



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
PLAN DE ESTUDIOS DE LA LICENCIATURA DE MÉDICO CIRUJANO



Práctica de laboratorio
Aglutinación activa: Determinación de los Grupos sanguíneos
ABO

Departamento responsable: Bioquímica

Realización por: Edgar Zenteno Galindo, Concepción Agundis Mata, Raúl Chávez S. Ricardo Lascurain
No. de Práctica: 1

Objetivos generales:

1. Demostrar la reacción antígeno-anticuerpo en antígenos de superficie (aglutinación).
2. Identificar los antígenos de superficie del sistema ABO (Lands-teiner) en los eritrocitos humanos mediante el uso de antisueros para determinar el grupo sanguíneo.
3. Discutir la importancia de la identificación del grupo sanguíneo en la práctica clínica.
4. Señalar otros sistemas de grupo sanguíneo: Rh (D), Lewis, Duffy, Kidd, MN, Lutheran, etcétera.

Antecedentes

Los eritrocitos poseen en su membrana diversas estructuras con carácter antigénico que son determinadas genéticamente. Muchas de ellas se han podido identificar serológicamente mediante anticuerpos específicos. El primer grupo de estas sustancias fue identificado por Landsteiner en 1901; a este grupo se le llamó sistema ABO, en el cual un individuo puede expresar en la membrana de sus glóbulos rojos uno, dos, o ninguno de los antígenos A y B. Esto da por resultado que si un sujeto expresa la sustancia A, posee el tipo sanguíneo A, si expresa la sustancia B, será de tipo sanguíneo B; en cambio, si no expresa ninguna de estas sustancias, será de tipo sanguíneo O. Como estas sustancias se expresan por un patrón mendeliano codominante (A y B son dominantes), hay posibilidad de que se expresen ambas sustancias: tipo sanguíneo AB. En lo que toca al tipo O (ausencia de A y B), su patrón hereditario se comporta como recesivo (ver el siguiente cuadro):

Combinaciones genóticas

| | | |
|----------|-----------|-----------|
| | B | O |
| A | AB | AO |
| O | BO | OO |

Los individuos con tipo sanguíneo O tendrán anticuerpos anti-A y anti-B; los de tipo A tendrán anticuerpos anti-B; en tanto que los de tipo B tendrán anti-cuerpos anti-A; y los de tipo AB no tendrán anticuerpos anti-A y anti-B (son antígenos propios) (fig. 2.1).

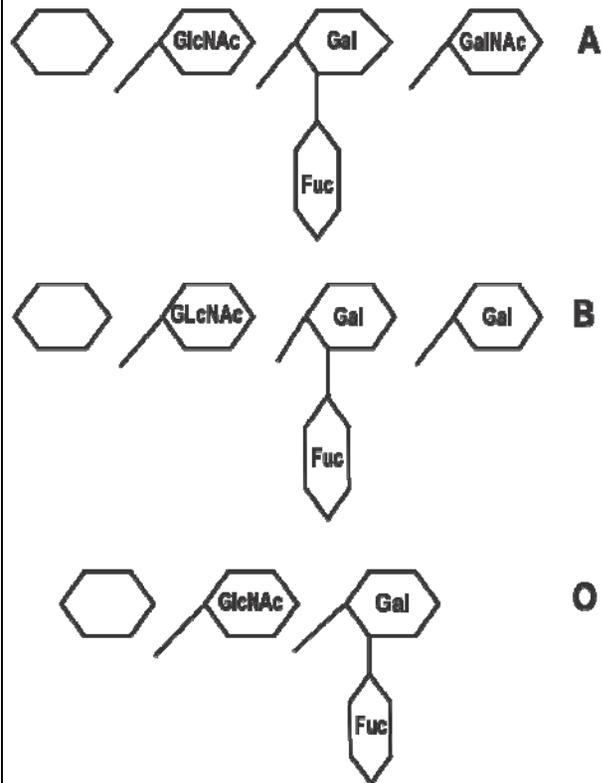


Fig. 2.1 Estructura de los tipos sanguíneos (ABO).

SISTEMA Rh

En 1939, Levine y Stetson, reportaron el caso de una mujer con una intensa re-acción hemolítica después de haberle practicado una transfusión con sangre donada por el esposo. El antígeno responsable fue diferente a los antígenos conocidos en aquella época.

En 1940, Landsteiner y Wiener inmunizaron conejos y cobayos con eritrocitos obtenidos de *Macacus rhesus*, partiendo del planteamiento de que en los eritrocitos de estos monos podrían existir antígenos similares a los humanos. El suero obtenido (anticuerpos) aglutinaba los glóbulos rojos de estos monos y a los eritrocitos de 85% de la población blanca.

Posteriormente, las investigaciones demostraron que el antígeno involucrado en el caso de Levine y Stetson y en el antígeno hallado por Landsteiner y Wiener, los cuales inicialmente se pensaban eran el mismo antígeno, resultaron ser distintos. Se estableció que el antígeno del mono *rhesus* lo poseen la mayoría de los humanos y, además, otro diferente, pero relacionado. A sugerencia de Levine, se conservó la denominación de factor Rh para el antígeno humano y LW para el antígeno común al hombre y al mono.

A mediados de los años 40 se habían identificado cinco antígenos pertenecientes al sistema Rh (C,c,D,E,e). El D tiene dominancia antigénica, de tal manera que si un individuo expresa D en sus eritrocitos, será Rh positivo.

Es hasta fecha muy reciente que se pudo caracterizar la estructura de estos antígenos, la cual resultó ser muy compleja.

Fundamento

Los eritrocitos humanos pueden o no tener en su superficie alguna combinación de los antígenos del sistema ABO y Rh. De la misma forma, algunos individuos tendrán en el suero isoanticuerpos dirigidos contra alguno de los antígenos del sistema ABO; solamente tendrán en el suero isoanticuerpos anti-D aquellos individuos que hayan sido previamente sensibilizados a este antígeno. En consecuencia, los sueros que contengan isoanticuerpos anti-A aglutinarán a los eritrocitos que tengan al antígeno A y sucederá lo propio en otros casos. La tabla 2.1 indica la composición de isoantígenos e isoanticuerpos según el grupo sanguíneo ABO.

