UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Química Farmacéutico Biológica

Área Farmacéutica

Manual de Laboratorio de Bioquímica Celular y de los Tejidos II

Quinto Semestre

- **Fecha de Aprobación**: 04 de septiembre de 2024
- **Fecha de Vigencia**: 04 de septiembre de 2027

Tabla de Contenido

Introducción al Manual de Prácticas de Bioquímica Celular y de los Tejidos II 4
Objetivos del Laboratorio de Bioquímica Celular y de los Tejidos II 7
Reglamento Académico para el Laboratorio de Bioquímica Celular y de Tejidos II 8
Capítulo I: DISPOSICIONES GENERALES 8
Capítulo II: CON RELACIÓN AL ALUMNO 9
Capítulo III: CON RELACIÓN A LA HIGIENE Y SEGURIDAD 10
Manejo de Residuos 11
1. Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos (RPBI) 11
2. Residuos Químicos 13
Criterios de Evaluación 15
1a. Anatomía de un mamífero (*Rattus norvegicus*) 18
1b Aparato reproductor femenino y masculino 30
2. Observación de epitelios 44
3. Gametogénesis 51
4. Análisis del semen (Espermatobioscopia) 58
5. Endocrinología del embarazo 71
6. Morfología y fisiología de los eritrocitos 81
7. Morfología y fisiología de los leucocitos 91
8. Catabolismo de la hemoglobina 101
9. Hemostasia 111
10. Sistemas, grupos y compatibilidad sanguínea 123
11. Tutorial para el uso del programa de registro de eventos fisiológicos 134
12. Tono muscular 144
13. Trabajo y fatiga muscular 153

14. Electrocardiograma 163

15a. Propiedades del músculo liso 176

15b. Propiedades del músculo liso (uso del simulador) 193

16. Frecuencia respiratoria 204

17a. Metabolismo y función de los triglicéridos 220

17b. Metabolismo y función del colesterol 228

18. Metabolismo y función de la glucosa 236

19. Depuración renal 246

20. Características de la orina 251

21. Diuresis 262

Anexos 275

Anexo 3. Empleo de Sujetos de Experimentación No Humanos 276

Anexo 4: Toma de muestra sanguínea y Anticoagulantes 278

Anexo 5: Realización de Frotis Sanguíneo (extendido sanguíneo) 287

AUTORES PRIMERA VERSIÓN

- Dra. Rosalinda Escalante Pliego
- Mtra. Rosalba Barrera Martínez
- QFB. Claudia Martínez Carrera
- QFB. Enrique Escalera Zúñiga
- QFB. Carina Gutiérrez Iglesias
- M en C. Claudia Fabiola Martínez Rodríguez
- Dra. Juana Rosado Pérez

AUTORES SEGUNDA VERSIÓN

- Dra. Taide Laurita Arista Ugalde
- Mtra. Rosalba Barrera Martínez
- Dra. María del Rosario Benítez Velázquez
- Mtro. Enrique Escalera Zuñiga
- Mtra. Carina Gutiérrez Iglesias
- M en C. Claudia Fabiola Martínez Rodríguez
- Dra. Gabriela Rosas Gavilán

REVISORES SEGUNDA VERSIÓN

- M.C. Carolina Sauer Ramírez
- Q.F.B. Jesús Arroyo Rosales
- M. en C. Luis Antonio Martínez Jiménez

Introducción al Manual de Prácticas de Bioquímica Celular y de los Tejidos II

El presente Manual de Prácticas constituye una herramienta fundamental en la formación académica del Químico Farmacéutico Biólogo (Q.F.B.), proporcionando una experiencia práctica complementaria a los conocimientos teóricos. A través de la realización de diversas prácticas, los estudiantes se adentrarán en áreas específicas de la profesión, tales como la Fisiología de la Reproducción, Sistema Muscular, Hematología y Química Clínica, consolidando su comprensión y dominio de los principios científicos y técnicos que sustentan estas áreas.

La importancia de este manual radica en su enfoque práctico y experiencial, permitiendo a los futuros Q.F.B. desarrollar habilidades esenciales para su desempeño profesional. Las prácticas descritas en este documento fomentan el pensamiento crítico, la resolución de problemas, la capacidad de análisis y la destreza manual, aspectos indispensables para el éxito en el campo de la Química Farmacéutica y Biológica.

- En el ámbito de la ***Fisiología de la Reproducción***, las prácticas se enfocarán en el estudio de los procesos biológicos que intervienen en la reproducción humana, desde la anatomía y fisiología del sistema reproductor hasta los mecanismos moleculares que regulan la fertilidad. Estas experiencias permitirán a los estudiantes comprender la complejidad de este sistema y su relevancia en la salud humana.
- En cuanto a la ***Fisiología Muscular***, las prácticas se centrarán en el análisis de la estructura y función del tejido muscular, incluyendo los diferentes tipos de músculos, sus mecanismos de contracción y su papel en el movimiento corporal. Estas actividades brindarán a los estudiantes una comprensión profunda de la fisiología muscular y su importancia en el mantenimiento de la salud y el bienestar.

- Las prácticas de ***Hematología*** abordarán el estudio de la sangre y sus componentes, incluyendo las células sanguíneas, el plasma y las proteínas plasmáticas. Los estudiantes analizarán la composición y función de cada elemento sanguíneo, así como las técnicas de diagnóstico. Esta experiencia les permitirá desarrollar habilidades esenciales para el análisis de muestras sanguíneas necesarias para el diagnóstico de patologías hematológicas.
- Finalmente, las prácticas de ***Química Clínica*** se enfocarán en el análisis de diversos componentes químicos presentes en la sangre y otros fluidos corporales, como glucosa, colesterol, urea y creatinina. Estas actividades brindarán a los estudiantes la oportunidad de practicar técnicas analíticas y desarrollar habilidades interpretativas para el diagnóstico y seguimiento de enfermedades, así como la integración o correlación entre diversos estudios clínicos.

En conjunto, las prácticas descritas en este Manual de Laboratorio representan una experiencia invaluable para la formación del futuro Q.F.B., permitiéndoles desarrollar las habilidades, conocimientos y aptitudes necesarias para desempeñarse con éxito en el ámbito profesional. A través de la práctica activa y la aplicación de los principios científicos, los estudiantes tendrán una formación como profesionales competentes y capaces de contribuir al bienestar de la sociedad.

Una innovación significativa de esta versión del manual es el ofrecer, en las prácticas que tradicionalmente se utilizan animales, una práctica alternativa, con lo cual se cumplen los objetivos de aprendizaje además de la normatividad vigente, así como los diversos códigos éticos, pues este tipo de actividades permite un aprendizaje más activo, dentro de estas herramientas digitales se encuentran las proporcionadas por la Biblioteca Digital UNAM y la Universidad de Strathclyde Glasgow, Reino Unido.

Además de lo anterior se tiene un nuevo formato de ***Consentimiento Informado*** que incluye los elementos mínimos y necesarios para actividades de laboratorio de docencia.

Por último, también se cuenta con una aplicación para poder realizar los conteos, diferencial y algunos cálculos para el bloque de Fisiología de la sangre.

Los formatos para informe, la aplicación y demás recursos podrán ser consultados y descargados desde el blog que sirve de apoyo a este manual cuya dirección es:

https://blogceta.zaragoza.unam.mx/manualbct2/

Objetivos del Laboratorio de Bioquímica Celular y de los Tejidos II

Objetivo General

- Fortalecer la formación académica y profesional del Químico Farmacéutico Biólogo (Q.F.B.) mediante la realización de prácticas experimentales en las áreas de Fisiología de la Reproducción, Muscular, Hematología y Química Clínica, fomentando el desarrollo de habilidades, conocimientos y aptitudes esenciales para su desempeño profesional.

Objetivos Específicos

1. Desarrollar habilidades experimentales en el manejo de técnicas para la obtención de muestras biológicas y equipos de laboratorio para el análisis, así como su manejo y disposición final.
2. Aplicar los conocimientos teóricos de Fisiología de la Reproducción, Muscular, Hematología y Química Clínica en la resolución de problemas y la toma de decisiones en escenarios simulados.
3. Interpretar resultados de análisis de laboratorio y correlacionarlos con indicadores de salud y enfermedad.
4. Fomentar el trabajo colaborativo, la comunicación efectiva y la ética profesional en el desarrollo de actividades prácticas.

Reglamento Académico para el Laboratorio de Bioquímica Celular y de Tejidos II

La puntualidad es: deber de caballeros, cortesía de reyes, hábito de gente de valor y costumbre de personas bien educadas.

Capítulo I: DISPOSICIONES GENERALES

Artículo 1. El presente reglamento deberá ser respetado y aplicado por alumnos y profesores **del Laboratorio de Bioquímica Celular y de los Tejidos II** (BCT-II).

Artículo 2. Queda prohibido comer, beber, fumar y correr dentro del laboratorio.

Artículo 3. Durante la estancia en el laboratorio deberán poner en modo de silencio sus teléfonos celulares y apagar cualquier reproductor de música.

Artículo 4. Queda prohibida la entrada a alumnos ajenos al grupo.

Artículo 5. Las gavetas asignadas al inicio del semestre deberán ser desocupadas a más tardar en la fecha del último examen de bloques.

Artículo 6. Se debe propiciar un ambiente de respeto y cordialidad mutuo entre alumnos y profesores.

Artículo 7. Al hacer uso de estuches (kits) comerciales es necesario conocer el fundamento de las técnicas, las precauciones propias de la marca y la técnica, valores de referencia, fecha de caducidad y lote.

Artículo 8. Como en cualquier otro laboratorio, se hace necesario llevar a cabo las buenas prácticas de laboratorio.

Artículo 9. El desarrollo de toda actividad dentro del laboratorio deberá efectuarse bajo la asesoría, supervisión y capacitación por parte del o los profesores responsables.

Capítulo II: CON RELACIÓN AL ALUMNO

Artículo 10. Es obligatorio como mínimo el 80% de asistencia para tener derecho a examen.

Artículo 11. La tolerancia para el ingreso al laboratorio será máxima de 15 minutos de acuerdo al horario de clase, después de los cuales no se contará como asistencia.

Artículo 12. Es responsabilidad leer y realizar las actividades del manual.

Artículo 13. Revisar el material, equipo e instrumento solicitado para que en caso de desperfecto o anomalía reportarlo.

Artículo 14. Mantener limpio su lugar de trabajo, por lo que debe realizar limpieza antes y después de cada práctica.

Artículo 15. Debe contar con el material necesario por práctica.

Artículo 16. Debe salir del laboratorio en cuanto el profesor indique que la práctica ha concluido (*habiendo entregado previamente el equipo y material*)

Artículo 17. En caso de padecer alguna enfermedad infectocontagiosa grave, alergia y/o estar en tratamiento médico, deberá indicarlo en la coordinación y a los profesores del laboratorio.

Artículo 18. Debe mostrar una conducta de respeto para sus compañeros, profesores y demás comunidad universitaria, así como una actitud colaborativa.

Artículo 19. En las prácticas donde sea necesario el uso de animales para la experimentación, éstos deben ser tratados y manipulados *con respeto*, atendiendo a las pautas establecidas por la normatividad vigente y comités de bioética.

Artículo 20. Cualquier muestra de indisciplina podrá ameritar que el alumno sea expulsado de la sesión (todo tipo de conducta inadecuada o acción que cause distracción y ponga en peligro la integridad de otras personas).

Capítulo III: CON RELACIÓN A LA HIGIENE Y SEGURIDAD

Artículo 21. Se portará una bata blanca de algodón de manga larga dentro de las instalaciones del laboratorio y ésta deberá estar abotonada.

Artículo 22. Toda muestra biológica debe ser considerada potencialmente infecciosa, por lo que se deberá utilizar guantes durante su manejo.

Artículo 23. No deben desecharse sustancias tóxicas o residuos sólidos en las tarjas.

Artículo 24. Debe utilizar los equipos e instrumentos de acuerdo a los manuales de procedimientos correspondientes.

Artículo 25. Utilizar los contenedores adecuados para los residuos biológico-infecciosos generados, en caso necesario preguntar a los profesores del módulo.

Artículo 26. En las prácticas donde se hayan utilizado animales para la experimentación, los restos deberán ser colocados dentro de una bolsa amarilla como lo establece la norma y llevados al bioterio para su tratamiento.

Artículo 27. No deben colocarse muebles, mochilas u otros objetos que obstruyan la puerta y pasillos.

Artículo 28. No se usarán gorras, zapatos descubiertos, ni audífonos dentro del laboratorio.

Artículo 29. Las personas con cabello largo deberán traerlo recogido.

Artículo 30. Las manos deben lavarse después de cualquier operación que implique el contacto con cualquier sustancia química o biológica.

Artículo 31. Cuando se manipulen sustancias químicas no deben frotarse los ojos y debe evitarse el contacto con la piel.

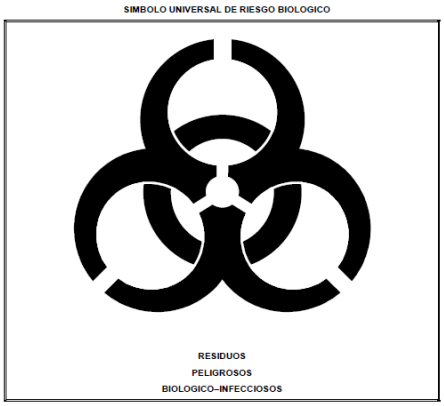
Artículo 32. Se debe cumplir con las normas vigentes que apliquen a cada una de las prácticas realizadas.

Artículo 33. Todas aquellas situaciones no previstas en este reglamento deberán ser consultadas con los profesores del grupo.

Manejo de Residuos

1. Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos (RPBI)

La Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental-Salud ambiental -Residuos peligrosos biológicos-infecciosos-Clasificación y especificaciones de manejo, es el documento que en México, rige la separación y disposición final de los residuos peligrosos, siendo aquellos que por sus características corrosivas, reactivas, explosivas, tóxicas, inflamables y biológico infecciosas, representan un peligro para el equilibrio ecológico o el ambiente. Se muestra el símbolo universal de “Riesgo Biológico”, característico de los RPBI.

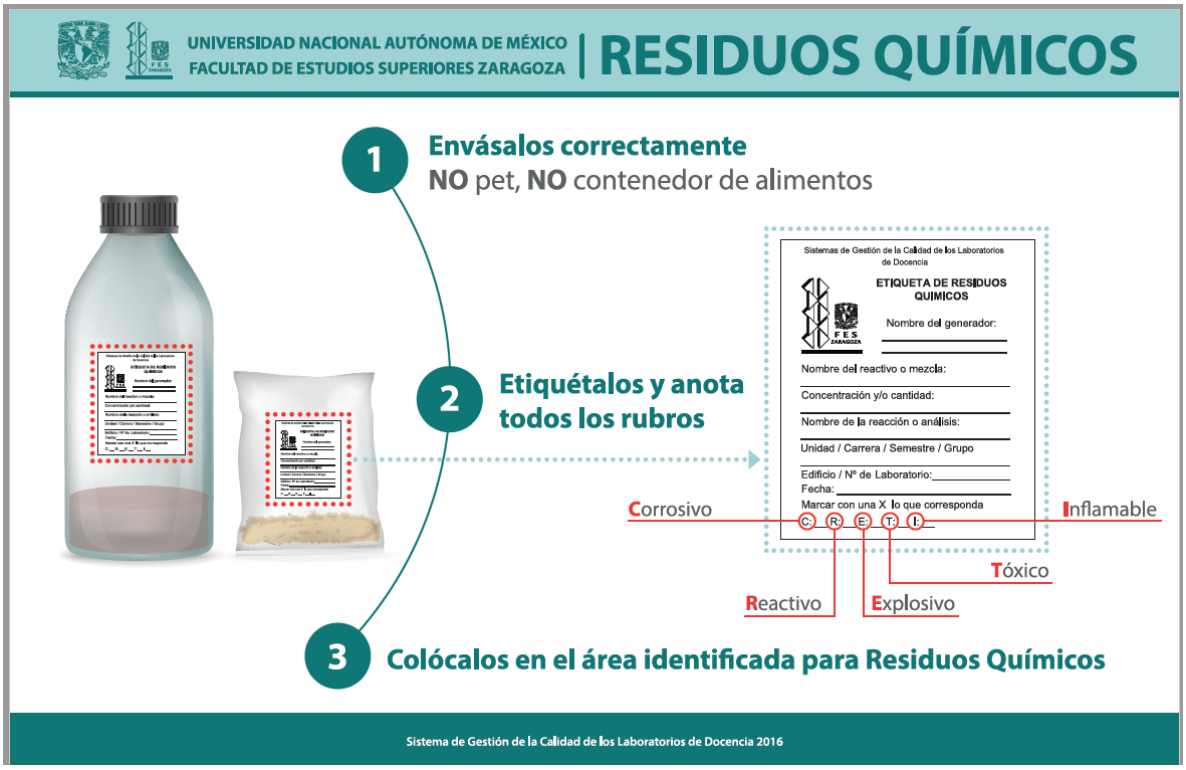


En cuanto al tratamiento, la separación y envasado de RPBI el alumno deberá apegarse al siguiente esquema, según la Norma ya mencionada y el Procedimiento SGC-FESZ-PO06. Procedimiento de manejo de residuos generados en los laboratorios de docencia.

Adicionalmente, el alumno deberá identificar en el laboratorio, el área para RPBI, en donde deberá colocar los residuos generados ya identificados.

2. Residuos Químicos

El generador de un residuo deberá clasificarlo de acuerdo con su naturaleza y grado de peligrosidad, según la Norma Oficial vigente correspondiente. Todos los recipientes que contengan residuos químicos deberán contar con etiqueta de identificación conforme al siguiente esquema:



El alumno colocará los residuos generados ya envasados e identificados en el área para residuos químicos. Todo lo anterior siguiendo el Procedimiento SGC-FESZ-PO06. Procedimiento de manejo de residuos generados en los laboratorios de docencia.

Requisitos legales y reglamentarios aplicables

En cada práctica se hace referencia a cada requisito legal y en el blog del manual, se encuentra toda la normatividad.

Criterios de Evaluación

Bioquímica Celular y de los Tejidos II, es una materia modular, ya que consta de la parte de Teoría y Laboratorio y por lo tanto, cada una de estas partes genera una calificación independiente y con diferente porcentaje de evaluación, como se muestra a continuación:

- Teoría: 60%
- Laboratorio: 40%

Los criterios de evaluación a utilizar en la materia Bioquímica Celular y de los Tejidos II Laboratorio, están orientados a resaltar los progresos generados por el alumno durante el proceso de enseñanza-aprendizaje en cada una de las prácticas.

Para evaluar el 40% correspondiente a Laboratorio se tomarán en cuenta los siguientes criterios:

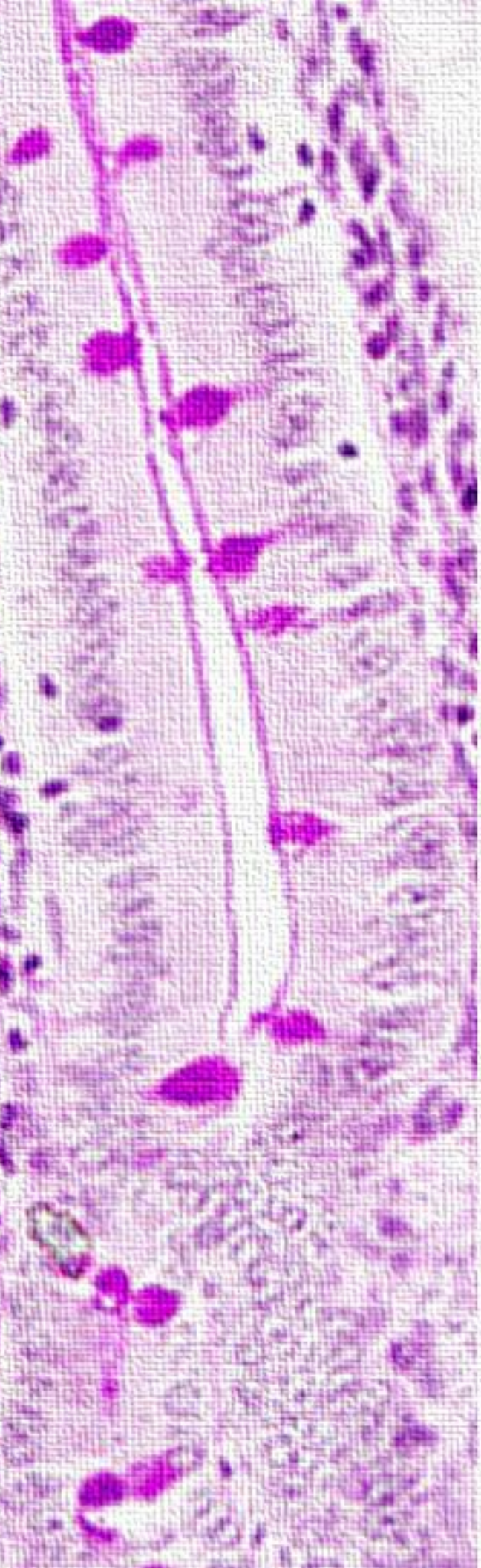
- **Examen de Bloque**: Es un examen, que se realiza al finalizar las cinco prácticas de las que está compuesto cada bloque, en él, se profundiza sobre los conocimientos adquiridos por el alumno, en este periodo de tiempo.
- **Trabajo experimental:** Durante la estancia en el laboratorio y realización de la práctica el alumno tendrá una evaluación continua en la que serán considerados diversos aspectos como: el uso de bata, cumplimiento de la normatividad, participación, etc.
- **Reporte:** Al finalizar cada práctica el alumno debe entregar un informe de los resultados obtenidos así como analizar y concluir sobre los mismos, este documento debe ser entregado ocho días después de concluir la parte experimental.
- **Examen previo:** Es un examen que se realiza al inicio de cada práctica, el cual tiene como objetivo comprobar los conocimientos con los que el alumno se presenta a realizar la práctica.
- **Bitácora:** El alumno tendrá que entregar en una libreta exclusiva de la materia, la investigación realizada de los antecedentes académicos de cada práctica.

IMPORTANTE: La calificación mínima aprobatorio para los rubros antes mencionados, es de 6.0.

