

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

COMPARACION DE LOS METODOS DE ALTERACION O
SENSIBILIZACION DE ERITROCITOS MARCADOS CON
^{99m}Tecnecio PARA SU USO EN CENTELLOGRAFIA
ESPLENICA

The seal of the Universidad de San Carlos de Guatemala is a circular emblem. It features a central figure, likely a saint or scholar, seated and holding a book. The figure is surrounded by various symbols, including a crown at the top, a shield on the left, and a banner at the bottom. The text "ACADEMIA COLECTIVA" is visible on the right side of the seal, and "UNIVERSITAS ORBIS COLONIAE" is on the left. The central text of the seal reads "S. CARLOS DE GUATEMALA".

Informe de Tesis

Presentado por

FELISA DEL CARMEN ESTRADA HERRERA

Para optar al título de

Química Bióloga

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

Guatemala, febrero de 1996.

DEDICO ESTA TESIS

A JESUS Amigo que nunca me ha fallado.

A MIS PADRES EFRAIN ESTRADA CASTILLO
CARMEN AMELIA HERRERA DE ESTRADA

a quienes agradezco la dedicación
y esmero que me han brindado
durante toda mi vida y es a
ustedes realmente a quien
pertenece este triunfo.

A MIS HERMANOS BLANCA ISABEL
THELMA ESPERANZA
SILVIA EUGENIA
KARLA DINORA
EFRAIN
JUAN CARLOS

por su cariño, comprensión y
apoyo.

A MI SOBRINA Elena Isabel

Con especial cariño

A HECTOR JOSUE DE LEON

Por su amor incondicional y el
apoyo que me ha brindado en todo
momento.

A MI FAMILIA Con cariño a mis abuelitos, tíos y
primos.

A MIS COMPANEROS Y AMIGOS, En especial a Claudia
Aldana y Lorena García.

A LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA.

A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA.

AGRADECIMIENTO

Agradezco infinitamente a Dios, luz que ilumina mi vida y quien me ha permitido alcanzar este triunfo.

Así mismo, agradezco muy especialmente a mis asesores de tesis:

Licda. Diana Freire de Nave y
Lic. Federico Nave Herrera,

quienes compartieron conmigo su tiempo y conocimientos; me brindaron su apoyo, dedicación y amistad; y supieron orientarme y motivarme constantemente hasta llegar a la culminación de este trabajo.

Agradezco también a la Dirección General de Energía Nuclear del Ministerio de Energía y Minas por su ayuda financiera, instalaciones y en especial al personal que labora en la Sección de Bioquímica y Radiofármacos por su valiosa colaboración y ayuda.

Finalmente, agradezco a mis revisores de tesis y personal de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, que de una u otra forma colaboraron durante la realización de este trabajo.

INDICE:

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCION.....	3
3. ANTECEDENTES.....	5
3.1. El Bazo.....	5
3.1.1 Anatomía.....	5
3.1.2 Fisiología.....	6
3.1.3 Patología.....	6
3.2 Medicina Nuclear.....	8
3.2.1 Centellografía.....	8
3.2.2 Centellografía Esplénica.....	9
3.2.3 Radiofármacos.....	9
3.2.3.1 Isótopos radiactivos.....	9
3.2.3.2 Generación de Radionúclidos.....	10
3.2.3.3 Generador de ^{99m}Mo - ^{99m}Tc	11
3.2.3.4 Características del ^{99m}Tc	11
3.2.3.5 Biodistribución y Localización de Radiofármacos.....	12
3.2.3.6 Biodistribución del Tecnecio.....	13
3.2.3.7 Radiofármacos empleados para estudios de Centellografía Esplénica.....	14
3.2.3.7.1 Uso de coloides.....	15
3.2.3.7.1.1 Sulfuro coloidal.....	16
3.3 Eritrocito.....	16
3.3.1 Estructura Molecular.....	17
3.3.1.1 Reacciones antígeno-anticuerpo.....	18
3.3.1.2 Unión del Complemento a la membrana eritrocítica.....	19
3.3.2 Supervivencia y Destrucción de eritrocitos.....	20
3.3.3 Métodos de alteración de eritrocitos.....	22
3.3.3.1 Desnaturalización por calor.....	22
3.3.3.2 Métodos Químicos.....	22
3.3.3.3 Métodos Inmunológicos.....	23
3.3.4 Marcación de células rojas.....	24
3.3.5 Fragilidad del eritrocito.....	25
3.3.5.1 Curva de fragilidad osmótica.....	25
3.3.5.2 Hemólisis por Complemento.....	26
4. JUSTIFICACION.....	28
5. OBJETIVOS.....	29
6. HIPOTESIS.....	30
7. MATERIALES Y METODOS.....	31
7.1 Universo de Trabajo.....	31
7.2 Recursos.....	31
7.3 Procedimientos.....	33
7.4 Diseño Experimental.....	36

8. RESULTADOS.....	38
9. DISCUSION DE RESULTADOS.....	44
10. CONCLUSIONES.....	48
11. RECOMENDACIONES.....	50
12. REFERENCIAS.....	52
13. ANEXOS.....	56
13.1 Curva de Fragilidad Osmótica.....	57
13.2 Fragilización con exceso de ACD.....	58
13.3 Fragilización con Fenilhidracina.....	59
13.4 Prueba de Coombs directa.....	60
13.5 Diseño de bloques completos al azar.....	61
13.6 Tabla No.1.....	62
13.7 Tabla No.2.....	63
13.8 Tabla No.3.....	64
13.9 Tabla No.4.....	65
13.10 Tabla No.5.....	66
13.11 Tabla No.6.....	67
13.12 Tabla No.7.....	68
13.13 Tabla No.8.....	69
13.14 Tabla No.9.....	69
13.15 Tabla No.10.....	70
13.16 Tabla No.11.....	70
13.17 Tabla No.12.....	71
13.18 Tabla No.13.....	71
13.19 Gráfica No.1.....	72

1. RESUMEN

Debido a la actividad de las células del sistema fagocítico mononuclear esplénico y a la capacidad secuestradora de eritrocitos dañados o sensibilizados, es posible visualizar la estructura y fisiología del bazo por medio de la incorporación de trazadores radioactivos a los eritrocitos.

Los procedimientos se ejecutan usando eritrocitos radiomarcados con pirofosfato-estaño-^{99m}Tecnecio y que han sido adecuadamente dañados, lo cual permite una imagen esplénica específica.

Para alterar o modificar la membrana de los eritrocitos se aplican métodos de naturaleza física, química e inmunológica, cuyo grado de daño debe controlarse para obtener un buen resultado diagnóstico.

En el presente trabajo se aplicó los métodos para fragilización de eritrocitos a muestras de sangre de 10 donadores sanos adultos y de grupo "O" Rh positivo y que fueron previamente marcadas con Pyp-Sn-^{99m}Tecnecio. Los métodos físicos fueron: calor a 49.5°C por 20min y calor a 56.0°C por 10min, los métodos químicos: Fenilhidracina dilución 1:50 250ul (método previamente estandarizado) y exceso de Acido Cítrico Dextrosa (800ul de solución concentrada), y los métodos Inmunológicos: 50ul y 100ul de IgG anti D para 1 ml de una suspensión de eritrocitos al 50%.

El efecto de cada uno de estos métodos se evaluó por medio de cambios morfológicos y curvas de fragilidad osmótica.

Esto se llevó a cabo con el propósito de comparar el daño ocasionado por los métodos arriba explicados para determinar si existía un punto común óptimo de fragilización (50% hemólisis) entre los métodos aplicados.

Actualmente para centellografía esplénica se fragilizan los eritrocitos con calor a 49.5°C, por lo que fue necesario

determinar la concentración de solución salina que hemoliza el 50% de eritrocitos, la cual equivale a 0.562 g/dl.

Es importante mencionar que se determinó los rangos de absorbancia para dicha concentración de solución salina aplicando un intervalo de confianza de 95% que indica el rango dentro del cual se obtiene una buena fragilización, los que corresponden a 0.528-0.563 para eritrocitos tratados con calor a 49.5°C por 20min, 0.730-0.767 para eritrocitos tratados con calor a 56.0°C y de 0.0 para eritrocitos control.

Respecto a los métodos químicos se determinó que no alteran el patrón normal de hemólisis y que lo que dañan es la hemoglobina y estructura química del eritrocito.

Las curvas de fragilidad osmótica y evaluación de alteraciones morfológicas para las muestras tratadas con IgG anti D, demostraron que hay aumento de la fragilidad osmótica de los eritrocitos, pero en proporción inferior a los métodos físicos. Así mismo, para asegurar la sensibilización apropiada de los eritrocitos, se efectuó la prueba de Coombs.

Resulta importante relacionar los cambios morfológicos con las alteraciones dentro de la curva de fragilidad osmótica, ya que morfológicamente los métodos físicos, químicos e inmunológicos aplicados, presentan alteraciones características.

Finalmente, por medio de un estudio se estableció el método de control de calidad para evaluar la óptima fragilización de eritrocitos marcados con Pyp-sn-^{99m}Tecnecio al ser tratados con calor a 49.5°C por min, y queda demostrado que la fragilización de eritrocitos por los métodos físicos, químicos e inmunológicos ocurre a diferente nivel y por lo tanto debe estandarizarse métodos específicos de evaluación.

Y por lo tanto se establece que los métodos físicos son los más apropiados para alterar los eritrocitos para usarse en centellografía esplénica, ya que se ha establecido un adecuado control de calidad, no se conocen efectos adversos, su costo es bajo y se ejecutan en poco tiempo.

2. INTRODUCCION

La Medicina Nuclear es una ciencia dedicada al diagnóstico y tratamiento de pacientes a través del estudio de diversas enfermedades humanas, utilizando isótopos radioactivos que permiten visualizar imágenes de diferentes órganos, así como de sus procesos fisiológicos.

Una de las ramas de esta ciencia se aplica a procesos hematológicos que involucran la marcación de componentes sanguíneos para el diagnóstico de patologías de diferente origen.

La membrana del eritrocito es una estructura compleja compuesta de proteínas y lípidos. Esta puede alterarse por métodos físicos, químicos e inmunológicos; siendo el daño más importante a este nivel, la pérdida de plasticidad y fluidez, lo cual lleva a la formación de eritrocitos de pared rígida que les impide el paso libre a través de las trabéculas del bazo y ocasiona en esta región el secuestro y fagocitosis de los mismos.

Es por ello que el uso de radiofármacos marcando eritrocitos con ^{99m}Tc y debidamente alterados permite lograr imágenes esplénicas específicas. Sin embargo, existen algunos factores que es preciso controlar al efectuar un radiomarcaje de eritrocitos con ^{99m}Tc para centellografía esplénica, entre los cuales se incluye la calidad y pureza del radiofármaco, su administración al paciente y la información diagnóstica que se obtenga de la marcación(1).

En el presente trabajo se comparó el efecto ocasionado por los métodos físicos, químicos e inmunológicos para la fragilización y sensibilización de eritrocitos que fueron marcados con Pirofosfato-Estaño- ^{99m}Tc , lo cual se evaluó como parte del control de calidad requerido en base a cambios morfológicos observados y determinación de la concentración de solución salina que produce el punto óptimo de fragilización (Hemólisis al 50%).

La evaluación de alteraciones en la morfología celular se llevó a cabo por medio de frotos sanguíneos teñidos con Wright, ejecutados antes y después de que se sometieron las muestras a cada uno de los tratamientos propuestos (20 minutos a 49.5°C, 10 minutos a 56.0°C, exceso de Acido Cítrico - Dextrosa 800ul, Fenilhidracina 1:50 250ul y recubrimiento con 50ul y 100ul de IgG-Anti D), lo cual permitió realizar comparaciones.

Con esto, en el presente trabajo se estandarizó el método de control de calidad para evaluar la adecuada fragilización o sensibilización de los eritrocitos tratados a 49.5°C por 20 min, para lo que se determinó el punto óptimo de hemólisis (hemólisis al 50%) y la concentración de solución salina que produce dicho efecto. Esto resulta de mucha utilidad ya que este es el método empleado de rutina para centellografía de bazo y anteriormente no existía un método para controlar el grado de fragilización.

Así mismo fue posible determinar que para calor a 56.0°C por 10 min los eritrocitos presentan mucho mayor daño con lo cual aumenta la fragilidad de éstos.

El estudio de los métodos químicos e inmunológicos se propuso como una alternativa, y luego de evaluar los cambios en morfología y fragilidad osmótica y compararlos con los obtenidos para métodos físicos, se determinó que el daño ocurre a diferente nivel en el eritrocito y por lo tanto es necesario estandarizar otras metodologías para evaluar el grado de daño celular que ocasionan para que puedan utilizarse obteniendo resultados diagnósticos similares a los provocados por el tratamiento térmico ya establecido. Además se debe evaluar estos tratamientos in vivo experimentalmente, para que se considere su uso en el diagnóstico esplénico.

3. ANTECEDENTES

3.1 EL BAZO:

Es el mayor de los órganos linfáticos y el único especializado para la filtración de la sangre. Su estructura facilita las respuestas inmunitarias a antígenos que han llegado a la sangre circulante, ya que recibe sangre de todo el cuerpo, a lo que se debe su color púrpura (1).

3.1.1 Anatomía:

El bazo tiene tamaño y forma que semejan un puño cerrado y se sitúa en el abdomen, protegido por las costillas 9a. a 11a., con su eje largo paralelo a ellas. Posee una estructura de colágeno en la cual está suspendida una red de células reticulares.

