

Anemia y metabolismo férrico

Coordinadora: Dra. Francis Kescherman

Asistente de la Cátedra de Hematología. Facultad de Medicina. UdelaR. Montevideo.

Encare general de anemia

Dra. Carolina Córdoba

Residente de Hematología. Facultad de Medicina. UdelaR. Montevideo.

IMPORTANCIA DEL TEMA

La Anemia es un importante problema de salud que afecta a un 24,8% de la población mundial, tanto de países desarrollados como en vías de desarrollo, con consecuencias tanto en salud como en el desarrollo social y económico de los países. ⁽¹⁾ Afecta a todas las edades pero su frecuencia es mayor en mujeres embarazadas y en niños en edad preescolar. ⁽¹⁾ Según estudios de prevalencia de la Organización Mundial de la Salud (OMS), no hay país en el mundo donde la anemia no sea al menos un leve problema de salud pública en niños en edad preescolar y mujeres embarazadas o en edad reproductiva. Por otro lado, en más del 80% de los países la anemia en mujeres embarazadas es un problema de salud moderado a severo. ⁽¹⁾ En países no industrializados la prevalencia de anemia es de 52% en mujeres embarazadas y 39% en niños menores de 5 años, en países industrializados es de un 23% y 20% respectivamente. ⁽²⁾ Dentro de las consecuencias de la anemia en estas dos poblaciones encontramos en los niños aumento en la morbilidad, alteraciones en el desarrollo cognitivo y del sistema inmune. En las mujeres embarazadas aumento del riesgo de hemorragia, sepsis y mortalidad durante el embarazo. Además la anemia determina un aumento de la mortalidad perinatal y bajo peso al nacer en el recién nacido. ⁽³⁾ La causa más frecuente de anemia es la deficiencia de hierro, responsable de hasta el 50% de los casos de anemia.

DEFINICIÓN

La OMS estableció límites de referencia del valor de hemoglobina (Hb) según la edad y el sexo. (Tabla I) Según este criterio, existe anemia cuando la concentración de Hb en sangre se halla por debajo de los límites establecidos, independientemente de que la concentración de eritrocitos sea normal o incluso elevada. ⁽⁴⁾

El nivel de Hb además de variar en función de la edad y el sexo se ve también afectado por otros factores como el embarazo, hábito tabáquico, altitud y raza^(2,6). Durante la adolescencia la producción de Hb se eleva aun más como resultado del acelerado crecimiento. Los hombres tienen mayores concentraciones de Hb con respecto a las mujeres debido a

la influencia hormonal de la testosterona, que determina un mayor tamaño corporal y una mayor masa eritrocitaria. En el embarazo debido a que la expansión del volumen plasmático es superior a la de la masa globular existe una dilución de la Hb. En los fumadores las concentraciones de Hb aumentan debido a que el monóxido de carbono inhalado provoca incremento de la carboxihemoglobina, la cual no tiene capacidad de transportar oxígeno. Para compensar este déficit de oxigenación tisular, los niveles de Hb se elevan.

Tabla I. Niveles de referencia de Hb según las OMS.

Edad y sexo	Nivel de hemoglobina(g/l)
Niños (0,5 - 4,99 años)	110
Niños (5 - 11,99 años)	115
Niños (12 - 14,99 años)	120
Mujer no embarazada (≥ 15 años)	120
Mujer embarazada	110
Hombre (≥ 15 años)	130

En regiones geográficas sobre los 1000 m de altura del nivel del mar, esta concentración se incrementan como respuesta adaptativa a la menor presión parcial de oxígeno. El incremento compensatorio en la producción de glóbulos rojos asegura entonces un suficiente aporte de oxígeno a los tejidos.

FISIOPATOLOGÍA

Existe una disminución en la capacidad de la sangre para transportar oxígeno a los tejidos, lo que determina hipoxia tisular. La sintomatología depende de la velocidad de instauración de la misma, de su intensidad, de la capacidad del organismo para adaptarse y del terreno previo del paciente.

Existen dos tipos de mecanismos de compensación, los inmediatos y los tardíos. Entre los primeros encontramos el estímulo de la eritropoyesis secundario al aumento de eritropoyetina que acorta el período de maduración de los eritrocitos con salida precoz de estos a la sangre y la redistribución del volumen sanguíneo con vasoconstricción generalizada y aumento del gasto cardíaco. La vasoconstricción se realiza en las áreas menos necesitadas como el riñón y la piel contribuyendo a la palidez, con el objetivo de derivar la sangre hacia regiones vitales como el corazón y cerebro. El aumento del gasto cardíaco clínicamente se evidencia por taquicardia

y aparición de soplos sistólicos funcionales. Entre los mecanismos de compensación tardíos destaca el mejor aprovechamiento de la Hb disponible secundario al aumento del 2,3-difosfoglicerato.⁽⁴⁾

CLÍNICA

Se denomina síndrome funcional anémico al conjunto de signos y síntomas que traducen anemia. La mayoría de los síntomas son consecuencia de los mecanismos adaptativos a la anemia y por lo tanto comprometen la mayor parte de los sistemas del organismo.

Síntomas: A nivel cardiovascular son constantes las manifestaciones, tanto en la anemia aguda como en la crónica. Los síntomas dependen de la intensidad de la misma y del terreno del paciente y van desde disnea a mínimos esfuerzos a disnea de reposo, palpitaciones y angor. En los enfermos de edad avanzada o con trastornos cardiocirculatorios previos, la aparición de anemia puede facilitar la descompensación del proceso cardiovascular, con signos de insuficiencia cardíaca congestiva, insuficiencia coronaria o facilitar la aparición de accidentes vasculares encefálicos. El compromiso neurológico aunque puede aparecer a cualquier edad, es mucho menos frecuente que el de tipo cardiovascular y, casi siempre, limitado a pacientes con anemia muy intensa o edad avanzada. Consiste principalmente, en pérdida de memoria, cambios del humor, cefaleas, vértigo, trastornos visuales, insomnio, incapacidad para concentrarse y, en ocasiones, desorientación. Cuando la Hb desciende por debajo de 5 g/dl la hipoxia cerebral puede determinar pérdida de conocimiento e incluso un estado de coma que puede terminar con la vida del paciente por anoxia cerebral. A nivel músculo esquelético las manifestaciones más frecuentes son la fatigabilidad fácil y la astenia. Los síntomas digestivos como anorexia, náuseas y ocasionalmente estreñimiento son con mayor frecuencia manifestaciones propias de la enfermedad de base. El compromiso renal es secundario a la vasoconstricción secundaria a la anemia que disminuye el flujo y la filtración glomerular, estimulando la secreción de aldosterona. Ello favorece la retención acuosa y la aparición de edemas en las extremidades.

A nivel ginecológico en algunas mujeres con anemia muy intensa, es frecuente observar una disminución del volumen y ritmo menstrual, con tendencia a la amenorrea. Esta situación constituye, de hecho, un mecanismo de protección del organismo frente a la pérdida de Hb, mediante un fenómeno de regulación de la actividad menstrual con disminución o incluso desaparición de la menstruación.

Los signos: los evidenciamos al examen físico. Uno de los más característicos es la palidez cutáneo mucosa. La misma es consecuencia del descenso de la Hb así como de la vasoconstricción cutánea secundaria a la redistribución del volumen sanguíneo. Las mucosas de la conjuntiva ocular, del velo del paladar y la región subungueal son los mejores lugares para evidenciarla. La intensidad de la palidez guarda relación con la de la anemia, por lo que puede ser muy variable. Así, cuando la Hb es menor a 9 g/dl la piel adquiere una tonalidad cérea característica y cuando se encuentra entre 9 y 11 g/dl puede pasar desapercibida al examen.

Otros signos son la taquicardia al esfuerzo o en reposo, taquipnea y soplos funcionales sistólicos en punta o base.