Asistencia: La asistencia no es un rubro ponderable, pero el alumno deberá cumplir con el 80% de asistencia, de lo contrario no podrá realizarse evaluación.

Los porcentajes de evaluación serán los siguientes:

Criterio	Porcentaje
Examen de bloque	30%
Trabajo experimental	35%
Reporte	15%
Examen previo	10%
Bitácora	10%



Sección I
Relación estructura y función

1a. Anatomía de un mamífero (*Rattus norvegicus*)

OBJETIVOS

1. Identificar macroscópicamente los órganos que integran cada uno de los diferentes sistemas (reproductor, digestivo, urinario, respiratorio y nervioso) que constituyen a los mamíferos en uno de sus representantes, *Rattus norvegicus.*
2. Diseccionar los órganos, describirlos y relacionarlos con su función.
3. Comparar las estructuras de los aparatos y sistemas de la rata con las estructuras de los humanos.
4. Analizar la morfología del espermatozoide de la rata.
5. Diseccionar el ámpula del oviducto de la rata hembra e identificar los ovocitos liberados.

ANTECEDENTES ACADÉMICOS

- Anatomía externa e interna de la rata.
- Fisiología comparada del cerebro y los aparatos digestivo, renal, reproductor y respiratorio de la rata y el humano.

INTRODUCCIÓN

Muchas de las investigaciones científicas son realizadas en animales de experimentación, dentro de los cuales se incluyen primates no humanos como el mono *rhesus*, ungulados como las cabras y los borregos. Sin embargo, en la mayoría de los experimentos se emplean especies pequeñas de mamíferos como los roedores; entre éstos están los conejos, los cobayos, los hámsteres y, principalmente las ratas y los ratones.

Las ratas han sido utilizadas como modelos animales en distintas áreas de investigación: endocrinología, bioquímica, farmacología, toxicología, fisiología experimental, neurofisiología, oncología, nutrición, entrenamiento en microcirugía y trasplantes. El uso de esta especie en la investigación se debe a su velocidad de reproducción, a su facilidad de manejo y a sus similitudes fisiológicas con el ser humano, razones por las que las ratas son consideradas un buen modelo de estudio. Las ratas utilizadas con mayor frecuencia pertenecen a la clase mamífera, género *Rattus*. Las de laboratorio pertenecen a la especie Norvegicus y en su mayoría a tres cepas: *Wistar, Sprague-Dawley y Long-Evans*. La cepa Wistar fue desarrollada en el Wistar Institute en 1906 para fines de investigación biomédica. Estas ratas viven aproximadamente dos años y medio, alcanzan la madurez sexual aproximadamente a los tres meses, lo cual las hace un modelo adecuado para la investigación, de ahí la importancia del conocimiento de la rata como modelo de estudio que permite la identificación de los órganos que integran cada aparato así como la valoración de su interconexión en el contexto anatómico en el que se llevan a cabo los eventos fisiológicos.

REACTIVOS

- $CO_{2.}$

MATERIAL BIOLÓGICO

- Ratas hembra y macho

MATERIAL Y EQUIPO

- Cámara de eutanasia (ubicada en el Bioterio del campus 2)
- Estereoscopio
- Microscopio
- Estuche de disección, o al menos navaja o bisturí con mango, pinzas, tijeras,

separadores.

- Gasas
- Guantes desechables
- Hilo grueso
- Tabla de disección
- Vidrio de reloj
- Vasos de precipitado de 250 mL
- Papel aluminio
- Sanitas

MÉTODO

Se sugiere que por cada dos equipos se trabaje con un ejemplar[1], de tal manera que por cada mesa de trabajo se tenga una hembra y un macho con el propósito de que al hacer la disección de los órganos sexuales, todos los alumnos puedan observar los caracteres sexuales tanto de hembras como de machos, y dependiendo del ejemplar con el que se esté trabajando, se realice el análisis de los gametos femeninos o masculinos.

La manipulación y sujeción preliminar de la rata normalmente es realizada por el personal del bioterio, de acuerdo a la normatividad[2], sin embargo, de así desearlo, previa preparación y bajo supervisión, puede llevarlo a cabo el alumno, para lo cual es aconsejable seguir las indicaciones del personal de bioterio para la sujeción.

***Importante**: El manejo y uso de animales de laboratorio representa una responsabilidad, por ello deben seguirse las indicaciones normativas y bioéticas[1,2].*

[1]Esto con la finalidad de *reducir* el número de animales por experimento, siguiendo los principios de las 3R.

[2]**NOM-062-ZOO-1999**, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Una vez sujetada, la rata se introduce en una cámara de eutanasia con CO_2 [3], en la cual permanece por entre tres y cinco minutos, según el protocolo del bioterio, hasta que se observa que se ha detenido la respiración. Tras la eutanasia de la rata, debe confirmarse su muerte mediante dislocación.

Posteriormente, la rata se coloca sobre la tabla de disección en extensión en decúbito supino (es decir, boca arriba) y se sujeta a la tabla por cada uno de los miembros utilizando el hilo.

Previo a la disección han de observarse las características externas, observar los órganos que componen los diferentes sistemas de los sentidos: oído, vista, olfato, gusto y tacto. Además, en el caso de la hembra, en la zona genital se observan tres orificios, de abajo hacia arriba, el anal, el vaginal y encima el meato urinario, además de cinco a seis pares de glándulas mamarias (figura 1.1A). En el caso del macho se observa un solo orificio, el ano y por encima de éste el saco escrotal que contiene los testículos y por arriba el pene (figura 1.1B).

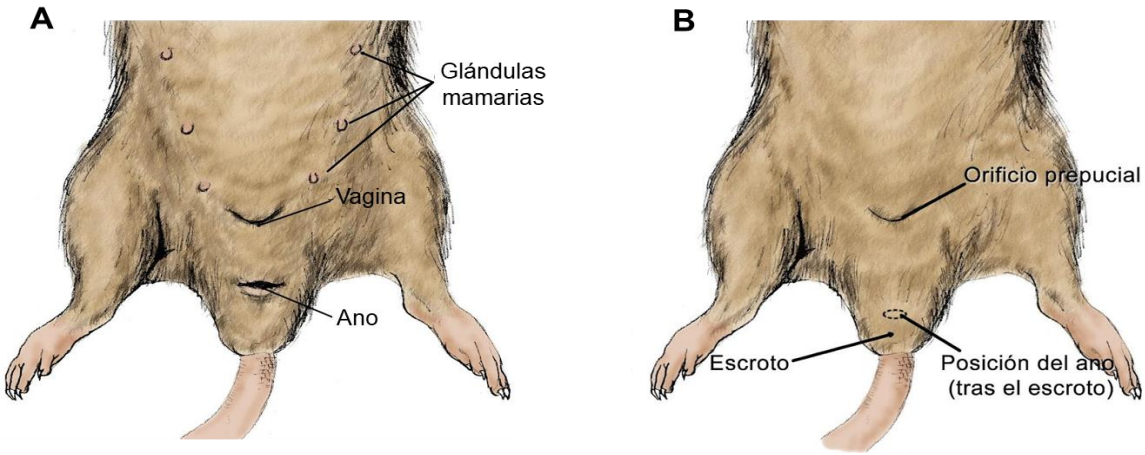


Figura 1.1. Aparato urogenital externo de la rata hembra (**A**) y macho (**B**).

[3] El CO_2 es el método más recomendable para la eutanasia de diferentes especies de mamíferos como las ratas, debido a su rápido efecto depresivo y anestésico (numeral 9.4.1.3 de la **NOM-062-ZOO-1999**).

Observados los órganos externos, se practica una incisión a manera de ojal por la línea media en la piel de la región ventral, empezando en las sínfisis del pubis y terminando en el tórax. Deben cortarse las adherencias entre la piel y los músculos, posteriormente cortar otro ojal en los músculos de la pared abdominal y hacer un corte siguiendo las líneas de la figura hasta el apéndice xifoides del esternón (figura 1.2).

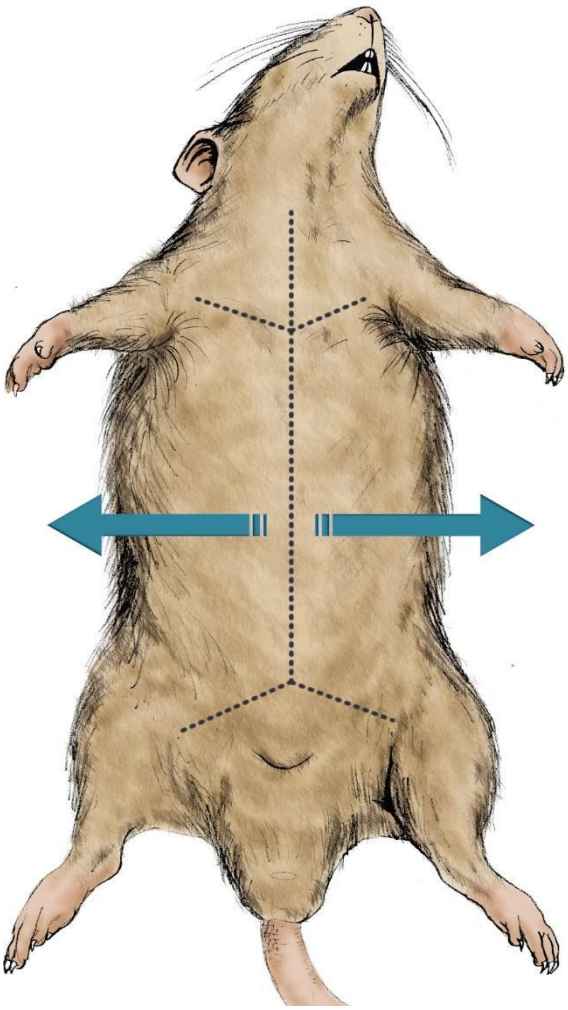


Figura 1.2. Líneas que seguir para los cortes laterales en la rata.

Realizar cortes laterales por debajo de las costillas y retirar los músculos hacia los lados a fin de observar la cavidad abdominal. Una vez separado el músculo a ambos lados aparecen todas las vísceras abdominales, donde habrá que identificar los siguientes órganos (Figura 1.3):

- El hígado con varios lóbulos, en el que se identificará la desembocadura de las vías biliares en el intestino delgado (conducto biliar) y la vena porta-hepática.
- El estómago, donde se diferencian la zona cardial, la fúndica y la pilórica.

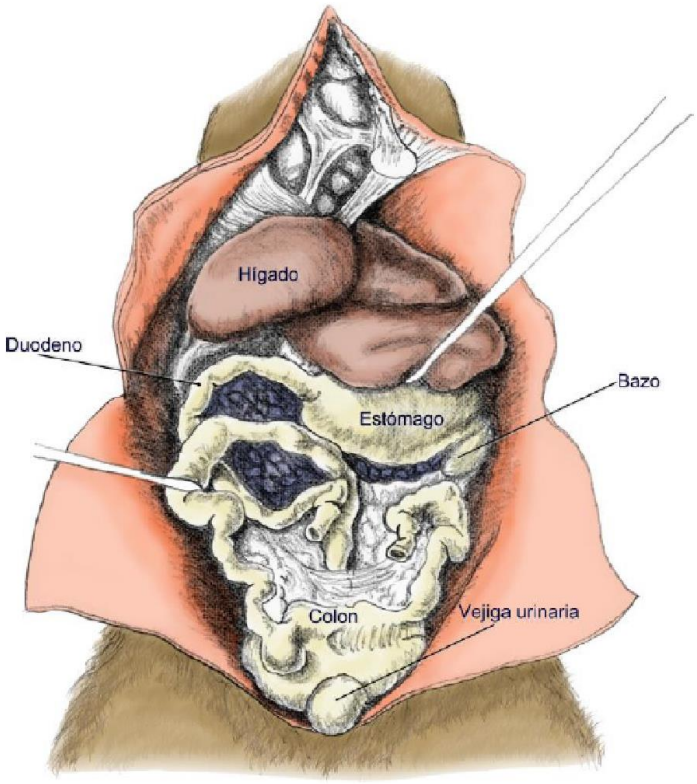


Figura 1.3. Cavidad abdominal.

- El páncreas, el cual es difuso y color rosado, tiene forma de numerosas masas tisulares diseminadas en el mesenterio del intestino delgado.
- El bazo, con forma de lengüeta.

- El paquete intestinal que está unido al mesenterio, el cual se debe de retirar para poder identificar las partes del intestino. En primer lugar, ha de seguirse el intestino delgado, observando posteriormente el duodeno, el yeyuno y el íleon. Del mismo modo se sigue el intestino grueso, identificando el ciego (saco muy voluminoso), el colón (con estriaciones) y el recto que desemboca en el ano.

APARATO UROGENITAL

Una vez extraídos los órganos digestivos queda expuesta la parte posterior de la cavidad abdominal donde pueden verse los riñones, uréteres y la vejiga urinaria. Junto al riñón se observan las cápsulas suprarrenales; separar por tracción una de ellas y cortarlas transversalmente para observar la corteza y médula adrenal. Extirpar un riñón y mediante corte longitudinal observar las zonas (corteza, médula y pelvis).

En la rata hembra se observarán los ovarios cerca de los riñones. Unidos a los ovarios se encuentran enrollados los oviductos que se comunican con las dos ramas del útero (bicorne), el cual presenta en su base al cérvix que desemboca directamente en la vagina (Figura 1.4).

Para la observación de los ovocitos, ubicar en un estereoscopio el oviducto y el ovario, separarlos con unas tijeras de disección y buscar el ampolla del oviducto. Con un par de agujas de disección, rasgar el ámpula para hacer observación y conteo de los ovocitos.

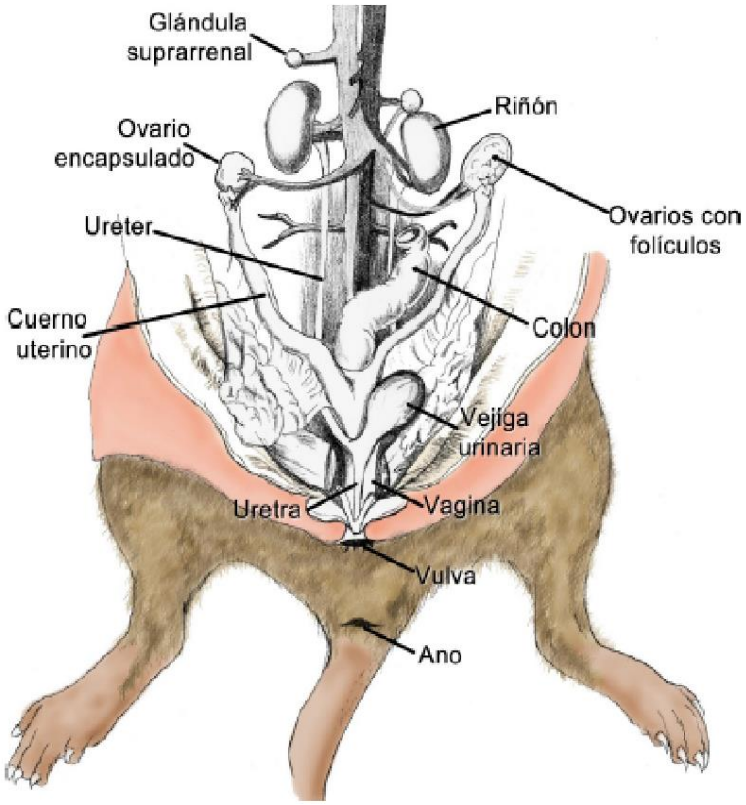


Figura 1.4. Aparato urogenital de la rata hembra.

Si se trata de un macho, pueden encontrarse los testículos en el saco escrotal, se rompe éste y se extrae el testículo, en el cual puede observarse el epidídimo, los vasos deferentes y el cordón espermático. También puede observarse como órganos anexos, las vesículas seminales, detrás de la vejiga urinaria con forma de hoja lobulada y las glándulas prostáticas. Por último, la uretra y el pene (Figura 1.5).

Para la observación de la motilidad y morfología de los espermatozoides, realizar un corte en la cola del epidídimo, colocarlo en un vaso de precipitado con 10 mL de solución salina (0.9%) a 37°C, dejar reposar durante un minuto para permitir que los espermatozoides

difundan al medio y colocar 100 uL de la solución en un portaobjetos previamente atemperado. Colocar un cubreobjetos sobre la solución y observar en un microscopio a 40X.

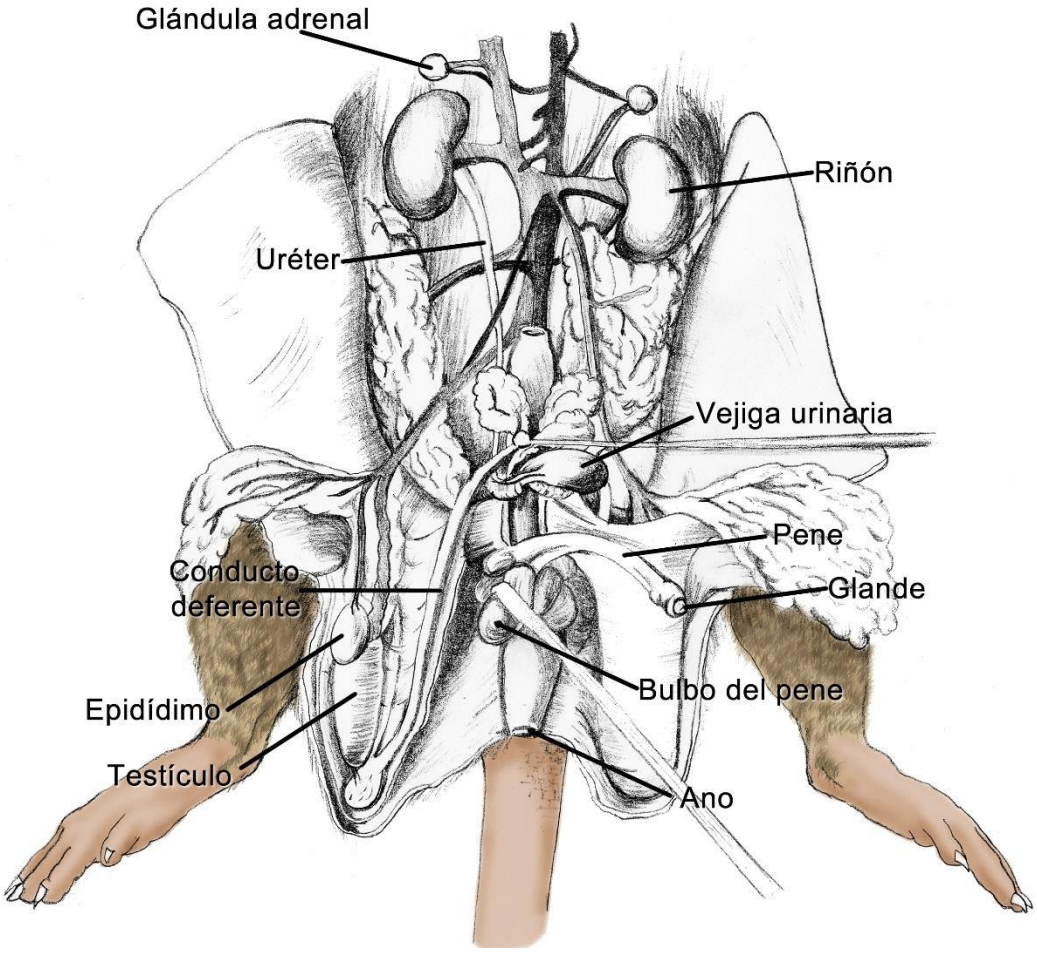


Figura 1.5. Aparato urogenital de la rata macho.

DISECCIÓN DEL TÓRAX

A continuación, se introducen las tijeras directamente en la línea media, en el extremo inferior de la caja torácica y se corta por el centro el esternón en dirección hacia la cabeza. Puede observarse el timo formado por una masa blanquecina que tapa parcialmente al corazón y los pulmones colapsados.

DISECCIÓN DEL CUELLO

Después, se corta por la línea media del músculo que recorre el cuello (esternohioideo) y se separa hacia los lados; se observa la tráquea, la glándula tiroides aparece al torcer la tráquea y los vasos sanguíneos.

DISECCIÓN DEL CEREBRO

Para la disección del cerebro, ha de cortarse la cabeza de la rata para lo cual tendrá que colocarse de lado, o boca abajo y empezar por remover la piel que se encuentra entre los ojos y las aurículas (orejas) de modo que se pueda empujar las orejas a los lados sin que se separen, después retirar el tejido muscular desde el área de los ojos y aurículas hasta la parte trasera del cráneo y de la zona craneal de la columna vertebral. Posteriormente, ubicando el sitio de unión entre cráneo y columna, hacer el corte para separar la cabeza, procurando cortar hacia la columna para no destruir el cerebelo que es la zona más próxima. Una vez separada la cabeza, sujetarla en una mano y con la otra usando unas pinzas fuertes, hacer un pequeño hoyo en el hueso del cráneo, tirando hacia la parte externa para evitar dañar el cerebro, (como si se pelase un huevo duro) y hecha la perforación, agrandarla quebrando cuidadosamente pequeñas piezas del hueso para gradualmente descubrir la parte superior y los lados del cerebro.

Una vez descubierto el cerebro, se desprende del cráneo suavemente con ayuda de unas pinzas delgadas, así, se puede observar los nervios olfatorios y ópticos al inclinar el cráneo

de la rata, de un ligero tirón se separa y el cerebro puede extraerse del cráneo, ha de colocarse en un vidrio de reloj para ubicar algunas estructuras como el bulbo olfatorio, los hemisferios cerebrales, el cerebelo y la glándula pineal.

Después de concluida la práctica, y en apego a la normatividad[4], los restos de los animales serán colocados en una bolsa de polietileno de color amarillo y serán llevados al bioterio para su adecuado procesamiento.

RESULTADOS

Los alumnos reportarán con imágenes y esquemas los órganos y sistemas observados, así como fotografías tomadas de los espermatozoides y ovocitos observados.

ACTIVIDADES

Elaborar un cuadro comparativo de la anatomía de la rata y la anatomía humana.