Está rodeado por una cápsula que está cubierta por una membrana serosa, el peritoneo, de la cual parten muchas trabéculas hacia el interior del órgano. En un punto de la superficie del bazo hay una depresión profunda llamada hilio por donde entran y salen los vasos sanguíneos.

El parénquima o pulpa esplénica es de dos tipos: la pulpa blanca es tejido linfático típico, en su mayor parte linfocitos, que rodea y sigue a las arterias. Se engrosa a intervalos formando masas ovoides llamadas Nódulos Esplénicos o Cuerpos de Malpighi. La pulpa roja es más abundante y se compone de senos venosos llenos de sangre y forma a menudo láminas llamadas cordones pulpares o de Billroth que se relacionan con muchos eritrocitos, macrófagos, linfocitos, plasmacitos y granulocitos (2).

Las arterias están en íntima relación con la pulpa blanca y los vasos sanguíneos terminales con la pulpa roja. Todos los vasos linfáticos son eferentes y se limita al tejido conectivo que envuelve a sus ganglios y vasos sanguíneos.

3.1.2 Fisiología:

El bazo lleva a cabo dos funciones principales.

- Produce anticuerpos contra antígenos circulantes en la sangre: numerosos plasmocitos capaces de producir cantidades considerables de inmunoglobulinas, surgen en el bazo de linfocitos B activados por la presencia de antígenos. Por su alto contenido de plasmocitos, éste es el órgano mayor productor de anticuerpos.
- Destrucción de elementos defectuosos figurados de la sangre: Posee una alta cantidad de macrófagos residentes que entran fácilmente en contacto con los elementos figurados a su paso por el órgano. Estas células fagocíticas destruyen elementos figurados envejecidos o lesionados, plaquetas, desechos circulantes y de cualquier partícula suspendida en la sangre (1,3).

Además, el bazo se encarga de la concentración de ciertos tipos de elementos figurados y de plaquetas, pudiendo en determinado momento, concentrarse en el bazo una tercera parte de la población plaquetaria total (1).

La pulpa blanca facilita el desarrollo de las respuestas inmunitarias, mientras que la pulpa roja facilita la extracción de elementos figurados en deterioro y plaquetas.

Durante la vida fetal, el bazo se constituye en un sitio de hematopoyesis mieloide activa, potencialidad que conserva en la edad adulta (3).

3.1.3 Patología:

El bazo es el órgano lesionado más frecuentemente por los traumatismos abdominales ocasionados por aplastamiento a este nivel, lo que suele causar la ruptura del órgano, que da lugar a hemorragia intraperitoneal grave y choque. En tal situación es necesaria la extirpación inmediata o esplenectomía, a fin de evitar hemorragias mortales (1). En caso de extirpación, las funciones del bazo pueden ejecutarlas otros tejidos hematopoyéticos, en particular la médula ósea (2).

Debido a la función del bazo en la regulación y homeostasis del tejido sanguíneo, éste se ve afectado por los desórdenes y alteraciones en la producción y eliminación de los componentes sanguíneos:

- Durante la anemia hemolítica grave, el bazo reexpresa tal potencialidad, participando en la hematopoyesis extramedular (1).
- En la anemia de células falciformes, los eritrocitos alterados se vuelven rígidos y susceptibles a secuestro y hemólisis en el bazo.
- En la esferocitosis hereditaria hay un defecto hereditario en la membrana del eritrocito que hace que adopte forma esferoidal, sea menos deformable y vulnerable al secuestro y destrucción a nivel del bazo.
- En lupus eritematoso sistémico, puede haber esplenomegalia con frecuente engrosamiento fibroso capsular. Las células plasmáticas son abundantes y contienen IgG e IgM. Surge fibrosis perivascular notoria en vasos de tamaño normal y anormal.
- En leucemia mielógena crónica, hay esplenomegalia masiva (mayor a 5000 gr) siendo menor en leucemia linfocítica crónica (hasta 2500 gr), y en ambas aparecen áreas de infarto pálido en toda la sustancia del órgano (zonas de necrosis isquémica por oclusión arterial con escasa hemorragia). Las formas agudas de leucemia, sólo producen esplenomegalia moderada (500-1000 gr).
- En metaplasia mieloide, hay esplenomegalia alta (hasta 4000 gr) con infartos múltiples. Sin embargo, se conserva la arquitectura natural y la hematopoyesis ordenada con proporciones más o menos normales de elementos figurados en maduración. Los megacariocitos son prominentes.
- En mononucleosis infecciosa el bazo está agrandado (300 - 500 gr), hay una intensa infiltración de linfocitos atípicos que pueden causar prominencia de los folículos esplénicos. El bazo es vulnerable a la rotura por la

infiltración linfocitaria de cápsula y trabéculas (4).

La actividad fagocítica de las células del sistema fagocítico mononuclear esplénico y la capacidad secuestradora de eritrocitos alterados o sensibilizados que posee el bazo, son las dos funciones que permiten con ayuda de trazadores radioactivos, la visualización y evaluación morfofuncional y patológica de este órgano (5).

3.2 MEDICINA NUCLEAR:

La Medicina Nuclear es una ciencia dedicada al diagnóstico y tratamiento de pacientes a través del estudio de diversas enfermedades humanas, utilizando isótopos radioactivos que permiten visualizar imágenes de diferentes órganos, así como de sus procesos fisiológicos (5).

Una de las ramas de esta ciencia es la Hematología Nuclear, la cual se aplica a procesos hematológicos, tales como la marcación de componentes sanguíneos que permiten diagnosticar patologías de diferente origen (6).

3.2.1 Centellografía:

Una de las principales aplicaciones de la Medicina Nuclear son los estudios morfofuncionales, siendo la característica de funcionalidad la más relevante.

Las exploraciones se realizan mediante una Gammacámara, que permite la detección de radiación emitida por un radiofármaco y su conversión en imágenes. Las Gammacámaras están conectadas a un ordenador que permite la visualización y posterior procesado de las imágenes. Según la exploración pueden adquirirse imágenes estáticas (de un momento determinado), o secuenciadas, que permiten un estudio dinámico (7). Según el órgano que se quiera estudiar, se utilizan diferentes radiofármacos con trazadores específicos. Existen técnicas que permiten la exploración de la mayoría de órganos.

3.2.2 Centellografía Esplénica:

Aunque no es común ejecutar imágenes esplénicas específicas, la centellografía del bazo es de utilidad en la detección de tejidos con acceso al bazo en pacientes que han sufrido esplenectomía y aún muestran signos de hiperesplenismo. Esto es también beneficioso en la visualización del bazo o como una ayuda en la determinación de la masa del cuadrante abdominal superior izquierdo (8).

La función de fagocitosis en el bazo es utilizada frecuentemente como un medio para aplicar radiofármacos. Puesto que el bazo es el principal órgano destructor de eritrocitos dañados y alterados, las imágenes esplénicas específicas pueden ejecutarse utilizando eritrocitos radiomarcados que sean apropiadamente desnaturalizados antes de localizarse en el bazo (8,9).

3.2.3 RADIOFARMACOS:

Un radiofármaco es un trazador metabólico compuesto de dos partes: un radionúclido (nucleones radiomarcados), que generalmente es emisor de rayos gamma; y un fármaco, cuya principal función es localizarse en un órgano específico y participar en la fisiología del mismo, para emitir radiación que sea percibida por un detector de centelleo (9).

El empleo de los radiofármacos ha evolucionado debido a que, a través de la radiación emitida se puede evaluar la anatomía de un órgano o sistema, la integridad y comportamiento fisiopatológico a nivel de tejidos y analizar su comportamiento bioquímico (8).

3.2.3.1 Isótopos Radioactivos:

La radioactividad es el fenómeno que presentan ciertas sustancias, consistente en la emisión espontánea de partículas, que procede de la desintegración de determinados núcleos y que se origina por la expulsión de

los productos sobrantes de un reordenamiento interno de los núcleos a fin de alcanzar una estructura más estable (7).

Para el diagnóstico clínico en la Medicina Nuclear se utilizan los detectores de centelleo para evaluar la actividad de un radionúclido, cuyo principio de funcionamiento se basa en la propiedad de emitir luz visible o ultravioleta cuando sobre ellos incide una radiación ionizante. La luz emitida por dichos materiales es posteriormente transformada en una señal eléctrica para poder ser medida (10).

La posibilidad de administrar radiofármacos con actividades adecuadas para obtener una buena imagen queda relegada a los isótopos radioactivos de corto período de semidesintegración y que a su vez sean emisores de radiación gamma (9).

Los isótopos metaestables son núclidos que permanecen en estado excitado durante un tiempo medible superior a 10^{-15} segundos, por lo cual son los más usados en Medicina Nuclear (9).

3.2.3.2 Generación de Radionúclidos:

Un Generador es un sistema que contiene una combinación de radionúclidos con relación genética, en la cual, mediante procedimientos químicos (precipitación, destilación, extracción con solventes, sublimación y cromatografía por intercambio iónico), puede conseguirse una separación selectiva del "hijo", entendiendo como tal la especie radioactiva formada por la desintegración del radionúclido "padre" (9).

Se debe tener en cuenta que ocurra una correcta y eficaz separación entre padre e hijo, estando la solución estéril y libre de pirógenos.

3.2.3.3 Generador ^{99}Mo - $^{99\text{m}}\text{Tc}$:

Este es el más utilizado, ya que su recuperación máxima tras el procedimiento de elución a través de una columna de alúmina se efectúa en 23 horas y se pueden obtener soluciones de pertecnetato con actividad suficiente durante una semana (9,11).

La facilidad de obtener el $^{99\text{m}}\text{Tc}$ a partir de generadores ha permitido la incorporación del Tecnecio en gran variedad de ligandos, generando la producción de muchos radiofármacos con diferentes afinidades hacia los tejidos.

3.2.3.4 Características del $^{99\text{m}}\text{Tecnecio}$:

- Período de semidesintegración de 6.04 horas.
- No emite radiación beta.
- Emite un fotón de 140 KeV, con alto rendimiento.
- Facilidad de formación de compuestos de coordinación con diferentes ligantes (7,11).

El Tecnecio se obtiene en forma de pertecnetato de sodio ($^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$) con valencia VII. Puede alterarse la valencia de VII por:

- Radiólisis del agua.
- Iones cloro presentes.
- Radiación ionizante.
- Impurezas orgánicas.

Para evitar la reducción previa del $^{99\text{m}}\text{Tecnecio}$ se debe incluir sustancias que capturen electrones, eliminar el agua residual de la columna, incluir filtros de carbón activado para eliminar impurezas orgánicas y eluir el generador en solución salina libre de oxígeno (7).

La preparación de radiofármacos con $^{99\text{m}}\text{Tecnecio}$ requiere generalmente una reducción del pertecnetato desde la valencia VII a I-VI, empleándose como agentes reductores cloruro de estaño, ácido clorhídrico concentrado, electrólisis, etc (8).

Tras la reducción del pertechnetato, el ^{99m}Tc puede formar complejos con gran variedad de ligantes a través de enlaces covalentes coordinados entre grupos del ligante, como grupos amino, fosfatos, hidroxilo, etc (11).

Las especies reducidas del pertechnetato son muy reactivas químicamente y se combinan con gran variedad de agentes quelantes, que contribuyen a la formación del enlace covalente coordinado. Una vez que tiene lugar la reacción de marcaje, puede quedar en solución pertechnetato que no ha llegado a ser previamente reducido y que podría reaccionar posteriormente, si no es tratado en exceso por un agente reductor (11).

3.2.3.5 Biodistribución y Localización de los radiofármacos:

La unión a proteínas o componentes intracelulares de las células sanguíneas, la lipofilidad, el tamaño y carga iónica, la unión a receptores y otras propiedades físicas y químicas determinan los diferentes mecanismos de biodistribución y localización de los fármacos (12):

-**Bloqueo capilar:** cuando se inyectan partículas de tamaño superior al de los capilares pulmonares, produciéndose microembolización pulmonar.

-**Fagocitosis:** Las células de Kupffer tienen la propiedad de ingerir partículas de 10 a 1000 nm de diámetro, por ello un determinado radionúclido administrado intravenosamente y en forma coloidal puede ser atrapado por el hígado, y en menor proporción por el bazo y médula ósea.

-**Secuestro celular:** El bazo extrae de la circulación aquellos hematíes alterados. Si se logra marcar estas células con un radiofármaco y se debilitan o alteran es posible visualizar este órgano.

-**Transporte activo:** Implica la localización por los procesos metabólicos específicos de un órgano determinado, pudiéndose obtener información morfofuncional del órgano,

como ocurre en los estudios de la tiroides.

-Localización compartimental: Un radiofármaco incorporado en un compartimiento bien definido (tracto gastrointestinal, líquido cefalorraquídeo o sistema circulatorio) no difundirá en condiciones normales para ser extraído por transporte activo u otro mecanismo.

-Difusión simple o intercambiable: Algunos radiofármacos lipofílicos pueden atravesar la barrera hematoencefálica e incorporarse a nivel cerebral.

-Mecanismos de eliminación de radiofármacos: Pueden eliminarse por vía urinaria, fecal o respiratoria. Esta depuración se debe al decaimiento físico del radionúclido y a la eliminación biológica del radiofármaco (9).