Según la etiología podemos observar elementos carenciales, dolores óseos, elementos de hemólisis y signos o síntomas que traduzcan compromiso de la serie blanca o plaquetaria.

Clásicamente luego de contar con estos datos catalogamos la anemia según:

TIPO EVOLUTIVO: en CRÓNICA o AGUDA por el tiempo de evolución de los síntomas. En general se considera crónica cuando la sintomatología lleva más de un mes de evolución. **TOLERANCIA:** se define la tolerancia en función de las manifestaciones que presente del síndrome funcional anémico. **SEVERIDAD:** depende de la intensidad de los síntomas, de la necesidad de transfusiones y una vez que contamos con la paraclínica depende del nivel de Hb: leve: mayor a 10 g/dl, moderada entre 7-10 g/dl, severa menor a 7 g/dl. **PUREZA:** la pureza de una anemia depende de que se acompañe o no de elementos que evidencien compromiso de otras series como fiebre o sangrados. **ORIENTACIÓN ETIOLOGÍA:** según presencia o no de elementos de hemólisis, elementos de carencia, dolores óseos

BIBLIOGRAFÍA

1. Bruno de Benoist, Erin McLean, Ines Egli and Mary Cogswell. Worldwide prevalence of anaemia 1993–2005 : WHO global database on anaemia.
2. Kevin M. Sullivan, Zugu Mei, Laurence Grummer-Strawn and Ibrahim Parvanta. Haemoglobin adjustments to define anaemia. *Tropical Medicine and International Health*. Volume 13 no 10 pp 1267–1271 October 2008.
3. Iron Deficiency Anaemia. Assessment, Prevention, and Control. A guide for programme managers. WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001.
4. J. Sans-Sabrafen. La anemia. Aspectos generales del diagnóstico. Hematología clínica. 5ta Edición. 2006.
5. Ernest Beutler and Jill Waalen. The definition of anemia: what is the lower limit of normal of the blood hemoglobin concentration? *BLOOD*. 2006 107: 1747-1750.
6. Fundación Ecuatoriana Contra la Anemia aprobada mediante el Acuerdo Ministerial No. 0000179, expedido por el Ministro de Salud el 17 de marzo del 2006.

Anemia. Clasificación morfológica.

Dra. Carolina Sosa

Residente de Hematología. Facultad de Medicina. UdelaR. Montevideo.

Para comenzar con la orientación etiológica de la anemia existen 2 abordajes de la misma: la clasificación morfológica y la fisiopatológica. En el razonamiento clínico etiológico deben tenerse en cuenta ambas clasificaciones ya que las mismas se intrincan y aportan datos complementarios.

En cuanto a la clasificación morfológica se basa en la interpretación de los índices hematimétricos o de Wintrobe y en el análisis de la morfología eritrocitaria en el frotis de sangre periférica (SP).¹ Existen algunas desventajas en la clasificación morfológica: primero, las alteraciones morfológicas pueden pasar desapercibidas al inicio del cuadro, y segundo las mismas orientan pero no son patognomónicas.²

INDICES HEMATIMÉTRICOS DE WINTROBE

El Dr Maxwell Wintrobe introdujo en el año 1932 los denominados Índices hematimétricos de Wintrobe: Volumen Corpuscular Medio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Media (HCM) y Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media (CHCM), todas constituyen medidas cuantitativas de la población eritroide. El VCM es una medida del tamaño medio de los eritrocitos circulantes.¹ Relaciona el hematocrito con el número de eritrocitos y se mide en fentolitros (fL). La HCM es una medida del contenido medio de Hemoglobina (Hb) de

los eritrocitos circulantes.¹ Se obtiene de la relación entre la hemoglobina total y el número de eritrocitos circulantes. La unidad de medida es el picogramo (pg). La CHCM relaciona el VCM y la HCM entre sí. Se mide en g/L.¹

En la clasificación morfológica, el índice de mayor importancia es el VCM que divide las anemias en tres grupos de acuerdo al tamaño eritrocitario:

- Anemia macrocítica: VCM mayor a 100 fL.
- Anemia normocítica: VCM 90-100 fL
- Anemia microcítica: VCM menor a 90 fL

Esta clasificación permite al clínico plantear y descartar ciertas patologías. Los pasos diagnósticos a seguir son diferentes de acuerdo al tipo de anemia y al cuadro clínico del paciente. Relacionar el VCM con otros índices como la reticulocitosis y el Ancho de distribución Eritrocitaria (ADE) puede ser útil en la orientación etiológica.¹ (Tabla I).

Tabla I VCM Y ADE en el diagnóstico de anemia 4

	VCM bajo (<80 fL)	VCM normal (80–99 fL)	VCM alto (>100 fL)
ADE Normal	Anemia de enf. crónica.	Sangrado agudo	Aplasia medular
	α- o β-Talasemia	Anemia de enf crónica	Hepatopatía crónica
	Hemoglobina E	Anemia e insuficiencia renal	QT/antivirales/alcohol
ADE elevado	Déficit de Fe	Deficiencia precoz de Fe, folato, o vitamin B ₁₂	Deficiencia de folato y Vit B12
	Drepanocitosis β-talasemia	Déficit de Fe + folato	AHAI
		Anemia drepanocítica	QT citotóxica
		AHAI	Hepatopatía crónica
		Hepatopatía crónica	Mielodisplasia
		Mielodisplasia	A. drepanocítica

Reticulocitosis e índices hematimétricos⁴

	Reticulocitosis corregida <2%	Reticulocitosis corregida ≥2%
VCM bajo, ADE normal	Anemia de enf crónicas	
VCM normal, ADE normal	Anemia de enf crónicas	
VCM alto, ADE normal	QT/antivirales/alcohol	
	Aplasia medular	
VCM bajo, ADE alto	Déficit de Fe	A. drepanocítica + β-talasemia
VCM normal, ADE alto	Déficit precoz de Fe, folato, Vit B ₁₂	A. drepanocítica
	Mielodisplasia	
VCM alto, ADE alto	Deficiencia de folato o Vit B ₁₂	AHAI
	Mielodisplasia	A. drepanocítica

LÁMINA PERIFÉRICA

Se solicita de acuerdo a los hallazgos clínicos y/o al resultado del hemograma. En la anemia hemolítica la forma eritrocitaria tiene mucha importancia diagnóstica. Algunos tipos presentan un frotis de SP característico que puede ser suficiente para el diagnóstico. Esto es así en la eliptocitosis hereditaria, piropoiquilocitosis hereditaria y en la ovalocitosis del sudeste Asiático.⁵ La presencia de esferocitos no tiene un valor patognomónico ya que pueden observarse en la esferocitosis hereditaria, en la anemia hemolítica autoinmune y aloinmune.⁵ La presencia de microsferocitos (GR pequeños e hiperocrómicos) puede verse en algunos pacientes con esferocitosis hereditaria y en pacientes con anemia hemolítica microangiopática.⁵ En este último caso también pueden observarse fragmentocitos. Estas características también pueden observarse en la anemia hemolítica mecánica por la presencia de prótesis valvulares. En las anemias inducidas por daño oxidativo (déficit de G6PD) pueden verse keratocitos ("bite" cells) y GR de bordes irregulares. La presencia de aglutinación de GR hace sospechar la presencia de crioprecipitación y la eritroaglutinación puede verse en la hemoglobinuria paroxística nocturna. En la anemia macrocítica la LP también juega un rol importante. Las anemias megaloblásticas se caracterizan por la presencia de macrocitos ovales y neutrófilos hipersegmentados. Cuando la anemia es más severa puede observarse poiquilocitosis, dacriocitos y fragmentocitos. Las hepatopatías y el consumo de alcohol son causas frecuentes de macrocitosis pudiendo observar en la LP la presencia de macrocitosis no oval, células en diana y estomatocitos. Los neutrófilos presentan una segmentación nuclear normal. Los síndromes mielodisplásicos en personas afeosas son una causa importante de anemia macrocítica. En la LP es característica la presencia de neutrófilos hipogranulares e hiposegmentados, pueden verse cuerpos de Pappenheimer, microcitos, megaplaquetas y blastos. Cuando existe macrocitosis en el contexto de hemólisis o sangrado agudo se puede observar policromasia por aumento de los reticulocitos en SP.

