. En casos de criptorquidia, varicocele, fiebre elevada o ropa muy ajustada, los testículos están sometidos a temperaturas superiores a la óptima y por ello se altera el rendimiento de la espermatogénesis.

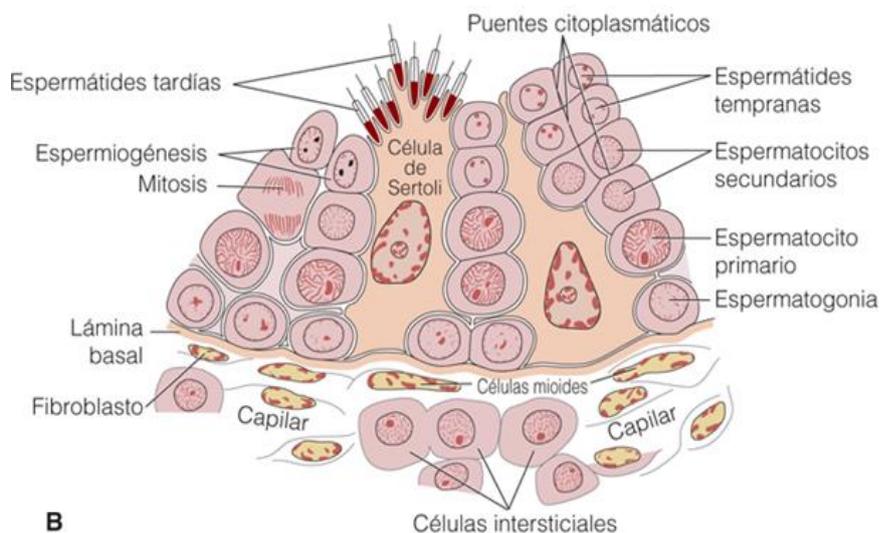


Figura 1. La organización estructural del tubo seminífero y del tejido intersticial en humanos (Greenspan. Endocrinología Básica y Clínica, 2013).

El espermatozoide maduro es una célula altamente diferenciada. Está formado por:

- Cabeza, que contiene el núcleo y aporta la información genética.
- Pieza intermedia, que contiene las mitocondrias, fuente de energía.

- Flagelo, que proporciona la movilidad necesaria para el traslado al lugar de fecundación y asegura la adecuada orientación de la cabeza para penetrar las cubiertas del ovocito.

Regulación del eje hipotálamo-hipófisis-testículo

La actividad testicular está bajo el control de LH y FSH, secretadas por la adenohipófisis en respuesta a GnRH hipotalámica (Figura 2). Además, existe una modulación de la función testicular por medio de factores autocrinos/paracrinos producidos por las células de Sertoli (CS) y por las células peritubulares. Así, las CS sintetizan una proteína fijadora de andrógenos (ABP: *androgen binding protein*) que es necesaria para mantener una concentración adecuada de testosterona (To) en el epitelio seminífero. La FSH promueve el desarrollo y división de las CS, las cuales nutren y sostienen a las células germinales, y estimula la producción de inhibina B. LH ejerce su acción sobre las células de Leydig promoviendo la síntesis de To, necesaria en altas concentraciones en el testículo para una espermatogénesis adecuada. Las gonadotropinas son reguladas por la retroalimentación negativa que ejerce To y sus derivados (estradiol) e inhibina B. Por lo tanto, una disminución en la función testicular llevará a una disminución en la producción de dichas hormonas y a un incremento concomitante de LH y FSH.

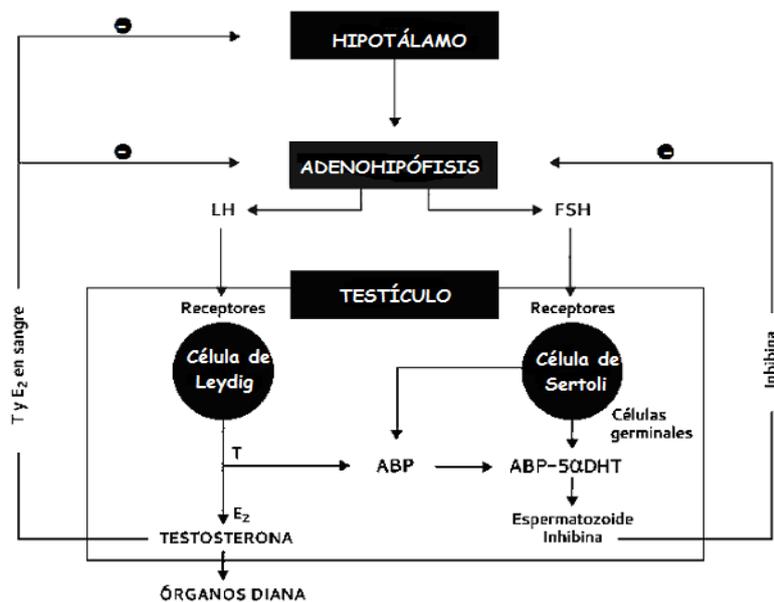


Figura 2. Regulación del eje hipotálamo-hipófisis-testículo. (<http://www.aeu.es/UserFiles/MuestraMaterialDocenteCFSH.pdf>).

En el varón, el principal andrógeno circulante es la To, el 95% deriva de la secreción testicular (3 a 10 mg/día), pero es la dihidrotestosterona (DHT) su metabolito más activo. La conversión de To a DHT por acción de la enzima 5 α -reductasa tiene lugar en los tejidos diana de los andrógenos (folículo piloso, piel genital, tracto genital masculino), haciendo posible que la acción androgénica se ejerza de forma intensa y selectiva. La To (pero no la DHT) se puede aromatizar a estradiol en diversos tejidos extraglandulares, vía que explica la mayor parte de la síntesis de estrógenos en varones. La To es metabolizada en el hígado y en menor proporción en tejidos periféricos como en la próstata y en la piel.

Mecanismo de acción de los andrógenos: Los efectos biológicos de la To y la DHT, son mediados a través del receptor a andrógenos (RA), un factor de transcripción perteneciente a la superfamilia de receptores nucleares. Cuando los andrógenos se unen al RA, éste se activa, se transloca al núcleo y se une a secuencias específicas del DNA. El complejo DHT-receptor es más estable que el de To-receptor, lo cual explica la mayor potencia androgénica de la DHT.

EFFECTOS BIOLÓGICOS DE LOS ANDRÓGENOS	
Testosterona	Dihidrotestosterona (DHT)
- Regulación de gonadotrofinas	- Inducción de la virilización externa
- Inicio y mantenimiento de la espermatogénesis	- Metabolismo lipídico
- Estimulación de los conductos de Wolff	- Promoción de la madurez sexual en la pubertad
- Efectos anabolizantes	

PATOLOGÍAS ASOCIADAS AL APARATO REPRODUCTOR MASCULINO

Disfunción gonadal

Las consecuencias clínicas del hipogonadismo dependen del periodo de la vida en el que se establecen. Durante el primer trimestre del embarazo el hipogonadismo primario provoca desórdenes del desarrollo sexual con genitales ambiguos o femeninos, debido a la carencia hormonal en una ventana crítica para la diferenciación sexual del varón. En contraste, el hipogonadismo de origen central no ocasiona ambigüedad genital, ya que la función de las células de Leydig en el primer trimestre de la vida fetal depende de la secreción de hCG (hormona gonadotrofina coriónica) y no de la LH hipofisaria. La aparición

de hipogonadismo durante el segundo o tercer trimestre del embarazo, ya sea de origen primario o central, provoca el desarrollo de micropene y/o criptorquidia.

Cuando el hipogonadismo se establece durante la infancia, permanece sin diagnosticar hasta la pubertad, a menos que se evalúen marcadores de función de las células de Sertoli. Durante la pubertad, puede provocar falta o arresto del desarrollo puberal, mientras que si aparece ya en la vida adulta se asocia con infertilidad y/o alteración de las funciones fisiológicas dependientes de los andrógenos (disfunción sexual, alteraciones de la densidad mineral ósea, de la composición corporal, etc).

Causas de hipogonadismo masculino (Figura 3)

Los factores que afectan la función testicular son múltiples, por lo cual su clasificación es dificultosa y depende del enfoque elegido (anatómico, funcional, sindrómico, etc.). Según el nivel del eje en que se asiente la lesión (hipotálamo/hipofisario-testicular-órgano blanco), es posible distinguir las siguientes entidades:

1. **Hipogonadismo primario** (daño testicular intrínseco).
2. **Hipogonadismo secundario** (anomalía del eje hipotálamo- hipófisis).
3. **Resistencia androgénica** (respuesta disminuida o ausente de los órganos blanco -piel, vello y próstata- a los andrógenos).

En los dos primeros casos la producción hormonal está disminuida pero la respuesta de los receptores hormonales es normal, mientras que en el tercer caso la producción es normal pero la respuesta está disminuida.

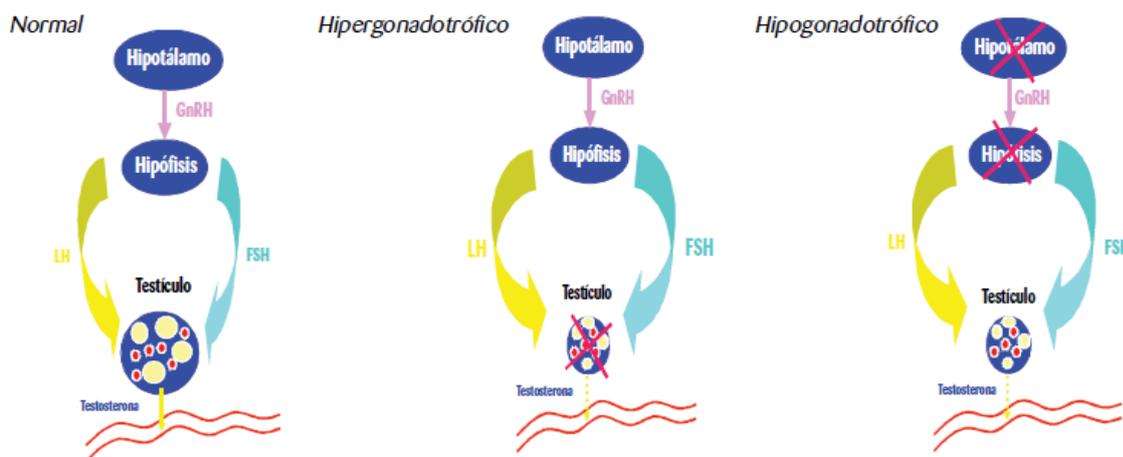


Figura 3. Representación esquemática del eje gonadotrófico según el nivel de la lesión. Separata Montpellier 2007; 15 (6): 1-56.

1) Hipogonadismo hipergonadotropo (primario)

La alteración se sitúa a nivel testicular y se caracteriza por bajos niveles de To y elevadas cifras de gonadotrofinas. Las causas más frecuentes son:

- *Síndrome de Klinefelter*: es el trastorno cromosómico más común que se acompaña de disfunción testicular e infertilidad masculina. La azoospermia es la regla en el síndrome de Klinefelter con cariotipo 47XXY; sin embargo, los varones con mosaicismo pueden tener células germinales, sobre todo durante la juventud. Los cromosomas X supernumerarios se presentan por falta de disyunción meiótica en las gametas paternas o maternas o, más raramente, por no disyunción en las divisiones mitóticas durante la etapa embrionaria. Las características histológicas de los testículos son hialinización de los túbulos seminíferos y ausencia de espermatogénia. La To disminuye y el estradiol asciende, lo cual origina las manifestaciones clínicas de subvirilización y ginecomastia*. Los pacientes con síndrome de Klinefelter tienen mayor riesgo de cáncer mamario, linfoma no Hodgkin y cáncer pulmonar. El diagnóstico de dicha patología puede realizarse antes del nacimiento mediante un estudio de cariotipo en el líquido amniótico (amniocentesis) o por una biopsia coriónica.

- *Criptorquidia* (no corregida): ocurre cuando hay un descenso incompleto de los testículos en el trayecto desde la cavidad abdominal hasta el escroto. En su etiología están involucrados factores genéticos, endocrinos y ambientales. En los seres humanos, el descenso de los testículos al interior del escroto se produce durante el segundo y tercer trimestre, siguiendo un modelo bifásico según la teoría de Hutson:

a) En la primera fase de descenso (transabdominal) los testículos se deslizan por la cavidad abdominal hasta situarse junto al orificio inguinal interno, permaneciendo en esta situación diez semanas más. Esta primera fase está regulada por la hormona similar a la insulina tipo 3 (INSL-3) secretada por las células de Leydig fetales desde la semana nueve, que actúa a nivel de su receptor RXFP2 e induce el desarrollo del *gubernaculum testis*. El efecto de INSL-3 puede potenciarse por la acción de la AMH o la To.

b) La segunda fase (inguino-escrotal) se inicia a partir de la 28 semana de gestación. El testículo situado a la entrada del canal inguinal es guiado por el ligamento gubernáculo hasta el escroto. Esta fase se completa al final de la semana 35 y es dependiente de andrógenos, y de otros factores anatómicos.

La frecuencia de criptorquidia en los recién nacidos a término es de 2 a 5%, mientras que en niños prematuros se eleva al 30-40%. El descenso testicular espontáneo ocurre en las primeras semanas de vida, siendo la frecuencia de criptorquidia menor al 1% hacia los

nueve meses de edad. La criptorquidea impacta en la fertilidad, la cual se reduce en forma progresiva a medida que el hombre crece. La mayoría de estos pacientes presentan en su edad fértil oligozoospermias muy severas o azoospermia no obstructiva. Además, la criptorquidia se considera un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer testicular.

- *Síndrome de células de Sertoli*: se caracteriza por ausencia de células germinales, testículos pequeños, azoospermia, To normal y FSH aumentada. La concentración de LH circulante está en el límite superior de referencia ya que existe algo de supresión a nivel central por los niveles de To circulantes. El síndrome se debe a microdeleciones de la secuencia AZFa del gen localizado en Xq11.

- *Deficiencia de 5-alfa-reductasa*: es un trastorno de la diferenciación sexual provocado por una mutación en el gen SRD5A2, que codifica para la enzima 5 α -reductasa de tipo II, que convierte To en DHT. Su deficiencia es una entidad de transmisión autosómica recesiva caracterizada por cariotipo 46,XY y genitales externos ambiguos (escroto bífido, pene pequeño con hipospadias). Los testículos pueden estar situados en cualquier parte entre el escroto y el abdomen. En la pubertad, la producción de To por los testículos permite el desarrollo masculino, con engrosamiento de la voz y aumento del tamaño del pene y de la masa muscular. La concentración circulante de To es alta, con valores de DHT bajos o indetectables.

