



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

LIC. EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

DEPARTAMENTO DE ANÁLISIS CLÍNICOS-HEMATOLOGÍA

**EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LOS EFECTOS DEL ANTICOAGULANTE
EDTA (ETILENDIAMINTETRAACETICO) SOBRE LOS VALORES DE
HEMOGLOBINA Y LOS COMPONENTES CELULARES DE MUESTRAS
SANGUÍNEAS**

PRESENTA

p.Q.F.B. GILBERTO GERARDO PALMERO RIVERA

DIRECTOR DE TESIS

M. C. RAFAEL MUÑOZ BEDOLLA

Depto. de Análisis Clínicos, FCQ

ASESORES:

Dra. ESTHER LARA GONZÁLEZ

Depto. de Química General, FCQ

PUEBLA, PUE., JUNIO 2017

AGRADECIMIENTOS

Camino largo, cansado, abrumador y tedioso he pasado para llegar al momento de poder escribir las siguientes líneas.

Empecemos. Clásico y necesario se vuelve agradecer a la deidad, especie, naturaleza o universo que nos creó, y me permitiré decir que aunque no comprendo su forma de proceder ni de diseñar planes de vida y tal vez ni el fundamento de su existencia, no deja de sorprenderme como a pesar de lo mencionado demuestra ser más grande que la propia vida.

En esta etapa fueron fundamentales mis amigos, agradezco con el corazón a ti Caro, Elo, Jordan, Julio, Rouse y en especial a David, por ustedes llego al fin de esta etapa, su apoyo y tiempo para consumir este paso lo llevo en el alma.

Amiga, compañera y pareja, aunque poco es el tiempo el que tienes en mi vida, tu alegría por la vida, el modo de alentarme y mantenerte a mi lado muy a pesar de mi me inspiran a no rendirme. Gracias por todo lo que representas Male.

A mis muy amados hermanos, con los que he compartido la mayor parte de mis días vividos, a su lado he conocido la bondad y amistad real. Gracias Manuel por el inmenso apoyo que he recibido de ti, tu lealtad y amor no los cambio por nada en el mundo. Paco, aunque eres el mas chico de esta familia, en secreto he mantenido que me servías de inspiración para esforzarme y elevar mi coeficiente, admiro tu inteligencia y valía ante lo que enfrentas.

Y al final, por ser el mas especial y sentido de mis agradecimientos, menciono a mis padres, las personas mas importantes en mi vida. Gracias por estar detrás de mi, sacrificar tiempo, seguridad y vidas para formarme, en mis recuerdos llevo todos los momentos que hemos pasado, tanto los buenos como duros, que a pesar de estos últimos, jamás me dejaron sin su apoyo y amparo. Si hay algo mas pueda

agradecerle a la vida es el haberme otorgado la bendición de vivir esta vida con
ustedes, los amo.

RESUMEN

La sangre es una forma especializada del tejido conjuntivo, compuesta por una sustancia intercelular líquida llamada plasma, en la cual se encuentran en suspensión los elementos figurados: hematíes, leucocitos y plaquetas.

La sangre circula a través de un sistema de tubos cerrados, denominados vasos sanguíneos

Por su parte, las células sanguíneas se forman en la médula ósea a partir de células madre. La sangre pasa a través de la médula ósea y recoge las células sanguíneas plenamente desarrolladas para que circulen en la sangre.

Para preservar los componentes sanguíneos, se hace uso de distintos anticoagulantes, entre los que destaca el EDTA, el cual es un quelante que se une con fuerza a diferentes metales, entre los cuales se destaca el calcio, metal que participa en la cascada de coagulación. Sin embargo, en distintas investigaciones se ha señalado algunos efectos adversos del EDTA y su relación con problemas óseos, tales como osteopenia y osteoporosis.

En esta investigación, se expuso a los hematíes a diferentes concentraciones de EDTA, en las cuales se notaron modificaciones en los componentes sanguíneos, notando la modificación en las formas de los hematíes.

I. INTRODUCCIÓN.

La sangre es un tejido líquido que recorre el organismo, a través de los vasos sanguíneos, transportando células, todos los elementos necesarios para realizar sus funciones vitales. La cantidad de sangre y sus componentes varían con respecto a factores como la edad, peso, sexo y altura.

La sangre tiene diferentes funciones importantes en el organismo, que van desde el transporte de nutrientes a las células, la oxigenación, procesos inmunitarios y de

coagulación hasta la recolección de desechos metabólicos para su eliminación en los órganos de excreción.

En el banco de sangre, la transfusión es una actividad cotidiana y de suma importancia. Esta se ha llevado con éxito por más de 60 años, tiempo en el que esta práctica ha sufrido cambios importantes en los procesos de extracción y conservación de la sangre. El uso de soluciones anticoagulantes inhibe el proceso de coagulación y proporciona el ambiente adecuado para los componentes sanguíneos, así también a los procesos metabólicos llevados a cabo por los mismos y cuidar el equilibrio bioquímico entre glucosa, pH y ATP.

Uno de los anticoagulantes más usados en la extracción sanguínea para su análisis y conservación es el EDTA. Este quelante químico atrae y elimina el calcio en libertad en el torrente sanguíneo con lo que se evita que se lleve a cabo el proceso de coagulación.

Sin embargo, el EDTA se ha visto relacionado con osteopenia y problemas óseos similares, debido a su presencia en paquetes globulares que, al secuestrar al calcio, provoca la disminución de su concentración en el sistema óseo.

II ANTECEDENTES.

2.1 Sangre.

La sangre es un tejido líquido que recorre el organismo, a través de los vasos sanguíneos, transportando células, todos los elementos necesarios para realizar sus funciones vitales (respirar, formar sustancias, defenderse de agresiones). La cantidad de sangre de una persona está en relación con su edad, peso, sexo y altura. Una persona adulta tiene entre 4.5 y 6 litros de sangre, el 7% de su peso corporal.

La sangre transporta los nutrientes desde el aparato digestivo hasta las células, de donde se recogen también las sustancias de desecho para eliminarlas a través de los riñones, hígado y otros órganos de excreción. También es la encargada de regular el transporte del oxígeno y la eliminación del anhídrido carbónico. Tiene un papel importante en funciones como la coagulación, la inmunidad y control de la temperatura corporal (Rojas *et al*, 2011).

El sistema linfohematopoyético está constituido por la sangre, la médula ósea, el bazo, el timo, los vasos y los ganglios linfáticos. En conjunto, la sangre y la médula ósea forman el sistema hematopoyético. La médula ósea es el lugar en el que se producen las células para reponer constantemente los elementos celulares de la sangre (eritrocitos, neutrófilos y plaquetas).

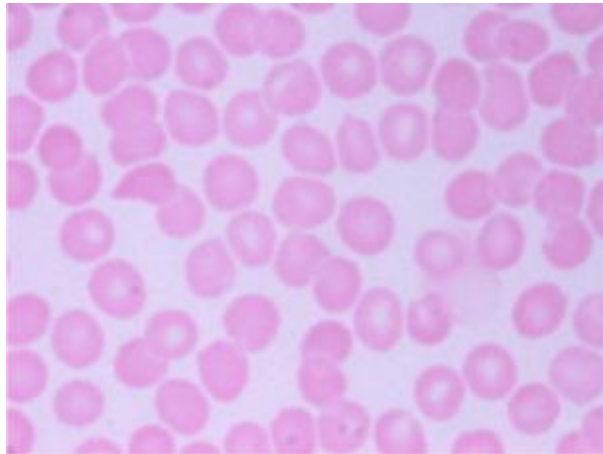
Para cumplir adecuadamente sus funciones, los elementos celulares deben circular en las cantidades apropiadas y mantener su integridad estructural y fisiológica (Bernard, 2006).

2.2 Serie roja.

Los eritrocitos (Figura 1) son células altamente especializadas en el transporte de oxígeno hacia los tejidos. El conjunto de células de la serie roja, es decir, desde los progenitores hasta la célula madura, se conoce con el nombre de eritrón, unidad considerada un verdadero órgano en términos funcionales.

El eritrocito tiene el aspecto de un disco bicóncavo, con un diámetro promedio de 8 micrones, el cual disminuye discretamente con el envejecimiento celular (Abbott Laboratories de México, 2002).

Los eritrocitos maduros carecen de núcleo pero tienen metabolismo, consumen O₂, ATP y glucosa y liberan CO₂. Estas funciones metabólicas son empleadas para alimentar los sistemas de transporte activo que mantiene la homeostasia iónica entre la célula y su medio (el glóbulo rojo y el plasma) (Cacheda & Cacheda, 2012).



Tomada de: Megías *et al*, 2015)

Figura 1. Eritrocito

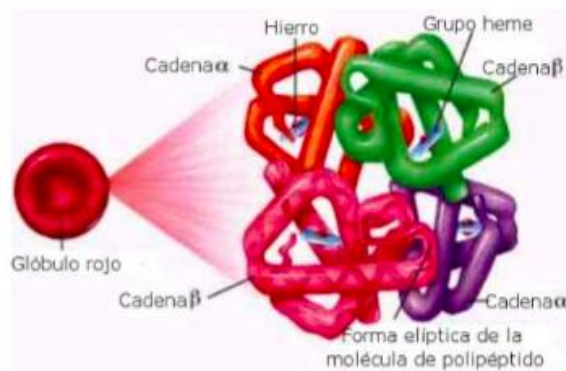
El esqueleto membranoso normal de los eritrocitos es una estructura en forma de red o malla constituida por aproximadamente 100,000 unidades hexagonales; las porciones laterales de los hexágonos están formadas por moléculas de alfa y beta espectrinas y los vértices por moléculas de actina y otras proteínas. Tanto los vértices (nodos) como las porciones laterales, están unidos a proteínas integrales de la membrana plasmática formando una estructura continua con ésta

Cada lado del hexágono tiene cuatro moléculas de espectrina, dos alfa y dos beta. Una molécula de alfa espectrina se une lateralmente con una molécula de beta espectrina a través de zonas de nucleación situadas en la porción COOH terminal de la alfa espectrina y NH terminal de la beta espectrina, es decir cerca del vertice o nodo del hexagono formando un heterodimero (Amador *et al.* 2002).

Parte fundamental del eritrocito es la hemoglobina. La hemoglobina (Figura 2) es una proteína compleja constituida por el grupo hem que contiene hierro y le da el color rojo al eritrocito (Burger & Pierre-Louis, 2002), y una porción proteínica, la globina, que está compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas (cadena de aminoácidos) que comprenden dos cadenas alfa y dos beta (Burger & Pierre-Louis, 2003). Esta misma se encuentra en grandes cantidades dentro del eritrocito (Brandan *et al*, 2008).

La hemoglobina es la principal proteína de transporte de oxígeno en el organismo, es capaz de fijarlo eficientemente a medida de que este entra a los alveolos pulmonares durante la respiración (Jordan, 2013).

