
TRABAJO PRÁCTICO N° 3
FISIOLOGÍA LEUCOCITARIA

1. OBJETIVOS

1. A. OBJETIVOS GENERALES

- Conocer el procedimiento para el Recuento de Leucocitos en cámara de Neubauer.
- Desarrollar destreza en la realización de frotis sanguíneo, coloración (May Gründwald Giemsa) e identificación de células.

1. B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aprender a realizar el recuento de leucocitos en cámara de Neubauer.
- Identificar e informar leucocitos en una fórmula leucocitaria relativa.
- Relacionar la concentración de Leucocitos con la Fórmula Leucocitaria Relativa.
- Interpretar los datos obtenidos y relacionarlos con los procesos fisiológicos.

2. CONOCIMIENTOS NECESARIOS

- Leucopoyesis.
- Fisiología Leucocitaria. Fagocitosis. Mecanismos microbicidas dependientes e independientes de oxígeno.
- Variaciones fisiológicas de la concentración de leucocitos.
- Variación fisiológica de la fórmula leucocitaria relativa.

3. DESARROLLO DEL TRABAJO PRÁCTICO

FUNDAMENTOS

Recuento de leucocitos en Cámara de Neubauer

El recuento de Leucocitos es la técnica que permite calcular el número de glóbulos blancos que se encuentran en un volumen de sangre. En unidades tradicionales se expresa como el número de leucocitos por mm^3 . El recuento orienta sobre la presencia o ausencia de enfermedad. Los leucocitos protegen al organismo de las infecciones y colaboran en la respuesta inmunológica. Si se desarrolla una infección, los leucocitos atacan y destruyen las bacterias, hongos o virus causantes de la infección.

También se utiliza para controlar tratamientos antiinfecciosos y/o antiinflamatorios y, entre otros estudios, para el control de tratamientos quimioterápicos o con radiación.

Algunos medicamentos que pueden alterar los resultados: Indometacina. Drogas antitiroideas. Antiinflamatorios no esteroideos. Anticonvulsivantes. Fentoína. Antibióticos y quimioterápicos.

Algunos factores que pueden alterar los resultados: estrés, ejercicio y digestión.

El recuento absoluto de glóbulos blancos sufre modificaciones fisiológicas en los extremos de la vida: recién nacido y anciano, y también en el tercer trimestre del embarazo.

En el recién nacido a término el número absoluto de neutrófilos se eleva en las primeras 24 hs. de vida, en promedio aumenta de 8.000 a un máximo de $13.000/\text{mm}^3$, y luego cae a $4.000/\text{mm}^3$ a las 72 hs de vida, manteniéndose en este nivel a través de los siguientes 7 días y a los 14 días adquiere la fórmula normal de un niño.

En los ancianos se puede observar un aumento en el número de neutrófilos y además los neutrófilos presentan defectos cualitativos como disminución de los mecanismos microbicidas dependientes de oxígeno, fagocitosis defectuosa y deterioro de la migración hacia los sitios de estrés.

Frotis coloreado de sangre

Es un examen que permite diferenciar y cuantificar los distintos tipos de leucocitos que se hallan circulando en sangre como así también la observación de las plaquetas. La observación microscópica de frotis coloreados permite reconocer los elementos morfológicamente normales y en distinto estado de maduración y aquellos que presentan formas alteradas.

MATERIALES

Recuento de leucocitos en cámara de Neubauer

- Sangre anticoagulada con EDTA
- Líquido de Türk: (ácido acético glacial 2% V/V, con 5 gotas de azul de metileno 0,3% P/V cada 100 ml de solución).
- Cámara de Neubauer.
- Microscopio.

Frotis coloreado de sangre

- Sangre anticoagulada con EDTA
- Portaobjetos – Extensores.
- Colorantes: May Gründwald – Giemsa
- Aceite de inmersión
- Microscopio

Limpieza (por comisión): Detergente – Rejilla – alcohol gel – Cepillo para lavar tubos de hemólisis – Rollos de cocina.

TÉCNICA

Recuento de leucocitos en cámara de Neubauer

Realizar una dilución 1/20 de sangre entera anticoagulada con EDTA, en solución o líquido de Türk. Este último, destruye los eritrocitos por hemólisis y deja intactos a los glóbulos blancos. Proporción sugerida: 20 μ l de sangre y 0,38 ml de Türk.