ANEMIA MACROCÍTICA

Frente a este tipo de anemias lo primero a diferenciar es si la causa está dada por una alteración en la síntesis de ADN a nivel de los precursores en la MO, lo que determina en los mismos cambios megaloblásticos o a otras causas que no determinan megaloblastosis.³

Las anemias megaloblásticas son secundarias a déficit de ácido fólico y Vitamina B12 o pueden deberse al uso de fármacos que interfieren en la síntesis de ADN (agentes citotóxicos o inmunosupresores) o drogas que interfieren en el metabolismo del ácido fólico.³ En estas situaciones se produce un defecto en la maduración nuclear de las células hematopoyéticas, lo que lleva a un asincronismo madurativo núcleo-citoplasma. Se caracterizan por presentar una eritropoyesis ineficaz que produce hemólisis intramedular con el consiguiente aumento de hierro sérico, bilirrubina indirecta y LDH. Al inicio de la enfermedad la macrocitosis puede ser moderada (en gral mayor a 110). En la evolución se agregan otras alteraciones en la LP: anisocitosis, poiquilocitosis, dacriocitos, equistocitos y punteado basófilo.³ El recuento reticulocitario es bajo y pueden asociarse otras citopenias constituyendo la denominada máscara aplásica. La presencia de macrocitos ovales y neutrófilos hipersegmentados son un elemento característico de la anemia megaloblástica por déficit de ácido fólico y vitamina B12.^{3,5} De estar ausentes y

de no existir uso de los fármacos mencionados se aconseja la realización de mielograma en búsqueda de mielodisplasia. En los síndromes mielodisplásicos es característico a nivel de SP la presencia de neutrófilos hiposegmentados e hipogranulares.

Las causas de macrocitosis no megaloblástica son múltiples: alcoholismo, hepatopatía, hipotiroidismo y hemólisis o hemorragia. En general la macrocitosis es moderada (100-110 fL) y los macrocitos no son ovoides.³

ANEMIA NORMOCÍTICA

Frente a este tipo de anemias cobra valor la reticulocitosis en la orientación etiológica. De tratarse de una anemia regenerativa (reticulocitosis aumentada), en primer lugar debemos pensar en un sangrado agudo oculto o evidente, o en hemólisis.³ Si se trata de una anemia arregenerativa podemos estar frente a las primeras etapas de una anemia ferropénica, frente a una anemia inflamatoria crónica (en el contexto de un proceso infeccioso, neoplasia o patología inflamatoria crónica) y se debe descartar disfunción endocrina (lo más frecuente hipoparatiroidismo), hepática o renal.

ANEMIA MICROCÍTICA

En este caso los índices eritrocitarios y los niveles de ferritina, acompañados en ciertas situaciones de marcadores inflamatorios, en el contexto clínico del paciente permiten el diagnóstico etiológico en la mayoría de los casos.³ Las consideraciones diagnósticas principales frente a este tipo de anemias son la deficiencia de hierro, la anemia de enfermedades crónicas o talasemias. Menos comunes son las hemoglobinopatías y ciertos tipos de anemias sideroblásticas. Cuando el déficit de hierro es reciente los índices eritrocitarios y la LP pueden ser normales.³ En la evolución se produce un descenso del VCM y del CHCM, siendo la anisocitosis uno de los cambios más precoces en la LP con el consiguiente aumento del ADE.³ Los cambios morfológicos más tardíos son la poiquilocitosis, microcitosis e hipocromía.^{3,5} Pueden verse glóbulos rojos en habano y en diana.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sans - Sabrafen, J. Hematología Clínica. 5ª Edición. Elsevier España 2006.
2. Kern W. PDQ Hematology. Pmhp USA; 1st edition. April 15, 2002.
3. Tkachuk D. C., Hirschmann J. V. Wintrobe's Atlas of Clinical Hematology. Lippincot Williams and Wilkins 2007.
4. Hoffman R. et al. Hematology. Basic Principles and Practice. 5ª Edición. Churchill Livingstone, 2008.
5. Bain B. J., F.R.A.C.P., F.R.C.P. Diagnosis from the Blood Smear. Current concepts. N Engl J Med 2005;353:498-507.

Clasificación fisiopatológica

Dra. Carolina Oliver

Residente de Hematología. Facultad de Medicina. UdelAR. Montevideo.

Las anemias se pueden clasificar desde el punto de vista fisiopatológico en regenerativas o arregenerativas. Las arregenerativas se deben a una inadecuada producción de glóbulos rojos (GR) debido a: déficit adquirido de metabolitos o a enfermedades crónicas como aplasia medular, síndromes

mielodisplásicos o sustitución medular. Las anemias regenerativas son debidas a patologías que generan hemólisis o a sangrados agudos.

Nos centraremos en el estudio de las anemias regenerativas, hemolíticas.

ANEMIAS HEMOLÍTICAS

Hemólisis significa "destrucción de la sangre", se refiere al acortamiento de la vida media de los eritrocitos (normal: 120 días) en la circulación. La causa común es una lesión del eritrocito que condiciona su destrucción precoz.

CLÍNICA

La hemólisis puede ser aguda o crónica. Las crisis hemolíticas agudas aparecen bruscamente en un sujeto previamente sano. Síntomas habituales: fiebre, malestar general, mareos, dolor abdominal, ictericia, eventualmente hemoglobinuria, y elementos de síndrome funcional anémico (SFA). La anemia hemolítica (AH) crónica se presenta de manera lenta, lo que permite desarrollar mecanismos de adaptación. Al examen se evidencia desde una palidez cérea a una franca ictericia, siendo el signo más común la subictericia conjuntival. Habitualmente puede hallarse una esplenomegalia.

DIAGNÓSTICO DEL SÍNDROME HEMOLÍTICO

Exámenes para demostrar la existencia de anemia hemolítica:

- Hemograma. Demuestra el descenso de Hb. El Volumen Corpuscular Medio (VCM) suele ser normal. Puede estar elevado (98-105 fl) debido a un aumento de reticulocitos, o disminuido, en las hemoglobinopatías o en las talasemia. La CHCM suele ser baja debido a que los reticulocitos contienen menor Hb.
- Reticulocitosis. Realiza el diagnóstico fisiopatológico del tipo de anemia. Valor normal 0,5-1,5%. En presencia de anemia, se deben corregir los valores según la fórmula: Reticulocitos corregidos: % reticulocitos x (Hto/45).
- Estudio de lámina periférica (LP). Necesario para valorar alteraciones en la forma de los hematíes, lo cual es un criterio diagnóstico fundamental.
- Indicadores generales de hemólisis:

Exámenes indirectos

Bilirrubina plasmática: aumenta la forma indirecta debido al hipermetabolismo de la Hb. Aumenta el estercobilinógeno en heces y el urobilinógeno en orina.

LDH: en la hemólisis aumenta la isoenzima 2. Prueba inespecífica.

Haptoglobina: disminuye en las primeras 48 hs. Normal: 0,5-1,5 g/L.

Hemopexina plasmática: sólo se altera en hemólisis intensas intravasculares.

Glicohemoglobina: puede disminuir a valores < 6%. Inespecífica.

Metahemalbúmina: persiste alta por semanas post hemólisis intravascular.

Hemoglobina libre: elevada en AH intravasculares, valor normal < 0,6 mg/dL.

Hemosiderinuria: demuestra hemólisis intravascular crónica. Aparece 2-3 semanas de iniciada la hemólisis.

Exámenes directos

Vida media eritrocitaria con Cr 51: es el examen más específico para demostrar hemólisis y el sitio principal de se-

cuestro. Valor normal: 25-32 días.