REFERENCIAS

1. Costa J, Madrid J, Zamora S, Manual de clases prácticas de fisiología animal. España: Editum, 1993.
2. Porterfield S.P. Endocrine Phisiology. 2th Ed. Mosby, Inc. 2000.
3. Silvernale, M.N. Zoología. 11a Ed. México: Cia. Editorial Continental, S.A. de C.V., 1985.
4. Tamarit, T. y Delso, J. Prácticas de bioquímica y fisiología. España: Marban, 1977.

[4] Los cadáveres y partes de animales son considerados como residuos peligrosos biológico-infecciosos de tipo patológicos (Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, Protección ambiental-Salud ambiental-Residuos peligrosos biológico-infecciosos- Clasificación y especificaciones de manejo).

5. Tórtora, G, J. y Anagnostakos, N. P. Principios de anatomía y fisiología. 5a ed. México: Harla, 1989.

6. Principios de las 3R.

7. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

8. Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, Protección ambiental-Salud ambiental-Residuos peligrosos biológico-infecciosos- Clasificación y especificaciones de manejo.

1b Aparato reproductor femenino y masculino

OBJETIVO

Del aparato reproductor femenino y masculino:

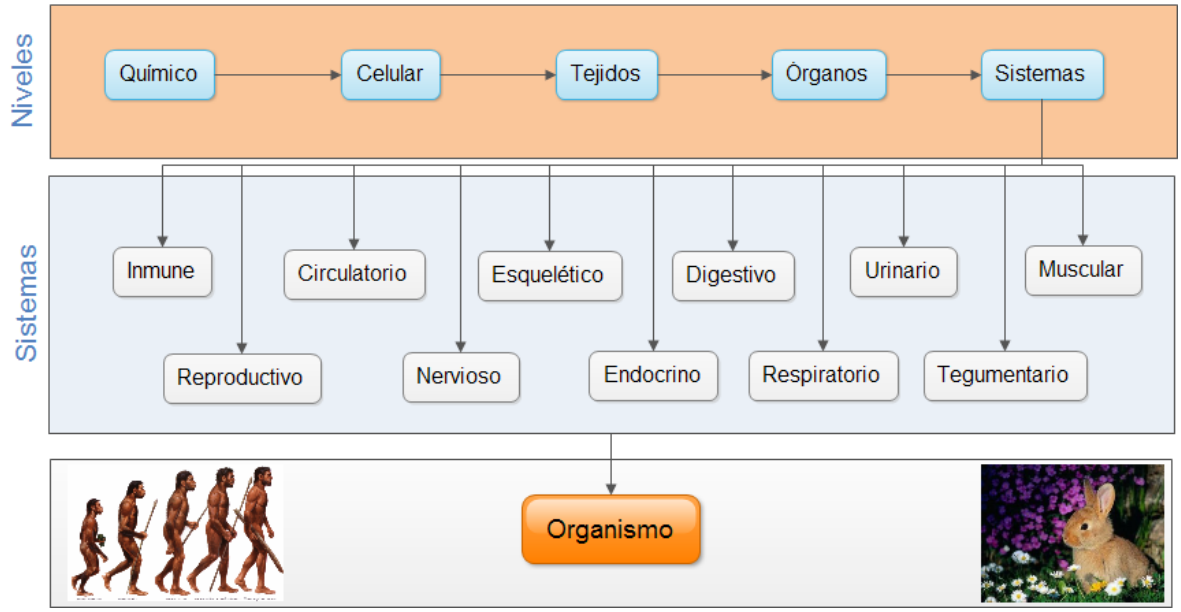
1. Identificar los órganos sexuales primarios y secundarios.
2. Observar e identificar cada una de las estructuras que componen al aparato reproductor.
3. Reconocer las diferencias anatómicas entre los aparatos reproductores.

ANTECEDENTES ACADÉMICOS

- Anatomía del aparato reproductor femenino y masculino.
- Eje hipotálamo-hipófisis-gónadas
- Retroalimentación negativa

MARCO TEÓRICO

El ser humano, igual que los demás animales, posee un sistema de organización muy complejo comenzando desde aquellos niveles considerados ***básicos*** (del nivel químico al nivel de órganos) hasta la interrelación de diversos órganos que establecen los once sistemas que conforman a un ser vivo del nivel de un animal, no debemos perder de vista que cualquier ser vivo por muy simple que nos parezca posee un sistema de organización complejo.



Aun cuando el **Sistema Reproductor** no contribuye a la homeostasis y no es esencial para la supervivencia del individuo, este sistema es el encargado de garantizar la procreación, es decir la formación de nuevos individuos para lograr la supervivencia de la especie, el modo de reproducción más común de los cordados es **reproducción sexual gámica** (gametos) mediante **organismos** sexualmente **dimórficos** (existe una diferencia entre la hembra y el macho).

La capacidad reproductora depende de intrincadas relaciones entre el hipotálamo, la hipófisis anterior (adenohipófisis) y las gónadas (ovarios y testículos). Estas relaciones emplean mecanismos para mantener la homeostasis reproductiva, como el control por retroalimentación negativa. Además de estos procesos biológicos básicos, el comportamiento y actitudes sexuales son influenciados profundamente por factores emocionales y las costumbres socioculturales donde vive el individuo.[1]

ANATOMÍA DEL APARATO REPRODUCTOR

El aparato reproductor puede ser clasificado bajo ciertos criterios, según el momento de desarrollo, su localización o función.

1. **Organogénicos**: Es la clasificación a partir de la gónada bipotencial la cual no han sufrido la diferenciación a alguna gónada específica. Si existe la maquinaria genética y enzimática adecuada los conductos de Müeller se desarrollan a genitales femeninos, mientras que los conductos de Wolf se diferencian a genitales masculinos.

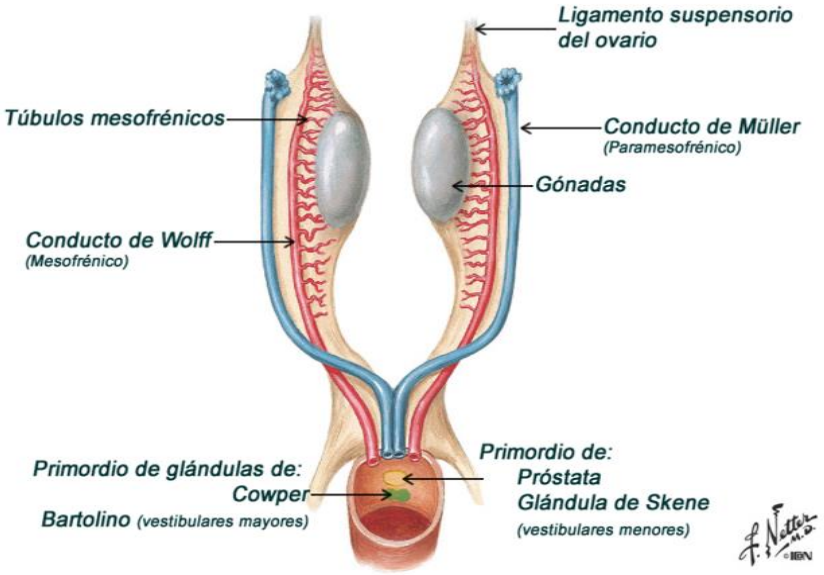


Figura 2b.1 Gónada bipotencial[2]

2. **Topográfico**: Hace referencia a la localización de cada estructura que conforman el aparato reproductor por lo que se puede dividir en internos y externos:

LOCALIZACIÓN	FEMENINO	MASCULINO
Internos	Vagina, útero, trompas de Falopio y ovarios	Próstata, vesículas seminales, glándulas bulbouretrales
Externos	Vulva que posee: • Labios mayores, • Labios menores y • Clítoris	Pene y escroto (conteniendo los testículos)

3. **Funcionales**: Hace una diferencia entre los órganos para la producción de células germinales y hormonas los necesarios para el transporte, gestación

y copulación, así como las glándulas accesorias

FUNCIÓN	FEMENINO	MASCULINO
Producción de Gametos y Hormonas	Ovarios	Testículos
Transporte, gestación y copulación	**Transporte** • Trompas de Falopio **Gestación** • Útero **Copulación** • Vagina	**Transporte** • Conducto deferente • Uretra **Gestación** • Sin estructura **Copulación** • Pene
Glándulas accesorias	Bartolino y Skene	Próstata, bulbouretrales, Cowper y vesículas seminales.

HOMOLOGÍAS

Debido a que el aparato reproductor femenino y masculino procede de una gónada embrionaria en común (bipotencial) que se diferencia a partir de la 10 semana, existen en ambos aparatos reproductores las mismas estructuras, mismas que se han adecuado o adaptado a las funciones propias del sexo del individuo, en la siguiente tabla se muestra las analogías entre cada uno de ellos.

Estructuras Femeninas	***Estructuras Masculinas***
Ovarios	Testículos
Óvulo	Espermatozoides
Labios Mayores	Escroto
Labios Menores	Uretra esponjosa (peneana)
Vestíbulo	Uretra Membranosa
Bulbo del Vestíbulo	Cuerpo esponjoso y bulbo del pene

Estructuras Femeninas	***Estructuras Masculinas***
Clítoris	Glande
Glándulas Parauretrales (G. Skene)	Próstata
Glándulas Vestibulares Mayores	Glándulas Bulbouretrales (de Cowper)
Células de la Granulosa	Células de Sertoli

EQUIPO

- Equipo de cómputo con las siguientes características mínimas:
  - Windows 10
  - 4 GB de memoria MB RAM
- Conexión a Internet
- Simulador Anatomy & Physiology Revealed *on line*[5] desarrollado por la Universidad de Toledo, Ohio, Estados Unidos accediendo desde la Biblioteca Digital de la UNAM, siguiendo la siguiente ruta:
  - BIDI > Ciencias Biológicas, Químicas y de la Salud > Access Physiotherapy > Multimedia
- Proyector

METODOLOGÍA

Para lograr los objetivos se realizarán en tres etapas las cuales no necesariamente tienen que ser en estricto orden y dos de ellas pueden desarrollarse en casa.

- **Actividad Software**: Uso del software **Anatomy & Physiology Revealed** por equipo dentro del laboratorio.
- **Actividad Evaluación**: Se realizarán de manera individual, puede ser antes o después de la **Actividad Sofware**.

[5] URL: https://accessphysiotherapy-mhmedical-com.pbidi.unam.mx:2443/multimedia.aspx#309

- **Actividad Cuestionario[6]:** Se trata de una serie de preguntas que el alumno deberá investigar, ya sea previo a la sesión de laboratorio o como trabajo en casa.

ACTIVIDAD SOFTWARE

En esta etapa se usará el software **Anatomy & Physiology Revealed *on line*** dentro del laboratorio por equipo.

1. Al alumno o alumnos se le proporcionará una serie de cuatro imágenes del aparato reproductor, dos masculinas y dos femeninas.
    a. Estas imágenes pueden ser impresas a color, blanco y negro o proyectadas o descargadas.
        i. La descarga puede hacerse desde esta dirección (http://bit.ly/2SQqZBN)
2. Apoyados por la literatura los alumnos identificarán cada una de las áreas indicadas mediante números.
    a. Los números encerrados en un **circulo** indica que deben seleccionar esa área.
    b. Los números en figura con un **vértice**, indica que deben seleccionar el punto indicado por el vértice.
3. Transcurrido el tiempo asignado para identificar, se distribuyen las imágenes con las respuestas de tal manera que otro equipo verifique las respuestas.
4. Iniciar **Anatomy & Physiology Revealed**.
    a. Seleccionar **Module** 14. *Reproductive*
    b. Identificar los iconos

[6] El cuestionario ha sido seleccionado, en parte, del Workbook to Accompany Anatomy & Physiology Revealed 3.0 McGraw-Hill[4]. El cuestionario estaría alojado en el blog de la Carrera.

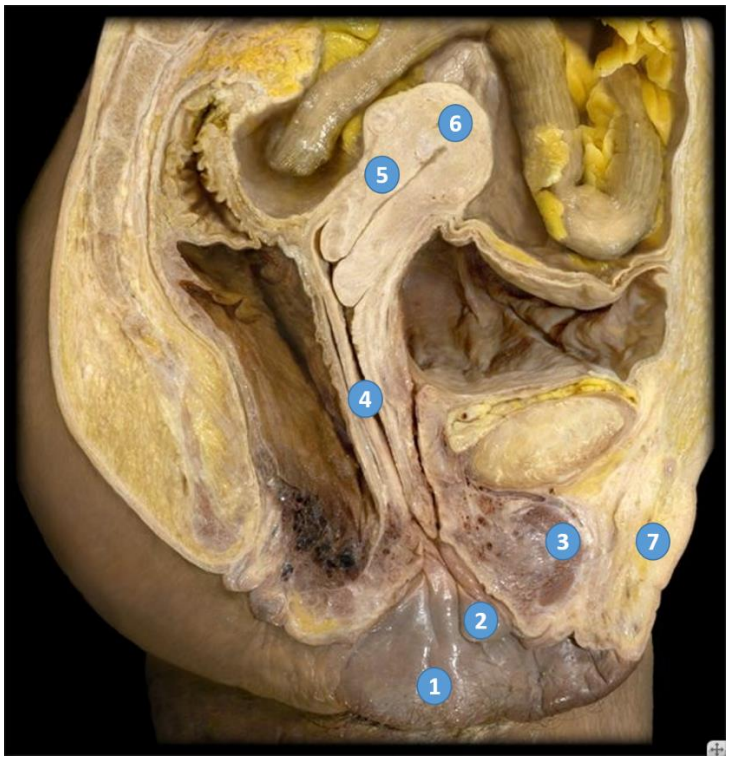
i. Disección (**1**)
ii. Modelo en 3D (**2**)
iii. Atlas (**3**)
iv. Videos (**4**)
v. Histología (**5**)
vi. Radiografías (**6**)
vii. Autoevaluaciones (**7**)

5. Se solicita a un alumno que indique los pasos para que otro de sus compañeros utilizando el software seleccione **Disección** localice cada uno de los puntos indicados en las imágenes y así se puedan comprobar las respuestas.
6. Cada integrante o equipo verifique las respuestas de su compañero o equipo asignado.
7. Una vez concluido lo anterior se recomienda realizar lo siguiente:
    a. Ver todos los tópicos y sus diversos cortes relacionados con los dos aparatos reproductores.
        i. Seno (femenino)
        ii. Pelvis (masculino y femenino)
        iii. Perineo (masculino y femenino)
        iv. Pene y escroto
        v. Testículo y cordón espermático
    b. Ejecutar las animaciones (Animations)
        i. Male reproductive system overview
        ii. Spermatogenesis
        iii. Female reproductive system overview
        iv. Female reproductive cycles

c. Ver los cortes histológicos:
    i. Seminiferous tubule
    ii. Ovary
    iii. Primordial follicle
    iv. Primary follicle
    v. Secundary follicle

Aparato Reproductor Femenino

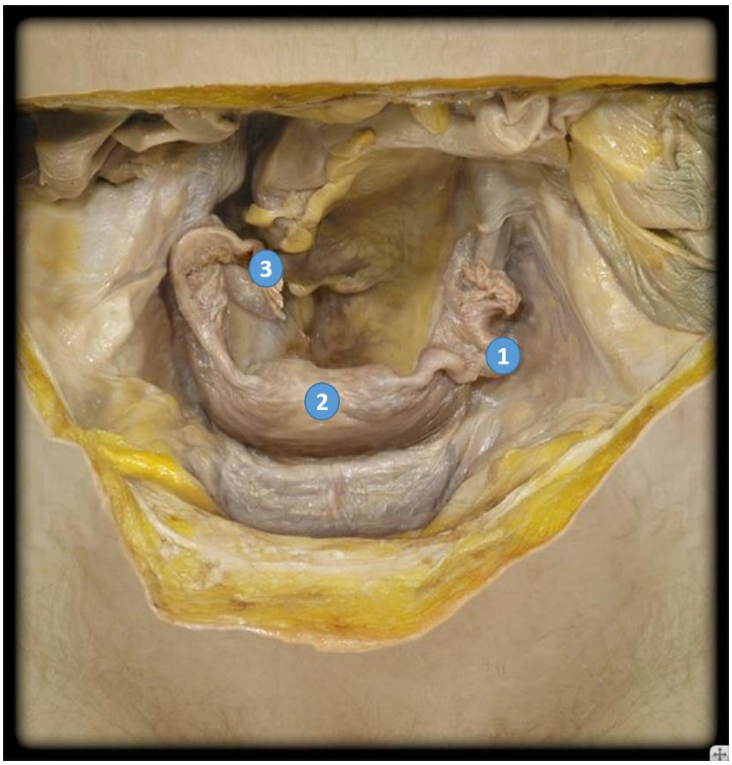
Esquema *Elementos a identificar*



1.
2.
3.
4.
5.
6.
7.

Comprobar respuestas:

1. Desde la pantalla inicial seguir la ruta: *System* → *Reproductive* → *Dissection* → *Select topic* → *Pelvis-Female* → Select view → *Sagittal* → *Go*.
2. Comprobar sus respuestas haciendo clic en *Layer 1* pasar el ratón sobre los puntos **verdes** identificados y palomea aquellas correctas.



1.

2.

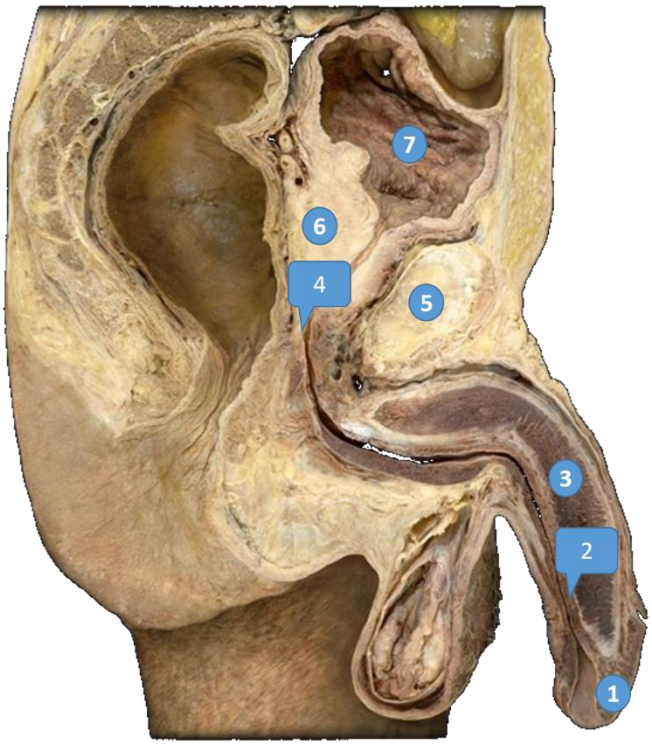
3.

Comprobar respuestas:

1. Desde la pantalla actual seguir la ruta: *Change Topic View* → *Pelvis-Female* → Select view → *Superior* → *Go*.
2. Comprobar sus respuestas desplazar el botón de *Layer 1* y posteriormente clic en *Layer 2* pasar el ratón sobre los puntos **verdes** identificados y palomea aquellas correctas.

Aparato Reproductor Masculino

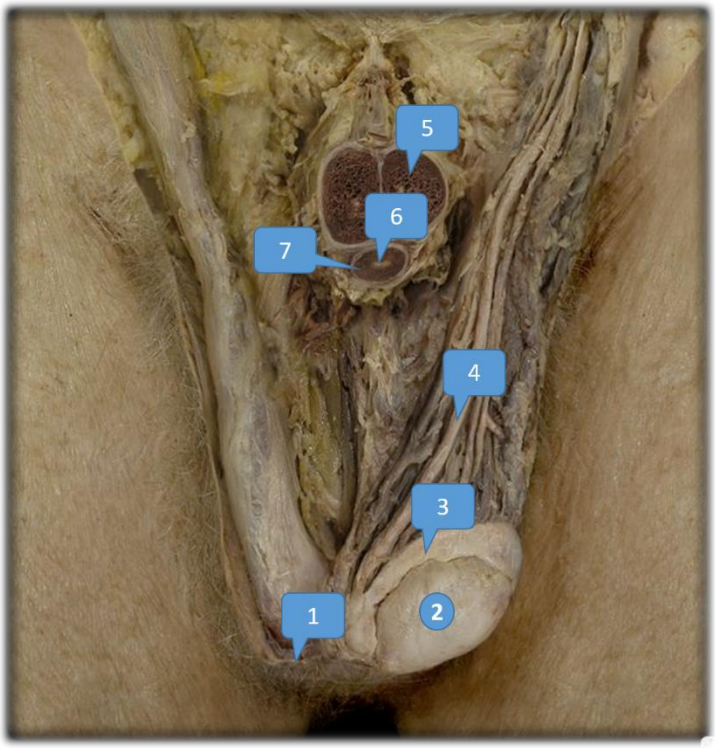
Esquema *Elementos a identificar*



1.
2.
3.
4.
5.
6.
7.

Comprobar respuestas:

1. Desde la pantalla actual seguir la ruta: *Change Topic View → Pelvis-male → Go*.
2. Comprobar sus respuestas desplazar el botón de *Layer 1* y posteriormente pasar el ratón sobre los puntos **verdes** identificados y palomea aquellas correctas.



1.
2.
3.
4.
5.
6.
7.

Comprobar respuestas:

1. Desde la pantalla actual seguir la ruta: Change Topic View → Penis and Scrotum → Go.
2. Comprobar sus respuestas hacer clic en el botón de *Layer 6* y posteriormente pasar el ratón sobre los puntos **verdes** identificados y palomea aquellas correctas.

Adaptado de: Broyles, RB, Workbook to accompany Anatomy & Physiology Revealed 3.0[4]

ACTIVIDAD CUESTIONARIO

Instrucciones: Estas preguntas deberán ser contestadas en su cuaderno e incorporar las referencias utilizadas.

APARATO REPRODUCTOR FEMENINO

1. Mencione los órganos internos del aparato reproductor.
2. ¿Cómo se llama el ligamento que mantiene en su sitio a los ovarios?
3. ¿Qué es la fimbria uterina? Y ¿cuál es su función?

4. ¿En qué lugar ocurre normalmente la fertilización?
5. Mencione tres funciones del útero.
6. ¿Qué es el ovario poliquístico?
7. ¿Qué diferencia existe entre menopausia y climaterio?