La hemoglobina es una proteína con estructura cuaternaria, es decir, esta constituida por cuatro cadenas polipeptídicas dos α y dos β (hemoglobina adulta- HbA); dos α y dos δ (forma minoritaria de hemoglobina adulta- HbA₂- normal 2%); dos α y dos γ (hemoglobina fetal- HbF). En el feto humano, en un principio, no se sintetizan cadenas alfa ni beta, sino zeta (ζ) y epsilon (ξ) (Hb Gower I).



Tomada de: Brandan *et al.* (2008).

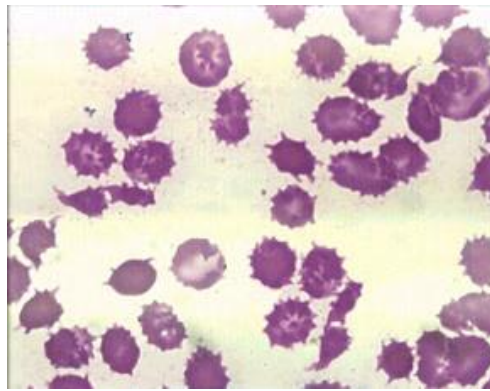
Figura 2. Estructura de la hemoglobina

2.3 Anormalidades citomorfológicas de la serie roja.

El estudio e interpretación del frote de sangre periférica como parte del hemograma representa la extensión morfológica del estado de los elementos celulares de la sangre y constituye un examen rutinario (Grinspan, 1985).

2.4 Acantocitosis.

También conocidas como células Spur, los acantocitos (Figura 3) son células con proyecciones en su superficie (membrana) en forma de puntas irregulares. Se observan en pacientes con enfermedades hepáticas y se forman por depósitos de colesterol en la membrana. No deben confundirse con crenocitos, éstos últimos aparecen por defectos técnicos al preparar las láminas o recoger la muestra (Grinspan, 1985).

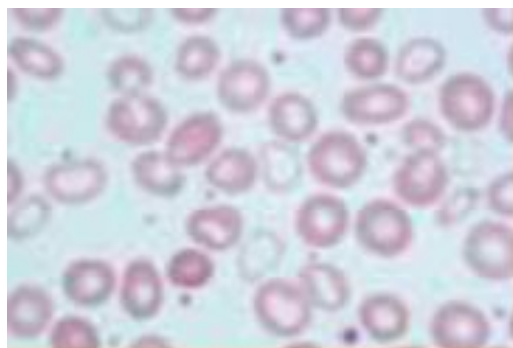


Tomada de: mesa54d.blogspot.mx/2009/04/anormalidades-del-eritrocito.html

Figura 3. Acanthocitos

2.5 Anisocitosis

La anisocitosis es una alteración presente en anemias en la cual, los eritrocitos se encuentran en una variación anormal en el tamaño (diámetro normal de 6 a 8 μ) (Hurtado *et al*, 2010).

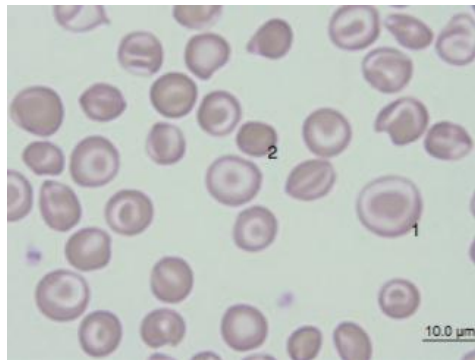


Tomada de: Hurtado *et al*. (2010).

Figura 4. Anisocitosis

2.6 Dianocito.

El dianocito (Figura 5) es un eritrocito con una forma *sui generis*, en donde en el centro, que debería ser más pálido que el resto de la célula, se encuentra una mayor concentración de hemoglobina, lo que le da una forma de diana. El dianocito se produce como la expresión morfológica resultante del incremento de la relación superficie/volumen del eritrocito que bien puede darse por expansión de la superficie del eritrocito o por aumento de los lípidos de la membrana (Campuzano, 2008).

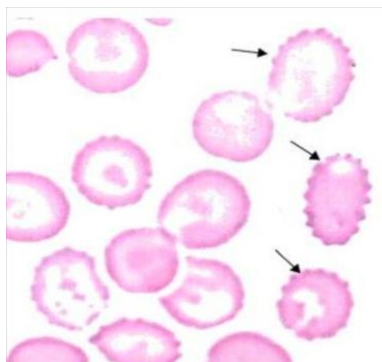


Tomada de: Campuzano (2008).

Figura 5. Dianocitos

2.7 Crenocito.

También conocida como equinocito o célula en erizo, el crenocito (Figura 6) es un eritrocito que presenta múltiples proyecciones romas distribuidas de manera regular. Su forma puede ser de ovoide a discoide y se presenta en uremia y carcinoma gástrico (Retamales *et al*, 2015).



Tomada de: <http://noeqbcursodehema.blogspot.mx/2015/11/equinocitos.html>

Figura 6. Crenocito

2.8 Eliptocitos.

El eliptocito (Figura 7) es un eritrocito maduro de forma ovalada, más o menos alargado que conserva la palidez central y en donde la hemoglobina se observa con mayor concentración en los extremos. En la práctica, los ovalocitos se han considerado sinónimo de eliptocitos pero los morfólogos consideran que son diferentes: se habla de eliptocito cuando el diámetro de la parte más larga del eritrocito es mayor que el doble del diámetro de la parte más corta, y si es menor, de ovalocito (Campuzano, 2008).



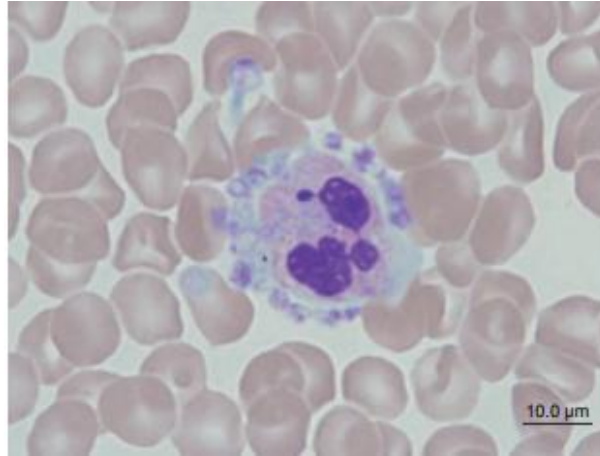
Tomada de: Vázquez (2011)

Figura 7. Eliptocito

2.9 Serie blanca.

En la hematopoyesis, las células destinadas a formar la serie granulocítica, es decir, neutrófilos, eosinófilos y basófilos, sintetizan proteínas y las almacenan en gránulos citoplasmáticos que le dan el aspecto característico (Abbott Laboratories de México, 2002).

Los neutrófilos (Figura 8) son leucocitos poliformonucleares (PMN), componentes esenciales del sistema inmune natural. Son las principales células fagocíticas encontradas en sangre periférica. Se les considera la primera línea de defensa con infecciones bacterianas y fúngicas (Barbieri *et al*, 2005).



Tomada de: <http://noeqbcursodehema.blogspot.mx>

Figura 8. Neutrófilo segmentado

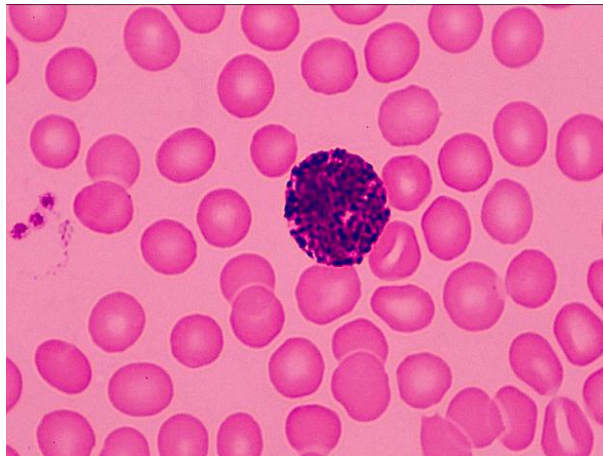
Después de los neutrófilos, los linfocitos (Figura 9) son los leucocitos más numerosos en la circulación. Van del 20% al 30% de la cuenta total. Estos se originan en la médula ósea y derivan de la célula madre hematopoyética CD 34 (*stem cell*). El 75% de los que circulan son linfocitos T y el mayor número de ellos corresponde a los T de ayuda (Th, CD4); el 25% restante corresponde a los linfocitos B y NK. La maduración de los linfocitos B se realiza en el hígado fetal y después en la médula ósea; los T maduran en el timo (Vega, 2009).



Tomada de: <http://cienciasdejoseleg.blogspot.mx/2012/10/los-leucocitos->

Figura 9. Linfocito

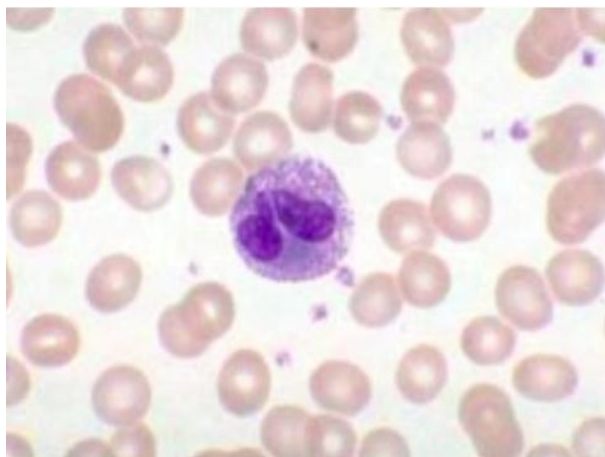
Los basófilos (Figura 10) conforman el tipo de leucocito menos abundante en la sangre. Tiene un núcleo irregular, difícil de ver por la granulación basófila que lo cubre casi siempre. La característica más importante de esta célula es la cantidad de gránulos de color azul negrozco que se encuentre ocupando toda la célula (esto cuando la célula es madura) y parte de la célula cuando esta es inmadura. Está involucrada en respuestas alérgica e inflamatorias (Merino, 2008).



Tomada de: <http://cienciasdejoseleg.blogspot.mx/2012/10/leucocitos->

Figura 10. Basófilo

El eosinófilo (Figura 11) es un granulocito pequeño, que mide de 10-15 nanómetros de diámetro, de núcleo bilobulado. Se encuentra en la sangre en porcentajes que van del 3% al 6% del total de los granulocitos. Se caracteriza principalmente por sus gránulos citoplasmáticos, que se diferencian en primarios (contienen losifosfolipasa A y forman los cristales de Charcot-Leyden), gránulos específicos (encargados de la liberación de histamina, acorta el tiempo de coagulación, etc.) y gránulos pequeños (encargados de la liberación de proteínas granulares). (Brito et al, 2003).