Tabla 2.1 **Clasificación de los grupos sanguíneos ABO.**

| <i>Antígeno en eritrocitos</i> | <i>Anticuerpos en el suero</i> | <i>Grupo sanguíneo</i> |
|------------------------------------|------------------------------------|----------------------------|
| A | Anti-B | A |
| B | Anti-A | B |

| | | |
|---------------|-------------------------|----|
| A y B | No hay anti-A ni anti-B | AB |
| No hay A ni B | Anti-A y anti-B | O |

Justificación:

Competencias con las que se relaciona en orden de importancia

- (X) Pensamiento crítico, juicio clínico, toma de decisiones y manejo de información
- (X) Aprendizaje autorregulado y permanente
- (X) Comunicación efectiva
- (X) Conocimiento y aplicación de las ciencias biomédicas, sociomédicas y clínicas en el ejercicio de la medicina
- (X) Habilidades clínicas de diagnóstico, pronóstico, tratamiento y rehabilitación.
- (X) Profesionalismo, aspectos éticos y responsabilidades legales
- () Salud poblacional y sistemas de salud: promoción de la salud y prevención de la enfermedad.
- (X) Desarrollo y crecimiento personal.

| Índice Temático | | | | |
|---|------------------------------|---|------------------------------|-----------------|
| Unidad | Tema | Objetivo temático | Subtema(s) | Horas Prácticas |
| 1 y 2 | Reacción antígeno-anticuerpo | Demostrar la especificidad de los anticuerpos hacia los determinantes antigénicos de los tipos ABO. Y su importancia en la clínica. | Reacción Antígeno Anticuerpo | 2 |
| <p>Desarrollo de la práctica:</p> <p>Material y reactivos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Placa con excavaciones o portaobjetos excavado. • Palillos de madera. • Lanceta estéril para punción. • Torundas con alcohol. • Suero anti-A. • Suero anti-B. | | | | |

- Bata de laboratorio y guantes.

Método

1. En uno de los orificios de la placa excavada, limpia y seca, colocar una gota de suero anti-A y en otra una gota de suero anti-B. Cuidar de que no se mezclen accidentalmente e inmediatamente.
2. Desinfectar con alcohol el pulpejo del dedo pulgar de un voluntario y puncionar con la lanceta estéril. Con presión suave hacer salir una gota gruesa de sangre sobre el dedo.
3. Mediante la parte gruesa de un palillo de madera tomar una pequeña cantidad de sangre y agregarla a la gota del suero anti-A que está en la placa excavada; mezclar perfectamente y, con otro palillo diferente, repetir esta misma maniobra con la gota de suero anti-B mezclando perfectamente. La concentración final de glóbulos rojos en la mezcla debe ser aproximadamente 2 %; si se pone un exceso de eritrocitos, los resultados pueden falsearse.
4. Después de mezclar perfectamente cada suero con los glóbulos rojos, se hace girar la solución sobre la placa excavada y se observa para apreciar macroscópicamente las reacciones de aglutinación. La temperatura no debe ser mayor que la ambiental. Las reacciones de aglutinación se producen en unos cuantos segundos, excepto cuando se trata de eritrocitos que contienen el aglutinógeno A₃ que reacciona débilmente; lo mismo sucede con otras variantes débiles de A y B. El tiempo máximo para llevar a cabo la lectura de la reacción es de tres minutos.

Interpretación de las pruebas

De acuerdo con el esquema de interpretación (tabla 2.2) se determina el grupo sanguíneo a que pertenece la sangre problema. Es muy recomendable probar la sangre también con el suero anti-AB al realizar la prueba, en especial para detectar las variantes débiles de los grupos A y B las cuales pasarían inadvertidas sin el empleo de este suero. También éste sirve para identificar plenamente el grupo O.

Estas pruebas resultan más sensibles y exactas si se efectúan en un tubo en lugar de placa y se utiliza una suspensión a 5 % de los glóbulos rojos problema, lava-dos previamente con solución salina isotónica.

Tabla 2.2 **Interpretación de las pruebas.**

| Anti-A | Sueros | | Grupo sanguíneo |
|--------|--------|---------|-----------------|
| | Anti-B | Anti-AB | |
| -* | - | - | O |
| + | - | + | A |
| - | + | + | B |
| + | + | + | AB |

*El signo menos (-) indica que no hay aglutinación; el signo (+) significa la presencia de aglutinación.

Determinar la distribución del grupo ABO en los alumnos de la clase y discutir su distribución étnica.

Bibliografía recomendada

1. Bryan NJ. An introduction to immunohematology. 2a. ed. Filadelfia: Saunders; 1982.
2. Weir DM. Inmunología. México: Editorial El Manual Moderno; 1990.
3. Stites DO. Inmunología básica y clínica. 7a. ed. México: Editorial El Manual Moderno; 1991.