- *Síndrome de Noonan*: se asocia con estatura baja, cuello alado, baja implantación de la línea del cabello y cúbito valgo. A diferencia de las mujeres con síndrome de Turner, los hombres con síndrome de Noonan no poseen alteraciones en el número de cromosomas. Puede observarse además retraso mental, ptosis palpebral (descenso permanente del párpado superior), hipertelorismo e implantación baja de las orejas. Asimismo, son frecuentes malformaciones congénitas como la estenosis de la válvula pulmonar y el defecto inter-auricular. Los varones afectados por este trastorno pueden presentar testículos no descendidos y micropene. Los niveles hormonales pueden ser normales o consistentes con hipogonadismo (To baja, FSH y LH altas). Se han observado casos familiares en los que la afección se transmite con carácter autosómico dominante. Casi 50% de los casos se deben a mutaciones de PTPN 11, el gen que codifica la proteína tirosina fosfatasa SHP-2, relacionada con la diferenciación celular.

- *Insuficiencia testicular adquirida*: la quimioterapia antineoplásica, la radiación testicular, los traumatismos, la orquitis vírica (virus de la parotiditis, virus linfocítico de la coriomeningitis y arbovirus del grupo B), la infección por el VIH, el alcohol (cuando se consume excesivamente por periodos prolongados) y otros agentes químicos tóxicos (plomo, cadmio) se asocian a daño testicular primario.

- *Otras*: el *Síndrome Poliglandular Autoinmune* de Tipo 1, 2 ó 4 se asocia con la presencia de falla testicular, bajos niveles de To, elevación de LH y FSH. En muchos de estos pacientes se hallan anticuerpos contra enzimas esteroidogénicas como 17- α hidroxilasa y citocromo P450_{scc} (enzima que cliva la cadena lateral del colesterol). En varones portadores de *Síndrome de Down* (trisomía 21), las gonadotrofinas se hallan elevadas y la espermatogénesis disminuida.

2) Hipogonadismo hipogonadotrópico (secundario)

La alteración de base se sitúa en el eje hipotálamo-hipófisis produciéndose un fallo en la secreción de gonadotrofinas y, por tanto, una disminución de la producción de To por el testículo. El compromiso gonadotropo puede ser selectivo, sin otras deficiencias de hormonas hipofisarias, o ser parte de una insuficiencia adenohipofisaria. El hipogonadismo hipogonadotrópico puede clasificarse en trastornos congénitos y adquiridos. Los trastornos *congénitos* más comunes implican deficiencia de GnRH, con el consiguiente déficit de gonadotropinas como en el *síndrome de Kallmann*. Este desorden ligado al cromosoma X, es ocasionado por mutaciones en el gen *KAL1* que codifica la síntesis de anosmina, una proteína que media la migración de progenitores neurales del bulbo olfativo y neuronas productoras de GnRH. Estos individuos presentan deficiencia de GnRH y combinaciones variables de anosmia o hiposmia, defectos renales y anormalidades neurológicas. Las causas más frecuentes de hipogonadismo hipogonadotrópico *adquirido* son: la *hiperprolactinemia*, la patología degenerativa o invasiva del hipotálamo o la hipófisis y la *hemocromatosis*, en la que tanto la hipófisis como los testículos resultan afectados por el depósito excesivo de hierro.

El hipogonadismo hipogonadotrópico tiene la particularidad, al presentar indemnidad gonadal, de permitir que con diversas terapéuticas se logre muchas veces la recuperación de la función esteroidogénica y reproductiva.

3) Trastornos de la acción de andrógenos

Las mutaciones en el receptor de andrógenos producen resistencia a la acción de To y de DHT, lo que se conoce como *síndrome de insensibilidad a los andrógenos (SIA)*. Estas mutaciones ligadas a X conllevan grados variables de desarrollo fenotípico defectuoso en el varón y subvirilización. Así, los individuos con SIA completo (*síndrome de Morris*) tienen un fenotipo femenino, desarrollo mamario normal, una vagina corta pero sin útero, escaso vello púbico y axilar, hernias inguinales que contienen testículos y orientación psicosexual femenina.

El SIA parcial (*síndrome de Reifenstein*) se debe a mutaciones menos graves del receptor de andrógenos. Los pacientes a menudo presentan pequeños testículos criptorquídicos (ocultos) y ginecomastia en la pubertad. Al igual que ocurre con los hipogonadismos primarios, los altos niveles de gonadotropinas llevan a un incremento en la síntesis de estradiol. Estos individuos desarrollados como varones requieren reducción de las mamas en la adolescencia. Si bien no es un síndrome de insensibilidad a hormonas, las mutaciones en el gen *SRD5A2*, que codifica la 5 α -reductasa tipo 2, evita la conversión de To en DHT, necesaria para el desarrollo normal de los genitales externos masculinos. Este trastorno se caracteriza por una masculinización mínima en la infancia, pero puede ocurrir cierto desarrollo fálico durante la adolescencia debido a la acción de otras isoenzimas. Los individuos criados como mujeres requieren gonadectomía, cirugía estética y restitución de estrógenos.

Andropausia

Fisiológicamente, a partir de los 40 años hay una lenta y continua disminución en la producción de To, junto con un aumento discreto en la concentración de SHBG que hace que los niveles de To biodisponible sean menores. Estos cambios van acompañados de un aumento moderado de las gonadotropinas. El descenso de la To relacionado con la edad se debe a defectos que ocurren en todos los niveles del eje hipotálamo-hipófisis-testículo: se atenúa la secreción pulsátil de GnRH, se reduce la respuesta de LH y se altera la respuesta testicular a LH. Sin embargo, el aumento gradual de las concentraciones de LH que ocurre con el envejecimiento sugiere que la disfunción del testículo es la principal causa del declive de los niveles de andrógeno.

Cáncer testicular

El cáncer de testículo, si bien es poco frecuente (1-1,5% de las neoplasias masculinas), representa la neoplasia sólida más común en varones de 15-34 años. Entre

los factores de riesgo epidemiológico pueden incluirse: antecedentes de criptorquidia, síndrome de Klinefelter, antecedentes de tumores testiculares en un familiar de primer grado, antecedentes de neoplasia intraepitelial testicular contralateral, exposición a dietilestilbestrol e infertilidad.

Los tumores testiculares conforman un grupo muy heterogéneo tanto desde el punto de vista histológico como clínico (Tabla 1). Los tumores de células germinativas del testículo (TCGT) suponen entre el 90-95% de las neoplasias de la gónada masculina. Las células germinales derivan de células pluripotenciales, lo que explica los diferentes elementos celulares germinales tanto en el tumor primario como en las posibles metástasis (seminoma, carcinoma embrionario, tumor de saco vitelino, coriocarcinoma y teratoma). Cerca de la mitad de los TCGT tienen más de un tipo celular y se denominan tumores germinales mixtos. El 5% restante corresponde a los tumores de células no germinales que se originan del cordón sexual (células de Sertoli) y del estroma (células de Leydig). Los tumores metastásicos (secundarios a otras neoplasias) suponen un porcentaje menor del total, siendo los más frecuente aquellos que tienen su origen próstata.

Tabla 1. Tipos de Tumores Testiculares

1. Tumores de células germinativas

- Neoplasia intratubular de células germinativas
- Seminoma (incluidos los casos con células sincitiotrofoblásticas)
- Seminoma espermatocítico (mencionar en caso de existir un componente sarcomatoso)
- Carcinoma embrionario
- Tumor del saco vitelino
- Coriocarcinoma
- Teratoma (maduro, inmaduro, con componente maligno)
- Tumores con más de un tipo histológico (especificar el % de componentes individuales).

2. Tumores de los cordones sexuales/estroma gonadal

- Tumor de células de Leydig
- Tumor maligno de células de Leydig
- Tumor de células de Sertoli
 - variante rica en lípidos
 - esclerosante
 - de células grandes calcificante
- Tumor maligno de células de Sertoli
- Tumor de células de la granulosa
 - tipo adulto
 - tipo juvenil
- Grupo de tumores del tecomoma/fibroma
- Otros tumores de los cordones sexuales/estroma gonadal
 - incompletamente diferenciado
 - mixto
- Tumores con células germinativas y cordones sexuales/estroma gonadal (gonadoblastoma).

3. Tumores diversos del estroma inespecífico

- Tumores epiteliales del ovario
 - Tumores de los conductos colectores y la red de Haller
 - Tumores (benignos y malignos) del estroma inespecífico
-

En función de su análisis histológico, los TCGT pueden dividirse de manera práctica en dos grandes subgrupos, seminomatosos y no seminomatosos. Los seminomatosos representan aproximadamente el 50% de todos los tumores de células germinales y aparecen más frecuentemente en la cuarta década de la vida (excluye a aquellos tumores que presentan algún elemento no seminomatoso o en los que esté incrementada la alfa feto proteína). Los *tumores no seminomatosos* aparecen a edades más tempranas y tienden a ser más agresivos. Se definen por la presencia de al menos un contingente no seminomatoso de tejidos embrionarios (carcinoma embrionario y teratoma) y/o extraembrionarios (tumor vitelino y coriocarcinoma).

Es importante realizar la determinación sérica de los distintos marcadores tumorales, ya que contribuyen al diagnóstico y estadificación del tumor, además de ayudar a monitorear la respuesta al tratamiento y detectar posibles recaídas. Los principales marcadores tumorales en la práctica clínica son:

- **Alfafetoproteína** (AFP, proteína sintetizada por las células del saco vitelino). Aumenta en el 50-70% de pacientes con tumores no seminomatosos. Sus niveles son normales en pacientes con coriocarcinoma puro y seminoma puro.
- **β -hCG** (expresada por el trofoblasto). Se eleva en todos los casos de coriocarcinoma, 40-60% de los carcinomas embrionarios y 10-25% de los seminomas puros.
- **Lactato deshidrogenasa** (LDH). Su elevación no es específica y se utiliza para determinar el volumen tumoral o como marcador de enfermedad avanzada.
- **Fosfatasa alcalina placentaria** (PLAP). Su cuantificación no se realiza de forma rutinaria. Su utilidad radica especialmente en el seguimiento de pacientes con seminoma puro.

**Ginecomastia*

La ginecomastia es el aumento de tamaño de la mama en el hombre y constituye un signo clínico y no una enfermedad. Se produce por desbalance plasmático o intramamario de estrógeno-testosterona: los estrógenos aumentan por mayor secreción funcional, tumoral o estrógenos exógenos y los andrógenos disminuyen por una alteración que afecta cualquier nivel del eje hipotálamo-hipófisis-testículo. La ginecomastia fisiológica es prevalente en los períodos neonatal, pubertad y adulto mayor, y en estados patológicos se asocian a la deficiencia de andrógenos o el exceso de estrógeno (Figura 4).

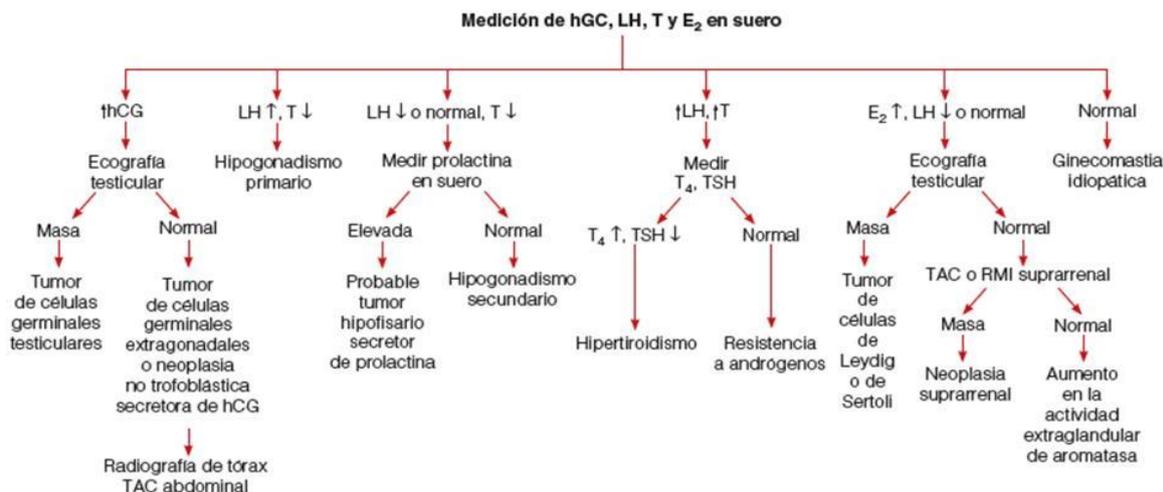


Figura 4. Evaluación diagnóstica de las causas endocrinas de la ginecomastia (E₂, estradiol; hCG, gonadotropina coriónica humana; LH, hormona luteinizante; T, testosterona; T₄, tiroxina; TSH, hormona tirotrópica). Greenspan. Endocrinología básica y Clínica, 2011).

Otras patologías testiculares

- *Azoospermia Obstruktiva (AO)*: La azoospermia obstruktiva es la ausencia de espermatozoides y células espermatogénicas en el semen y la orina post-eyacuación debida a una obstrucción bilateral de los conductos seminales, desde el epidídimo hasta los conductos eyaculadores. Los hombres con azoospermia obstruktiva tienen tamaño testicular normal y niveles de FSH dentro del rango de referencia. Su origen puede ser congénito o adquirido (postinfecciosa o postquirúrgica). (Tabla 2)

Tabla 2. Clasificación de la AO en función de la obstrucción canalicular debida a causas congénitas y adquiridas

Afecciones	Congénitas	Adquiridas
Obstrucción epididimaria	Obstrucción epididimaria idiopática	Post-infecciosa (epididimitis) Post-operatoria (quistes epididimarios)
Obstrucción de los conductos deferentes	Ausencia congénita de los conductos deferentes	Post-vasectomía Post-quirúrgica (hernia, cirugía escrotal)
Obstrucción de los conductos eyaculadores	Quistes prostáticos (quistes de Müller)	Post-quirúrgica (cirugía de cuello de la vejiga) Post-infecciosa

(Dohle y col. Guía clínica sobre la infertilidad masculina. Eur Association of Urology, 2010).

- *Varicocele*: es una patología frecuente caracterizada por una dilatación del plexo pampiniforme testicular debida a un retorno venoso enlentecido secundario a una falla de

las válvulas venosas. Puede estar asociado con déficit en concentración, motilidad o morfología espermática. Posee implicaciones andrológicas como falla en el crecimiento y desarrollo testicular ipsilateral, dolor e infertilidad. El diagnóstico se basa en el examen clínico y se confirma con estudios de imágenes.

- *Infecciones del tracto genital y glándulas anexas*: se trata de procesos de naturaleza inflamatoria o infecciosa que pueden alterar la función reproductiva por diversos mecanismos (formación de radicales libres que afectan la membrana del espermatozoide y la integridad del ADN, disminución de motilidad-viabilidad espermática, espermoaglutinación, producción de anticuerpos antiespermáticos, alteración de la maduración espermática a nivel epididimario, obstrucción parcial o total de las vías espermáticas, etc). Cursan por lo general con cambios en la composición de la bioquímica seminal, leucospermia y alternancia oligo/azoospermia. (Tabla 3).