Luego de cargar la sangre en la pipeta, limpie su exterior con papel absorbente y verifique que la sangre continúa en el mismo nivel. Cuando descargue la sangre sobre el líquido diluyente, enjuague la pipeta aspirando y expulsando este líquido tres veces.

Monte la laminilla de vidrio (cubrecámara) en la cámara para recuento (Fig.1), presionándola cuidadosamente para colocarla en su sitio. Cuando ha sido montada adecuadamente, entre las dos superficies del vidrio se observan unas bandas de color, llamadas anillos de Newton.

Con la micropipeta cargue la cámara por capilaridad para el recuento. Evite llenarla más allá del área cuadriculada (Fig. 2). Si el líquido se derramar en el canal que se encuentra entre las dos cámaras, o a los lados, la operación se deberá repetir (quite y limpie la laminilla de vidrio y la cámara).



Fig. 1

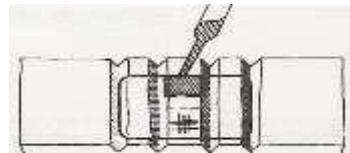


Fig. 2

Deje reposar la cámara sobre la mesa de trabajo durante 3 minutos a fin de que las células se asienten y sedimenten por su mayor densidad con respecto al solvente.

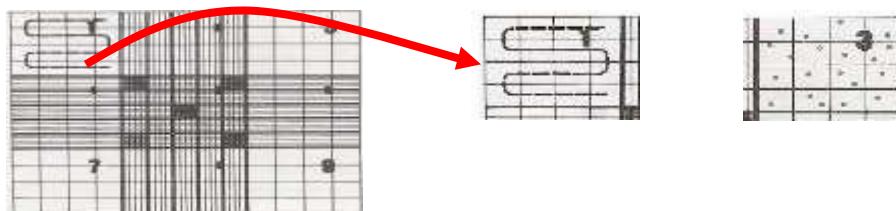
Coloque la cámara en la platina del microscopio y obsérvela con el objetivo de 10X.

Cámara de Neubauer:

- 1 área de la cámara = 9 mm²
- 2 profundidad de la cámara = 0,1 mm

Contar las células en un área de 4 mm² utilizando los cuadros numerados 1, 3, 7 y 9 (cuadrantes secundarios) como se indica en la figura. Incluir en este recuento las células que se observen sobre las líneas de dos lados de cada cuadro revisados, por ej.: incluya a los leucocitos sobre las líneas de arriba y a

la derecha, y no cuente los que están sobre las líneas de abajo y a la izquierda; así evita contar dos veces a la misma célula.



Cálculo del número de células en un litro de sangre:

Células por mm^3 = células contadas $\times F$ dilución $\times F$ volumen = células contadas $\times 20 \times 10/4 (0,4\text{mm}^3)$

Células por mm^3 = Células contadas $\times 50$

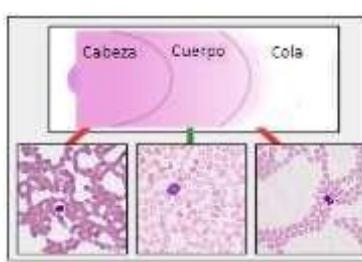
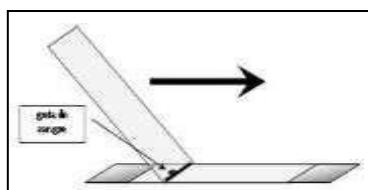
Cada uno de los cuatro cuadrados primarios tiene un área de 1 mm^2 ; como se cuentan 4 de ellos el área mide 4 mm^2 . La profundidad de la cámara es de $0,1 \text{ mm}$; en consecuencia, el volumen en que se cuentan las células es $0,4 \text{ mm}^3$. De este modo la división por 4 y la multiplicación por 10, dará el número de leucocitos que haya en 1 mm^3 de sangre diluida. Ya que la dilución es $1/20$, la multiplicación por 20 dará el número de células en 1 mm^3 de sangre sin diluir.

Valor de referencia para hombres y mujeres adultos: 4.500 a 11.000 células/ mm^3

En el caso de encontrar leucocitosis, se realizará una nueva dilución de $1/40$; y en el caso de leucopenia, de $1/10$. Esto permitirá contar las células de manera más clara y aumentar la precisión.