Preguntas orientadas para consolidar el conocimiento

- Que son las pruebas cruzadas
- Que son las pruebas directa e indirecta de Coombs
- Que tipo de herencia se da en el Sistema ABO

Preguntas para evaluar el conocimiento adquirido

- Cuales son las características estructurales de los antígenos del sistema ABO
- Cuales son los precursores de estos antígenos

| | | |
|--|--|---|
| Que fenotipos se tendrían a partir de los genotipos | | Cual es la estructura la sustancia H |
| Que tipo de anticuerpos se forman contra los antígenos del Sistema ABO | | De que manera se van formando las estructuras glicosidicas de los tipos ABO |
| Porque un individuo con fenotipo A o B, tiene anticuerpos contra el fenotipo que no posee. | | Cual es el tipo sanguíneo Bombay y como se forma |
| Cuales son los mecanismos que participan ewn la eritroblastosis fetal | | |
| Cual es la alternativa para evitar la isoimmunización materno fetal y como actúa. | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
PLAN DE ESTUDIOS DE LA LICENCIATURA DE MÉDICO CIRUJANO



Práctica de laboratorio
Fagocitosis (Evaluación estallido respiratorio)

Departamento responsable: Bioquímica
Realización por: Dr. Oscar Rojas Espinosa.
No. de Práctica:

Objetivos generales:

Antecedentes

La fagocitosis representa una de las primeras líneas de defensa en contra de los agentes infecciosos que han logrado atravesar las barreras externas de protección del cuerpo (piel y mucosas). La fagocitosis es ejercida fundamentalmente por los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMN) y por las células del sistema fagocítico mononuclear dentro del que se incluyen los macrófagos de todas las localizaciones corporales, las células de Langerhans y las células dendríticas.

La respuesta bioquímica de las células fagocíticas al contacto con el microorganismo conduce a la generación de sustancias tóxicas derivadas del metabolismo del oxígeno y el nitrógeno (*radicales libres del oxígeno y el nitrógeno*) que incluyen al anión superóxido, al peróxido de hidrógeno, a los iones hidroxilo, a los singletes de oxígeno, al óxido nítrico y a otros intermediarios inestables y muy reactivos. (11) Los radicales libres del oxígeno y el nitrógeno y las enzimas y proteínas microbicidas de los lisosomas se concentran en los fagolisosomas y son la causa de la muerte y digestión de los microorganismos ingeridos.

Los neutrófilos que han sido reclutados a los sitios de infección también pueden atrapar y matar microorganismos por el “lanzamiento” de NETs (*neutrophil extracellular traps*). Las NETs se liberan como resultado de la muerte celular dependiente de radicales libres del oxígeno (ROIs). Durante el proceso de formación de NETs, la producción de ROIs induce cambios morfológicos como desglobulación del núcleo y desorganización de la membrana nuclear. Después del rompimiento de la membrana nuclear, la cromatina (DNA e histonas) se mezcla intracelularmente con proteínas granulares (elastasa y otras hidrolasas). Finalmente la membrana celular se rompe expulsando las

NETs, un proceso conocido como NETosis.

Las anomalías en la función de las células fagocíticas pueden estar relacionadas con defectos en adherencia, locomoción, plasticidad, reconocimiento, adhesión, ingestión, formación y maduración de fagosomas, desgranulación, capacidad microbiana, o eliminación del material ingerido. La prueba estándar de la función fagocítica es la reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT, *nitroblue tetrazolium test*).

En la prueba del NBT, los fagocitos se incuban con un microorganismo de prueba (usualmente levaduras) en presencia de NBT, y se examinan al microscopio para buscar el grado de endocitosis y de reducción del NBT, por la formación de un formazan de color azul dentro de las células. Normalmente la mayoría de las células (>90%) son capaces de ingerir levaduras, sobre todo cuando estas están opsonizadas y la totalidad de las células que ingieren levaduras son capaces de reducir el NBT. En contraste, los neutrófilos de los pacientes con enfermedad crónica granulomatosa (CGD) aunque ingieren partículas de manera normal, no son capaces de reducir el colorante o lo hacen limitadamente (0-10% de las células) debido a defectos en su sistema generador de radicales libres del oxígeno (NADPH-Oxidasa). Entre estos extremos se pueden encontrar resultados intermedios en los portadores de un solo alelo defectuoso (en la CGD ligada al X) o en otras formas menos severas del defecto (CGD no ligada a X).

Justificación:

Competencias con las que se relaciona en orden de importancia

- (X) Pensamiento crítico, juicio clínico, toma de decisiones y manejo de información
- (X) Aprendizaje autorregulado y permanente
- (X) Comunicación efectiva
- (X) Conocimiento y aplicación de las ciencias biomédicas, sociomédicas y clínicas en el ejercicio de la medicina
- (X) Habilidades clínicas de diagnóstico, pronóstico, tratamiento y rehabilitación.
- (X) Profesionalismo, aspectos éticos y responsabilidades legales
- () Salud poblacional y sistemas de salud: promoción de la salud y prevención de la enfermedad.
- (X) Desarrollo y crecimiento personal.

| Índice Temático | | | | |
|-----------------|------|-------------------|------------|-----------------|
| Unidad | Tema | Objetivo temático | Subtema(s) | Horas Prácticas |

| | | | | |
|---|-------------------------|--|-------------|---|
| 1 | Respuesta Inmune Innata | Evaluar los mecanismos del estallido respiratorio en las células fagocíticas por medio de una prueba que se aplica en la clínica | Fagocitosis | 3 |
| <p>Desarrollo de la práctica:</p> <p>Materiales:</p> <p>Levaduras (utilizar material estéril: soluciones, tubos, frascos).</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Preparar una suspensión de levaduras dispersando 1.0 g de levaduras (de pan) en 100 ml de agua destilada (usar un matraz de 250 ml). Calentar al autoclave a 15 libras/ 10 min) y luego dejar enfriar. 2. Centrifugar a 1000 rpm durante 5 min (usar tubos de centrífuga de 50 ml). 3. Descartar el sedimento y centrifugar el sobrenadante a 1000 rpm por 5 min. 4. Repetir el paso 3. 5. Descartar el sedimento y recuperar el sobrenadante. El sobrenadante contiene levaduras “finas” (de pequeño tamaño). 6. Hacer una cuenta de levaduras en una cámara de Neubauer. 7. Ajustar la suspensión a 100×10^6 levaduras por ml con solución salina fisiológica. 8. Envasar la suspensión en alícuotas (de 10 o 20 ml cada una). <p>Solución de NBT.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Preparar una suspensión de NBT al 0.1% en solución salina fisiológica (disolver 10 mg de NBT en 10 ml de agua y luego adicionar 85 mg de NaCl sólido, en ese orden). <p>Colorante safranina</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Pesar 0.5 g de safranina y disolver en 100 ml de agua destilada (solución al 0.5%) <p>Opsonización de las levaduras.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Tomar 2 alícuotas de 1.0 ml de la suspensión de levaduras con 100×10^6 células por ml y centrifugarlas a 3000 rpm por 5 min (se pueden usar tubos de microcentrífuga de 1.5 ml). | | | | |