Tabla 3. Resumen de las principales alteraciones del sistema reproductivo en el varón

Hipogonadismo hipergonadotrópico	Hipogonadismo hipogonadotrópico	Resistencia de los órganos efectores a los andrógenos
<ul style="list-style-type: none"> • Anorquia • Criptorquidia • Síndrome de Klinefelter • Microdeleciones del cromosoma Y • Anomalías cromosómicas numéricas y estructurales • Traumatismo, torsión testicular, orquitis • Yatrogeno (cirugía, medicamentos, irradiación, citostáticos) • Factores exógenos (toxinas, calor, riesgos laborales) • Enfermedades sistémicas (cirrosis hepática, insuficiencia renal) • Tumor testicular • Varicocele • Idiopática 	<ul style="list-style-type: none"> • Congénito: Hipogonadismo hipogonadotrópico idiopático -normósmico -hipo/anósmico (síndrome de Kallmann) • Adquirido: Idiopático Tumores de las siguientes regiones: -Diencefalo (craneofaringiomas, meningiomas), Hipotálamo o hipófisis • Silla turca vacía • Enfermedades granulomatosas •Fracturas de la base del cráneo • Lesiones isquémicas o hemorrágicas en la región del hipotálamo • Hiperprolactinemia • Medicamentos/esteroides anabolizantes, radioterapia 	<ul style="list-style-type: none"> • Feminización testicular • Síndrome de Reifenstein

EVALUACIÓN ENDOCRINA EN EL VARÓN POR EL LABORATORIO

Para la evaluación del eje hipotálamo-hipófiso-testicular, se realizan determinaciones basales de LH, FSH, prolactina, To, To biodisponible o To libre, SHBG y estradiol, así como test dinámicos que orientan el diagnóstico de diversas patologías (Figura 5). Se considera que una evaluación endocrina debe ser realizada si se detecta: 1) una concentración espermática baja; 2) disminución en la función sexual o 3) hallazgos clínicos sugestivos de una endocrinopatía específica.

FSH: su elevación en pacientes con volumen testicular disminuido sugiere un daño severo de la espermatogénesis y permite diferenciar los hipogonadismos primarios o hipergonadotropos de los secundarios, que se asocian con daño orgánico o funcional a nivel hipotálamo-hipofisario y valores disminuidos o normales de FSH. En pacientes azoospermicos con FSH y volumen testicular normal, debe descartarse una ausencia u obstrucción de las vías seminales.

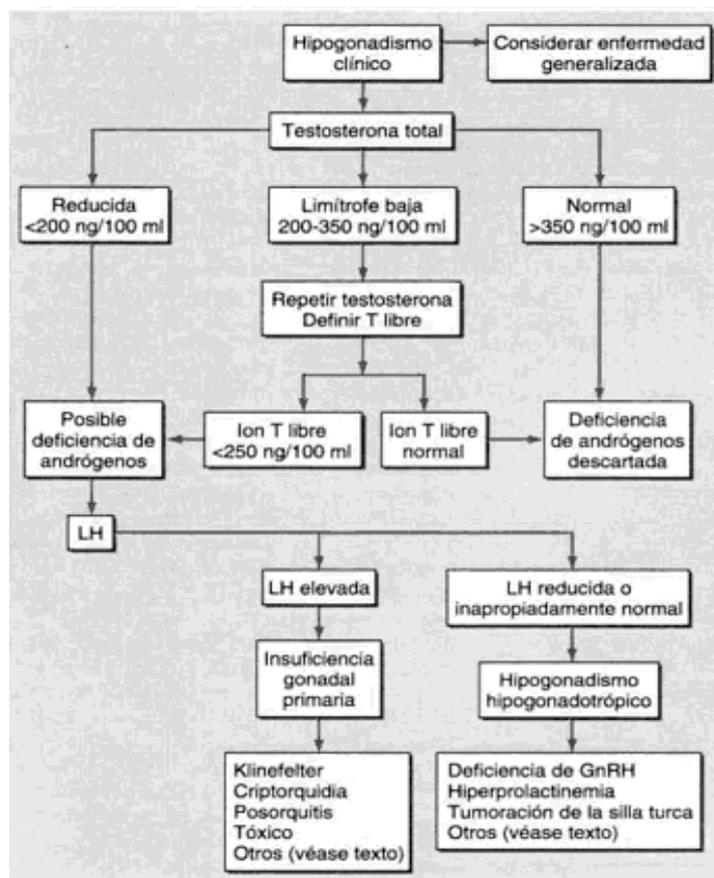


Figura 5. Evaluación del hipogonadismo: T, testosterona; LH, hormona luteinizante; GnRH, hormona liberadora de gonadotropina (Harrison, Medicina Interna, 2008).

LH: la evaluación de LH es esencial para el diagnóstico del síndrome de resistencia o insensibilidad periférica a los andrógenos. Este síndrome se sospecha en hombres con azoospermia u oligozoospermia que tienen valores séricos de LH, To y E2 elevados, DHT disminuidos y aumento de la relación To/DHT. Estas alteraciones hormonales se hacen más evidentes durante la estimulación testicular con hCG.

To: su determinación está indicada para el diagnóstico del hipogonadismo primario y secundario, en las alteraciones del desarrollo puberal y en el estudio de las anomalías del desarrollo sexual con cariotipo 46,XY; como la resistencia androgénica. Se sugiere medir To en pacientes con disfunción eréctil, pues ésta puede ser consecuencia de un hipogonadismo. Sin embargo, existe una importante variabilidad individual en los umbrales de To circulante para la aparición de los síntomas de hipogonadismo. Asimismo, distintos síntomas parecen presentarse con diferentes valores de To, lo que refuerza el valor del juicio clínico ponderado con los datos bioquímicos.

- Cuantificación de To total

La extracción de sangre para la cuantificación de To total debe realizarse a la mañana entre las 8 y 10 h, no se requiere ninguna preparación especial ni es imprescindible estar en ayunas. Valores por debajo del intervalo de referencia poblacional deben confirmarse al menos con una determinación adicional. Todas las guías recomiendan que cada laboratorio utilice métodos validados y establezca correctamente con ellos sus propios valores de referencia. Dada la variabilidad de los resultados de las diversas técnicas y entre diferentes laboratorios, es importante que los análisis de confirmación y seguimiento terapéutico se lleven a cabo en el mismo laboratorio.

El método de referencia para la determinación de To total es la espectrometría de masas (MS) con dilución isotópica previa extracción con solventes y separación mediante cromatografía (C-MS) de gases (GC) o líquida (LC). En la actualidad se está imponiendo como procedimiento de detección más idóneo la MS en tándem (conlleva 2 espectrómetros conectados en serie) con separación previa por LC (LC-MS/MS). Si bien las mencionadas metodologías son poco aplicables a las determinaciones clínicas rutinarias por su complejidad, costo de equipamiento y consumo de tiempo de trabajo, representan el patrón con el que idealmente se deberían comparar las técnicas habituales. En el ámbito clínico la To total plasmática se suele medir mediante diversos tipos de inmunoanálisis competitivos.

Se pueden usar distintos procedimientos para marcar la molécula de To. El más clásico es mediante radiactividad (^3H en la propia molécula de To o bien ^{125}I en una molécula orgánica acoplada a la de To), lo que se conoce como *radioinmunoanálisis* (RIA).

Este tipo de ensayo se ha ido reemplazando paulatinamente por otros que emplean marcas no radioactivas susceptibles a ser automatizadas. Así, la To se puede marcar con una enzima (fosfatasa alcalina, peroxidasa o galactosidasa), y se cuantifica mediante una reacción colorimétrica que se inicia al añadir sus correspondientes sustratos tras la incubación y lavado; es el *enzimoinmunoanálisis* (EIA/ELISA). A su vez, la molécula de To puede marcarse con una sustancia fluorescente, como el europio, que se mide con un fluorímetro tras completar la reacción y la separación; es el *fluoroimmunoanálisis* (FIA). Hay sistemas que marcan la To con sustancias quimioluminiscentes (en algunos, su generación es provocada por una enzima acoplada a la To) como acridinio, rutenio, derivados de luminol o adamantil dioxetano, que se miden con un fotomultiplicador y se denominan inmunoensayos por *quimioluminiscencia* (CLIA).

- Cuantificación de testosterona libre (To L) y testosterona biodisponible (To bio)

La To circula en la sangre unida a proteínas plasmáticas, fundamentalmente a la albúmina y a la globulina ligadora de hormonas sexuales (SHBG), y alrededor del 2% se encuentra en el plasma en forma libre (To L). La SHBG regula la concentración de To L, que es la fracción biológicamente activa (Figura 6).

La fracción de To unida a la albúmina (To-Alb) tiene un tiempo de disociación muy bajo comparado al del complejo To-SHBG, por ello se considera a To-Alb como parte de la fracción libre. Así, la suma de To L más la To unida a la albúmina se denomina fracción biodisponible (To bio). La concentración de To bio no depende de los factores que podrían modificar los valores de la SHBG, los cuales provocarían falsas modificaciones de la testosteronemia.

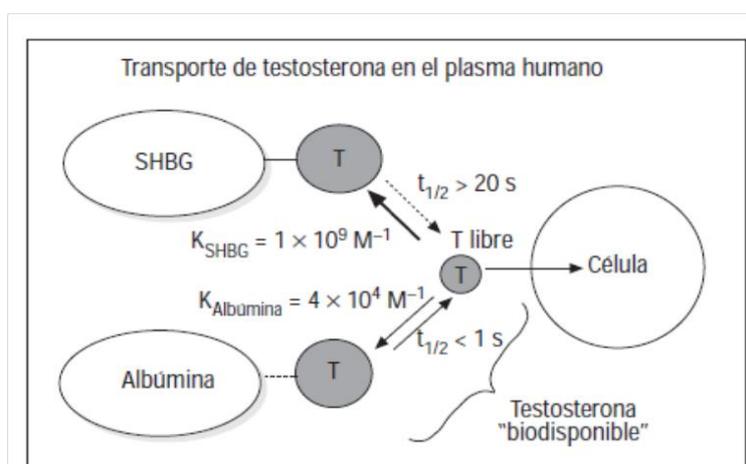


Figura 6: Equilibrio de la testosterona plasmática e "hipótesis de la hormona libre". T: Testosterona. (Rev Int Androl. 2008; 6: 101-14).

Existen dos **métodos de referencia** para la cuantificación de To L (no es de rutina en el laboratorio clínico):

- 1) **Diálisis**, el suero del paciente se coloca en un compartimiento separado de otro que contiene una solución tampón (dializado) por medio de una membrana semipermeable, que permite el paso a la To L pero no a las proteínas (ni a la To unida a ellas). Así, las moléculas de To L difunden hasta el compartimiento del dializado, hasta equilibrar su concentración con la presente en el suero. El dosaje de la To presente en el dializado por RIA da la concentración de To L.
- 2) **Ultrafiltración**, se basa en centrifugar la muestra de suero a través de una membrana semipermeable, de modo que sólo la To L (con otras moléculas pequeñas) se encuentre presente en el ultrafiltrado, donde se puede determinar por RIA. Tiene la ventaja que es rápido y para su procedimiento se dispone de dispositivos comerciales (sistema de micropartición de Millipore).

Para la determinación de To bio se debe conocer la concentración de la To total y la de SHBG. La distribución de la To total entre sus fracciones libre y unidas a las proteínas de transporte sigue la Ley de Acción de Masas, de modo que se puede utilizar un cálculo manual mediante la ecuación de Södergård (van den Beld et al. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85:3276-3282, 2000) o computarizado (*SHEEVA, Diagnos Med SRL*) que permita obtener la concentración de las distintas fracciones. Así se calcula la concentración To L, la que ha mostrado tener, por este método, un 100% de correlación con la T bio. Esto es lógico, ya que en las únicas situaciones en las que la To L no se correspondería con la To bio serían ante una concentración de albúmina tan patológica que no sería compatible con la vida, o frente a cambios en la Ka de la albúmina, situación que no ha sido descripta. Un método alternativo para la determinación de To bio es la precipitación del suero con una solución saturada de sulfato de amonio (precipita la fracción unida a la SHBG), quedando en el sobrenadante la To bio, la cual debe cuantificarse por RIA con extracción.

Las determinaciones de To L y To bio (calculadas o medidas) pueden resultar superfluas cuando los valores obtenidos de To total están por encima o por debajo de los límites inferiores de normalidad. Su principal utilidad se encuentra cuando los valores de To total están en la "zona gris" intermedia y no permiten clasificar con certeza al paciente: > 2 ng/mL (6,9 nmol/L) y < 4 ng/mL (13,8 nmol/L).

SHBG: la concentración de SHBG es variable, depende del sexo y de distintas situaciones fisiológicas y patológicas. Aumenta por acción de los estrógenos (el incremento de la glicosilación extiende su vida media) y de las hormonas tiroideas (activan la transcripción del gen que controla su síntesis), por ello suele elevarse en el embarazo, en el tratamiento con anticonceptivos, en el hipertiroidismo, etc. Disminuye por acción de los andrógenos (disminuye la glicosilación) y por la insulina (inactiva la transcripción del gen), por lo que puede hallarse baja en presencia de hiperinsulinemia, obesidad, hiperandrogenismo, hipotiroidismo, menopausia, etc (Tabla 4). Si la SHBG se encuentra inalterada dentro del rango de referencia, To L y To bio son proporcionales a la To total.

Tabla 4. Factores que modifican la SHBG en varones

Factores que modifican la SHBG en varones	
Disminución	Incremento
- Obesidad moderada	- Edad avanzada
- Síndrome nefrótico	- Cirrosis
- Hipotiroidismo	- Hipertiroidismo
- Acromegalia	- Tratamiento con anticonvulsivantes o estrógenos
- Tratamiento con glucocorticoides, andrógenos o progestágenos	- Infección por HIV
	- Anorexia nerviosa
	- Hipogonadismo

Inhibina B: es una glicoproteína producida principalmente en la célula de Sertoli, cuya síntesis depende de la FSH y del estado de la espermatogénesis. Tiene una acción reguladora de la gametogénesis, inhibiendo específicamente la secreción de FSH. En niños, es utilizada en el diagnóstico de criptorquidia y pubertad precoz. Permite evaluar el daño espermático en pacientes tratados con radioterapia o quimioterapia. Factores como hipo o falta de espermatogénesis, síndrome de célula de Sertoli solo, baja concentración de espermatozoides o bajo volumen testicular causan disminución de los niveles de inhibina B, asociada a una elevación de la FSH.

PRL: la hiperprolactinemia puede originarse por tumores secretantes (prolactinomas) o por causas funcionales como el uso de fármacos que interfieren con la regulación dopaminérgica hipotalámica (alfametildopa, cimetidina, metoclopramida, antidepresivos tricíclicos, entre otros). El estrés, incluso el de la venipuntura, puede elevar temporalmente

los valores de PRL. La hiperprolactinemia puede dar como resultado hipogonadismo por alterar la función aminérgica e inhibir la liberación de GnRH.

Estradiol (E2): La determinación de E2 se realiza principalmente ante la sospecha de un tumor productor de estrógenos o la presencia de ginecomastia. En casos de hipogonadismo hipergonadotropo, por ejemplo, se genera un desbalance E2-To por disminución de To, en presencia de niveles normales de E2 provenientes de la aromatización periférica de andrógenos suprarrenales, lo que provoca el incremento del tejido glandular mamario en el varón.