CLASIFICACIONES

1. Genética: congénitas o adquiridas. Las congénitas son las membranopatías, enzimizopatías y hemoglobinopatías. Las adquiridas se dividen en: inmunes, mecánicas, infecciosas, secundarias a agentes físicos-químicos y metabólicas. 2. Etiológica: intracorpúsculares, cuando el defecto es intrínseco (congénito o adquirido). Extracorpúsculares por lesión secundaria del eritrocito normal. 3. Fisiopatológica: intravasculares, cuando la lisis es en el interior del sistema vascular. Son extravasculares cuando aumenta la eliminación fisiológica de los GR por parte del sistema mononuclear fagocítico (SMF). Habitualmente estos mecanismos actúan simultáneamente, con predominio de uno u otro⁴. Clínica: se pueden clasificar en agudas o crónicas.

AENIMAS HEMOLÍTICAS CONGÉNITAS

Membranopatías

La característica común de estas entidades es una alteración en la membrana que interfiere en la forma, deformabilidad e integridad estructural de los GR (Tabla I).

Esferocitosis Hereditaria (EH): es la AH congénita más frecuente en la raza blanca. El 80% se heredan de manera Autosómica Dominante (AD) y el 20% Autosómica Recesiva (AR). Las alteraciones de la membrana que generan esta patología son déficit de: anquirina (la más frecuente), banda 3, β -espectrina, α -espectrina y de proteína 4,2. La sintomatología es variable, habitualmente leve, y la anemia suele estar bien compensada. Los signos comunes son: anemia, ictericia y esplenomegalia. Según las guías para el diagnóstico y manejo de la EH publicadas en British Journal of Hematology, el diagnóstico se sospecha por la clínica, los AF y el hallazgo en la LP de esferocitos (3-30%). Es característico el CCMH aumentado > 35 g/L. La prueba de fragilidad osmótica incubada es el gold estándar, pero puede no detectar un 10-20 % de pacientes con EH. Esta prueba no diferencia entre causas de esferocitosis (inmune vs no inmune), así como puede ser positiva en la eliptocitosis hereditaria. Este test puede ser normal en presencia de ferropenia o ictericia obstructiva. Estudios como el gradiente osmótico ektacitométrico, el test de criohemólisis hipertónica y Eosin-5-maleimide binding, se utilizan en casos atípicos. La electroforesis de proteínas de membrana no se requiere habitualmente en la práctica clínica.

Enzimizopatías

Debido a déficits de enzimas del metabolismo glucídico.

Enzimizopatías de la glucólisis anaerobia: raras, de herencia AR. La AH aparece sólo en homocigotos. El déficit de piruvatocinasa es el más frecuente.

Enzimizopatías del metabolismo oxidorreductor: la más importante y frecuente es el déficit de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de herencia ligada al cromosoma X. Generalmente se desencadena hemólisis luego del uso de fármacos, infecciones, fiebre o acidosis. El diagnóstico se basa en: sospecha clínica, hallazgo de cuerpos de Heinz en GR, y en la medida de la actividad de la G6PD por espectrofotometría cuantitativa o por test de fluorescencia.

Enzimizopatías del metabolismo nucleotídico: déficit de pirimidina-5' nucleotidasa (AR) y aumento de la actividad adenosindesaminasa (AD).

Hemoglobinopatías

Se deben a mutaciones en los genes que codifican la síntesis de cadenas globina. Pueden clasificarse en:

Estructurales: generan una Hb estructuralmente anormal. Prevalencia mundial 0,2%. Se conocen 1000 hemoglobinopatías diferentes, las más frecuentes son Hb S y C. La anemia drepanocítica es debida a la presencia de HbS homocigota y se presenta en la raza negra. Es debida a una sustitución del ácido glutámico en la posición 6 de la β -globina por una valina, lo cual altera su carga eléctrica y le confiere a los GR una forma de hoz. La hemólisis es intra y extra vascular. El diagnóstico se realiza con: la observación de drepanocitos en la LP, test de solubilidad anormal y por medio de la electroforesis de Hb.

Talasemias: grupo heterogéneo de enfermedades caracterizadas por la disminución o ausencia de síntesis de cadenas de globina estructuralmente normales. Esto genera una disminución del contenido de Hb y del VCM. Se heredan de manera AD. Las principales son: α , β , $\delta\beta$, γ y δ talasemias. La α -talasemia se caracteriza por presentar: anemia microcítica, hipocrómica, con RDW normal, no ferropénica, sin expresividad a nivel de la electroforesis de Hb. El diagnóstico se realiza por análisis de ADN. Las β -talasemias tienen un espectro clínico variable, y su diagnóstico se realiza por la electroforesis de Hb.

ANEMIAS HEMOLÍTICAS ADQUIRIDAS

Anemias de mecanismo inmune: están mediadas por anticuerpos (Ac), complemento o por fármacos inmunógenos. Se dividen en 5 tipos: autoinmune: causa más frecuente de

Tabla I

Membranopatías no EH	Herencia	Lp	Alt. en membrana	Clínica
Eliptocitosis	Ad	Eliptocitos	A-espectrina, β -espectrina Proteína 4.1, Glicoforina c	Variable: de asintomáticos a anemia severa
Estomatocitosis	Ad	10-30 % de estomatocitos	Permeabilidad a na y k	S. Rh nulo, hidrocitosis c, xerocitosis c, pseudo hiperpotasemia familiar
Acantocitosis Abetalipo-proteinemia	Ar	> 20 % Spur cells	Colesterol > en membrana	Anemia moderada a severa
Equinocitosis	Enf. Diversas	Equinocitos	Banda 3	Anemia
Codocitosis	Ad	Target cells	Lcat	Anemia moderada

hemólisis de las AH adquiridas. Puede ser originada por Ac IgG o "calientes", IgM o "fríos" o por la criohemolisina bifásica de Donath-Landesteiner. El diagnóstico de AH autoinmune por Ac IgG se basa en el Test de Coombs directo, con una sensibilidad de 95 %. El diagnóstico en la AH por Ac IgM se realiza por medio del Test de Coombs directo más la determinación del título de crioadglutininas en suero. También son AH inmunes: la reacción hemolítica post transfusional, la AH del recién nacido, la AH inmunomedicamentosa y la α hemoglobinuria paroxística nocturna. Ésta última se origina por una mutación somática adquirida, que le confiere aumento de sensibilidad al complemento. Es causa de AH intravascular, adquirida e intracorpúscular. El diagnóstico se realiza por citometría de flujo a valorar el déficit de antígenos CD 55 y CD 59 en neutrófilos y eritrocitos.

Las anemias hemolíticas de mecanismo no inmune son: mecánicas, secundarias a la acción de agentes naturales, por acción de agentes tóxicos y oxidantes, secundaria a gérmenes y parásitos, por trastorno metabólico o endócrino o por hiperesplenismo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sans-Sabrafen J. Hematología Clínica. Elsevier 2006; 187-298.
2. Hoffman. Hematology: Basic Principles and Practice. Elsevier 2005.
3. Wagner P. La anemia: consideraciones fisiopatológicas, clínicas y terapéuticas. Anemia Working Group Latinoamérica. Lima, Perú, 2006.
4. Okpala I. Practical Management of Haemoglobinopathies. Blackwell Publishing Ltd. 2004; 1-25.
5. Bolton-Maggs P. et al. Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis British Journal of Haematology, 2004;126, 455-474.
6. Gallagher P. Red Cell Membrane Disorders. Hematology 2005; 13-18.

Métodos diagnósticos en el estudio de las anemias

Dra. Graciela Pedreira

Profesora Agregada de Laboratorio de Patología Clínica.
Facultad de Medicina. UdelaR. Montevideo.

Métodos diagnósticos en el estudio de las anemias microcíticas

El mayor porcentaje de anemias microcíticas corresponden a anemias por carencia de hierro. En ellas existe un descenso de los índices hematimétricos: VCM, HCM, CHCM disminuidos.