2. Eliminar el sobrenadante de una de las alícuotas y suspender el botón en 1.0 ml de suero fresco o suero mantenido a -70°C .
3. Eliminar el sobrenadante de la otra alícuota y suspender el botón en 1.0 ml de solución salina fisiológica
4. Incubar las dos alícuotas a 37°C durante 30 min
5. Centrifugar las dos alícuotas a 3000 rpm por 5 min.
6. Eliminar el sobrenadante de las dos alícuotas y sustituirlo con 1.0 ml de solución salina fisiológica.
7. Centrifugar las dos alícuotas a 3000 rpm por 5 min (lavado de las levaduras)
8. Eliminar el sobrenadante de las dos alícuotas y sustituirlo con 1.0 ml de la solución de NBT.
9. Mantener las levaduras en refrigeración hasta su uso, o congeladas a -20°C si se van a usar varios días después.

Preparación de los portaobjetos.

1. Lavar los portaobjetos (un portaobjetos por prueba) con detergente en polvo corriente, sin aromatizantes ni aditivos. Usar una esponja para lavarlos.
2. Enjuagar los portaobjetos con suficiente agua corriente y finalmente con agua destilada.
3. Dejar secar los portaobjetos al aire. De aquí en adelante no tomar los portaobjetos de las superficies sino de los bordes.
4. Marcar sobre los portaobjetos 3 círculos equidistantes de 1 cm de diámetro (se puede usar lápiz de diamante o plumón de tinta indeleble. Si se usa lápiz de diamante los círculos se pueden marcar antes del lavado de los portaobjetos). Alternativamente, estos portaobjetos se pueden adquirir de un distribuidor comercial. Hacer alguna marca sobre el portaobjetos para identificar los círculos control (C, para cuenta diferencial), levaduras opsonizadas (LO), y levaduras no opsonizadas (LN).

Preparación de las monocapas de células.

1. Tomar 5 ml de sangre venosa y depositarla en un tubo de vidrio de 10 o 15 ml de tapón de rosca conteniendo aproximadamente 10 perlas de vidrio (o cuerpos de ebullición) de tamaño pequeño.
2. Mezclar la sangre con las perlas de vidrio por inversión continua del tubo hasta que se forme la fibrina y se atrape entre las perlas. La mezcla por inversión requiere de 5 a 10 min.
3. Evitando el coágulo de fibrina, tomar alícuotas de 50 microlitros de sangre desfibrinada y depositarlas en el centro de cada círculo marcado sobre el portaobjetos.
4. Colocar cada portaobjetos dentro de una caja de Petri provista de papel humedecido en la tapa (cámara húmeda).
5. Incubar las cajas a 37°C durante 30 min (etapa de adherencia de las células).

Estimulación de las células.

1. Recuperar los cubreobjetos, escurrir el exceso de sangre desfibrinada y lavar las preparaciones con 2 – 3 ml de solución salina a temperatura ambiente. Este paso es crítico y la solución de lavado no debe depositarse sobre los círculos que contienen las células sino por fuera de ellos. El lavado se logra oscilando al aire (no sobre la mesa) las preparaciones cubiertas con solución salina (cuidado, el lavado enérgico ocasionará que las células se despeguen).
2. Repetir el lavado una vez más y no se preocupe si todavía observa demasiada sangre sobre las preparaciones de células.
3. Secar, cuidadosamente, con papel higiénico el líquido que queda alrededor de los círculos (¡no toque los círculos y no deje que las monocapas se sequen!).
4. Regresar el portaobjetos a la caja de Petri (cámara húmeda) y colocar 50 microlitros de solución salina al círculo control, 50 microlitros de levaduras opsonizadas al círculo LO, y 50 microlitros de levaduras no opsonizadas al círculo NO.
5. Incubar las placas a 37°C durante 30 min.
6. Recuperar los portaobjetos y repetir el proceso de lavado como se indica en los incisos 1 y 2 de esta sección.

Tinción de las preparaciones.

1. Cubrir los círculos con las monocapas celulares con safranina al 0.5% en agua durante 10 min
2. Enjuagar cuidadosamente las preparaciones teñidas con agua destilada hasta que se elimine el colorante en exceso (aquí es mejor sumergir las preparaciones en agua en jarras de Copling, haciendo 2 o 3 cambios del agua de lavado).
3. Recuperar las preparaciones, dejarlas secar al aire (puede ayudarse de aireación manual).
4. Montar las preparaciones con resina sintética entre porta- y cubreobjetos.
5. Dejar secar la resina y hacer las observaciones al microscopio.

ACTIVIDADES.

I. Cuenta diferencial

1. Observe a 40X las preparaciones de las células control (no estimuladas) y haga una cuenta diferencial (PMN, MN, Lc y otras células). Prepare una gráfica de barras (porcentaje de cada tipo celular).

II. Endocitosis

2. Observe a 40X las preparaciones de las células tratadas con levaduras opsonizadas, haga una cuenta y determine el porcentaje de células que fagocitaron y las que no fagocitaron.

3. Observe a 40X las preparaciones de las células tratadas con levaduras no opsonizadas, haga una cuenta y determine el porcentaje de células que fagocitaron y las que no fagocitaron.
4. Observe a 40X las preparaciones de las células tratadas con levaduras opsonizadas, haga una cuenta y determine el porcentaje de células que fagocitaron 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, y 10 o más levaduras por célula.
5. Observe a 40X las preparaciones de las células tratadas con levaduras no opsonizadas, haga una cuenta y determine el porcentaje de células que fagocitaron 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, y 10 o más levaduras por célula.
6. Prepare gráficos de barras para cada resultado.