3.2.3.6 Biodistribución del ^{99m}Tc Tecnecio (pertechnetato sódico):

Después de su administración por vía intravenosa se biodistribuye en el compartimiento vascular, alcanzando el equilibrio con el compartimiento intersticial a los 2-3 min. El aclaramiento plasmático es de aproximadamente 30 min. Un 30% es excretado a las 24 horas, el 50% es eliminado en 3 días por orina y heces y un 20% en 8 días. Entre un 70% y un 80% se une a proteínas y el resto difunde rápidamente en la tiroides, glándulas salivares, mucosa gástrica y plexos coroideos. Tiene un comportamiento biológico parecido al yoduro, pero a diferencia de éste, no se reabsorbe en el intestino delgado ni es organificado en la tiroides (13).

La elección del radiofármaco dependerá de las características del órgano a estudiar, del tipo de radionúclido utilizado y propiedades del ligante (11).

La carga total del complejo determina su comportamiento en el organismo, teniendo los radiofármacos no polares la propiedad de atravesar membranas (14).

3.2.3.7 Radiofármacos empleados para estudio de Centellografía esplénica

Los estudios de la cinética, funcionalismo y localización de los lugares de destrucción de las células rojas se realizan mediante su marcaje con isótopos radiactivos. En 1949, Bale utilizó el primer trazador radioactivo para el marcaje de eritrocitos (^{14}C -Lisina) (8).

Aunque el ^{51}Cr fue originalmente empleado como el radionúclido de preferencia para marcar eritrocitos debido a que se liga firme e irreversiblemente a los polipéptidos de las cadenas beta de la hemoglobina, actualmente el $^{99\text{m}}\text{Tc}$ se está utilizando en diversidad de análisis centellográficos, especialmente con radiofármacos como el citrato y pirofosfato (Pyp) para estudios esplénicos específicos (15).

El $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Sn-Pyp permite una buena estabilidad del marcaje. Una variante del marcaje con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ es la utilización de los hematíes alterados para la visualización gammagráfica del bazo con ausencia de actividad en vasos u otros órganos vascularizados próximos (14).

Del pertecnetato sódico al marcar hematíes *in vivo* cuando se administran 2 a 4 mg de pirofosfato de estaño, del 30 al 40 % del Sn^{2+} se localiza en hueso, 40 a 50 % se excreta por vía renal y sólo 5 a 8 % penetra en el eritrocito y permanece unido a la hemoglobina durante largo tiempo (8).

Al administrar el radiofármaco, el pertecnetato penetra en los eritrocitos por la vía de difusión de los canales aniónicos y tras la reducción intracelular con el Sn^{2+} , el pertecnetato ya reducido se une a la hemoglobina, preferentemente en la cadena beta.

El mecanismo exacto de fijación *in vitro* del ^{99m}Tc no es bien conocido. Según Srivastava consiste en:

- El ion Sn^{2+} penetra en el interior de los eritrocitos y se une fundamentalmente a la hemoglobina.
- El pertecnetato difunde libremente hacia afuera y adentro del eritrocito.
- En el interior del eritrocito, el pertecnetato reducido por el Sn^{2+} se une a la hemoglobina.
- El estaño oxidado (Sn^{4+}) así como el pertecnetato reducido no son transportados a través de la membrana.
- El estaño extracelular reduce prematuramente al pertecnetato inhibiendo la entrada de pertecnetato y causando bajos rendimientos de marcaje.
- El eritrocito retiene el estaño por largo tiempo (8).

3.2.3.7.1 Uso de Coloides:

Las soluciones verdaderas son aquellas en que el soluto se distribuye en el solvente sin distinguirse de éste. El lado opuesto es una suspensión o emulsión, cuyas partículas son mayores a 1 μm . El sistema coloidal tiene un tamaño de partícula entre 10 nm y 1 μm .

Las partículas coloidales tienen carga eléctrica que está contrarrestada por una carga igual pero de signo opuesto de las moléculas del disolvente.

La adición de electrolitos (sales, ácidos o bases), que son moléculas cargadas, causa interacción con el sistema, alterando el potencial existente, con lo que el resultado es la floculación del coloide. Para prevenir estas agregaciones se añaden agentes estabilizantes (14).

La utilización de coloides se fundamenta en la capacidad del sistema fagocítico mononuclear de extraerlos del sistema circulatorio, con lo que los coloides son radiofármacos de elección para la obtención de imágenes hepáticas, esplénicas y de médula ósea.

Estas estructuras presentan una serie de células que se encargan de remover partículas extrañas de la circulación; así tanto el coloide normal como el radioactivo es atrapado por los macrófagos.

El grado de fagocitosis depende de la forma, diámetro, superficie, carga eléctrica, lugares de reconocimiento en la membrana y número de partículas inyectadas (15).

3.2.3.7.1.1 Sulfuro coloidal marcado con ^{99m}Tecnecio:

Este es un radiofármaco de aplicación en estudios del sistema fagocítico mononuclear debido a la propiedad fagocítica de las células que extraen el fármaco del sistema circulatorio, especialmente para Gammagrafía hepato-esplénica.

El tamaño de las partículas coloidales no debe ser mayor a 500 nm y no debe existir Al^{3+} como impureza, ya que puede interferir en la formación del coloide produciendo su agregación, con lo que resultarían partículas más grandes, que quedarían atrapadas en el lecho vascular pulmonar. Las imágenes se realizan a los 15 minutos postinyección (14).

La distribución normal de la actividad es 6% en hígado (células de Kupffer), 6% en bazo y 8% en médula ósea (15, 16).

En la imagen normal debe observarse una captación homogénea por parte del parénquima hepático (lóbulo derecho más activo), un bazo más hipoactivo y sólo indicios de actividad en la médula ósea en proyección posterior (17).

3.3 ERITROCITO:

Esta es una célula anucleada bien caracterizada que no posee membranas intracelulares. Tiene forma bicóncava y mide 7.2 μm de diámetro. Posee un citoesqueleto que forma una especie de concha, la cual se distribuye por toda la

membrana plasmática y se une a ella en diferentes formas dándole a la célula elasticidad y plasticidad.

Los factores que determinan y conservan la forma tan característica del eritrocito son los constituyentes moleculares particulares de su membrana celular y la constitución del complejo coloidal con el que está lleno. Estos componentes le confieren ductilidad y elasticidad, de modo que el eritrocito puede experimentar la deformación requerida para atravesar redes de vasos que posean una luz pequeña (1, 3).

3.3.1 Estructura Molecular:

Cada eritrocito está envuelto en una delicada membrana plasmática que contiene proteínas intercaladas en una sustancia lipídica doble fundamental (una membrana unitaria típica) (3).

Entre las proteínas predominan la glucoforina, que se extiende a través de la membrana y una proteína llamada banda tres encargada del transporte de aniones y que une el citoesqueleto (16).

Cerca del 50% de proteínas existen como proteínas integrales de membrana, las cuales están fuertemente unidas a la porción lipídica de la membrana.

Las proteínas periféricas o extrínsecas forman una red que actúa como citoesqueleto, con una capa granulosa vertical y una malla filamentosa horizontal, constituida principalmente por espectrina (proteína contráctil). Tanto la espectrina como la actina se unen a las proteínas integrales de la membrana por medio de la anquirina (1,3).

La espectrina conserva la forma bicóncava del eritrocito y permite el flujo eficaz de oxígeno y dióxido de carbono en el interior. Esta flexibilidad permite que la viscosidad de la sangre se conserve baja. Aunque la forma del eritrocito maduro es afectada por la red subplasmalémica, la plasticidad de la membrana necesaria

para la supervivencia depende de la presencia de los componentes de membrana. Algunas glicoproteínas y glicolípidos que integran la membrana poseen cadenas oligosacáridas que presentan especificidad para los antígenos de los grupos sanguíneos (16,18).

Los antígenos de la superficie eritrocítica pueden ser polisacáridos, proteínas y lipoproteínas, los cuales están genéticamente determinados. Entre ellos se incluye el sistema ABO, que es común en muchas células y cuya inmunización se inicia en épocas tempranas de la vida y por lo tanto son anticuerpos naturales anti A y anti B de tipo IgM. El sistema Rh se limita a los eritrocitos y su importancia radica en la formación de anticuerpos anti Rh positivo de tipo IgG, en el caso de incompatibilidad (16).

Los eritrocitos sensibilizados por anticuerpos, pueden adherirse a macrófagos durante su paso a través del bazo, sufriendo fagocitosis parcial o completa. La fagocitosis parcial de partes de la membrana y citoplasma del eritrocito provoca que adquiera forma esférica, o hace al esferocito lesionado susceptible al secuestro permanente en el bazo y hemólisis por eritrofagocitosis (16).

3.3.1.1 Reacciones antígeno-anticuerpo.

Los anticuerpos completos o salinos aglutinan eritrocitos apropiadamente antigénicos en Cloruro de Sodio isotónico, los cuales por lo general son de tipo IgM.

Los anticuerpos incompletos, casi siempre de tipo IgG, requieren pruebas especiales para demostrar la interacción del anticuerpo y del eritrocito, ya que no es visible la aglutinación. Estos eritrocitos sensibilizados por IgG se pueden aglutinar por medio de anticuerpos anti-IgG humanos producidos en otra especie, método en el que se basa la prueba de Coombs (16).

La prueba directa de antiglobulina (Coombs directo) detecta IgG o componentes del Complemento en los

eritrocitos del paciente. Los hematíes se hacen reaccionar con antisuero antiglobulina y se cuantifica la aglutinación.

La prueba indirecta de antiglobulina (Coombs indirecto) detecta anticuerpos eritrocíticos incompletos en el suero del paciente. Los eritrocitos normales se incuban con el suero del paciente, se lavan muy bien, y se estudia la aglutinación con antisuero antiglobulina apropiado (16).

3.3.1.2 Unión de componentes del Complemento a la Membrana Eritrocítica:

Esta capacidad causa adherencia de los eritrocitos que llevan Complemento a los macrófagos o activación de la cadena del Complemento y hemólisis intravascular.

Muchos anticuerpos IgM e IgG pueden unir el Complemento a las superficies eritrocíticas, pero la IgM es la más eficiente en la captación del Complemento. La IgG₁, IgG₃ e IgG₂ muestran capacidad decreciente para unirse al Complemento.

Los componentes del Complemento participan en la hemólisis de eritrocitos fomentando la adherencia de hematíes sensibilizados a los macrófagos del sistema fagocítico mononuclear, lo que causa eritrofagocitosis. También activando el sistema lítico completo del Complemento y generando una lesión en la membrana del eritrocito, lo que permite la hemólisis osmótica del hematíe sensibilizado de la siguiente forma:

-La adherencia inmune específica de anticuerpo con activación de fijación de Complemento a los antígenos eritrocíticos, proporcionan receptores para la fijación inicial del Complemento (C1). La configuración activa de estas moléculas requiere la aproximación de moléculas de anticuerpo y calcio. Esta reacción requiere dos receptores Fc del Complemento a una distancia de 25-40 nm. Por lo tanto una sola molécula de IgM unida a la membrana puede iniciar la fijación del Complemento (19).

Muchos de estos cambios, contribuyen a la incapacidad del eritrocito viejo para fluir con rapidez a través del bazo u otros tejidos fagocíticos.

Los eritrocitos viejos o dañados, se retrasan en su paso a través de la pulpa roja esplénica, en especial por los intersticios revestidos de retículo, de los cordones de Billroth.

El medio de la pulpa esplénica que consiste sobre todo en baja concentración de glucosa, hipoxia leve, hipercapnia y pH relativamente bajo, es nocivo para los eritrocitos.

Una vez fagocitados, los eritrocitos son sometidos al efecto de enzimas proteolíticas y lipolíticas de los macrófagos (1,16,18).

La participación conjunta o independiente de los dos principales órganos del sistema fagocítico mononuclear, el bazo y el hígado, es de gran importancia en los procesos fisiopatológicos que ocurren en la mayor parte de los casos de enfermedad hemolítica inmunitaria.

Estos dos órganos suministran al organismo mecanismos para la eliminación de eritrocitos con una amplia variedad de tipos y grados de lesión. El hígado es capaz de secuestrar con rapidez eritrocitos con lesión grave, como los sensibilizados por anticuerpos IgM que captan el Complemento (16).

El bazo, si bien recibe el 5% del gasto cardíaco, ejerce una extraordinaria capacidad de discriminación para secuestrar y destruir eritrocitos con lesión mínima, incluyendo hematíes sensibilizados con IgG. A diferencia del hígado, el sistema fagocítico mononuclear esplénico está dispuesto de una manera compleja filtradora (cordones de Billroth) que obliga a los eritrocitos circulantes a pasar por pequeñas ventanas y tener estrecho contacto con macrófagos tisulares (1,16).

3.3.3 Métodos de Alteración y sensibilización de

Eritrocitos:

Debido a que el bazo es el principal órgano encargado de la detrucción de eritrocitos dañados y alterados, la imagen esplénica específica puede ejecutarse usando eritrocitos radiomarcados que han sido apropiadamente sensibilizados antes de localizarse en el bazo (8).

Una variedad de técnicas han sido empleadas para modificar la membrana eritrocítica, entre las que se incluyen:

3.3.3.1 Desnaturalización por calor: este tratamiento produce la formación de esferocitos que se caracterizan por haber perdido electrolitos y alteración en la membrana celular que hace más susceptibles de lisis a las células.

Para que ocurra un adecuado daño a la membrana es necesario calentar las células previamente marcadas en un baño de maría a 49.5°C por 20 minutos o a 56°C por 10 minutos.

