

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

DETERMINACIÓN DE INTERVALOS DE REFERENCIA DE HEMATOLOGÍA EN

CANINOS ADULTOS

Agustín Andrés González Russo

Hugo Adrián Carzoli Mimbacas

TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de Doctor
en Ciencias Veterinarias
Orientación: Medicina Veterinaria

MODALIDAD: ESTUDIO DE CASO

MONTEVIDEO

URUGUAY

2019

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:

Dr. Alejandro Benech

Segundo miembro (Tutor):

Dra. Eugenia Agesta

Tercer miembro:

Dr. Marcelo Rodríguez

Cuarto miembro:

Dra. Paula Pessina

Quinto miembro:

Dr. Fernando Vila

Fecha:

23/08/2019

Autores:

Br. Agustín Andrés Gonzalez Russo

:

Br. Hugo Adrián Carzoli Mimbacas

AGRADECIMIENTOS

A nuestra tutora, la Dra. Maria Eugenia Agesta y nuestra co-tutora, la Dra. Paula Pessina por su disposición, paciencia y apoyo en esta instancia.

A nuestro co-tutor el Dr. Fernando Vila por su colaboración en el análisis estadístico.

Al Dr. Pedro Martino y la Dra. Ana Meikle por su apoyo en la revisión de este trabajo.

A todo el equipo del Laboratorio de Análisis Clínicos de la Facultad de Veterinaria de la UdelaR por la ayuda en el procesamiento de las muestras y por compartir sus conocimientos.

A los equipos de las veterinarias El Rastro, Don Quijote e Ibiray, los cuales fueron de gran importancia y siempre estuvieron dispuestos a sumar.

A nuestras familias, parejas y amigos que nos brindaron su apoyo incondicional durante todo este tiempo.

A todos los propietarios que confiaron a sus mascotas en nosotros.

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Figura 1. Esquema de la producción de distintas líneas celulares.	9
Figura 2. Hematopoyesis.....	10
Figura 3. Reticulocito teñido con Nuevo Azul de Metileno.....	11
Figura 4. Aumento del porcentaje de reticulocitos relativo según la gravedad de la anemia, con un recuento de reticulocitos constante.....	12
Figura 5. Esferocitos.....	13
Figura 6. Acantocitos.....	13
Figura 7. Fragmentación de eritrocitos.....	14
Figura 8. Autoaglutinación.....	14
Figura 9. Cuerpos de Heinz y Excentrocitos.....	15
Figura 10. Cuerpo de Howell-Jolly.....	15
Figura 11. Eritrocitos nucleados.....	16
Figura 12. Agregados plaquetarios.....	16
Figura 13. Linfocito.....	16
Figura 14. Monocito.....	17
Figura 15. Neutrófilo.....	17
Figura 16. Neutrófilo en banda.....	17
Figura 17. Eosinófilos.....	18
Figura 18. Basófilos.....	18
Figura 19. Formas inmaduras leucocitarias.....	19
Figura 20. Neutrófilos tóxicos.....	19
Figura 21. Neutrófilo hipersegmentado.....	20
Figura 22. Linfocito reactivo.....	20
Figura 23. Inclusión leucocitaria.....	20
Figura 24. Eritrocitos crenados.....	23
Figura 25. Artefactos relacionados al tiempo.....	24
Figura 26. Artefactos de secado.....	24
Figura 27. Precipitado de tinción.....	24
Figura 28. Apariencia de distintos tubos de microhematocrito demostrando (A) Leucocitosis (B) Ictericia (C) y (D) Hemólisis (E) Lipemia.....	31
Figura 29. Extensión sanguínea.....	35
Figura 30. Ficha de identificación.....	50
Figura 31. Escala de condición corporal.....	50
<i>Tabla 1. Tiempo de supervivencia de los reticulocitos según el hematocrito.</i>	<i>12</i>
<i>Tabla 2. Intervalos de referencia de eritrograma y plaquetas para el total de la muestra</i>	<i>40</i>
<i>Tabla 3. Intervalos de referencia de leucograma para el total de la muestra</i>	<i>40</i>
<i>Tabla 4. Intervalos de referencia de eritrograma dividido por categoría etaria</i>	<i>41</i>
<i>Tabla 5. Intervalos de referencia de leucograma divididos por categoría etaria</i>	<i>41</i>
<i>Tabla 6. Intervalos de referencia utilizados actualmente comparados con los intervalos de referencia obtenidos</i>	<i>42</i>

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	4
RESUMEN	6
SUMMARY	6
INTRODUCCIÓN	7
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	8
Hematología	8
<i>Recordatorio fisiológico</i>	8
<i>Hematopoyesis</i>	8
<i>Morfología celular</i>	10
<i>Hemograma completo</i>	21
<i>Estados patológicos más frecuentes</i>	25
Intervalos de Referencia	28
<i>Importancia de los intervalos de referencia</i>	28
<i>Definiciones de interés</i>	28
<i>Etapa preanalítica</i>	29
<i>Etapa analítica</i>	31
<i>Base estadística</i>	32
OBJETIVOS	33
MATERIALES Y MÉTODOS	33
Criterios de selección de los individuos de referencia	33
Toma de muestras	34
Análisis estadístico	36
RESULTADOS	37
DISCUSIÓN	43
CONCLUSIONES	46
BIBLIOGRAFÍA	47
ANEXOS	50

RESUMEN

Esta tesis tuvo como finalidad establecer los intervalos de referencia para los parámetros hematológicos (recuento eritrocitario, concentración de hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media, concentración de la hemoglobina corpuscular media, recuento plaquetario, recuento leucocitario, neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos en sus formas relativa y absoluta) en caninos adultos clínicamente sanos. Además se evaluó si factores como género y edad influenciaron en los parámetros. Se seleccionaron 170 caninos clínicamente sanos, los cuales se clasificaron por género y edad. Ningún parámetro se vio afectado por el efecto del género. Sin embargo, los resultados obtenidos para el hematocrito evidenciaron una disminución con la edad, siendo menor en animales gerontes que en animales adultos y adultos jóvenes ($P=0,04$). El conteo leucocitario y los neutrófilos en su forma absoluta se vieron disminuidos en los adultos con respecto a las categorías adultos jóvenes y gerontes ($P=0,03$). Los monocitos mostraron un incremento en individuos gerontes con respecto a las categorías restantes ($P=0,04$). En suma, el género no mostró ser un factor que provoque cambios estadísticamente significativos, mientras que la edad afectó distintos parámetros, debiendo ser considerada al momento de interpretar los resultados. A partir de esta tesis determinamos los intervalos de referencia de hematología para nuestro laboratorio, destacando la importancia que esto implica para discriminar salud de enfermedad; en el diagnóstico, evolución y pronóstico de cualquier patología sistémica e incluso para evaluar la respuesta a un tratamiento.

SUMMARY

This thesis aimed at establishing the reference intervals for hematological parameters (total erythrocyte count, hemoglobin concentration, hematocrit, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin, mean corpuscular hemoglobin concentration, platelet count, leukocyte count, neutrophils, lymphocytes, monocytes, eosinophils and basophils in their relative and absolute forms) in clinically healthy adult canines. It was also evaluated if factors such as gender and age influenced the parameters. 170 clinically healthy canines were selected, which were classified by gender and age. No parameters were affected by the effect of gender. However, the results obtained for hematocrit showed a decrease with age, being lower in elderly animals than in adult animals and young adults ($P = 0.04$). The leukocyte count and neutrophils in their absolute form were diminished in adults with respect to the young and elderly adult categories ($P = 0.03$). Monocytes showed an increase in elderly individuals with respect to the remaining categories ($P = 0.04$). In sum, gender was not shown to be a factor that causes statistically significant changes, while age affected different parameters, and should be considered when interpreting the results. From this thesis we determined the hematology reference intervals for our laboratory, thus highlighting its importance in discriminating disease from health; in the diagnosis, evolution and prognosis of any systemic pathology and even to evaluate the response to a treatment.

INTRODUCCIÓN

El hemograma es una herramienta esencial para discriminar salud de enfermedad, en el diagnóstico, evolución y pronóstico de cualquier patología sistémica e incluso para valorar la respuesta a un tratamiento. El mismo consta de dos partes que deben realizarse siempre y son igual de importantes. La primera es una parte cuantitativa en la que se incluye el hematocrito (HTC), el recuento total de eritrocitos (RBC), la concentración de hemoglobina (Hgb), el recuento total de leucocitos (WBC), el recuento diferencial de WBC y el recuento plaquetario (PLT); obteniendo mediante cálculos el volumen corpuscular medio (VCM), la hemoglobina corpuscular media (HCM) y la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM). La segunda es una parte cualitativa que consta de la evaluación del frotis sanguíneo (Villiers y Blackwood, 2012). Para interpretar la información, el laboratorio clínico se basa en los valores de referencia, sin los cuales no es posible interpretar los resultados de los diferentes test de laboratorio (Stockham y Scott, 2008), por lo que los mismos han ganado cada vez más importancia en la Medicina Veterinaria (Geffré y col., 2009). En el escenario ideal, los intervalos de referencia de variables utilizadas en el diagnóstico clínico deberían ser formulados por cada laboratorio debido a que los mismos están ligados en gran parte a los equipos y reactivos utilizados, así como también a la población y al ambiente (Friedrichs y col., 2012). Generalmente los intervalos de referencia no son óptimos ya que son creados a partir de un número limitado de individuos donde no se tienen en cuenta los factores que afectan a los intervalos como son la edad, el sexo o la raza (Willard y Tvedten, 2004). Si el laboratorio no cuenta con intervalos de referencia propios, deberá utilizar valores ya establecidos por otros laboratorios para interpretar los resultados, lo cual puede llevar a errores diagnósticos (Cornell University College of Veterinary Medicine, 2013).

A pesar de la confiabilidad de los intervalos de referencia utilizados hoy en día en el Laboratorio de Análisis Clínicos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República, los mismos fueron creados a partir de una población de referencia diferente, la cual se encuentra en un ambiente y bajo unas condiciones que no se corresponden con las de nuestra población canina, sumado a que las muestras fueron procesadas mediante equipos, reactivos y personal distinto al que se encuentra hoy en día en nuestro laboratorio. Por lo mencionado anteriormente nace la necesidad de generar los intervalos de referencia del hemograma en caninos propios, ya que en la actualidad se utilizan intervalos de referencia generados en otros laboratorios.

La finalidad de la presente tesis fue determinar los intervalos de referencia del hemograma en caninos adultos.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Hematología

Recordatorio fisiológico

La sangre está compuesta por una fracción celular (30-50% del volumen total) en la cual encontraremos eritrocitos, leucocitos y plaquetas; y por plasma (aproximadamente 50-70%, Cunningham, 2003). El plasma está constituido en un 92-95% por agua y el resto por una porción sólida dentro de la cual encontraremos más que nada proteínas (incluidas las de coagulación como fibrinógeno), glucosa, electrolitos, urea y otros compuestos químicos (Stockham y Scott, 2008).

Tanto los eritrocitos como los leucocitos se generan en la médula ósea, y se desarrollan mediante mitosis y diferenciación a partir de una línea común de células progenitoras, células madre pluripotenciales indiferenciadas. Las plaquetas o trombocitos son fragmentos de sus células precursoras, los megacariocitos, que residen en la médula ósea y liberan plaquetas al torrente sanguíneo. Su función es la de participar en la hemostasia mediante el control de hemorragias (Ettinger y Feldman, 2007).

La sangre en el organismo cumple funciones de transporte de nutrientes como por ejemplo la glucosa, aminoácidos, ácidos grasos y varios lípidos. También interviene en la eliminación de desechos como dióxido de carbono, ácido láctico, desechos nitrogenados procedentes del metabolismo proteico y calor. A su vez realiza el transporte de oxígeno, mensajeros químicos como hormonas, agua y electrolitos. Por último cumple funciones inmunológicas (Cunningham, 2003).

Hematopoyesis

La hematología abarca un amplio rango de temas, incluyendo la hematopoyesis y el estudio de laboratorio de células hematopoyéticas (Cornell University College of Veterinary Medicine, 2013). A pesar de que la palabra hematopoyesis significa formación de sangre, se debe tener en cuenta que se refiere a la formación de células sanguíneas maduras: eritrocitos, granulocitos, monocitos, linfocitos y plaquetas. La formación de los componentes del plasma dependerá de varios factores fisiológicos y tejidos diferentes (Feldman y col., 2000).

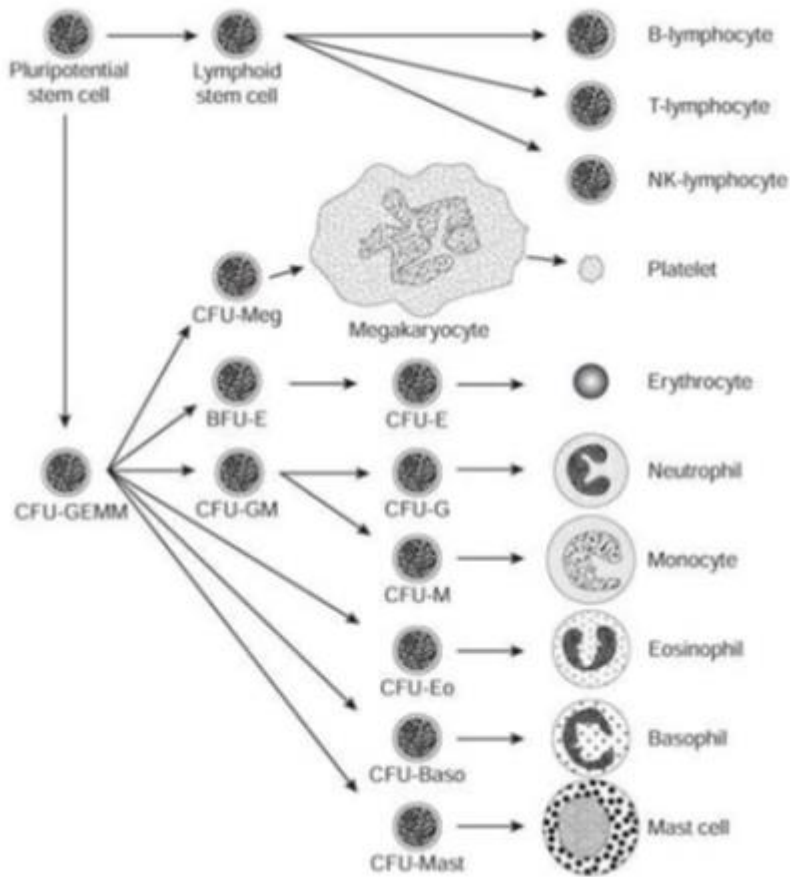


Figura 1. Esquema de la producción de distintas líneas celulares. Fuente: Stockham y Scott (2008).

En los mamíferos, la eritropoyesis comienza en el saco vitelino, para luego darse también en la zona aorta-gonado-mesonéfrica del embrión. Los sitios de producción celular varían durante la vida embrionaria y fetal. El hígado y el bazo se convierten en los órganos hematopoyéticos por excelencia hacia la mitad de la gestación, comenzando también a esta altura la hematopoyesis a nivel de la médula ósea (Harvey, 2012).