III.Reducción del NBT

7. De las células que fagocitaron cuente y determine el porcentaje de células que redujeron el NBT (basta con que una levadura aparezca asociada al formazano azul, para considerar positiva la reducción del colorante).
8. Exprese sus resultados en forma de gráficos de barras.

IV.Discusión

1. Discuta sus resultados con su grupo y su asesor, y concluya de manera pertinente.

Bibliografía recomendada

REFERENCIAS ORIGINALES

1. Park BH, Fikrig SM, Smithwick EM. Infection and nitroblue-tetrazolium reduction by neutrophils. A diagnostic aid.

- Lancet. 1968 Sep 7;2(7567):532-4.
2. Park HH, Good RA. N.B.T. test stimulated. Lancet. 1970 Sep 19;2(7673):616
 3. Humbert JR, Marks MI, Hathaway WE, Thoren CH. The histochemical nitroblue tetrazolium reduction test in the differential diagnosis of acute infections. Pediatrics. 1971 Aug;48(2):259-67.
 4. Park BH. The use and limitations of the nitroblue tetrazolium test as a diagnostic aid. J Pediatr. 1971 Feb;78(2):376-8.
 5. Baehner RL, Nathan DG. Quantitative nitroblue tetrazolium test in chronic granulomatous disease. N Engl J Med. 1968 May 2;278(18):971-6.

REFERENCIAS GENERALES

1. Dale DC, Boxer L, Liles WC. (2008). The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood* 112, 935-945.
2. Rojas-Espinosa O. y Arce Paredes P. Fagocitosis: mecanismos y consecuencias. Primera parte. *Bioquimia*. Vol. 28, No. 4, pag. 19-28, 2003.
3. Rojas-Espinosa O. y Arce Paredes P. Fagocitosis: mecanismos y consecuencias. Segunda parte. *Bioquimia*. Vol. 29, No. 1, pag. 18-31, 2004.
4. Rojas-Espinosa O. y Arce Paredes P. Fagocitosis: mecanismos y consecuencias. Tercera parte. *Bioquimia*. Vol. 29, No. 2, pag. 55-67, 2004.
5. Rojas-Espinosa O. y Arce-Paredes P. A practical approach to phagocytic function (in press 2011).

| Preguntas orientadas para consolidar el conocimiento | | | Preguntas para evaluar el conocimiento adquirido | | |
|---|--|--|--|--|--|
| Que consecuencias tendría para el individuo defectos en la NADPH oxidasa | | | Cuales son los componentes de la NADPH oxidasa | | |
| Que importancia tiene para el individuo la liberación de la mieloperoxidasa al fagosoma | | | Porque y como se forman los compuesto reactivos de oxígeno | | |
| Cual es la importancia del citoesqueleto en la fagocitosis | | | Que otros compuestos de forman a partir de los reactivos del oxígeno | | |
| Que mecanismos y señales participan en la formación del oxido nítrico | | | Discutir la importancia de la mieloperoxidasa y la formación de compuestos halogenados | | |
| | | | Cuales son los mecanismos de muerte intracelular no dependientes de oxígeno | | |

| | | | |
|---|--|---|--|
| Que importancia tiene saber si las bacterias infectantes son catalasa positivas | | Como se reduce el nitroazul de tetrazolio | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
PLAN DE ESTUDIOS DE LA LICENCIATURA DE MÉDICO CIRUJANO



Práctica de laboratorio

Crisis asmática

Departamento responsable: Bioquímica

Realización por: Jesús Rivera Jiménez, Alba Sofía Pérez Acosta, F. Raúl Chávez S.

No. de Práctica:

Objetivos generales:

- Conocer el concepto de asma y los mecanismos inmunológicos envueltos en el desarrollo de esta enfermedad.
- Asociar los mecanismos fisiopatológicos con las manifestaciones clínicas del asma.
- Identificar los factores predisponentes y desencadenantes para el desarrollo de un cuadro asmático agudo.
- Conocer y aplicar de manera correcta los auxiliares de diagnóstico para una crisis asmática.
- Tomar decisiones adecuadas al enfrentarse a un paciente con una crisis asmática, con base en los mecanismos fisiopatológicos, y el conocimiento de los efectos farmacológicos de la terapéutica empleada.

Antecedentes

Una respuesta de hipersensibilidad ocurre cuando una respuesta inmune se desarrolla de forma inapropiada o exagerada, en respuesta a una exposición prolongada o repetitiva a un antígeno, produciendo daño tisular, el cual podría resultar muy grave para la integridad del individuo. La hipersensibilidad se manifiesta al segundo contacto con el antígeno, cuando el hospedero ha sido previamente "sensibilizado", y ha desarrollado una inmunidad adaptativa ante el factor desencadenante.

Robin Coombs y Philip Gell describieron en 1963 cuatro tipos de hipersensibilidad; la aparición de una forma no es excluyente para que coexistan las otras formas.

La hipersensibilidad tipo I (también conocida como hipersensibilidad inmediata) se caracteriza por una respuesta adaptativa tipo Th2, desencadenada por la exposición a un antígeno, con la producción subsecuente de IgE, la cual tiene la capacidad de unirse a los receptores FcεRI localizados en la superficie de los mastocitos, los cuales con una segunda exposición al antígeno se activan, liberando tanto mediadores inflamatorios que a su vez atraerán y activarán otras células, así como otras sustancias con efectos fisiológicos diversos, que a su vez contribuyen también al desarrollo del proceso inflamatorio y las manifestaciones clínicas de la enfermedad.