La insuficiencia de calor resulta en desnaturalización incompleta con disminución en el secuestro por el bazo, mientras que el excesivo calor resulta en localización de imágenes hepáticas incrementadas (8,15).

Los métodos de fragilización a 49.5°C por 20 minutos, ya han sido estudiados y establecidos para centellografía esplénica en Guatemala(18).

3.3.3.2 Métodos Químicos: Existen varios agentes que pueden alterar la estructura química y carga de superficie de la membrana celular eritrocítica, haciéndola vulnerable al secuestro esplénico (8).

La deficiencia de glucosa-6 fosfato-deshidrogenasa es un defecto enzimático frecuente en los eritrocitos, en que hay ausencia de glutatión reducido, el cual es necesario para conservar la longevidad del eritrocito. En ausencia de

glutación reducido, ciertos fármacos u otros agentes oxidantes producen peróxido de hidrógeno que altera la hemoglobina.

La fenilhidracina puede inducir rigidez. En casos de policitemia tratados con fenilhidracina e intoxicación por otros agentes químicos, en un frote sanguíneo se observan Cuerpos de Heinz.

La fenilhidracina es un agente altamente hemolítico, que provoca una lesión oxidativa de algunas zonas del estroma del eritrocito y la hemoglobina (21).

Los Cuerpos de Heinz suelen observarse como cuerpos de elevado índice de refracción en la periferia de los glóbulos rojos. Estos cuerpos se encuentran con frecuencia en niños con ausencia congénita de bazo y en adictos a ciertos medicamentos (21,22).

Con N-etil-meleimida se induce esferocitosis, que se caracteriza por eritrocitos esféricos de diámetro menor, de color bronce oscuro en los frotos teñidos con mezclas de Romanowsky; son frecuentes en las anemias hemolíticas, sobre todo en la anemia esferocítica hereditaria (22). La forma esférica caracteriza a los eritrocitos a punto de sufrir lisis para ser fagocitados por el sistema esplénico.

El daño a la membrana se logra directamente incubando los eritrocitos con exceso de Acido Cítrico Dextrosa (ACD), exceso de Estaño (Sn^{2+}), Neuraminidasa y Mercurihidroxiopropano (8).

3.3.3.3 Métodos Inmunológicos: Se puede lograr sensibilizar la membrana eritrocítica con anticuerpos, incubando las células RhO con IgG anti D (8). Dicha sensibilización se verifica mediante la prueba directa de antiglobulina humana. Cuando la antiglobulina humana obtenida por inmunización de animales con suero humano, es añadida a los eritrocitos sensibilizados con anticuerpos incompletos, la aglutinación tiene lugar.

La globulina anti Rh, no destruye anticuerpos y no hemoliza los glóbulos rojos; solamente bloquea los antígenos (los anticuerpos que contiene son llamados anticuerpos bloqueadores), logrando que el glóbulo rojo Rh positivo pierda su propiedad inmunogénica.

El producto comercial (Rhesuman) se emplea en lo sucesivo después de cada parto en madres Rh negativo que dan a luz un niño Rh positivo; ésto se debe a que tratándose de una IgG, su vida media es de veintiún días y por consiguiente, su efecto se pierde en el curso de las pocas semanas posteriores a su administración (22).

Independientemente del método de alteración y sensibilización seleccionado, como control de calidad antes de administrar el radiofármaco debe controlarse su pureza, actividad, asepsia durante el procedimiento de extracción de sangre, marcaje y sensibilización de eritrocitos. Se incluye también el control que se debe efectuar dentro de la curva de fragilidad osmótica de eritrocitos, para determinar el punto óptimo de fragilización y sensibilización de los mismos (18).

3.3.4 Marcación de Células Rojas:

Los glóbulos rojos marcados con ^{99m}Tc pueden tener diferentes aplicaciones clínicas, como determinación de la masa globular, localización de placenta, valoración anatómica y fisiológica del sistema cardiovascular, y en el caso de que se altere debidamente la membrana celular es posible lograr imágenes centellográficas esplénicas específicas.

Dicha marcación puede efectuarse *in vivo*, *in vitro* o en combinación. El procedimiento *in vivo*, se lleva a cabo usando inyecciones consecutivas Pirofosfato de estaño y ^{99m}Tc (Sn-Pyp). A pesar de que esta técnica da buenos resultados, las imágenes en ocasiones son de baja calidad,

dando una eficiencia de 60 a 90 por ciento de ^{99m}Tecnecio que se incorpora a la célula.

El marcaje in vitro ha demostrado dar imágenes de excelente calidad pese a que es una técnica laboriosa por la separación de los glóbulos rojos del plasma antes o después de su marcación. Además, existe el riesgo de que el manipuleo dañe levemente las células y que en este procedimiento haya mayor exposición a radiación. Sin embargo, se ha reportado que la eficacia del marcaje in vitro es mayor al 98%, mientras que para el marcaje in vivo puede ser menor al 80% (8,18).

3.3.5 Fragilidad de los eritrocitos:

La tensión osmótica del plasma es igual a la de los eritrocitos, por lo que el plasma es isotónico respecto a ellos. Una solución que tenga una concentración de sal más baja que la de los eritrocitos se llama hipotónica, mientras que una concentración mayor se denomina hipertónica.

Los eritrocitos resisten bien cambios pequeños en la tensión osmótica, pero con una solución suficientemente hipotónica, se abultan y ~~se abultan~~ ^{se abultan} toman forma esférica dando lugar a la hemólisis, ya que la membrana ~~resulta incapaz~~ ^{resulta incapaz} para retener la hemoglobina en su interior (23).

Es normal la liberación de hemoglobina en zonas como el bazo, donde los glóbulos rojos desgastados son fagocitados constantemente.

Los eritrocitos en una muestra dada de sangre no son todos igualmente susceptibles a la hemólisis por lo que varían en su fragilidad (susceptibilidad a hemólisis) (19).

3.3.5.1 Curva de Fragilidad Osmótica:

Esta es una medida de la resistencia de los eritrocitos a la hemólisis al ser expuestos a diferentes concentraciones de solución salina hipotónica. La lisis se presenta dependiendo de la concentración de solución salina y del tiempo de exposición de los hematíes al medio hipotónico (23).

La Fragilidad Corpuscular Media se refiere a la concentración de solución salina que hemoliza el 50% de los eritrocitos, lo cual indica el punto óptimo de sensibilización de éstos y depende de la concentración y fragilidad de las células sanguíneas, de la cantidad y naturaleza de la sustancia usada para sensibilizar, pH, tiempo, etc (18,24).

Aunque la preba de fragilidad osmótica depende de la ósmosis en sí, la ruptura de las células resulta de la alteración de su forma y disminución de su resistencia a la fuerza osmótica, más que a cambios en la composición de la célula o a su osmolaridad respecto a una concentración dada de solución salina.

La curva de fragilidad osmótica se considera como un índice sensible de la magnitud de la alteración de la membrana del eritrocito ocasionado por agentes físicos y químicos (25).

3.3.5.2 Hemólisis por Complemento:

Para la titulación precisa de la actividad hemolítica del Complemento, el punto de sensibilización óptima corresponde al 50% de hemólisis y sigue un patrón sigmoidal.

La unidad hemolítica al 50% del Complemento designada como C'_{H50} se define como la cantidad de Complemento requerida para el 50% de lisis. Esta es una unidad arbitraria, puesto que depende de la concentración de eritrocitos, fragilización de las células, cantidad de

anticuerpo usado para sensibilización, naturaleza del anticuerpo, fuerza ionica del sistema de reacción, concentración de Calcio, Magnesio, pH, tiempo de reacción y temperatura (19,25,26).

En esta reacción se debe tener en cuenta los cambios en el comportamiento cinético, ya que se pueden atribuir a la disociación de las moléculas de anticuerpo de complejos eritrocito-anticuerpo, seguidos por asociación con otros sitios antigénicos. En algunos casos, en ausencia de transferencia de anticuerpos, algunos eritrocitos no incorporan anticuerpos durante la sensibilización y no hay activación del Complemento. Por ello, esta es la técnica más apropiada para evaluar el grado de sensibilización de eritrocitos con IgG anti D (25-27).

4. JUSTIFICACION

Debido a la actividad fagocítica de las células del sistema fagocítico mononuclear esplénico y la capacidad secuestradora de eritrocitos dañados o sensibilizados, es posible visualizar la estructura y fisiología del bazo utilizando radiofármacos incorporados a los eritrocitos.

Los procedimientos se ejecutan usando eritrocitos radiomarcados con Pirofosfato-Estaño-^{99m}Tecnecio y que han sido apropiadamente alterados, lo que origina el secuestro de los mismos para lograr una imagen esplénica específica.

Sin embargo, para la realización de estos procedimientos resulta necesario efectuar un extenso control de calidad, el cual incluye un buen porcentaje de marcación, así como una fragilización de eritrocitos adecuada para obtener imágenes esplénicas específicas.

De lo anterior surgió la necesidad de elaborar el presente trabajo, el cual permitió establecer una metodología precisa para el control de calidad de los métodos de fragilización existentes que permitirán mejorar la eficiencia de la centellografía esplénica.

Así mismo al comparar el efecto ocasionado por los métodos físicos en relación a los métodos químicos e inmunológicos, se determinó que éstos producen un daño a diferente nivel en los eritrocitos, por lo que resulta necesario estandarizar metodologías específicas para cada uno de ellos, lo cual permitirá un adecuado control de calidad.

5. OBJETIVOS

5.1 GENERAL:

Comparar el efecto a nivel de la membrana de los métodos de alteración y sensibilización de eritrocitos marcados con pirofosfato- ^{99m}Tc con el objeto de utilizar los métodos químicos e inmunológicos, como una alternativa al método físico ya establecido para su uso en centellografía esplénica.

5.2 ESPECIFICOS:

- 5.2.1 Utilizar agentes químicos para establecer técnicas de alteración y sensibilización de eritrocitos que garanticen su adecuada fragilización.
- 5.2.2 Establecer técnicas inmunológicas basadas en el recubrimiento de eritrocitos con anticuerpos para la alteración de la membrana.
- 5.2.3 Comparar el daño celular ocasionado al tratar eritrocitos marcados con pirofosfato- ^{99m}Tc con agentes físicos, químicos e inmunológicos.
- 5.2.4 Determinar el punto óptimo de sensibilización de los eritrocitos al ser aplicados los distintos procedimientos para alterar la membrana y que permitan su fragilización óptima.

6. HIPOTESIS

Los métodos químicos e inmunológicos para fragilizar y sensibilizar eritrocitos marcados con Pirofosfato-Estaño-^{99m}Tecnecio, podrían ser usados en Centellografia Esplénica, ya que producen un efecto similar al que se ocasiona por agentes físicos.

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
BIBLIOTECA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

7. MATERIALES Y METODOS

7.1 UNIVERSO DE TRABAJO:

Eritrocitos marcados con $pyp-Sn-^{99m}Tc$ y tratados con agentes físicos, químicos e inmunológicos provenientes de personas sanas. Se utilizó sangre fresca de 10 donadores sanos, de ambos sexos, con hematocrito normal y grupo O Rh+.

7.2 RECURSOS:

7.2.1 Recursos Humanos:

Investigador: Felisa del Carmen Estrada H.
Asesores: Licda. Diana Freire de Nave
Lic. Federico Nave Herrera

7.2.2 Recursos Institucionales:

Sección de Bioquímica y Radiofármacos de la Dirección General de Energía Nuclear del Ministerio de Energía y Minas.

7.2.3 Materiales

7.2.3.1 Equipo:

- Calibrador de dosis (detector gaseoso)
- Centrífuga
- Baño de María
- Espectrofotómetro de luz visible
- Agitador tipo péndulo
- Geiger Muller
- Contador de centelleo sólido tipo pozo con detector de NaI
- Balanza analítica digital
- Autoclave
- Refrigeradora
- Microscopio óptico

7.2.3.2 Reactivos:

- Pirofosfato de estaño
- Peróxido de hidrógeno 20v. dil 1:10
- EDTA al 4.4 % pH 7
- Heparina
- Fenilhidracina
- Antisueros para grupos sanguíneos ABO y factor Rh
- Solución salina y cloruro de sodio
- Colorante Wright para Hematología
- Cristal Violeta
- Acido Cítrico Dextrosa
- Generadores de ^{99m}Mo - ^{99m}Tc
- Gamma Globulina anti Rh (Rhesuman)
- Reactivo de Coombs (antiglobulina humana)

7.2.3.3 Instrumentos y Cristalería:

- Jeringas de 1, 5 y 20 cc
- Agujas de 21 x 1 1/2
- Algodón
- Alcohol
- Papel mayordomo
- Viales para muestras de sangre
- Tapones de caucho para los viales
- Tubos de centrifuga de 10 cc
- Tijeras
- Gradillas
- Guantes
- Gabacha de plomo
- Dosímetro personal
- Portaviales plomados
- Pipeta automática de 50 ul a 200 ul
- Tips
- Capilares para hematocrito
- Plasticina

- Portaobjetos
- Probeta de 100 ml
- Pizetas
- Frascos de vidrio ámbar de 60 y 20 ml
- Balones, erlenmeyers y beakers.