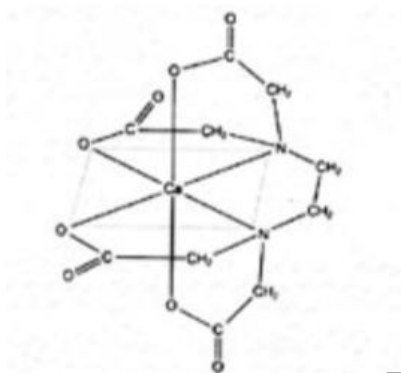


Tomada de: <http://www.hpc.org.ar/images/revista/217->

Figura 11. Eosinofilo

2.10 EDTA.

El ácido etilediaminotetraacético, también denominado como EDTA, es una sustancia blanca soluble, sin olor y cristalina, es relativamente no tóxica y poco irritante en soluciones débiles. La fórmula química $C_{10}H_{16}N_2O_8$ contiene 4 grupos acéticos unidos al grupo etilendiamino (García, 2000).



Tomada de: García, 2000

Figura 12. EDTA

El EDTA (Figura 12), fue patentado en Alemania en el año 1935 por F. Munz. La molécula es un sustituto diamino, usualmente comercializado como sales de sodio. Es un poderoso agente formador de complejos con metales y una molécula

altamente estable, ofreciendo una versatilidad en usos industriales y en el hogar (Oviedo & Rodriguez, 2003).

Al ser una sal disodica, el EDTA es capaz de formar quelatos solubles no ionicos con un largo número de metales ionicos. Los metales iionicos reaccionan con mabas terminaciones del agente quelante y forman una estructura de anillo, asi que ion metalico se une fuertemente al anillo de manera inactiva y listo para una futura reacción química (García, 2000)

Niniforuk *et al.*, en el año 1953 realizaron una descripcion similar en la que narran que el EDTA está considerado como parte de las sales de etilendiamino tetraacético, las cuales son agentes quelantes orgánicos y no coloidales que semejan a los polifosfatos inorgánicos como el hexametafosfato de sodio, debido a su habilidad para formar quelatos solubles, no iónicos, con un largo número de iones metálicos. Estos autores, en su estudio neutralizan el pH del EDTA al valor deseado, mediante el uso de solución de hidróxido de sodio a bajas concentraciones, añadida al ácido y a la sal disódica, respectivamente.

Buck *et al.* (1999) menciona que el pH del EDTA es de 7.5. Por su parte, Calvo *et al.* (2005) realizaron una investigación sobre el efecto de los cambios de pH que sufre el EDTA en el proceso de desmineralización, en la cual, destacan las siguientes conclusiones:

1. La solución de EDTA dentro del sistema de conductos va cambiando su pH durante la desmineralización.
2. A medida que el pH disminuye la taza de desmineralización igualmente decrece.
3. Los cambios pueden alterar las propiedades físicas de las soluciones irrigadoras, alterando la capacidad de penetración.

2.11 Investigaciones con EDTA.

Para afectar la formación de aglomerados causada por la coagulación de los conidios en el cultivo de *A. niger* y *A. oryzae* se hace uso de los agentes quelantes, tal como el EDTA y ferrocianuro, que conducen a la formación de gránulos pequeños y compactos, lo que ayuda a deshacer los coágulos (Krijgsheld *et al*, 2013).

Estudios con extractos de hojas de *Ginkgo biloba* han demostrado su efecto antimicrobiano contra *Listeria monocytogenes* observando que los extractos de las hojas de esta planta redujeron los niveles de la población de *L.monocytogenes* y que este efecto se hizo más pronunciado a bajas temperaturas. Además, demostraron que la adición de EDTA (1.6 mg/mL) aumentó la actividad antimicrobiana (Rodríguez, 2011).

Las betaninas son un pequeño grupo de pigmentos presentes solamente en la familia Centrosperme. Esta puede transformarse y perder su coloración bajo la influencia de factores como el pH, temperatura alta, oxígeno, luz, etc. Su tiempo de vida es de 48 min. en temperaturas que van de los 5° a 75 °c. La adición de EDTA ha demostrado incrementar 1.5 veces el valor de tiempo de vida media con respecto al valor control (Téllez *et al*, 2010).

2.12 Usos del EDTA.

El EDTA se ha reportado con una gama diversa de aplicaciones, que van desde la limpieza de suelos hasta terapias médicas y dentales.

El mencionado es una solución acuosa con un pH de 7,5 que se utiliza rutinariamente como solvente inorgánico para el tratamiento de los conductos escleróticos, capaz de disolver la matriz calcificada de la dentina (Buck *et al*, 1999)

Existe una preocupación cada vez mayor por los efectos potenciales directos o indirectos en presencia de EDTA en el ambiente. Numerosos estudios de campo han demostrado que la complejación con EDTA puede movilizar iones metálicos

contaminantes. EDTA puede evitar la precipitación de metales pesados en solución o, por el contrario, provocar un efecto de disolución de los metales pesados adsorbidos en los sedimentos (Oviedo & Rodríguez, 2003).

En 1957, Östby introdujo el EDTA a una concentración del 15% en la terapia del sistema de conductos, obtenida a partir de sales de etilendiamino al 100% y diluidas en una solución de hidróxido de sodio, hasta obtener una solución 0,5 molar como reemplazo del uso de ácidos inorgánicos. Este autor encontró que el EDTA tenía cierto efecto disolvente sobre la dentina radicular y observó que durante los tratamientos de conductos que se reducía el tiempo requerido para el desbridamiento, contribuía al ensanchamiento de conductos obstruidos y estrechos, facilitaba el sobrepaso de instrumentos fracturados dentro del conducto y con acción auto limitante.

Quiroz et al. (2015) hablaron de la exposición constante que tenemos hacia este producto, ya que es usado en aditivos alimentarios, medicamentos y productos para la higiene personal, tales como cosméticos, alimentos y bebidas, en las cuales se le usa como conservante y estabilizante. Además de los mencionados, se añaden a la lista algunos detergentes y varios usos médicos.

Dentro del área médica, se utiliza para tratar el envenenamiento por mercurio y otros metales pesados y para eliminar el exceso de hierro y calcio del cuerpo. También es un efectivo anticoagulante, que se utiliza en transfusiones sanguíneas y en análisis de sangre. En oftalmología veterinaria EDTA puede ser utilizado como un anticlagenasa para evitar el empeoramiento de úlceras de la córnea en animales (Avendaño, 2011).

En el área de la hematología, el EDTA es una solución de sales sodio y potasio que se utiliza como anticoagulante que inhiben la participación del ion calcio en la cascada de la coagulación de la sangre (Henry & Harper, 1974).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Actualmente, se conocen diversas enfermedades a falta de diversos minerales importantes en la formación y regeneración ósea que, al disminuir su concentración dentro del organismo debido a factores como la dieta, medicamentos y otras sustancias, pueden derivar en problemas óseos de distinta gravedad.

En trabajos anteriores, se ha denotado la relación que tiene el EDTA con algunos padecimientos óseos, por lo cual, se hace de suma importancia estudiar sus efectos a distintas concentraciones en los componentes celulares sanguíneos con el fin de saber ¿Cuál es su efecto sobre estas? ¿Alterará de manera gradual su morfología? ¿Podríamos relacionar la observación de cambios morfológicos con las investigaciones previas que hablan de su efecto negativo sobre el metabolismo?

IV. JUSTIFICACIÓN.

El EDTA al ser un compuesto quelante puede secuestrar con gran facilidad diversos iones metálicos importantes para las funciones metabólicas. Esto se ha respaldado por lo observado en investigaciones anteriores, destacando la realizada por Quiroz & Muñoz (2015), donde se observó descalcificación en ratas expuestas a este quelante, por lo que estudiar sus efectos en los componentes sanguíneos a nivel *in vitro* pueden demostrar si afecta a nivel de la proteína de hemoglobina y se confirmaría por determinación espectrofotométrica de IR demostrando si cambia a nivel estructural los compuestos.

V. HIPOTESIS.

5.1 Afirmativa: Los valores de hemoglobina y las diversas células sanguíneas al ser expuestas a diferentes concentraciones de EDTA se verán afectadas en sus valores (en el caso de Hb) y en la composición estructural de las células sanguíneas.

5.2 Negativa: Los valores de hemoglobina y las diversas células sanguíneas al ser expuestas a diferentes concentraciones de EDTA no se verán afectadas en sus valores (en el caso de Hb) y en la composición estructural de las células sanguíneas.

VI. OBJETIVOS.

6.1 Objetivo General.

Evaluar *in vitro* los efectos del colorante agroalimentario EDTA sobre los valores de hemoglobina y los componentes celulares de muestras sanguíneas.

6.2 Objetivos específicos.

1. Obtener las muestras sanguíneas de pacientes totalmente sanos.
2. Obtener y/o preparar el reactivo cianometahemoglobina
3. Obtener los valores iniciales de absorbancia en espectrofotómetro de la hemoglobina de las muestras a través del método de cianometahemoglobina
4. Realizar las distintas diluciones de sangre: EDTA que irán de 1:1 hasta 1:5
5. Obtener los valores de absorbancia a las 0, 24, 48 y 72 horas de las diluciones descritas en los dos puntos anteriores.
6. Realizar tinción de Wright a las muestras anteriormente mencionadas.
7. Analizar mediante la técnica de infrarrojo (IR)

VII. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

7.1 MATERIALES

7.1.1 Material y métodos.

El material que se utiliza para el desarrollo de proyecto de investigación es:

Pipetas de 20 y 100 μ L.

- a) Puntas amarillas: necesarias para todas las determinaciones.
- b) Material de vidrio: necesario para todas las determinaciones

7.1.2 Material biológico.

Así también fue necesario utilizar el siguiente material biológico.

- Muestras sanguíneas

7.1.3 Equipo.

Espectrofotómetro de infrarrojo, marca VERTEX 70.

7.1.4 Reactivos.

- a) Cianometahemoglobina.
- b) EDTA

7.2 Metodología.

7.2.1 Obtención de muestra sanguínea

Se dan indicaciones al paciente para que se presente a la venopunción en ayunas y bañado con el fin de reducir el número de interferencias en la muestra. Se requiere que este se encuentre relajado sentado para la toma de muestra. Se le pide que estire el brazo y se realiza palpación para la elección de la vena a punzar. Posterior a esto, se realiza la asepsia de la zona de punción con alcohol. Se coloca el torniquete a aproximadamente 15 cm arriba de la zona media del brazo. Al momento de colocar la aguja, se verifica la obtención de la muestra y se quita el torniquete. Se llena el tubo morado hasta donde se indica y se retira este mismo sin retirar la aguja. Se coloca un parche en la zona punzada y se le indica al paciente no retirárselo hasta pasados 10 minutos (Moran, 2001).

7.2.2 Preparación de Cianometahemoglobina (Drabkin, modificado por Van Kampen y Zijistra, VKZ).

Para la preparación de un litro del reactivo Drabkin se requieren los siguientes analítos:

- a) Ferricianuro de potasio: 200 mg
- b) Cianuro de potasio: 50 mg.
- c) Fosfato de potasio: 140 mg
- d) Sterox SE (Harleco): 0.5 mL
- e) Agua destilada: 1000 mL

Las características físicas de este diluyente son las siguientes: color amarillo pálido, una transparencia absoluta, un pH de 7.2 (7.0 - 7.4), un espectro de absorción lumínica característico de la HiCN , y una absorbancia a 540 nm de 0,00 medida contra H_2O destilada (Saenz et al, 1996).