Frotis coloreado de sangre

Se realizará el extendido, colocando una gota de sangre directamente de la jeringa sobre un portaobjetos limpio y seco; luego con un extensor apoyado sobre la gota, en un ángulo de 45° se procede a realizar la extensión de sangre. Dejarlo secar a temperatura ambiente y una vez seco el portaobjetos se lo puede



identificar escribiendo sobre el extendido con lápiz ($Nº$ de orden o el apellido del paciente). Identificados los extendidos se procede a su coloración. Un frotis bien confeccionado debe constar de una zona inicial gruesa (cabeza), una zona central (cuerpo) de mediano espesor (zona ideal para la lectura) y la zona final (cola) delgada que termina en un borde convexo en forma de serrucho.

(cabeza), una zona central (cuerpo) de mediano espesor (zona ideal para la lectura) y la zona final (cola) delgada que termina en un borde convexo en forma de serrucho.



El recuento diferencial se realiza preferentemente en el cuerpo del extendido, contando 100 leucocitos siguiendo un desplazamiento como indica la figura. Se elige un campo microscópico, se registra los diferentes tipos de leucocitos observados y se pasa al siguiente hasta completar los 100 elementos. Los resultados obtenidos se expresan en porcentaje.

- **Coloración de May- Grundwald- Giemsa.**

1. Sobre el extendido seco e identificado colocar una película del colorante May- Grümwald (que cubra toda la superficie del portaobjetos) durante 3 minutos. Fase de fijación.
2. Sin volcar agregar igual cantidad de agua corriente, dejando por el lapso de 2 minutos una película de agua y colorante. Luego lavar con agua.
3. Colocar por último una solución acuosa de Giemsa a razón de 2 gotas del colorante por cada ml de agua, durante 15 minutos. Lavar con agua corriente.
4. Escurrir y dejar secar.
5. Observar al microscopio, con un objetivo de 40X y luego con uno de 100X utilizando aceite de inmersión.

Posibles causas de error en la confección del extendido

- Portaobjetos sucios, húmedos, viejos.
- Excesiva cantidad de sangre, extensiones gruesas.
- No esperar a que se seque completamente.
- Prolongado tiempo de tinción.
- Lavado inadecuado.

Valores de Referencia de fórmula leucocitaria relativa para un adulto

LEUCOCITOS	Valor Porcentual (%)	Valor absoluto /mm ³
Neutrófilo Segmentado	55 – 65	3000 - 5000
Neutrófilo en Cayado	0 - 3	0 -150
Eosinófilo	0.5 – 4	20 - 350
Basófilo	0 – 0.5	10 - 60
Linfocitos	25 – 35	1500 - 4000
Monolitos	4 – 8	100 - 500

Fuente: Manual de Técnicas Básicas para un Laboratorio de Salud –

OPS Nº2 2007

Morfología:

Neutrófilos: El citoplasma es abundante y se tiñe de color rosado. En él hay numerosas granulaciones neutrófilas que se tiñen de color rosa-azulado y son de pequeño tamaño.

El núcleo se tiñe intensamente de azul, es irregular y polilobulado, variando el número de lóbulos de 2 a 5.

Eosinófilos: se llaman así por el color rojo con el que aparecen al microscopio por una tinción con eosina. La estructura de estas células se parece a la de los neutrófilos segmentados, pero con algunas diferencias. El núcleo se tiñe algo menos y tiene 2 lóbulos, normalmente dispuestos en forma de anteojos. Las granulaciones citoplasmáticas son de mayor tamaño, redondo u ovalado.

Basófilos: Poseen un núcleo con forma de S. Contienen gránulos gruesos Basófilos de color azul-violeta intenso que se ubican sobre el núcleo cubriendolo por completo.

Linfocitos: Tienen un núcleo celular único. El núcleo del linfocito se tiñe de color azul oscuro. El citoplasma es escaso y se tiñe de un color azul pálido.

Monocito: Es la célula de mayor tamaño de la sangre normal. Contiene un único núcleo, generalmente excéntrico y con forma redondeada, lobulada o en forma de herradura. Se tiñe de un azul más débil que los linfocitos. El citoplasma es abundante y se tiñe de un color azul grisáceo conteniendo a veces gránulos finos de color entre rojo y púrpura, menos diferenciados y pequeños que los gránulos de los neutrófilos.