7.3 PROCEDIMIENTO:

7.3.1 Extracción de Sangre:

- Se extrajo por punción venosa 20 ml de sangre y se colocó en un frasco conteniendo heparina.
- Se tomó una alícuota de 5 ml y se determinó el hematocrito verificando que se encontrara dentro del rango normal (19). De esta muestra también se determinó grupo sanguíneo y factor Rh, se hizo un frote sanguíneo inicial y se realizó la curva de fragilidad osmótica inicial, la cual sirvió como control (ver anexo 13.1).

7.3.2 Marcación *in vitro* de Eritrocitos:

- Se reconstituyó el pirofosfato de sodio estanzado liofilizado con 8ml de solución salina.
- Se agregó 0.5ml de pirofosfato de sodio estanzado reconstituído a la muestra de sangre.
- Se homogenizó en agitador tipo péndulo por 20-30 minutos para que ocurriera la estanzación dentro del eritrocito.
- Se agregó 0.5 ml de peróxido de hidrógeno 20 vol dilución 1:10 y se homogenizó (20 veces).
- Se agregó 1 ml de EDTA al 4.4 % a cada vial y se homogenizó (20 veces).
- Se agregó 10-20 milicuries de ^{51m}Tecnecio (1-3 ml).
- Se homogenizó por 10 minutos en agitador tipo péndulo a temperatura ambiente.

7.3.3 Determinación del Porcentaje de marcación:

-Se tomó una alícuota de 0.5 ml de los eritrocitos marcados y se agregó 1 ml de solución salina 0.85 % y se centrifugó por 10 min a 1500 rpm.

-Se separó el sobrenadante del botón de eritrocitos y se midió la concentración de la radioactividad en un calibrador de dosis (detector tipo gaseoso).

-Se determinó el porcentaje de marcación con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de marcación} = \frac{\text{Act. de G.R}}{\text{Act. G.R} + \text{Act. Sobrenadante}} \times 100$$

-Cuando el porcentaje de marcación fue mayor o igual a 90% se procedió a aplicar cada uno de los diferentes tratamientos.

7.3.4 Fragilización y Sensibilización

-Se alícuotó la muestra ya marcada en 5 viales conteniendo cada uno 3 ml.

-Se procedió a aplicar a cada uno de los viales el tratamiento de sensibilización específico siguiendo el orden de un diseño de bloques al azar y al final se realizó la curva de fragilidad osmótica, por medio de la cual se determinó el punto en que se produce el 50% de hemólisis:

VIAL # 1: Se colocó la muestra en baño de maría a 49.5°C por 20 min.

VIAL # 2 : Se colocó la muestra en baño de maría a 56°C por 10 min.

VIAL # 3 : Se agregó exceso de ACD (Acido Cítrico Dextrosa) y se esperó 10 a 20 min, para lo cual se se estandarizó el método y se determinó como óptimo un volumen de 800 ul de una solución concentrada de ACD (ver anexo 13.2).

VIAL # 4 : Se agregó fenilhidracina y se esperó 10-20 min, para lo cual se estandarizó el método y se determinó como óptimo un volumen de 250 ul de una solución de

fenilhidracina diluída 1:50 (Ver anexo 13.3).

VIAL # 5 : Se lavó 3 veces los eritrocitos con solución salina y se preparó una suspensión al 50%. Se colocó en 2 viales 1 ml de la anterior suspensión y se agregó al primero 50 ul de IgG anti D y al segundo 100 ul. Se homogenizó bien y se incubó por 60 min a 37°C homogenizando eventualmente.

7.3.5 Control de Calidad:

-Se determinó el hematocrito a todas las muestras, y se seleccionó únicamente para este estudio las que se encontraron dentro del rango normal.

-Se determinó el porcentaje de marcación, el cual debió ser mayor o igual al 90 %.

-Se realizó frotos sanguíneos de cada una de las muestras (al inicio y después de aplicar cada uno de los tratamientos de alteración y sensibilización de la membrana eritrocítica). Estos se tiñeron con colorante de Wright para detectar cambios morfológicos de tamaño y en coloración. De la muestra tratada con fenilhidracina se hizo un frote adicional que se tiñó con cristal violeta para observar los cuerpos de Heinz.

-Se realizó inicialmente a cada una de las muestras una curva de fragilidad osmótica inicial, que sirvió como control, la cual se comparó con los valores de referencia.

-Control del punto óptimo de sensibilización de eritrocitos ya tratados, en base a la concentración de solución salina que permitió obtener el 50 % de hemólisis:

Para ello se efectuó la curva de fragilidad osmótica a las muestras luego de aplicar los tratamientos físicos, químicos e inmunológicos respectivos.

-Además para el control de la adecuada sensibilización de eritrocitos por métodos inmunológicos se realizó la prueba de Coombs (ver anexo 13.4); y se hizo diluciones seriadas de cada muestra por medio de las cuales se determinó la dilución máxima de la muestra en que la prueba fue positiva para 50ul y 100ul de IgG-anti D respectivamente.

7.4 DISEÑO EXPERIMENTAL

Los métodos físicos, químicos e inmunológicos para fragilizar eritrocitos marcados con ^{51}Cr se evaluaron por medio de la determinación de la concentración de solución salina que produce el punto óptimo de hemólisis dentro de la curva de fragilidad osmótica (50% de hemólisis), áreas bajo la curva y los cambios morfológicos observados al aplicar los distintos métodos.

Se realizó un diseño de bloques completos al azar para asignar el orden en que se aplicó los diferentes tratamientos a cada muestra marcada con Pyp-Sn- ^{51}Cr : 49.5°C por 20 minutos, 56.0°C por 10 min, fenilhidracina, exceso de ACD, sensibilización con IgG -anti D (50ul y 100ul) y eritrocitos no marcados y no tratados que constituyeron el control, para lo que cada paciente constituyó un bloque (Anexo 13.5).

Se estableció un intervalo de confianza de 95 por ciento para la prueba de hipótesis, cuya H_0 establecía que todos los tratamientos de alteración de eritrocitos tienen un efecto equivalente, produciéndose un punto común de fragilización óptima dentro de la curva de fragilidad osmótica, así como la misma área bajo la curva.

Se trabajó con una desviación estándar establecida en un trabajo anterior (18) equivalente a 0.06 y la varianza a 0.0036, con un intervalo de confianza de 95 (alfa=0.05). Y para el cálculo del tamaño muestral se estableció un nivel de error beta de 0.24, con lo que se determinó realizar 10 repeticiones de cada uno de los tratamientos.

Para determinar si existía diferencia significativa entre el grupo control y cada uno de los métodos aplicados, se realizó una regresión lineal de los datos de absorbancias obtenidos de cada curva y se aplicó la prueba de ANDEVA (Análisis de Varianza) para determinar la linealidad de los mismos. Posteriormente se determinó áreas bajo la curva y concentraciones de solución salina que produjeron el 50% de hemólisis, ya que en un trabajo anterior para evaluar fragilización de eritrocitos marcados con ^{51}Cr se determinó que el área bajo la curva tiene un comportamiento paramétrico (18).

Luego de que se encontró dicha diferencia estadística, se aplicó la prueba de Dunnett para los métodos físicos y químicos, por medio de la cual se efectuaron comparaciones múltiples para determinar diferencias de cada uno de los tratamientos en relación al control. Posteriormente se realizó un análisis de regresión y se determinó la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación (r), para determinar la concentración de solución salina que se necesita en cada método para producir el 50% de hemólisis, así como los rangos de absorbancia para un intervalo de confianza de 95%.

Finalmente se aplicó la prueba de colinealidad, la cual mediante el valor de t crítico establecido (1.96), permitió evaluar la aceptación o rechazo de la Hipótesis nula para pendientes paralelas y el intercepto de cada uno de los métodos físicos en relación al control y entre ambos.

Para el análisis de los métodos inmunológicos, se realizó Análisis de Varianza y se determinó áreas bajo la curva y concentraciones de solución salina que produjeron el 50% de hemólisis. Luego se aplicó la prueba de Fisher LSD, por medio de la cual se efectuaron comparaciones múltiples para establecer diferencias entre cada uno de los tratamientos en relación al control y entre ambos.

Para el análisis estadístico de los títulos de máxima sensibilización determinados por la prueba de Coombs, se aplicó la prueba de t-pareada, en la cual debido a la progresión geométrica de las diluciones, se utilizó el log del recíproco del título, con un error alfa= 0.05. Estableciéndose que existe diferencia significativa si p es igual o menor al error alfa.

Para evaluar las diferencias morfológicas por medio de frotos, se estableció el porcentaje de células dañadas promedio de cada tratamiento (físico, químico e inmunológico), y se compararon en relación al control; así como también se realizó una evaluación semicuantitativa de parámetros morfológicos como son porcentaje de crenocitos, hipocromía, hipercromía, cuerpos de Heinz, microesferocitos y macrocitos y se determinó el patrón morfológico característico de cada uno de los métodos.

8. RESULTADOS

En el presente estudio se analizaron muestras sanguíneas de 10 donadores, a cada uno de los cuales inicialmente se les realizó determinación de hematocrito (se aceptó sólo dentro del rango normal), grupo sanguíneo y factor Rh (necesario O⁺), frote sanguíneo (control morfológico) y curva de fragilidad osmótica (patrón normal de hemólisis).

Teniendo en cuenta lo anterior, se procedió al marcaje de cada muestra y luego de obtener el porcentaje de marcación esperado (Tabla No. 1), se preparó alícuotas de 3 ml respectivamente, y se procedió a aplicar cada uno de los tratamientos de fragilización y sensibilización de eritrocitos, siguiendo el orden establecido por el diseño de bloques al azar realizado.

Se realizó 10 repeticiones de cada tratamiento físico y químico (calor 49.5°C por 20min, calor a 56°C por 10 min, Fenilhidracina 1:50 250 ul y ACD sol conc 800 ul).

Luego, utilizando los datos de absorbancia en la región lineal de la curva de fragilidad osmótica, se hizo una regresión de los mismos para determinar la ecuación de la recta y los coeficientes de correlación (r), que resultaron significativos por estar muy cercanos a la unidad. La linealidad de dichas curvas se confirmó por medio de un Análisis de Varianza, el cual fue significativo ($p < 0.05$) (Tabla No. 2).

Con estos datos, se determinó por medio del programa estadístico "Cálcula", las áreas bajo la curva para los tratamientos y el control (Tabla No.3), así como también la concentración de solución salina que produce el 50% de hemólisis dentro de la curva de fragilidad (Tabla No.4).

A los datos obtenidos de áreas bajo la curva y concentraciones de solución salina que producen el 50% de hemólisis de cada uno de los tratamientos físicos y químicos en relación al control se le efectuó Análisis de Varianza de una Vía, encontrándose una diferencia estadísticamente significativa entre los mismos ($p=0.0001$) por lo que se efectuó la prueba de Dunnett, por medio de la cual se determinó que los métodos físicos: calor a 49.5°C por $20'$ y calor 56.0°C por $10'$ sí desplazan significativamente la curva de fragilidad, ya que producen el punto óptimo de fragilización a concentraciones de solución salina muy diferentes al control (siendo mayor aún la fragilización con calor a 56.0°C por $10'$).

Además se determinó que los métodos químicos propuestos: Fenilhidracina 1:50 250ul y ACD sol conc 800ul no alteran suficientemente el patrón normal de hemólisis dentro de la curva de fragilidad osmótica de eritrocitos, ya que estadísticamente no se consideran diferencias respecto al control ($p > 0.05$).

Para el análisis de la alteración del patrón de hemólisis para métodos inmunológicos por medio de la curva de fragilidad osmótica, se efectuaron 5 repeticiones de cada uno de los métodos propuestos: 50 ul y 100 ul de IgG antiD para 1 ml de una suspensión al 50% de eritrocitos.

Al igual que para los métodos físicos y químicos se hizo la regresión lineal de resultados obtenidos, donde se obtuvo coeficientes de regresión estadísticamente significativos, que se comprobaron realizando un Análisis de Varianza en el que se obtuvo un alto nivel de significancia (Tabla No. 5).

Como el propósito de investigar el efecto de los métodos inmunológicos fue comparar si existían diferencias

significativas en el patrón de hemólisis de cada uno de los tratamientos y el control, así como entre ambos métodos, se determinaron las áreas bajo la curva y concentraciones de solución salina que hemolizan el 50% de eritrocitos, tanto para los tratamientos y el control (Tabla No. 6).

Con estos datos se realizó un Análisis de Varianza y se determinó que existían diferencias significativas entre cada uno de los métodos inmunológicos en relación al control con un alto nivel de significancia ($p=0.0001$) por lo que se aplicó la prueba de Fisher -LSD-, con la cual se determinó que ambos métodos producen un desplazamiento en el patrón de hemólisis dentro de la curva de fragilidad diferente al control ($p < 0.05$), pero no así entre ambos métodos; es decir que las diferencias en los volúmenes de anticuerpo utilizados no son significativos ($p > 0.05$).

La evaluación y control de calidad de la adecuada sensibilización inmunológica para cada uno de los métodos propuestos, se realizó por medio de la prueba de Antiglobulina Humana (Coombs), con lo que se determinó el título de máxima sensibilización para cada tratamiento (Tabla No. 7).

Se hizo una transformación logarítmica del recíproco del título "log (yi)" debido a que el título aumenta en progresión geométrica y se aplicó la prueba de "t pareada" para el análisis estadístico, por medio de la cual se determinó que entre ambos métodos inmunológicos hay una diferencia estadística significativa ($p=0.0001$).