7.2.3 Prueba con cianometahemoglobina.

La muestra sanguínea y las diluciones deberán estar completamente homogenizadas antes de tomarse las alícuotas. Se toman 20 μL de esta y se añaden a 5 mL del reactivo de Drabkin. Es importante que las pipetas se encuentren calibradas para evitar errores en el volumen. Se mezcla el tubo por inversión hasta su homogenización y posteriormente se procede a la lectura en espectrofotómetro a 540 nm de absorbancia (Alors, 2008).

7.2.4 Obtención de EDTA.

Facilitada por el director de tesis M.C. Rafael Muñoz Bedolla.

7.2.5 Diluciones de 1:1 a 1:5 con sangre: EDTA.

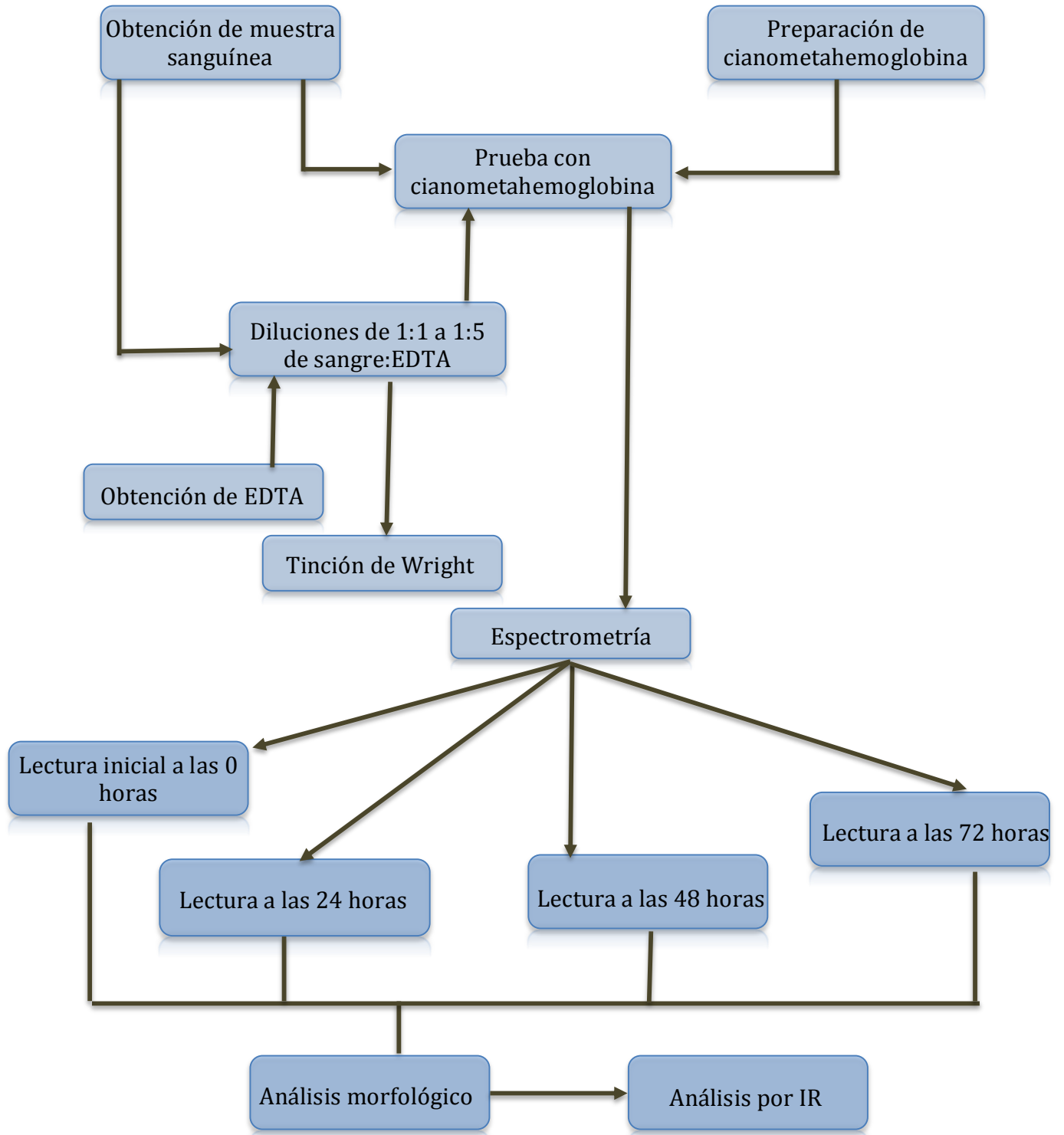
Las diluciones se realizan con alícuotas de sangre de 100 μL con alícuotas de EDTA que irán desde los 100 hasta los 500 μL , con respecto a la dilución que se esté realizando.

7.2.6 Tinción de Wright

La tinción se realizó con frotis sanguíneos, los cuales contenían 3.4 μL de muestra sanguínea. Se tiñen con la solución de Wright durante 3 minutos. Posteriormente se le agregó solución buffer hasta observar la coloración verde cromo y se dejaron así durante 3 minutos. Al final se enjuagaron con agua destilada y se dejaron secar.

7.3 Diagrama de flujo.

El diagrama 1, muestra el desarrollo experimental



VIII. Resultados de la interacción sangre: EDTA

8.1 Muestras sanguíneas

Las muestras fueron recolectadas de cinco pacientes que gozan de buena salud, con niveles de hemoglobina normales, que no presentara enfermedades infecciosas o virales.

8.2 Pruebas con cianometahemoglobina

Posterior a la recolección, a cada muestra se le analizo mediante el método de cianometahemoglobina, dando los resultados descritos en las tablas 1 a la 5.

8.2.1 Muestra 1

Dilución	Tiempo			
	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas
D= 1:1	423	409	395	382
D= 1:2	383	362	351	339
D= 1:3	290	272	260	248
D= 1:4	188	161	152	151
D=1:5	121	105	99	93

Tabla 1. Valores de absorbancia de la muestra 1 con respecto a la dilución y el tiempo.

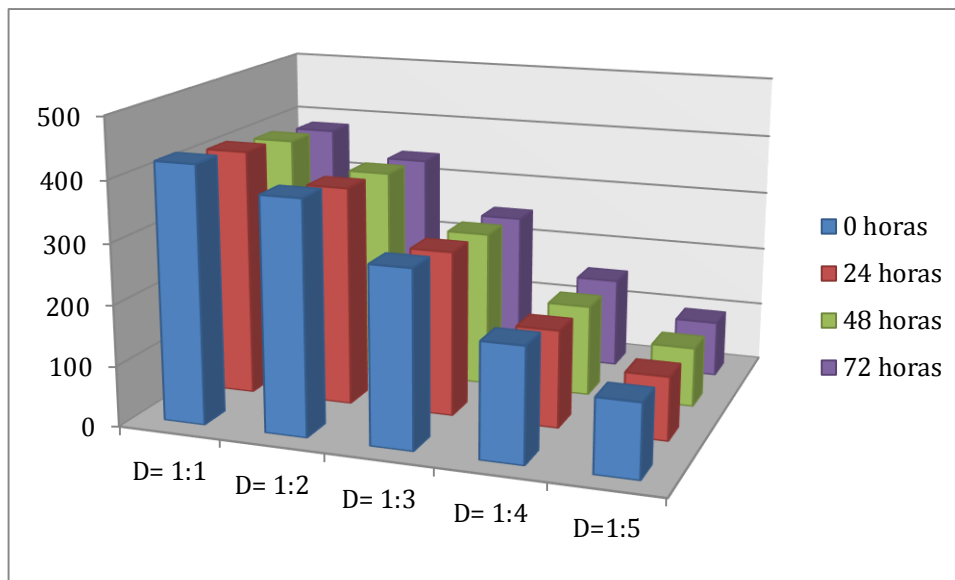


Gráfico 1. Valores de absorbancia de la muestra 1 con respecto a la dilución y el tiempo.

En la muestra 1 se logra observar los cambios de absorbancia (Grafica 1) que se obtienen con respecto al tiempo y a la dilución, notándose que a partir de la hora 0 en las distintas diluciones se observan las diferencias mencionadas.

Además, se destaca que al paso de las horas, las absorbancias fueron disminuyendo bajo las condiciones expuestas.

Se destaca que en la dilución 1:1 existieron cambios amplios en los valores de absorbancia con respecto al tiempo.

8.2.2 Muestra 2

Dilución	Tiempo			
	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas
D= 1:1	441	424	412	398
D= 1:2	312	288	272	251
D= 1:3	301	271	253	230
D= 1:4	191	170	161	149
D= 1:5	132	118	108	102

Tabla 2. Valores de absorbancia de la muestra 2 con respecto a la dilución y el tiempo.

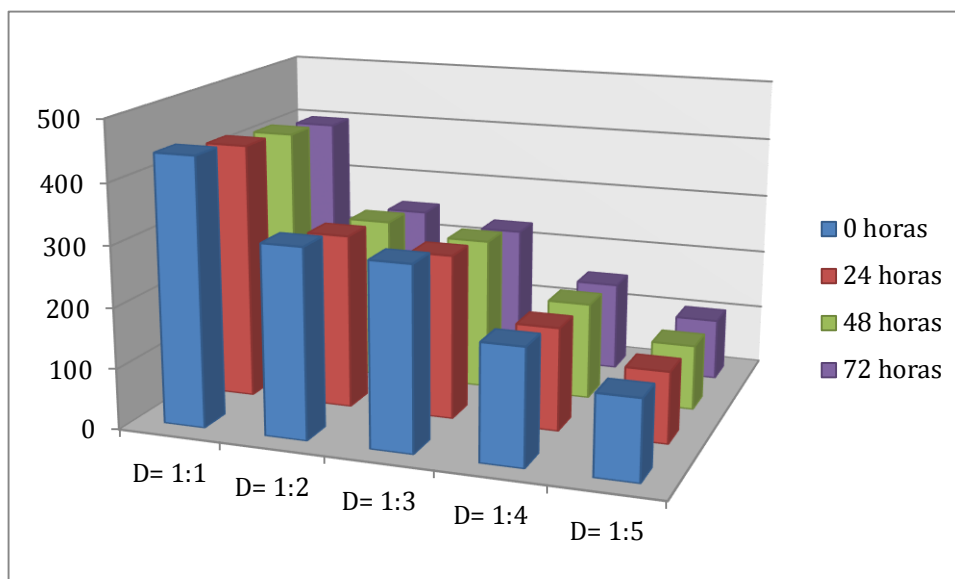


Gráfico 2. Valores de absorbancia de la muestra 2 con respecto a la dilución y el tiempo.