El asma es una enfermedad caracterizada por obstrucción de la vía aérea, que tiene la capacidad de ser reversible. Es causada por un proceso inflamatorio secundario a una reacción de hipersensibilidad inmediata. Se estima que alrededor de 300 millones de personas en todo el mundo padecen esta enfermedad. El 50% de los casos se diagnostican antes de los diez años, con una relación varón:mujer de 2:1, igualándose en la adolescencia y posteriormente en la edad adulta es mayor la prevalencia en mujeres. El antecedente de atopia es el factor de riesgo más importante para el desarrollo de asma. Existe un amplio espectro de factores ambientales que pueden desencadenar esta enfermedad, como son alérgenos

inhalados (polen, polvo, esporas), alimentos (fresa, kiwi, cacahuete), fármacos (penicilina, salicilatos, sulfas), entre muchos otros. Hay factores también que pueden contribuir al desarrollo o exacerbación de esta enfermedad, como son la contaminación ambiental, tabaquismo, infecciones virales, por mencionar algunos, así como también existen otros factores asociados, como el ejercicio, el frío, los cambios hormonales, el uso de algunos medicamentos (salicilatos), entre otros.

En la patogenia del asma, el mecanismo principal de daño está mediado por el enlace cruzado con un alérgeno entre dos moléculas de IgE unidas a su receptor Fc en la superficie de mastocitos, lo que provoca en primer lugar la degranulación de los mismos, con la liberación de diversos mediadores que son los responsables de la respuesta inmediata después de la exposición al antígeno. Dentro de estos mediadores, el principal es la histamina, la cual tiene como efectos provocar contracción del músculo liso, con la subsecuente disminución del calibre de los bronquios, así como aumento de la permeabilidad vascular, provocando así edema de la vía aérea; también existen en los gránulos algunas proteasas (quimasa y tripsina), las cuales participan activamente en la lesión tisular. Posteriormente ejercen su efecto los derivados del ácido araquidónico, entre los que se encuentran leucotrienos B₄, C₄ y D₄, prostaglandina D₂, y el factor activador de plaquetas, con funciones similares a la histamina, así como con actividad proinflamatoria. En una etapa posterior se expresan los productos de genes de citocinas que favorecen la continuación del proceso inflamatorio, siendo éstas de un perfil Th₂, caracterizado por IL-3 (que estimula la proliferación de mastocitos), IL-4 (que favorece el cambio de isotipo hacia IgE), IL-13 (similar a la IL-4, y estimula la producción de moco por el epitelio bronquial), IL-5 (que estimula la activación y proliferación de eosinófilos), así como las citocinas de la inmunidad innata TNF- α y MIP-1 α , que favorecen el proceso inflamatorio. Dentro de una fase posterior, y característicamente en la fase crónica de la enfermedad, los eosinófilos que fueron atraídos a la vía aérea son los principales efectores, con la liberación de los productos de sus gránulos, como son la proteína básica principal y la proteína catiónica eosinófila, que provocan daño tisular, derivados del ácido araquidónico, y citocinas tanto proinflamatorias y quimiotácticas (IL-8, RANTES, eotaxina) como de un perfil Th₂ (IL-4, IL-5).

Las manifestaciones de la enfermedad se dan básicamente en el aparato respiratorio, y la triada clásica con la que se describen son la presencia de tos (generalmente no productiva), disnea (dificultad para respirar) y sibilancias (sonido silbante que produce el aire al pasar por las vías respiratorias congestionadas o con un calibre reducido). Estos eventos pueden tener desde una intensidad leve, hasta una tan severa que pueden poner en peligro la vida, este último caso correspondería a una crisis asmática, la cuál es una urgencia y requiere tratamiento inmediato.

Para el diagnóstico de esta entidad nos basamos en una adecuada historia clínica, donde podemos encontrar el antecedente de atopia o la presencia de alguna otra enfermedad alérgica, tanto en el paciente como en algún familiar, la presencia de eventos previos similares, o el antecedente de infecciones de vías respiratorias de repetición. En la exploración encontraremos los datos previamente mencionados en las manifestaciones clínicas, datos de dificultad respiratoria (tiraje intercostal, disociación tóraco-abdominal, aleteo nasal, retracción xifoidea y quejido espiratorio); también es posible encontrar datos sugestivos de alguna otra enfermedad alérgica. Dentro de los estudios paraclínicos tenemos los de laboratorio, donde podemos encontrar en una citometría hemática la presencia de eosinofilia, característicamente, y en muestras de expectoración también se pueden encontrar eosinófilos, neutrófilos, cristales de Charcot-Leyden (restos de lisofosfolipasa, una enzima sintetizada por los eosinófilos), cuerpos de creola (células columnares descamadas) o cuerpos espirales de Curschmann (vestigios de epitelio descamado); en una gasometría encontraremos inclusive parámetros normales en un paciente con asma crónica, hipoxemia e hipocapnia por hiperventilación y alcalosis respiratoria, en el caso de un proceso agudo, y debido a la fatiga de los músculos respiratorios y a la incapacidad de ventilación se puede encontrar en casos severos hipercapnia con acidosis respiratoria. Dentro de los estudios de gabinete podemos utilizar la radiografía de tórax, que puede mostrar datos de hiperinsuflación (por el atrapamiento aéreo), así como para hacer diagnóstico diferencial con otras enfermedades, o para detectar la presencia de alguna complicación asociada. Es importante evaluar la función respiratoria mediante espirometría, tanto para confirmar el diagnóstico,

como para evaluar la respuesta al tratamiento; en ella se evalúa tanto la capacidad vital forzada (FVC) como el volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV₁); una disminución en el FEV₁ nos indica un patrón obstructivo, compatible con asma, así mismo, un aumento $\geq 12\%$ o ≥ 200 ml posterior a la administración de un broncodilatador nos demuestra la reversibilidad del cuadro, lo que también nos orienta hacia el diagnóstico de asma; una relación FEV₁/FVC normal es >0.75 en adultos o >0.9 en niños, valores menores nos indican también un patrón obstructivo. Pueden usarse también para el diagnóstico pruebas de provocación, donde se manifiesta la hiperreactividad de la vía aérea al exponer al paciente a sustancias, usualmente metacolina o histamina, causando estas generalmente una disminución del 20% del FEV₁. Otras pruebas auxiliares pueden ser la detección no invasiva de marcadores inflamatorios en la vía aérea, como los comentados en las muestras de esputo, así como la medición de los niveles exhalados de óxido nítrico (FeNO) o de monóxido de carbono (FeCO), también como indicadores de actividad inflamatoria; y por último indicadores de la presencia de enfermedad alérgica, como la detección sérica de IgE o pruebas de reacción cutánea con alérgenos.