El déficit de hierro puede ser real por falta de aporte, aumento de pérdida, disminución de su absorción, aumento de las demandas o por mala utilización del mismo.

Frente a un paciente que presente un perfil de hemograma que nos muestra una anemia hipocrómica (HCM descendiendo), microcítica (VCM disminuido) debemos comenzar estudiando:

Metabolismo férrico: Sideremia: Es la concentración sérica de hierro. La misma puede determinarse mediante métodos colorimétricos y métodos de absorción atómica. Los que empleamos usualmente en el laboratorio, actualmente en equipos automatizados es el método que recomienda el Comité Internacional de Standarización en Hematología (ICSH). El mismo se basa en la formación de una sustancia coloreada cuando el hierro, en su forma reducida, reacciona

con un derivado de la fenantrolina: batofenantrolina (388). La concentración de hierro sérica, en una población sana varía de acuerdo a edad y sexo. Como mencionáramos el descenso de la sideremia es característico de la anemia ferropénica, pero también puede observarse en todas aquellas situaciones que se acompañan de un bloqueo del hierro en las células del SMF, tales como los síndromes inflamatorios crónicos y procesos neoplásicos (anemia inflamatoria). Un aumento de la sideremia puede observarse en los llamados estados de sobrecarga férrica o sea aquellas situaciones en las que el organismo acumula hierro en exceso (hemocromatosis, anemia sideroblástica, talasemias). Cuando no existe un cuadro clínico que justifique un aumento aislado de la sideremia debemos pensar en errores metodológicos y repetir el estudio. Capacidad de saturación de la transferrina (CST): es la cantidad de transferrina del plasma que puede ser saturada por el hierro. Constituye una medida indirecta de la concentración sérica de la transferrina y permite determinar el llamado índice de saturación de la transferrina (IST), que es el porcentaje de transferrina en plasma que se halla saturado por el hierro.

Actualmente los métodos automatizados que miden la concentración de hierro plasmática, también determinan la CST. En este caso, la CST se determina por el cálculo a partir de la medida de la transferrina como proteína mediante un método basado en una reacción Ag.-Ac y de la sideremia.

La CST varía entre 2,50 y 4,0 g/l y el porcentaje de transferrina normalmente saturada por el hierro (IST) es de 33%. Mientras que la CST depende de la cantidad de transferrina, el IST depende de la cantidad de hierro plasmático. Normalmente en el organismo existe una relación inversa entre la cantidad de hierro de depósito y la síntesis de transferrina, cuando disminuye el hierro de depósito aumenta la síntesis de transferrina y viceversa. En una ferropenia real la disminución de la sideremia y la ferritina están asociadas generalmente a un aumento de la CST y a un descenso del IST, mientras que en los trastornos debidos a bloqueo en la utilización de hierro no se observan grandes aumentos de la CST y el IST en gral. no es menor a 15%. Ferritina: Cuantifica el estado de las reservas férricas del organismo. Actualmente los procedimientos automatizados que se utilizan se basan en reacciones ferritina-ac antiferritina, empleándose metodologías diversas: quimioluminiscencia, nefelometría. La determinación más exacta es la que utiliza técnicas radioinmunitológicas (RIA) o inmunorradiométricas (IRMA). Los valores de ferritina varían de acuerdo a edad, sexo y metodología empleada. Los valores oscilan en gral. entre 12 - 300ug/l. Receptor soluble de transferrina (RTF): es una proteína que en forma dimérica se encuentra en la superficie de las células fundamentalmente en los eritroblastos. Algunas moléculas sufren un mecanismo de proteólisis y pasan a la circulación como receptor soluble de TF, la concentración del mismo viene regulada por la concentración de hierro intracelular. Cuando existe una ferropenia aumenta la concentración de RST. A diferencia de la ferritina que es un reactante de fase aguda, el RST se encuentra muy poco afectado por procesos inflamatorios. En cuanto a métodos de determinación se basan en el principio de la reacción ag.-ac. Mediante empleo de ac monoclonales. Los más empleados son los métodos de ELISA. Actualmente se pueden realizar en forma automatizada por métodos inmunoturbidimétricos y nefelométricos. Hecpidina: es un péptido sintetizado en el hígado, rico en histidina, regulador de los procesos de absorción y reutilización del hierro por el organismo. Un exceso de hierro aumenta la síntesis de hepcidina, lo que disminuye la absorción intestinal y la salida de hierro de los macrófagos.

La expresión de hepcidina en el hígado es incrementada

por la sobrecarga férrica y también por las IL1 y IL6 y su expresión es frenada por la anemia y la hipoxemia.

Recién se han elaborado técnicas que permitirán a los laboratorios de rutina incorporar su determinación, ya que las existentes hasta el momento eran muy costosas y de difícil ejecución.

Debemos recordar siempre que una anemia es un signo de una patología subyacente que tendremos que estudiar. En el caso de las anemias ferropénicas deberemos descartar las pérdidas digestivas y en la mujer en edad genital activa, las causas ginecológicas.

Métodos diagnósticos en el estudio de las anemias megaloblásticas

Se denominan anemias megalobásticas aquellas debidas a una falta de cobalamina (vit. B12) o de ácido fólico lo que puede ocurrir por diversos mecanismos. En ellas encontramos alteraciones morfológicas características como asincronismo madurativo N/C, gigantismo celular, etc. La causa es un defecto en la síntesis de ADN que afecta a todos los tejidos con intenso recambio celular. La megaloblastosis está asociada a un acortamiento de la vida media de los eritroblastos que desaparecen en la propia médula antes de madurar a eritrocitos (eritropoyesis ineficaz).

Determinación de cobalamina (vit B12)

En gral. actualmente se realiza su determinación por métodos automatizados, usando el método de unión a un transportador, en este caso el factor intrínseco gástrico. Enzimo-inmunoensayo de micropartículas (MEIA).

Determinación de ácido fólico: uno de los métodos usados es el basado en la captura iónica (AXSYM). El estudio de la médula ósea a través de la realización de un mielograma completará el estudio del paciente.

Luego de confirmar el déficit de alguno de estos metabolitos y de realizar su tratamiento veremos la reacción del paciente frente al mismo realizando una reticulocitosis aproximadamente entre los 7 y 10 días de instituido el mismo.

Métodos diagnósticos de las Hemoglobinopatías y las Talasemias

Las hemoglobinopatías son alteraciones cuali o cuantitativas de las cadenas de globinas, secundarias a mutaciones genéticas cuya consecuencia puede ser una modificación estructural hemoglobinopatías estructurales) o una disminución variable de la síntesis de una cadena de globina, sin alteración estructural (talasemias).

La historia clínica del paciente así como el estudio de sus parámetros hematimétricos y perfil del metabolismo férrico, nos harán pensar en este tipo de patología.

Las hemoglobinopatías estructurales son el resultado de mutaciones genéticas que afectan a la estructura de algunas de las cadenas de globina (alfa, beta, delta, gama). Existe sustitución de un aminoácido por otro, lo que origina un cambio en la carga en la superficie de la molécula, lo que permite diferenciar esta hb mutada de la normal mediante una corrida electroforética.

En las talasemias, donde existe la disminución en la síntesis de una de las cadenas de globina vemos también alteraciones a nivel electroforético. Las técnicas empleadas en gral. para el estudio de las hemoglobinopatías y las talasemias son las siguientes: Electroforesis de Hb, Cuantificación de la fracción hemoglobínica HbA2, Cuantificación de Hb F, Análisis de la estabilidad molecular de la Hb, Análisis de HB mediante cromatografía de alta resolución (HPLC), Biología molecular.

Electroforesis de Hb

Para realizar esta técnica trabajamos con un hemolizado que posea entre 8-10 gr% de Hb. La Hb está constituida por aminoácidos unidos entre si por enlaces peptídicos, forman cadenas que poseen radicales ácidos COO- y básicos NH3+. La carga eléctrica de estos grupos depende del pH del medio en que se encuentren. En su punto isoelectrico la proteína es eléctricamente neutra. La proteína cargada negativamente será atraída por el polo positivo del campo eléctrico (ánodo) y si lo está positivamente lo será por el polo negativo (cátodo).