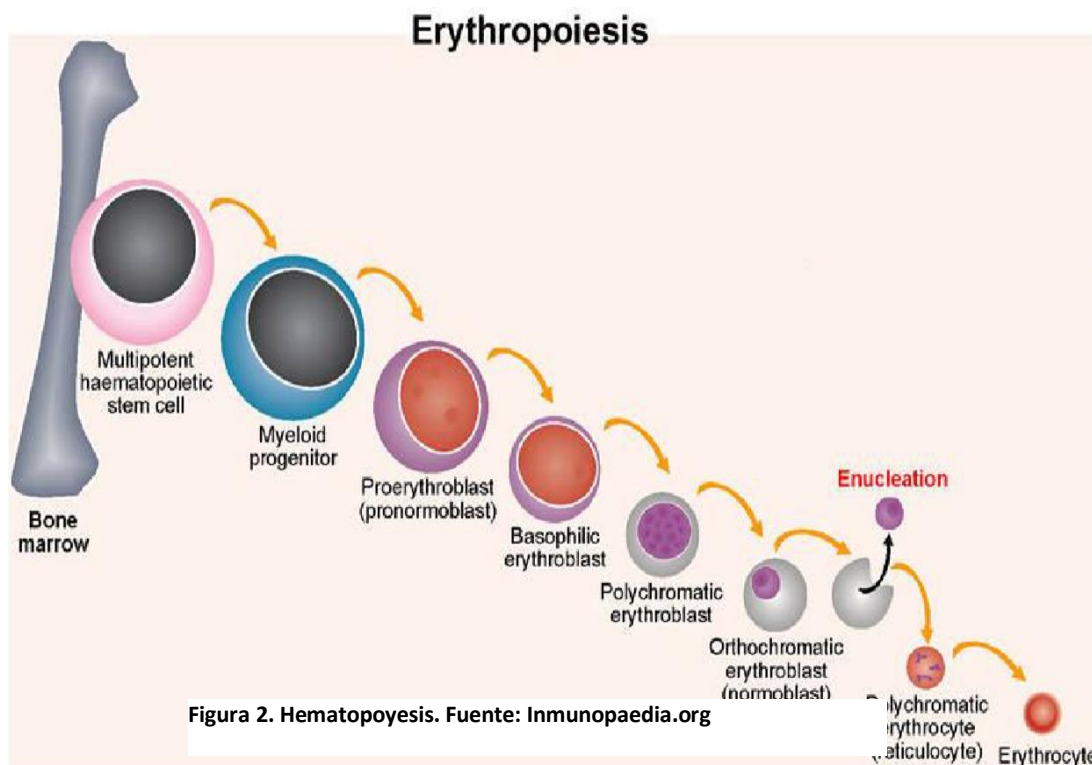
El sistema hematopoyético está formado por varios tejidos hematopoyéticos, los elementos formes funcionales de la sangre y las células progenitoras. Los tejidos hematopoyéticos, también llamados microambiente hematopoyético, están dispersos en la médula ósea de huesos planos y largos, bazo, hígado, linfonodos y timo. El microambiente hematopoyético se divide en 3 compartimientos funcionales, conectados y continuos: el de células madres, el de células progenitoras y el de células precursoras. Durante el pasaje por estos compartimientos se logra el crecimiento y diferenciación celular previo a la liberación a la circulación (Feldman y col., 2000).

El desarrollo de celular progresa a partir de una célula madre hematopoyética, que puede someterse a una auto renovación o diferenciación en una célula progenitora multilínea: un progenitor linfóide común o un progenitor mielóide común (Weiss y Wardrop, 2010). La célula progenitora linfóide común dará origen a células progenitoras de linfocitos T y natural killer, mientras que la célula progenitora mielóide común dará origen a las células progenitoras de megacariocitos y células eritroides; y por otra parte a células progenitoras de granulocitos y monocitos (Harvey, 2012). En última instancia, estas células dan lugar a progenitores unilínea para las células B, células NK, células

T, granulocitos, monocitos, eritrocitos y megacariocitos. Existen citoquinas y factores de crecimiento que apoyan la supervivencia, la proliferación o diferenciación de cada tipo de célula (Weiss y Wardrop, 2010).

En la mayoría de los casos, la hematopoyesis ocurre en la médula ósea. Cuando la hematopoyesis ocurre fuera de ella, es llamada hematopoyesis extra medular. Este tipo de hematopoyesis se puede dar en varios sitios, siendo los más comunes bazo (pulpa roja) e hígado (área portal) (Cornell University College of Veterinary Medicine, 2013). La hipoxia severa es el principal estímulo para la hematopoyesis extra medular (Johns y Christopher, 2008).

Morfología celular



Eritrocitos

Morfología normal

Los eritrocitos caninos son discos bicóncavos de aproximadamente 7 micrómetros de diámetro, siendo la forma bicóncava más pronunciada que en otras especies, por lo que en los frotis sanguíneos se puede ver claramente la palidez central ocupando aproximadamente $\frac{1}{3}$ del diámetro celular (Feldman y col., 2000).

Anomalías eritrocitarias frecuentes

- Policromasia:

Se define como el incremento de glóbulos rojos inmaduros en los frotis sanguíneos teñidos con coloración de Wright o Giemsa, donde se les da el nombre de policromatófilos. Estas células presentan citoplasma de color azulado o rojo-azulado, y su tamaño es mayor que el de un eritrocito maduro. Se pueden identificar como reticulocitos en extendidos sanguíneos teñidos con Nuevo Azul de Metileno (Reagan y col., 2008).

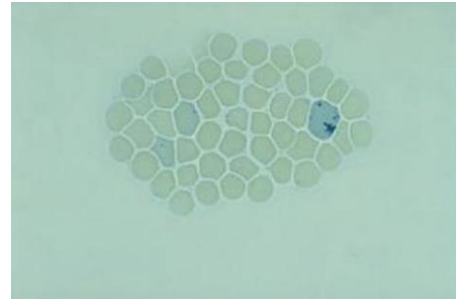


Figura 3. Reticulocito teñido con Nuevo Azul de Metileno. Fuente: Cowell y col. (2009)

Los reticulocitos caninos son del tipo agregado, a diferencia de los reticulocitos felinos son del tipo agregado y punteados (Cowell y col., 2009).

Los reticulocitos teñidos con nuevo azul de metileno presentan gránulos oscuros en un patrón lineal, a diferencia de los eritrocitos maduros se tiñen de forma homogénea (Willard y Tvedten, 2010). Estos gránulos forman una especie de red, la cual es llamada "reticulum". Estos gránulos están formados por ARN ribosomal y organelos, como por ejemplo mitocondrias (Reagan y col., 2008).

El método se lleva adelante mezclando una parte de sangre con una o una parte y media de nuevo azul de metileno al 0,5% en solución salina durante 10 minutos. Luego se homogeneiza de nuevo y se realiza la extensión, que se seca al aire y se examina con el objetivo para aceite de inmersión (Cowell y col., 2009). Se deben contar por lo menos 1000 hematíes en total y el número de reticulocitos se expresa en porcentaje (Gregg y Shannon, 2011).

Un recuento de reticulocitos mayor al 50% de lo esperado, pero menor de lo que se considera adecuado para la especie o la severidad de la anemia representa una respuesta de la médula ósea inadecuadamente regenerativa. Estas respuestas se producen en animales con hemorragias o hemólisis concomitantes con afectación de la eritropoyesis en la médula ósea. En animales que ya han tenido tiempo de responder (7 días) pero que tienen menos del 50% de la respuesta reticulocitaria esperada tienen una anemia no regenerativa. El porcentaje de reticulocitos se considera inexacto ya que, en la anemia, el recuento de eritrocitos maduros tiene reducción variable, por lo cual, el porcentaje de reticulocitos sobreestima la respuesta hematopoyética (Cowell y col., 2009).

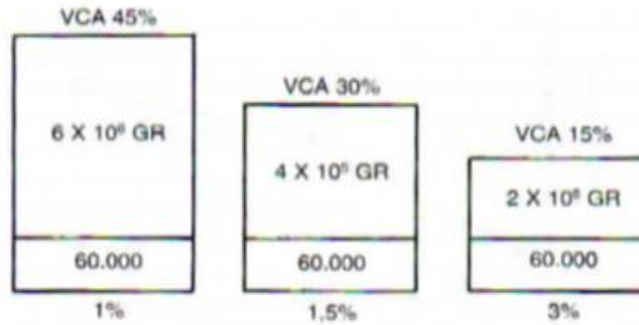


Figura 4. Aumento del porcentaje de reticulocitos relativo según la gravedad de la anemia, con un recuento de reticulocitos constante. Fuente: Willard y Tvedten (2004).

Recuento reticulocitario absoluto:

Se calcula multiplicando el porcentaje de reticulocitos por el recuento eritrocitario, de modo que varía con la gravedad de la anemia y evita la sobreestimación de la respuesta hematopoyética. Es el indicador más confiable de la eritropoyesis y se recomienda como el mejor indicador individual de regeneración en perros y gatos (Willard y Tvedten, 2012).

Índice reticulocitario y porcentaje reticulocitario corregido:

Son indicadores alternativos de la producción reticulocitaria que emplean el hematocrito en lugar del recuento de glóbulos rojos. El porcentaje reticulocitario corregido se ajusta de acuerdo al grado de anemia y se calcula como $PRC = \% \text{ de reticulocitos} \times \text{Hematocrito del paciente} / \text{Hematocrito normal}$. El índice reticulocitario se ajusta de acuerdo a la vida útil de los reticulocitos caninos en sangre periférica y se calcula como $IR = PRC / \text{vida media del reticulocito}$. En la anemia de gravedad creciente, los reticulocitos son liberados más temprano desde la médula ósea y viven más tiempo en la sangre, antes de madurar a eritrocitos. En los perros, un índice reticulocitario mayor de 1 indica anemia regenerativa. Un índice reticulocitario de 3 o mayor señala respuesta regenerativa marcada (Willard y Tvedten, 2012).

Tabla 1. Tiempo de supervivencia de los reticulocitos según el hematocrito.

Hematocrito (%)	Supervivencia esperada de los reticulocitos (días)
45	1
35	1,5
25	2
15	2,5

Fuente: Willard y Tvedten (2004)

El error más común en la interpretación de los reticulocitos es concluir que la anemia es regenerativa basándose en incrementos leves en alguno de los modos de expresar los reticulocitos (Willard y Tvedten, 2004).

- Esferocitos:

Los esferocitos son eritrocitos que presentan una reducción de su superficie, debida a alteraciones a nivel de membrana. Tienen diámetro más pequeño, color naranja oscuro y carecen de palidez central (Harvey, 2012). En las áreas gruesas y cerca del borde festoneado del frotis de sangre, los glóbulos rojos caninos normales no tienen palidez central y semejan esferocitos, por lo que debe tenerse especial cuidado. En el borde delgado de los frotis caninos normales, los glóbulos rojos se observan estirados, pierden su forma y también carecen de palidez central (Willard y Tvedten, 2004).

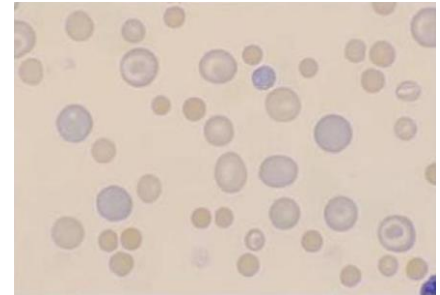


Figura 5. Esferocitos. Fuente: Cowell y col. (2009)

Los mismos suelen ser vistos en patologías autoinmunes como la anemia hemolítica inmunomediada y en desórdenes esplénicos (Gregg y Shannon, 2011).

- Acantocitos:

Los acantocitos son glóbulos rojos anormales, que tienen pocas proyecciones separadas irregularmente y con extremos redondeados. Algunos eritrocitos se parecen tanto a los acantocitos como a los equinocitos, recibiendo el nombre de equinoacantocitos (Willard y Tvedten, 2004).

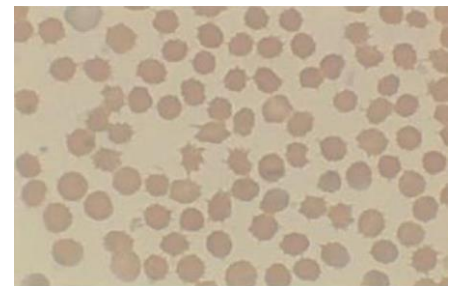
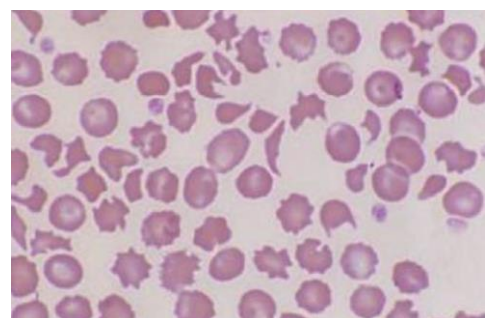


Figura 6. Acanthocitos. Fuente: Cowell y col. (2009)

Los acantocitos se forman cuando hay un exceso de colesterol en la membrana en comparación con los fosfolípidos. Este exceso se puede dar por aumento del colesterol en sangre o por una anomalía en la composición del plasma con respecto a las lipoproteínas. También han sido descritos en perros con alteraciones que generan fragmentación de eritrocitos como puede ser hemangiosarcoma, CID o glomerulonefritis (Harvey, 2012).

- Fragmentación de eritrocitos:

La fragmentación de eritrocitos puede deberse a trastornos metabólicos, traumatismos intravasculares como la coagulación intravascular diseminada (en el cual se forman fibras de fibrina



que rompen los eritrocitos) o deficiencias de hierro (Thrall y col., 2012).

Los fragmentos de glóbulos rojos pequeños e irregulares se denominan, queratocitos o células en casco (las cuales tienen 2 prolongaciones con forma de cuerno) y esquizocitos o fragmentos de glóbulo rojo, las cuales probablemente provengan de fragmentos de las anteriores (Willard y Tvedten, 2004).

Figura 7. Fragmentación de eritrocitos. Fuente: Cowell y col. (2009)

- Leptocitos:

Los leptocitos son glóbulos rojos flexibles, de mayor tamaño y con una membrana aparentemente más fina y con palidez central. Existen 2 tipos de leptocitos, los codocitos o células en diana y los knizocitos o células en barra (Reagan y col., 2008). El codocito es una forma común de leptocito que tiene un pequeño círculo de hemoglobina en medio del área de palidez central (Willard y Tvedten, 2012). Los knizocitos presentan una porción de la membrana la cual divide el área de palidez central en 2 partes. Se suelen ver junto con los codocitos (Reagan y col., 2008).

El área de palidez central debe ser diferenciada de la hipocromía por deficiencia de hierro por el espesor y color del margen de hemoglobina y por los índices eritrocitarios. Los leptocitos presentan un margen de hemoglobina oscuro y ancho, al contrario que en las deficiencias de hierro (Willard y Tvedten, 2012).

Los leptocitos y los codocitos son hallazgos inespecíficos que pueden asociarse con anemias no regenerativas y enfermedad hepática o esplénica (Willard y Tvedten, 2004).

- Autoaglutinación:

Esta alteración es la agregación de los glóbulos rojos inducida por mecanismos inmunológicos que forma grumos en forma de racimos. La verdadera autoaglutinación es equivalente a una reacción de Coombs positiva y constituye una fuerte evidencia de anemia hemolítica inmunomediada (Willard y Tvedten, 2012). La inmunoglobulina M es la más propensa a producir aglutinación por su naturaleza pentavalente (Harvey, 2012).

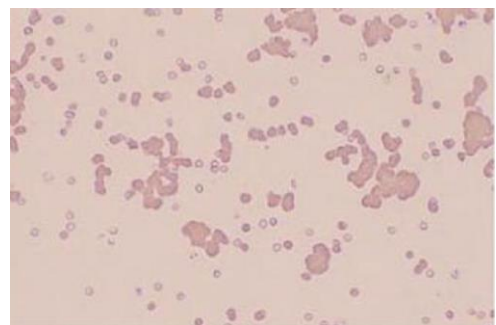


Figura 8. Autoaglutinación. Fuente: Cowell y col. (2009)

La aglutinación debe ser diferenciada de los eritrocitos en pilas de monedas. La formación de pilas de monedas es la unión de glóbulos rojos en cadenas que semejan esta figura (Gregg y Shannon, 2011). Puede diferenciarse también mezclando la sangre con una cantidad equivalente de solución fisiológica. En el caso de la pila de monedas la aglomeración será dispersada por la solución fisiológica, mientras que en la autoaglutinación no sucederá la dispersión. La presencia aislada de pilas de monedas es normal en los perros y más numerosa en los gatos y equinos (Willard y Tvedten, 2012). La formación de pilas de monedas está asociada al incremento de proteínas plasmáticas como el fibrinógeno y las gammaglobulinas. Estas formaciones son sugestivas de gammapatías; en el caso de los animales con mieloma múltiple casi siempre se ve un incremento en la formación de pilas de monedas (Thrall y col., 2012).

- Cuerpos de Heinz y Excentrocitos:

La lesión oxidativa puede conducir a la desnaturalización de la hemoglobina, que cuando es importante puede aparecer en forma de cuerpos de Heinz y/o excentrocitos (Cowell y col., 2009). Los cuerpos de Heinz son protuberancias únicas y redondeadas de la membrana de los hematíes, normalmente refráctiles (Reagan y col., 2008).

Los cuerpos de Heinz pueden ser mejor visualizados con tinción de nuevo azul de metileno. Su tamaño es variable dependiendo del grado de lesión oxidativa. Los cuerpos de Heinz en hematíes caninos sugieren una crisis hemolítica (Harvey, 2012).