Aparato Reproductor Masculino

1. Indique los órganos sexuales primarios
2. Mencione el camino del espermatozoide desde los órganos primarios hasta el pene.
3. ¿Cuáles son las glándulas sexuales accesorias y su función?
4. ¿Mediante qué mecanismos los testículos mantienen la temperatura adecuada para la supervivencia del espermatozoide? ¿qué músculos intervienen si la temperatura disminuye o aumenta?
5. Mencione la célula responsable de producir LH y FSH
6. Indique a qué se refieren las siguientes patologías:
    a. La Peyronie
    b. Priapismo
    c. Disfunción Eréctil
7. ¿Qué es la andropausia?
8. ¿Cuál es el mecanismo de la erección y la detumescencia?

ACTIVIDAD EVALUACIÓN

La evaluación podrá ser realizada antes o después de la Actividad Software ya sea presencial o en casa, como el profesor lo considere más adecuado.

CALIFICACIÓN FINAL

La calificación final de la actividad de esta práctica corresponde al promedio de las calificaciones obtenidas en las tres actividades.

1. Software
2. Cuestionario
3. Evaluación

REFERENCIAS

1. Sherwood L, Zendejas Escandón A, Sandoval Ferrera C. Fisiología humana. 7th ed. México, D.F.: Cengage Learning; 2011.
2. Mulroney S, Myers A, Netter F. Netter fundamentos de fisiología. [Barcelona]: Elsevier; 2016.
3. E Schneider, M., Hankin, M., Morris, D. and Bennett-Clarke, C. (2011). *Anatomy & Physiology Revealed 3.0 An Interactive Cadaver Dissection Experience*. Toledo, OH, EE.UU.: McGraw-Hill.
4. Broyles, R. (2012). *Workbook to accompany Anatomy & physiology revealed, version 3.0*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill Higher Education.

2. Observación de epitelios

OBJETIVOS

1. Identificar de cada corte histológico el tejido epitelial indicando el tipo de célula y capas que los componen.
2. Relacionar la estructura del órgano y del epitelio con la función desempeñada en el organismo.

ANTECEDENTES ACADÉMICOS

- Estructura celular
- Manejo del microscopio
- Iluminación Köhler
- Clasificación de epitelios

INTRODUCCIÓN

La ***célula*** es la unidad funcional de todo organismo y poseen la capacidad de llevar funciones vitales de manera individual o colectiva, cuando células de estructura y función similar se unen, constituyen ***tejidos*** de los cuales podemos encontrar cuatro tipos principales en el cuerpo:

- **Muscular**: encargado de la generación de tensión y del movimiento.
- **Nervioso**: especializado en la iniciación y transmisión de impulsos nerviosos.
- **Conjuntivo**: también llamado ***conectivo***, encargado de conectar, anclar y soportar diversas estructuras corporales.
- **Epitelial**: consiste en células especializadas para el intercambio de sustancias entre éstas y su entorno.

EPITELIO

La palabra epitelio proviene de *epite* que significa cobertura, y tiene como funciones la protección, absorción, filtración, secreción, transporte y recepción de estímulos. Se encuentran como *revestimiento* (e.g. endotelio) o *recubrimiento* (e.g. epitelio superficial del ovario).

Los tejidos de este tipo presentan las siguientes características generales:

- Son avascularizados.
- Están soportados por una membrana basal y acelular.
- Contienen gran cantidad de células.
- Presentan alto índice mitótico.
- Derivan de cualquiera de las tres capas embrionarias, para dar origen a los diferentes epitelios según su localización y función.
- Poseen *citoqueratina*.

Al ver de cerca una célula epitelial podemos identificar los diversos dominios o polaridades que las caracterizan:

- ***Dominio apical***: es la región o borde libre (sin unir) expuesta al exterior del cuerpo o cavidad. Dependiendo su localización y función, ésta podrá presentar *especialización de membrana* a través de la presencia de *microvellosidades, cilios, estereocilios o placas de membrana*.
- ***Dominio lateral***: estas regiones son aquellas que están en contacto o comunicación directa con otras células del tejido. Estas *uniones* pueden ser de varios tipos *unión hermética* (zónula de oclusión), *banda de adhesión* (desmosoma en banda o zónula adherente), *desmosoma* (mácula adherente), *unión de tipo gap* (unión en hendidura) o *interdigitaciones laterales*.
- ***Dominio basal***: es el dominio que se encuentra unido a la *membrana basal* por medio de *hemidesmosomas*.

Los epitelios pueden ser clasificados de manera general con base en su función, en:

- Revestimiento
- Glandular

Epitelio de Revestimiento

Como su nombre lo indica, este tipo de epitelio se encarga, entre otras funciones, de revestir los órganos internos y externos del organismo. A cada epitelio se le asigna un nombre compuesto de dos partes, la primera parte nos indica el tipo de célula del dominio apical: ***plana, cúbica o cilíndrica.***

Figura 2.1 Tipos de células que conforman un epitelio; A) plana, B) cúbica, C) cilíndrica y D) cilíndrica con especialización apical (cilios)

La segunda parte del nombre hace referencia al *número relativo de capas* que conforman el tejido:

- ***Epitelios simples***: se encargan principalmente de la difusión, filtración, absorción y secreción de las sustancias.
- ***Epitelios estratificados***: se encargan principalmente de la protección.
- ***Epitelios pseudoestratificados***: su característica es que todas las células están en contacto con la membrana basal, pero no todas llegan a alcanzar la zona apical, por lo

que aparenta estar constituido por más de una capa. En mamíferos, reviste a la tráquea, bronquios, conductos eferente y deferente y epidídimo. Su función es de protección, absorción y secreción, por tanto, se encuentra en sitios donde se requiera movimiento de secreciones o fluidos.

- ***Epitelio de transición***: muestra como característica principal cambios en la altura, forma y número de capas celulares, mostrando un aspecto de transición entre la forma del epitelio cilíndrico y el cúbico. Se encuentra principalmente en vías urinarias de los mamíferos, está especializado para adaptarse a la distensión y la toxicidad de la orina.

En ciertos casos se hace necesario agregar la especialización de membrana:

- ***Microvellosidades***: Son proyecciones epiteliales digitiformes que se extienden en la luz e incrementan el área superficial de la célula.
- ***Estereocilios***: Son microvellosidades muy largas, pero menos que los cilios, que se encuentran en el epidídimo y los conductos deferentes del aparato reproductor masculino así como en el oído medio.
- ***Cilios***: Estructuras en movimiento que se encuentran en determinados epitelios, como traqueobronquial y oviductos, cuya función es impulsar las sustancias a lo largo de su superficie.

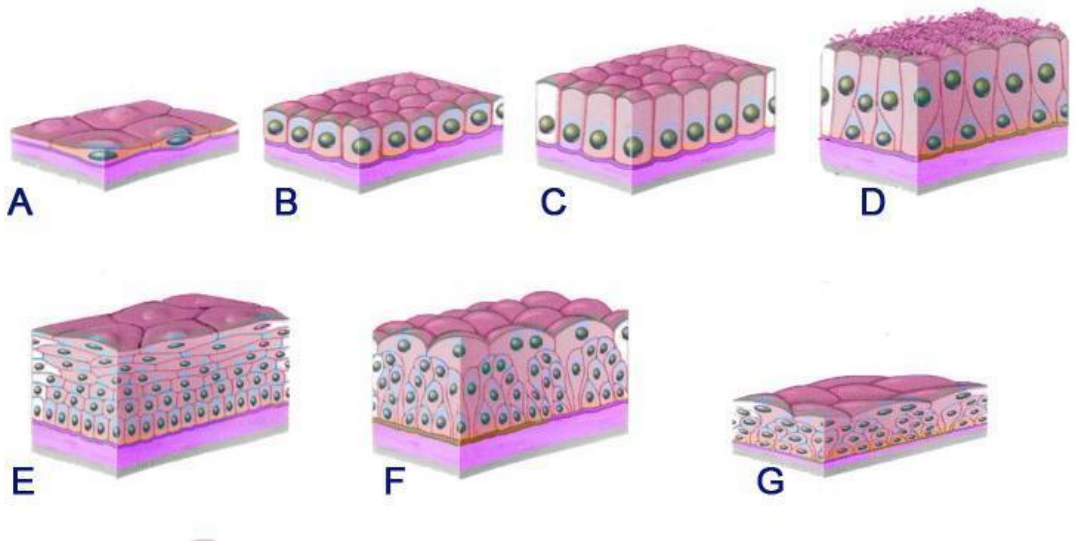


Figura 2.2 Clasificación de epitelios según el número de capas y morfología de la célula apical; A) plano, B) cúbico, C) cilíndrico, D) pseudoestratificado ciliado, E) estratificado plano, F y G) de transición

Epitelio Glandular

Este tipo de epitelio está especializado en la producción, almacenamiento y secreción de sustancias para ser liberadas ya sea al interior del organismo, es decir *endócrina*, o al exterior, *exocrina*, aunque existen las *mixtas* como las gónadas, hígado y páncreas.

Existe a su vez otras clasificaciones en función de ciertos criterios, como son:

- Naturaleza de la secreción (serosas o mucosas)
- Mecanismo de secreción (merocrinas, apocrinas u holocrinas)
- Número de células (unicelular o pluricelular)
- Morfología del ***adenómero*** (tubulares, acinar, tubuloalveolar o sacular)
- Morfología del conducto (simple o ramificado)

MATERIAL

- Papel seda
- Laminillas con cortes histológicos sugeridas a continuación, o las que se dispongan en el laboratorio:
  - Esófago
  - Estómago
  - Glándula parótida
  - Glándula sublingual
  - Intestino grueso
  - Piel delgada
  - Piel gruesa
  - Tráquea
  - Vejiga

REACTIVOS

- Aceite de inmersión

EQUIPO

- Microscopio

MÉTODO

1. Ajuste del microscopio mediante la iluminación de Köhler[7]
2. Observar al microscopio con los objetivos 10x, 40x y 100x las diversas laminillas.
3. Localizar e identificar las siguientes características:
   a. Número de capas
   b. Tipo de célula
   c. Célula apical
   d. Tejido conectivo
   e. Especialización de membrana

[7] En caso de contar con diafragma y condensador en buen estado.

RESULTADOS

Con los datos obtenidos llenar el formato correspondiente a la práctica, que podrás descargar desde el blog del manual.

ACTIVIDADES

1. Realiza una tabla que incluya los diferentes tipos de uniones celulares con sus características, función y localización.
2. ¿Qué función cumplen y dónde se localizan los estereocilios, cilios, microvellosidades y demás especializaciones de membrana?
3. ¿Qué características poseen las glándulas serosas y mucosas?

REFERENCIAS

1. Alcamo IE & Krumhardt B. Barron´s Anatomy and physiology. 2nd ed. U.S.A; Barron´s Educational Series, Inc.; 2004.
2. Fortoul van der Goes, T. editora. Biología celular e histología médica. México: Intersistemas/UNAM; 2011.
3. Gartner LP, Hiatt JL y Sturm JM. Temas Clave: Biología celular e histología. 5ª ed. Barcelona, España: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
4. Leeson R, Lesson TS y Paparo AA. Histología. 5ª ed. México; Interamericana; 1987.
5. Sherwood L. Fisiología humana. De las células a los sistemas. 7ª ed. México D.F.; Cengage Learning; 2011.
6. Welsch U. Sobotta: Histología. 5ª ed. Madrid, España; Editorial Médica Panamericana; 2010.

3. Gametogénesis

OBJETIVOS

1. Definir los principales eventos que suceden en los procesos de ovogénesis y espermatogénesis.
2. Explicar las principales características histológicas presentes en los testículos y ovarios de humanos y de rata.

ANTECEDENTES ACADÉMICOS

- Anatomía del aparato reproductor masculino y femenino.
- Meiosis
- Eje hipotálamo-hipófisis-gónadas.
- Hormonas sexuales.

INTRODUCCIÓN

En la reproducción sexual, dos células especiales llamadas gametos -con la mitad de cromosomas de una célula somatical- se fusionan y originan un nuevo individuo unicelular -el cigoto- que por sucesivas mitosis se desarrollará como pluricelular.

Los gametos se originan gracias a un sistema especial de división celular llamado meiosis. La gametogénesis, es el proceso de formación de gametos (por definición haploides, n) a partir de las células diploides de la línea germinal.

En el caso de los humanos si el proceso tiene como fin producir espermatozoides se denomina espermatogénesis y se realiza en las gónadas masculinas o testículos. Si el resultado son óvulos se denomina ovogénesis u oogénesis y se realiza en las gónadas femeninas u ovarios.

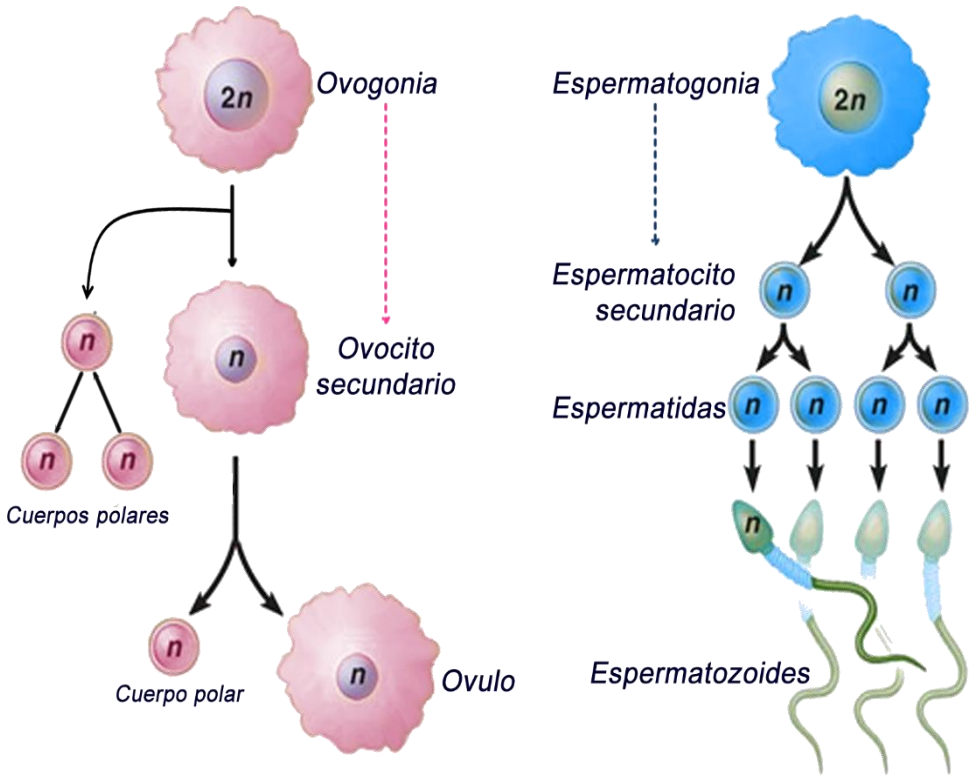


Figura 3.1. Proceso de gametogénesis (producción de gametos). En la ***ovogénesis*** se produce ***un*** solo gameto (***óvulo***) y tres cuerpos polares mientras que en la ***espermatogenésis*** se produce ***cuatro*** células funcionales (***espermatozoides***).

ESPERMATOGÉNESIS

Las células germinativas primordiales que se originan en el saco vitelino e ingresan a los testículos embrionarios, se diferencian a espermatogonias y permanecen en estado de letargo durante la niñez e inician la producción activa de espermatozoides al alcanzar la pubertad. Hacia la luz del túbulo las capas celulares son cada vez más maduras.

En los seres humanos la espermatogénesis (ver figura 3.1) dura entre 60 y 75 días. Comienza con la espermatogonia que contiene un número diploide (*2n*) de cromosomas, éstas se introducen dentro de la barrera hematotesticular y se diferencian a espermatocitos primarios *(2n)*, los cuales replican su DNA y entran en meiosis. Las dos células formadas en la meiosis I, se denominan espermatocitos secundarios.

En la meiosis II, las cromátidas de cada célula se separan, formándose 4 células haploides, que llamamos espermátides. A medida que las células espermatogénicas proliferan, no logran completar la citocinesis, separándose finalmente por el proceso de espermiogénesis.

OVOGÉNESIS

PRENATAL

En la etapa de formación embrionaria femenina, las células germinales se reproducen por mitosis sucesivas. Al llegar a las gónadas (ovarios) las células germinales continúan dividiéndose por mitosis donde se producen millares de ovogonias, que son células madres del ovario con toda la dotación genética de la especie (diploides). Las ovogonias dan origen por división mitótica a ovocitos primarios, también diploides. Los ovocitos primarios se rodean de células foliculares y epiteliales planas, formando el folículo primordial. Alrededor del séptimo mes de gestación, los ovocitos primarios comienzan a dividirse por meiosis I, pero al llegar al diploteno de la profase I, se detiene la división meiótica. Este prolongado lapso de inactividad, llamado dictiotena, culmina cuando se alcanza la pubertad, momento en que se reinicia el proceso de ovogénesis por acción hormonal. Se supone que las células foliculares segregan una sustancia que frena el proceso de maduración del ovocito primario.

POSNATAL

Las niñas nacen con folículos primarios que encierran a todos los ovocitos primarios en dictiotena, hasta que llega la madurez sexual. En ese momento empiezan a madurar los folículos y los ovocitos primarios aumentan de tamaño. Un poco antes de que la mujer ovule, concluye la meiosis I y se genera un ovocito secundario haploide y el primer cuerpo polar.

Cabe señalar que esta división no es proporcional en cuanto a volumen, ya el cuerpo polar, que más tarde se atrofia, es muy pequeño respecto del ovocito secundario, que obtiene casi todo su citoplasma. En la medida que exista fecundación, el ovocito secundario reanuda la meiosis II hasta el final, formándose un ovocito haploide maduro y un segundo y pequeño cuerpo polar que más tarde involuciona. Si no se produce la fecundación, el ovocito secundario es eliminado durante la menstruación. Cerca de dos millones de ovocitos primarios se forman en los ovarios durante la etapa embrionaria, aunque esa cantidad se reduce aproximadamente a 400000 al nacimiento. Al llegar la pubertad, la gran mayoría se atrofia, puesto que solo 400-500 ovocitos primarios diploides se transformarán en ovocitos secundarios haploides a lo largo de toda la vida reproductiva. Con la ovulación de cada ciclo sexual de 28 días, el ovocito secundario pasa del ovario a la trompa de Falopio, madurando de a uno por vez. Las hormonas segregadas por la hipófisis (gonadotrofinas) ejercen su acción sobre los ovarios. La hormona folículo estimulante (FSH) estimula al ovocito primario para que se convierta en secundario, mientras que la hormona luteneizante (LH) provoca la ovulación.

FOLICULOGÉNESIS

Los folículos ováricos son estructuras formados por un conglomerado de células granulosas que encierran a cada ovocito en el interior del ovario. Dentro de los folículos tiene lugar la ovogénesis. La foliculogénesis es la formación y maduración de los folículos ováricos, a partir del folículo primordial hasta períodos intermedios o finales. De acuerdo a la etapa de desarrollo, se distinguen distintos tipos de folículos como se observa en la figura 3.2.

- Folículos primordiales: se forman en la vida embrionaria y contiene una capa de células planas epiteliales y foliculares. Rodea al ovocito primario que está en dictiotena.
- Folículos primarios: están constituidos por células de forma cúbica que encierran ovocitos primarios, también en dictiotena, pero que han aumentadote tamaño.

- Folículos secundarios: tienen un diámetro cercano a 300 micras. Poseen varias capas de células granulosas que encierran a un ovocito secundario de 90-100 micrómetros.
- Folículos terciarios o de De Graaf: tienen un diámetro promedio de 20 mm. Están constituidos por varias capas de células granulosas que se van ahuecando, formando un antro que se llena de líquido a medida que se acerca a la superficie del ovario. El folículo terciario contiene a un ovocito secundario latente en la profase de la mitosis I (dictiotena) que se prepara para ser expulsado hacia la trompa de Falopio.

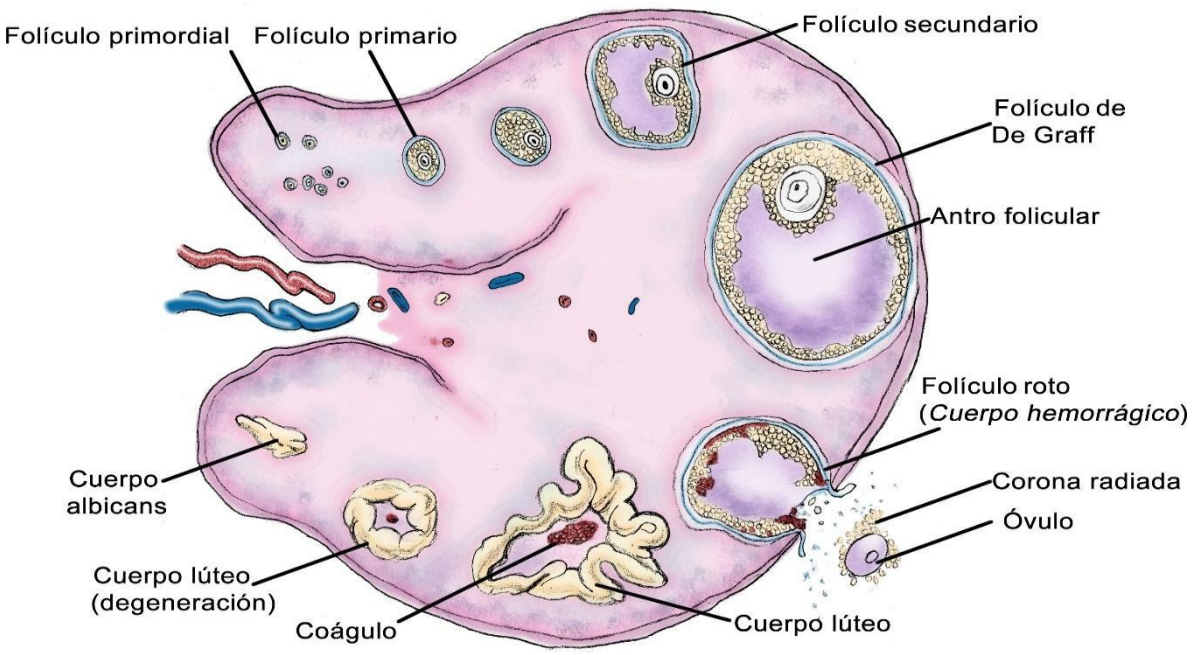


Figura 3.2. Desarrollo y maduración folicular.