Esta es la base que permite separar las diferentes hb cuando se colocan en un campo eléctrico a diferente pH. Se usa la electroforesis de zona. Aquí el sistema amortiguador impregna un soporte (gel de agar, acetato de celulosa, etc) sobre el que se coloca una muestra de la solución de hb a analizar. Las fracciones separadas se pueden visualizar después del revelado con colorantes adecuados. En la práctica el soporte más usado es el de acetato de celulosa a pH 8,6. Cualitativamente esta técnica permite la separación de las hb normales de un hemolizado (A, A2, F), así como de determinadas hemoglobinopatías. En otros casos para mejorar la identificación de las fracciones se usan corridas a diferente pH, gralmente. PH6 y otro soporte como el gel de agar. Este es especialmente útil para separar la HbS, Hb C, etc.

Electroforesis de Hb a pH alcalino

En ella se destacan tres fracciones bien diferenciadas. La fracción más rápida y más intensamente coloreada corresponde a la HbA, la segunda fracción corresponde al HbA2 y la tercera cerca del origen no es hb y corresponde a la anhidrasa carbónica.

En recién nacidos puede observarse a continuación de la HbA una banda que correspondería a la HbF. La alteración cuantitativa que se observa con mayor frecuencia es el aumento de la fracción A2 (beta talasemia menor) y el incremento de la Hb F

Electroforesis de Hb a pH ácido: Permite diferenciar la HbA de la HbF, lo que es difícil en acetato de celulosa a pH alcalino. Asimismo separa claramente Hb patológicas como la Hb S de la HbD. Cuantificación de HbA2: en la corrida electroforética nosotros tenemos una noción cualitativa de la presencia de la HbA2. Para cuantificarla se usan diferentes métodos:

Elución de la fracción electroforética, Densitometría de la placa electroforética, Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Este método permite la separación y cuantificación automatizada de las fracciones hemoglobínicas normales (HbA, A2, F), así como de posibles hemoglobinopatías (HbS, HbC, etc.) y de derivados glicosados de la hemoglobina, de utilidad clínica en el seguimiento terapéutico de la diabetes mellitas. La base de esta metodología es una columna de intercambio catiónico con gradientes preprogramados que van incrementando la fuerza iónica del tampón de elución y las hb que se unen con más fuerza a la columna son las últimas en eluir. La elución de las columnas se monitoriza mediante un espectrofotómetro que detecta cambios en la absorbancia a dos longitudes de onda 415/690nm. La representación de estos cambios en relación con el tiempo generan un cromatograma para cada una de las muestras problema. Se dispone de tres programas básicos para la detección de: beta talasemia en adultos; alfa talasemia en adultos y escrutinio neonatal de anemia falciforme y hemoglobinopatías a partir de sangre seca.

Cuantificación de HbF

Además de los dos métodos tradicionales de desna-

turalización alcalina y resistencia a la elusión ácida, existe como vimos un método automatizado para su cuantificación el HPLC. Análisis de la estabilidad molecular de la hb: Existe un grupo de Hb patológicas que se caracterizan por poseer una molécula inestable capaz de desnaturalizarse en presencia de ciertas condiciones físicas o químicas que son perfectamente toleradas por la HbA. Las mismas son en general el resultado de una mutación de carácter neutro y por ello no presentan variación en la carga de la molécula de Hb. Al migrar electroforéticamente igual que la HbA, no pueden ser detectadas mediante este procedimiento. La mutación suele estar localizada en la cavidad del grupo hemo, por lo que su desnaturalización va precedida de una pérdida espontánea del grupo hemo. La desnaturalización in vivo de la hb condiciona la aparición de precipitados de hb en el interior del GR o cuerpos de inclusión (cuerpos de Heinz), que son la causa de la hemólisis.

Se utilizan en la práctica dos métodos para poner a prueba la estabilidad molecular de la hb: Método de la estabilidad frente al calor (estabilidad térmica), Método de estabilidad frente al isopropanol (estabilidad química), Prueba de escrutinio de la anemia falciforme (HbS): Prueba de la falciformación (prueba de itano): Consiste en provocar la falciformación de los eritrocitos a partir de sangre total, cuando esta se expone a un medio pobre en oxígeno.

Dignóstico molecular de la talasemia

Biología molecular.

Métodos diagnósticos de las membranopatías eritrocitarias

El glóbulo rojo presenta una gran deformabilidad, que le permite atravesar capilares de diámetro inferior al suyo propio. La misma depende de tres factores: La forma o relación entre la superficie y el volumen eritrocitario, La estructura de la membrana, El contenido de Hb. La alteración de alguno de estos factores es suficiente para disminuir la deformabilidad y con ello la vida media de los eritrocitos en la circulación. La disminución de la vida media del eritrocito puede deberse a dos mecanismos principales: Extracorpúscular por factores extrínsecos al GR, en general. De origen plasmático o vascular. Intracorpúscular o alteración de alguno de sus componentes estructurales: membrana, Hb, enzimas. La mayoría de los defectos intracorpúsculares tienen un origen congénito.

Las membranopatías serían defectos de algunos de los componentes estructurales (proteínas, lípidos) de la membrana del GR. Este trastorno puede manifestarse por un cambio en la forma de l eritrocito, siendo allí donde el examen morfológico de la sangre es fundamental para el diagnóstico. Dentro de las membranopatías una de las más frecuentes es la esferocitosis hereditaria.

La misma se caracteriza por la presencia de eritrocitos de forma esférica y osmóticamente frágiles.

Clínicamente es de intensidad variable y se caracteriza por ictericia, anemia con reticulocitosis elevada y esplenomegalia. La forma más frecuente es debida a un déficit de anquirina/espectrina.

En la práctica el estudio de las membranopatías se inicia con el empleo de métodos indirectos que ponen de manifiesto algunas de sus propiedades físicas que se conocen como pruebas de hemólisis.

Entre ellas se destaca: test de resistencia osmótica eritrocitaria (ROE), capacidad para resistir a la hipotonía del medio; al calor (resistencia térmica); a la incubación prolongada a 37°C (autohemólisis); a la acción lítica del complemento (hemólisis ácida).

Los estudios de proteínas de membrana, realizados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, previa solubilización con dodecilsulfato de sodio y / o las pruebas moleculares no se realizan rutinariamente. Mencionaremos algunas de ellas: Resistencia o fragilidad osmótica eritrocitaria: La membrana del GR es semipermeable por ello cuando se lo incubaba en un medio hipertónico, pierde agua y se deshidrata. En un medio hipotónico ocurre lo contrario. Si la hipotonía del medio supera cierto límite, se altera la membrana y se produce hemólisis. Definimos entonces como resistencia osmótica a la capacidad que tiene el GR para resistir el efecto hipotónico del medio. La resistencia o fragilidad osmótica depende de la relación entre la superficie y el volumen. Debido a su forma de disco bicóncavo los eritrocitos son capaces de aceptar sin hemólisis una entrada de agua capaz de aumentar su volumen hasta un 70%. En la esferocitosis, por Ej. este límite disminuye y la hemólisis ocurre en presencia de soluciones salinas más concentradas, la capacidad para resistir la entrada de agua está disminuida. La prueba incubada es más sensible para poner en evidencia esta característica. Prueba de la autohemólisis: esta prueba pone de manifiesto la capacidad de los eritrocitos de mantener su integridad in Vitro después de cierto tiempo (24 hs) de incubación a 37°C, frente a su propio plasma. También puede usarse como escrutinio de eritroenzimopatías (G6PD). La misma puede realizarse o no en presencia de glucosa lo que permite obtener resultados diferentes que orientaran a diferentes patologías. Prueba de hemólisis en medio ácido (Ham Dacie): Esta prueba se basa en que la acción lítica del Complemento es favorecida por la acidez del medio. En los eritrocitos normales ello no ocurre, pero en la Hemoglobinuria Paroxística Nocturna (HPN), una pequeña disminución del pH del medio provoca el desarrollo de esta acción sobreviniendo la hemólisis. Normalmente no se observa hemólisis en ninguno de los tubos estudiados. Una prueba más sensible pero menos específica es la prueba de la sacarosa. Esta se basa en el principio de que los GR en presencia de solutos de baja fuerza iónica (sacarosa), fijan el C, por lo cual en la HPN se facilita la hemólisis. Actualmente la citometría de flujo pone de manifiesto la presencia de los ag CD55 y CD59.