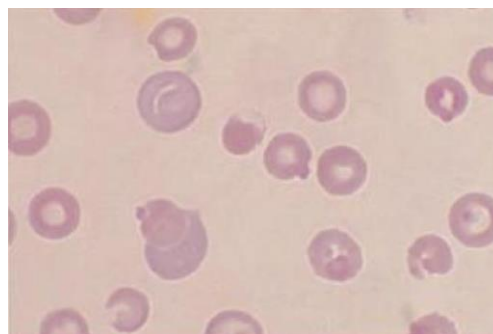


Figura 9. Cuerpos de Heinz y Excentrocitos. Fuente: Cowell y col. (2009)

Los excentrocitos tienen una zona citoplasmática fantasma excéntrica donde el citoplasma que permanece se encuentra ligeramente condensado. Ambos se asocian a ingestión de ajo, cebolla, cinc, cobre o naftaleno, paracetamol, productos con benzocaína, Propofol, metionina y vitamina K3 (Cowell y col., 2009).

- Cuerpos de Howell-Jolly:

Son inclusiones esféricas azul oscuras a negras que suelen aparecer individualmente dentro del citoplasma de los hematíes. Son restos nucleares que no han sido extraídos apropiadamente durante la maduración de la célula (Harvey, 2012).

Existe un número bajo en animales adultos, pero una elevada cantidad puede sugerir anemia regenerativa, disminución de la función esplénica y/o eritropoyesis anormal (Cowell y col., 2009).



Figura 10. Cuerpo de Howell-Jolly. Fuente: www.telmeds.org

- Puntillado basófilo:

Aparece como un débil moteado en el citoplasma de los hematíes de granos finos de color gris a azul oscuro (Cowell y col., 2009). Tiene una similitud en su forma de teñirse con los reticulocitos, con la única diferencia de que se ven correctamente con tinciones de tipo Romanowsky y sin embargo no se ve bien definido el puntillado con nuevo azul de metileno (Gregg y Shannon, 2011). Se define como la agregación in vivo de los ribosomas y se asocia con anemias altamente regenerativas en caninos. Cuando se ve en casos en los que no existe anemia suele sugerir graves intoxicaciones por plomo (Thrall y col., 2012).

- Eritrocitos nucleados:

Los rubrocitos y metarubrocitos se observan ocasionalmente en la sangre de perros sanos. Un elevado número de glóbulos rojos nucleados se asocia a animales con anemia regenerativa, disfunción esplénica o asplenia, hiperadrenocorticismo, estrés fisiológico grave, tratamiento con corticoides y mielodisplasia (Harvey, 2012).

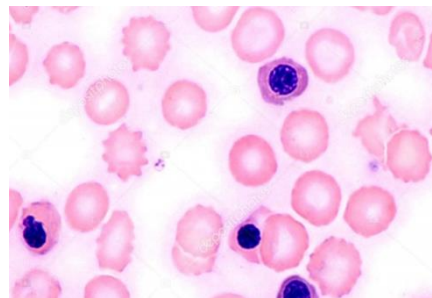


Figura 11. Eritrocitos nucleados. Fuente: sp.depositphotos.com

En algunas razas como schnauzer miniatura o teckel se ha descrito aumentos de glóbulos rojos nucleados en individuos sanos. Si hay más de 5 hematíes nucleados cada 100 glóbulos blancos se debe sospechar una alteración en la médula ósea. En casos de 15 o más hematíes por cada 100 leucocitos lo más probable es un daño grave en la médula, disrupción de su arquitectura o intoxicación por plomo (Cowell y col., 2009).

Plaquetas

Las plaquetas no son células completas sino que son partes del citoplasma de células de mayor tamaño llamadas megacariocitos, por lo que varían en su forma y tamaño. Lo más común es que sean pequeñas y ligeramente teñidas con las tinciones de tipo Romanowsky (Gregg y Shannon, 2011).

Cuando se encuentran parcialmente activadas presentan procesos citoplasmáticos que se extienden desde el cuerpo celular. Pueden aparecer agregadas o aglutinadas formando una masa amorfa. Este tipo de formaciones se suele encontrar en los flocos por lo que si se lee la monocapa solamente puede subestimarse el valor plaquetario (Cowell y col., 2009).

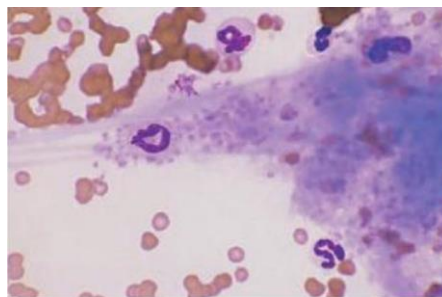


Figura 12. Agregados plaquetarios. Fuente: Cowell y col. (2009)

Cuando existe una alta demanda de plaquetas se pueden encontrar macroplaquetas, las cuales pueden llegar a medir 5 micrómetros de diámetro o más (Reagan, 2008).

Linfocitos

Son el segundo tipo celular más común en sangre periférica, presentan forma redondeada y son ligeramente más pequeños que los neutrófilos (Reagan, 2008). El núcleo es densamente teñido de forma circular a oval y a veces indentado con agregados de cromatina, pudiendo la misma aparecer en forma difusa. El citoplasma es escaso y moderadamente azul en tinciones de tipo Romanowsky (Cowell y col., 2009).

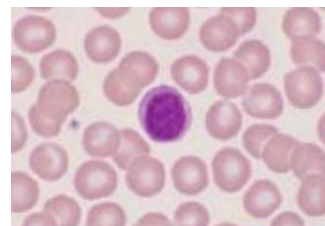


Figura 13. Linfocito. Fuente: Cowell y col. (2009)

Monocitos

Son más grandes que los neutrófilos y similares en su tamaño a los eosinófilos y los basófilos. El núcleo varía en su morfología, adoptando desde formas en U a formas multilobuladas irregulares. La cromatina tiene forma reticular o de cordón, con solo unos pocos agregados aislados de heterocromatina. El citoplasma es abundante, de coloración azulada-grisácea, con una textura de cristal esmerilado, pudiendo presentar vacuolas. Los bordes citoplasmáticos suelen ser irregulares y con finas extensiones como pseudópodos (Cowell y col. 2009).

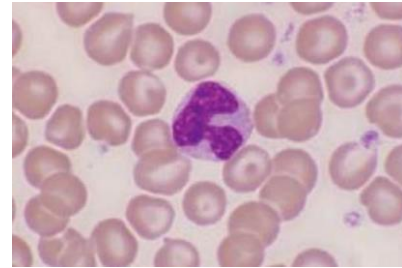


Figura 14. Monocito. Fuente: Cowell y col. 2009)

Neutrófilos

Los neutrófilos segmentados maduros miden entre unos 10 y 12 micrómetros de diámetro. El citoplasma presenta pocos organelos y un gran número y variedad de gránulos citoplasmáticos (Weiss y Wardrop, 2010). El mismo es claro, de pálido eosinofílico a débilmente basófilo con una textura granular que a veces puede contener una o dos vacuolas. Su núcleo es alargado y separado en múltiples lóbulos por invaginaciones del borde nuclear. La cromatina se organiza en agregados de heterocromatina de tinción morada oscura a negra separados por áreas de eucromatina menos condensada (Cowell y col., 2009). Los lóbulos nucleares pueden estar simplemente separados por zonas nucleares más angostas o por finos filamentos (Harvey, 2012).



Figura 15. Neutrófilo. Fuente: Cowell y col. (2009)

Neutrófilos en banda

Tienen un núcleo en forma de U o J con cromatina menos condensada. A diferencia de los neutrófilos maduros no existe lobulación nuclear (Cowell y col., 2009), aunque se pueden notar leves indentaciones (Reagan y col., 2008). El citoplasma es similar al de los neutrófilos maduros (Cowell y col., 2009).

No existe un criterio estandarizado para definir si un neutrófilo es segmentado o en banda, y hay casos en los que se genera la duda. En esta situación se lo toma como un neutrófilo segmentado ya que son los más comunes de encontrar (Harvey, 2012).



Figura 16. Neutrófilo en banda. Fuente: Cowell y col. (2009)

Eosinófilos

Son ligeramente más grandes que los neutrófilos. El núcleo tiende a ser menos lobulado que el de éstos y su cromatina se encuentra menos condensada (Cowell y col., 2009). El citoplasma va de claro a levemente basófilo y contiene abundantes

gránulos rosados, los cuales tienen afinidad por la eosina y le dan el nombre a la célula. El tamaño, número y forma de los gránulos varía considerablemente. En ciertos casos pueden verse vacuolas en el citoplasma, pero en el caso de los galgos este evento se ve con mayor frecuencia (Harvey, 2012).

Basófilos

Son los granulocitos más grandes y menos comunes de encontrar. El núcleo tiene menos lobulaciones que otros granulocitos y es más alargado. El citoplasma es azul-grisáceo a levemente púrpura y usualmente contiene gránulos (Cowell y col., 2009).

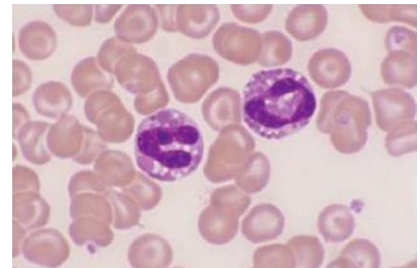


Figura 17. Eosinófilos. Fuente: Cowell y col. (2009)

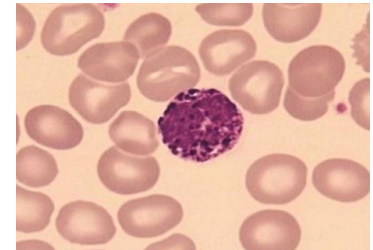


Figura 18. Basófilos. Fuente: Cowell y col. (2009)

Anomalías leucocitarias frecuentes

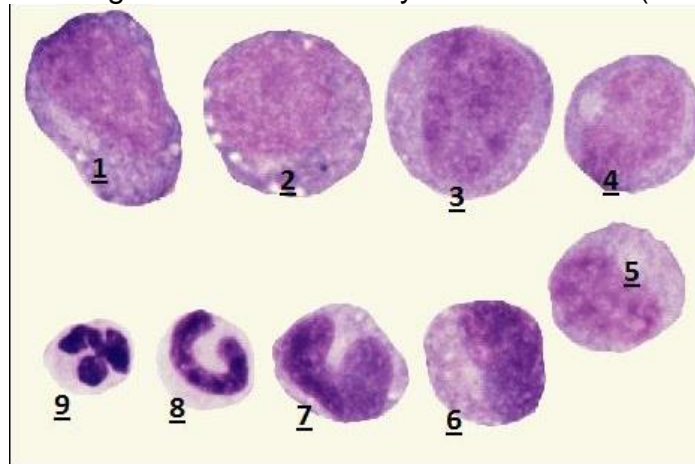
- Desviación a la izquierda:

La desviación a la izquierda se define como un aumento de formas inmaduras de neutrófilos en sangre y es un indicador de enfermedad inflamatoria. La diferenciación entre un neutrófilo no segmentado o inmaduro (neutrófilos en banda, metamielocitos, mielocitos, promielocitos y mieloblastos) y uno maduro se realiza mediante la lectura del frotis. La identificación de las formas inmaduras es subjetiva y varía según el observador. En casos de sepsis o endotoxemia, los neutrófilos evidencian una maduración asincrónica dificultando la identificación consistente de los diferentes estadios de maduración (Willard y Tvedten, 2012).

Existe una condición rara llamada anomalía de Pelger-Huet en la cual existe un defecto en la segmentación de los neutrófilos maduros, causando una hipo segmentación. Esto da una falsa impresión de desviación a la izquierda, pudiendo ser diferenciados de las verdaderas formas inmaduras por las características de la cromatina nuclear y porque clínicamente no existen alteraciones (Reagan y col., 2008).

Existen 3 tipos de mieloblastos. Los mieloblastos tipo I son células grandes, redondeadas, con un núcleo oval localizado en el centro de la célula. Los mieloblastos tipo II contienen menos de 15 gránulos color magenta en su citoplasma. En el caso de que se presenten más de 15 gránulos de las características antes mencionadas se clasifica como mieloblasto tipo III. Los promielocitos tienen núcleos redondos a ovales. Presentan muchos gránulos primarios de color magenta incluidos en un citoplasma levemente azulado (Harvey, 2012). Los mielocitos tienen un núcleo redondeado a oval, ligeramente excéntrico y aplanado en un lado. Son más grandes con una ratio núcleo-citoplasma mayor en comparación a la mayoría de los leucocitos maduros. El citoplasma es ligeramente basófilo y contiene gránulos característicos del tipo leucocitario. Los metamielocitos tienen núcleo en forma de poroto con menos, más chicos y más separados acúmulos de heterocromatina en comparación con los

neutrófilos en banda y segmentados. El citoplasma varía desde un rosa pálido hasta basófilo, dependiendo del grado de inmadurez y de la toxicidad (Cowell y col., 2009).



- 1-Mieloblasto
- 2 y 3- Progranulocito
- 4 y 5- Mielocito
- 6- Metamielocito
- 7 y 8 - Neutrófilo en banda
- 9 - Segmentado

Figura 19. Formas inmaduras leucocitarias.

- Neutrófilos tóxicos:

Es el cambio morfológico más común en los frotis sanguíneos, indicando un efecto inflamatorio sistémico sobre la médula ósea. El cambio tóxico significativo en los neutrófilos indica toxemia y debe informarse tanto por el número de neutrófilos afectados como por la gravedad (Cowell y col., 2009). Se evidencia principalmente mediante vacuolización del citoplasma, intensa basofilia y/o la presencia de cuerpos de Dohle. Los cuerpos de Dohle son pequeñas e irregulares formaciones de color gris-azulado en el citoplasma, formados por agregados de retículo endoplásmico rugoso (Reagan y col., 2008). Puede también observarse anomalías nucleares como cariólisis, cariorrexis, hipo segmentación y binucleación (Harvey, 2012).



Figura 20. Neutrófilos tóxicos. Fuente: Willard y Tvedten (2004)

Cuando la toxicidad es leve o pocos neutrófilos están afectados, puede no haber evidencia clínica de toxemia, pero cuando los cambios tóxicos son moderados a graves en muchas células, la toxemia suele tener manifestaciones clínicas evidentes (Cowell y col., 2009).

Los cambios tóxicos más marcados se deben a toxinas bacterianas, a menudo relacionadas con enfermedades entéricas (por ej., diarrea por parvovirus) u otras infecciones por bacterias gramnegativas. Se pueden utilizar las siguientes pautas para mantener la uniformidad de los informes en cuanto a la cantidad de neutrófilos tóxicos (un 0 a 4% se considera no relevante): escasos, 5-10%; moderados, 11-30% y

abundantes, más del 30%. La gravedad de la toxicidad se define de manera subjetiva. Los neutrófilos caninos con toxicidad leve sólo tienen cuerpos de Dohle, cuyo hallazgo puede ser irrelevante. La toxicidad más grave por lo general refleja toxemia clínica y el pronóstico empeora con el aumento de la toxicidad. Estos animales a menudo tienen infecciones bacterianas (por ej., enteritis bacteriana gram negativa secundaria a infección con parvovirus) (Willard y Tvedten, 2012).

- Neutrófilos hipersegmentados (desviación a la derecha):

Son neutrófilos que han permanecido en la circulación por un período de tiempo prolongado en vez de migrar hacia los tejidos. Se reconocen como neutrófilos que tienen 5 o más separaciones distintas entre sus lóbulos, pudiendo indicar un incremento en la circulación de corticosteroides endógenos o exógenos. También se pueden ver en animales con una marcada neutrofilia asociada a un proceso inflamatorio crónico (Cowell y col., 2009). Estas células han sido descritas también en animales con deficiencia en la absorción de cobalamina (Harvey, 2012).



Figura 21. Neutrófilo hipersegmentado. Fuente: telmeds.org

- Linfocitos reactivos:

Estos linfocitos aparecen como respuesta a un estímulo antigénico. Tienen un tamaño mayor y exhiben una basofilia citoplasmática intensa. Pueden ser confundidos con monocitos, los cuales tienen un citoplasma más claro, o también con células neoplásicas. En caso de que no se puedan diferenciar se los denomina linfocitos atípicos (Harvey, 2012). Es frecuente hallar linfocitos reactivos ocasionales en frotis de sangre, tanto de animales enfermos como sanos. La presencia de abundantes linfocitos reactivos en animales enfermos sugiere estimulación antigénica intensa. El número de linfocitos reactivos no es un indicador confiable de la intensidad de las reacciones inmunitarias. Los linfocitos reactivos tienden a ser más numerosos en los animales jóvenes (Willard y Tvedten, 2012).