Con lo que respecta a la muestra 2, se observan resultados similares a la muestra 1. En la hora cero, se observan los cambios en las absorbancias debido a la dilución de las muestras (Gráfico 2)

Además, se observan cambios en los valores de absorbancia, los cuales disminuyeron con respecto al tiempo.

Se destacan las disminuciones de las absorbancias obtenidas en las diluciones 1:2 y 1:3, donde de la hora 0 a la hora 72 existieron cambios considerables en base a la absorbancia.

8.2.3 Muestra 3

Dilución	Tiempo			
	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas
D= 1:1	412	383	366	351
D= 1:2	321	299	286	279
D= 1:3	283	261	247	229
D= 1:4	160	141	128	119
D= 1:5	108	101	97	91

Tabla 3. Valores de absorbancia de la muestra 3 con respecto a la dilución y el tiempo.

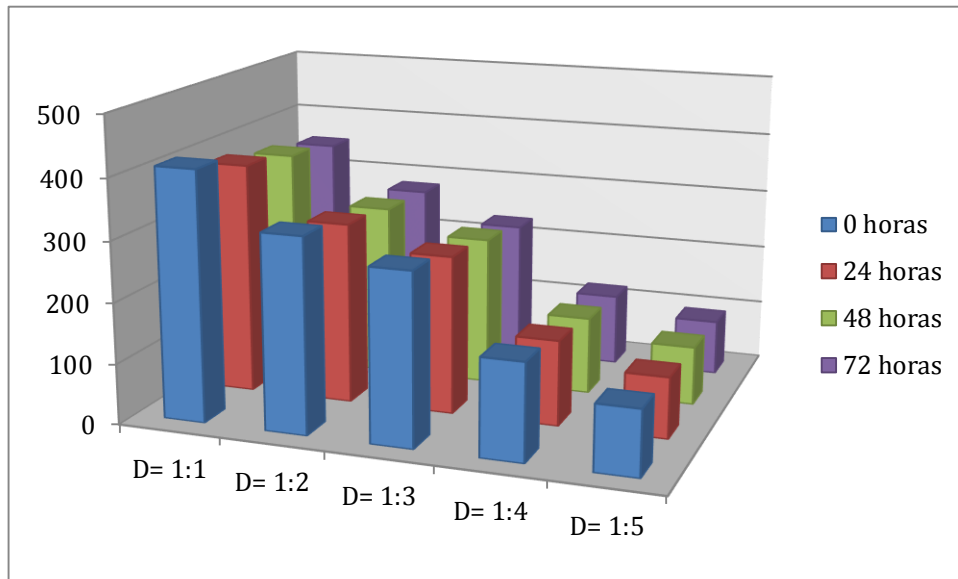


Gráfico 3. Valores de absorbancia de la muestra 3 con respecto a la dilución y el tiempo.

En el Grafico 3 se logran observar los cambios en el valor de absorbancia obtenidos en la muestra 3 y sus diluciones.

Al igual que la *Muestra 1* y la *Muestra 2* a partir de la hora 0 se observan os cambios con respecto a la absorbancia.

Con respecto a la dilución 1:1, los valores de absorbancia obtenidos muestran que de la primer medición a la final se observa de una disminución de absorbancia considerable (Tabla 3).

Al igual que la dilución mencionada, de la dilución 1:3 se obtuvo una disminución considerable con respecto a la hora 0 a la 72.

8.2.4 Muestra 4

Dilución	Tiempo			
	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas
D= 1:1	433	425	410	410
D= 1:2	333	316	299	288
D= 1:3	259	249	231	218
D= 1:4	173	151	138	126
D= 1:5	104	97	93	88

Tabla 4. Valores de absorbancia de la muestra 4 con respecto a la dilución y el tiempo.

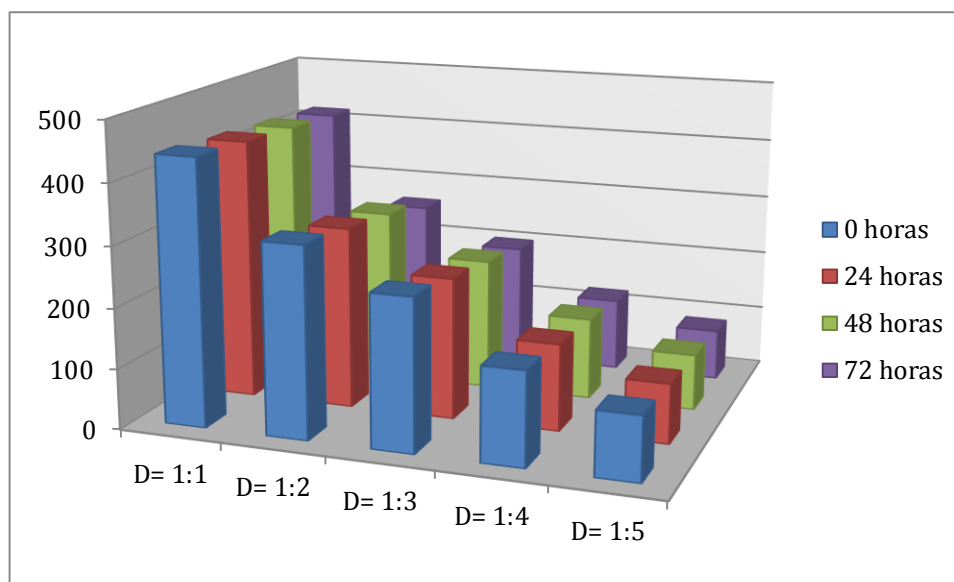


Gráfico 4. Valores de absorbancia de la muestra 4 con respecto a la dilución y el tiempo.

En la Tabla 5 se observan los cambios de los valores de absorbancias obtenidos en las distintas diluciones, donde se observa que en la dilución 1:4 existió un cambio grande con respecto a la absorbancia de la hora 0 a la hora 24, y de esta misma a la hora 48.

Además, en la dilución 1:2 se logra observar que las absorbancias fueron disminuyendo, notándose que a partir de la hora 0 a la hora 72, la absorbancia decayó notablemente (Gráfico 4).

Se destaca la disminución de la absorbancia observada en la dilución 1:3 con respecto al tiempo.

8.2.5 Muestra 5

Dilución	Tiempo			
	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas
D= 1:1	440	432	425	417
D= 1:2	316	301	287	260
D= 1:3	251	234	219	199
D= 1:4	155	144	136	121
D= 1:5	106	99	93	84

Tabla 5. Valores de absorbancia de la muestra 5 con respecto a la dilución y el tiempo.

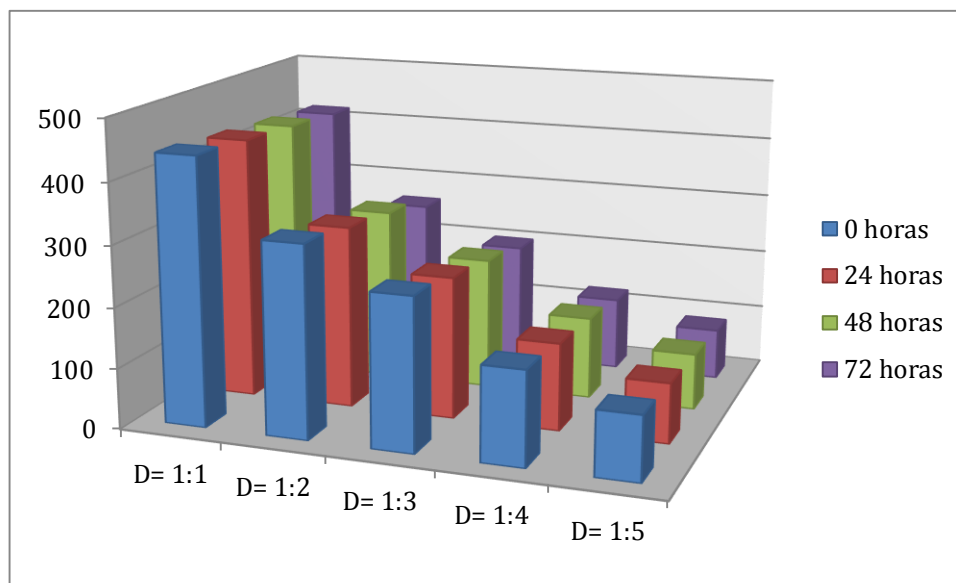


Gráfico 5. Valores de absorbancia de la muestra 5 con respecto a la dilución y el tiempo.

En el Gráfico 5 se logra observar los cambios de absorbancia con respecto al tiempo en lo que respecta a la dilución 1:2, donde los mencionados decayeron considerablemente desde la medición en la hora 0 a la 72. En esta misma dilución, de la hora 48 a la hora 72 se observa la mayor de las diferencias en los valores de absorbancia tal como lo muestra la tabla 5.

Comportamiento similar se logró observar en la dilución 1:3, en la cual la disminución obtenida de la hora 0 a la 72 fue considerable y similar a la obtenida en la dilución 1:2.

Se destaca también la disminución obtenida en la dilución 1:5, la cual tuvo su mayor diferencia entre sus valores de absorbancia de la hora 48 a la 72.

En el cuadro 1 se muestran ejemplos de los frotis realizados a las distintas concentraciones utilizadas en esta investigación, con lo cual se hace cotejo de los resultados anteriormente descritos con respecto a la morfología.

En la dilución 1:1 se puede observar cambios en la concentración de hemoglobina de los hematíes con respecto al tiempo, mostrando los cambios más considerables de las 24 a las 72 horas, en la cual se observa claramente la hipocromía incrementada con las anteriores.