MATERIAL

- Laminillas de cortes histológicos de ovario y testículo de humano y/o rata.

- Atlas de histología.

MÉTODO

Realizar observaciones de las laminillas al microscopio con los objetivos de 10x, 40x y 100x.

RESULTADOS

Esquematizar lo observado con cada objetivo y cada corte, identificando las diferentes estructuras encontradas.

ACTIVIDADES

1. Mencione las principales diferencias en los procesos de mitosis y meiosis.
2. Identifique las diferencias existentes entre espermatogénesis y ovogénesis.
3. ¿Cómo identifica a las células de Sertoli y de Leydig en un corte histológico?
4. Histológicamente, ¿cuáles son las principales diferencias entre en folículo secundario y uno terciario?
5. Describa el mecanismo de acción de los anticonceptivos orales en el ciclo ovárico.

REFERENCIAS

1. Tórtora,GJ, Reynolds GS. Principios de anatomía y fisiología. 11ª ed. México. University Oxford Press; 2011

Sección II
Fisiología de la reproducción

4. Análisis del semen (Espermatobioscopia)

OBJETIVOS

1. Realizar un examen macroscópico y microscópico del semen.
2. Describir las características morfológicas de los espermatozoides humanos a través de su observación *in vivo.*
3. Identificar las principales modificaciones estructurales de los espermatozoides.
4. Clasificar los espermatozoides de acuerdo a la motilidad.
5. Interpretar los resultados obtenidos comparándolos con valores de referencia.

ANTECEDENTES ACADÉMICO

- Anatomía del aparato reproductor masculino.
- Características morfológicas del espermatozoide
- Fisiología del semen.
- Esterilidad masculina

INTRODUCCIÓN

La fertilidad se define como la posibilidad fisiológica de procrear, así, la esterilidad e infertilidad suponen una situación carencial que no compromete la integridad física del individuo ni implica un riesgo vital, sin embargo, esta carencia puede incidir negativamente en el desarrollo de la persona, produciendo frustración y desmoralización. Por ello se consideran un problema de salud pública de trascendencia. El desarrollo de nuevas estrategias diagnósticas y novedosos procedimientos terapéuticos han sido ampliamente divulgados en los medios de comunicación, lo que ha facilitado el acceso de la mayoría de la población a los centros de reproducción asistida para abordar el problema.

ESTERILIDAD E INFERTILIDAD

Se entiende por *esterilidad* la incapacidad, tanto por parte del varón como de la mujer, para concebir. La esterilidad se clasifica en: primaria (cuando la pareja, tras un año de relaciones sin tomar medidas de protección, no ha conseguido un embarazo) y secundaria (la de la pareja que, tras la consecución del primer hijo, no logra una nueva gestación tras 2 o más años de intentarlo). El tiempo mínimo a partir del cual se habla de esterilidad se fija en un año de relaciones sexuales con deseo de descendencia.

El concepto de *infertilidad* es distinto: de acuerdo a la ***Organización Mundial de la Salud*** (***OMS***) y al ***International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology*** (***ICMART***) es la incapacidad de lograr un embarazo clínico después de 12 meses o más de relaciones sexuales no protegidas[8].

La esterilidad por factor masculino se refiere a la incapacidad de una pareja de lograrla concepción debido a problemas en el hombre. La mayoría de estos problemas están relacionados específicamente con los espermatozoides, el líquido seminal o los órganos reproductores del hombre.

El semen es una mezcla de espermatozoides formados en los túbulos seminíferos de los testículos y las secreciones de las vesículas seminales, próstata y glándulas bulbouretrales. Este líquido denominado seminal provee a los espermatozoides de un medio de transporte, nutrientes y protección.

El seminograma es la primera etapa diagnóstica de la infertilidad masculina. Este examen permite orientar hacia una participación masculina en la fertilidad de pareja y/o confirmarla.

---

8 **Glosario de terminología en Técnicas de Reproducción Asistida (TRA). Versión revisada y preparada por el International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) [http://goo.gl/Sto7fQ]**

MATERIAL

- Material biológico: semen humano.
- Cubreobjetos.
- Portaobjetos.
- Cámara de Neubauer.
- Cubrehematocímetro.
- Tiras de pH (rango de 6-10).
- Guantes.

REACTIVOS

- Colorante de Wright o Giemsa.
- Diluyente de Weigman (bicarbonato de sodio: 5 g; formol 30%: 1 mL; agua destilada csp: 100 mL).
-

Equipo

- Microscopio óptico.

MÉTODO

Abstinencia sexual

- La OMS recomienda una abstinencia entre dos y siete días.

Contenedor de recolección

- Los contenedores de recogida que se utilicen deben ser de cristal o plástico limpios, los cuales, antes de la recolección de la muestra deberán mantenerse a temperatura entre 20-40º C, para evitar la disminución de motilidad de los espermatozoides (riesgo de shock por frío), éste rango también deberá cuidarse durante el traslado al laboratorio.

Recolección de la muestra

- La muestra debe de obtenerse mediante masturbación.

IMPORTANTE: *La muestra de semen puede ser biológicamente peligrosa porque puede contener virus nocivos como los de la hepatitis, del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y herpes, por lo que deben manipularse siguiendo las medidas de seguridad.*

EVALUACIÓN MACROSCÓPICA

Licuefacción

- La evaluación de la licuefacción se realiza mediante observación visual. Cuando se eyacula el semen se transforma en una masa semisólida coagulada, posteriormente comienza a licuarse y homogeneizarse (15 a 60 minutos), la muestra debe permanecer a 37°C durante éste proceso. Las muestras normales, algunas veces se encuentran hilos de moco y cuerpos gelatinosos, los cuales no tienen significancia clínica, pero pueden interferir con el análisis. En algunos casos la licuefacción no se completa a los 60 minutos y deberá ser reportado.

Apariencia

- Se evalúa por inspección simple, después de la licuefacción (15 a 60 minutos). El semen normal deberá ser homogéneo, gris-opalescente.

Volumen

Se puede realizar por dos técnicas:

- **Método de pesada**. Para ello se debe asumir, de acuerdo al manual de la OMS, que la densidad de la muestra de semen es 1 g/mL. Por tanto, si la masa es igual al volumen, un gramo de semen corresponde a un mililitro. Se pesa el contenedor

vacío, y se etiqueta correctamente. Una vez recogida la muestra se vuelve a pesar el recipiente. La diferencia calculada proporcionará los gramos, que como hemos dicho anteriormente corresponderá al volumen de la muestra en mililitros.

- **Tubo cónico:** El volumen del eyaculado puede medirse también usando un cilindro o tubo graduado de base cónica.

IMPORTANTE: No se debe medir el volumen mediante transferencia a pipetas, jeringas o probetas.

pH

- Con una pipeta pasteur, extender uniformemente una gota de semen sobre papel sensible al pH (pH 6.4 a 8). Revisar el color a los 30 segundos y hacer la lectura. Como un control de calidad se debe verificar las tiras reactivas con soluciones patrón de pH para asegurar un buen resultado. Este parámetro deberá medirse dentro de la hora del eyaculado

Viscosidad

Se evalúa después de la licuefacción y puede denominarse “consistencia”. Se pueden utilizar dos métodos:

- Pipeta: Aspirar la muestra con una pipeta de 5 mL (puede ser pasteur) y luego permitir la libre caída de las gotas, para observar la longitud del filamento formado.
- Varilla de vidrio:También puede hacerse introduciendo una varilla de vidrio en la muestra, observando el filamento que forma al retirar la varilla.

Para evaluar este parámetro se toman las siguientes consideraciones:

a) viscosidad normal: se observan gotas pequeñas y bien definidas.
b) viscosidad anormal: se observa un filamento mayor a 2 cm.

EVALUACIÓN MICROSCÓPICA

Durante la investigación microscópica de la muestra se hacen estimaciones de la motilidad y concentración de los espermatozoides y se determina la presencia de células que no son espermatozoides y si hay aglutinación de espermatozoides.

Motilidad

Para la valoración de la movilidad, se monta el portaobjetos con 10 µL de muestra y se cubre con el cubreobjetos. Se deja en reposo un minuto a 37ºC y se sitúa en el microscopio, idealmente a una temperatura de 37ºC. Se observa con el objetivo de 40x. Consideraciones:

- Se debe hacer un doble recuento, para ello habrá que preparar dos portaobjetos.
- Al menos hay que contar cinco campos en cada uno de estos portaobjetos.
- Hay que contar al menos 200 espermatozoides por portaobjetos. Si no se consigue contando 5 campos, se deberá seguir hasta alcanzar ese número de 200.

La clasificación de los tipos de movilidad que introduce el quinto manual de la OMS ha supuesto un gran cambio con relación a manuales anteriores. En este nuevo manual se unifican en un solo tipo de movilidad, la movilidad progresiva, quedando por tanto sólo tres tipos de movilidad (ver figura 4.1).

- Espermatozoides inmóviles (IM).
- Espermatozoides con movilidad no progresiva (NP).
- Espermatozoides con movilidad progresiva (PR): lineal o en círculos amplios, independientemente de la velocidad.

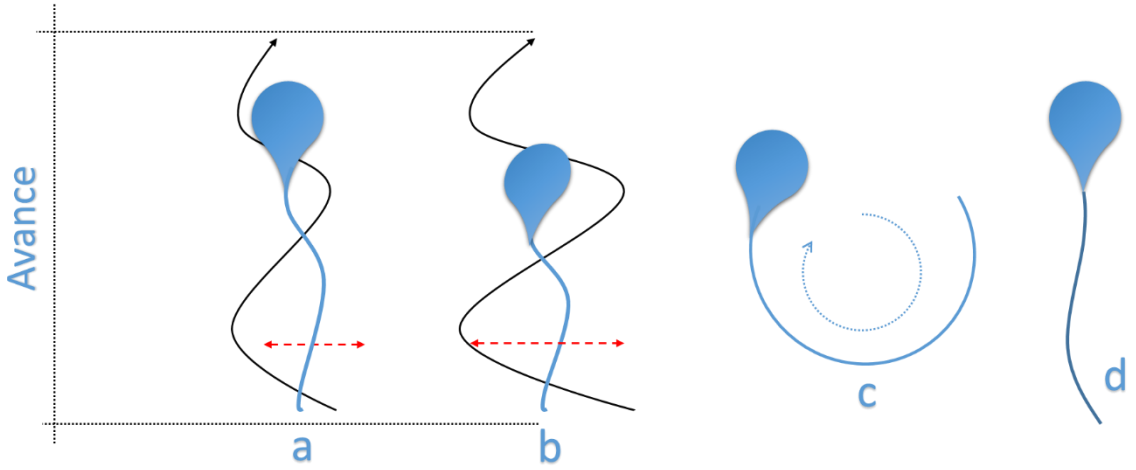


Figura 4.1. Tipos de movilidad de los espermatozoides (spz). ***(a)*** *Progresivo rápido, (**b**) progresivo lento (se agrupan en movilidad progresiva **spz-PR**), (**c**) es móvil no progresivo (**spz-NP**) ,y (**d**) es inmóvil (**spz-IM**).*

Estimación del recuento

Se Colocan 10 µL de muestra en un portaobjetos y se pone el cubreobjetos correspondiente. Se deja en reposo un minuto a 37ºC y se observa en el microscopio con el objetivo de 40X.

Según el número de espermatozoides que se cuenten se realizará una determinada dilución (cuadro 4.1).

Para realizar el conteo correctamente se deben considerar las siguientes recomendaciones:

• Examinar una muestra bien mezclada para que previo al conteo se determine cuál es la dilución apropiada para la muestra (Cuadro 4.1).

• Una vez determinada la dilución adecuada, mezclar y diluir la muestra utilizando una solución fijadora (Diluyente de Wiegman).

• Llenar la cámara de Neubauer y dejarla reposar en una cámara húmeda.

• Realizar la lectura dentro de los 10-15 minutos posteriores al llenado de la cámara.

• Contar al menos 200 espermatozoides.

• Calcular la concentración por mL.

• Calcular el número de espermatozoides por eyaculado.

Cuadro 4.1. Estimación de la dilución a utilizar en el recuento de espermatozoides.

400x	**Dilución**	**µL semen**	**µL diluyente**
>101	1/20	50	950
16-100	1/5	50	200
<16	1/2	50	50

Conteo de espermatozoides

Para realizar el conteo la muestra debe colocarse en la cámara de Neubauer. En función de la dilución realizada, debe elegirse el área de la cámara a contar. Para las diluciones 1:20 y 1:5, se contará el cuadro central de la cámara (Cuadro B de acuerdo al Anexo 2, cuadro de 1 mm x 1 mm). Si no se completasen 200 espermatozoides, se procederá a contar también el cuadro que encontramos a la derecha del cuadro central B (también de 1 mm x 1 mm) y si contando estos dos cuadros no se completasen 200 espermatozoides, también se contará el cuadro de la izquierda (de 1 mm x 1 mm).

En muestran más diluidas, (por ejemplo 1:1) se contarán los nueve cuadros de 1 mm x 1 mm, es decir, toda la cámara.

En cuanto a los espermatozoides, deben contarse sólo los que estén completos, es decir cabeza y cola.

Para evitar contar por duplicado los espermatozoides que se encuentren en las líneas divisorias de cuadros adyacentes, se contarán sólo los que estén sobre dos de las cuatro líneas, se recomienda los de las líneas izquierda e inferior (siguiendo un patrón como en forma de L).

CÁLCULO FINAL

Para realizar el cálculo, debe considerarse la dilución hecha, el número y dimensiones de los cuadros contados así como la profundidad de la cámara, datos que han de sustituirse en la siguiente relación, de la cual obtendremos el resultado en mm^3 .

$$\frac{Cel}{mm^3} = \frac{\#_C FD}{C_C A^2 P}$$

Donde:

$\#_C$ = Número de espermatozoides contados.

FD = Factor de dilución.

C_C = Número de cuadros contados.

A_2 = Área de los cuadros contados.

P = Profundidad, este valor es de 0.1 mm al utilizar el cubrehematocímetro.

Dado que el resultado obtenido es por mm_3 debe multiplicarse por 1000 para tener el resultado por mL y posteriormente, debe multiplicarse por el volumen de eyaculado para tener el número total de espermatozoides en el eyaculado.

MORFOLOGÍA

Elegir dos portaobjetos y limpiarlos por ambos lados. Identificarlos. Hacer una extensión con otro portaobjetos formando un ángulo de unos 45º y tocando la gota para arrastrar en el sentido opuesto a donde se colocó la gota. Se recomienda lograr una velocidad tal que se emplee aproximadamente un segundo en el arrastre de la gota sobre el portaobjetos. Se ha de realizar por duplicado, posteriormente secar al aire las extensiones y proceder a teñir con colorante de Wrigth (ver anexo 4).

Interpretación de la morfología

- Realizar la observación a 40x e inmersión.

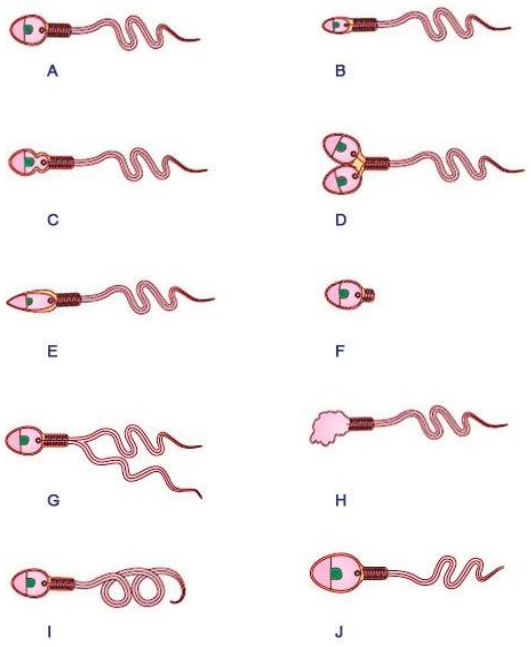


Figura 4.3. Algunos defectos en la morfología de los espermatozoides; (**A**) normal, (**B**) microcéfalo o cabeza de alfiler, (**C**) cabeza estrangulada, (**D**) bicéfalo, (**E**) cabeza cónica, (**F**) espermatide, (**G**) doble cola, (**H**) cabeza amorfa, (**I**) cola enrollada y (**J**) macrocéfalo.

AGREGACIONES

Las agregaciones son la adherencia de espermatozoides (inmóviles o móviles) a filamentos de moco, células no espermáticas o detritos. No son específicas, no tienen ninguna significación clínica.

AGLUTINACIONES

Las aglutinaciones son espermatozoides móviles adheridos a otros espermatozoides móviles, éstas sí son específicas, por lo que pueden tener significación clínica. No son evidencia suficiente para deducir la presencia de anticuerpos anti-espermatozoides, pero sí sugieren investigar su presencia.

Existen diferentes tipos, en cuanto al lugar de unión (cabeza-cabeza, cola-cola, cabeza-cola) y al número de espermatozoides unidos. La aglutinacion debe ser evaluada en el momento de evaluar la motilidad de los espermatozoides. El tipo de aglutinación
se debe reportar (por ejemplo, cabeza con cabeza, cola con cola o de formas mixtas). Se puede utilizar una escala semicuantitativa desde - (sin aglutinación) hasta +++ (agrupamiento masivo en el cual todos los espermatozoides móviles están aglutinados).

CÉLULAS ESPERMÁTICAS

El eyaculado contiene otras células y su identificación puede ser clínicamente relevante. Son las llamadas células no espermáticas, que incluyen a células epiteliales y células redondas. El nombre genérico de células redondas engloba a células germinales inmaduras y a leucocitos.

VALORES DE REFERENCIA

PARÁMETRO	VALOR
Licuefacción	<60 minutos
Viscosidad	≤ 2 cm
Apariencia	Homogéneo, gris opalescente
pH	≥ 7.2
Agregación	Sin interés
Aglutinación	No concluyente
Volumen (mL)	1.5
Concentración de espermatozoides (10^6/mL)	15
Espermatozoides totales (10^6/Eyaculado)	39
Movilidad total (%)	40
Movilidad progresiva (%)	32
Morfología normal (%)	40

RESULTADOS:

Descargar el formato correspondiente.

REFERENCIAS

1. Álvarez, C., Castilla, J.A., Martínez, L., Ramírez, J.P., Vergara, F., & Gaforio, J.J. (2003). Biological variation of seminal parameters in healthy subjects. *Human Reproduction*, 18, 2082-2088. http://dx.doi.org/10.1093/humrep/deg430
2. Carlsen, E., Jorgen, H.P., Andersson, A.M., & Niels, E.S. (2004). Effects of ejaculatory frequency and season on variations in semen quality. *Fertil Steril*, 82, 358-366. http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.01.039
3. Carreras, A., Ramírez, J.P., & Mendoza, C. (1992). Sperm plasma membrane integrity measurement: A combined method. *Andrología*, 24, 335-340. http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0272.1992.tb02665.x
4. WHO (2010). WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen (5th Ed.).
5. Toro-Montoya, Al. (2009). Espermiograma. Medicina & Laboratorio, 15, 145-169.
6. Vásquez, F., & Vásquez Echeverri, D. (2007). El espermiograma y su utilidad clínica. Salud Uninorte. Barranquilla (Col.) 23(2), 220-230.

5. Endocrinología del embarazo

OBJETIVOS

1. Analizar los cambios hormonales presentes en el embarazo.
2. Identificar el fundamento de las técnicas de aglutinación.
3. Determinar la presencia de la hCG mediante la técnica de inmunocromatografía.

ANTECEDENTES ACADÉMICOS

- Reacción antígeno-anticuerpo
- Regulación hormonal del embarazo.
- Características fisiológicas de la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG).
- Fundamento de las técnicas de aglutinación para la determinación de hCG.
- Fundamento de la técnica de inmunoensayo cromatográfico para la detección de hCG.

INTRODUCCIÓN

De acuerdo con la guía Diagnóstica de Consulta Externa del Hospital General de México[9], el embarazo es

> *"La gestación o proceso de crecimiento y desarrollo de un nuevo individuo en el seno materno. Abarca desde el momento de la concepción hasta el nacimiento pasando por la etapa de embrión y feto. En el ser humano la duración media es de 269 días (cerca de 10 meses lunares o 9 meses-calendario)."*

[9] http://www.hgm.salud.gob.mx/descargas/pdf/area_medica/consul_exter/guia_embarazo.pdf

Para la OMS el embarazo inicia cuando termina la implantación, esto ocurre 5 o 6 días después de la fertilización. En 2007 el Comité de Aspectos Éticos de la Reproducción Humana y la Salud de las Mujeres de la ***Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia*** (***FIGO***) definió al embarazo como la parte del proceso de la reproducción humana que comienza con la implantación del *conceptus* en la mujer. Y aunque el embarazo no es precisamente una enfermedad, la 10 edición de la Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE 10ª) la clasifica dentro del

- ***Capítulo XXI:*** *Factores que influyen en el estado de salud y contacto con los servicios de salud (Z00-Z99)*
    - *Z30-Z39: Personas en contacto con los servicios de salud en circunstancias relacionadas con la reproducción*
        - *Z33: Estado de Embarazo*

Lo anterior se debe a la sintomatología propia del embarazo y que hacen necesario la atención y el cuidado del personal de la salud.

Las modificaciones endocrinas, fisiológicas y anatómicas que acompañan al embarazo dan origen a síntomas y signos que proporcionan indicios de la existencia de éste. Estos signos y síntomas se clasifican en tres grupos: sospecha, probabilidad y certeza.

Cuadro 5.1. Signos y síntomas relacionados a la existencia de embarazo.