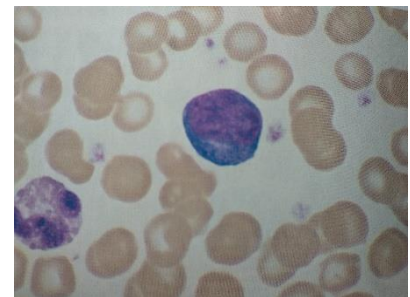


Figura 22. Linfocito reactivo. Fuente: Cowell y col. (2009)

- Inclusiones leucocitarias:

Normalmente representan material fagocitado, pudiendo ser otras células, detritos celulares y organismos infecciosos (Cowell y col., 2009). Las inclusiones de distemper son formadas en las células precursoras de la médula ósea, viéndose en las células sanguíneas durante la fase aguda virémica de la enfermedad (Harvey, 2012). Se pueden observar también mórulas de Ehrlichia canis o Anaplasma phagocytophilum en los leucocitos, especialmente en los animales con sintomatología clínica. Son de apariencia redondeada a oval y de

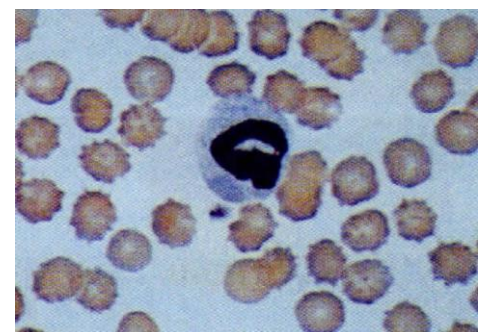


Figura 23. Inclusión leucocitaria. Fuente: Willard y Tvedten (2004)

coloración eosinofílica a basofílica. Los gametocitos de *Hepatozoon* sp son un raro hallazgo en sangre periférica. Se hallan en células nucleadas circulantes (probablemente monocitos). Muy rara vez se encuentran levaduras, hongos u otro tipo de organismos bacterianos. Si se encuentran en muestras frescas son diagnósticos de infecciones sistémicas (Cowell y col., 2009).

Hemograma completo

En el hemograma estudiaremos los glóbulos rojos, glóbulos blancos, plaquetas, anormalidades de la serie roja y anormalidades de la serie blanca, como las descritas anteriormente. En cuanto a la serie roja evaluaremos el recuento de eritrocitos (n°/mm^3), hematocrito (masa eritrocitaria), hemoglobina e índices hematimétricos, dentro de los cuales tenemos el volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM) y la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM). También realizaremos el recuento y/o estimación plaquetaria y el frotis sanguíneo. Con respecto a la serie blanca realizaremos recuento de leucocitos (n°/mm^3) y fórmula leucocitaria en valores absolutos y relativos (linfocitos, monocitos, eosinófilos, basófilos y neutrófilos) (Willard y Tvedten, 2004).

Los resultados hematológicos proporcionados por el técnico son utilizados por el veterinario como herramientas que, cuando se combinan con la historia, el examen físico y otros hallazgos de laboratorio, ayudan a formar un diagnóstico. Aunque ocasionalmente un análisis de sangre arrojará un diagnóstico definitivo (por ejemplo, parásitos sanguíneos), la mayoría de los resultados de laboratorio se deben ver como piezas grandes o pequeñas de un rompecabezas de diagnóstico que se deben ensamblar.

Los resultados de la hematología también pueden indicar un curso de tratamiento para el animal. Un ejemplo de esto es el uso de la hematología para diferenciar entre la anemia causada por una hemorragia interna y la causada por la depresión de la médula ósea. Otro ejemplo es encontrar organismos infecciosos específicos dentro de las células sanguíneas. Los hallazgos de laboratorio también pueden sugerir otras pruebas beneficiosas, como una biopsia de médula ósea (Gregg y Shannon, 2011).

Hematocrito

El hematocrito se define como el porcentaje del volumen sanguíneo que comprenden los eritrocitos, y se puede determinar por la técnica de microhematocrito o directamente por el equipo automatizado, siendo medido por el volumen de todas los eritrocitos que fluyen por la apertura de la cámara de conteo de glóbulos rojos (Orpheé, 2014).

El examen macroscópico del plasma en el tubo de microhematocrito permite identificar ictericia, hemólisis o lipemia. El microhematocrito también permite detectar enfermedad por gusanos cardíacos en los perros, ya que las microfilarias se concentran en el plasma por encima de la capa flogística. El volumen celular aglomerado se determina centrifugando la sangre anti coagulada en un tubo micro capilar durante 5 minutos y a una velocidad de entre 11.500 y 15.000 rpm para separar las células del plasma. Luego de la centrifugación los glóbulos rojos se mantendrán en el fondo y los glóbulos blancos y las plaquetas aparecen como una delgada línea blanca entre los glóbulos rojos y el

plasma llamada capa flogística. Existen diversos dispositivos para la lectura del microhematocrito. (Willard y Tvedten, 2004).

Hemoglobina

La mayor parte del oxígeno que transporta la sangre (aproximadamente el 98,5%) se encuentra combinado químicamente con esta proteína, la cual está localizada en los eritrocitos, mientras que el resto se transporta en forma disuelta. Teniendo en cuenta lo anterior, la capacidad de la sangre para transportar oxígeno se determina por la cantidad de hemoglobina presente en ella y por las características químicas de la misma (Cunningham, 2003). En el caso de los equipos automatizados, los mismos miden la hemoglobina mediante espectrofotometría a 555nm. La hemoglobina es detectada por la formación de metahemoglobina en el caso de que la solución lítica contenga cianuro; o por la formación de oxihemoglobina en el caso de que la solución lítica no lo contenga (Orpheé, 2014).

Recuentos celulares

Los recuentos celulares se pueden determinar de manera manual usando un hemocitómetro o mediante instrumentos automatizados. Los equipos automatizados se basan en el principio Coulter o principio del recuento por impedancia. El mismo se basa en que las células se encuentran diluidas en una solución electrolítica y en la resistencia eléctrica al pasaje de las mismas a través de una apertura (Willard y Tvedten, 2004). La aplicación de un vacío en uno de los lados de la apertura permite el pasaje celular, y el curso constante está determinado por dos electrodos ubicados a cada lado de la apertura (Orpheé, 2014). La frecuencia del cambio en la impedancia indica el número de células, mientras que la magnitud de este cambio indica el tamaño celular. La aglomeración de plaquetas afecta el conteo en todas las especies y mediante todos los métodos, tanto los manuales como los automatizados. También ayuda la observación en el frotis, en el cual veremos los acúmulos de plaquetas en el caso de que la trombocitopenia sea debida a la aglomeración. Los anticoagulantes citratados reducen la pseudotrombocitopenia (Willard y Tvedten, 2004).

Recuento de glóbulos blancos corregido y recuento absoluto de glóbulos rojos nucleados:

Tanto en el recuento manual como en el automatizado el recuento total de glóbulos blancos incluye a los glóbulos rojos nucleados, los cuales deben ser descontados del recuento leucocitario. La corrección se realiza si se detectan más de 5 glóbulos rojos nucleados cuando se cuentan 100 leucocitos en un recuento diferencial de leucocitos. El recuento absoluto de glóbulos rojos nucleados es la diferencia entre el recuento de células nucleadas y el recuento de glóbulos blancos corregidos (Willard y Tvedten, 2004).

Índices hematimétricos

Dado que la hemoglobina se localiza en el interior de los eritrocitos, es posible establecer relaciones clínicamente útiles entre el contenido de hemoglobina en la sangre, el número de glóbulos rojos o la cantidad de hemoglobina en cada eritrocito, y el hematocrito (Cunningham, 2003).

Los índices hematimétricos describen el tamaño y el contenido de hemoglobina promedio de los glóbulos rojos. Pueden ser calculados a partir de mediciones directas (hematocrito, recuento eritrocitario y hemoglobina) o también ser medido directamente por los contadores automatizados. El VCM indica el tamaño promedio de los glóbulos rojos y se mide en femtolitros (fl). Puede verse aumentado (macrocitosis), normal (normocitosis) o disminuido (microcitosis). La HCM indica el contenido de hemoglobina por glóbulo rojo promedio. La unidad es el picogramo (pg). Este índice resulta redundante con el siguiente (CHCM) por lo que suele ignorarse. La CHCM indica la concentración de hemoglobina en un glóbulo rojo promedio. Su valor se mide en g/dl. Una CHCM normal o disminuida define a los glóbulos rojos como normocrómicos o hipocrómicos respectivamente (Willard y Tvedten, 2004). Un nivel anormalmente bajo de CHCM denota un déficit en la síntesis de hemoglobina (no se sintetiza suficiente hemoglobina para todos los glóbulos rojos), mientras que un nivel anormalmente bajo de la concentración hemoglobina se puede deber a varias causas, como déficit en la síntesis de hemoglobina, de eritrocitos, dilución sanguínea o pérdida de glóbulos rojos (Cunningham, 2003).

Los equipos automatizados obtienen estos datos mediante cálculos. El VCM se obtiene mediante la fórmula $VCM = (HTC \times 10) / RBC$ (Orpheé, 2014). La HCM se determina $HCM = (HGB \times 10) / RBC$, mientras que la CHCM se calcula $CHCM = (HGB \times 100) / HTC$ (Orpheé, 2014).

Evaluación del frotis

En primera instancia debe ser examinado desde la zona más ancha hacia la zona de los flecos con un objetivo de 10 o 20x. Con este aumento podremos chequear la correcta tinción, el grosor general del frotis, las transiciones en el grosor del preparado, la distribución celular y la ubicación de la monocapa. La monocapa se ubica en la mitad distal del preparado junto al comienzo de los flecos. Es la región donde la evaluación celular es más confiable. La examinación de los bordes y los flecos a este aumento puede evidenciar agregación plaquetaria, células atípicas en cuanto a tamaño o células que han fagocitado microorganismos. También nos permite realizar una estimación del hematocrito y de la cantidad de leucocitos, que luego deberá ser chequeada. Para realizar una identificación de los distintos tipos celulares podemos utilizar objetivos de 40 o 50x. La morfología celular es evaluada a aumentos desde 40 a 100x (Cowell y col., 2009).

Posibles artefactos de morfología celular y tinción:

- Eritrocitos crenados:

En los eritrocitos se pueden observar espículas cortas, puntiagudas y uniformemente distanciadas entre sí que protruyen de la membrana celular. Puede ser el resultado de secar la muestra demasiado despacio o de un exceso de anticoagulante en la muestra. Un depósito prolongado de la sangre (mayor a 2 horas), particularmente con EDTA como anticoagulante, puede resultar en la crenación de los eritrocitos (Cowell y col., 2009).



Figura 24. Eritrocitos crenados.
Fuente: Cowell y col. (2009)

- Artefactos relacionados al tiempo:

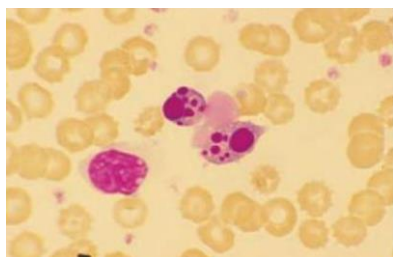


Figura 25. Artefactos relacionados al tiempo. Fuente: Cowell y col. (2009)

Se suelen dar en frotis realizados a partir de muestras de sangre dejadas a temperatura ambiente durante más de 2 a 4 horas y refrigeradas durante más de 12 horas. Los neutrófilos, monocitos, leucocitos inmaduros y neoplásicos se degeneran antes que otros tipos celulares. Los núcleos de las células afectadas se verán condensados y la segmentación de los núcleos de granulocitos será más evidente, con solo finales líneas de cromatina entre los lóbulos. Se hace evidente una basofilia y vacuolización del citoplasma de los neutrófilos

y los núcleos de volverán picnóticos y fragmentados. También podremos observar agregados plaquetarios en este tipo de frotis (Cowell y col., 2009).

- Núcleos pálidos o sin teñir:

Este artefacto sugiere que el tiempo de tinción fue inadecuado o la tinción se encuentra degenerada por el tiempo. En frotis teñidos con tinción de Wright en los que se encuentran núcleos pálidos con glóbulos rojos naranjas o rojos la causa puede ser un lavado excesivo o un bajo pH del buffer. También en el caso de este tipo de tinción si encontramos núcleos pálidos y glóbulos rojos de color marrón a verde la causa puede ser un preparado muy grueso, enjuagado de forma inadecuada o teñido con muy poco buffer o de pH muy alcalino (Cowell y col., 2009).

- Artefactos de secado:

Se da cuando un preparado no es secado lo suficiente antes de teñirlo. Se reconoce como unas zonas perforadas en formas redondas o en media luna o estructuras refráctiles como vacuolas. Se puede ver tinción condensada en los bordes de las células o en el fondo del campo entre las células (Cowell y col., 2009).

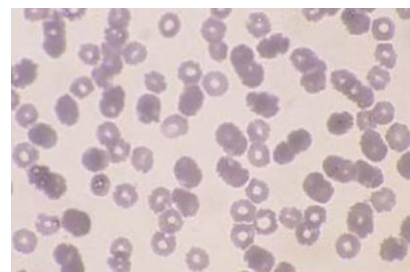


Figura 26. Artefactos de secado. Fuente: Cowell y col. (2009)

- Tinción azul general:

Se puede observar en preparados teñidos con sangre antigua para la cual se utilizó heparina como anticoagulante y/o expuestos a formalina (Cowell y col., 2009).

- Precipitados de tinción:

Se da principalmente en tinciones de Wright. Se suele dar en tinciones guardadas durante mucho tiempo, incubaciones demasiado largas o por lavado insuficiente. En el caso de incubaciones prolongadas veremos acúmulos irregulares y dispersos homogéneamente de tinción. En los otros casos estos acúmulos tendrán forma esférica y estarán dispersos al azar (Cowell y col., 2009).

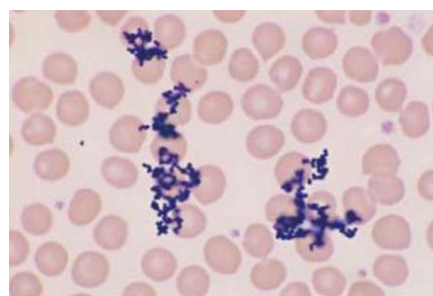


Figura 27. Precipitado de tinción. Fuente: Cowell y col. (2009)

Estados patológicos más frecuentes

Relacionados a los glóbulos rojos:

- Anemia:

La anemia es un estado patológico que puede cursar con disminución del conteo eritrocitario, de la hemoglobina o del hematocrito. Su mayor importancia es una capacidad reducida de la sangre para el transporte de oxígeno a los tejidos. La anemia se desarrolla cuando hay uno o más de los siguientes factores: aumento de la pérdida de eritrocitos debido a la pérdida de sangre, destrucción acelerada de eritrocitos (hemólisis patológica) y/o disminución de la producción efectiva de eritrocitos (Stockham y Scott, 2008). Clasificaciones de anemias: Se pueden clasificar por respuesta medular, basándose principalmente en la presencia o ausencia de reticulocitosis en sangre y también por los índices eritrocitarios. Según la respuesta medular podemos tener una anemia denominada regenerativa, que cursa con reticulocitosis (hasta que haya una reticulocitosis o aumentos progresivos de hematocrito, uno no puede asegurar de que la eritropoyesis será efectiva y la anemia es regenerativa) o una anemia no regenerativa que cursa sin reticulocitosis. En cuanto a los índices eritrocitarios, este sistema de clasificación se basa en los valores del VCM y la CHCM, clasificando las anemias en relación al tamaño (normocítica, macrocítica o microcítica) y a la hemoglobina (normocrómica, hipocrómica e hipercrómica) (Stockham y Scott, 2008).