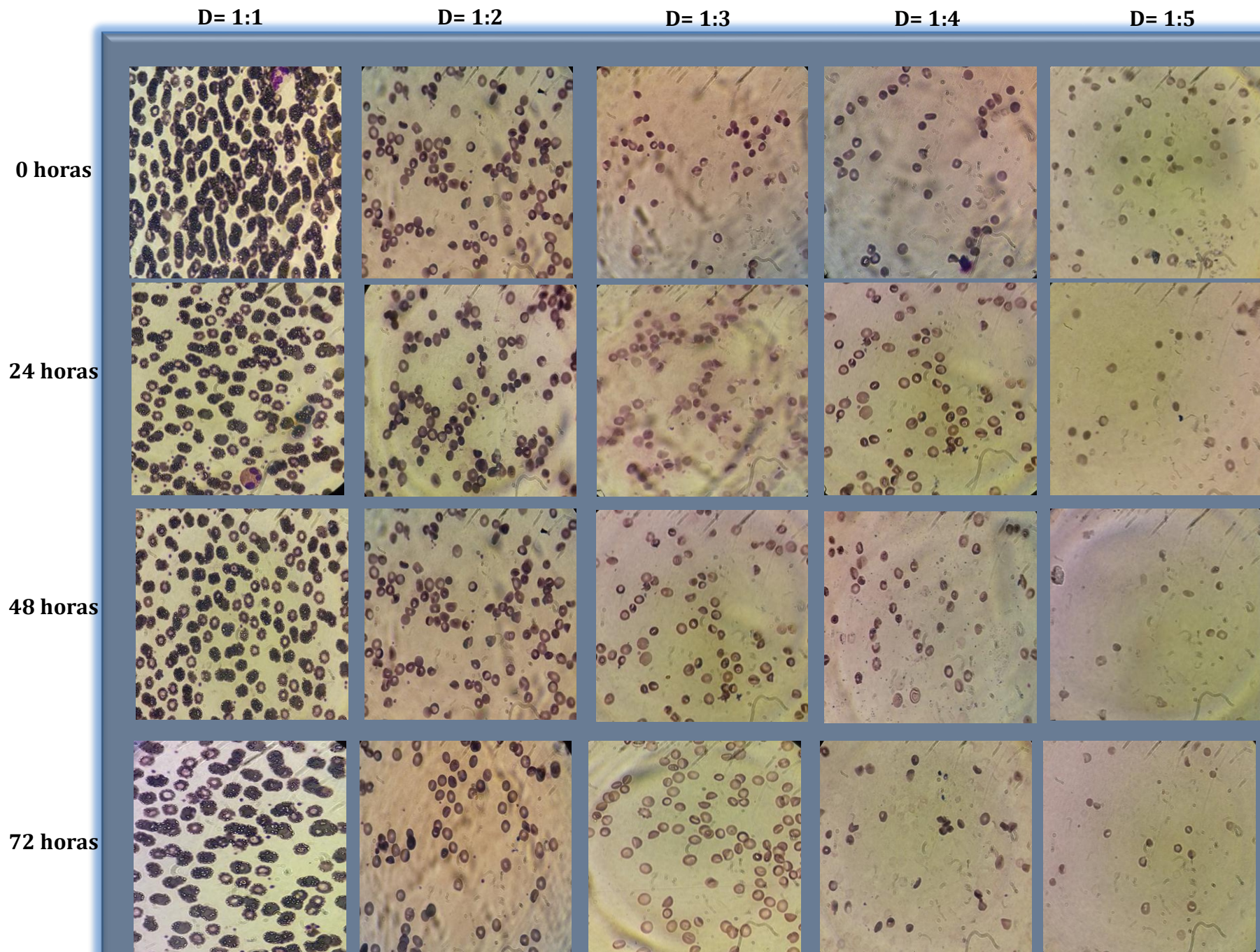
Mismo comportamiento se logró observar en la dilución 1:2 que, a diferencia de la dilución 1:1, se observa con una menor cantidad de eritrocitos debido a la dilución. Sin embargo, también muestra que los eritrocitos presentan hipocromía incrementada con respecto al tiempo, notándose un cambio considerable a las 72 horas en comparación a la hora 0.

Por su parte, la dilución 1:3 al igual que la dilución anterior, muestra menor concentración de glóbulos rojos con respecto a la dilución 1:1 e igualmente con la de 1:2. Se observa incremento en el número de eritrocitos hipocrómicos con respecto al tiempo, siendo los frotis de las 48, y de las 72 horas las que mayor hipocromía presentan en los glóbulos, siendo esta última la que más acentuada la presenta.

Con respecto a la dilución 1:4 se observan menores concentraciones de hematíes en comparación a las diluciones anteriores, acompañado de hipocromía que fue en

incremento con respecto al tiempo, siendo el frotis de las 24 horas el que presenta el cambio mas notorio con respecto a la concentración de hemoglobina.

La dilución 1:5 fue la concentración en la que se observaban el menor número de hematíes en comparación con las 4 concentraciones anteriores debido a la dilución. Además, se observan en la mayoría de los eritrocitos hipocromía, la cual se ve en aumento con respecto al tiempo. Con respecto al frotis de las 72 horas y en comparación con los frotis de las demás diluciones a la misma hora, este es el que mayor hipocromía presentaba.



Cuadro 1. Imágenes de los frotis realizados a las diluciones 1:1 a 1:5 con respecto al tiempo

VIII. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN.

8.1 Espectroscopia infrarroja (IR).

La caracterización de los nanomateriales obtenidos, se realizó con ayuda de un espectrofotómetro Infrarrojo con transformada de Fourier, VERTEX 70, Bruker. Los espectros de infrarrojo nos proporcionan información de los grupos funcionales presentes en los nanoreservorios sintetizados. Figura 13.



Figura 13. Espectrofotómetro de ultravioleta-visible.

La capacidad de absorción de las distintas soluciones se medirá en un espectrómetro a 540 nm y se comparará con la de una solución de HiCn estándar (Alors, 2008). Las lecturas se harán a las 0, 24, 248, 72 y 96 horas.

IX DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

El espectro de EDTA se muestra en la figura 14 y se observa un modo de vibración tipo alargamiento (ν_{O-H}) en 3 723.2 y 3 290.0 cm^{-1} , que identifica los grupos hidroxilos (OH^+), de la molécula del EDTA y también se localiza el modo de vibración (ν_{N-H}), correspondiente al grupo funcional de una amida secundaria de las moléculas cianometahemoglobina. La banda de absorción Ubicada en 2 840.6 cm^{-1} , presentan los modos de vibración de tipo alargamiento ν_{C-H} de los metilenos (CH_2 -) asimétricos. La banda de absorción en 1630.0 cm^{-1} se presenta los modos de

vibración: (ν_{O-H}); ($\nu_{C=C}$); ($\nu_{C=N}$) y ($\nu_{C=O}$), que representan las vibraciones de flexión simétricas ν_{COO^-} del grupo funcional C=O de grupo carboxílico, de los grupo OH⁻ presentes en la fórmula del EDTA y de la cianometahemoglobina. En 1389.6 cm^{-1} se presentan los modos de vibración de tipo flexión de (ν_{C-H}); (δ_{CH_2}) y (δ_{C-CO-C}), que corresponden a las interacciones de las especies C-H y a las vibraciones de deformación de las especies metilo y C-CO-C. La banda de absorción ubicada en 1068.7 cm^{-1} se ubica los modos de vibración (ν_{CH_2}); (ν_{C-O-C}); (ν_{C-O}) y (γ_{C-H}) correspondientes a los metilenos de vibración balanceo y la vibración de doblaje fuera del plano. El modo de vibración tipo flexión en 820.5 cm^{-1} y 675.8 cm^{-1} , corresponden a las interacciones Fe-O; al modo de vibración (γ_{N-H}) de la amida primaria de la vibración de doblaje fuera del plano y el modo de vibración (ν_{C-H}) de coleteo de las especies C-H.

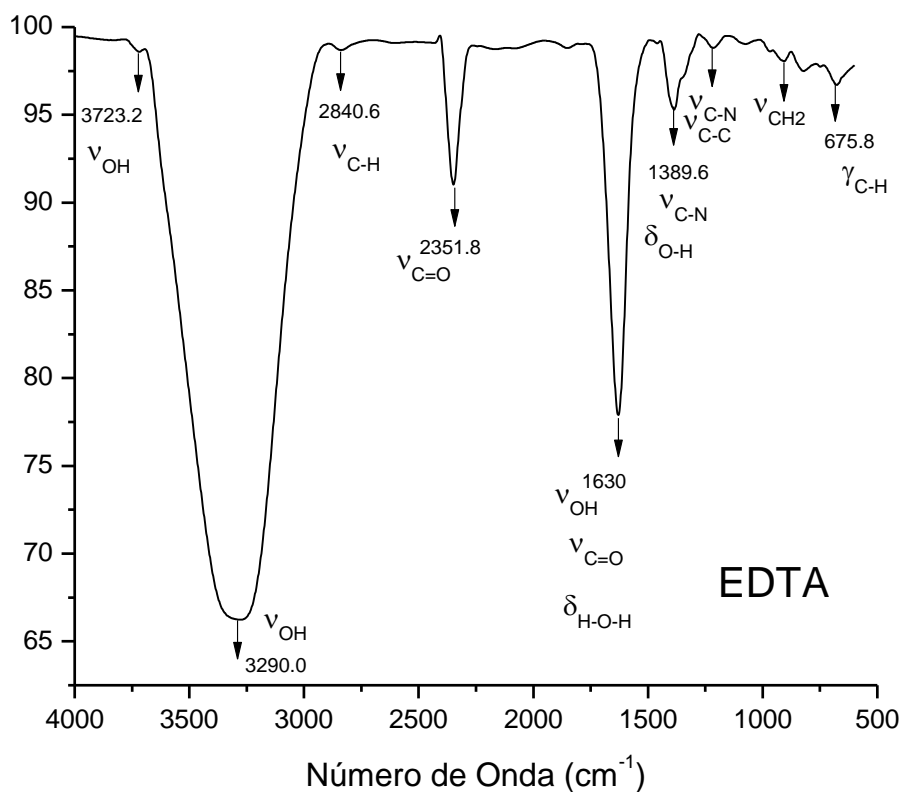


Figura 14. Espectro de IR del EDTA.

El espectro de la cianometahemoglobina, se muestra en la Figura 15; presenta modos de vibración similar al espectro del EDTA. La única diferencia entre estos dos espectros (de la cianometahemoglobina y del EDTA) es que no se observa la presencia de los modos de absorción correspondientes a las interacciones de las especies C-H y a las vibraciones de deformación de las especies metilo y C-CO-C, en 1389.6 cm^{-1} y a los modos de vibración (ν_{CH_2}); ($\nu_{\text{C-O-C}}$); ($\nu_{\text{C-O}}$) y ($\delta_{\text{C-H}}$) correspondientes a los metilenos de vibración balanceo y la vibración de doblaje fuera del plano, en 1068.7 cm^{-1} , en el espectro de IR de la cianometahemoglobina.

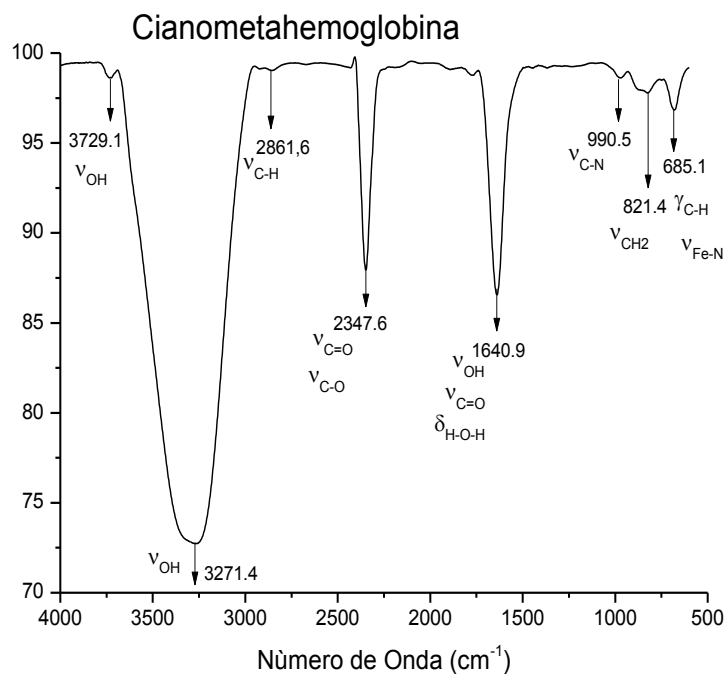


Figura 15. Espectro de IR de la cianometahemoglobina.