Existencia de embarazo	Signos y síntomas
Sospecha	● *Náuseas con o sin vómitos* ● *Perturbaciones de la micción* ● *Fatiga* ● *Percepción de movimientos fetales* ● *Interrupción de la menstruación* ● *Cambios en las mamas* ● *Cambio de color en la mucosa vaginal*

Existencia de embarazo	Signos y síntomas
	• *Aumento de la pigmentación cutánea y desarrollo de estrías abdominales.* • *De especial importancia es que la mujer ¿cree estar embarazada?*
Probabilidad	• *Aumento del tamaño del abdomen.* • *Cambio de la forma, tamaño y consistencia del útero.* • *Modificación anatómica del cuello uterino.* • *Contracciones de Braxton Hicks[10].* • *Peloteo.* • *Contorno físico del feto.* • *Presencia de la gonadotropina coriónica humana (hCG) en plasma y orina.*
Certeza	• *Identificación de la actividad cardiaca fetal.* • *Percepción de movimientos fetales.* • *Reconocimiento del embrión y del feto por econografía, en cualquier momento del embarazo o del feto maduro en la segunda mitad del embarazo por radiografía.*

GONADOTROPINA CORIÓNICA HUMANA (HCG)

La presencia de gonadotropina coriónica humana (hCG) en el plasma materno y su excreción en orina son la base de los estudios endocrinos de embarazo, debido a que esta

[10] Serie de contracciones uterinas regulares e indoloras.

hormona es detectable tanto en suero como en orina de 7 a 10 días tras la concepción y alcanza un nivel máximo en el primer trimestre de embarazo. Desde la semana 10 a la 18 los niveles séricos comienzan a disminuir con lentitud hasta que al final del segundo trimestre se observa una caída en su concentración que ya no se recupera a lo largo del embarazo. Por lo tanto, para detectar la presencia de esta hormona es de suma importancia el tiempo de embarazo, el cual puede diagnosticarse por diversas técnicas, ya sea de inmunoensayo o biológicas.

La hCG es importante en el reconocimiento materno del embarazo porque evita la degeneración del cuerpo lúteo, principal productor de progesterona durante las primeras seis semanas de embarazo y previene la involución del cuerpo lúteo. Es semejante a la hormona luteinizante (**LH**) por lo que fácilmente se une a los receptores de esta última como los que se encuentran en ovarios (cuerpo lúteo) y testículos (células de Leydig).

Químicamente, la hCG es una glucoproteína con alto contenido de carbohidratos, conformada por dos subunidades (**α** y **β**) unidas por enlaces no covalentes. Gracias a que se ha identificado la estructura así como los genes que codifican para cada una de las subunidades hoy en día es posible utilizar anticuerpos dirigidos a la fracción β de la hCG, que tiene la característica de no presentar reacción cruzada con la LH.

Su síntesis se lleva a cabo exclusivamente en el ***sincitiotrofoblasto***, comienza casi al momento de la implantación alcanzando un máximo entre los días 60 y 70, declinando posteriormente entre el 100 y 130 día hasta alcanzar un mínimo.

DETERMINACIÓN DE HCG

Para la determinación cualitativa de la gonadotropina coriónica se utilizan distintos procedimientos, como por ejemplo el ***inmunoensayo cromatográfico***. Esta prueba es sencilla, rápida y sólo requiere una muestra de orina. Para entender el principio de estas técnicas se hará una breve descripción de cada una.

REACCIONES DE AGLUTINACIÓN

Se considera una reacción de ***aglutinación*** cuando un antígeno (que se encuentra adherido a la superficie celular) se une al correspondiente anticuerpo y se forman agregados que pueden ser visibles a simple vista o microscópicamente. Éstos se ven influenciados por diversos factores tales como: la carga, el tipo de anticuerpo, la concentración de antígenos y anticuerpos y la temperatura.

Con relación a la temperatura, existe una óptima para la aglutinación. Algunos antígenos se unen mejor al anticuerpo a 37°C (termoaglutininas), mientras que otros lo hacen mejor a 4°C (crioaglutininas). El tiempo de incubación también es un factor importante, por lo tanto existen tiempos óptimos para cada tipo de reacción.

Importante*: En pruebas inmunológicas (reacción Antígeno-Anticuerpo [Ag-Ac]) es fundamental cuidar la relación de Ag y Ac para evitar los resultados dudosos o ambiguos ya que un exceso de alguno de ellos puede afectar las reacciones de aglutinación al inhibir la formación del agregado, esto se conoce como fenómeno de* ***zona****. La formación del agregado es máxima a una concentración óptima de antígenos y anticuerpos (****zona de equivalencia****), mientras que un exceso de anticuerpos (****prozona****) o un exceso de antígenos (****postzona****) pueden causar la inhibición del agregado.*

Las técnicas de aglutinación más comunes son las de aglutinación directa, las de aglutinación indirecta, la inhibición de la aglutinación, entre otras.

INMUNOENSAYO CROMATOGRÁFICO

Este tipo de reacción es llevada a cabo mediante el uso de una "***tira reactiva"*** para la detección cualitativa de la hGC en orina o suero, para el diagnóstico precoz del embarazo. La prueba utiliza dos líneas para indicar los resultados: *línea de la prueba* que utiliza una combinación de anticuerpos que incluyen un anticuerpo monoclonal hCG para detectar selectivamente niveles elevados de hCG y una *línea de control* que se compone por

anticuerpos policlonales y partículas coloidales.

La tira reactiva consta de tres anticuerpos (Ac), de los cuales los dos primeros **Ac1** y **Ac2** se unen selectivamente a la hGC, además de que Ac1 se encuentra acoplado a un cromóforo, el tercero (**Ac3**) es selectivo a Ac1, ver figura 5.1a.

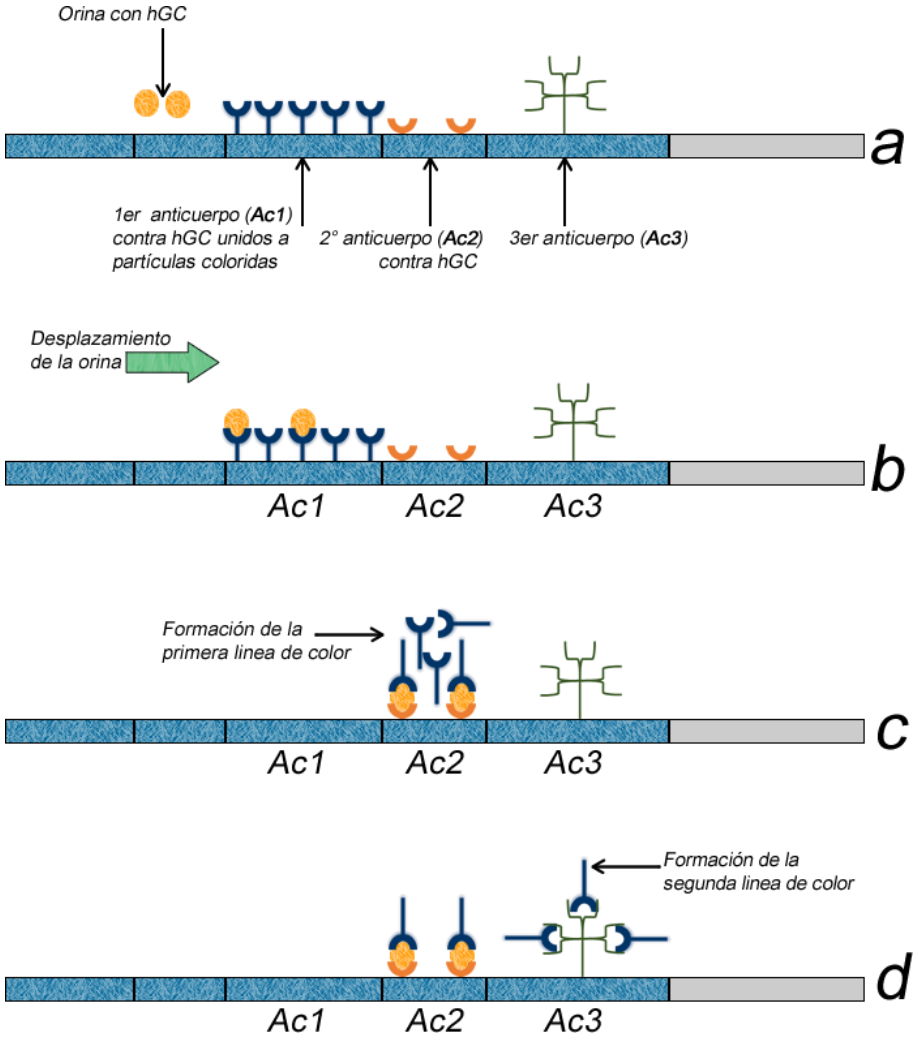


Figura 5.1 Fundamento de la prueba en tira reactiva

Al sumergir la tira en la orina ésta migrará por acción capilar a través de la membrana para

reaccionar con el Ac1, ver figura 5.1b, el complejo **Ac1-hGC** es arrastrado al anticuerpo Ac2 para así formar una nueva unión (**Ac1-hGC-Ac2**) la cual se pone de manifiesto con la aparición de una línea de color (***línea de prueba***), ver figura 5.1c, el anticuerpo Ac1 que no se unió a la hGC migra hasta el anticuerpo **Ac3** formando el complejo **Ac1-Ac3** y se visualiza mediante una segunda línea colorida (***línea de control***), ver figura 5.1d.

Las muestras positivas reaccionan con el conjugado de color del anticuerpo específico anti-hCG para formar una línea de color en la región de la línea de la prueba de la membrana. La ausencia de esta línea de color sugiere un resultado negativo, ver figura 5.2. El no observar ninguna línea de color en la tira, es indicador de mal funcionamiento de la tira, no puede confiarse en el resultado.

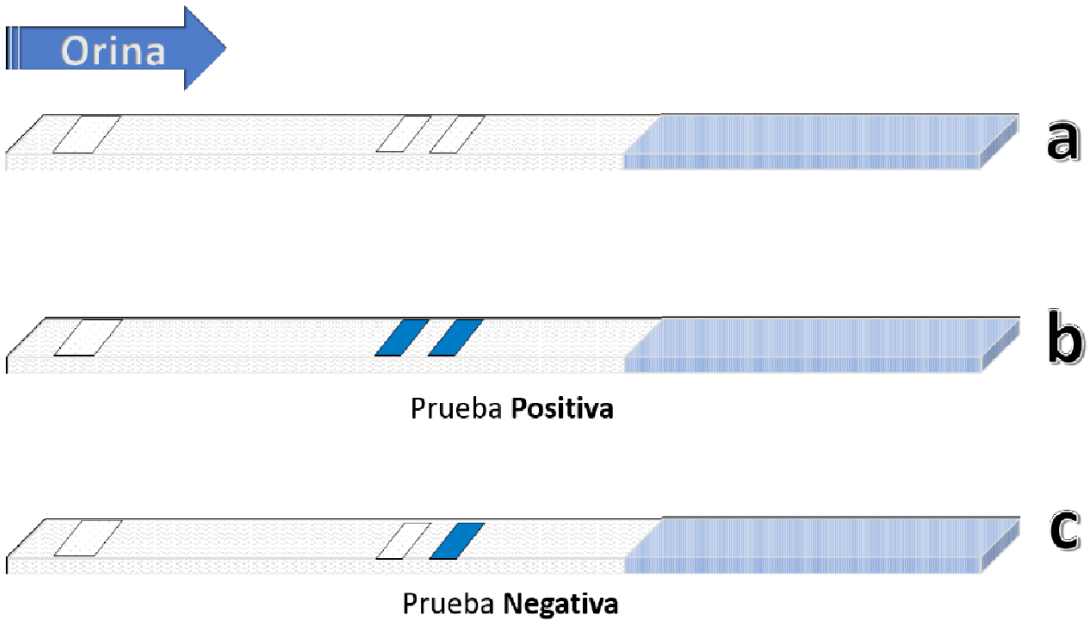


Figura 5.2. Interpretación de la tira reactiva, una vez que la orina fluye (**a**) pueden observarse ***dos bandas*** de color por lo que se considera una prueba ***positiva*** (**b**) o bien sólo mostrar ***una banda*** y considerarse ***negativa*** (**c**).

MATERIAL BIOLÓGICO

- Muestra de orina del primer trimestre de embarazo

MATERIAL

- Pipetas Pasteur
- Sanitas
- Frasco estéril para recolección de muestra de orina

REACTIVOS

- Kit de reactivos para determinación de hCG

MÉTODO

Seguir la técnica indicada por el profesor y que se encuentra disponible en el blog.

RESULTADOS

Interpretar si existe o no presencia de hCG

VALORES DE REFERENCIA

Revisar especificaciones en el inserto de la técnica.

ACTIVIDADES

1. ¿Qué utilidad tiene la determinación de la hCG en orina y la determinación en sangre?
2. ¿En qué padecimientos se encuentran aumentados los niveles de hCG?
3. ¿Por qué se debe utilizar una muestra de orina de mujer que no rebase el tercer trimestre del embarazo?
4. ¿Cuáles son las hormonas involucradas durante el embarazo y en qué orden

cronológico se presentan?

REFERENCIAS

1. Costanzo LS. Fisiología. Barcelona, España: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
2. Cunningham FG, Williams Obstetricia. 21ª Edición. España: Editorial Médica Panamericana; 2002
3. Fuentes Arderiu X. Codex Del Laboratorio Clínico: Indicaciones e Interpretación De Los Exámenes De Laboratorio. Madrid: Elsevier; 2003.
4. González de Buitrago J. Tecnología y métodos del laboratorio clínico. Barcelona: Salvat; 1992.
5. Silverthorn, DE. Fisiología humana. Un enfoque integrado. 4.a ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2008.
6. Tortora GJ, Derrickson B. Principios de Anatomía y Fisiología. 15ª ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2018.

Sección III

Fisiología de la sangre

6. Morfología y fisiología de los eritrocitos

OBJETIVOS

1. Realizar la citometría hemática para la serie roja, incluyendo el cálculo de los índices eritrocitarios.
2. Interpretar los valores obtenidos en cada determinación.
3. Discutir la correlación clínico-patológica de los valores obtenidos.

ANTECEDENTES ACADÉMICOS

- Obtención de muestras de sangre capilar y venosa.
- Principales componentes de la sangre.
- Mecanismo de acción de los principales anticoagulantes (EDTA, citratos y heparina).
- Morfología de las células sanguíneas.
- Papel funcional de la hemoglobina.
- Cuantificación de la hemoglobina.
- Clasificación de las anemias.
- Uso clínico de la citometría hemática para el diagnóstico de anemias.

INTRODUCCIÓN

La sangre, considerada por siglos la esencia de la vida, ha sido materia de estudio de hombres ilustres como Hipócrates (año 400 a.C.), Anton van Leeuwenhoeck (1632-1723), William Harvey y Karl Vierordt, a quien se le atribuye el primer informe de resultados cuantitativos del análisis de las células sanguíneas en el año de 1852.

Actualmente la hematología es considerada una ciencia que aplica los conceptos fundamentales de la biología y la química al diagnóstico y tratamiento de trastornos o enfermedades relacionadas con la sangre o manifestaciones en ésta y en la médula ósea.

Entre sus principales estudios, se halla la llamada biometría hemática, actualmente denominada ***citometría hemática***. Este término resulta ser el más adecuado para aludir a la medición de las células de la sangre (citos = célula, metros = medida, haemo, haematos = sangre), de modo que se denomina así al estudio de laboratorio cuyo fin es informar sobre el número y características de dichas células.

La correcta interpretación de la citometría hemática conlleva el análisis minucioso de los datos de la serie trombocítica, la serie blanca y de la llamada serie roja, que se refiere a la serie de determinaciones que involucran al eritrocito. La citometría hemática enfocada a la serie roja la cual constituye el objeto de estudio de la presente práctica es útil para el diagnóstico y vigilancia de diversos trastornos, pero se utiliza más a menudo para el seguimiento de pacientes con quimioterapia o radioterapia, y también para establecer el diagnóstico de síndrome anémico. Dentro de los datos más relevantes que arroja dicho estudio se encuentra la medición directa de la hemoglobina, el hematocrito y la cuenta de eritrocitos, además de cálculos adicionales que brindan más información, entre ellos los llamados índices eritrocitarios.

Los índices eritrocitarios resultan de suma importancia pues generan información detallada de los eritrocitos, a saber el primero de ellos llamado VCM (volumen corpuscular medio) expresa el volumen de un eritrocito, el segundo, denominado HCM (hemoglobina corpuscular media) expresa el peso promedio (contenido) de hemoglobina en un eritrocito, y el último de ellos conocido como CMHC (concentración media de hemoglobina corpuscular) expresa la concentración promedio de hemoglobina por unidad de volumen de eritrocitos. Como se mencionó anteriormente, la interpretación integral de la citometría de la serie roja resulta ser una gran herramienta diagnóstica para la detección de anemia. Se considera que existe anemia cuando la concentración de hemoglobina en los eritrocitos o el hematocrito están por debajo del límite inferior del 95% del intervalo de referencia para la edad, género y localización geográfica del paciente. Dado que la anemia es considerada un síndrome, tiene varias causas; en realidad hay aproximadamente 500 factores causales y en cada paciente la causa debe determinarse con exactitud con la finalidad de instituir un

tratamiento apropiado.

Aunque se han propuesto varios esquemas de clasificación, es posible clasificar a las anemias por su morfología o su función (fisiopatología).

Las anemias desde el punto de vista morfológico suelen clasificarse de acuerdo con el tamaño promedio y concentración de hemoglobina de los eritrocitos, según lo indican los índices eritrocitarios en apoyo con la observación de los frotis donde se visualiza la palidez o hipocromía asociada a bajas concentraciones de hemoglobina. Las categorías generales de la clasificación morfológica incluyen: macrocítica-normocrómica, normocítica-normocrómica y microcítica-hipocrómica.

Desde el punto de vista fisiológico, las anemias suelen ser el resultado de tres mecanismos: 1) un defecto de proliferación, 2) un defecto en la maduración, y 3) un defecto en la supervivencia (aumento de la destrucción) de los eritrocitos.

Un incremento en los elementos de la serie roja, puede ser indicativo de una ***Policitemia***.

Este estudio es clave en la práctica clínica, de ahí su importancia.

MÉTODO

Para estas pruebas se requiere una muestra de sangre anticoagulada, por lo cual se debe realizar la toma de muestra de sangre venosa (consultar el **Anexo 3** correspondiente a la toma de muestra) empleando EDTA como anticoagulante.

Con esta muestra se hacen las diferentes determinaciones, a continuación, se presentarán cada una de las pruebas.

A) FROTIS SANGUÍNEO

Material

- Material biológico: muestra de sangre anticoagulada.
- Portaobjetos
- Pipeta Pasteur

Reactivos

- Colorante de Wright o colorante Giemsa.

Equipo

- Microscopio

Técnica

Seguir la técnica indicada en el **Anexo 5** referente a la elaboración de frotis sanguíneos.

B) Conteo de glóbulos rojos (Técnica Manual).

Material

- Material biológico: muestra de sangre anticoagulada.
- Pipeta Thoma para glóbulos rojos.
- Tubo de ensayo de 13 x 100 mm.
- Gradilla.
- Cámara de Neubauer.

Reactivos

- Líquido diluyente de Hayem (consultar preparación en el **Anexo 2**).

Equipo

- Microscopio

Técnica

Seguir la técnica indicada en el **Anexo 2** empleando la pipeta Thoma para eritrocitos.

C) Hematócrito (Hto)

Material

- Material biológico: muestra de sangre anticoagulada.
- Pipeta Pasteur.
- Tubo Wintrobe (para el Macrohematocrito)
- Tubos capilares (para el Microhematocrito)
- Tubos de ensayo 13 x 100 mm.

Reactivos

- Líquido diluyente de Hayem (consultar preparación en el **Anexo 2**).

Equipo

- Centrífuga clínica (para el Macrohematocrito)
- Microcentrífuga para capilares (para el Microhematocrito)
- Lector de Hto

Técnica

Macrohematócrito.

- Utilizando una pipeta Pasteur larga, se llena de sangre el tubo de Wintrobe exactamente hasta la marca de 10 evitando que se formen burbujas.
- Centrifugar a 3000 rpm durante 30 minutos.
- Realizar la lectura de la altura de la columna de glóbulos rojos en la escala ascendente del lado derecho del tubo, cada línea equivale al 1%.
- Reportar en porcentaje.

Microhematócrito.

- Llenar dos terceras partes de un tubo capilar con sangre venosa.
- Sellar el tubo a la flama o con plastilina por el extremo más distante a la sangre con el objeto de no hemolizarla.
- Colocar en la microcentrífuga.
- Centrifugar de 10,000 a 12,000 rpm durante 5 minutos.
- Determinar el hematocrito utilizando el lector.

Importante: *En caso de no contar con una microcentrífuga para Hto, hacerlo en una centrífuga clínica a 3,000 rpm durante 30 minutos*.

D) Concentración de Hemoglobina

Material

- Material biológico: muestra de sangre anticoagulada.
- Celdas para espectrofotómetro
- Pipeta Pasteur.
- Pipeta Sahli con boquilla y adaptador.
- Pipeta volumétrica de 5 mL.
- Tubo de Wintrobe.
- Tubos capilares.
- Tubos de ensayo 13 x 100 mm

Reactivos

- Solución de Drabkin:
    - Disolver 2 g de bicarbonato de sodio, 50 mg de cianuro de potasio y 200 mg de ferricianuro de potasio en agua destilada (2L).
- Solución estándar de hemoglobina.
- Alcohol al 70%

Equipo

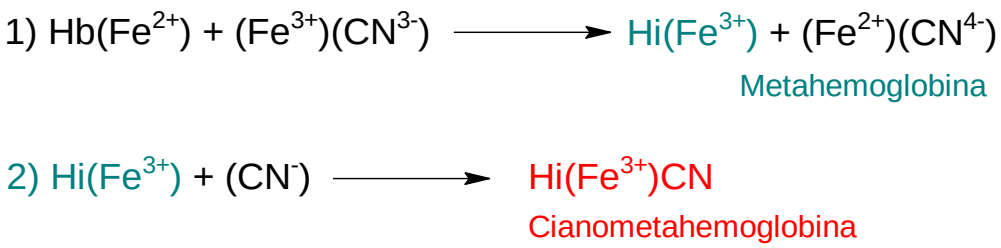
- Espectrofotómetro

Técnica

- Colocar 5 mL de reactivo de Drabkin en un tubo de 13 X 100 mm.
- Tomar una pipeta de Sahli y llenar exactamente con sangre hasta la marca (20 ⌈L).
- Limpiar la sangre adherida al exterior de la pipeta con una gasa.