- Policitemia:

La policitemia, también denominada eritrocitosis, es un aumento en el recuento de glóbulos rojos, el contenido de hemoglobina y/o el volumen en la sangre. Esto haría suponer que la sangre transporte más oxígeno, pero a medida que la masa de glóbulos rojos (PCV) aumenta por encima del 50%, la oxigenación del tejido disminuye rápidamente debido a que ese mayor número de células aumenta la viscosidad de la sangre, llevando a un aumento de la resistencia vascular pulmonar y tisular. Esto produce un flujo sanguíneo lento, reduce el gasto cardíaco y disminuye la oxigenación de los tejidos. La policitemia puede ser absoluta, lo que indica un aumento real en los eritrocitos corporales totales, o relativa, debido a la pérdida de volumen plasmático sin pérdida de eritrocitos. La absoluta se puede clasificar en primaria o secundaria, siendo la primaria muy poco común debido a que se da por una sobreproducción no regulada de glóbulos rojos en la médula ósea con un ligero aumento de leucocitos y plaquetas. A medida que aumenta el volumen de sangre, la presión sanguínea se eleva, y el daño vascular y la formación de coágulos de sangre son comunes. La policitemia secundaria puede desarrollarse en respuesta a la hipoxia y al estímulo de la eritropoyetina. Esto puede ser una respuesta fisiológica, como en el aumento de PCV que se observa comúnmente en animales que viven en la altura. También ocurre como una respuesta patológica a cualquier disminución en el flujo de sangre al riñón, causando una producción excesiva de eritropoyetina. La policitemia relativa es más común y clínicamente significativa. Esto se ve cuando la masa de glóbulos rojos permanece constante, pero la porción de líquido de la sangre disminuye debido a la deshidratación. Cualquier condición asociada con la pérdida excesiva de agua, como vómitos, diarrea, poliuria, sudoración excesiva o privación de agua, puede llevar a una policitemia aparente. Otro mecanismo para este aumento aparente está relacionado con las

grandes reservas de glóbulos rojos que ante situaciones de estrés, excitación o ejercicio, se liberan en el torrente sanguíneo y la PCV puede aumentar en varios porcentajes, aunque el número total de glóbulos rojos en el cuerpo no ha cambiado (Gregg y Shannon, 2011).

Relacionados a los leucocitos:

- Concentraciones anormales de neutrófilos

- Desplazamiento a la izquierda

Normalmente, las células alcanzan la etapa segmentada "adulta" antes de su liberación a la circulación, aunque se libera un pequeño porcentaje de células en banda. Cuando hay una pérdida rápida y una mayor demanda de neutrófilos, como en las infecciones y el daño tisular, el aumento la tasa de liberación de la médula ósea a menudo contendrá un mayor porcentaje de formas inmaduras. Esto se denomina "desplazamiento a la izquierda", que indica la presencia de células a la "izquierda" del neutrófilo maduro en el índice de maduración del neutrófilo de Shilling o en los gráficos de la distribución de neutrófilos (Gregg y Shannon, 2011).

- Desplazamiento a la derecha

Cualquier neutrófilo con más de cinco segmentos nucleares se denomina hipersegmentado y representa un mayor envejecimiento de la célula. La presencia de un número excesivo de estas células en la circulación se denomina cambio a la derecha. Esto se puede ver cuando el neutrófilo ha permanecido en la circulación más tiempo de lo normal debido a la presencia prolongada de corticosteroides por estrés o un régimen de tratamiento. La hipersegmentación también puede verse como un artefacto en muestras de sangre que se han almacenado durante demasiado tiempo (Villiers y Feldman, 2012).

- Neutrofilia

Generalmente es patológico y sucede debido a procesos inflamatorios agudos, pudiendo aparecer por otras causas, como son los efectos (endógenos o exógenos) de los glucocorticoides, procesos inflamatorios crónicos y en algunos estados fisiológicos (estrés, ejercicio y excitación), etc. (Stockham y Scott, 2008).

- Neutropenia

Aparece más comúnmente relacionada a reacciones inflamatorias graves, ya que por la intensidad del proceso, la migración de neutrófilos hacia el tejido inflamado supera la capacidad de liberación de los mismos. También se puede dar por patologías como leucemias o por administración de algunas drogas (tranquilizantes o barbitúricos), llamándose esta última pseudoneutropenia ya que no responde a un proceso patológico (Willard y Tvedten, 2012).

- Linfocitosis

A menudo está presente en animales muy jóvenes, animales que se enfrentan a situaciones de miedo o excitación, o que realizan actividad muscular. Otras causas de la linfocitosis son la estimulación antigénica crónica, especialmente por virus, parásitos sanguíneos y post-inmunización. Se puede observar linfocitosis en la neoplasia linfóide (leucemia, linfosarcoma) (Stockham y Scott, 2008).

- Linfopenia

Existen diversos procesos que pueden cursar con linfopenia, como por ejemplo la inducida por corticosteroides o con el estrés crónico. Los virus que suprimen el sistema inmunitario, la radiación y la quimioterapia, etc. (Ettinger y Feldman, 2007).

- Eosinofilia

Está asociada a la inflamación en una variedad de tejidos ricos en mastocitos y en fenómenos de hipersensibilidad (Weiss y Wardrop, 2010).

Relacionadas a las plaquetas:

- Trombocitopenia

La trombocitopenia es la causa más común de hemorragias en perros, a pesar de que en la mayoría de los casos se da una leve trombocitopenia en la cual no se evidencian signos de sangrado. Existen varias causas de trombocitopenia, entre las cuales encontramos disminución de la producción por causas infecciosas, tóxicas, farmacológicas, neoplasias de médula ósea, etc. y el aumento en la destrucción de las plaquetas causado también por procesos infecciosos, inflamatorios o inmunomediados. También se puede dar un aumento en el consumo de las plaquetas, como es el caso de la coagulación intravascular diseminada. Se debe confirmar que la trombocitopenia es real y no se debe a errores en la toma de muestras, manejo de la sangre o errores laboratoriales. Los signos clínicos varían según el grado de trombocitopenia, pasando desde animales asintomáticos en casos leves de trombocitopenia hasta epistaxis, hematoquecia, melena, hematuria, hematemesis, petequias cutáneas o hemorragias equimóticas en casos severos (Willard y Tvedten, 2012)

- Trombocitosis

La trombocitosis puede ser causada por un desorden primario de la médula ósea o de forma secundaria por una variedad de enfermedades o estados fisiológicos. Generalmente, la trombocitosis se da de forma moderada y asintomática, pero en el caso que sea muy severa, se puede asociar con signos clínicos de sangrado o trombosis (Harvey, 2012).

La podemos clasificar en esencial o reactiva. La esencial es una trombocitosis persistente primaria debido a un raro desorden crónico mieloproliferativo. Existen otros trastornos mieloproliferativos que pueden manifestar trombocitosis, como por ejemplo la policitemia vera, leucemia crónica mielógena y mielofibrosis. La trombocitosis reactiva o secundaria es un incremento transitorio del conteo plaquetario en pacientes

que tienen una condición diferente a un desorden mieloproliferativo. La trombocitosis fisiológica resulta de la movilización de las reservas plaquetarias a nivel esplénico y extra esplénico (principalmente en pulmones), asociada principalmente al ejercicio y/o estrés. La trombocitosis reactiva se puede dar por una pérdida periférica de plaquetas, causada por alteraciones inmunológicas, infecciosas, neoplásicas o traumáticas, lo que va a llevar a un aumento de megacariocitopoyesis. También suele ocurrir en casos de hipoxemia, ya sea de origen cardíaco o pulmonar. En el caso de la trombocitosis esencial existe un aumento del compartimiento de megacariocitos en la médula ósea, así como de su tamaño, lo que va a generar un aumento en el número de plaquetas anormales (Feldman y col., 2000).

El conteo plaquetario puede verse elevado en fragmentación eritrocitaria, fragmentos citoplasmáticos de células nucleadas, lipemia, bacterias, crioglobulinas o dificultades técnicas. Por esto es importante examinar los frotis sanguíneos para determinar si la trombocitosis es real (Harvey, 2012).

Intervalos de Referencia

Importancia de los intervalos de referencia

El concepto de valores de referencia fue introducido en la década del 60' por Grasbeck y Saris para describir variaciones de los distintos componentes de la sangre, en grupos de individuos seleccionados según determinados criterios (Geffré y col., 2009). Los intervalos de referencia son específicos para cada estudio y grupo de referencia. No pueden ser transferidos entre laboratorios sin una validación previa, incluso si los equipos y las técnicas son las mismas (Latimer, 2011). Teóricamente se deberían establecer los intervalos de referencia cada vez que se realiza un cambio de equipamiento o de reactivos (Willard y Tvedten, 2004), pero también se debe tener en cuenta que el proceso para establecer los intervalos de referencia es difícil, costoso y consume mucho tiempo, por lo que es poco realista pretender que todos los laboratorios cuenten con valores de referencia propios cada vez que haya una renovación (Geffré y col., 2009).

El principal objetivo de la existencia de los intervalos de referencia es dar significado a los resultados de laboratorio, debido a que si no sabemos cuáles son los valores "normales" no podremos juzgar el resultado de la prueba para darle su utilidad clínica (Willard y Tvedten, 2004).

Definiciones de interés

Para comprender mejor se realizarán algunas puntualizaciones:

Se denomina individuo de referencia a un animal seleccionado a partir de criterios claramente definidos (Stockham y Scott, 2008).

Acorde a lo mencionado por Aguilar y Vives (2006), la población de referencia estará constituida por un número variable de individuos de referencia y conformado por animales saludables y de estado fisiológico normal.

Así mismo un grupo de referencia, tomando en cuenta la definición de Stockham y Scott (2008), será un número estadísticamente adecuado de individuos de referencia que representarán a la población de referencia, mientras que un valor de referencia es el obtenido a partir de individuos del grupo de referencia para determinada magnitud (Aguilar y Vives, 2006).

La distribución de referencia es la que corresponde a los valores de referencia (Stockham y Scott, 2008), pudiendo ser paramétricas o no paramétricas según su ajuste a la campana de Gauss (Aguilar y Vives, 2006).

Se define intervalo de referencia como el intervalo comprendido entre los dos límites de referencia (incluyendo a los mismos), los cuales corresponden al valor más bajo (límite de referencia inferior) y al valor más alto (límite de referencia superior) del intervalo de referencia (Stockham y Scott, 2008).

Por lo tanto, los intervalos de referencia son calculados mediante métodos estadísticos adecuados, a partir de una población de referencia, de una determinada especie para un determinado test. Por esta razón es que también son nombrados intervalos de referencia basados en la población (Cornell University College of Veterinary Medicine, 2013).

Etapas preanalíticas

En primera instancia se deberán estudiar los factores que pueden generar cambios en los analitos que estudiaremos. Estos factores pueden ser tanto de variabilidad biológica como de interferencias que afectan las medidas de los valores; y nos darán los lineamientos para determinar los criterios de inclusión de los individuos de referencia, la forma de tomar las muestras, y la manera de manipularlas (Friedrichs y col., 2012).

Estado de salud

En un principio se da por sentado que los individuos de referencia son animales "sanos". Esta determinación puede ser complicada ya que no existe un consenso para definir y determinar que un animal es sano, por lo que esta apreciación, además de ser clave, es muy difícil de caracterizar ya que no se cuentan con herramientas para calificar y/o cuantificar el estado de salud de un animal de forma objetiva (Geffre y col., 2009).

Los procedimientos para estimar el estado de salud pueden ser definidos de manera acotada, por ejemplo utilizando la historia clínica y un examen físico, o de forma más amplia incluyendo métodos paraclínicos y otras formas de seguimiento a lo largo del tiempo (Friedrichs y col., 2012).

Edad, sexo y raza

En animales recién nacidos y jóvenes nos encontramos con que los eritrocitos tienen un mayor tamaño y por lo tanto el volumen corpuscular medio es mayor que en los adultos. También, en cachorros podemos encontrar el hematocrito y las proteínas plasmáticas disminuidas y el conteo de reticulocitos elevado, datos que si fuesen evaluados utilizando intervalos de referencia de animales adultos indicarían una anemia regenerativa por pérdida de sangre (Willard y Tvedten, 2004). A su vez

veremos una disminución en la concentración de hemoglobina en cachorros hasta la octava semana de vida (Rosset y col., 2012). En cuanto a las plaquetas, en los animales jóvenes se puede ver un incremento tanto en su número como en su tamaño (Schneider y Mischke, 2016).

En perros gerontes se ha determinado que existe una variabilidad en los parámetros hematológicos, mostrando una tendencia a la baja en cuanto a hematocrito, hemoglobina y conteo de glóbulos rojos; mientras que en el caso del conteo de glóbulos blancos los mismos tienden a incrementar a predominio de los neutrófilos, existiendo una merma en el número de linfocitos y monocitos (Pati y col., 2015).

En el caso de las hembras existen estados fisiológicos como la preñez, la lactación o el mismo ciclo estral que pueden afectar los resultados más allá de si existe o no una patología subyacente (Cornell University College of Veterinary Medicine, 2013).

Existen diferencias determinadas por la raza del individuo, como por ejemplo los caninos de raza san bernardo presentan valores de hematocrito bajos, mientras que los Greyhound presentan valores de hematocrito por encima de lo establecido como normal para otras razas (Willard y Tvedten, 2004).

Toma de muestras, manipulación y transporte

Sin importar la técnica utilizada o el nivel del laboratorio, la obtención de muestras de buena calidad y una correcta manipulación de las mismas es esencial para que los resultados obtenidos sean confiables (Thrall y col., 2012).

Previo a la toma de muestras se deberá identificar al paciente, elegir el material de punción acorde al diámetro del vaso sanguíneo y al tamaño del paciente, elegir el tubo con el anticoagulante apropiado y rotularlo (Orpet y Welsh, 2011). Previo a la punción se realizará la tricotomía de la zona y antisepsia con alcohol etílico al 70%. Se aplicará un torniquete o presión (dependiendo de la vena elegida) para ingurgitar el vaso, el cual debe ser retirado luego de la canalización venosa (Aguilar y Vives, 2006). El EDTA es el anticoagulante recomendado para las muestras hematológicas de rutina ya que tienden a preservar la morfología y el detalle celular (Willard y Tvedten, 2012).

Las causas de error más frecuentes en esta instancia son la utilización de tubos o jeringas sucios, elección errónea o inadecuada proporción de anticoagulante, aplicación por tiempo excesivo del torniquete, perforación de la vena con hematoma e ingreso de factores hísticos que aceleran la coagulación, extracción lenta con coagulación parcial en la jeringa, introducción de la sangre en el tubo bajo presión y con la aguja puesta, agitación excesiva de la sangre en el tubo de recogida con la consiguiente hemólisis, agitación insuficiente en el tubo de recogida produciendo micro coágulos y errores en la identificación del paciente (Aguilar y Vives, 2006).

El escenario ideal comprende que la muestra se procese dentro de una hora. En caso de que no sea posible debemos realizar el frotis y refrigerar la muestra, ya que luego de mantener la muestra en un tubo con EDTA se podría llegar a deteriorar la morfología celular (Thrall y col., 2012). En el caso de que la muestra se mantenga refrigerada, luego de 24 horas se verá un aumento del hematocrito, conteo de glóbulos rojos y una disminución en el conteo plaquetario. Teniendo en cuenta que los analitos se

mantienen dentro de los intervalos de referencia utilizados hasta por 12 horas, podemos tomar este tiempo como el periodo en que la muestra permanece estable en condiciones de refrigeración (Athanasίου y col., 2016).

Interferencias: Hemólisis, lipemia e hiperbilirrubinemia

La hemólisis se refiere a la lisis de los eritrocitos y la liberación de la hemoglobina, pudiéndose dar in vivo o in vitro (Thrall y col., 2012). Esta interferencia puede disminuir conteo de glóbulos rojos, generar varios artefactos en la morfología celular e incrementar la concentración de sustancias que se encuentran presentes dentro de los eritrocitos, las cuales puede interferir en los ensayos espectrofotométricos (Willard y Tvedten, 2012).

También veremos un aumento en la HCM y CHCM ya que hay una disminución en los valores de hematocrito y conteo de glóbulos rojos debida a la hemólisis (Stockham y Scott, 2008).

La lipemia es un hecho macroscópico definido como la turbidez y opacidad blanquecina del suero o plasma, causada principalmente por altas concentraciones de partículas lipoproteicas de gran tamaño (Stockham y Scott, 2008). La presencia de esta alteración puede generar un incremento en los valores de hemoglobina, CHCM, plaquetas y conteo leucocitario. Normalmente es el resultado de falta de ayuno, pero también hay varias patologías que pueden llegar a causarla (Harvey, 2012).