En la Figura 16, se observan los espectros de IR correspondientes a la cianometahemoglobina, EDTA y las muestras 1, 2, 11 y 51. Se observa que todos los espectros de las muestras reportadas son idénticos; es decir, no presentan ninguna diferencia significativa.

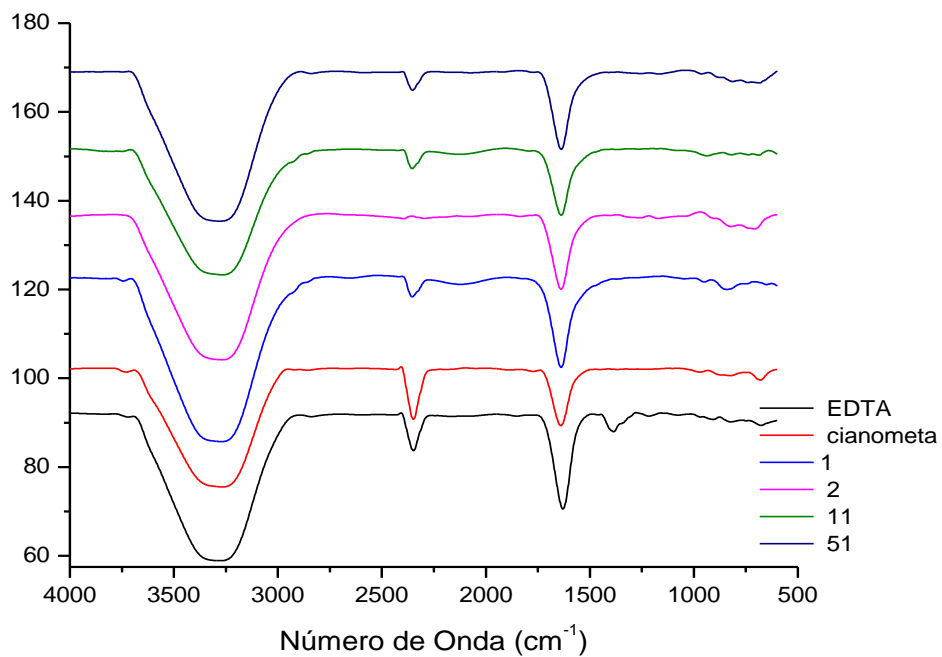


Figura 16. Espectros de IR de las muestras EDTA, cianometahemoglobina, 1, 2, 11 y 51

De forma similar, el espectro de la muestra 1 y los espectros de IR de sus respectivas diluciones, no se observa ninguna diferencia. Figura 17.

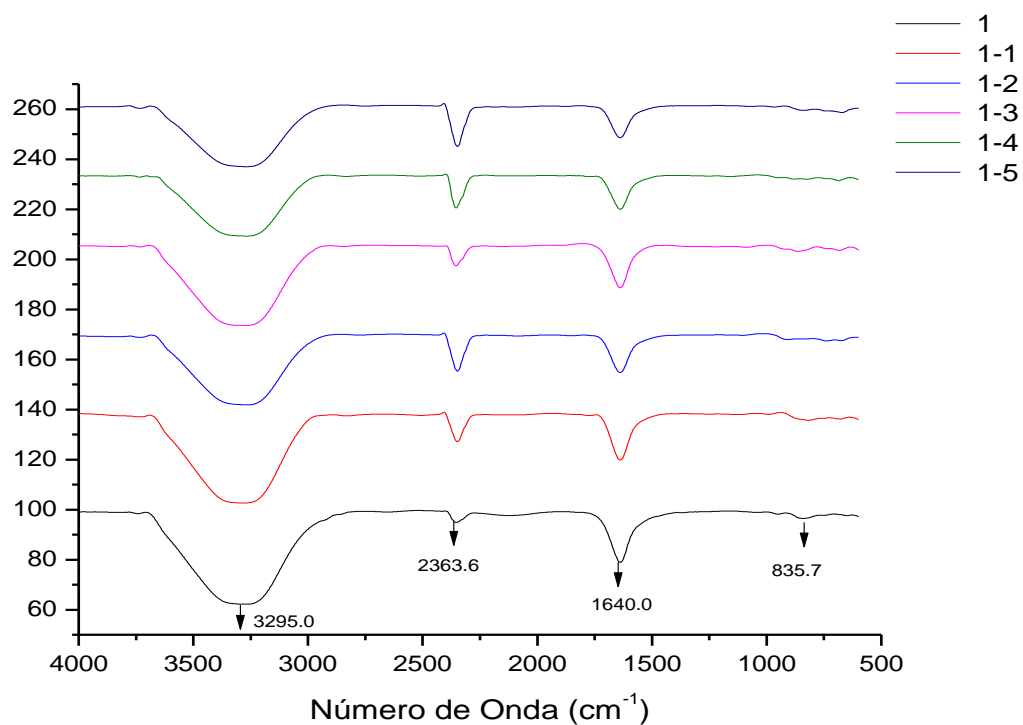


Figura 17. Espectros de IR de la muestra 1 y sus respectivas diluciones

Se establece el mismo comentario anterior respecto a los espectros de IR de la muestra 21 y sus respectivas diluciones. Figura 18.

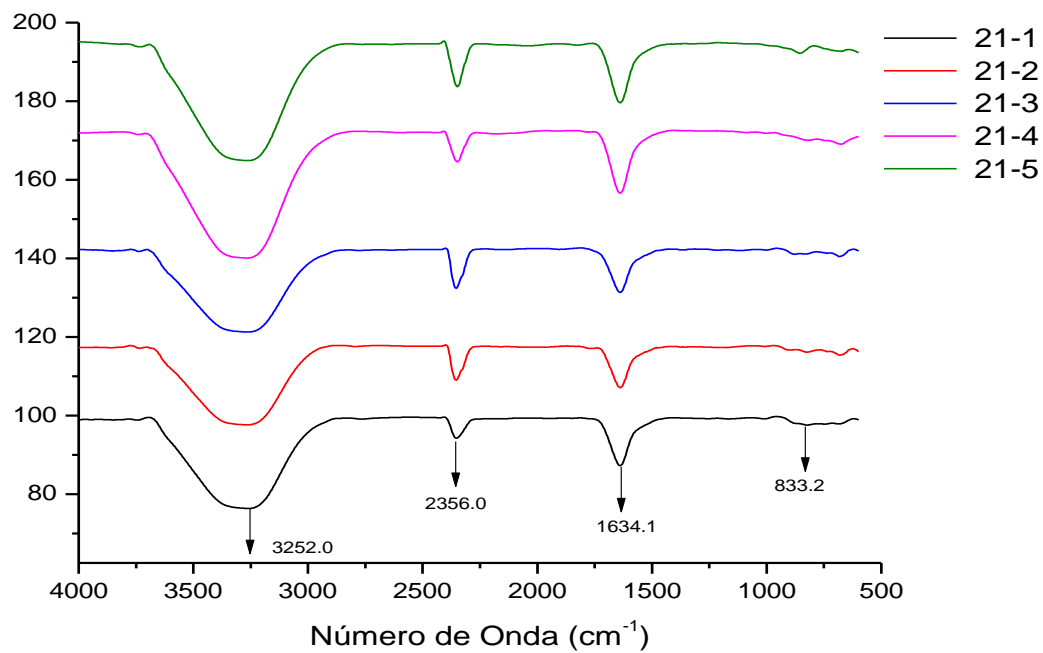


Figura 18. Espectros de IR de la muestra 2 y sus respectivas diluciones.

No se observa ninguna diferencia entre los espectros de IR de la muestra 11 y sus respectivas diluciones. Figura 19.

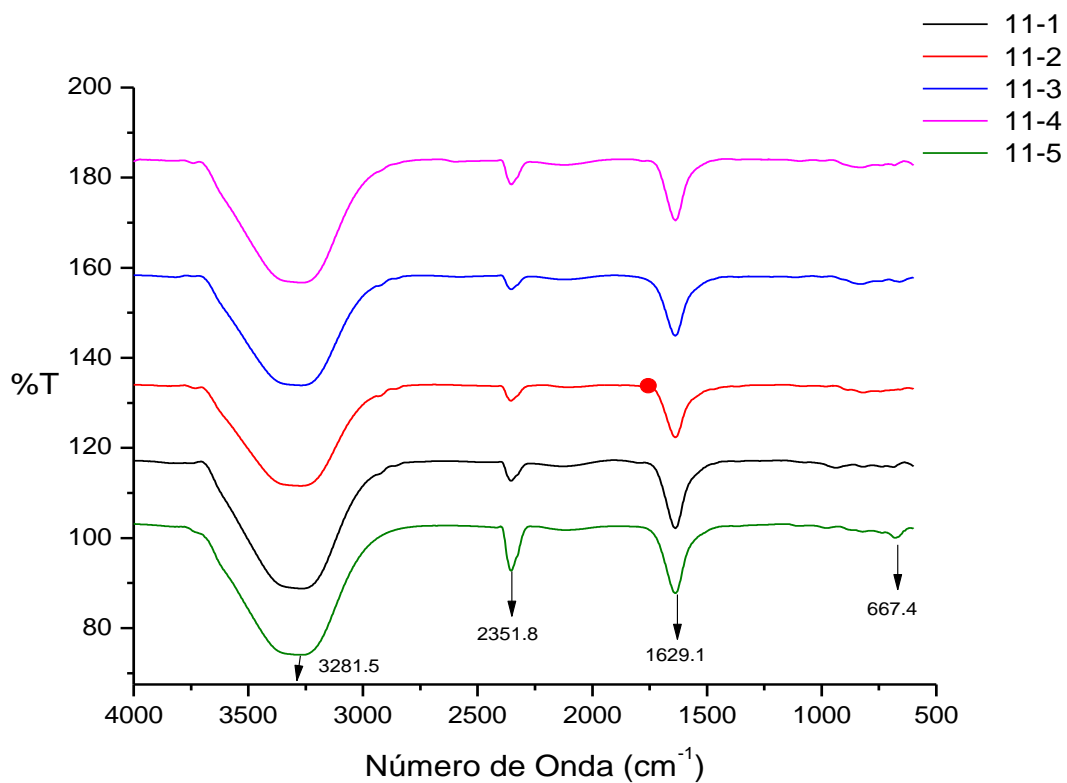


Figura 19. Espectros de IR de la muestra 11 y sus respectivas diluciones.

Y por último, no se observa ninguna diferencia entre los espectros de IR de la muestra 11 y sus respectivas diluciones. Figura 20.