Métodos diagnósticos en las eritroenzimopatías. Las funciones que cumple el eritrocito están orientadas a mantener el transporte de Hb.: conservar su integridad durante 120 días, mantener el hierro hemoglobínico en estado reducido para que la hb pueda fijar reversiblemente el oxígeno molecular, contribuir a la función hemoglobínica facilitando la liberación del oxígeno a nivel de los tejidos.

Estas funciones pueden realizarse mediante diferentes procesos enzimáticos.

Las enzimopatías de mayor interés son aquellas que están asociadas a una hemólisis aislada o acompañada de otros trastornos como neuropatía, miopatía o retraso mental. Los métodos aplicados para el diagnóstico de las enzimopatías pueden ser cuali o cuantitativos. Dentro de los métodos cualitativos destacamos la detección de déficit de G&PD. El ICSH recomienda hacer asar la prueba de la mancha fluorescente como escrutinio en esta enzimopatía. Los métodos cuantitativos confirman la existencia de una eritroenzimopatía.

Hemograma en el diagnóstico de anemia

Dra. Cecilia Guillermo

Profesora Adjunta de Laboratorio de Patología Clínica, Ex Profesora Adjunta de Hematología. Facultad de Medicina. UdelaR. Montevideo.

INTRODUCCIÓN

La sospecha clínica de anemia debe confirmarse por la disminución del nivel de hemoglobina por debajo de los valores de referencia considerados para la población en estudio, por lo que el Hemograma pasa a ser un elemento semiológico más en el diagnóstico, clasificación y orientación etiológica de una anemia.

CONSIDERACIONES PREANALÍTICAS

Confirmar la identificación del paciente y la solicitud médica. No requiere ayuno. Los plasmas lipémicos pueden causar falso aumento de la hemoglobina. Se utilizan tubos con ácido etileno diamino tetraacético en forma de sal tripotásica, K_3 -EDTA (tapa violeta). Este anticoagulante no influye sobre las determinaciones hematológicas y conserva la morfología celular.⁽¹⁾ La muestra debe ser analizada dentro de las seis primeras horas, aunque la estabilidad es aceptable si se conserva por 24 hs a temperatura ambiente.⁽²⁾

CONSIDERACIONES ANALÍTICAS

Los equipos actuales incorporan el principio Coulter (1958) por variación de impedancia, y la medida óptica basada en la Citometría de flujo (1977). El recuento de partículas por variación de impedancia, genera histogramas por distribución de volumen (recuentos de plaquetas, eritrocitos y leucocitos)⁽³⁾. Con el agregado de la medida óptica (difracción de luz laser emitidos a diferentes ángulos), los equipos brindan la clasificación completa con un alto grado de confiabilidad⁽⁴⁾. Sin embargo, el estudio del frotis de sangre periférica continúa siendo insustituible.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS EN EL DIAGNÓSTICO DE ANEMIA

El recuento de GR es realizado por impedancia. La presencia de crioaglutininas puede determinar una falsa disminución del recuento de GR, con Hb normal. Esto se corrige precalentando la muestra a 37°. La Hb tradicionalmente se ha determinado por la medición del complejo cianometahemoglobina a 540 nm⁽⁵⁾. Actualmente se utilizan reactivos libres de cianuro, en general lauril sulfato de sodio (SLS), agente tensoactivo, que lisa la membrana de los eritrocitos liberando la Hb cuya concentración es medida por espectrofotometría. El hematocrito es la proporción entre los GR y el plasma y se expresa como un porcentaje del volumen de sangre total. Los equipos calculan el Hto: $GR / mm^3 \times VCM$, o lo miden acumulando los VCM de cada partícula examinada. Pueden incrementarlo falsamente: la deshidratación, sangre capilar, uso prolongado de torniquete, frío, actividad muscular, posición de pie. El descenso puede deberse a hipervolemia, posición supina, exceso de anticoagulante, embarazo, hiperproteíne-mia. El VCM es el índice hematimétrico más importante en la clasificación de las anemias y la orientación etiológica de las mismas. La microcitosis es típica de la ferropenia y tala-

semia, las macrocitosis de las carencias de B12, ácido fólico, mielodisplasias, alcoholismo, y la normocitosis de sangrado agudo y enfermedades crónicas. El VCM es la media del histograma de GR. La Hemoglobina corpuscular media, refleja el contenido promedio de Hb en cada GR en forma individual. $HCM (pg) = Hb(g/L) / GR (10^{12}/L)$. Es el parámetro usado en la definición de la "cromía" de los GR.

La Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media refleja la concentración de Hb en los GR de un dl de sangre. $CHCM (g/dl) = Hb/Hto$ o $Hb/ GR \times VCM$. La hipocromía puede ser un indicador precoz de ferropenia en los equipos que usan la focalización hidrodinámica. El ADE /Ancho de distribución eritrocitaria: refleja la anisocitosis en la población de GR. Es el coeficiente de variación del VCM. Es útil en el diagnóstico diferencial entre las ferropenias (ADE aumentado) y la talasemia menor (ADE normal). La información gráfica sobre la distribución de la población eritrocitaria, nos muestra el ADE, el VCM, las interferencias con el histograma de plaquetas y leucocitos, y puede mostrar subpoblaciones en pacientes transfundidos o mielodisplasias.

Los analizadores actuales realizan el recuento de reticulocitos y establecen su grado de maduración, mediante la tinción del contenido de ARN de estas células. Se clasifican en 3 grupos de acuerdo a su contenido y grado de fluorescencia, definiendo la Fracción de Reticulocitos Inmaduros, índice que representa la actividad eritropoética.

EL FROTIS DE SANGRE PERIFÉRICA EN EL ESTUDIO DE LA ANEMIA

A pesar de los avances tecnológicos, y la abundante información obtenida en un Hemograma Automatizado, el estudio de la lámina periférica es siempre de gran importancia⁽⁶⁾. A modo de ejemplo, en la sospecha de microangiopatías tromboticas, la observación de esquistocitos puede ser definitorio. Las células en tiro al blanco en una pseudopoliglobulia microcítica, apoya el diagnóstico de talasemia. Los dacriocitos, típicos de las mielofibrosis, eritroblastos son otros hallazgos de gran importancia en la práctica clínica. El fenómeno de Rouleaux, cuerpos de Heinz, esferocitos, drepanocitos y falciformación espontánea, parásitos intraeritrocitarios, son todas situaciones en donde por el momento solo la observación del frotis puede aportarnos información.

CONCLUSIONES

El Hemograma puede brindarnos suficiente información como para diagnosticar, clasificar y guiar los estudios etiológicos de una anemia, y contribuir en el seguimiento evolutivo. Sin embargo, la observación directa de los elementos formes no ha podido aún ser sustituida por la automatización en el Laboratorio de Hematología.