AMH: representa un marcador distintivo de la funcionalidad de las CS durante la etapa pre-puberal. Los valores en el niño son superiores a los hallados en las niñas. La liberación de AMH es estimulada por FSH e inhibida por To, por lo que sus niveles disminuyen a partir de la pubertad. Contribuye al diagnóstico etiológico del hipogonadismo en pediatría.

17-Hidroxiprogesterona (17-OHP) y electrolitos: la determinación de 17-OHP junto con el ionograma es urgente en un recién nacido fenotípicamente varón con testículos no palpables bilaterales para descartar una hiperplasia suprarrenal congénita.

Pruebas funcionales

1. *Test de Clomifeno:* permite evaluar la integridad de la unidad hipotálamo-hipófisis, ya que actúa como un antiestrógeno hipotalámico que provoca un desenfreno de la secreción de GnRH, que estimula la liberación de LH y FSH. Se administra Citrato de Clomifeno vía oral durante 7 días y se valoran LH y FSH antes y al séptimo día post-administración del fármaco. Interpretación: LH y FSH deben aumentar por lo menos un 100%.

2. *Test de Tamoxifeno:* utiliza el mismo principio que el anterior. Se administra Tamoxifeno por vía oral durante 30 días y se valoran los niveles séricos de LH y FSH antes y a los 30 días post-administración del fármaco. Interpretación: LH y FSH deben aumentar por lo menos un 100%.

3. *Test de GnRH:* en los hipogonadismos secundarios puede efectuarse un test de estímulo con la administración de 100 µg de GnRH, en bolo subcutáneo o en inyección endovenosa rápida. A causa de la liberación pulsátil de las gonadotropinas, se deben

obtener al menos dos muestras de sangre 15 min antes e inmediatamente antes de la administración de GnRH. El promedio de las dos muestras sirve como valor basal para LH y FSH. Se valora la concentración de LH y FSH a los 30, 60, 90 y 120 min posteriores a la estimulación con GnRH. La respuesta de LH suele ser más intensa y observarse antes que la respuesta de FSH; los valores máximos de LH suelen observarse a los 15 a 45 min, mientras que los de FSH pueden aparecer más tarde en algunos pacientes. En los adultos, se espera que los valores de LH se dupliquen tras la administración de GnRH, e incluso es frecuente observar mayores aumentos. La elevación de FSH suele ser del orden de 1,5 a 2 veces el valor basal.

La prueba de GnRH es útil para evaluar la capacidad funcional y la respuesta de las gonadotrofinas hipofisarias en los adultos, pero no permite diferenciar los trastornos hipotalámicos de los trastornos de etiología hipofisaria, ya que en ambos casos puede existir una respuesta disminuida. Se observa una respuesta exagerada de LH a la GnRH en los hombres con hipogonadismo primario. Es importante remarcar que un tercio de los hipogonadismos congénitos presentan una respuesta normal debido a cierta secreción endógena de GnRH, suficiente para desarrollar receptores hipofisarios que respondan al estímulo agudo con una secreción gonadotrófica normal.

4. *Test de hCG*: permite evaluar la integridad de compartimento esteroideogénico del testículo, ya que hCG tiene actividad biológica de LH. Existen diversos protocolos, con administración única o múltiple (entre 3 y 5 días) de hCG intramuscular. Una única dosis 5.000 UI/1,73m² con determinación de testosterona basal y a las 72 h post-inyección aporta información diagnóstica suficiente en la mayoría de los casos. La prueba de estimulación con hCG revela la presencia de células de Leydig funcionales en niños u hombres sin evidencia de testículos a la exploración, permitiendo distinguir la criptorquidia bilateral de otras formas de hipogonadismo primario, especialmente la anorquia bilateral. Si en un recién nacido no se palpan los testículos, debe descartarse un trastorno del desarrollo sexual 46,XX o una anorquia bilateral congénita. La lesión testicular causada por una torsión o un accidente vascular puede haber sucedido antes del tercer mes de gestación. Los lactantes con anorquia tienen genitales externos masculinos normales. En niños prepúberes, un aumento de la testosterona >1,50 ng/mL (5,2 nmol/L) indica la presencia de tejido testicular, mientras que la falta de respuesta señala la ausencia del mismo o una alteración importante del funcionamiento de las células de Leydig.

Estudios genéticos

Los tres factores genéticos más comúnmente relacionado con la infertilidad masculina son: 1) Anomalías cromosómicas que producen una disminución de la función testicular, 2) Microdeleciones del cromosoma Y asociadas a disminución de la espermatogénesis, 3) Mutaciones del gen de la fibrosis quística asociada a agenesia bilateral de conductos deferentes.

a) Cariotipo

El cariotipo es la técnica citogenética principal para el estudio de la constitución cromosómica y se realiza habitualmente sobre linfocitos de sangre periférica. Cuanto mayor sea la desviación de la normalidad en el análisis seminal previo, mayor será la probabilidad de encontrar alteraciones genéticas asociadas. Las anomalías cromosómicas pueden ser numéricas o estructurales (inversiones, translocaciones, duplicaciones). Las dos terceras partes de las anomalías cromosómicas corresponden a aneuploidías de los cromosomas sexuales, como es el síndrome de Klinefelter (47,XXY). El estudio del cariotipo resulta altamente recomendable ante la presencia de fenotipo sugestivo de cromosomopatía, azoospermia u oligozoospermia grave, abortos a repetición o antecedentes familiares de primer grado de cromosomopatías. También es aconsejable en cualquier pareja con diagnóstico de esterilidad idiopática que vaya a someterse a FIV/ICSI.

b) Microdelección cromosoma Y

Se han identificado microdeleciones en tres regiones sin superposición del cromosoma Y, AZF a-b-c (*azoospermia factor*). Las deleciones que tienen importancia clínica eliminan parcial o completamente, una o más regiones AZF y representan una causa frecuente de oligozoospermia grave y azoospermia. Su estudio está indicado en pacientes con azoospermia no obstructiva, especialmente para determinar si es necesario realizar biopsia testicular, ya que deleciones en AZFc presentan una alta probabilidad de espermatogénesis completa a nivel del epitelio germinal y obtención de espermatozoides, lo contrario ocurre en deleciones presentes en AZFa y AZFb. Si bien estas microdeleciones son muy pequeñas para ser detectadas en el estudio de cariotipo, pueden ser detectadas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

c) Mutaciones en el gen CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulation Gene*)

Este gen se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 7 y codifica una proteína de membrana que actúa como canal iónico y también influye en la formación de los conductos eyaculadores, las vesículas seminales, los conductos deferentes y los dos tercios distales del epidídimo. La ausencia bilateral congénita de los conductos deferentes

(ABCCD) se asocia a mutaciones de CFTR. Los varones con azoospermia han de ser examinados minuciosamente para descartar una ABCCD, especialmente si presentan espermogramas con un volumen seminal $< 1,5$ mL y $\text{pH} < 7$. Es importante el testeo conjunto de la pareja para mutaciones del gen de la fibrosis quística.

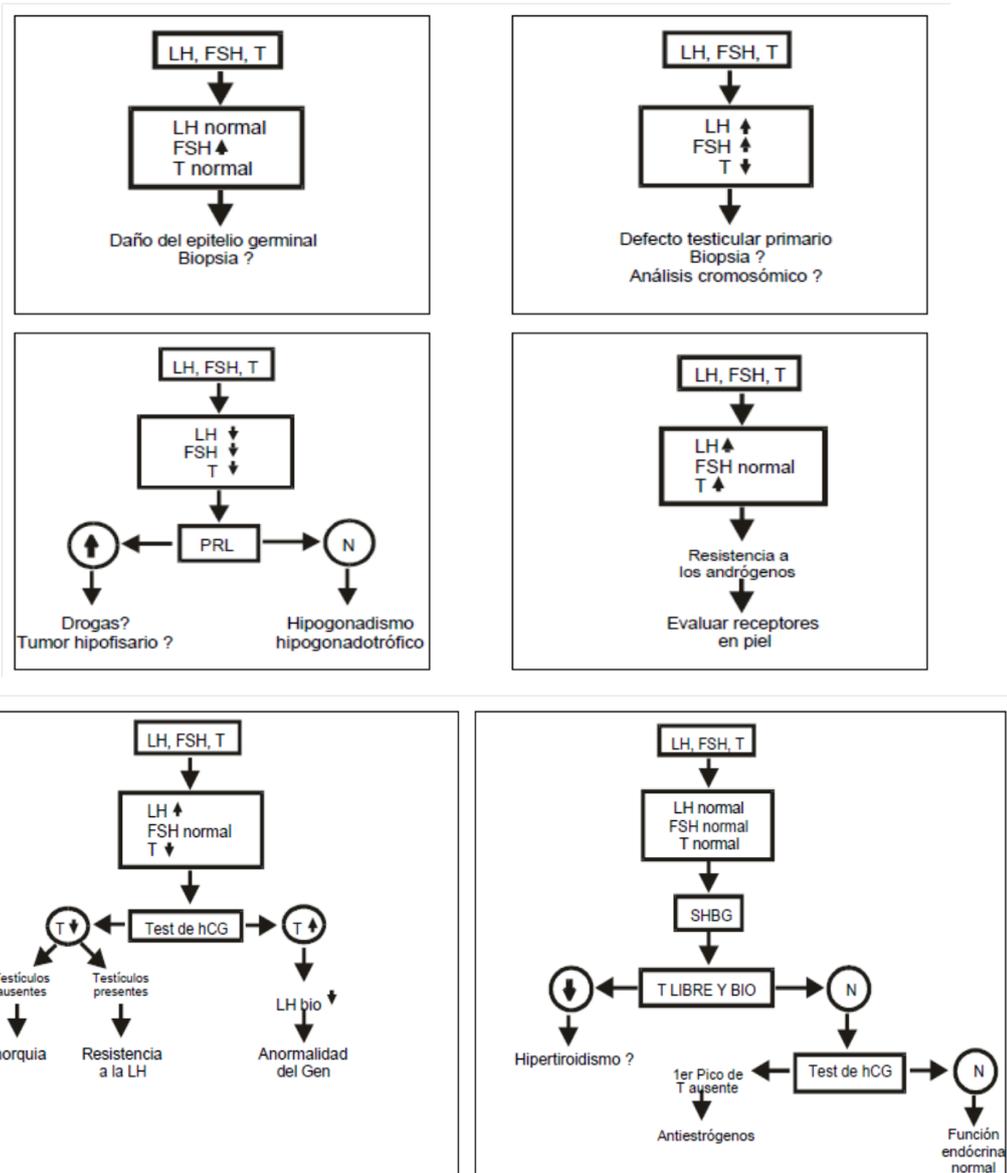
Ultrasonido

Se utiliza para obtener una evaluación más precisa del tamaño testicular, para comprobar que no hay pequeños quistes de epidídimo y para descartar la presencia de imágenes sugerentes de cáncer en desarrollo. Estos hallazgos son más comunes en los hombres con problemas severos en la producción de espermatozoides o en los hombres que han tenido una historia de criptorquídea. La asociación con doppler permite confirmar el diagnóstico de varicocele.

Biopsia testicular

En general la biopsia testicular está indicada con el objeto de diferenciar entre azoospermia obstructiva y no obstructiva en pacientes sin factor evidente, hormonas normales y tamaño testicular normal. Se recomienda enviar simultáneamente muestras testiculares al laboratorio de reproducción asistida con el fin de aprovechar el procedimiento con fines terapéuticos y criopreservar espermatozoides en caso de ser encontrados.

Algoritmos en el estudio del varón



Fisiopatología del eje hipotalamo-hipofiso-testicular. Fundación Bioquímica Argentina (2011).

EVALUACIÓN ANDROLÓGICA DEL HOMBRE CON ALTERACIONES DE LA FERTILIDAD

Factor Masculino en Infertilidad

La **infertilidad** se define según la OMS como la incapacidad de una pareja, sexualmente activa y que no utiliza contracepción, para lograr el embarazo en el transcurso de año. Una tercera parte de las causas de infertilidad se debe al factor masculino; una fracción igual al femenino y el tercio restante son de competencia compartida.

La **fertilidad masculina** puede verse reducida como consecuencia de:

- Anomalías genitourinarias, congénitas o adquiridas
- Infecciones de las vías genitourinarias
- Aumento de la temperatura escrotal
- Trastornos endocrinos
- Anomalías genéticas
- Factores inmunitarios
- Idiopática

La evaluación andrológica por infertilidad en un hombre debe incluir una historia médica y reproductiva completa y al menos dos espermogramas, separados por entre sí por un tiempo prudencial. El análisis seminal permitirá obtener información acerca de la espermatogénesis y la condición fisiológica de los órganos y tejidos comprometidos en ella. Basado en esta evaluación, se recomendarán otros procedimientos y pruebas para aclarar la etiología de la infertilidad que afecta al paciente, entre los que se incluyen cultivos de semen, imágenes, estudios hormonales, inmunológicos y genéticos.

Interrogatorio y Examen físico

Es importante indagar acerca de la existencia de infertilidad familiar, enfermedades eruptivas de la infancia, como la parotiditis y su complicación con orquitis, enfermedades de transmisión sexual, enfermedades sistémicas (síndrome metabólico, diabetes tipo 2, esclerosis múltiple) y antecedentes quirúrgicos (orquiectomía, hernioplastías, cirugía retroperitoneal). Además, conocer la profesión del paciente, exposición a tóxicos del medio ambiente, estilo de vida, estrés, drogas o consumo de anabólicos. El desarrollo sexual habitualmente se valora según los estadios descritos por *Tanner*. Debe prestarse atención a los posibles estigmas endocrinos a partir del hábito corporal: cantidad y distribución del vello y el patrón de distribución grasa, inspección del tamaño, pigmentación o malformaciones de los genitales externos, como en el eunucoidismo que presenta genitales muy pequeños y pigmentación escasa. La implantación del meato uretral en la cara ventral

del pene se denomina *hipospadía*; si es muy severa o se asocia con criptorquidia, se sospecha de una anomalía de la diferenciación sexual 46,XY (pseudo-hermafroditismo masculino).

ESPERMOGRAMA

Es el examen de diagnóstico más importante y sencillo para iniciar el estudio de la fertilidad masculina, destacándose como un método de medición no invasivo. Brinda información sobre la severidad del factor masculino y permite analizar el efecto deletéreo de agentes terapéuticos, químicos ambientales y laborales.

Se recomienda efectuar el espermograma siguiendo los parámetros normatizados establecidos por la OMS (*WHO Laboratory manual for the Examination and processing of human semen-2010*). Cabe destacar que el concepto de “valor de referencia” (VR) se ha cambiado en este Manual por el de “low rate limit” (límites inferiores de referencia), el cual incluye al 95% de los individuos de referencia con valores superiores al percentil 5.