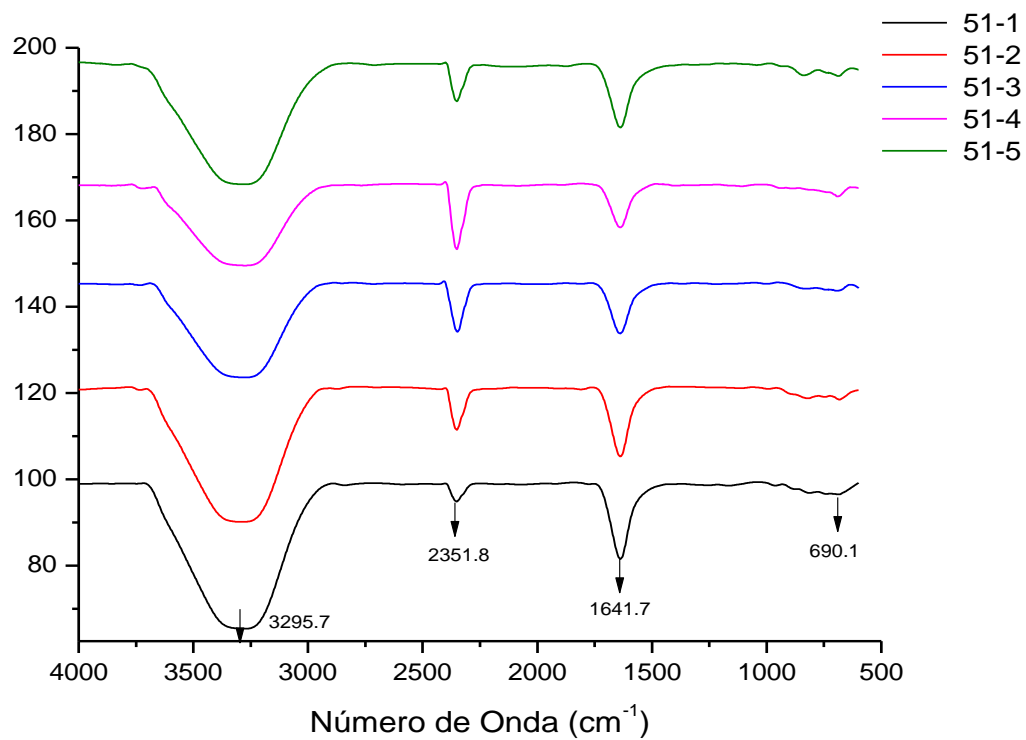


Figura 20. Espectros de IR de la muestra 51 y sus respectivas diluciones.

X. CONCLUSIÓN.

- 1) Los valores de absorbancia a partir de la hora 0 en cada una de las diluciones muestran cambios, disminuyendo con respecto a sus lecturas iniciales.
- 2) Al paso de las 0 a las 72 horas, todas las muestras y sus diluciones muestran disminución en los valores de absorbancia.
- 3) En la mayor parte de las muestras, la disminución en los valores de absorbancia se encuentran de la hora 0 a la hora 48.
- 4) Los valores mas bajos de absorbancia se encuentran en la hora 72 en cada una de las muestras.
- 5) Las absorbancias obtenidas por las muestras demuestran disminución con respecto a la dilución.
- 6) Con respecto a los frotis, se observan los cambios mas claros de la hora 24 a la 72 con lo que respecta a la hipocromía observada en los eritrocitos.
- 7) En cada una de las muestras a la hora 72 se observa menor cantidad de hematíes debido a la dilución, así como la hipocromía mas marcada.
- 8) Con respecto a la dilución, se observa menor numero de eritrocitos, siendo la dilución 1:5 en la que menor numero de hematíes se observan.
- 9) El IR muestra que entre las distintas diluciones no se observa ninguna diferencia entre los espectros obtenidos por cada una de las muestras y sus respectivas diluciones.
- 10) El EDTA tiene efecto sobre la proteína hemoglobina.
- 11) Este trabajo sirve como referente para realizar investigación acerca de proteínas.

XI. BIBLIOGRAFÍA:

Abbott Laboratories de México S.A. de C.V. 2002: Atlas de Hematología con interpretación de histogramas y escatogramas. Abbott diagnósticos. Una división de Abbott Laboratories. México, D.F.

Alors. C. R. 2008: Determinación de la hemoglobina en el laboratorio. Rev. Dig. Innovación y experiencias educativas. Granada, España.

Avendaño. S. E. 2011: EDTA maravilla. Universidad Autónoma metropolitana. Disponible en: <http://moleculadelasemana.weebly.com/uploads/1/2/9/3/12931434/edta.pdf>

Barbieri Petrelli G, Flores Guillén J, Vignoletti F. *El neutrófilo y su importancia en la enfermedad periodontal*. Av Periodon Implantol. 2005; 17, 1: 11-16

Bernard. D. G. 2006: Sangre, agentes o condiciones de trabajo que afectan la sangre. Consejo de Saud Ocupacional. Costa Rica.

Brandan. N., Aguirre. M. V., Giménez. C. E. 2008: Hemoglobina. Catedra de bioquímica. Facultad de Medicina UNNE. Argentina.

Brito. G. F., Yamasaki. M. A., Padilla. S. S. E., Vázquez. T. O., Huerta. L. J., Berrón. P. R. 2003: Eosinófilos: revisión de la literatura. Alergia, Asma e Inmunología Pediátrica. Vol. 12. Núm 2. Mayo-Agosto 2003. Artículo de revisión.

Burger S, Pierre-Louis J. (2003). A Procedure to estimate the Accuracy and Reliability of HemoCue Measurements of Survey Workers, USA, International Life Sciences Institute, Washington DC. Disponible en: (http://pdf.usaid.gov/pdf_docs/PNACW643.pdf) Fecha de visita: 22/08/2011.

Buck R, Eleazer P, Staat R. 1999: In vitro disinfection of dentinal tubules by various endodontic irrigants. J Endodon; 25:786-8

Calvo. P. V., Medina M. E., Sanchez P. 2005: The possible role of pH changes during EDTA demineralization; 69:220-22

Campuzano. M. G. 2008: Utilidad clínica del extendido de sangre periférica: los eritrocitos*. Medicina & Laboratorio, Volumen 14, Números 7-8, 2008

Cury JA, Bragotto C, Valdrighi L. 1981: The demineralizing efficiency of EDTA solutions on dentin. Oral Surg Oral Med Oral Pathol; 52:446-8.

García. D. E. 2000: Uso del Ácido EtilendiaminoTetraacético (EDTA) en la Terapia Endodóntica. Especialista en Endodoncia, U.C.V., Venezuela, 2000

Grinspan. K. S. 1985: El estudio de la sangre periférica. Educación Médica Continua. BVS. Revista Médica Hondureña. Honduras.

Henry. R. J. Harper. E. 1974: Clinical Chemistry, Principles and Technics. New York.

Jordan. L. T. 2013: Procedimiento para la determinación de hemoglobina mediante hemoglobinómetro portátil. Ministerio de salud de Perú. Instituto Nacional de Salud. Lima 2013.

Krijgheld. P., Bleichrodt. R., van Veluw. G. J., Wang. F., Müller. W. H., Dijksterhuis. J., Wösten. H. A. B. 2013: Development in Aspergillus. Microbiology and Kluver Centre for Genomics of Industrial Fermentations, Utrecht University, Padualaan 8, 3584 CH Utrecht, The Netherlands; Biomolecular Imaging, Utrecht University, Padualaan 8, 3584 CH Utrecht, The Netherlands; Applied and Industrial Mycology, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Uppsalalaan 8, 3584 CT Utrecht, The Netherlands

Megías. M., Molist. P., Pombal. M. A. 2015: Atlas de histología vegetal y animal. Tipos celulares. Eritrocito. Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Facultad de biología. Universidad de Vigo.

Merino. A. 2008: Valores normales del hemograma. ¿Cuándo hay que alarmarse? Servicio de Hemoterapia-Hemostasia. Hospital clínic (IDIBAPS). Universidad de Barcelona. Barcelona, España.

Moran. V. L. 2001: Obtención de muestras sanguíneas de calidad analítica. Mejoría continua de la etapa pre analítica. Editorial Panamericana.

Niniforuk G, Sreebny L. Demineralization of hard tissues by organic chelating agents at neutral ph. J Dent Res 1953; 32:859-67.

Östby N. Chelation in root canal therapy. Ethylenediamine tetra-acetic acid for cleansing and widening of root canals. Odont T 1957; 65:3-11.

Oviedo. C., Rodriguez. J. 2003: EDTA, the chelating agent under environmental scrutiny.

Peña. Q. Y., Batista. C. J. F., Coca. M. A., Stusser. R., Ruibal. L. A., Rochela. C. L. M. 2001: Valor del uso del quelante de calcio EDTA en el tratamiento de la cardiopatía isquémica. Centro de Investigaciones Clínicas. Ciudad de La Habana. Cuba.

Quiroz. G. A. K., Muñoz. B. R., Castro. L. A. 2015: Determinación de la fosfatasa alcalina osea, calcio serico, biometría hemática, calcio y hierro por absorción atómica en ratas descalcificadas por EDTA. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Retamales. C. E., Ramirez. V., Anabalón. P., Celis. M. M., Bertín. C. P., Maffioletti. B. M., Romero. M. M., Pape. L. I., Cabrera. C. M. E., Undurraga. S. M. S., Labra. J. S., Diaz. G. J. 2015: Recomendaciones para la interpretación del frotis sanguíneo del subprograma de morfología sanguínea. Instituto de Salud Pública. Ministerio de Salud. Gobierno de Chile. Chile.

Rodriguez. S. E. N. 2011: Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. Ra Ximhai, enero-abril, año/Vol. 7, Número 1 Universidad Autónoma Indígena de México Mochicahui, El Fuerte, Sinaloa. pp. 153-170

Rojas. J. M., Carmona. R. M. P, Romero. N. E. 2011: Banco de sangre. Laboratorio. Libros Laboratorio.

Sáenz. G. F., Chavez. M., Valenciano. E., Montero. A. G., Jiménez. J. 1996: Hemoglobinometria. Normalización de la metodología. Preparación nacional del estándar de calibración y del hemolizado control. Centro de Investigación de Hemoglobinas Anormales y Trastornos Atines (CIHATA), Universidad de Costa Rica, San José. Costa Rica. Cátedra de Hematología, Departamento de Análisis Clínicos, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, Hospital San Juan de Dios, San José, Costa Rica.

Vega. R. G. B. 2009: Linfocitos. Inmunología para el médico general. Departamento de Medicina Experimental. Facultad de Medicina. UNAM. Rev Fac Med UNAM Vol. 52 No. 6 noviembre-diciembre, 2009

Consultas electrónicas:

Cacheda. A., Cacheda. A. 2012: Fisiología. Disponible en:

<http://laphysis.blogspot.mx/2011/10/tema-4-fisiologia-del-eritrocito.html>

<http://cienciasdejoseleg.blogspot.mx/2012/10/leucocitos-basofilos.html>

<http://cienciasdejoseleg.blogspot.mx/2012/10/los-leucocitos-linfocitos.html>

Santini. F., Crosta. C. Sin año: El eosinófilo. Disponible en:

<http://www.hpc.org.ar/images/revista/217-v3p135.pdf>

<http://noeqbcursodehema.blogspot.mx>