La hiperbilirrubinemia ocurre cuando la producción de bilirrubina supera a la tasa de metabolización de los hepatocitos, o cuando la metabolización por parte de los hepatocitos supera la tasa de excreción en bilis (Stockham y Scott, 2008).

El incremento de la concentración de bilirrubina en sangre resulta en un suero de color amarillento, lo cual puede interferir con los resultados de los ensayos espectrofotométricos (Thrall y col., 2012).

Etapa analítica

Las muestras de referencia deben ser analizadas de la misma manera en las que serán analizadas las de los pacientes (Geffre y col. 2009), usando métodos estrictamente monitoreados y con un adecuado control de calidad. Las condiciones del análisis deben ser bien definidas para reducir la variación que no sea causada por factores intra o inter individuos. Se debe tener en cuenta que existen variaciones del día a día que residen en el cambio de lotes de reactivos o del personal encargado (Friedrichs y col., 2012).

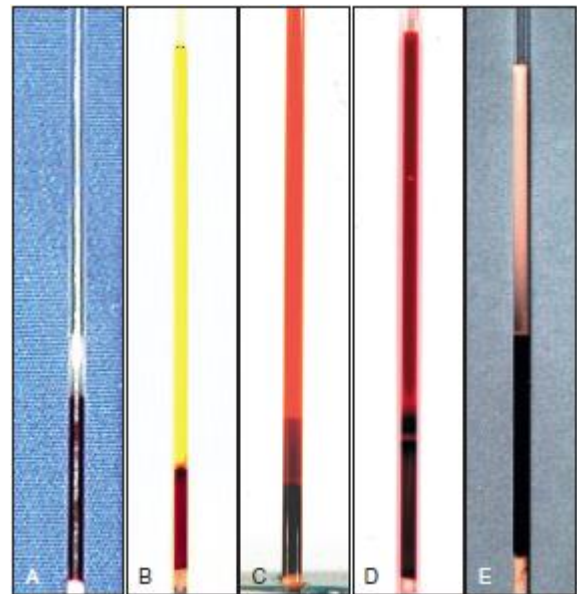


Figura 28. Apariencia de distintos tubos de microhematocrito demostrando (A) Leucocitosis (B) Ictericia (C) y (D) Hemólisis (E) Lipemia. Fuente: Harvey (2012)

En general, los errores analíticos pueden ser disminuidos mediante un correcto entrenamiento del personal y un estricto programa de control de calidad (Willard y Tvedten, 2012).

Base estadística

Los intervalos de referencia son utilizados para describir la dispersión de las variables en individuos sanos, los cuales son descritos como intervalos de referencia basados en la población, incluyendo al 95% de la población sana. En primera instancia es importante la identificación y la eliminación de los valores atípicos (outliers) que no corresponden con la distribución de referencia e incluyen valores extremos (Friedrichs y col., 2012). A parte de la observación del histograma, los métodos más utilizados para el reconocimiento y descarte de los valores atípicos son el Dixon-Reed's y Tukey's (Geffre y col., 2009).

El primer método examina el valor más extremo, teniendo un enfoque conservador, mientras que el segundo puede ser utilizado correctamente en presencia de varios valores atípicos ya que identifica varios valores atípicos tanto en el extremo inferior como el superior, tendiendo a favorecer la eliminación (Friedrich y col., 2012).

Cuando el diagrama de frecuencia de los resultados de las muestras de la población sana es analizado, muchos de los analitos exhibirán una distribución Gaussiana. En estos casos se podrá establecer como grupo de referencia a un mínimo de 40 individuos de referencia, siendo ideal 100 o más. Este intervalo se aproxima al intervalo de confianza de 95%, por lo cual el 95% de los animales sanos muestreados obtendrán valores dentro del intervalo de referencia, estando un 2,5% por encima del límite superior y el restante 2,5% por debajo del límite inferior (Harvey, 2012).

En el caso de que los resultados muestren una distribución no Gaussiana y se pretenda utilizar métodos paramétricos, la información debe ser manipulada para aproximar a una distribución Gaussiana (Harvey, 2012), ya que hay algunos métodos de identificación de valores atípicos y métodos para el cálculo del intervalo que son dependientes de la distribución. La distribución de referencia debe ser determinada examinando el histograma y confirmándola mediante test, que puede ser Anderson-Darling, Kolmogorov-Smirnov o Shapiro-Wilk (Friedrichs y col. 2012).

Los límites de referencia deberían ser calculados por métodos no paramétricos, pero en caso de que la información tenga o pueda ser transformada a una distribución Gaussiana se podrá realizar la estimación paramétrica (Geffre y col., 2009). El método estadístico utilizado será definido principalmente por el número y la distribución de los valores de referencia. Siempre que el tamaño de la muestra lo permita los intervalos de confianza deben ser calculados para los límites, ya que proveen un estimado de la certeza de los mismos (Friedrichs y col., 2012). Cuando los resultados del test presentan una distribución Gaussiana, y solo en este caso, el intervalo de referencia se determina por la media ± 2 desviaciones estándar (Thrall y col., 2012).

OBJETIVOS

Objetivo general

El objetivo general es determinar los intervalos de referencia propios del Laboratorio de Análisis Clínicos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República para hematología en caninos adultos clínicamente sanos.

Objetivos específicos

Determinar los intervalos de referencia para caninos clínicamente sanos, de entre 1 y 10 años de edad, para los siguientes análisis: recuento eritrocitario, hematocrito, concentración de hemoglobina, volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media, concentración de hemoglobina corpuscular media, recuento plaquetario y recuento leucocitario (discriminando neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos en su forma relativa y absoluta).

Determinar si existen diferencias significativas entre las diferentes franjas etarias y géneros.

MATERIALES Y MÉTODOS

Criterios de selección de los individuos de referencia

Los individuos de referencia fueron caninos clínicamente sanos, de entre 1 y 10 años de edad, de ambos sexos y distintas razas; con condiciones corporales 2, 3 y 4 según la escala de 5 puntos de Royal Canin.

Los animales se categorizaron en 3 subgrupos etarios: 31 ♀ y 22 ♂ ≤ a 3 años (adultos jóvenes), 33 ♀ y 29 ♂ > a 3 años hasta < 7 años (adultos), 32 ♀ y 23 ♂ ≥ a 7 años (gerontes).

Criterios de exclusión de los individuos de referencia

Se corroboró con el propietario que el animal realizó el ayuno correspondiente, siendo el mismo de 12 horas de alimentos sólidos. También se consultó si se le han administrado fármacos previamente y si el animal ha estado en situaciones de estrés, siendo importante ya que estos eventos podrían modificar los resultados de ciertos parámetros por lo que no formaron parte del estudio.

Identificación del paciente

Se le asignó un número de ficha y se registró la raza, tamaño, condición corporal, sexo, edad, nombre y datos del propietario.

Toma de muestras

Elección del Anticoagulante/Tubo:

La sal potásica de EDTA es el único anticoagulante quelante (se une a la molécula en 2 o más lugares) de calcio y otros cationes bivalentes como magnesio, cobre y plomo, ligándose al calcio en 6 lugares diferentes (Stockham y Scott, 2008). Se utilizó la sal potásica ya que posee mayor solubilidad en sangre (Aguilar y Vives, 2006).

Tiene como ventaja que respeta la morfología eritrocitaria y leucocitaria, de manera que permite una demora de 2 horas en la realización de la extensión sanguínea después de la extracción. También asegura la conservación de las células sanguíneas durante 24 horas si la muestra se mantiene refrigerada, aparte de inhibir la aglutinación de las plaquetas (Willard y Tvedten, 2004).

Elección del material de punción:

Se eligió el diámetro de la aguja acorde al tamaño del paciente y al diámetro del vaso sanguíneo. Normalmente el diámetro osciló entre los 21 y 23 gauge. La misma se encontró conectada a una jeringa descartable de 5 ml (Orpet y Welsh, 2011).

Punción Venosa

Las venas de elección para la punción venosa serán la yugular, cefálica y safena (Orpet y Welsh, 2011). Previo a la punción se realizó la tricotomía de la zona y antisepsia con alcohol etílico al 70%. Se aplicó un torniquete o presión (dependiendo de la vena elegida) para ingurgitar el vaso, el cual se retiró luego de la canalización venosa (Aguilar y Vives, 2006). Luego de la punción se aplicó presión sobre la zona para evitar la formación de un hematoma. Al transferir la sangre al tubo se extrajo previamente la aguja de la jeringa y, una vez destapado el tubo, se introdujo la punta de la jeringa apoyándola sobre la pared interna del tubo y, mediante una ligera presión sobre el émbolo, se dejó que la sangre resbale con suavidad a lo largo de la superficie interna hasta completar la cantidad estipulada para el tubo en cuestión, culminando el proceso al homogeneizar suavemente la muestra con el objetivo de que la misma entre en contacto con la totalidad del anticoagulante (Orpet y Welsh, 2011).

Transporte de las muestras

Las muestras fueron transportadas hacia el laboratorio, refrigeradas a 4°C y contenidas en un recipiente secundario, a parte del recipiente externo, con el objetivo de que la muestra no entre en contacto directo con los refrigerantes. Fueron acompañadas de la ficha de cada individuo.

Ingreso al laboratorio

Se corroboró que las muestras se encuentren en las condiciones adecuadas, teniendo en cuenta el transporte, interferencias y correcto funcionamiento del anticoagulante. Luego se les dio ingreso al sistema de registro del laboratorio para realizar la tinción (May Grunwald - Giemsa), evaluar el extendido sanguíneo y analizar la muestra en el equipo automatizado Mythic 18 vet.

Realización de la extensión sanguínea

1. Homogeneizamos la sangre anticoagulada con un mínimo de 10 inversiones o agitación suave del mismo durante unos 2 minutos en un homogeneizador.
2. Colocamos una gota de sangre (2 a 5 microlitros) a 1 cm aproximadamente del borde esmerilado del portaobjetos.
3. Colocamos un segundo portaobjetos justo delante de la gota situada en la superficie del primer portaobjetos, formando un ángulo aproximado de 45°. Desplazamos el segundo portaobjetos hacia atrás hasta que alcance la gota de sangre.
4. Si realizamos un ángulo superior a 45° obtendremos una extensión gruesa y corta (útil en pacientes anémicos), mientras que si realizamos un ángulo inferior a 45° la extensión resultará larga y fina (útil en pacientes hemoconcentrados).
5. Esperamos que, por capilaridad, toda la sangre se distribuya de forma uniforme.
6. Deslizamos suavemente y a velocidad moderada un portaobjetos sobre el otro en sentido longitudinal hasta que la gota quede bien extendida sobre la superficie del primer portaobjetos formando una fina película.
7. Si deslizamos a alta velocidad obtendremos una película de mayor grosor, sucediendo lo contrario si se realiza a baja velocidad.
8. Secamos la extensión durante un mínimo de 30 minutos en posición horizontal a temperatura ambiente.
9. Teñimos las extensiones dentro de las siguientes 24 horas ya que el plasma presente en la muestra puede interferir en el proceso de tinción y producir un fondo excesivamente azul (Willard y Tvedten, 2004).

Una buena extensión debe tener entre 3 y 4 cm de longitud y presentar 3 áreas de diferente grosor y con distribución distinta de leucocitos:

- Zona gruesa: Inmediata al punto de partida en el que se encuentra gran cantidad de linfocitos.
- Zona fina: Final de la extensión (flecós). Aquí se verá gran cantidad de granulocitos y monocitos.
- Zona ideal: Situada entre las 2 anteriores, donde existe un reparto equilibrado de células (Willard y Tvedten, 2004).

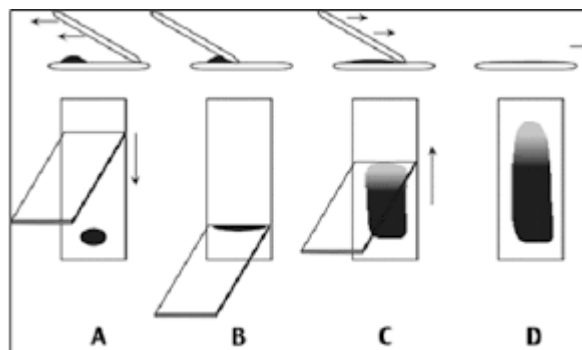


Figura 29. Extensión sanguínea. Fuente: Willard y Tvedten (2004).

Evaluación del Frotis

La lectura del frotis se realizó con microscopio Olympus CX21.

En primera instancia el frotis fue examinado desde la zona más ancha hacia la zona de los flecos con un objetivo de 10 o 20x. Con este aumento pudimos chequear que la tinción fue correcta, el grosor general del frotis, transiciones en el grosor del preparado, la distribución celular y la ubicación de la monocapa. La monocapa se ubica en la mitad distal del preparado junto al comienzo de los flecos. Es la región donde la evaluación celular es más confiable (Cowell y col. 2009). La examinación de los bordes y los flecos a este aumento puede evidenciar agregación plaquetaria, microfilarias, células atípicas en cuanto a tamaño o células que han fagocitado microorganismos. También nos permite realizar una estimación del hematocrito y de la cantidad de leucocitos, que luego deberá ser chequeada (Willard y Tvedten, 2004). Para realizar una identificación de los distintos tipos celulares utilizamos objetivos de 40 o 50x. La morfología celular fue evaluada a aumentos desde 40 a 100x. El conteo celular se realizó utilizando el objetivo de inmersión (Cowell y col. 2009).

Análisis estadístico

La base de datos fue construida a partir de los resultados obtenidos del procesamiento de muestras en el Laboratorio de Análisis Clínicos de Facultad de Veterinaria de UdelaR (n=170), los cuales fueron agrupados por género y edad.

Antes de proceder a estudios de estadística inferencial, se realizó un análisis descriptivo de la muestra para las distintas variables (RBC, HGB, HCT, PLT, VCM, HCM, CHCM, WBC, linfocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos y monocitos en sus formas relativas y absolutas) utilizando el complemento estadístico de Microsoft Excel 2010.

Para la mayoría de los parámetros, los datos obtenidos presentaron una distribución normal, con valores de simetría que oscilan entre -0,5 y 0,5. Sin embargo, existen variables como VCM, CHCM, monocitos y eosinófilos las cuales presentan valores tendiendo a la asimetría, pero al ser de tipo numéricas, continuas y tener un número de muestras mayor a 30 en cada grupo pueden ser tratadas como si tuviesen una distribución normal (Álvarez Cáceres, 2007).

Con el fin de analizar el posible efecto del género sobre los distintos parámetros, realizamos pruebas estadísticas que se adaptan a dos categorías mediante Microsoft Excel 2010. En primera instancia, el Test de Fisher para comparar las varianzas y, en base al resultado obtenido, realizamos el Test de Student que nos permitió determinar si existen diferencias significativas entre los grupos. En cuanto a las categorías etarias, se utilizó el test ANOVA, ya que es el indicado para determinar si existen diferencias significativas entre las tres franjas etarias. Se consideraron valores de $p \leq 0,05$ como diferencias significativas, valores de $p > 0,05$ y $\leq 0,1$ como tendencia y valores de $p > 0,1$ como no significativas.

En base a lo mencionado en cuanto a la distribución, los intervalos de referencia fueron calculados como la media \pm dos desvíos estándar utilizando el complemento estadístico de Microsoft Excel 2010.

RESULTADOS

Influencia del género y la edad en los distintos analitos

Eritrograma y plaquetas

Recuento eritrocitario

El recuento de glóbulos rojos en nuestro estudio no alcanzó la significancia estadística en cuanto a las influencias del género, presentando las hembras una media (\pm desvío estándar) de $7,7 \pm 1,2 \times 10^{12}/l$ y los machos un valor de $7,4 \pm 1,4 \times 10^{12}/l$ ($P=0,11$). La edad no alcanzó significancia estadística para el RBC. Los individuos menores o iguales a 3 años presentaron valores de $7,6 \pm 1,3 \times 10^{12}/l$, los mayores a 3 años y menores a 7 años $7,7 \pm 1,3 \times 10^{12}/l$, y los mayores o iguales a siete años $7,3 \pm 1,0 \times 10^{12}/l$ ($P=0,12$).