Componentes del espermograma básico

El espermograma provee información sobre el volumen seminal, la concentración espermática, movilidad y morfología. El análisis básico del eyaculado comprende:

- a) La descripción de las características macroscópicas y fisicoquímicas del líquido seminal (volumen, pH, aspecto, licuefacción, viscosidad).
- b) La estimación porcentual de la movilidad de los gametos.
- c) La concentración de espermatozoides.
- d) La evaluación de la vitalidad espermática.
- e) La determinación de aglutinación/agregación y de anticuerpos anti-espermáticos fijados a los gametos.
- f) El estudio citomorfológico de las células en el líquido seminal en un extendido fijado y teñido.

Consideraciones Pre-Analíticas

La fase pre-analítica del espermograma está sujeta a gran número de variables que pueden afectar los parámetros seminales y a la interpretación clínica de los resultados. Su adecuada estandarización resulta esencial para obtener resultados válidos, reproducibles y comparables entre laboratorios.

Es muy importante que se instruya al paciente sobre la correcta toma de la muestra. Las indicaciones, preferentemente escritas, deben incluir un periodo de abstinencia mayor de 2 y menor de 7 días. Es recomendable que el semen sea recolectado por masturbación (el uso de preservativos convencionales está contraindicado), teniendo la precaución de

recolectar todo el volumen del eyaculado en un recipiente de polipropileno de boca ancha (no necesariamente estéril) bien cerrado para evitar pérdidas. La muestra debe ser entregada al laboratorio dentro de la hora de obtenida y durante este lapso de tiempo debe ser mantenida a una temperatura de entre 20-37°C. El ejercicio físico intenso, la fiebre, determinados fármacos y la exposición a altas temperaturas son factores que pueden afectar la calidad del semen.

Toma de muestra para casos particulares

Si la muestra se utiliza para **análisis microbiológico**, el recipiente empleado tiene que ser estéril, debiendo cumplirse determinadas normas higiénicas para este tipo de recolección: 1) orinar, con objeto que la orina limpie la uretra de gérmenes; 2) lavar los genitales y las manos con jabón, enjuagar con abundante agua y secar; y 3) obtener la muestra como se indicó anteriormente. El análisis microbiológico está recomendado ante los siguientes hallazgos:

- Hipospermia: volumen bajo de semen y/o pH < 7.
- Hemospermia: sangre o hematíes en semen.
- Leucocitospermia: > 10⁶ leucocitos/mL semen.
- Aglutinaciones espontáneas de los espermatozoides en el eyaculado.
- Antecedentes de infecciones urogenitales o de las glándulas accesorias (posible infección de la vía seminal).
- Inclusión en programas de reproducción asistida, es fundamental que la muestra de semen no contamine los medios de cultivo enriquecidos en los cuales se incuban normalmente ovocitos y espermatozoides.

Si se produce el orgasmo pero no hay eyaculación o el eyaculado es poco, debe considerarse la posibilidad de una **eyaculación retrógrada** total o parcial. La misma se genera cuando la muestra, en lugar de seguir la vía habitual a través de la uretra, asciende hasta la vejiga atravesando el orificio urovesical. En este caso, se recolecta la **orina post-eyaculado** después del acto sexual o de la masturbación. Si ésta tiene un aspecto opalescente o nebuloso y el análisis microscópico del sedimento urinario refiere numerosos espermatozoides, se apoya el diagnóstico de eyaculación retrógrada. Es frecuente en diabéticos, en lesiones medulares, antecedente de cirugía del cuello vesical o enfermedades neurológicas.

Evaluación macroscópica del semen

- Licuefacción:

Al momento de la eyaculación, el plasma seminal proveniente de la próstata es líquido, pero una vez que entra en contacto con las secreciones de las vesículas seminales se coagula. Después de la coagulación ocurre un fenómeno de licuefacción, el cual se observa entre los 10-30 min posteriores a la eyaculación. La evaluación de la licuefacción se realiza mediante una simple observación visual. Una muestra normal es una muestra licuada, homogénea, sin grumos ni coágulos. Es considerada anormal cuando no se licúa dentro de los 60 min y este hecho debe constar en el informe.

La licuefacción es dependiente de la actividad de la próstata. Por ello, ambos procesos, la coagulación y la mucólisis, reflejan la función de las glándulas sexuales accesorias (vesículas seminales y próstata). La alteración de la mucólisis y el aumento de la viscosidad del líquido seminal se relacionan con procesos inflamatorios de las glándulas y su presencia impide el libre desplazamiento del espermatozoide.

- Viscosidad

La viscosidad o consistencia del semen se evalúa tomando la muestra con una pipeta Pasteur y permitiendo la caída libre de las gotas para observar la longitud del filamento que se forma. Una muestra normal deja caer gotas pequeñas y bien definidas o un filamento no mayor de 2 cm. Una viscosidad anormal puede afectar la determinación de parámetros como el recuento o la movilidad de los espermatozoides. Una viscosidad aumentada puede ser el resultado de la inflamación crónica de la próstata o estar asociada con la presencia de anticuerpos anti-espermatozoides. En estos casos se recomienda diluir la muestra con igual volumen de solución amortiguadora de fosfato.

- Apariencia

Un semen normal debe ser homogéneo, de color entre blanco y gris opalescente. En ocasiones puede tener un aspecto traslúcido (baja concentración de espermatozoides). El color rosado o rojo sugiere la presencia de sangre (hematospermia) por ruptura ocasional de algún vaso sanguíneo en la vía uretral o vejiga, pero cuando persiste debe descartarse un proceso neoplásico. El color amarillento puede ser indicativo de ictericia, consumo de ciertas vitaminas o leucospermia.

- Volumen

El volumen del semen está conformado especialmente por la contribución de las vesículas seminales y la próstata, con un pequeño aporte de las glándulas bulbouretrales y el epidídimo. Para la medida del volumen del eyaculado se recomienda el método de pesada, asumiendo que la densidad de la muestra de semen es 1: un gramo de semen corresponde a 1 mL. Para ello, se debe pesar el recipiente vacío con las etiquetas incluidas. Una vez obtenida la muestra se pesa el recipiente nuevamente. La diferencia calculada en gramos corresponderá al volumen de la muestra en mL. El manual de la OMS establece el límite inferior de referencia en 1,5 mL. Un volumen bajo es indicativo de las siguientes alteraciones:

- Obstrucciones de vías seminales o ausencia de conductos deferentes.
- Pérdida de alguna fracción de la muestra en el momento de la recolección. Por eso es importante interrogar al paciente en relación a posibles incidentes durante la obtención de la muestra.
- Eyaculación retrógrada.
- Deficiencia androgénica.

Un volumen alto puede ser producido por el aumento de volumen de secreción de algunas glándulas, en casos de inflamación.

- pH

El pH refleja el balance entre las diferentes secreciones, principalmente entre el pH alcalino de vesículas seminales y el ácido de la próstata. El límite inferior de referencia es de 7,2. Se mide dentro de la hora de producida la eyaculación, depositando una gota de esperma sobre una tira de papel de pH por comparación con una escala colorimétrica, y controlando el color antes de transcurridos 30 segundos.

Un pH por debajo de 7, unido a oligo o azoospermia y a un volumen bajo, sugiere la agenesia u obstrucción de vesículas seminales y/o conductos deferentes, o la presencia de infección. Esto impide la salida total o parcial de secreciones procedentes del testículo (espermatozoides) y de vesículas seminales, con un pH básico.

Evaluación microscópica del semen

Para su realización se aconseja un microscopio de contraste de fases y platina termostaticada a 37°C, ya que la temperatura afecta la motilidad de los espermatozoides. La muestra se debe homogeneizar en su recipiente original, sin formar burbujas (no se recomienda el empleo de vórtex). Se utilizan porta y cubreobjetos de dimensiones

estandarizadas, ya que debe lograrse una profundidad de campo de 20 micras para no obstaculizar el libre movimiento de los espermatozoides. La profundidad de campo es igual al volumen de muestra dividido por el área que ocupa.

Ejemplo: montar el portaobjeto con 10; 6,5 u 11 μ L de muestra de semen y cubrir con el cubreobjeto (22x22, 18x18 o 21x26). Se deja en reposo 1 min a 37°C y se observa al microscopio con el objetivo de 10x ó 40x, según corresponda.

- **Observación a 10x:** es la primera evaluación microscópica para visualizar la presencia de agregaciones, aglutinaciones y células no espermáticas.

Las **agregaciones** son adherencias de espermatozoides (inmóviles o móviles) a células no espermáticas o detritos; no son específicas y no tienen significación clínica. Por el contrario, las **aglutinaciones** son espermatozoides móviles adheridos entre sí, que sugieren la presencia de anticuerpos anti-espermatozoides. Existen diferentes tipos, en cuanto al lugar de unión y al número de espermatozoides unidos (Figura 7).

Las llamadas **células no espermáticas** del eyaculado incluyen a células epiteliales del tracto genitourinario y células redondas. La presencia de abundantes células poligonales recubiertas de bacterias sugiere que la muestra fue tomada por *coitus interruptum*.

- **Observación a 40x:** se emplea para la estimación inicial de la dilución necesaria para calcular la concentración espermática, y también para el estudio de la movilidad.

Movilidad

La medida de la movilidad espermática es muy subjetiva y a pesar de las precauciones que se puedan tomar para normalizarla, las variaciones intra- e interindividuales son numerosas. El nuevo manual de la OMS unifica tres tipos de movilidad, estableciendo el límite inferior de referencia para la movilidad total (PR+NP) en 40%, y para la movilidad progresiva en 32% (Figura 8).

- a) Espermatozoides con *movilidad progresiva* (PR): lineal o en círculos amplios, independientemente de la velocidad.
- b) Espermatozoides con *movilidad no progresiva* (NP): ausencia de traslación.
- c) Espermatozoides *inmóviles* (IM).

PARTES	GRADOS			
	1. AISLADOS <10 spz	2. MODERADO 10-50 spz	3. ALTA >50 spz	4. MUY ALTA Todos aglutinados
Cabeza-Cabeza				
Flagelo-Flagelo				
Punta-Flagelo				
Cabeza-Cabeza + Flagelo-Flagelo				
Cabeza-Flagelo				

Figura 7. Diferentes partes y grados de aglutinación entre los espermatozoides. (Laboratory Manual for the examination and processing of human semen. WHO, 2010).

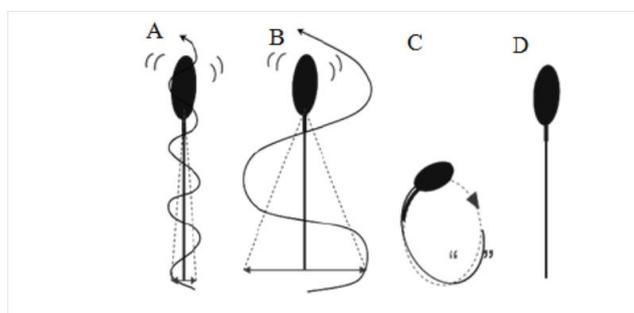


Figura 8. Tipos de movilidad de los espermatozoides. A: progresivo rápido. B: progresivo lento. C: móvil no progresivo-NP. D: inmóvil-IM. (A y B se agrupan en movilidad progresiva-PR). (Manual de laboratorio para el análisis del semen. López García y col., 2012).

Consideraciones especiales

- Se seleccionará un área definida, imaginando un cuadrado en el centro del portaobjeto que será el área de conteo (lo ideal sería disponer de un reticulado).
- Cuando se cuenta un campo se debe iniciar el conteo inmediatamente, como si los espermatozoides comenzaran a moverse en ese justo momento.
- Se debe contar siempre a una distancia de los bordes mayor de 5 mm con objeto de prevenir artefactos (Figura 9). A partir de esa distancia y conforme se acerque al borde, el

movimiento irá disminuyendo hasta encontrar sólo espermatozoides inmóviles. Al menos deben contarse 200 espermatozoides por porta.

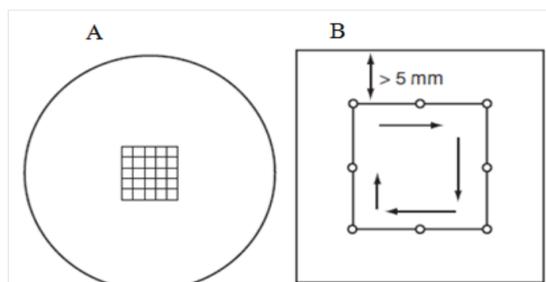


Figura 9. Procedimiento para facilitar el conteo de la movilidad. A) Simulación de una rejilla en el campo visual. B) Punto de partida y trayectoria visual del conteo. (Laboratory Manual for the examination and processing of human semen. WHO, 2010).

- Primero se cuentan los espermatozoides con PR, luego aquellos con NP y por último los IM, siguiendo el sentido de las agujas del reloj.
- Posteriormente, se evalúan los resultados utilizando el intervalo de confianza del 95% para diferencias entre los dos porcentajes que es equivalente al máximo error esperado entre dos conteos. Si el error es mayor habrá que hacer dos nuevas preparaciones y empezar de nuevo (Ver Anexo I).

Estimación del recuento

Según el número de espermatozoides que se cuenten se realizará una determinada dilución de la muestra (Figura 10). En ocasiones se puede encontrar un número muy alto de espermatozoides, para lo cual está aconsejado hacer una dilución 1/50.

La dilución se realiza con el diluyente *Weigman* (bicarbonato sódico 50 g; formol 35% 10 mL; agua csp 1L). El formol inmovilizará los espermatozoides y permitirá contarlos fácilmente.

Conteo a 40x	Dilución	μL Semen	μL Diluyente
>101	1/20	50	950
16-100	1/5	50	200
<16	1/2	50	50

Figura 10. Cálculo de la dilución necesaria según el recuento estimado.

Se utiliza la cámara de Neubauer *improved*, subdividida en dos subcámaras, que permite el conteo de la muestra por duplicado. El recuento se realiza en el cuadrante central (empleado para el conteo glóbulos rojos). El número de cuadrados pequeños en los que se cuentan los espermatozoides depende de cada muestra (Figura 11).

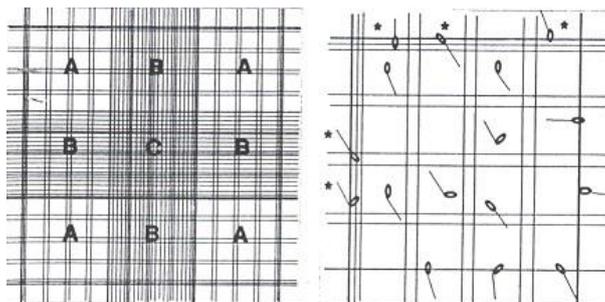


Figura 11. Detalles de la cámara Neubauer improved. Consta de dos subcámaras y cada subcámara posee 9 rejillas. La rejilla C (central) está formada por 25 cuadrados grandes; cada cuadrado grande está enmarcado por una triple línea, y se divide en 16 cuadrados pequeños (Manual de laboratorio para el análisis del semen. López García y col., 2012).