Para el análisis de cambios morfológicos de los eritrocitos, se hizo comparaciones por medio de frotos realizados antes y después del marcaje y aplicación de los métodos de fragilización y sensibilización en los que se evaluó el porcentaje de daño, porcentaje de crenocitos, presencia de cuerpos de Heinz, poiquilocitosis y anisocitosis (Tablas 8-13).

Esto permitió determinar que los métodos físicos aplicados dañan completamente los eritrocitos, produciéndose para calor a 49.5°C por 20' un daño promedio de 93% con microesferocitos e hipocromía moderada y crenocitos en promedio de 34%; mientras que para calor a 56.0°C por 10' se produjo un daño promedio de 99.8% con microesferocitos e hipocromía aumentada y crenocitos en promedio de 48%.

Mientras que con los métodos químicos se determinó que el daño es semejante entre ambos métodos y menor al producido por métodos físicos: daño promedio de 80% y crenocitos promedio de 25%, con microcitos escasos e hipocromía aumentada. En los frotos correspondientes al tratamiento de fenilhidracina se observó escasos cuerpos de Heinz.

Para los métodos inmunológicos se determinó que tanto 50ul y 100ul de IgG anti D alteran completamente la estructura de los eritrocitos, mostrándose éstos ligeramente hipocrómicos, regularmente macrocíticos (muy alargados) y unidos entre sí. También pudo observarse que el porcentaje de crenocitos fue muy bajo.

Finalmente, debido a que los métodos físicos son los que interesan de inmediato para incorporarse en el estudio de pacientes en el Hospital General San Juan de Dios, luego de realizar la regresión lineal y calcular coeficientes de correlación (r) y diferencias estadísticas significativas, se determinó por medio de la ecuación de la recta que con una concentración de solución salina de 0.562 g/dl es posible efectuar el control de calidad del punto óptimo de hemólisis para eritrocitos fragilizados y calculándose que para un intervalo de confianza de 95%, los eritrocitos control deben producir 0 de absorbancia. Para eritrocitos tratados por calor a 49.5°C por 20' esta concentración de solución salina debe producir un rango entre 0.528-0.563 de

absorbancia. Y para eritrocitos tratados por calor a 56.0°C , con 0.562g/dl se permite un rango entre $0.730-0.767$ de absorbancia para considerar la óptima fragilización.

Así mismo, para evaluar las diferencias en los puntos óptimos de fragilización de los métodos físicos, se aplicaron pruebas de Colinealidad, para evaluar paralelismo e intercepto entre las curvas de eritrocitos tratados y control y entre ambos métodos físicos. Con ésto se estableció que no hay paralelismo ni intercepto común entre las curvas de eritrocitos tratados y el control.

Al comparar ambos métodos físicos, se determinó que sí hay paralelismo entre el patrón de hemólisis producido por los tratamientos físicos. Sin embargo, no coinciden en el mismo intercepto, ya que el calor a 56.0°C por $10'$ produce un mayor desplazamiento de la curva, obteniéndose a una mayor concentración de solución salina el punto óptimo de fragilización (Gráfica No. 1).

9. DISCUSION DE RESULTADOS

En base a los resultados de marcación obtenidos para cada una de las muestras sanguíneas se determinó que los porcentajes de marcaje no fueron tan altos como es necesario para conseguir la máxima eficiencia de la centellografía esplénica. Esto se debió a que la técnica de marcación empleada, está estandarizada para marcación *in vivo*, por lo cual, en las primeras muestras se obtuvo bajos porcentajes de marcación; sin embargo, con las muestras siguientes se disminuyó la concentración de pirofosfato de sodio, con lo cual se logró porcentajes de marcación muy cercanos al nivel óptimo de marcación.

Además, para este tipo de técnicas, el control de calidad es importante a partir de la marcación adecuada de los eritrocitos; ya que aunque se realice muy bien el control de calidad de la fragilización de los eritrocitos, si el marcaje es muy bajo, la centellografía de bazo resultará poco útil.

Respecto a los métodos de fragilización y sensibilización de eritrocitos aplicados y que fueron evaluados por medio de frotos sanguíneos y curvas de fragilidad osmótica, quedó demostrado que los agentes físicos, químicos e inmunológicos empleados sí dañan al eritrocito, pero el daño es diferente en magnitud y estructuras celulares afectadas, por lo que no existe un punto igual de fragilización y por lo tanto no se puede establecer un patrón común de evaluación.

La evaluación de los métodos físicos permitió establecer como óptima una concentración de solución de salina de 0.562g/dl para evaluar cada uno de los métodos aplicados, para los cuales se estableció diferentes rangos de absorbancia con un nivel de confianza de 95%, ya que las

curvas se desplazan de forma diferente; habiendo mayor daño al aumentar la temperatura. Con esto se eliminará la realización de la curva de fragilidad osmótica para el control de calidad, ya que la concentración de solución salina determinada es la que servirá como referencia para el control de calidad de fragilización óptima.

Resulta muy útil relacionar lo anterior con evaluación morfológica, ya que los métodos físicos producen un daño casi completo de los eritrocitos, el cual es aún mayor al aumentar la temperatura.

Mientras tanto, con la evaluación de los métodos químicos por medio de curvas de fragilidad osmótica, se demostró que el patrón de hemólisis se altera muy poco en relación control, lo que indica que el daño no ocurre a nivel de la membrana y por lo tanto no hay fragilización.

Además, la evaluación de cambios morfológicos por medio de frotos reveló que la membrana eritrocítica se altera muy poco, y que el daño ocurre a nivel de hemoglobina (formación de cuerpos de Heinz) y quizá de sustancias químicas intra o extraeritrocíticas. Este efecto fue muy evidente para la fenilhidracina dilución 1:50 250 ul, la cual oxidó la hemoglobina y la muestra de sangre tomó un color café oscuro.

Respecto a los métodos inmunológicos, se determinó que al sensibilizar eritrocitos con IgG antiD (50ul-100ul para 1 ml de suspensión de eritrocitos al 50%), es posible lesionar la membrana celular debido a la alta carga protéica en la superficie y por lo tanto, sí hay alteración en el patrón de hemólisis, sin que intervenga el Complemento.

Esto se pudo evidenciar por medio de titulaciones con antiglobulina humana y por medio de curvas de fragilidad

osmótica, por medio de lo cual se determinó que una mayor concentración de IgG anti D aumenta considerablemente los títulos de antiglobulina; mientras que esa diferencia en el volumen de anticuerpo no es suficiente para provocar una lesión mayor a nivel de la membrana.

Así mismo, para completar lo anterior, la evaluación de frotos demostró que los métodos inmunológicos provocan un daño estructural semejante en magnitud a los métodos físicos pero de morfología diferente, ya que debido a las múltiples uniones de los anticuerpos a los sitios antigénicos de la membrana, se forman agregados de eritrocitos con morfología alargada.

Por lo tanto, por medio de este estudio se ha establecido el punto óptimo de fragilización de eritrocitos para los métodos físicos que se emplean actualmente para centellografía esplénica. Con lo que para asegurarse de la adecuada fragilización de los eritrocitos por calor a 49.5°C por 20 min, bastará con someter los eritrocitos tratados a una concentración de solución salina de 0.562 g/dl de NaCl que producirá una absorción entre 0.528 a 0.563, en relación a un control que a esta concentración su absorbancia debe ser cero.

La literatura reporta como alternativa al método anterior el Calor a 56.0°C por 10 min, por lo que debe evaluarse si el alto daño a nivel de la membrana eritrocítica, no disminuye la captación a nivel de bazo y la aumenta a nivel de hígado. Ya que si produjera resultados diagnósticos similares, resultaría un método mucho más ventajoso por el ahorro de tiempo.

Además, por medio de esta investigación, se descarta el uso de la curva de fragilidad osmótica como control de

calidad para los métodos químicos, y por lo mismo resulta necesario hacer ensayos en modelos experimentales, para determinar si los métodos estandarizados en este estudio lesionan los eritrocitos al nivel que se requiere para la centellografía esplénica, y también para evaluar si las concentraciones de estos agentes químicos provocan efectos tóxicos o adversos.

Finalmente, aunque pareciera que la curva de fragilidad osmótica es un buen parámetro para evaluar la sensibilización inmunológica de los eritrocitos, el daño directo a la membrana se ocasiona por acción del Complemento, por lo que se considera conveniente hacer una curva de hemólisis modificada.

Además, este método presenta muchas limitaciones importantes como lo es que sólo se puede realizar a pacientes de grupo O y factor Rh positivo, el anticuerpo (Rhesuman Berna) se obtiene de plasma sanguíneo de donadores apropiados, por lo que al aplicarse a algún paciente puede desencadenar alguna reacción hemolítica. Y en último caso, teniendo en cuenta que los fines de esta investigación son lograr el mejor diagnóstico al menor costo y tiempo en beneficio del paciente, los métodos inmunológicos son sumamente caros, y el procedimiento es mucho más largo, por lo que se complica su ejecución.

10. CONCLUSIONES

- 10.1 Los métodos físicos, químicos e inmunológicos propuestos para lesionar eritrocitos para usarse en Centellografía Esplénica causan daño a diferente nivel en el eritrocito y por lo tanto la curva de fragilidad osmótica no constituye un parámetro común de evaluación.
- 10.2 Los métodos físicos basados en la aplicación de calor causan daño directo a la membrana celular alterando el proceso de ósmosis y por lo tanto las curvas de fragilidad osmótica se desplazan en relación proporcional con el aumento de temperatura.
- 10.3 Los métodos químicos aplicados alteran la hemoglobina y componentes químicos del eritrocito sin que se altere la membrana celular por lo que se mantiene la fragilidad globular media normal.
- 10.4 Los métodos inmunológicos aplicados alteran la membrana celular en menor grado que los métodos físicos y por lo tanto hay menor desplazamiento de las curvas de fragilidad osmótica.
- 10.5 La evaluación de cambios morfológicos constituye un buen parámetro para evaluar el efecto causado por los métodos físicos, químicos e inmunológicos, pues debido a que el daño es a diferente nivel se produce un patrón morfológico característico.

- 10.6 Al someter eritrocitos a diferentes volúmenes de IgG anti D se producen títulos de sensibilización proporcionales a la cantidad de anticuerpo, pero la alteración del proceso osmótico es muy similar.
- 10.7 El punto óptimo de fragilización de eritrocitos marcados con ^{99m}Tc y alterados por calor a 49.5°C se obtiene a una concentración de NaCl de 0.562 g/dl, lo que equivale aproximadamente al tubo 8 de la curva normal de fragilidad osmótica.
- 10.8 Al utilizar un tubo con una concentración de NaCl de 0.562 g/dl, se espera obtener con un intervalo de confianza de 95% una absorbancia de 0.0 para el control, de 0.528-0.563 para eritrocitos tratados con calor a 49.5°C por 20min y de 0.730-0.767 para eritrocitos tratados con calor a 56.0°C por 10min, lo cual garantiza fragilización óptima de los eritrocitos (50% de hemólisis).
- 10.9 Los métodos físicos son los más apropiados para alterar los eritrocitos para usarse en Centellografía esplénica, ya que se ha establecido un adecuado control de calidad, no se conocen efectos adversos, su costo es bajo y requieren de un tiempo similar a los métodos químicos para su ejecución.

11. RECOMENDACIONES

- 11.1 Al realizar curvas de fragilidad osmótica debe tenerse cuidado para evitar que haya aumento de hemólisis por factores ajenos al tratamiento aplicado, como lo es manipulación brusca de la muestra, utilizar tips o frascos mojados y mala preparación de la solución salina (el pH debe ser de 7.4).
- 11.2 Evaluar in vivo la captación por el bazo de eritrocitos que han se han sometido a calor a 56.0°C por 10min, ya que si no se altera la imagen centellográfica, este método resultaría mucho más eficiente, ya que se requiere de menor tiempo para efectuar el control de calidad.
- 11.3 Hacer estudios en modelos experimentales utilizando eritrocitos que han sido tratados con los agentes químicos empleados en este estudio, para determinar la captación esplénica producida, así como también para observar si las concentraciones empleadas producen efectos tóxicos o adversos.
- 11.4 Sensibilizar eritrocitos con IgG anti D y evaluar el daño a la membrana por medio de curvas de fragilidad osmótica utilizando Complemento.
- 11.5 Al realizar la marcación de eritrocitos con ^{99m}Tecnecio y alterarlos por calor a 49.5°C por 20min, efectuar el control de calidad establecido en el presente trabajo para obtener los mejores resultados diagnósticos.

11.6 Para el adecuado control de calidad de la fragilización óptima de eritrocitos, debe relacionarse el punto óptimo de fragilización con los cambios morfológicos encontrados.

11.7 Siempre que se realice marcación de eritrocitos con Pyp-Sn-^{99m}Tecnecio, se debe determinar el porcentaje de marcación obtenido, para lo cual es necesario buscar la concentración óptima de pirofosfato de sodio que permite el nivel óptimo de marcación.