BIBLIOGRAFÍA

1. Morfofisiología: **Obtención muestra** de sangre para el **hemograma**. Victoria Eugenia González Cárdenas. <http://aprendeenlinea.udea.edu.co/lms/moodle/mod/resource/view.php?id=3540>
2. Aging stability of complete blood count and white blood cell differential parameters analyzed by Abbott CELL-DYN Sapphire hematology analyzer. P. HEDBERG, T. LEHTO. 2008 The Authors Journal compilation _ 2008 Blackwell Publishing Ltd, Int. Jnl. Lab. Hem. 2009, 31, 87-96.
3. Manual de técnicas de laboratorio en Hematología. En: Vives Corrons JL, Aguilar Bascompte JL, editores. 3ª edición. Barcelona: Masson; 2006.
4. Anemia Diagnosis, Classification, and Monitoring Using Cell-

- Dynn Technology Reviewed for the New Millenium. L. Van Hove, T. Schisano, L. Brace. Laboratory Hematology 6:93-108. 2000 Carden Jennings Publishing Co., Ltd.
- International Committee for Standarization in Haematology. Recommendations for reference method for haemoglobinometry in human blood. (ICSH Standard 1986) and specifications for international haemoglobincyanide reference preparation /3rd edition), Clin Lab Haematol 1987;9:73-79).
 - Interpretation of the Peripheral Blood Film. Clinics in Laboratory Medicine. Robert V. Pierre, MD, Guest Editor. March 2002.

Metabolismo del hierro

Dra. Mariana Stevenazzi

Profesora Adjunta de Clínica Médica B, Ex Asistente de Hematología. Facultad de Medicina. UdelaR. Montevideo.

INTRODUCCIÓN

El **hierro (Fe)** es un metal fundamental involucrado en reacciones metabólicas de transferencia de electrones (citocromos, peroxidasas) y en transportadores de O₂ (hemoglobina, mioglobina). El exceso de hierro es nocivo para las células, por lo que se requiere de un proceso meticuloso de regulación, para mantener el equilibrio en el metabolismo del Fe. El mayor capital férrico se encuentra en los hematíes circulantes (1mg de Fe c/ml de células). El contenido de hierro se ajusta regulando la absorción, ya que la pérdida en condiciones normales es escasa. En los últimos años se han comprendido mejor los mecanismos moleculares involucrados en el metabolismo del hierro y descubierto alteraciones genéticas claves para este equilibrio. La homeostasis del hierro depende de la regulación de la **Hepcidina**, una hormona que regula negativamente la salida del hierro desde las células intestinales y macrófagos, por alteración de la expresión del exportador celular del hierro, la **Ferroportina**. La Hepcidina controla el Fe corporal total y su disponibilidad para la eritropoyesis. El hierro no difunde libremente a través de la membrana celular, requiere de un mecanismo transportador; algunas células están equipadas para importar y exportar hierro (macrófagos, células epiteliales intestinales y hepatocitos); estas son las encargadas de obtener, movilizar y depositar el hierro. Los precursores eritroides son los mayores consumidores. En humanos adultos la producción diaria de eritrocitos requiere aproximadamente 20 mg de Fe elemental. La gran mayoría del hierro deriva del recambio de eritrocitos senescentes o dañados captados por los macrófagos y 1 a 2 mg provienen de la absorción intestinal. Por lo que se puede considerar como un circuito cerrado (Figura 1).

Absorción

La absorción del Fe ocurre en el intestino, a través del ribete en cepillo fundamentalmente en el duodeno y primeras porciones del yeyuno. Se absorbe como Fe⁺² (ferroso) o como grupo hemo. En el interior de la célula (en los microsomos) la hemo-oxigenasa transforma el grupo hemo en biliverdina, CO y Fe⁺³ (férrico). El jugo gástrico estabiliza el Fe⁺³ de la dieta, para que no precipite. Este puede ser reducido a Fe⁺² por una enzima ferro- reductasa. El Fe⁺² es transportado a través de la membrana apical de la célula epitelial intestinal por el transportador de metales divalente (DMT1) (figura2), este no es exclusivo del Fe, también transporta otros metales (Cobre, Zinc, Cobalto). Al entrar a la célula una parte se deposita como Ferritina y otra se exporta. La Ferroportina exporta Fe⁺²; esta actúa en conjunto con una

proteína oxidasa la **Hefastina** (homóloga de la ceruloplasmína), transformando el Fe⁺² en ⁺³ y de esta forma se puede unir a la TF y circular por el plasma. El resto del Fe que queda dentro del enterocito se pierde cuando esta célula envejece y se desprende en la luz intestinal. Los mecanismos de absorción del Fe-hemo no están del todo claro, se postula que ocurre a través de diferentes vías, aparentemente también a través de DMT1. El exportador del Fe-hemo no es conocido pero se postula que es una proteína, que de estar alterada su función por interferencia o inhibición sería la causante de la acumulación de hemo en las células precursoras eritroides, con la consiguiente alteración en la maduración y apoptosis como ocurre en la eritroleucemia. La dieta occidental contiene acerca de 15 mg de Fe al día, el Fe tipo hemo (pescado, pollo y carne roja) se absorbe en un 30%, el Fe no hemo (vegetales) se absorbe en un 10%. La absorción del Fe es afectada por sustancias presentes en la luz del intestino. El ácido ascórbico (vit. C) aumenta la absorción de Fe no animal (cereales, frutas, vegetales y pan). Los taninos (té), fosfatos, antiácidos y metales competitivos (zinc) inhiben la absorción.

Transporte del hierro

El Fe circula unido a la transferrina (**TF**), ésta en situaciones normales está presente a una concentración de 2 a 3 g/l. Se mide en plasma como capacidad total de unir Fe. La unión con Fe⁺³ es de alta afinidad; el Fe precipitaría de circular libre. De síntesis hepática, aumenta en caso de déficit de Fe, por mecanismos poco conocidos. La TF está saturada normalmente en 1/3, el % de saturación de TF disminuye en caso de deficiencia de Fe, AEIC (anemia de enfermedades inflamatorias crónicas). Y aumenta en caso de suplemento de Fe o por aumento de demanda. Cada molécula de TF transporta 1 a 2 átomos de Fe, unidos a su receptor de membrana (**RTF**: receptor de TF). Estos receptores se expresan sobre todo en aquellas células que necesitan Fe (*precursores eritroides*, células tumorales y linfocitos activados). Los RTF son hallados en la sangre en proporción a la masa eritroide. Los niveles de RTFs (solubles) aumentados son indicativos de deficiencia de hierro o eritropoyesis ineficaz. El complejo TF-Fe-RTF entra a la célula por endocitosis (Figura 3), estas vesículas poseen un pH ácido donde se libera el Fe y pasa al citoplasma. Luego la TF y RTF vuelven a la membrana celular para liberar la apoTf (TF sin Fe) al plasma y de esta forma poder participar de un nuevo ciclo del transporte de Fe. En el interior de la célula el Fe es captado por proteínas y pequeñas moléculas para su utilización o depósito. En los precursores eritroides la mayoría del Fe va a la mitocondria para incorporarse al grupo hemo. El transporte del Fe en otras células como por ejemplo los *hepatocitos* es muy importante ya que al mayor depósito de Fe ocurre en estas células. Estas expresan RTF1 y RTF2 (con iguales funciones que RTF1 pero menos eficiente y de función incierta). Por otro lado y a diferencia con RTF1, RTF2 no formaría complejo con la proteína HFE. Se ha relacionado a mutaciones en RTF2 con Hemocromatosis, por lo cual este sería importante en el metabolismo del Fe. Al parecer la Ferroportina jugaría un rol en el transporte de Fe desde el hepatocito. Los *macrófagos* del SRE obtienen el Fe al fagocitar los eritrocitos, pero también por el ciclo de la TF. En estas células la Ferroportina sería la proteína exportadora de Fe. Al parecer la Ceruloplasmina (ferroxidasa con cobre) tendría un papel importante ya que catalizaría la oxidación de Fe⁺² en Fe⁺³. La concentración del Fe en plasma y por lo tanto la saturación de TF está regulada por la entrega celular (hepatocitos y macrófagos) de Fe (oferta de Fe) y de la demanda (eritropoyesis). En caso de eritropoyesis constante la saturación de Tf depende del re-