- Transferir el contenido de la pipeta de Sahli a la solución reactiva, enjuagando tres veces la pipeta en la solución (la dilución final es de 1:251).
- Mezclar la sangre con la solución Drabkin mediante rotación del tubo.
- Dejar en reposo durante 10 minutos para la formación de ***cianometahemoglobina***.
- Leer la absorbancia a 540 nm contra un blanco de reactivos.
- Realizar el mismo procedimiento con la solución estándar.
- Calcular la concentración de hemoglobina empleando la técnica de comparación con un estándar.

PRINCIPIO DE LA REACCIÓN



E) ÍNDICES ERITROCITARIOS DE WINTROBE

Sobre la base del recuento de eritrocitos y de los valores de hemoglobina y hematocrito pueden formularse características de glóbulos rojos individuales (índices eritrocitarios de Wintrobe) que ayudan al diagnóstico de las anemias.

- **Volumen Corpuscular Medio (VCM)**

$$VCM\ (fL) = \frac{Hto}{GR} x10$$

- **Hemoglobina Corpuscular Media (HCM)**

$$HCM\ (pg) = \frac{Hb}{GR} x10$$

- **Concentración Media de Hemoglobina Corpuscular (CMHC)**

$$CMHC\ (\%) = \frac{Hb}{Hto} x100$$

RESULTADOS

Determinación	**Valores de Referencia** (tomados del IMSS)	**Resultados**
Glóbulos Rojos	• Hombres: 4.5 - 5.9 millones/mm³ • Mujeres: 4.1 - 5.1 millones/mm³	
Hematocrito	*Macrohematocrito:* • Hombres: 42 - 50% • Mujeres: 36 - 45%	
	Microhematocrito: • Hombres: 47% • Mujeres: 42%	
Hemoglobina	• Hombres: 14 - 17.5 g / dL • Mujeres: 13.3 - 15.3 g / dL	
VCM	80.0 - 96.1 fL	
HCM	27.5 - 33.2 pg	
CMHC	33.4 - 35.5 %	

ACTIVIDADES

1. ¿Qué diferencia existe entre el suero y el plasma?
2. Mencione el mecanismo de acción de los siguientes anticoagulantes: EDTA K3, citrato de sodio y heparina.
3. Explique el fundamento de la reacción de la hemoglobina con el reactivo de Drabkin.
4. ¿El número de glóbulos rojos varía con el nivel del mar? ¿Por qué?
5. ¿Qué indican los índices de Wintrobe?
6. ¿Qué caracteriza a la policitemia?

REFERENCIAS

1. Ruiz Arguelles, Guillermo J. Fundamentos de hematología. 2ª ed. México, DF: Médica Panamericana, 1998.
2. Turgeon, Mary Louise. Hematología clínica: teoría y procedimientos. 4ª ed. México, DF : Manual Moderno, 2006.
3. McKenzie, Shirlyn B. Hematología clínica. 2ª ed. México : Manual Moderno, 2000.
4. Wintrobe, M. R. Lee, J. Foerster, J. Lukens. Wintrobe´s. Clinical Hematology. 10 ed. Lippincott, Williams & Wilkins. 1999.

7. Morfología y fisiología de los leucocitos

OBJETIVOS

1. Usar las técnicas hematológicas de recuento de leucocitos, tinciones y recuento diferencial leucocitario por frotis sanguíneo.
2. Diferenciar los tipos de leucocitos presentes en un frotis de sangre periférica.
3. Comparar los resultados obtenidos con los intervalos de referencia establecidos para cada técnica.
4. Inferir un estado clínico con base en los resultados.

ANTECEDENTES ACADÉMICOS

- Tipos y métodos de obtención de muestras de sangre.
- Tipos y usos de anticoagulantes.
- Hematopoyesis
- Morfología de los leucocitos.
- Fundamento de los métodos de tinción de extendidos de sangre periférica.
- Métodos de recuento manual de células.
- Alteraciones patológicas leucocitarias.

INTRODUCCIÓN

La hematopoyesis (hemopoyesis) es el proceso mediante el cual se producen los elementos formes de la sangre (eritrocitos, plaquetas y leucocitos), a partir de células madre pluripotenciales que se diferencian en células madre mieloides y linfoides. (Figura 7.1).

Los leucocitos o glóbulos blancos a diferencia del eritrocito, poseen núcleo, pero carecen de hemoglobina. Se clasifican conforme a la presencia o ausencia de vesículas citoplásmicas protuberantes (gránulos) en:

- **Granulocitos**, donde se incluyen los neutrófilos polimorfonucleares (neutrófilos segmentados), eosinófilos y basófilos.
- **Agranulocitos**, donde están los linfocitos y monocitos. Aunque se clasifican en esta categoría estos leucocitos si poseen gránulos citoplásmicos, solo que, por ser tan pequeños y no fácilmente teñibles, no son visibles con el microscopio de luz.

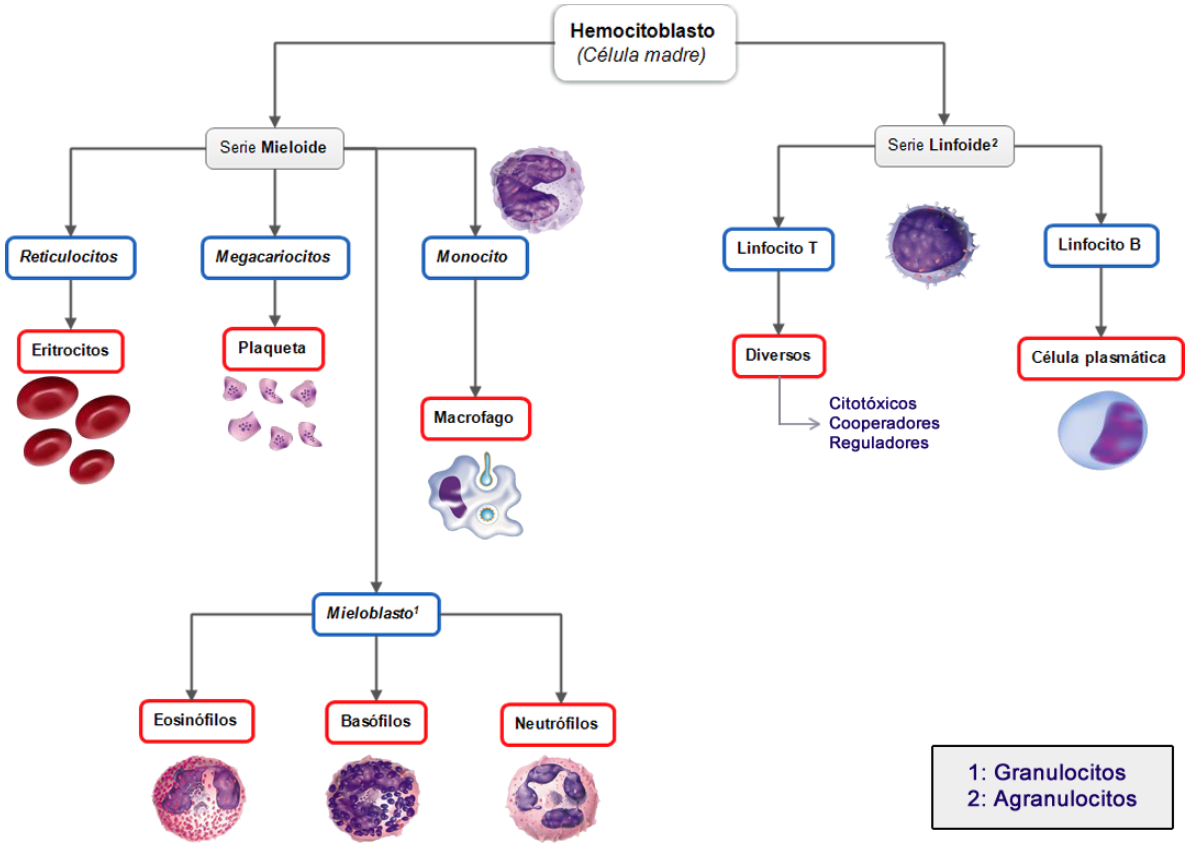


Figura 7.1. Hematopoyesis

Los leucocitos forman parte del sistema de protección del organismo, mediante la sangre son transportados a la zona específica de acción. Los monocitos y los granulocitos se desarrollan a partir de las células madre mieloides, se encargan de los microorganismos

invasores mediante fagocitosis. Mientras los linfocitos se diferencian a partir de células madre linfoides y junto con las células plasmáticas forman parte del sistema inmune.

El aumento en el número de leucocitos en sangre se denomina **leucocitosis** y es una respuesta protectora ante microorganismos invasores, ejercicio físico extenuante o anestesia. En cambio, una disminución en el número de leucocitos totales se llama **leucopenia** y es causada por radiaciones, intoxicaciones medicamentosas y enfermedades crónicas. Ver cuadro 7.1.

Cuadro 7.1. Causas de aumento y disminución en el recuento diferencial de leucocitos.

TIPO DE LEUCOCITO	CAUSAS DE RECUENTO ALTO	CAUSA DE RECUENTO BAJO
Neutrófilos	Infecciones bacterianas, quemaduras, estrés e inflamación.	Exposición a radiaciones, intoxicaciones por medicamentos, deficiencia de vitamina B12 y lupus eritematoso sistémico.
Linfocitos	Infecciones virales y algunas leucemias y linfomas.	Enfermedades crónicas (falla renal), inmunosupresión y tratamiento con cortisol.
Monocitos	Infecciones virales y micóticas, tuberculosis, algunas leucemias y otras enfermedades crónicas.	Depresión de médula ósea y tratamiento con cortisol.
Eosinófilos	Reacciones alérgicas, infestaciones parasitarias y enfermedades autoinmunes.	Intoxicación por medicamentos y estrés.
Basófilos	Reacciones alérgicas, procesos inflamatorios crónicos (leucemias, cáncer e hipotiroidismo).	Embarazo, ovulación, estrés e hipertiroidismo.

MATERIALES

- Material biológico:

- Sangre anticoagulada con EDTA

- Microscopio óptico
- Cámara de Neubauer
- Portaobjetos de vidrio 75 x 25 mm
- Pipetas tipo Pasteur
- Pipeta de Thoma para leucocitos

REACTIVOS

- Colorante de Wright
- Líquido de Turk (ver **Anexo 2** para la preparación).

MÉTODO

Recuento manual de leucocitos

1. Homogenizar por mezclado la muestra de sangre anticoagulada.
2. Llenar la pipeta de Thoma para glóbulos blancos, hacer la dilución con el líquido de Turk. (Seguir la técnica de llenado de pipeta y de la cámara de Neubauer conforme al **Anexo 2**)
3. Calcular el número de leucocitos por µL (mm^3) de sangre, de acuerdo a lo establecido en el **Anexo 2**.

Preparación de frotis

1. Se efectúa el frotis sanguíneo siguiendo la técnica descrita en el **Anexo 5**.
2. Se tiñe conforme a la técnica de Wrigth.

Recuento diferencial de leucocitos

1. Observar el frotis sanguíneo con objetivo 40x (seco fuerte) para buscar un área

donde las células se encuentran uniformemente distribuidas. Figura 7.2.

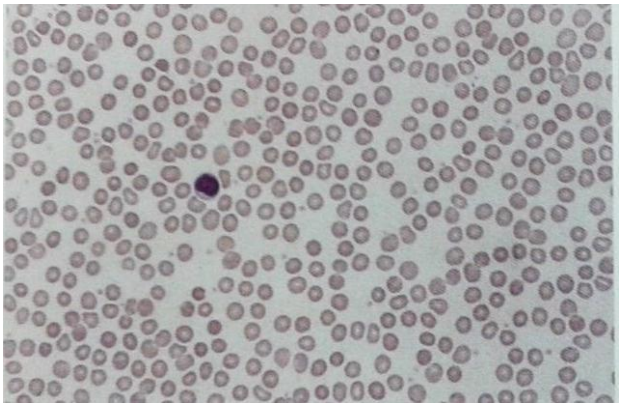


Figura 7.2. Área de correcta distribución celular en un frotis sanguíneo

2. Pasar a objetivo 100x (inmersión) y comenzar el recuento diferencial (clasificando los leucocitos según su tipo) contando 100 leucocitos consecutivos.
   Para el conteo emplear un recorrido en el frotis con el patrón de guarda griega o almena. Figura 7.3

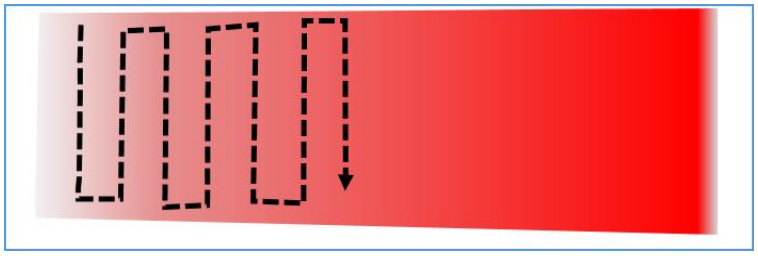


Figura 7.3. Patrón de guarda griega o almena para el recuento diferencial de leucocitos

3. Informar en porcentaje los resultados de cada tipo de leucocito observado durante el recuento.

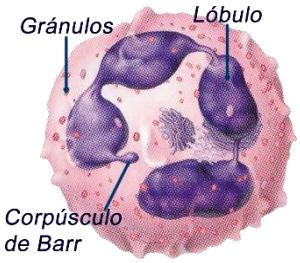
RESULTADOS

Recuento manual de leucocitos

Los valores de referencia varían ligeramente según la población estudiada, y deben ser establecidos por cada laboratorio. En la Ciudad de México, los valores normales promedio de leucocitos en adultos sanos son de 3800 a 11000/ µL (mm^3) de sangre.

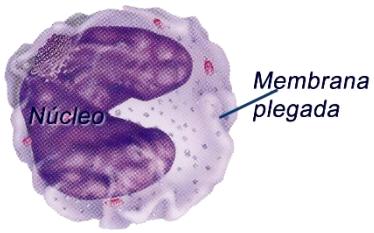
RECUENTO DIFERENCIAL DE LEUCOCITOS

Neutrófilo polimorfonuclear (PMN)



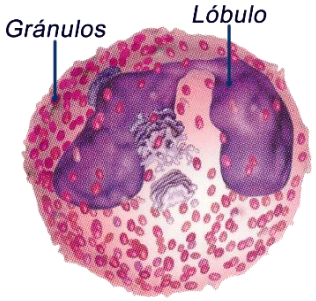
Tamaño:	10-15 µm
Núcleo (N):	2-5 lóbulos conectados por filamentos delgados de cromatina
Citoplasma (C):	Azul pálido a rosa
Relación N/C:	Predomina citoplasma
Intervalo de referencia:	
Médula ósea	3-11 %
Sangre periférica	40-82 %

Monocito



Tamaño:	12-20 µm
Núcleo (N):	Variable; puede ser redondo con forma de hendidura o de riñón.
Citoplasma (C):	Azul grisáceo. Puede presentar seudópodos.
Relación N/C:	Variable
Intervalo de referencia:	
Médula ósea	2 %
Sangre periférica	2-13 %

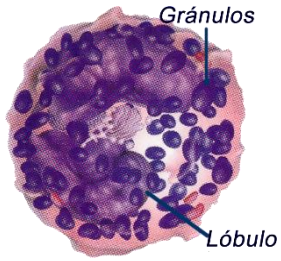
Eosinófilo



Tamaño:	12-17 µm
Núcleo (N):	2-3 lóbulos conectados por filamentos delgados sin cromatina visible.

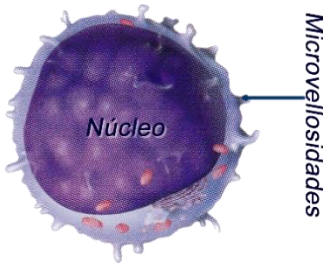
Citoplasma (C):	Rosa
Relación N/C:	Predomina el citoplasma.
Intervalo de referencia:	
Médula ósea	0-3 %
Sangre periférica	0-3 %

Basófilo



Tamaño:	10-14 µm
Núcleo (N):	Generalmente 2 lóbulos conectados por filamentos delgados.
Citoplasma (C):	Lavanda a incoloro
Relación N/C:	Predomina el citoplasma
Intervalo de referencia:	
Médula ósea	<1 %
Sangre periférica	0-3 %

Linfocitos



Tamaño:	7-8 µm
Núcleo (N):	Redondo a ovalado, puede ser ligeramente indentado.
Citoplasma (C):	Escaso o moderado de color azul cielo o celeste.
Relación N/C:	3-5 a 1
Intervalo de referencia:	
Médula ósea	5-15 %
Sangre periférica	13-50 %

Los resultados obtenidos se registran en el formato para descargar en el blog.

ACTIVIDADES

1. Mencionar las alteraciones nucleares y citoplasmáticas que pueden presentar los leucocitos.
2. Definir qué es leucemia y elaborar un diagrama de flujo donde se clasifiquen los

tipos de leucemia que se conocen.

REFERENCIAS

1. Carr JH, Rodak BF. Atlas de hematología clínica. 3ª ed. China: Médica Panamericana; 2011.
2. Guyton AC, Hall JE. Tratado de fisiología médica. 10ª ed. México: McGraw Hill Interamericana; 2001.
3. Hurtado MR, Mellado Ortiz Y, Flores Rico G, Vargas Viveros P. Semiología de la citometría hemática. Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM [revista en internet] 2010 Julio-agosto [acceso 8 de octubre de 2013]; 53(4). Disponible en: www.ejournal.unam.mx/rfm/no53-4/RFM053000405.pdf
4. Ruiz Argüelles GJ. Fundamentos de hematología. 4ª ed. México: Médica Panamericana; 2009.
5. Tortora GJ, Grabowski S. Principios de anatomía y fisiología. 9ª ed. México: Oxford University Press; 2002.

8. Catabolismo de la hemoglobina

OBJETIVOS

1. Analizar el metabolismo de la bilirrubina.
2. Cuantificar la bilirrubina total y la bilirrubina directa.
3. Relacionar la importancia de cada uno de los pigmentos en el estudio de la función hepática.

ANTECEDENTES ACADÉMICOS

- Anatomía y funciones del hígado
- Metabolismo de bilirrubinas
- Fundamento de la determinación de bilirrubinas
- Causas de hiperbilirrubinemia

INTRODUCCIÓN

El hígado produce y segrega de 250 a 1 00 mL de bilis por día, un líquido verde y de sabor amargo que interviene en los procesos de la digestión y cuyos componentes se muestran en el cuadro 8.1.

Cuadro 8.1. Composición de la bilis.

Componentes de la bilis
Pigmento biliar (bilirrubina)
Sales biliares
Fosfolípidos (principalmente lecitina)
Colesterol
Iones inorgánicos

Además de su función digestiva, la bilis sirve como ruta de excreción para el producto resultante de la transformación del grupo hemo de la hemoglobina.

Al carecer de núcleo, los eritrocitos de los mamíferos no son capaces de renovarse y se autodestruyen tras intervalos característicos. En el ser humano, la vida media del eritrocito es de 120 días. Aproximadamente el 80% de los 250-400 mg/dL de bilirrubina que se forman diariamente proceden de la hemoglobina de los eritrocitos envejecidos. El compuesto porfirínico más abundante en los vertebrados es el hemo de la hemoglobina y de varias hemoproteínas como mioglobina, citocromos, catalasa, etc.

Esta conversión tiene lugar predominantemente en las *células reticuloendoteliales* del hígado, el bazo y la médula ósea, es un proceso que se produce en diferentes etapas las cuales se describen a continuación.

FORMACIÓN DE BILIRRUBINA

La porción hemo es oxidada por la hemo oxigenasa, una enzima del sistema reticuloendotelial (SRE), en presencia de NADPH y O_2 por medio de una reacción de función mixta ya que abre el anillo y convierte uno de los carbonos del puente de meteno en monóxido de carbono (CO) y libera el hierro del tetrapirrol lineal resultante, pigmento al que se ha denominado ***biliverdina*** por su color verde oscuro (figura 8.1).

El hierro liberado es oxidado de ferroso a férrico y se une a la transferrina para ser transportado a las reservas de almacenamiento en la médula ósea con la finalidad de ser reutilizado en la producción de eritrocitos, mientras que los aminoácidos liberados de la porción globina de la molécula de hemoglobina se catabolizan o reutilizan para la síntesis proteica (*figura 8.4*).

A continuación, la biliverdina se reduce a ***bilirrubina***, de color naranja-rojo, en una reacción catalizada por la biliverdina reductasa. Mientras tanto el CO difunde fuera de la célula, luego

se transporta en la sangre a los pulmones donde abandona el cuerpo por la espiración (figura 8.2).