12. REFERENCIAS

1. Cormack DH. Histología de HAM. Benglio JR, Blanco J, Castilleja M, trad. 9 ed. México: HARLA, 1990. XVI + 892 p.
2. Tórtora GJ, Anagnostakos NP. Principios de Anatomía y Fisiología. 5 ed. México: HARLA, 1989. XX + 993 p.
3. Leeson TS, Leeson CR, Paparo AA. Texto/Atlas de Histología. Hernández C, trad. México: Interamericana.Mc.Graw-Hill, 1990. 741 p.
4. Robbins SL, Kumar V. Patología Humana. Folch A, Rivera B, trad. 4 ed. México: Interamericana. McGraw-Hill, 1990. XIV + 798 p.
5. Wagner H. Principles of Nuclear Medicine. Philadelphia: W R Saunders, 1968. 586 p.
6. Masjhur JS. Nuclear Hematology. Handbook of Nuclear Medical Practice in Developing Countries. Viena: CO Publishers, 1991. 764 p.
7. Puchal R. Radioactividad; Conceptos Generales.p 1-8 (En: Curso de Introducción a la Radiofarmacia. Barcelona: Sociedad Española de Radiofarmacia, 1993. 315p).
8. Ramírez I, Piera C. Marcaje Radioisotópico de Hematíes. p 152-175 (En: Curso de Introducción a la Radiofarmacia. Barcelona: Sociedad Española de Radiofarmacia, 1993. 315p).
9. Blasco RF. Radiofármacos: Características Generales. p 66-83 (En: Curso de Introducción a la Radiofarmacia. Barcelona: Sociedad Española de Radiofarmacia, 1993. 315p).
10. Pavía J. Detección y Medida de la Radioactividad. p 9-19 (En: Curso de Introducción a la Radiofarmacia. Barcelona: Sociedad Española de Radiofarmacia, 1993. 315 p).
11. Blasco RF. Generadores de Radionúclidos; Aspectos Generales. p 43-50 (En: Curso de Introducción a la Radiofarmacia. Barcelona: Sociedad Española de Radiofarmacia, 1993. 315p).

12. Piera C. Control de Calidad de los Radiofármacos. p 125-149 (En: Curso de Introducción a la Radiofarmacia. Barcelona: Sociedad Española de Radiofarmacia, 1993. 315p).
13. Soriano B. Mecanismos de Localización y Farmacocinética de los Radiofármacos. p 117-124 (En: Curso de Introducción a la Radiofarmacia. Barcelona: Sociedad Española de Radiofarmacia, 1993. 315p).
14. Ramírez I. Química y Principales Radiofármacos del ^{99m}Tc . p 84-94 (En: Curso de Introducción a la Radiofarmacia. Barcelona: Sociedad Española de Radiofarmacia, 1993. 315p).
15. Swanson DP, Chilton HM, Thrall JH. Pharmaceuticals in Medical Imagin. New York: Macmillan Publishing Co, 1990. 643p.
16. Rifkind RA, et al. Hematología Clínica. Thalheimer AG, trad. 3 ed. México: Interamericana.McGraw-Hill, 1988. VIII + 233 p.
17. Padio LM. Gammagrafía Hepatoesplénica; Estudios Morfofuncionales. p 51-53 (En: Curso de Introducción a la Radiofarmacia. Barcelona: Sociedad Española de Radiofarmacia, 1993. 315p).
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central
18. Tabarini IV. Determinación del Punto Óptimo, dentro de la Curva de Fragilidad Osmótica, Como Garantía de Calidad de la Alteración de la Membrana de Eritrocitos Marcados con ^{99m}Tc . Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia), 1993. 46p.
19. Kabat EA, Mayer MM. Experimental Immunochemistry. 2 ed. Illinois: Charles C. Thomas Pub, 1971. XII + 905 p.
20. Stites DP, Stobo JD, Wells JV. Inmunología Básica y Clínica. 6 ed. México: El Manual Moderno, 1988. 756 p.

21. Lynch MJ, *et al.* *Métodos de Laboratorio*. 2 ed. México: Interamericana, 1987. 2085p.
22. Meneses LF. Casos Clínicos de Recién Nacidos. *Guat. Ped.* 1994,1:32-36.
23. Pérez J. *Manual de Prácticas de Hematología*. 2 ed. Guatemala: USAC, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, 1986. 112 p.
24. Henry JB. *Todd-Sanfor-Davidsohn: clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 17 ed. USA: W B Saunders, 1984. 1502p.
25. Peacock JE, Russell H. *Manual of Laboratory Immunology*. Philadelphia: Lea y Febiger, 1980. 228 p (pc 207-213).
26. Sell SA. *Inmunología, Inmunopatología e Inmunidad*. 2a ed. México: Harla, 1981. 386p.
27. Evatt BL, *et al.* *Fundamental Diagnostic Hematology; Anemia*. Atlanta: CDC, 1992. VII+136.
28. Rose NR, Friedman H, Fabey JL. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3 ed. Washington: American Society for Microbiology, 1986. 1002p.
29. Sampson CB. *Textbook of Radiopharmacy: Theory and Practice*. Amsterdam: Gordon and Breach Science Publishers, 1990. 387 p.
30. Quintero CM, Freire DY. Modificación de la Marcación de Eritrocitos Autólogos con ^{99m}Tecnecio para la Evaluación Centellográfica del Sistema Venoso Profundo. *CC y Tec. Nuc.* 1994;1:57-61 p.
31. Comin JM, *et al.* *Radiolabeled Blood Elements: Recent Advances in Techniques and Applications*. Barcelona: NCATO ASI Series, 1992. 360 p.

32. Adrian NC. Primer of Serology. Maryland: Harper & Row, 1976. 208 p.
33. Bach JF. Inmunología. México: Limusa, 1984. 908p
34. Creutzling H. Labeling of RBC. J Nuc Med. 1984;9:294.

13. ANEXOS

13.1 CURVA DE FRAGILIDAD OSMOTICA DE ERITROCITOS

Solución base salina tamponada:

NaCl.....	9.00 g
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O.....	0.24 g
Na ₂ HPO ₄	1.36 g

Aforar a 100 ml.

Este buffer produce una solución equivalente al 10 por ciento de NaCl. Preparar una dilución 1:10 con agua destilada. El pH es 7.4

Procedimiento:

Preparar los tubos de la siguiente manera:

# TUBO	S.S (ml)	AGUA (ml)	[NaCl] %
1	9.0	1	0.9
2	8.5	1.5	0.85
3	8.0	2.0	0.80
4	7.5	2.5	0.75
5	7.0	3.0	0.70
6	6.5	3.5	0.65
7	6.0	4.0	0.60
8	5.5	4.5	0.55
9	5.0	5.0	0.50
10	4.5	5.5	0.45
11	4.0	6.0	0.40
12	3.5	6.5	0.35
13	3.0	7.0	0.30
14	0	10.0	0.00

- Colocar 0.1 ml de sangre heparinizada.
- Mezclar cada tubo por inversión y dejar reposar a temperatura ambiente por 30 minutos.
- Mezclar y centrifugar a 2000 rpm por 5 minutos.
- Leer los sobrenadantes a 540 nm utilizando como blanco el tubo # 1 y como estándar el tubo # 14 (23).

13.2 FRAGILIZACION DE ERITROCITOS CON EXCESO DE ACD

Preparar la solución de ACD concentrada:

Acido Cítrico.....	0.8 g
Citrato trisódico.....	2.2 g
Dextrosa.....	2.5 g

Disolver en 30 ml de agua destilada. El pH debe ser de 7.4.

Procedimiento de Estandarización:

- Extraer 10 ml de sangre y agregarle heparina.
- Hacer frote sanguíneo y curva de fragilidad osmótica.
- Realizar el proceso de marcación.
- Hacer otro frote sanguíneo.
- Alicuotar la muestra en 3 viales.
- Agregar ACD de la siguiente manera:

VIAL # 1: 100 ul de ACD.
 VIAL # 2: 200 ul de ACD.
 VIAL # 3: 300 ul de ACD* .

- Hacer frote sanguíneo final.
- Controlar el punto óptimo de hemólisis realizando la curva de fragilidad osmótica.

*Se continuó las pruebas aumentando el volumen de solución concentrada de ACD, con lo que se determinó que son necesarios 800ul de la anterior solución concentrada para que haya cierto desplazamiento de la curva de fragilidad osmótica.

Así mismo, estos procedimientos se efectuaron de esta forma, ya que la literatura no hace referencia respecto a la forma de aplicación y evaluación de este método de fragilización de eritrocitos.

13.3 FRAGILIZACION DE ERITROCITOS CON FENILHIDRACINA

- Extraer 20 ml de sangre y agregarle heparina.
- Hacer frote inicial y curva de fragilidad osmótica.
- Realizar el proceso de marcación.
- Hacer frote sanguíneo.
- Preparar diluciones de fenilhidracina en solución salina isotónica (1:20, 1:50, 1:100.....).
- Alicuotar la sangre ya marcada colocando 3 ml en cda vial.
- Aregar 250 ul de la dilución respectiva a cada muestra*.
- Homogenizar y dejar 10 a 20 minutos a temperatura ambiente.
- Hacer frote sanguíneo final y curva de fragilidad osmótica para cada muestra.

*Con el método anterior se determinó que con 250ul de fenilhidracina dilución 1:50 se logra el mayor desplazamiento de la curva de fragilidad osmótica, y por lo tanto este fue el procedimiento que se aplicó.

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

13.4 PRUEBA DE COOMBS DIRECTA.

Preparar una suspensión al 3 por ciento en solución salina de eritrocitos sensibilizados y lavados (por lo menos lavarlos cuatro veces para asegurar la completa eliminación de todas las proteínas séricas no adsorbidas por los eritrocitos.

-Realizar diluciones de la suspensión de eritrocitos lavados en tubo de ensayo pequeños (1:0, 1:2, 1:4.....).

-Añadir a cada dilución una gota de suero de antiglobulina humana (reactivo de Coombs).

-Mezclar bien y centrifugar inmediatamente a 1000 rpm por 1 minuto.

-Remover suavemente los eritrocitos sedimentados y observar si existe aglutinación macroscópica.

INTERPRETACION

La aglutinación de los eritrocitos indica que están recubiertos con anticuerpos (23).

13.5 DISEÑO DE BLOQUES COMPLETOS AL AZAR.

Tratamientos:

M1 : Baño de maría a 49.5°C por 20 min.

M2 : Baño de maría a 56.0°C por 10 min.

M3 : Exceso de ACD.

M4 : Fenilhidracina.

M5 : Control: Eritrocitos no marcados ni alterados.

Sangre O Rh+ de donadores	ALICUOTAS (ORDEN DE APLICACION DE LOS TRATAMIENTOS)				
BLOQUE 1	M3	M4	M1	M5	M2
BLOQUE 2	M1	M4	M3	M2	M5
BLOQUE 3	M2	M5	M3	M4	M1
BLOQUE 4	M2	M1	M5	M3	M4
BLOQUE 5	M5	M2	M1	M3	M4
BLOQUE 6	M2	M5	M1	M4	M3
BLOQUE 7	M5	M2	M4	M3	M1
BLOQUE 8	M4	M1	M5	M2	M3
BLOQUE 9	M2	M3	M5	M1	M4
BLOQUE 10	M1	M2	M4	M5	M3

Tabla No. 1
PORCENTAJE DE MARCACION
Con Pyp-Sn-Tecnecio 99 metaestable

No. MUESTRA	% MARCACION
1	63.16
2	71.65
3	78.73
4	91.07
5	94.62
6	86.69
7	89.42
8	88.48
9	90.69
10	90.15
promedio	84.47
D.STD	9.57

TABLA No. 2: CALCULO DE COEFICIENTE DE CORRELACION "r", "P" Y NIVEL DE SIGNIFICANCIA "P"

No.	TRATAMIENTOS														
	CONTROL			CALOR 49.5 20'			CALOR 56.0 10'			FENIL HIDRACINA			ACD SOL COHC 800Hl		
	a,b	r	P												
1	n=3.408 b=-6.72	0.9970	0.0018	n=1.852 b=-2.133	0.9960	0.0001	n=1.947 b=-2.091	0.9970	0.0001	n=2.507 b=3.954	0.9960	0.0167	n=2.293 b=-3.593	0.9720	0.0001
2	n=3.052 b=-6.02	0.9970	0.0002	n=1.753 b=-2.087	0.9960	0.0001	n=1.783 b=-1.923	0.9920	0.0001	n=2.181 b=-3.806	0.9890	0.0002	n=2.243 b=-3.946	0.9650	0.0019
3	n=2.436 b=-4.68	0.9910	0.0010	n=1.632 b=-2.035	0.9950	0.0010	n=1.745 b=-1.832	0.9790	0.0001	n=2.788 b=-4.88	0.9170	0.0283	n=2.294 b=-4.04	0.8990	0.0378
4	n=3.156 b=-6.16	0.9780	0.0040	n=1.6 b=1.943	0.9670	0.0001	n=1.725 b=-1.746	0.9380	0.0001	n=2.87 b=-5.52	0.9800	0.0034	n=2.511 b=-4.406	0.9750	0.0009
5	n=2.379 b=-4.131	0.9760	0.0002	n=1.366 b=-1.577	0.9920	0.0001	n=1.698 b=-1.744	0.9620	0.0001	n=2.309 b=-4.046	0.9760	0.0008	n=2.351 b=-4.021	0.9600	0.0006
6	n=2.828 b=-5.4	0.9720	0.0057	n=1.592 b=-1.728	0.9940	0.0001	n=1.671 b=-1.73	0.9820	0.0001	n=2.506 b=-4.52	0.9920	0.0027	n=2.141 b=-3.64	0.9340	0.0064
7	n=2.67 b=-5.0	0.9880	0.0002	n=1.644 b=-2.002	0.9790	0.0001	n=1.748 b=-1.896	0.9680	0.0001	n=2.494 b=-4.406	0.9400	0.0053	n=2.18 b=-3.777	0.9250	0.0063
8	n=2.642 b=-4.94	0.9640	0.0080	n=1.289 b=-1.451	0.9960	0.0001	n=1.505 b=-1.333	0.9700	0.0001	n=2.193 b=-3.657	0.9650	0.0004	n=2.27 b=-3.9	0.8930	0.0414
9	n=2.657 b=-5.029	0.886	0.0003	n=1.661 b=-1.877	0.97	0.0001	n=1.965 b=-2.03	0.98	0.0001	n=3.03 b=-5.54	0.973	0.0052	n=2.066 b=-3.38	0.943	0.0163
10	n=3.676 b=-7.28	0.905	0.0348	n=1.535 b=-1.784	0.966	0.0001	n=1.708 b=-1.593	0.966	0.0001	n=2.762 b=4.966	0.94	0.0052	n=2.459 b=-4.269	0.931	0.0069

b = INTERCEPTO
b = PENDIENTE

Tabla No.3 AREAS BAJO LA CURVA DE FRAGILIDAD

No.	TRATAMIENTOS				
	CONTROL	49.5C 20'	56.0C 10"	FENILHID.	EX. ACD
1	0.1440	0.3394	0.4154	0.2066	0.1842
2	0.1234	0.3041	0.3775	0.1409	0.1521
3	0.1128	0.2466	0.3875	0.1652	0.1356
4	0.1384	0.2605	0.4064	0.1324	0.1596
5	0.1574	0.2519	0.3910	0.1474	0.1624
6	0.1336	0.3288	0.3798	0.1396	0.1488
7	0.1362	0.2711	0.3618	0.1554	0.1437
8	0.1332	0.2510	0.4231	0.1642	0.1420
9	0.1299	0.3209	0.4482	0.1628	0.1428
10	0.1528	0.2788	0.4873	0.1628	0.1618
MEDIA	0.1362	0.2853	0.4078	0.1577	0.1533
D.8TD	0.0132	0.0351	0.0377	0.0208	0.0142