Método de recuento

- Llenar la cámara con la dilución del semen y dejar 5 min en reposo en cámara húmeda para que los espermatozoides se asienten.
- Contar en la rejilla central hasta 200 espermatozoides. En caso de que no se completen los 200, continuar el conteo en la rejilla 4. Si tampoco se completase, seguir en la 6.
- Contar siempre filas completas.
- Apuntar el número de espermatozoides y las filas contadas.
- Respecto a la triple línea que separa los cuadrados grandes, tener en cuenta que:
 - . La línea media muestra el cuadrado relevante.
 - . Contar todos los espermatozoides que estén dentro del cuadro central.
 - . Contar cuando la cabeza cae dentro.
 - . Si la cabeza está justo en la línea central, se cuentan los de la línea vertical izquierda y horizontal superior, y no se cuentan los de la vertical derecha y horizontal inferior (estos se contarán en otro recuento).

Cálculos: se calcula la suma y diferencia de los dos contajes y se compara con la gráfica que recoge el intervalo de confianza del 95% para diferencias entre dos contajes. Mayores diferencias que las tabuladas sugieren: error de dilución, de contaje, o una distribución no homogénea de espermatozoides (spz) en la dilución (Anexo II).

- *Cálculo final*

$$\text{Concentración} = \frac{N^{\circ} \text{ spz}}{N^{\circ} \text{ filas}} \times \frac{1 \text{ fila}}{20 \text{ nl}} \times \text{Factor Dilución} = C \times 10^6 \text{ spz/ml}$$

- *Expresión del resultado del recuento*

El resultado final se informa con dos cifras significativas: si es menor de 10 se da el número entero con un decimal; si es igual o mayor de 10 sólo se da el número entero.

El manual de la OMS establece el valor conocido como límite inferior de referencia para la concentración y para el conteo total de espermatozoides:

- Número total: 39 millones de espermatozoides/eyaculado.
- Concentración: 15 millones de espermatozoides/mL.

- *Criptozoospermia*: No hay espermatozoides en el eyaculado, pero sí son observados en el sedimento luego de una centrifugación de la muestra a máxima velocidad (3000g-15min). De esta manera, un 30% de las muestras inicialmente categorizadas como azoospermia presentan algunos pocos espermatozoides, teniendo en hoy en cuenta un pronóstico totalmente distinto.

- *Azoospermia*: ausencia de espermatozoides, incluso tras usar un método de análisis validado.

Vitalidad

Es útil para conocer si los espermatozoides inmóviles están vivos o muertos. Se realiza en forma rutinaria en todas las muestras y es obligatoria cuando la movilidad progresiva es menor del 40%. El porcentaje de espermatozoides viables siempre debe ser igual o superior al de espermatozoides móviles.

Fundamento de las técnicas para la vitalidad

- Colorantes supravitales: Eosina y Eosina/Nigrosina.

Estos colorantes no pueden atravesar una membrana plasmática estructuralmente intacta, de tal forma que un espermatozoide vivo será aquel cuyo núcleo no se tiñe de rojo. En el caso de que la membrana posea un daño estructural, será atravesada por los colorantes, y el espermatozoide se observará teñido color rojo. *Técnica* (Ver Anexo III).

- Test hipoosmótico

Se fundamenta en el estudio la funcionalidad de la membrana plasmática en un medio hipoosmolar: cuando la membrana está funcionalmente activa, no permite la salida de sustancias osmóticamente activas y compensa el desequilibrio osmótico captando agua, así la membrana del espermatozoide se hincha y el flagelo se riza. En contraste, cuando la

membrana está alterada permite la salida de sustancias con propiedades osmóticas, considerándose al espermatozoide como no funcional (Figura 12). *Técnica* (Ver Anexo IV).

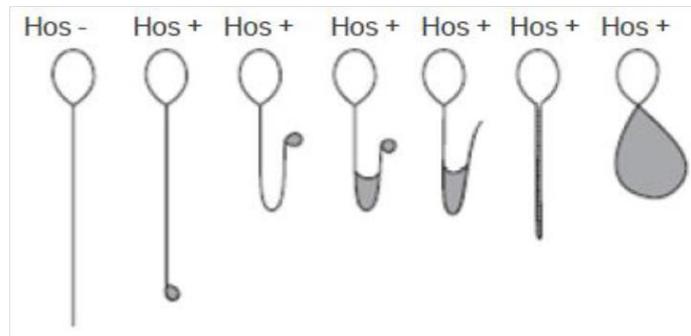


Figura 12. Test de vitalidad hiposmótica. El Hos (-) está intacto, muerto; los Hos (+) que tienen el flagelo encogido en distinto grado por hinchamiento, están vivos. (Laboratory Manual for the examination and processing of human semen. WHO, 2010).

Morfología

La clasificación de normalidad de la OMS se basa en considerar un espermatozoide normal al integrante de una subpoblación de espermatozoides potencialmente fertilizadores seleccionados naturalmente en el moco cervical.

Técnica

- A partir de una gota de semen, realizar un extendido sobre un portaobjetos nuevo, por duplicado (Figura 13).
- Secar al aire los extendidos
- Teñir con coloración de Papanicolaou, Shorr o Diff-Quik.
- Observar al microscopio a 100x, contando al menos 200 spz/porta.

Si la muestra es de baja concentración (< 2 millones/mL):

- Centrifugar a 600g-10 min.
- Resuspender el pellet
- Depositar 5-10 μ L de muestra bien homogenizada en el extremo del portaobjetos y realizar un extendido (en caso de centrifugar la muestra se debe informar ya que esta manipulación puede afectar a los resultados de la morfología).

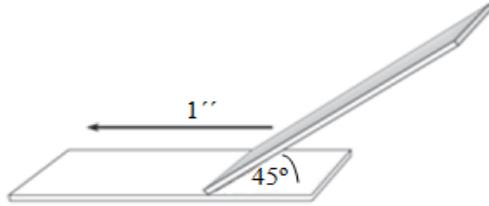


Figura 13. Técnica para realizar una extensión de semen. En muestras de viscosidad normal, se utiliza un porta a 45° para el arrastre de una gota en un segundo.

Interpretación de la morfología

Un espermatozoide debe cumplir los siguientes criterios estrictos (*Kruger*) en cada una de sus partes para considerarse normal (Figura 14):

- a) Cabeza perfectamente oval y contorno regular (4-5 μm de largo y 2,5-3,5 μm de ancho) y una relación largo: ancho entre 1,5 y 1,75.
- b) La región acrosómica debe ocupar un 40-70% de la zona anterior de la cabeza.
- c) Cola única, de 45 μm de longitud no enrollada, rota ni doblada, con inserción centrada en la cabeza siguiendo el eje.
- d) Pieza intermedia de 1 μm de ancho y 7-8 μm de largo.
- e) Gotas citoplasmáticas no mayores que un tercio del tamaño de la cabeza.
- f) Ausencia de vacuolas en la cabeza.

La OMS establece un valor para el límite inferior de referencia para la morfología espermática del 4%.

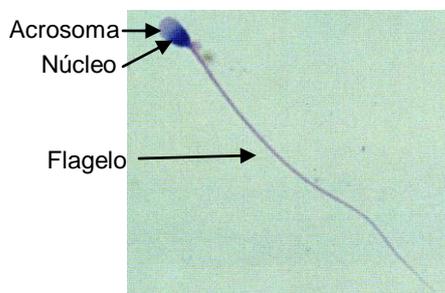


Figura 14. Espermatozoide normal. Tinción May Grunwald Giemsa x 400. Espermograma. Luis Sarabia Villar, según criterios de la OMS, 2010. <http://pp.centramerica.com>

Todos los espermatozoides observados al microscopio son clasificados como normales o anormales, y los anormales son sub-clasificados en anomalía de cabeza, pieza intermedia y cola (Figura 15).

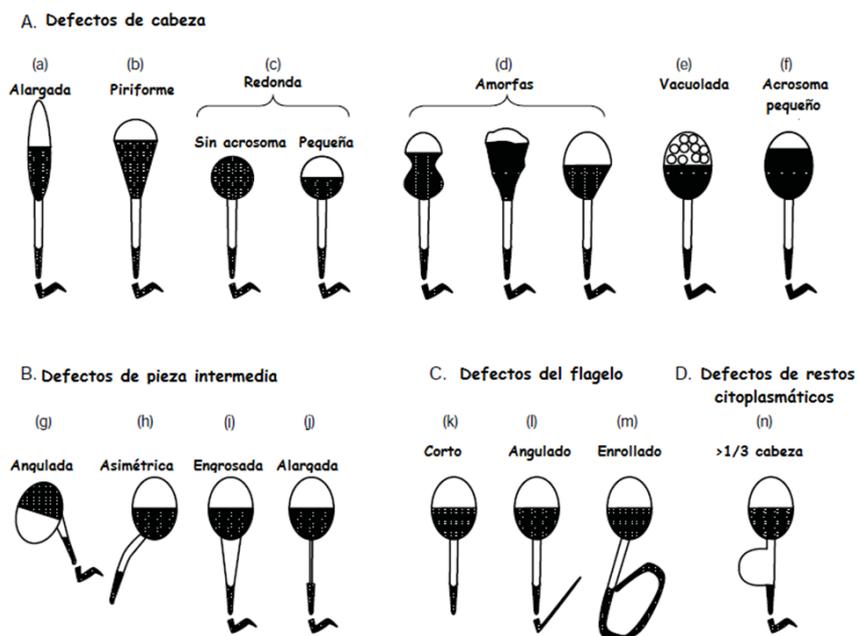


Figura 15. Clasificación de los defectos morfológicos de los espermatozoides. (Laboratory Manual for the examination and processing of human semen. WHO, 2010).

Otros elementos celulares

En las muestras coloreadas se ponen de manifiesto otros tipos celulares además de los espermatozoides como son las células epiteliales y las células redondas (terminología que agrupa a células germinales inmaduras y leucocitos). Diferenciar las células epiteliales de las redondas es relativamente fácil, ya que difieren morfológicamente. Para distinguir las células de la espermatogénesis de los leucocitos es necesario recurrir a pruebas específicas como las de actividad de peroxidasa o a anticuerpos frente al antígeno CD45.

Como procedimiento estándar se debería hacer de forma rutinaria el conteo de células redondas y si el número supera el millón por mL, debería investigarse la presencia de leucocitos por alguno de los métodos establecidos. La forma más adecuada para calcular la concentración de células redondas es usando las extensiones teñidas para la realización de la morfología espermática mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Concentración spz} \times \text{N}^{\circ} \text{ células redondas}}{400} = \text{millones/ml}$$

NOTA: Si se cuentan menos de 25 células redondas, el error es mayor a 20, y el resultado se debería acompañar con el comentario de que el número de células redondas contadas es demasiado pequeño para poder asegurar esa concentración.

Un número elevado de leucocitos en el eyaculado (leucocitospermia) sugiere la presencia de inflamación o infección en las glándulas sexuales accesorias y se asocia con una mala calidad del semen. Los leucocitos producen un ataque oxidativo alterando la movilidad de los espermatozoides y la integridad del DNA, por lo que su número nunca debe superar el millón/mL.

Las peroxidases del leucocito polimorfonuclear reaccionan con el agua oxigenada de la solución de trabajo desprendiendo oxígeno, que reacciona a su vez con la ortotoluidina, oxidándola y formando un precipitado marrón. No se tiñen leucocitos polimorfonucleares que estén activados y hayan liberado sus gránulos de peroxidasa, así como tampoco linfocitos, macrófagos o monocitos, ya que no contienen gránulos de peroxidasa (Anexo V).

Células de la espermatogénesis inmaduras

Generalmente en semen se encuentran: espermátides redondas, espermatoцитos, y raramente espermatogonias. Un recuento alto de este tipo de células indicaría desórdenes en la espermatogénesis como resultado de anomalías en los túbulos seminíferos, varicocele u otra alteración testicular. Las espermátides y espermatoцитos se pueden diferenciar de los leucocitos mediante la tinción de Papanicolau en función de la coloración adquirida, forma y tamaño del núcleo. Sin embargo, cuando los leucocitos degeneran en procesos inflamatorios resulta difícil diferenciarlos mediante esta técnica.

Anticuerpos anti-espermatozoides (AAE)

Los AAE en el semen usualmente son de tipo IgA e IgG, y pueden inducir la aglutinación, inmovilización o incluso lisis de los espermatozoides. La alteración funcional más grave se produce cuando se fijan a nivel de la cabeza o de la pieza intermedia, interfiriendo con los procesos de capacitación espermática. Si se fijan en el flagelo, se producirán alteraciones de la movilidad. Los AAE de tipo IgA serían los de mayor relevancia clínica. Ambos tipos de anticuerpos pueden ser detectados en células espermáticas (test directos) así como en líquido seminal, suero o fluido cervical (test indirectos).

Una autoinmunización antiesperma debe sospecharse en todas aquellas situaciones asociadas a la ruptura de la barrera hemato-testicular que permitan el paso de antígenos espermáticos a la sangre: intervención quirúrgica, traumatismo, obstrucciones o infección de la esfera genital. Sin embargo, en muchas ocasiones no se hallan antecedentes evocadores. La OMS señala la obligatoriedad de realizar el estudio de AAE en todos los seminogramas, siendo particularmente importante frente a la presencia de aglutinaciones o movilidad baja.

Las técnicas para la detección de AAE se basan en reacciones de aglutinación con esferas recubiertas de anticuerpo y requieren de la presencia de al menos 200 espermatozoides móviles disponibles en cada preparado.

• M.A.R. Test directo (*Mixed Antiglobulin Reaction*)

Para identificar la presencia de anticuerpos fijados en espermatozoides se añaden esferas de látex que llevan adosadas inmunoglobulinas, del isotipo G o A. Posteriormente, se incorporan anticuerpos antiinmunoglobulinas, frente a los del isotipo G o A. Si hay AAE fijados, formarán un complejo de unión con éstos y con las esferas de látex unidas a inmunoglobulinas. Por lo tanto el espermatozoide fijará las esferas plásticas sólo si tiene anticuerpos adheridos (Anexo V).

• Inmunocuentas-Test directo (*Direct Immunobead Test*)

Consume más tiempo que la técnica anterior, pero permite la detección de anticuerpos sobre espermatozoides que han sido lavados previamente para evitar posibles interferencias del líquido seminal. Los AAE se pondrán en evidencia en caso de existir porque se unirán a ellos antiinmunoglobulinas G o A fijados a las esferas de poliacrilamida y por tanto se observan los espermatozoides móviles con las esferas adheridas.

Interpretación de las reacciones de aglutinación

- Se considera un espermatozoide positivo, con anticuerpos en su superficie, si es móvil y tiene esferas adheridas (si no hubiesen anticuerpos en las membranas de los espermatozoides móviles, éstos nadarán libremente entre las partículas).
- Identificar el lugar de unión: cabeza, pieza intermedia o flagelo (ignorar si las esferas están unidas en la punta del flagelo).
- Calcular el porcentaje de cada preparación.

Existe un factor inmunológico cuando más del 50% de los espermatozoides móviles de un eyaculado tienen adheridos AAE. En casos positivos se estudiarán: los isotipos presentes, la intensidad de respuesta y la localización del anticuerpo.