Hemoglobina

No se encontró un efecto significativo del género y la edad sobre los niveles de hemoglobina sanguínea. Las hembras presentaron valores de $17,94 \pm 2,44$ g/dl y los machos $17,51 \pm 2,41$ g/dl ($P=0,25$), mientras que los individuos menores o iguales a 3 años presentaron una concentración de hemoglobina de $17,76 \pm 2,71$ g/dl, los animales mayores a 3 años y menores a 7 años $18,1 \pm 2,45$ g/dl, y los animales mayores o iguales a 7 años $17,35 \pm 2,07$ g/dl ($P=0,24$).

Hematocrito

Los animales de 7 años o más presentaron un HCT (%) más alto que los animales de 3 años o menos y a los animales mayores a 3 años y menores a 7 (50.4 ± 7.1 , 53.3 ± 8.8 y 54.3 ± 9.2 , respectivamente, $P < 0.05$).

Volumen corpuscular medio

No se encontró un efecto significativo del género sobre el volumen corpuscular medio ($P=0,97$). La edad no alcanzó diferencias estadísticamente significativas, presentando los individuos menores o iguales a 3 años un volumen corpuscular medio de $70,47 \pm 4,49$ fl, los mayores a 3 años y menores a 7 años $70,24 \pm 4,97$ fl y los individuos mayores o iguales a 7 años $69,23 \pm 4,57$ fl ($P=0,24$).

Hemoglobina corpuscular media

No se encontró un efecto significativo del género y la edad sobre los valores de la hemoglobina corpuscular media ($P=0,53$ y $P=0,62$).

Concentración de hemoglobina corpuscular media

El género no alcanzó diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la CHCM, presentando las hembras un valor de $33,74 \pm 3,06\text{g/dl}$ y los machos una media de $34,07 \pm 2,71\text{g/dl}$ ($P=0,46$). La edad mostró una tendencia a presentar diferencias para éste parámetro, el cual es superior en animales gerontes con respecto a adultos y adultos jóvenes. La CHCM de los animales menores a tres años fue $33,48 \pm 2,67\text{g/dl}$, la de los animales mayores a 3 años y menores a 7 años $33,59 \pm 2,97\text{g/dl}$ y la de los animales mayores o iguales a 7 años $34,59 \pm 2,98\text{g/dl}$ ($P=0,08$).

Recuento plaquetario

No se encontró un efecto significativo del género y la edad sobre el conteo plaquetario. Las hembras presentaron una media de $240,14 \pm 89,83 \times 10^9/l$ y los machos una media de $261,13 \pm 96,54 \times 10^9/l$ ($P=0,18$), mientras que los individuos menores o iguales a 3 años presentaron una media de $229,64 \pm 84,25 \times 10^9/l$, los animales mayores a 3 años y menores a 7 años $241,27 \pm 84,15 \times 10^9/l$, y los animales mayores o iguales a 7 años $278,43 \pm 105,52 \times 10^9/l$ ($P=0,17$).

Leucograma

Recuento leucocitario

Los animales mayores a tres años de edad y menores a siete años de edad presentaron valores más bajos de recuento leucocitario con respecto a las categorías uno y tres. El WBC de la categoría dos se encontró en $10114 \pm 2900/\mu\text{l}$, mientras que los conteos de las categorías uno y tres se ubicaron en $11353 \pm 2408/\mu\text{l}$ y $11359 \pm 3405/\mu\text{l}$, respectivamente ($P=0,03$). No se encontró un efecto significativo del género en el WBC, presentando las hembras un valor de $11084,9 \pm 3266,45/\mu\text{l}$ y los machos $10668,24 \pm 2566,61/\mu\text{l}$ ($P=0,35$).

Neutrófilos absolutos

Los animales mayores a 3 años de edad y menores a 7 años de edad presentaron valores más bajos de neutrófilos en su forma absoluta con respecto a las categorías uno y tres. El recuento de neutrófilos de la categoría dos se encontró en $6505,25 \pm 2377,63/\mu\text{l}$, mientras que los conteos de las categorías uno y tres se ubicaron en $7455,42 \pm 1847,91/\mu\text{l}$ y $7550,05 \pm 2758,36/\mu\text{l}$, respectivamente ($P=0,03$). No se encontró un efecto significativo del género en los neutrófilos absolutos, presentando las hembras un valor de $7196,11 \pm 2464,32/\mu\text{l}$ y los machos $7066,07 \pm 2326,57/\mu\text{l}$ ($P=0,73$).

Linfocitos absolutos

No se encontró un efecto significativo del género y la edad sobre el conteo linfocitario. Las hembras presentaron una media de $2863,51 \pm 1304,92 /\mu\text{l}$ y los machos una media de $2584,15 \pm 1024,97/\mu\text{l}$ ($P=0,12$), mientras que los individuos menores o iguales a 3 años presentaron una media de $2931,73 \pm 1300,62 /\mu\text{l}$, los animales mayores a 3 años y menores a 7 años $2574,94 \pm 1228,66 /\mu\text{l}$, y los animales mayores o iguales a 7 años $2747,20 \pm 1036,64 /\mu\text{l}$ ($P=0,28$).

Monocitos absolutos

La edad tuvo efecto significativo sobre los monocitos en su forma absoluta, mostrando un aumento a medida que incrementa la edad. Los animales menores o iguales a 3 años valores de $307,14 \pm 239,17/\mu\text{l}$, los comprendidos entre 3 y 7 años $343,74 \pm 223,03/\mu\text{l}$ y los mayores o iguales a 7 años $433,21 \pm 337,33/\mu\text{l}$ ($P=0,04$). No se encontró un efecto estadísticamente significativo relacionado al género. Las hembras presentaron valores de $375,71 \pm 309,56/\mu\text{l}$ y los machos $342,55 \pm 217,80/\mu\text{l}$ ($P=0,41$).

Eosinófilos absolutos

No se encontró un efecto significativo del género y la edad sobre los valores de los eosinófilos en su forma absoluta ($P=0,53$ y $P=0,62$, respectivamente).

Neutrófilos relativos

No se encontró un efecto significativo del género sobre los neutrófilos en su forma relativa ($P=0,72$). La edad no alcanzó diferencias estadísticamente significativas, presentando los individuos menores o iguales a 3 años un valor de $65,72 \pm 9,14\%$, los mayores a 3 años y menores a 7 años $63,61 \pm 10,26\%$ y los individuos mayores o iguales a 7 años $65,93 \pm 9,22\%$ ($P=0,35$).

Linfocitos relativos

No se encontró un efecto significativo de la edad sobre los linfocitos en su forma relativa ($P=0,75$). El género no alcanzó diferencias estadísticamente significativas, presentando hembras un valor de $26,13 \pm 8,95\%$ y los machos $24,90 \pm 9,65\%$ ($P=0,39$).

Monocitos relativos

La edad tuvo efecto significativo sobre los monocitos en su forma relativa, alcanzando los animales menores o iguales a 3 años valores de $2,68 \pm 1,99\%$, los comprendidos entre 3 y 7 años $3,50 \pm 2,22\%$ y los mayores o iguales a 7 años $3,80 \pm 2,62\%$ ($P=0,03$). El género mostró una tendencia a presentar diferencias para éste parámetro, teniendo las hembras un valor de $3,41 \pm 2,50\%$ y los machos un valor de $3,26 \pm 2,09\%$ ($P=0,055$).

Eosinófilos relativos

No se encontró un efecto significativo del género sobre los eosinófilos en su forma relativa ($P=0,77$). La edad no alcanzó diferencias estadísticamente significativas, presentando los individuos menores o iguales a 3 años un valor de $6,00 \pm 3,93\%$, los mayores a 3 años y menores a 7 años $6,53 \pm 4,91\%$ y los individuos mayores o iguales a 7 años $5,42 \pm 5,08\%$ ($P=0,44$).

Intervalos de referencia del 95% para hematología:

Según los resultados obtenidos en el apartado anterior, los intervalos de referencia se presentarán discriminados únicamente por categoría etaria, ya que el género no alcanzó diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los analitos.

Los intervalos de referencia del total de la muestra para eritrograma y plaquetas se resumen en la tabla 2:

Tabla 2. Intervalos de referencia de eritrograma y plaquetas para el total de la muestra

	n	LIR	LSR
RBC x10¹² (n°/L)	170	5.16	9.94
Hgb (g/dl)	170	12.90	22.61
HTC (%)	170	35.61	69.85
VCM (fl)	170	60.60	79.40
HCM (pg)	170	19.58	27.81
CHCM (g/dl)	170	28.07	39.70
PLT x10⁹ (n°/L)	139	63	436

LIR = Límite inferior de referencia, LSR= Límite superior de referencia, RBC = Eritrocitos, Hgb= Hemoglobina, HTC = Hematocrito, VCM = Volumen corpuscular medio, HCM = Hemoglobina corpuscular media, CHCM = Concentración de hemoglobina corpuscular media, PLT = Plaquetas

Los intervalos de referencia del total de la muestra para leucograma se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 3. Intervalos de referencia de leucograma para el total de la muestra

	n	LIR	LSR
WBC (n°/μl)	170	4942	16865
Neutrófilos (n°/μl)	170	2341	11938
Linfocitos (n°/μl)	170	350	5134
Monocitos (n°/μl)	170	0	908
Eosinófilos (n°/μl)	170	0	1850
Basófilos (n°/μl)	170	0	0
Neutrófilos (%)	170	45.83	84.20
Linfocitos (%)	170	7.08	44.10
Monocitos (%)	170	0	7.99
Eosinófilos (%)	170	0	15.37
Basófilos (%)	170	0	0

LIR = Límite inferior de referencia, LSR= Límite superior de referencia, WBC = Leucocitos.

Los intervalos de referencia divididos por categoría etaria para eritrograma y plaquetas se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 4. Intervalos de referencia de eritrograma dividido por categoría etaria

	Categoría 1			Categoría 2			Categoría 3		
	n	LIR	LSR	n	LIR	LSR	n	LIR	LSR
RBC x10¹² (n°/L)	53	5.05	10.13	62	5.15	10.34	55	5.39	9.19
Hgb (g/dl)	53	12.35	23.18	62	13.19	23.01	55	13.21	21.48
HTC (%)	53	35.65	70.90	62	35.91	72.70	55	36.23	64.60
VCM (fl)	53	61.49	79.44	62	60.33	80.23	55	60.09	78.38
HCM (pg)	53	19.25	28.04	62	19.77	27.32	55	19.68	28.14
CHCM (g/dl)	53	28.14	38.82	62	27.65	39.54	55	28.64	40.55
PLT x10⁹ (n°/L)	44	61	398	51	73	410	44	67	489

LIR = Límite inferior de referencia, LSR= Límite superior de referencia, RBC = Eritrocitos, Hgb = Hemoglobina, HTC = Hematocrito, VCM = Volumen corpuscular medio, HCM = Hemoglobina corpuscular media, CHCM = Concentración de hemoglobina corpuscular media, PLT = Plaquetas. Categoría 1 = 1 a 3 años inclusive, Categoría 2 = mayor a 3 y menor a 7 años, Categoría 3 = 7 a 10 años inclusive.

Los intervalos de referencia divididos por categoría etaria para leucograma se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 5. Intervalos de referencia de leucograma divididos por categoría etaria

	Categoría 1			Categoría 2			Categoría 3		
	n	LIR	LSR	n	LIR	LSR	n	LIR	LSR
WBC (n°/μl)	53	6536	16170	62	4314	15916	55	4549	18171
Neutrófilos (n°/μl)	53	3760	11151	62	1750	11261	55	2033	13067
Linfocitos (n°/μl)	53	330	5533	62	118	5032	55	674	4820
Monocitos (n°/μl)	53	0	785	62	0	790	55	0	1108
Eosinófilos (n°/μl)	53	0	1551	62	0	1843	55	0	2102
Basófilos (n°/μl)	53	0	0	62	0	0	55	0	0
Neutrófilos (%)	53	47.44	83.99	62	43.09	84.14	55	47.49	84.37
Linfocitos (%)	53	7.58	43.63	62	5.29	47.10	55	8.71	41.07
Monocitos (%)	53	0	6.66	62	0	7.93	55	0	9.04
Eosinófilos (%)	53	0	13.85	62	0	16.36	55	0	15.58
Basófilos (%)	53	0	0	62	0	0	55	0	0

LIR = Límite inferior de referencia, LSR= Límite superior de referencia, WBC = Leucocitos. Categoría 1 = 1 a 3 años inclusive, Categoría 2 = mayor a 3 y menor a 7 años, Categoría 3 = 7 a 10 años inclusive.

En la tabla 6 se presentan los resultados obtenidos en nuestra tesis comparados con los intervalos de referencia utilizados por nuestro laboratorio en la actualidad.

Tabla 6. Intervalos de referencia utilizados actualmente comparados con los intervalos de referencia obtenidos

	Bibliografía Internacional		Resultados Obtenidos	
	LIR	LSR	LIR	LSR
RBC x10¹² (n°/L)	5.5	8.5	5.16	9.94
Hgb (g/dl)	12	18	12.90	22.61
HTC (%)	37	55	35.61	69.85
VCM (fl)	60	77	60.60	79.40
HCM (pg)	19.2	24.5	19.58	27.81
CHCM (g/dl)	31.9	35.9	28.07	39.70
PLT x10⁹ (n°/L)	200	900	63	436
WBC (n°/μl)	6000	17000	4942	16865
Neutrófilos (n°/μl)	3000	11400	2341	11938
Linfocitos (n°/μl)	1000	4800	350	5134
Monocitos (n°/μl)	150	1350	0	908
Eosinófilos (n°/μl)	100	750	0	1850
Basófilos (n°/μl)	0	0	0	0
Neutrófilos (%)	60	77	45.83	84.20
Linfocitos (%)	12	30	7.08	44.10
Monocitos (%)	3	10	0	7.99
Eosinófilos (%)	2	10	0	15.37
Basófilos (%)	0	0	0	0

LIR = Límite inferior de referencia, LSR= Límite superior de referencia, RBC = Eritrocitos, Hgb = Hemoglobina, HTC = Hematocrito, VCM = Volumen corpuscular medio, HCM = Hemoglobina corpuscular media, CHCM = Concentración de hemoglobina corpuscular media, PLT = Plaquetas, WBC = Leucocitos.

DISCUSIÓN

Este trabajo permitió generar los intervalos de referencia para hematología propios del Laboratorio de Análisis Clínicos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República, y a su vez crea la posibilidad de contrastar los hallazgos con los valores presentados por la bibliografía internacional para hematología canina.

La presente tesis ha aportado información respecto a cómo puede afectar la edad del individuo en las mediciones de distintos analitos en caninos clínicamente sanos.

Edad

Eritrograma y plaquetas

El aumento de la edad se asoció con una disminución del HTC, siendo la media de los animales gerontes (mayores o iguales a 7 años) inferior a la obtenida para los animales adultos jóvenes (menores o iguales a 3 años) y para los animales adultos (mayores a 3 y menores a 7 años). Este hallazgo concuerda con lo descrito por Pati y col. (2015) y por Jangsangthong y col. (2012). Si bien, era de esperar que el RBC y la Hgb presentaran una tendencia similar, por su relación con el HTC, en nuestro estudio estos analitos no mostraron diferencias significativas, pero debemos tener en cuenta que el valor de p obtenido para el recuento eritrocitario está al límite de mostrar tendencia a presentar diferencias ($P=0,12$). Jangsangthong y col. (2012) describen una disminución del recuento eritrocitario y la hemoglobina en la categoría etaria de cinco a diez años con respecto a las anteriores; en este sentido, Pati y col. (2015) encontraron una disminución en el RBC y hemoglobina en animales gerontes, atribuyéndolo a una disminución en la eritropoyesis y en la función de los eritrocitos causada por depresión de la médula ósea, enfermedad renal crónica (disminuyendo la producción de eritropoyetina) y/o deficiencia de cobre (mineral esencial en la estructura de la hemoglobina). Existen otros trabajos que encontraron diferencias significativas en cuanto al conteo eritrocitario y a la concentración de hemoglobina, pero estas diferencias fueron encontradas principalmente durante los primeros meses de vida, normalizando sus valores sobre el año (Khan y col., 2011; Rizzi y col., 2010). Teniendo en cuenta que los individuos de referencia en nuestra tesis son mayores a un año, se puede atribuir a este factor las diferencias con ambos trabajos.