De acuerdo a la GINA (*Global Initiative for Asthma*) 2010, el asma puede ser clasificada de diversas maneras, ya sea de acuerdo a su etiología, a su expresión fenotípica, a su nivel de control o a la severidad. De acuerdo al nivel de control, la clasificación consiste en:

| Características | Controlado (Todas las características) | Parcialmente controlado (Cualquiera de las siguientes presente) | No controlado |
|--|--|---|--|
| Síntomas durante el día | Ninguna (dos veces o menos por semana) | Más de dos por semana | Tres o más características del asma parcialmente controlado. |
| Limitación de las actividades | Ninguna | Cualquiera | |
| Síntomas nocturnos/que despierten al paciente. | Ninguno | Cualquiera | |
| Necesidad de tratamiento de rescate | Ninguna (dos veces o menos por semana) | Más de dos por semana | |
| Función pulmonar (PEF o FEV ₁) | Normal | <80% del valor predicho o su mejor marca personal (si se conoce). | |

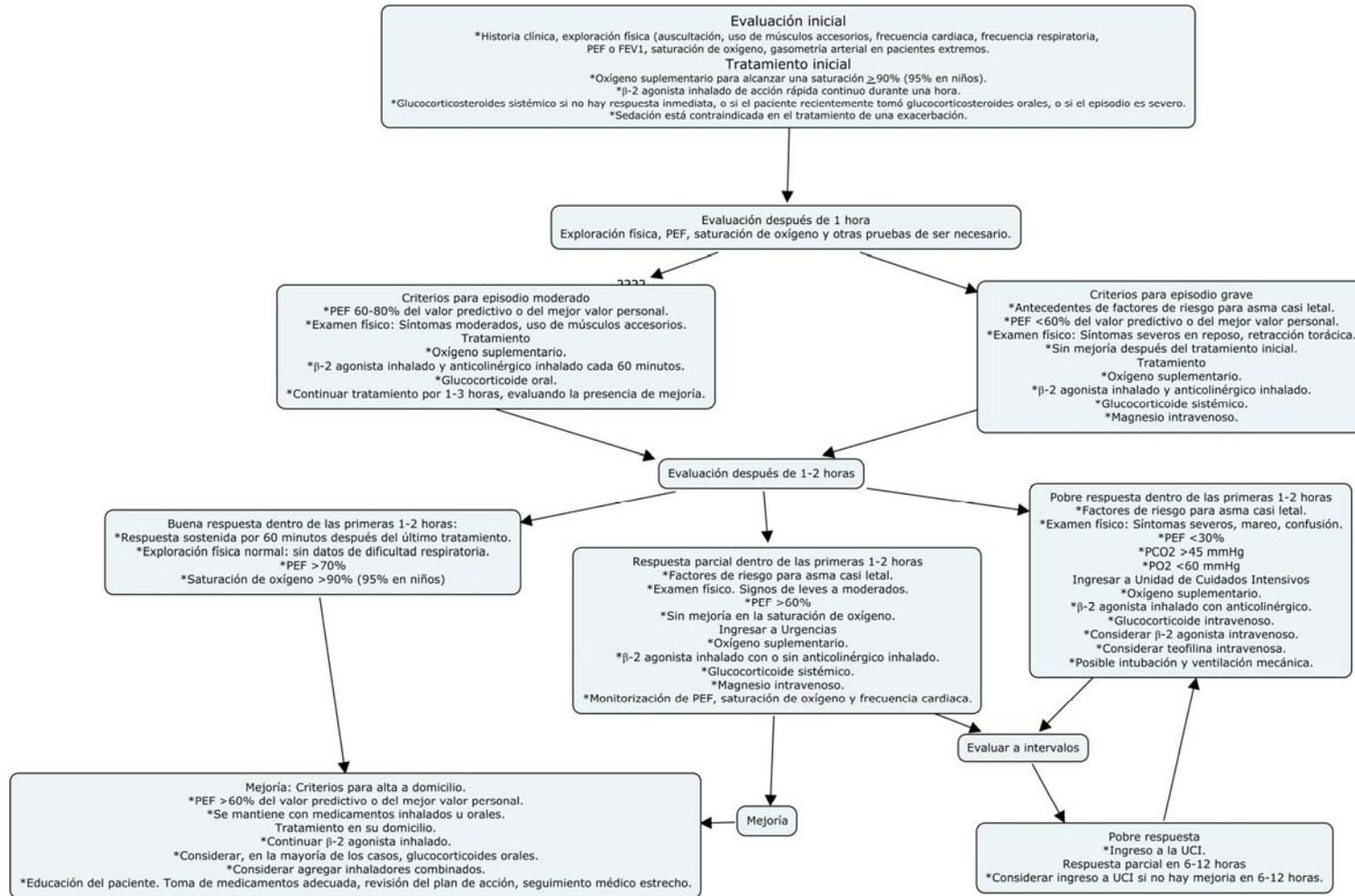
De acuerdo a su severidad, actualmente se clasifica en:

- Leve. Aquella que puede ser controlada con un tratamiento de baja intensidad, como dosis bajas de corticosteroides inhalados, modificadores de leucotrienos o cromonas.
- Severa. Aquella que requiere un tratamiento de alta intensidad, o cuando el tratamiento de alta intensidad no es suficiente para controlar los síntomas.