Bioquímica seminal

Es posible localizar una afección del tracto genital en función de la disminución de un determinado marcador, teniendo en cuenta que:

- Cada glándula posee su marcador específico (Figura 16).
- Si una glándula está afectada, hay disminución de la concentración de su marcador.

- Si hay obstrucción al nivel del tracto, las secreciones de las glándulas situadas más arriba no se podrán evacuar, observándose por ende una disminución del marcador correspondiente.

Las indicaciones más frecuentes de la bioquímica seminal son: azo u oligozoospermia, volumen disminuido, infección genital, alteraciones de la movilidad, viscosidad anormal, etc.

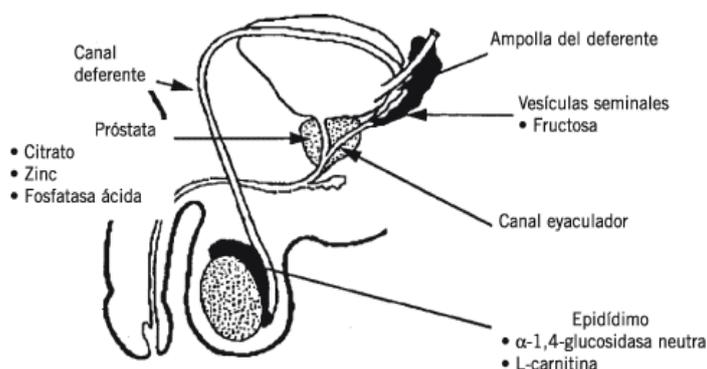


Figura 16. Marcadores bioquímicos del conducto seminal. (Poirot C y Cherruau B. Infertilidad masculina. Aspectos clínicos e investigaciones biológicas. Acta Bioquím Clín Latinoam 2005; 39: 225-241.

Marcadores de la próstata (1ª Fracción del eyaculado)

- **Citrato:** es el anión principal y actúa como quelante de cationes. Existe una estrecha correlación entre las concentraciones de zinc y citrato.
- **Zinc:** es un catión específico del plasma seminal dotado de poder bactericida. Responsable de la estabilidad y condensación de la cromatina espermática al favorecer el mantenimiento de la estructura cuaternaria de la cromatina.
- **Fosfatasa ácida:** es una enzima activa en la desfosforilación de los ésteres ortofosfóricos. La isoenzima hallada en el espermatozoide es específica de la próstata.

Marcadores del epidídimo (1ª Fracción del eyaculado)

- **L-carnitina:** se encuentra en el espermatozoide bajo la forma de L-carnitina y acetilcarnitina. Desempeña un papel en la adquisición de la movilidad progresiva y es un transportador de ácidos grasos. Es el marcador del cuerpo y la cola del epidídimo, pero no es secretada por las células de la cabeza. Existe una pequeña secreción extra-epididimaria del orden del 15 al 20%.
- **α1,4 glucosidasa neutra:** es una hidrolasa que está presente en dos formas en el espermatozoide: una forma ácida de origen prostático y una neutra epididimaria, donde

desempeñaría un papel en la maduración de los espermatozoides. Esta disminuida en las obstrucciones epididimarias y cuando la concentración de To es baja.

Marcador de las vesículas seminales (2ª Fracción del eyaculado)

- **Fructosa:** es el marcador más específico de las vesículas seminales. Su secreción es andrógeno-dependiente y suele estar disminuida en procesos inflamatorios o degenerativos. En casos de obstrucción distal de la vía seminal o hipoplasia congénita de las vesículas (que a menudo acompaña a la agenesia de los conductos deferentes), la concentración de fructosa es baja. La fructosa es sintetizada en las células epiteliales de las vesículas seminales, por conversión a partir de la glucosa sanguínea. La diabetes conlleva un falso aumento de la fructosa seminal y puede disfrazar una disminución de este parámetro.

Las dosificaciones de L-carnitina, fructosa, citrato y fosfatasa ácida están comercializadas y son automatizables.

Las **azoospermias** (ausencia de espermatozoides en 2 espermogramas practicados con 2 meses de intervalo) pueden tener un origen:

- **Secretor, no obstructivo:** no hay espermatozoides por falta de funcionalidad de la espermatogénesis.
- **Excretor, obstructivo, con función secretora conservada:** hay producción de espermatozoides, pero existe una imposibilidad de salida debido a una obstrucción bilateral en las vías seminales. Las azoospermias excretoras pueden ser congénitas o adquiridas.

La cuantificación de FSH plasmática y de los marcadores bioquímicos, la medida del volumen y el pH del plasma seminal, son esenciales para orientar el diagnóstico diferencial de azoospermia (Figura 17).

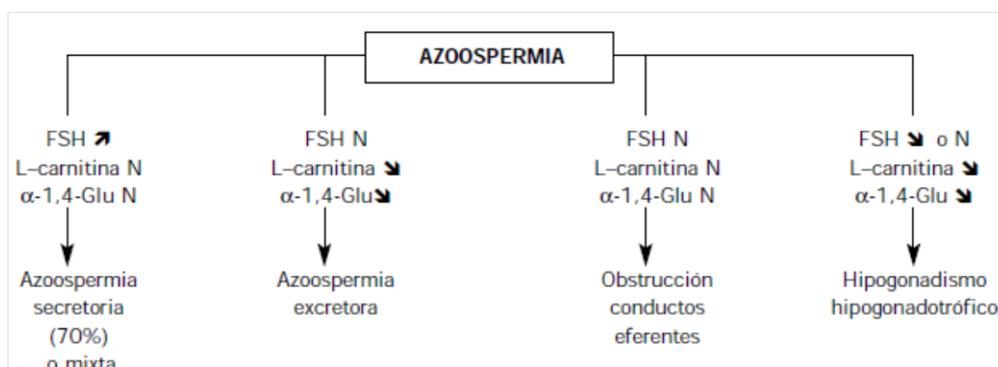


Figura 17. Marcadores bioquímicos del epidídimo en las azoospermias (Poirot C y Cherruau B. Infertilidad masculina. Aspectos clínicos e investigaciones biológicas. Acta Bioquím Clín Latinoam 2005; 39: 225-41).

- Si la FSH está disminuida, puede tratarse de un hipogonadismo hipogonadotrófico. La anomalía es de origen pretesticular, la To estaría también disminuida y los marcadores bioquímicos serían normales o bajos.
- Si la FSH está aumentada con L-carnitina y α 1,4 glucosidasa normales, el origen es testicular y se trata de una azoospermia secretora. La elevación de la concentración de FSH es proporcional al grado de afección testicular. Las etiologías son numerosas: síndrome de Klinefelter, defectos de maduración de la línea germinal, criptorquidia, secuelas infecciosas, lesiones traumáticas o térmicas. Ciertas azoospermias secretoras tienen, sin embargo, una tasa de FSH normal que complica su diagnóstico.
- Si el FSH es normal con L-carnitina y α 1,4 glucosidasa baja, se denomina azoospermia excretora. Es debida a una obstrucción o una agenesia del tracto genital. La cuantificación de otros marcadores (fructosa) permitirá situar el nivel de esta obstrucción: si los niveles de fructosa son normales, se puede sospechar una oclusión del epidídimo o deferente, mientras que si la fructosa es baja con un volumen débil de esperma y un pH ácido, se puede sugerir una oclusión de los conductos eyaculadores o una agenesia vesículo-deferencial. (Figura 18)

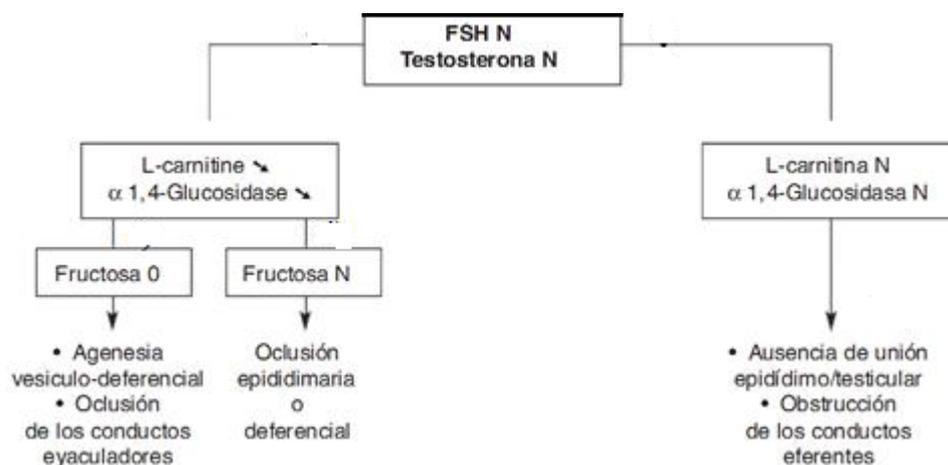


Figura 18. Marcador bioquímico en las azoospermias excretoras u obstructivas (Poirot C y Cherruau B. Infertilidad masculina. Aspectos clínicos e investigaciones biológicas. Acta Bioquím Clín Latinoam 2005; 39: 225-41).

Pruebas de interacción moco cervical-esperma

Estas pruebas permiten apreciar la aptitud de los espermatozoides para migrar en el moco y además, son esenciales en la evaluación de la calidad funcional de los espermatozoides.

A) Test postcoital (Prueba de Hühner)

Consiste en determinar la presencia de espermatozoides móviles en el moco cervical horas después del coito. Provee información relevante acerca del significado de la presencia de AAE tanto en el hombre como en la mujer. La prueba debe ser realizada en el periodo pre-ovulatorio, ya que los estrógenos influyen las características del moco cervical y por ende su capacidad de interacción con los espermatozoides.

Interpretación

- La prueba es negativa si no se hallan espermatozoides.
- La presencia de espermatozoides con PR en el moco endocervical entre 9 a 14 h después de llevada a cabo la relación sexual descarta a los factores cervicales y a los AAE como posibles causantes de la infertilidad.
- Si se observan espermatozoides con NP y movimiento tipo "*shaking*" (los espermatozoides se mueven sin poder trasladarse, como si estuvieran aferrados por sus colas), sugiere la presencia de AAE en el semen o en el moco cervical.

En caso de negatividad de la prueba por alteraciones del moco, la misma debe repetirse cuando éste sea óptimo. Si el test es negativo en presencia de un moco de buena calidad, se solicita una prueba de penetración cruzada *in vitro*.

B) Prueba de penetración cruzada

Consiste en poner en contacto *in vitro* el moco de la mujer con el esperma de su pareja y evaluar el grado de movilidad y penetración de los espermatozoides en la interfase moco-esperma. Ante resultados anormales, es conveniente la evaluación cruzada empleando semen y moco cervical controles para identificar el origen del problema.

Interpretación

- Si los espermatozoides probados no penetran ni en el moco de su pareja, ni en el moco testigo, mientras que el esperma testigo sí penetra en el moco testigo, se trata de un problema espermático.
- Si al contrario, el esperma probado penetra en el moco testigo y no en el moco probado y el esperma testigo no penetra tampoco en el moco probado, se trata de un problema de moco endocervical.

Es conveniente medir previa realización de esta prueba la medición del pH del moco endocervical, el cual debe encontrarse entre 7 y 8,5 para asegurar la migración y supervivencia de los espermatozoides.

Análisis del movimiento de los espermatozoides asistido por ordenador

Los Sistemas Computarizados de Análisis de Semen conocidos como CASA (*computer aided sperm analysis*), son instrumentos que miden la movilidad y la cinética espermática e incluso de estimar su concentración mediante el empleo de una cámara de video acoplada a la óptica de un microscopio de contraste de fases. La ventaja que aportan estos sistemas objetivos es su alta precisión y la posibilidad de proveer datos cuantitativos de parámetros cinéticos del espermatozoide que escapan al ojo humano (Figura 19). Un espermatozoide presenta habitualmente un movimiento sinusoidal y su trayecto se caracteriza por los siguientes parámetros:

- Amplitud del giro lateral de la cabeza respecto a la pieza intermedia (ALH).
- Velocidad de progresión lineal en $\mu\text{m/s}$ (VSL): velocidad media del desplazamiento según una línea recta trazada entre la primera y la última posición detectada de la cabeza.
- Velocidad curvilínea en $\mu\text{m/s}$ (VCL): velocidad media del desplazamiento de la cabeza a lo largo de su trayectoria real, tal como se ve en dos dimensiones en el microscopio.
- Velocidad según el trayecto medio en $\mu\text{m/s}$ (VAP): velocidad media de desplazamiento de la cabeza siguiendo el trayecto medio.
- Linealidad del trayecto: relación VSL/VCL.
- Media del desplazamiento angular en grados (MAD). La media de los valores del ángulo de giro instantáneo de la cabeza de los espermatozoides a lo largo de su trayectoria curvilínea.

Los datos aportados esta nueva metodología están siendo evaluados para su aplicación en el diagnóstico clínico andrológico. También permite llevar un registro de las filmaciones de las muestras archivadas por el *software* del equipo, que son de utilidad para futuras re-evaluaciones y/o estudios de comparación en diferentes situaciones clínicas.

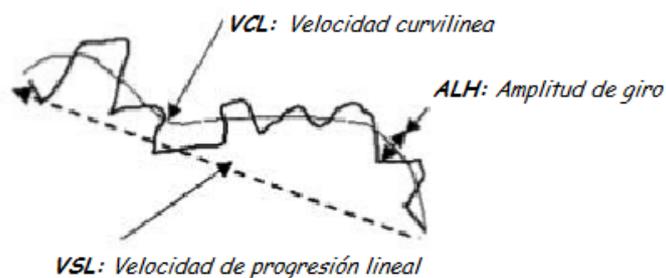


Figura 19. Trayectoria del espermatozoide. (Poirot C y Cherruau B. Infertilidad masculina. Aspectos clínicos e investigaciones biológicas. Acta Bioquím Clín Latinoam 2005; 39 (2): 225-41).

Causas de variabilidad y medidas de control de la calidad

El estudio del semen se encuentra estandarizado por normativas de la OMS y debe ser sometido a controles de calidad internos y programas de evaluación externa, cumplimentando con los requisitos de calidad propuestos. Sin embargo, no existen patrones o estándares internacionales de referencia para ninguno de sus parámetros.