Tabla No. 4
CONCENTRACION DE SOL. SALINA PARA FRAGILIZACION OPTIMA
(50% DE HEMOLISIS)

No.	TRATAMIENTOS				EX. ACD
	CONTROL	49.5C 20'	56.0C 10'	FENILHID.	
1	0.4059	0.5752	0.6322	0.4696	0.4475
2	0.3990	0.5764	0.6412	0.4285	0.4402
3	0.3923	0.5317	0.6523	0.4535	0.4441
4	0.4149	0.5661	0.6796	0.4112	0.4107
5	0.4559	0.5491	0.6829	0.4348	0.4603
6	0.4126	0.6027	0.6480	0.4383	0.4110
7	0.4140	0.5714	0.6582	0.4526	0.4514
8	0.4285	0.5610	0.7538	0.4635	0.4577
9	0.4040	0.5659	0.6724	0.4386	0.4485
10	0.4122	0.5241	0.6935	0.4555	0.4530
MEDIA	0.4139	0.5623	0.6712	0.4446	0.4424
D.STD	0.0177	0.0228	0.0351	0.0176	0.0177

TABLA No. 5 COEFICIENTES DE CORRELACION "r" Y NIVEL DE SIGNIFICANCIA "P"

No.	TRATAMIENTOS											
	CONTROL			IgG 50ul			IgG 100ul					
	Y,X	r	P	X,Y	r	P	X,Y	r	P	X,Y	r	P
1	a=3.408 b=-6.72	0.9870	0.0018	a=2.569 b=-4.194	0.9800	0.0006	a=2.171 b=-3.36	0.9120	0.0113			
5	a=2.370 b=-4.121	0.9760	0.0002	a=2.549 b=-4.194	0.9790	0.0007	a=2.562 b=-4.143	0.9790	0.0006			
5	a=2.370 b=-4.121	0.9760	0.0002	a=2.519 b=-4.114	0.9810	0.0050	a=2.516 b=-3.943	0.9630	0.0002			
7	a=2.67 b=-5.0	0.9880	0.0002	a=2.25 b=-3.651	0.9370	0.0058	a=2.132 b=-3.366	0.9550	0.0030			
7	a=2.67 b=-5.0	0.988	0.0002	a=2.19 b=-3.423	0.9580	0.0027	a=2.247 b=-3.2526	0.9510	0.0036			

b=PENDIENTE

a=INTERCEPTO

TABLA No. 6
AREAS BAJO LA CURVA Y CONC.DE SOLUCION SALINA
PARA FRAGILIZACION OPTIMA CON ANTICUERPOS

Paciente No	AREAS		CONC. SOL. SALIN	
	50ul IgG	100ul Ig	50ul IgG	100ul Ig
1	0.19664	0.1857	0.4695	0.4675
5	0.1916	0.2003	0.4647	0.4736
5	0.1926	0.2101	0.4664	0.4859
7	0.1746	0.1754	0.4724	0.4699
7	0.1838	0.2162	0.4791	0.5217
PROMEDIO	0.187848	0.19754	0.47042	0.48372
D. STD	0.007821	0.015126	0.005079	0.020019

Tabla No. 7
SENSIBILIZACION DE ERITROCITOS O+ CON
INMUNOGLOBULINA G ANTI Rh

No. MUESTRA	TITULO DILUCION COOMB DIRECTO	
	50ul IgG	100ul IgG
1	1:32	1:64
2	1:16	1:64
3	1:16	1:64
4	1:16	1:64
5	1:16	1:32
6	1:16	1:64
7	1:8	1:64
8	1:16	1:64
9	1:16	1:64
10	1:16	1:64
MEDIA GEOMETRIC	16	59.71

EVALUACION DE CAMBIOS MORFOLOGICOS

TABLA No. 8

ASPECTOS	TRATAMIENTO										MEDIA
	CALOR A 49.5 C POR 20 min										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
% DE DANO	90	91	93	95	98	90	95	90	90	96	93
% CRENOCITOS	40	25	40	25	40	40	38	40	25	30	34
c. Heinz	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Macroцитos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Microцитos	**	**	**	**	***	**	**	**	**	**	**
Hipocromia	**	**	**	**	***	**	**	**	**	**	**
Hipercromia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
% DANO INICIAL	3	5	0	1	4	2	3	5	7	2	3.1

Tabla No. 9

ASPECTOS	TRATAMIENTO										MEDIA
	CALOR A 56.0 C POR 10 min										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
% DE DANO	98	100	100	100	100	100	100	100	100	100	99.8
% CRENOCITOS	60	25	60	25	60	55	50	60	50	50	48.5
c. Heinz	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Macroцитos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Microцитos	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
Hipocromia	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
Hipercromia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
% DANO INIC.	3	5	0	1	4	2	3	5	7	2	3.1

* = ESCASO

** = regular

*** = abundante

Tabla No. 10

ASPECTOS	TRATAMIENTO										MEDIA
	FENILHIDRACINA dil 1:50 250ui										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
% DE DANO	80	75	80	80	80	80	75	75	85	80	79
% CRENOCITOS	30	10	30	25	30	30	25	25	30	20	25
c. Heinz	*	0	*	*	*	*	0	*	*	*	*
Macroцитos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Microцитos	**	**	***	***	***	***	***	***	**	**	***
Hipocromia	**	**	**	**	***	**	**	**	**	**	**
Hipercromia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
% DANO INIC.	3	5	0	1	4	2	3	5	7	2	3.1

Tabla No. 11

ASPECTOS	TRATAMIENTO										MEDIA
	ACIDO CITRICO DEXTROSA SOL CONC 800ui										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
% DE DANO	80	80	80	85	80	90	95	70	80	80	82
% CRENOCITOS	30	10	30	25	30	30	25	25	30	25	26
c. Heinz	0	0	*	*	*	*	0	0	0	0	0
Macroцитos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Microцитos	*	**	*	*	*	**	*	**	**	**	**
Hipocromia	**	**	**	**	*	**	*	**	**	**	**
Hipercromia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
% DANO INIC.	3	5	0	1	4	2	3	5	7	2	3.1

* = escaso
 ** = regular
 *** = abundante

Tabla No. 12

ASPECTOS	TRATAMIENTO										MEDIA
	50ul de IgG anti D										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
% DE DANO	98	100	100	100	100	95	90	90	95	98	96.3
% CRENOCITOS	10	5	10	10	10	10	5	7	10	5	8.2
c. Heinz	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Macrocitos	*	*	**	*	*	*	*	*	*	*	*
Microcitos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hipocromia	*	0	*	*	*	0	0	0	0	0	0
Hipercromia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
% DANO INIC.	3	5	0	1	4	2	3	5	7	2	3.1

Tabla No. 13

ASPECTOS	TRATAMIENTO										MEDIA
	100ul de IgG anti D										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
% DE DANO	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
% CRENOCITOS	10	5	10	15	10	10	5	10	10	5	9
c. Heinz	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Macrocitos	*	*	**	**	**	**	**	**	**	**	**
Microcitos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hipocromia	0	0	0	0	*	0	0	0	0	0	0
Hipercromia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
% DANO INIC.	3	5	0	1	4	2	3	5	7	2	3.1

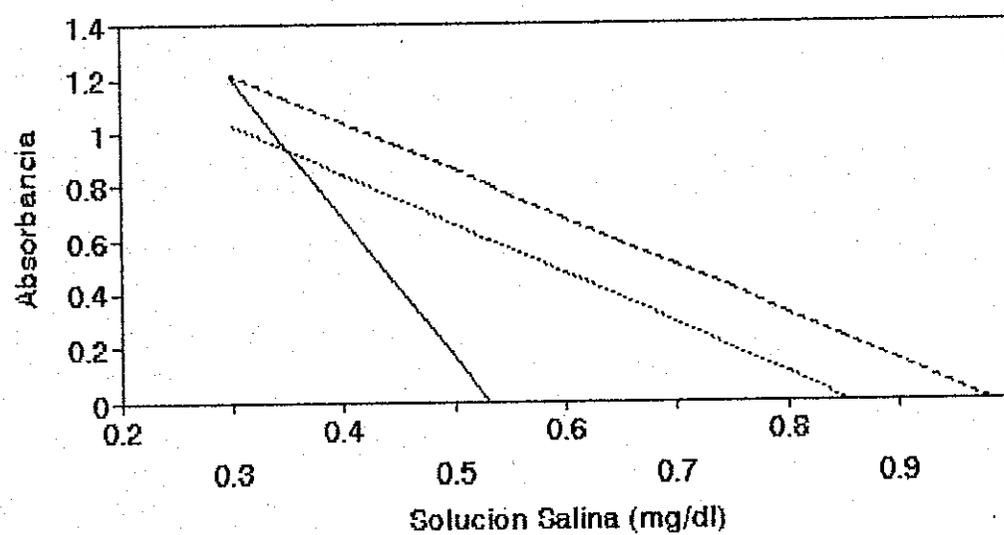
* = escaso

** = regular

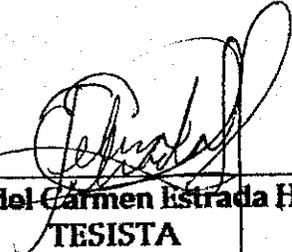
*** = abundante

GRAFICA No. 1

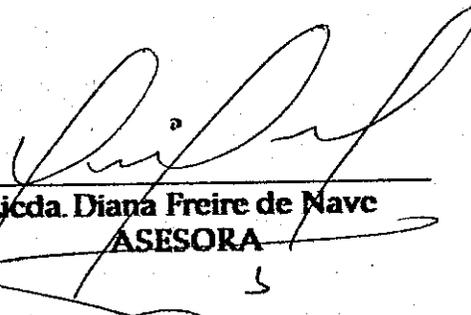
CURVAS DE FRAGILIDAD OSMOTICA DEL CONTROL Y TRATAMIENTOS TERMICOS



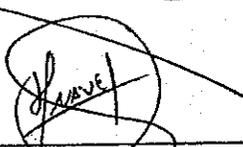
— CONTROL 49.5 grados - - - - 56 grados



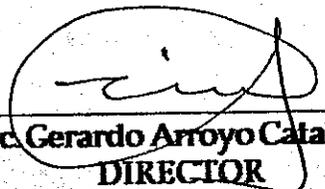
Felisa del Carmen Estrada Herrera
TESISTA



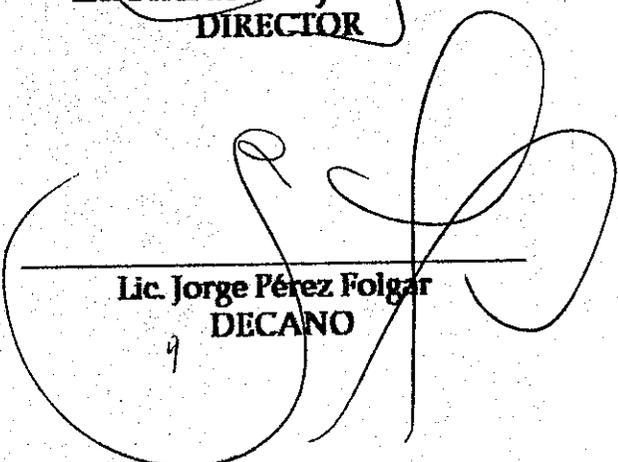
Licda. Diana Freire de Nave
ASESORA



Lic. Oscar Federico Nave Herrera
ASESOR



Lic. Gerardo Arroyo Catalán
DIRECTOR



Lic. Jorge Pérez Folgar
DECANO