Existen diversos medicamentos para el tratamiento del asma, los cuales se pueden clasificar en aquellos que se utilizan para el control a largo plazo de la enfermedad, y aquellos que se utilizan para el control y alivio inmediato de los síntomas de broncoespasmo. Dentro del primer grupo tenemos a los corticosteroides inhalados, los modificadores de leucotrienos, agonistas β -2 inhalados de acción prolongada, metilxantinas, comonas, anticuerpos monoclonales anti-IgE, agonistas β -2 orales de acción prolongada, glucocorticosteroides sistémicos y compuestos orales antialérgicos. Dentro de

los medicamentos de rescate contamos con los agonistas β -2 inhalados de acción rápida, glucocorticoides sistémicos, anticolinérgicos y metilxantinas.

La GINA 2010 propone el siguiente algoritmo para el manejo de una crisis asmática.



Justificación:

Al ser la Inmunología una de las ciencias de las bases biomédicas dentro del plan de estudios, es importante asentar en el alumno la importancia de esta asignatura con relación a sus futuros ciclos clínicos, dado el papel fundamental que juega el sistema inmune tanto en la defensa como en el desarrollo de enfermedades en el ser humano. Siendo las reacciones de hipersensibilidad tipo I las involucradas en el desarrollo de las enfermedades alérgicas, y siendo estas últimas una causa frecuente de visitas al médico, tanto en la consulta externa, como en los servicios de Urgencias, es importante que el alumno de segundo año de la carrera comience a involucrarse con la atención al paciente, sin perder de vista la fuerte asociación que existe entre los mecanismos moleculares y celulares implicados en esta enfermedad, con las manifestaciones y consecuencias clínicas que estos mismos pueden causar.

Competencias con las que se relaciona en orden de importancia

- (3) Pensamiento crítico, juicio clínico, toma de decisiones y manejo de información
- (2) Aprendizaje autorregulado y permanente
- (-) Comunicación efectiva
- (1) Conocimiento y aplicación de las ciencias biomédicas, sociomédicas y clínicas en el ejercicio de la medicina
- (4) Habilidades clínicas de diagnóstico, pronóstico, tratamiento y rehabilitación.
- (-) Profesionalismo, aspectos éticos y responsabilidades legales
- (5) Salud poblacional y sistemas de salud: promoción de la salud y prevención de la enfermedad.
- (-) Desarrollo y crecimiento personal.

| Índice Temático | | | | |
|-----------------|--|--|--|-----------------|
| Unidad | Tema | Objetivo temático | Subtema(s) | Horas Prácticas |
| 4 | Introducción a la inmunopatología e inmunología clínica. | Describir e identificar las alteraciones de la respuesta inmune tanto por defectos en la regulación o bien por deficiencias en los componentes de la respuesta inmune. | Hipersensibilidades de tipo I, II, III y IV. | 2 |

Desarrollo de la práctica:

La práctica se llevará a cabo en dos sesiones, la primera dentro del aula, y la segunda en la sala de replicación hospitalaria del Centro de Enseñanza y Certificación de Aptitudes Médicas (CECAM).

En la primera sesión se abordarán los conocimientos teóricos del asma y la crisis asmática, con un enfoque hacia los mecanismos que desencadena el sistema inmune para el desarrollo de la enfermedad y cuáles de estos son alterados o suprimidos mediante la acción farmacológica de los agentes empleados en su tratamiento logrando una correlación entre la Inmunología y otras asignaturas, como Fisiología y

Farmacología.

En la segunda sesión se realizará un breve recordatorio de los conceptos básicos de la enfermedad, y se procederá a enfrentar al alumno a un escenario clínico simulado ante un paciente con una crisis asmática, situación que quedará a cargo del CECAM.

Bibliografía recomendada

- Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne B, Kuby J. *Inmunología*. 6 ed. McGraw-Hill Interamericana Editores. México. 2007.
- Male D, Brostoff J, Roth D, Roitt I. *Immunology*. 7th Ed. Mosby Elsevier. Canada. 2006.
- *Global Strategy for Asthma Management and Prevention. Updated 2010*. Global Initiative for Asthma.
- Serrano C, Valero A, Picado C. *Rinitis y asma: una vía respiratoria, una enfermedad*. Arch Bronconeumol. 2005;41(10):569-78

| Preguntas orientadas para consolidar el conocimiento | | Preguntas para evaluar el conocimiento adquirido | |
|--|--|---|--|
| Describe que son las atopias. | | Cuáles son las características de la IgE | |
| Cuál sería la diferencia entre un alérgeno y un PAMP | | Que tipos de receptores para el Fc de la IgE existen y que características tienen | |
| Cuáles son los mecanismos que lleva a la contracción bronquial | | Que células expresan receptores para el Fc de la IgE y de qué tipo son. | |
| Cuál sería la contraindicación del uso de aspirina en un paciente con crisis asmática | | Qué caracteriza a una respuesta de tipo Th2 | |
| Mediante que pruebas se puede evaluar a un paciente atópico | | Cuáles son las características funcionales de las células cebadas. | |
| Cuales componentes genéticos participan en la enfermedad alérgica. | | Cuáles son los mediadores preformados almacenados en las vesículas de células cebadas y basófilos | |
| De qué manera la IgE participa en la desgranulación de las células cebadas | | Cuáles son los mediadores formados de novo. | |
| Cuál sería el papel del TGFβ en fisiopatogenia del asma crónica | | Cómo se forman estos mediadores a partir del ácido araquidónico | |
| Cuál es el origen de las sibilancias | | Cuáles son y qué acciones tienen las citocinas que participan en la hipersensibilidad tipo I | |
| Porque el uso de alergen en dosis progresivas puede inducir tolerancia al alérgeno específico. | | Que poblaciones celulares participan en el proceso asmático | |
| | | Cuáles son los principales mediadores con efecto espasmógeno en bronquios | |
| | | Cuáles son los mediadores con efecto quimiotáctico | |