La variabilidad observada en los principales parámetros del espermograma se debe a la combinación del error analítico y a la variabilidad biológica. Los métodos usados son básicamente manuales, asociados a una subjetividad importante y en muchos laboratorios se hallan poco estandarizados. Además, existe una amplia variabilidad biológica intraindividual e interindividual en la mayoría de las variables seminales, por lo que resulta imposible caracterizar a un individuo con un único espermograma.

a) A nivel intra-individual es deseable que todas las mediciones que realiza un observador se hagan por duplicado y, si las diferencias superan el error de contaje, se rechace la medición comenzando el procedimiento nuevamente.

b) A nivel de observador, cuando entra a formar parte de un equipo de trabajo, deberá ser instruido y realizará mediciones en paralelo hasta conseguir que no existan desviaciones sistemáticas con respecto a un observador experimentado.

c) Como en todos los ámbitos del laboratorio clínico, debe realizarse un seguimiento continuo de los resultados que se ofrecen mediante el procesamiento de especímenes conocidos. Para el control de calidad de la concentración espermática los materiales de control pueden ser semen congelado o suspensión de espermatozoides en formol.

d) A partir de las muestras de pacientes se pueden realizar otras técnicas de control de calidad interno, como por ejemplo calcular y dibujar un gráfico tipo Levy-Jennings con la media mensual (o bimensual en función del número de muestras analizadas) y su

desviación estándar, de tal modo que cuando los resultados a estudiar caen fuera de dos desviaciones estándar se investigue las causas que lo originan.

e) Los programas de control externo evalúan como mínimo movilidad, morfología y recuento espermático. El estudio comprende movilidades grabadas en soporte digital, con imágenes tomadas en microscopio de luz de campo claro y/o imágenes de contraste de fase grabadas por CASA, fotomicrografías de extendidos de semen coloreados y muestras de una suspensión de espermatozoides para recuento espermático.

Resumen de los Límites de Referencia inferiores (percentiles 5 y sus intervalos de confianza del 95%) para las características del semen.

Parámetro	VR inferior
Volumen seminal (mL)	1,5 (1,4-1,7)
Número total de espermatozoides (10^6 /eyaculado)	39 (33-46)
Concentración de espermatozoides (10^6 /mL)	15 (12-16)
Movilidad total (PR+NP, %)	40 (38-42)
Movilidad progresiva (PR, %)	32 (31-34)
Vitalidad (espermatozoides vivos, %)	58 (55-63)
Morfología de los espermatozoides (formas normales, %)	4 (3-4)
Otros valores umbral de consenso	
pH	> 7,2
Leucocitos positivos para peroxidasa (10^6 /mL)	< 1,0
Prueba MAR (espermatozoides móviles con partículas adheridas, %)	< 50
Análisis de inmunocuentas (espermatozoides móviles con microcuentas adheridas, %)	< 50
Cinc seminal (μ mol/eyaculado)	> 2,4
Fructosa seminal (μ mol/eyaculado)	> 13
Glucosidasa neutra seminal (mU/eyaculado)	> 20

ANEXOS

Anexo I- Movilidad

Diferencias aceptables entre dos porcentajes, calculados a partir de dos recuentos de 200 espermatozoides (400 espermatozoides).

MEDIA (%)	DIFERENCIA ACEPTABLE	MEDIA (%)	DIFERENCIA ACEPTABLE
0	1	66-76	9
1	2	77-83	8
2	3	84-88	7
3-4	4	89-92	6
5-7	5	93-95	5
8-11	6	96-97	4
12-16	7	98	3
17-23	8	99	2
24-34	9	100	1
35-65	10		

Ejemplo de la valoración de la Movilidad:

	%PR	%NP	%IM
1ª PREPARACIÓN	28	22	50
2ª PREPARACIÓN	35	29	36
MEDIA	32	25	43
DIFERENCIA	7	7	14
VALORACION	✓	✓	NO VALIDO

La media de los espermatozoides inmóviles ente 50 y 36 es de 43% y la diferencia es de 14. Se puede apreciar que la diferencia obtenida supera la diferencia máxima admisible que es 10, por tanto, el resultado no es válido y se debe repetir todo el proceso.

Anexo II- Estimación del recuento espermático

Diferencias aceptables entre dos porcentajes, calculados a partir de dos recuentos de 200 espermatozoides (400 espermatozoides).

SUMA	DIFERENCIA ACEPTABLE	SUMA	DIFERENCIA ACEPTABLE
144-156	24	329-346	36
157-169	25	347-366	37
170-182	26	367-385	38
1083-196	27	386-406	39
197-211	28	407-426	40
212-226	29	427-448	41
227-242	30	449-470	42
243-258	31	471-492	43
259-274	32	493-515	44
275-292	33	516-538	45
293-309	34	539-562	46
310-328	35	563-587	47

Si se han contado 400 espermatozoides totales, el límite máximo de diferencia entre los dos contajes es de 39, si la diferencia superara el límite permitido habría que empezar desde el principio, preparando dos nuevas diluciones y realizando un nuevo doble contaje.

Anexo III- Técnica Test de Eosina y Eosina/Nigrosina

Solución de Eosina:

Eosina Y 0,67 g
NaCl 0,90 g
Agua 100 mL

Disolver la Eosina y ClNa en agua purificada y calentada.

Procedimiento:

- Mezclar 5 µl de semen con 5 µL de la solución de eosina, en un portaobjetos (hacer por duplicado).
- Cubrir con un cubreobjetos 22x22.
- Dejar la preparación 30 segundos en reposo. Observar en microscopio de contraste de fases a 40x.
- Contar al menos 200 espermatozoides /porta.

Solución Eosina/Nigrosina:

Nigrosina 10 g
Solución Eosina 100 mL

Mezclar la Nigrosina con la solución Eosina, hervir, filtrar, enfriar y guardar en bote de vidrio.

Procedimiento:

- Mezclar 50 µL de semen y 50 µL de solución Eosina/Nigrosina, y esperar 30 segundos.
- Realizar una extensión sobre portaobjetos (por duplicado).
- Secar las muestras y observar las extensiones a 100x. Contar al menos 200 espermatozoides/extensión.

Anexo IV- Técnica Test hipoosmótico

- Dispensar en un tubo 1 mL de la solución hipoosmótica (citrato sódico y fructosa en agua) y 100 µL de semen. Mezclar y se dejan 30 min en estufa a 37°C.
- Depositar una gota de la preparación entre porta y cubreobjetos (por duplicado).
- Observar en microscopio de contraste de fases a 40x. Contar al menos 200 espermatozoides/preparación.

Anexo V- Técnica de la peroxidasa

Soluciones:

a) NH₄Cl 250 g/L
b) Na₂EDTA 50 g/L en PBS
c) Orto-toluidina 0,25 mg/mL
d) H₂O₂ 30%

Con estas cuatro soluciones se prepara la Solución de trabajo: 1 mL de la Solución a), 1 mL de la Solución b), 9 mL de la Solución c) y 1 gota de la Solución d).

- Mezclar 0,9 mL de la Solución de trabajo con 0,1 mL de semen (realizar por duplicado).
- Agitar 2 min. Dejar 20-30 min a temperatura ambiente.
- Agitar nuevamente y proceder al recuento en cámara de Neubauer, de forma similar a la concentración espermática. Al menos contar 200 células peroxidasa positivas en cada subcámara,

para lo cual se contarán el número de rejillas completas necesarias. Se considera anómala la presencia de más de 1×10^6 leucocitos/mL.

$$\text{Concentración} = \frac{N^{\circ} \text{ PMN}}{N^{\circ} \text{ rejillas}} \times \frac{1 \text{ rejilla}}{100 \text{ nl}} \times 10 = C \times 10^6 \text{ PMN/ml}$$

Anexo VI- M.A.R. Test directo

En portaobjetos y por duplicado, colocar:

- 3,5 μ L de semen completo y 3,5 μ L de esferas revestidas con IgG (o IgA humana). Mezclar.
- Añadir 3,5 μ L de antisuero frente a IgG (o IgA humana). Mezclar y cubrir con cubre 22x22.
- Mantener 3 min en cámara húmeda.
- Realizar la observación microscópica a 400x utilizando contraste de fases. Contar al menos 200 espermatozoides en cada portaobjetos. Si el 100% de los espermatozoides móviles presentan esferas unidas no hacer más observaciones.
- Realizar una segunda observación a los 10 min. Valorar el porcentaje de los espermatozoides móviles con esferas unidas. Si los espermatozoides se hubieran vuelto inmóviles a los 10 min considerar como válido.

ACTIVIDAD PRÁCTICA

- 1) ¿Cuáles son las pruebas de laboratorio para evaluar la función testicular?
- 2) ¿Cuándo debe efectuarse la toma de muestra en el laboratorio para la medición de esteroides? Indique: número de muestras, momento del día y metodología.
- 3) ¿Qué datos deberían acompañar a una muestra para espermograma que arriba al laboratorio? ¿Cuántas muestras son necesarias para confirmar un diagnóstico y por qué?

Caso 1

Varón de 3 años y 7 meses de edad, que es derivado a la consulta de Endocrinología Pediátrica por presentar desarrollo de caracteres secundarios durante los últimos 10 meses. Como único antecedente de importancia la madre refiere que el progenitor realiza desde hace un año tratamiento tópico con To en zonas expuestas de la piel por cáncer testicular. La exploración física mostró los siguientes hallazgos: peso de 17,9 kg (percentil 75), talla de 104,6 cm (percentil 75), voz grave, pene puberal de 8 cm de longitud, pigmentación escrotal aumentada, testes en bolsas con volumen de 1 cc, pubarquia II (según estadios de Tanner), y axilarquia incipiente. Entre las pruebas complementarias solicitadas se destacan: edad ósea de 6 años; ecografía abdominal sin evidencia de masas suprarrenales ni lesiones ocupantes de espacio hepáticas; ecografía testicular, con ambos testículos de tamaño y patrón ecográfico normales y sin masas. Laboratorio: To 1,1 ng/mL (VR para su edad: < 0,5 ng/mL); DHEA-S 50 ng/mL (40-1.910 ng/mL), FSH 0,21 mUI/mL (0,3-1,5 mUI/mL), LH de 0,15 mUI/mL (< 1,3 mUI/mL), estradiol de 5 pg/mL (< 11 pg/mL), AFP y β -hCG (negativas).

- a) ¿Hacia qué patología orienta la anamnesis de este paciente?
- b) ¿Cuál es el objeto de la determinación de marcadores tumorales?
- c) ¿Cómo explica los resultados de las pruebas de laboratorio?
- d) ¿Por qué la edad ósea del paciente no coincide con la edad cronológica?

Caso 2

Varón de 38 años de edad que concurre al Servicio de Endocrinología junto con su pareja por dificultades para lograr un embarazo. En el interrogatorio refiere tener baja libido y no lograr buenas erecciones, además de dificultades para la percepción de olores. Como antecedentes familiares, un tío materno no pudo tener hijos. Examen físico: talla: 183 cm; peso: 71 kg; volumen testicular (medido con orquidómetro de Prader) 6 mL (VR: 15-25 mL); consistencia testicular disminuida, pene pequeño, escaso vello axilar y pubiano, poco desarrollo muscular. *Laboratorio hormonal:* LH: 0,7 mUI/mL (1,1-9 mUI/mL); FSH: 1,1

mUI/mL (1,5-7 mUI/mL); To: 0,9 ng/ml (3-9 ng/mL); SHBG: 45 nmol/L (11-70 nmol/L).

Espermograma:

Examen macroscópico: Volumen 0,8 mL; Viscosidad normal; Color blanquecino, con aspecto traslúcido; Licuefacción: 60 minutos, total; pH: 8.

Examen microscópico: Recuento de espermatozoides: azoospermia post-centrifugación.

Recuento de células peroxidasa positivas: $0,4 \times 10^6$ /mL.

- a) ¿Encuentra alguna alteración en los datos aportados por el espermograma?
- b) ¿Hacia qué patología orientan los datos clínicos y del laboratorio?
- c) ¿Es necesaria la determinación de TBio en este caso? ¿Pór qué?

Caso 3

Paciente de 30 años que consulta al Servicio de Endocrinología, por agrandamiento mamario bilateral de 4 años evolución. Niega afectación de su libido y potencia sexual. No fuma. Toma 2 litros de cerveza por semana. Niega medicación o droga alguna, antecedentes de traumatismo testicular, parotiditis/orquitis o enfermedades venéreas. Examen físico: 77 kg de peso y 1,90 m de altura (IMC: 21,4), distribución pilosa androide normal, tiroides normal, ginecomastia bilateral simétrica, con protusión areolar. Semiología gonadal: Testículo derecho (Prader 25) con induración irregular en polo superior de unos 2,5 cm de diámetro, indoloro a la palpación. Testículo izquierdo (Prader 20) de caracteres normales. Varicocele izquierdo grado III. Laboratorio: PRL 7,2 ng/dL (3-17 ng/dL); LH < 1,1 UI/mL (1,1-9 mUI/mL), FSH < 1,5 UI/mL (1,5-7 mUI/mL); To 1,7 ng/mL (3-9 ng/mL); E2 150 pg/mL (VR < 50 pg/mL). AFP, CEA y β hCG negativas. Eco-Doppler Color testicular: "Imagen hipoecoica en tercio superior de 26 x 17 x 21 mm, compatible con lesión orgánica". *Espermograma:* Vol: 5 mL, pH: 7,5; concentración: 15.000.000/mL, Motilidad de 40% entre grados A y B, y formas normales: 30%. Bioquímica espermática normal.

- a) ¿Hacia qué patología orientan los datos clínicos y del laboratorio?
- b) ¿Existen alteraciones del espermograma?
- c) ¿Cómo justificaría la presencia de ginecomastia en el paciente?

Caso 4

Un varón de 13 años es evaluado por dolor torácico, enfermedad pulmonar crónica e intolerancia a la glucosa. Presenta fatiga, disminución de la masa y del tono muscular, con aumento del tejido adiposo. El paciente está en sexto grado actualmente, repitió el primer grado por lentitud en el aprendizaje y mal desempeño escolar. Al examen clínico presenta una estatura de 163 cm (mayor a la que corresponde a su edad cronológica). El volumen testicular es de 4 cc, los testículos son duros a la palpación, y el pene tiene una longitud de

4,8 cm. No presenta hipospadia. La cromatina sexual en células epiteliales de la mucosa oral mostró el corpúsculo de Barr en un 30% de las células estudiadas.

- a) ¿Cuál es el diagnóstico probable?
- b) Nombre al menos tres signos clínicos importantes a tener en cuenta
- c) ¿Qué estudios de laboratorio realizaría para confirmar el diagnóstico?

BIBLIOGRAFÍA

- GREENSPAN. ENDOCRINOLOGÍA BÁSICA Y CLÍNICA. DG Gardner, D Shoback. 9ª Ed. Editorial McGraw-Hill Interamericana. Madrid, 2013.
- FISILOGÍA DEL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISO-GONADAL. Freggiaro EL. PROECO 2013.
- MANUAL DE LABORATORIO PARA EL ANÁLISIS DEL SEMEN. MJ García, A Felices, MC Povedano. 1ª Ed. OmniaScience, Omnia Publisher SL, 2012.
- ANÁLISIS DE ORINA Y DE LOS LÍQUIDOS CORPORALES. LA Mund, K Shanahan. 2ª Ed. Editorial Médica Panamericana, 2011.
- EXAMINATION AND PROCESSING OF HUMAN SEMEN. World Health Organization. 5ª Edición), 2010.
- EVALUACIÓN DE LA TESTOSTERONA PLASMÁTICA EN EL VARÓN. LO QUE SE DEBE MEDIR Y LO QUE NO. Mas M. Rev Int Androl. 6:101-14, 2008.