Experiencia

Recuento de Leucocitos en cámara de Neubauer

- Preparar la dilución para el recuento de leucocitos según técnica indicada previamente.
- Observar al microscopio con aumento de 10X.

Frotis de sangre coloreado

- Realizar un frotis sanguíneo según técnica indicada previamente.
- Colorear el frotis realizado.
- Observar al microscopio con aumento de 100x (objetivo).

Informe y Resultados

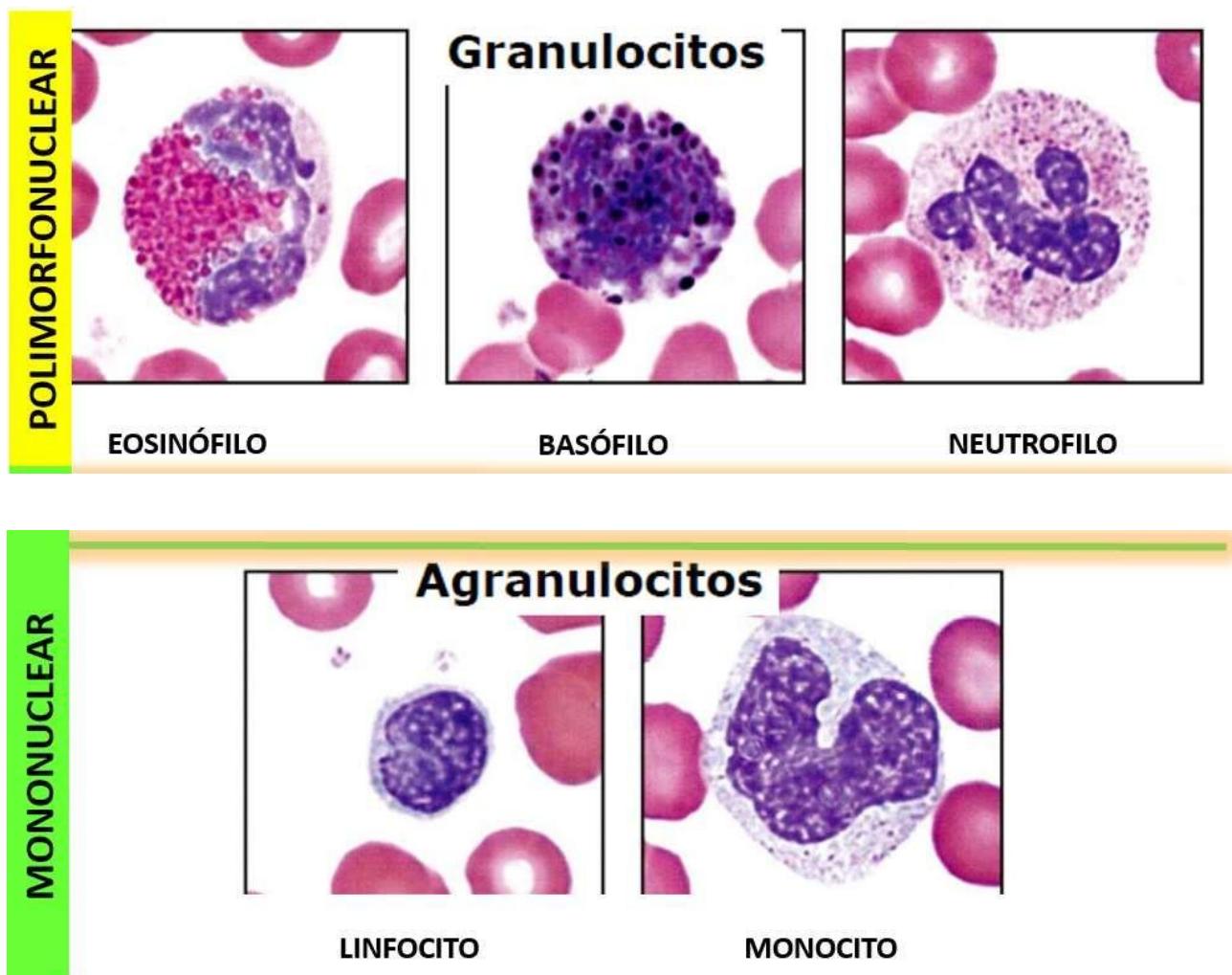
Recuento de Leucocitos en cámara de Neubauer

- Calcular el recuento absoluto de leucocitos en muestra procesada.
- Indicar si los valores hallados están dentro del intervalo de referencia para la edad y el sexo.
- Interpretar los valores del Recuento Leucocitario del caso proporcionado en el presente TP.