En cuanto a los índices hematimétricos, no encontramos diferencias estadísticamente significativas para el VCM y tampoco para la HCM, sin embargo la CHCM mostró una tendencia a presentar diferencias entre grupos ($P=0,08$), obteniendo los animales mayores o iguales a 7 años, valores superiores que los animales más jóvenes. Considerando que la fórmula para calcular este analito es $CHCM = (HGB \times 100) / HTC$ (Orpheé, 2014) y los animales mayores o iguales a 7 años presentaron un HTC disminuido con respecto a las otras categorías etarias, estos resultados eran esperables.

Schneider y Mischke (2016) y Brenten y col. (2016) señalan que existen diferencias entre edades con respecto al conteo plaquetario, al contrario de los resultados obtenidos en este estudio. Estas diferencias se ven en su mayoría en los primeros meses de vida, lo que explicaría la discordancia entre trabajos, teniendo en cuenta nuevamente los criterios de inclusión de los individuos de referencia. Por otro lado, hay autores que concuerdan con nuestros resultados para el recuento plaquetario (Jangsangthong y col., 2012; Pati y col., 2015, Weiss y Wardrop, 2010). Si tenemos en

cuenta los valores obtenidos en nuestra tesis para este parámetro, notamos que existe una tendencia al aumento del recuento plaquetario con la edad, concordando con el trabajo realizado por Bossa-Miranda y col. (2012) en el cual realizaron subgrupos etarios de uno a tres años inclusive y de tres a seis años, notando un valor mayor en el segundo grupo con respecto al primero.

Leucograma

En nuestra tesis encontramos diferencias en el conteo absoluto de leucocitos y neutrófilos entre los animales adultos con respecto a los restantes grupos. Los valores obtenidos para ambas variables fueron inferiores en adultos en comparación con las otras dos categorías estudiadas. El mayor recuento encontrado en animales jóvenes concuerda con lo reportado por otros autores en la bibliografía internacional (Brenten y col. 2016; Jangsangthong y col., 2012; Olayemi e Ighagbon, 2009). En este mismo sentido, en los trabajos presentados por Cornell University College of Veterinary Medicine (2013) y Villiers y Blackwood (2012) relacionan el mayor recuento de leucocitos y neutrófilos en animales jóvenes a la edad de maduración, estando ésta influenciada por la talla canina y pudiendo alcanzar los valores normales recién a los dos años de edad. En base a lo señalado anteriormente, si bien en nuestro estudio no se utilizaron animales menores a un año, la diferencia entre los adultos jóvenes y los adultos puede ser explicada por la inclusión de animales que todavía no alcanzaron la madurez. El mayor recuento de leucocitos y neutrófilos en los animales gerontes observado en nuestra tesis concuerda con los resultados obtenidos por la bibliografía internacional (Pati y col., 2015; Ranjan y col., 2010). A pesar de que es una premisa que los individuos seleccionados sean sanos, este criterio es difícil de objetivar, ya que pueden haber varias maneras de definir a un animal como “sano” (Geffré y col. (2009). En este sentido, en nuestra tesis definimos como animal sano al que se encuentra en un correcto estado clínico, pudiendo existir patologías que cursan de forma subclínica, como ser nefropatías hepatopatías o patologías articulares, las cuales nos pueden generar un proceso inflamatorio llevando a un aumento de los valores de estos parámetros. Se debe tener en cuenta que en la etapa preanalítica existen factores como el estrés y el miedo que pueden provocar una liberación de cortisol en sangre, lo que provocará un cambio directo en la serie blanca (leucograma de estrés), que concuerda con el aumento de glóbulos blancos y neutrófilos (Harvey, 2012; Weiss y Wardrop 2010).

En nuestra tesis obtuvimos un aumento en el número de monocitos a medida que los animales envejecen, lo cual concuerda con lo descrito por Goldston y Hoskins (1995). Este aumento puede ser explicado por la mayor frecuencia de procesos inflamatorios crónicos que cursan de manera subclínica en animales gerontes (Nelson y Couto, 2010). En contraposición a nuestros resultados, Pati y col. (2015) y Jangsangthong y col. (2012), describen una disminución en los monocitos con el avance de la edad.

Género

Concordando con lo descrito por en trabajos publicados en la bibliografía internacional (Bossa-Miranda y col., 2012; Brenten y col (2016); Khan y col., 2011; Olayemi e Ighagbon, 2009; Tesser y col., 2016), no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre géneros para los parámetros hematológicos estudiados en esta tesis. Sin embargo, Jangsangthong y col. (2012) encontraron que los valores de la CHCM son mayores en hembras que en machos; mientras que Choi y col. (2011)

describen que en perros de la raza Beagle el conteo plaquetario es ligeramente mayor en hembras que en machos, aunque se debe tener en cuenta que en este trabajo de los individuos involucrados tuvieron entre 5 y 9 meses de edad. Schneider y Mischke (2016) encontraron diferencias entre géneros para el recuento plaquetario, obteniendo valores superiores en hembras que en machos.

Comparación con los intervalos de referencia publicados en la bibliografía internacional

Como se describe en la tabla 3, de nuestro estudio se desprende que para el caso del RBC, la hemoglobina, el hematocrito, los índices hematimétricos y el número de eosinófilos, el límite superior de referencia obtenido (LSRO) se encuentra por encima del límite superior de referencia publicado por la bibliografía internacional (LSRI), incluyendo a los intervalos de referencia utilizados en nuestro laboratorio. En lo que refiere al recuento plaquetario, el límite superior de referencia publicado en la bibliografía internacional varía considerablemente entre autores (Cornell University College of Veterinary Medicine, 2013; Cowell y col., 2009; Harvey, 2012; Lumsden y col., 1978; Weiss y Wardrop, 2010; Willard y Tvedten, 2004).

Eritrograma y plaquetas

En relación a las diferencias observadas para el RBC, la Hgb y el HTC, podrían explicarse por la influencia de factores fisiológicos (miedo, estrés, estado reproductivo, ejercicio, etc.), enfermedades subclínicas y el estado nutricional (Weiss y Wardrop, 2010). Considerando que los índices hematimétricos son calculados a partir de los valores de RBC, la HGB y el HTC, es de esperarse que sus LSRO también se vean alterados.

El LSRO del conteo plaquetario se encuentra muy por debajo del LSRI (435.520/ μ l vs 900.000/ μ l respectivamente). Por otro lado, Feldman y col. (2000) proponen un LSR de 500.000/ μ l, valor que se encuentra cercano al LSRO. El LIRO se encuentra por debajo de lo estipulado por la bibliografía internacional en general. Estas diferencias encontradas al comparar con la bibliografía internacional pueden ser explicadas por los métodos utilizados por la Universidad de Cornell para la formulación de los intervalos de referencia, los cuales desconocemos, y por factores como la edad, sexo y raza de los individuos de referencia, tamaño y características de la muestra, procedimientos estadísticos y factores pre-analíticos y/o analíticos.

Leucograma

La diferencia encontrada en el valor del LSRO de los eosinófilos podría deberse a factores ambientales, ya que los animales no se encuentran en un ambiente controlado, pudiendo estar expuestos a alérgenos y cargas parasitarias que aumenten esta población celular (Weiss y Wardrop, 2010).

Si bien cada laboratorio debería generar sus propios valores de referencia, no siempre es posible y se utilizan aquellos reportados en la bibliografía internacional. En nuestro país, hasta el momento los laboratorios veterinarios no contaban con rangos de referencia propios para hematología. Este trabajo permitió que el Laboratorio de Análisis Clínicos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República cuente con intervalos de referencia específicos para cada uno de los analitos mencionados anteriormente.

CONCLUSIONES

El uso de intervalos de referencia específicos de nuestro laboratorio constituye una herramienta indispensable para una correcta evaluación de los resultados hematológicos, un diagnóstico, evolución y pronóstico certero de cualquier patología sistémica; principalmente debido a la existencia de diferencias en distintos intervalos de referencia con respecto a la bibliografía internacional.

En este sentido, los intervalos de referencia específicos de edad permiten evaluar por separado las distintas categorías etarias y tener en cuenta las variaciones que existieron entre ellas para los distintos analitos. El hematocrito disminuye con la edad, siendo menor en animales gerontes que en animales adultos y adultos jóvenes. El conteo leucocitario y los neutrófilos en su forma absoluta se ven disminuidos en los adultos con respecto a las categorías adultos jóvenes y gerontes. Los monocitos se ven incrementados en individuos gerontes con respecto a las categorías restantes.

No correspondió generar intervalos de referencia específicos de género ya que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilar, J.L.; Vives J.L. (2006) Manual de Técnicas de Laboratorio en Hematología. 3ª Ed. Barcelona, Elsevier, 741 p.
2. Álvarez Cáceres, R. (2007) Estadística aplicada a las ciencias de la salud. Madrid, Díaz de Santos, 996 p.
3. Athanasiou, LV; Polizopoulou, Z; Kalafati, MR; Ntararas, G; Kontos, V (2016) Effects of pre-analytical handling on selected canine hematological parameters evaluated by automatic analyzer. *Veterinary Research Forum*; 7(4):281-285.
4. Bossa-Miranda, MA., Microb; Valencia-Celis, VC., Carvajal-Giraldo, BA., Ríos-Osorio, LA. (2012) Automated hemogram values for healthy dogs aged 1 to 6 years attended at the Veterinary Hospital - Universidad de Antioquia (Colombia), 2002-2009. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 25(3):409-416.
5. Brenten, T; Morris, PJ.; Salt, C; Raila, J; Kohn, B.; Schweigert, FJ.; Zentek, J. (2016) Age-associated and breed-associated variations in haematological and biochemical variables in young Labrador retriever and miniature schnauzer dogs. *Veterinary Record Open* 3:e000166. doi:10.1136/vetreco-2015-000166.
6. Choi, S; Hwang, J; Kim, I; Hwang, D; Kang, H. (2011) Basic data on the hematology, serum biochemistry, urology, and organ weights of beagle dogs. *Laboratory Animal Research* 27(4):283-291.
7. Cornell University College of Veterinary Medicine. Reference Intervals. Disponible en: <http://eclinpath.com/test-basics/reference-intervals/>. Fecha de consulta: 15 de abril de 2019.
8. Couto, C.G; Nelson, R.W. (2010) Medicina Interna de Pequeños Animales. 4ª Ed. Barcelona, Elsevier, 1467 p.
9. Cowell, RL.; Tyler, RD; Meinkoth, JH; DeNicola, DB. (2009) Diagnóstico citológico y hematológico del perro y el gato. 3ª Ed. Barcelona, Elsevier, 474 p.
10. Cunningham, JG. (2003) Fisiología veterinaria. 3ª Ed. Madrid, Elsevier, 575 p.
11. Ettinger, SJ; Feldman, EC. (2007) Tratado de Medicina Interna Veterinaria. 6ª Ed. Barcelona, Elsevier, 2116 p.
12. Feldman, BV; Zinkl, JG; Jain, NC (2000) Schalm's Veterinary Hematology. 5ª Ed. Baltimore, Lippincot Williams & Wilkins, 1344 p.
13. Friedrichs, KR; Harr, KE; Freeman, KP; Szladovits, B; Walton, RM; Barnhart, KF; Blanco-Chavez, J. (2012) ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. *Veterinary Clinical Pathology*; 41:439-607.

14. Geffre, A; Friedrichs, K; Harr, K; Concordet, D; Trumel, C; Braun, JP. (2009) Reference values: a review. *Veterinary Clinical Pathology*; 38:288-298.
15. Goldston, RT.; Hoskins, JD. (1995) *Geriatría & Gerontología del Perro y el Gato*. 1ª Ed. Junín, Intermedica, 491 p.
16. Gregg, LV; Shannon LS. (2011) *Hematology techniques & concepts*. 2ª Ed. Iowa, Wiley-Blackwell, 200 p.
17. Harvey, JW. (2012) *Veterinary Hematology A Diagnostic Guide and Color Atlas*. Missouri, Elsevier, 384 p.
18. Jangsangthong, A; Suwanachat, P; Jaykum, P; Buamas, S; Kaewkongjan, W; Buranasinsup, S. (2012) Effect of sex, age and strain on hematological and blood clinical chemistry in healthy canine. *Journal of Applied Animal Science* 5(3):25-38.
19. Johns, JL; Christopher, ML. (2012) Extramedullary Hematopoiesis: A New Look at the Underlying Stem Cell Niche, Theories of Development, and Occurrence in Animals. *Veterinary Pathology Journal*; 49:508-543.
20. Khan, S.A.; Epstein J.H.; Olival, K.J.; Hassan, M.M; Hossain, M.B.; Rahman, K.B.M.A; Elahi, M.F.; Mamun, M.A.; Haider, N; Yasin, G.; Desmond, J. (2011). Hematology and serum chemistry reference values of stray dogs in Bangladesh. *Open Veterinary Journal*; 1:13-20.
21. Latimer, KS. (2011) *Duncan & Prasse's Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Pathology*. Chichester, Wiley-Blackwell, 524 p.
22. Lumsden, J.H.; Mullen, K.; McSherry, B.J. (1978) Canine Hematology and Biochemistry Reference Values. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 43(2):125-131.
23. Olayemi, FO., Ighagbon FO. (2009) Haematology of the German Shepherd dog in a humid tropical environment. *Comparative Clinical Pathology*, 20:61-64.
24. Orpet, H.; Welsh, P. (2011) *Handbook of Veterinary Nursing.*; 2ª Ed. Chichester, Wiley-Blackwell, 392 p.
25. Orpheé S.A. *Mythic™ 18 Vet Operator's Manual*. Orpheé S.A. 2014.
26. Pati, S; Panda, SK; Acharya, AP; Senapati, S; Behera, M; Behera, SS. (2015) Evaluation of geriatric changes in dogs. *Veterinary World*; 8(3):273-278.
27. Ranjan, R.; Zahid, UN.; Gupta, DK.; Bansal BK, Dua K. (2010) An epidemiological study of periodontal diseases in dogs-a clinical study on 103 canine patients. *Intas Polivet*, 11(2): 274-277.

28. Reagan, WJ; Irizarry Rovira, AR; DeNicola, DB. (2008) Veterinary Hematology Atlas of Common Domestic and Non-Domestic Species. 2ª Ed. Iowa, Wiley-Blackwell, 128.
29. Rizzi, T. E., Meinkoth, J. H., Clinkenbeard, K. D. (2006) Normal haematology of the dog. Em: Weiss DJ, Wardrop KJ. Schalm's Veterinary Haematology. 6th Ed. Ames, Blackwell, 799–810 p.
30. Rosset, E; Rannou, B; Casseleux, G; Chalvet-Monfray, K; Buff, S (2012) Age-related changes in biochemical and hematologic variables in Borzoi and Beagle puppies from birth to 8 weeks. Veterinary Clinical Pathology; 41(2):272-282.
31. Schneider, L.; Mischke, R. (2016) Platelet variables in healthy dogs: reference intervals and influence of age, breed and sex. Comparative Clinical Pathology; 25:1097–1106.
32. Stockham, SL.; Scott, MA (2008) Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology. 2ª Ed. Iowa, Blackwell Publishing, 928 p.
33. Tesser, S; Cavagnolli, NI.; Torriani, I; Dalpicolli Rodrigues, A. (2016) Perfil hematológico de caes e gatos na cidade de Bento Goncalves, Rio Grande do Sul, Brasil. Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR, 19(1):47-51.
34. Thrall, MA; Weiser, G; Allison, RW; Campbell, TW (2012) Veterinary Hematology and Clinical Chemistry. 2ª Ed. Iowa, Wiley-Blackwell, 776 p.
35. Villiers, E.; Blackwood, L. (2012) Diagnóstico de Laboratorio en pequeños animales. 2ª Ed. Barcelona, Ediciones S, 657 p.
36. Weiss, J. Wardrop, J. (2010) Schalm's Veterinary Hematology.; 6ª Ed. Iowa, Wiley-Blackwell, 1206 p.
37. Willard, MD; Tvedten, H. (2004) Diagnóstico Clinicopatológico Práctico en los Pequeños Animales. 4ª Ed. Missouri, Intermédica, 434 p.
38. Willard, MD; Tvedten, H. (2012) Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods. 5ª Ed. Missouri, Elsevier, 402 p.

ANEXOS

Anexo 1: Ficha de identificación del paciente.



NUMERO DE REGISTRO		
NOMBRE		
SEXO		
RAZA		
TAMAÑO		
CONDICION CORPORAL		
EDAD		MESES - AÑOS
OBSERVACIONES		

Figura 30. Ficha de identificación

Anexo 2: Escala de Condición Corporal.



Figura 31. Escala de condición corporal