Frotis de sangre coloreado

- Realizar el recuento diferencial de leucocitos en el frotis coloreado y calcular su concentración absoluta teniendo en cuenta el valor hallado de la concentración de leucocitos en el recuento en cámara de Neubauer.
- Interpretar los valores de la Fórmula Leucocitaria Relativa del caso proporcionado en el presente TP y calcular los correspondientes Valores Absolutos para cada tipo de leucocito.

MORFOLOGÍA DE LAS CÉLULAS A SER OBSERVADAS Y DIFERENCIADAS



Conclusiones

En base a los conocimientos previos, indique cómo espera encontrar un recuento absoluto de leucocitos y su fórmula relativa en los siguientes casos:

- a. Infestación por larva migrans;
- b. Embarazo tercer trimestre;
- c. Inmediatamente luego de hacer un ejercicio físico intenso.

Justifique cada respuesta.

4. GUÍA DE ESTUDIO

1. Explique en qué condiciones debe estar el paciente para la toma de muestra.
2. ¿Cuál es la muestra?
3. ¿Utiliza necesariamente algún anticoagulante siempre en el recuento de blancos? En caso afirmativo, ¿cuál?
4. ¿Utiliza anticoagulante en la muestra para realizar el frotis? Explique brevemente.
5. Enumere por lo menos dos objetivos del presente trabajo práctico.
6. ¿Cuáles son las posibles causas de error analítico que puede cometer en el desarrollo de las técnicas del trabajo práctico del día?
7. Teniendo en cuenta los valores de referencia citados en ambos casos, haga un listado de las variaciones fisiológicas y por lo menos dos fisiopatológicas en cada determinación y explique brevemente.

5. BIBLIOGRAFÍA

Textos de cabecera

- ✓ Cingolani, H. E.; Houssay, A. B. y Col: **Fisiología Humana de Houssay**. 7^a Edición. Editorial El Ateneo. Buenos Aires. 2006.
- ✓ Dvorkin, M. A.; Cardinali, D. P.; Iermoli, R. H.: **Best & Taylor. Bases Fisiológicas de la Práctica Médica**. 14^a Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 2010.
- ✓ Guyton, A. C.: **Tratado de Fisiología Médica**. 11^a Edición. Editorial Elsevier. Madrid. 2006.
- ✓ Koeppen, B.M.; Stanton, B.A.: **Berne & Levy. Fisiología**. 6^a Edición. Editorial Elsevier Mosby. Madrid, 2009.
- ✓ Silvernagl, S; Despopoulos, A.: **Fisiología. Texto y Atlas**. 7^a Edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid, 2009.
- ✓ Silverthorn, D. U.: **Fisiología Humana. Un Enfoque Integrado**; 4^a Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 2007.

-
- ✓ Coppo, J. A.: ***Fisiología Comparada del Medio Interno***. 2^a Edición corregida y aumentada. Editorial Universidad Católica de Salta. Departamento Editorial EUCASA. Salta. 2008.

Textos de consulta

- ✓ Henry, J.B.: El ***Laboratorio en el diagnóstico clínico: homenaje a Todd-Stanford & Davidsohn***. Tomos I y II. Editorial Marbán. 2005.
- ✓ Cristaldo, Daniel Osmar: ***"Pruebas que conforman el hemograma"***. Curso "PARÁMETROS DEL HEMOGRAMA. UTILIDAD E INTERPRETACIÓN". Resolución 811/08 C.D. Corrientes, 16 de octubre de 2008.
- ✓ Gauna Pereira, María del Carmen: ***"Bioseguridad en el laboratorio"***. Curso "PARÁMETROS DEL HEMOGRAMA. UTILIDAD E INTERPRETACIÓN". Resolución 811/08 C.D. Corrientes, 16 de octubre de 2008.
- ✓ Ióvine, E.; Atilio Selva, A.: ***El Laboratorio en la Clínica***. 3^a Edición. Editorial Médica Panamericana. 1985.
- ✓ Levy-Lambert: ***Manual de técnicas básicas para un laboratorio de salud***. Organización Panamericana de la Salud. 1983.