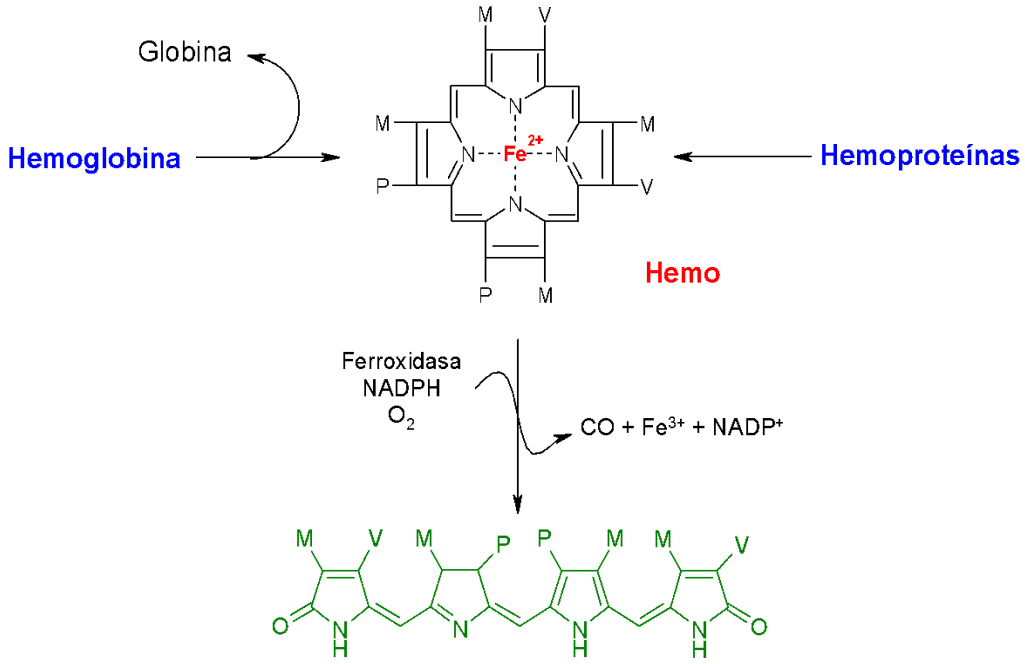


Figura 8.1. *Formación de biliverdina*

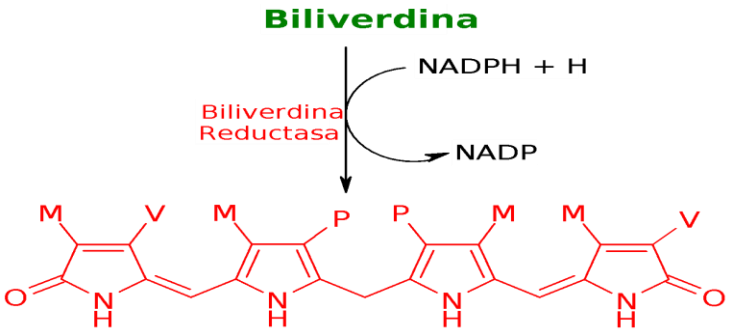


Figura 8.2. *Formación de bilirrubina*

CAPTACIÓN DE BILIRRUBINA EN EL HÍGADO

La bilirrubina es bastante tóxica e insoluble, se sabe que afecta inhibiendo la síntesis de proteínas y el metabolismo de los hidratos de carbono en el cerebro, por lo tanto para su eliminación como componente de la bilis intervienen varios sistemas orgánicos. En primer lugar forma complejos con la albúmina sérica para transportarse al hígado; esta forma de bilirrubina se conoce como ***bilirrubina no conjugada o indirecta***. Una vez en el hígado, la bilirrubina no conjugada pasa al espacio sinusoidal en donde es liberada de la albúmina y es transportada por la proteína llamada ligandina hasta el retículo endoplásmico.

CONJUGACIÓN DE BILIRRUBINA

Allí es rápidamente conjugada cuando los grupos carboxilo de los propionilo de la bilirrubina se esterifican mediante la conjugación con dos moléculas de ácido glucurónico (*figura 8.3*) para formar productos solubles o ***bilirrubina conjugada*** tales como: monoglucurónidos y diglucurónidos de bilirrubina (UDPA=ácido UDP-glucurónico). Estos productos son secretados desde el hepatocito hacia los canalículos biliares como parte de la bilis. Este paso dependiente de energía y limitante de la velocidad es susceptible a alteraciones en caso de enfermedad hepática. Lo normal es que no se excrete bilirrubina no conjugada en la bilis.

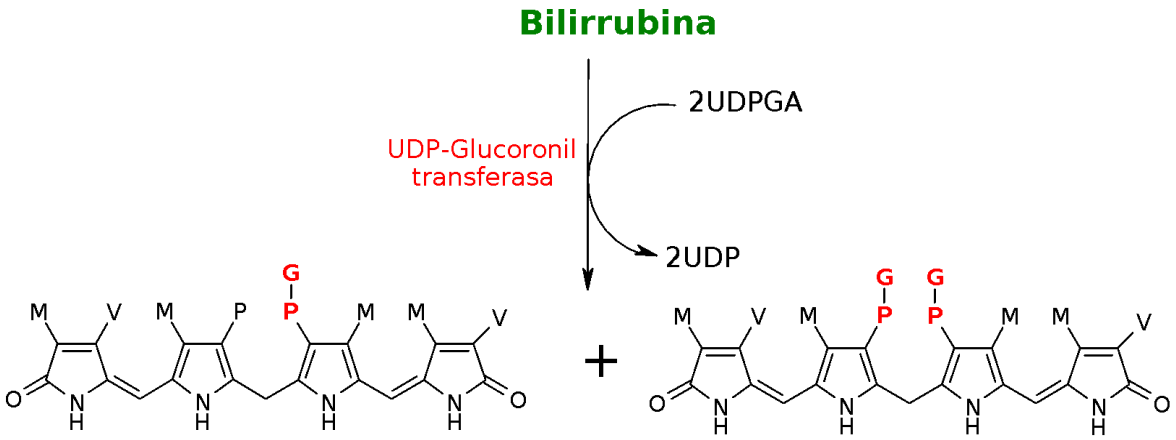


Figura 8.3. *Conjugación de bilirrubina*

FORMACIÓN DE UROBILINAS

Una vez en el ducto hepático este se combina con secreciones de la vesícula biliar para ser expulsados a los intestinos. Las bacterias intestinales de la porción más baja de este transforman la bilirrubina conjugada en mesobilirrubina, la cual es reducida a mesobilirrubinógeno y después a urobilinógeno un compuesto incoloro. Aproximadamente el 80% del urobilinógeno es oxidado por acción de las bacterias intestinales hasta un compuesto color café característico llamado urobilina o estercobilina y es excretado en las heces.

Hay dos cosas que pueden suceder con el 20% del urobilinógeno restante. La mayoría se reabsorbe por el intestino y entra a la vena porta hepática para ser reciclada a través del hígado para su posterior re-excreción a la bilis, proceso conocido como ciclo enterohepático de urobilinógeno. La otra pequeña cantidad entrará a la circulación sistémica y será filtrada por los riñones donde se convierte en urobilina amarilla y excretada en la orina. Casi toda la bilirrubina formada es eliminada en heces y sólo una pequeña cantidad de urobilinógeno pasa a la orina. Ver metabolismo completo en la figura 8.3.

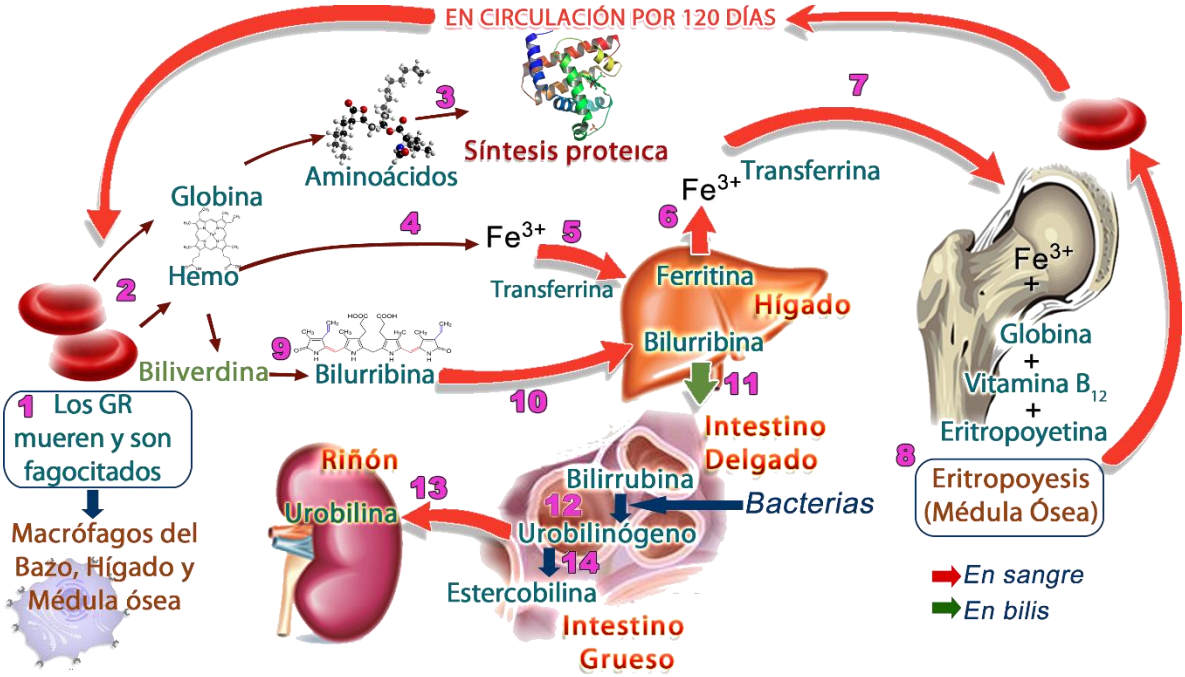


Figura 8.3. *Metabolismo de los pigmentos biliares*

ELEVACIÓN DE BILIRRUBINAS

Un adulto saludable tiene muy bajos niveles de bilirrubina total en suero (0.2-1.0 mg/dL) y de esta cantidad la mayoría se encuentra en forma no conjugada.

Dado que en la degradación del hemo participan varios sistemas orgánicos, existen muy diversas posibilidades de que falle alguna parte del proceso. Cuando el catabolismo del hemo es defectuoso, se acumula la bilirrubina en la sangre. Este defecto se detecta en primer lugar por la aparición del color amarillento característico que confiere la bilirrubina a la piel, lechos ungueales y a las escleróticas. Este hecho denominado ***ictericia***, aunque no es una enfermedad casi siempre es un síntoma de un trastorno subyacente y se observa por ejemplo en las enfermedades hepáticas agudas o crónicas, en la obstrucción de la vía

biliar, en las reacciones de incompatibilidad de Rh de los recién nacidos o en los recién nacidos prematuros.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE BILIRRUBINAS

DIAZOREACCIÓN

La reacción de la bilirrubina con solución de ácido sulfanílico diazotado para formar un producto coloreado fue descrito por primera vez por Ehrlich en 1883 usando muestras de orina. Desde entonces, este tipo de reacción en la que se usa bilirrubina con solución de ácido sulfanílico diazotado se ha referido de forma clásica como *diazo reacción.* En 1913, van den Bergh descubrió que la diazo reacción puede ser aplicada a muestras de suero, pero sólo en presencia de un acelerador o solubilizador. Sin embargo, este método tiene errores asociados. No fue hasta 1937 que Malloy y Evelyn desarrollaron el primer método clínicamente útil para la cuantificación de bilirrubina en muestras de suero utilizando la reacción diazo clásica con una solución de metanol al 50% como un acelerador. Hoy en día, todos los métodos comúnmente utilizados para medir bilirrubina y sus fracciones son modificaciones de la técnica descrita por Malloy y Evelyn.

MEDICIÓN DE BILIRRUBINA TOTAL Y CONJUGADA

Las determinaciones colorimétricas de laboratorio se basan en las características de la bilirrubina, la ***bilirrubina no conjugada o indirecta*** es una molécula no polar, insoluble en agua que en el plasma se encuentra unida a la albúmina. Debido a estas características la bilirrubina no conjugada sólo reaccionará con la solución de ácido sulfanílico diazotado (reactivo diazo) en presencia de un acelerador (solubilizante). Por otro lado, la ***bilirrubina conjugada o directa*** es un compuesto polar y soluble en agua que se encuentra en el plasma en estado libre (no ligado a ninguna proteína). Este tipo de bilirrubina va a reaccionar con solución de ácido sulfanílico diazotado directamente (sin un acelerador). Si

bien durante muchos años los resultados de bilirrubina eran reportados como bilirrubina directa e indirecta, esta terminología es ahora anticuada. Ahora los resultados de bilirrubina directa e indirecta deben ser reportados como bilirrubina conjugada y no conjugada, respectivamente.

Una tercera fracción de bilirrubina se conoce como *"delta"* bilirrubina (**-bilirrubina**). La *-bilirrubina* es una bilirrubina conjugada que está unida covalentemente a la albúmina. Esta fracción de bilirrubina es vista sólo cuando hay una obstrucción hepática significativa.

Debido a que esta molécula está unida a la albúmina es demasiado grande para ser filtrada por el glomérulo, por lo tanto, no se excreta en la orina. Cuando esta fracción de la bilirrubina está presente, va a reaccionar en la mayoría de los métodos de laboratorio como la bilirrubina conjugada. Por lo tanto, la bilirrubina total se compone de tres fracciones: conjugado, no conjugada, y delta bilirrubina. Las tres fracciones juntas se conocen como la bilirrubina total. Por lo tanto, al determinar la concentración de bilirrubina total y la bilirrubina conjugada se puede calcular la concentración de bilirrubina no conjugada al restarla de la bilirrubina total.

MATERIAL

- Material Biológico: Suero
- Tubos para extracción sanguínea
- Sistema de extracción sanguínea
- Ligadura
- Algodón
- Pipetas graduadas de 0.1 mL
- Pipetas graduadas de 5 mL

REACTIVOS

- Kit de reactivos para bilirrubinas
- Alcohol
- Hipoclorito de sodio

EQUIPO

- Espectrofotómetro

MÉTODO

Seguir la técnica del inserto correspondiente y disponible en bct2manual.wordpress.com.

RESULTADOS

Anotar los resultados de las absorbancias para bilirrubina total (BT) y bilirrubina conjugada (BC) y realizar el cálculo para obtener las concentraciones de acuerdo al inserto.

Obtener la concentración de la bilirrubina no conjugada (BNC) por medio de la fórmula:

$$BNC = BT - BC$$

Al obtener las concentraciones llenar el formato de reporte correspondiente.

VALORES DE REFERENCIA

Pigmento en suero	Valor de referencia
Bilirrubina total	**0,2 a 1,0 mg/dL**
Bilirrubina conjugada	**0 a 0,2 mg/dL**
Bilirrubina no conjugada	**0,2 a 0,8 mg/dL**

ACTIVIDADES

1. ¿Qué diferencias existen entre la bilirrubina conjugada y la bilirrubina no conjugada?
2. Elabore una tabla en la que incluya la clasificación de las ictericias, las causas y

cómo se encuentran las bilirrubinas en la sangre y en la orina.

3. ¿Qué es la acolia y a qué se debe?
4. Explique brevemente qué es el kernicterus.
5. ¿Cuál es el tratamiento de la ictericia neonatal y por qué?

REFERENCIAS

1. Barret, KM. Ganong, Fisiología Médica. 24 Edición. China: Editorial McGrawHill; 2013.
2. Bishop M. Clinical Chemistry: techniques, principles, correlations. 6th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2010.
3. Champe CP. Bioquímica. 3a Edición. México: McGrawHill; 2005.
4. Fox SI. Fisiología humana. 12a ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2011.
5. Mathews. CK. Bioquímica. 3ª Edición. España: Editorial Addison Wesley; 2002.
6. Mckee T. Bioquímica, la base molecular de la vida. 3ª Edición. España: McGrawHill Interamericana; 2003.
7. McPherson, MD. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 22nd edition. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2011.

9. Hemostasia

OBJETIVOS

1. Realizar las pruebas básicas de coagulación
2. Interpretar los resultados obtenidos en cada determinación
3. Discutir la correlación clínico-patológica de los valores obtenidos.

ANTECEDENTES ACADÉMICOS

- Características morfológicas y fisiológicas de las plaquetas
- Eventos involucrados en la fase primaria de la hemostasia
- Factores de coagulación
- Activación de la fase fluida de la hemostasia
- Eventos involucrados en la fase fluida de la hemostasia anteriormente denominada cascada de coagulación.
- Fundamento de las pruebas básicas de coagulación.
- Principales alteraciones clínico-patológicas de la hemostasia
- Uso del citrato de sodio como anticoagulante en pruebas de coagulación sanguínea.

INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad, los hombres asociaron la sangre con la vida cuando empezaron a construir herramientas y a cazar animales. Un animal herido que perdía sangre se debilitaba y moría si la pérdida era bastante grande; por consecuencia, la conclusión lógica que se obtuvo fue que la sangre es necesaria para vivir.

Con el paso del tiempo la sangre se relacionó directamente con el estado de salud, a tal grado que los médicos de las civilizaciones occidentales creían que los espíritus malignos que causaban enfermedades circulaban en ella, y que la única forma de eliminarlos era extraer la sangre que los contenía, pero claro es que la sangría se debía realizar con extrema prudencia. Sin lugar a dudas esta práctica mató más gente que la que curó.

Hoy se sabe que, tras una lesión traumática, como la incisión en un dedo, se seccionan vasos sanguíneos, lo que resulta en hemorragia. Para minimizar la pérdida de la sangre, se movilizan plaquetas y proteínas disueltas en el plasma que forman una barrera que "cierra" los vasos lesionados. A esta serie de procesos se le conoce como ***hemostasia*** (del griego *haima* = sangre y *stasis* = detener).

La hemostasia conlleva una serie de etapas llamadas: hemostasia primaria, hemostasia secundaria y fibrinólisis. En la hemostasia primaria las plaquetas interactúan entre ellas y con los vasos sanguíneos para dar como resultado un tapón hemostático primario que aunque es débil, detiene temporalmente el sangrado; para darle estabilidad, debe adherirse una red proteica (red de fibrina). Esta red se forma gracias a reacciones bioquímicas entre algunas proteínas disueltas en el plasma (factores de coagulación). A esta serie de eventos que transforman al tapón plaquetario inicial en un coágulo estable se les conoce como hemostasia secundaria. Por cuestiones didácticas se ha dividido en fase intrínseca y extrínseca (figura 9.1).

Finalmente, después de reparada la lesión, otros componentes del sistema hemostático rompen y retiran el coágulo en una última etapa llamada fibrinólisis.

En esta práctica se desarrollarán las principales pruebas enfocadas a la evaluación de la hemostasia, lo que en la práctica clínica suele llamarse perfil de coagulación; estas pruebas son:

- Tiempo de sangrado considerada una medición *"in vivo"* de la adhesión y agregación plaquetaria, proporciona una estimación de la integridad del tapón plaquetario y por

tanto mide la interacción entre los capilares y las plaquetas.

- Tiempo de coagulación, definida como el tiempo necesario para que una muestra de sangre sin anticoagulante forme el coágulo, es la medida de la actividad total del sistema intrínseco de coagulación.
- Retracción del coágulo que de forma indirecta evalúa el número y funcionalidad de las plaquetas, ya que se estima que la retracción del coágulo se produce por la vinculación de los pseudópodos de las plaquetas adyacentes entre sí con las tiras de fibrina. La actina y otras proteínas contráctiles dentro de los pseudópodos hacen que las plaquetas se contraigan.
- Tiempo de tromboplastina parcial activada que mide el tiempo necesario para generar trombina y polímeros de fibrina mediante la vía intrínseca de la fase fluida de la hemostasia.
- Tiempo de protrombina es considerada una prueba de detección importante para la evaluación de los pacientes con deficiencias hereditarias o adquiridas en las vías extrínsecas y común de la cascada de coagulación, ya que evalúa la activación de la fase fluida de la coagulación a través de la formación del complejo tromboplastina / factor VII.
- Solubilidad del coágulo en urea que evalúa la estabilidad de un coágulo dada por el factor XIII. Un coágulo estabilizado por dicho factor no se solubiliza en una solución de urea 5M.
- Resistencia capilar que evalúa la fragilidad capilar mediante la formación de petequias que indican aumento de la permeabilidad de los vasos sanguíneo.

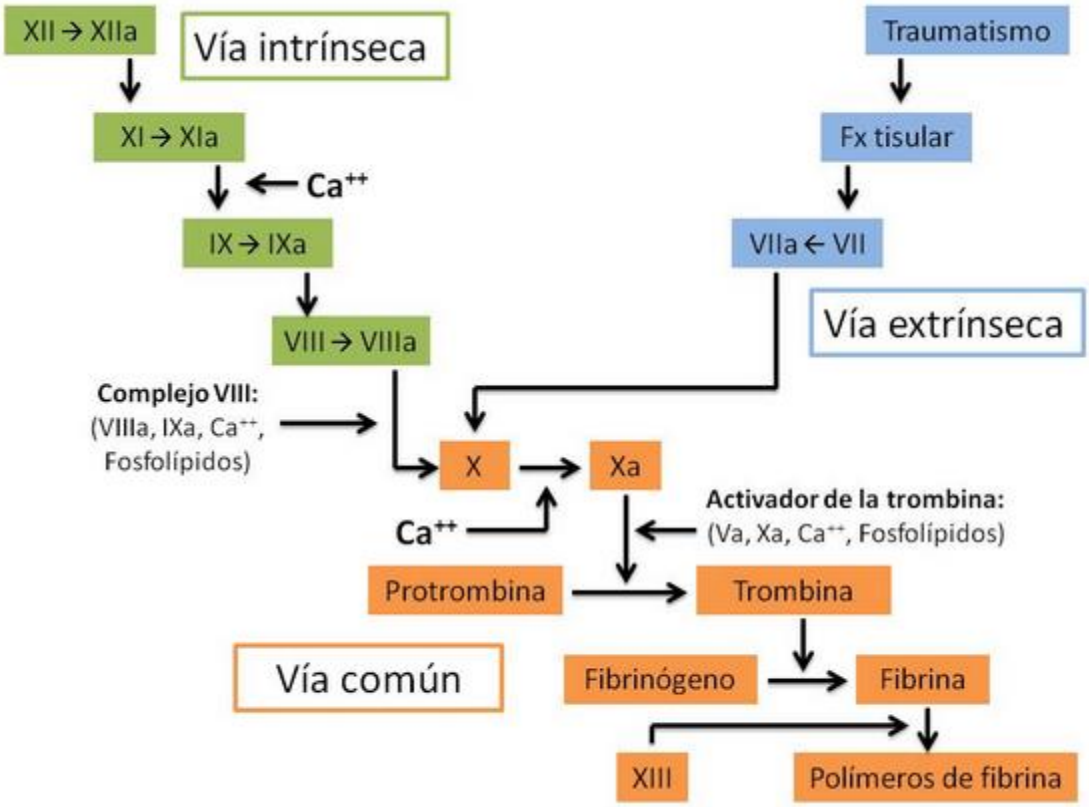


Figura 9.1 Fase fluida de la coagulación.

MÉTODO

A) REALIZAR TOMA DE MUESTRA DE SANGRE VENOSA.

Revisar técnica e información sobre anticoagulantes en el **Anexo 3**.

Material

- 1 tubo con tapón rojo (sin anticoagulante)
- 1 tubo con tapón azul (citrato sódico)
- 1 tubo con tapón lila (EDTA)
- Lancetas
- Torundas
- Sistema de extracción sanguínea

B) TIEMPO DE COAGULACIÓN (TC)

Material

- Tubo con muestra sin anticoagulante
- Cronómetro

Equipo

- Sistema de baño maría

Técnica

- Inmediatamente después de tomada la muestra de sangre sin anticoagulante (tubo rojo), activar el cronómetro y esperar hasta la formación del coágulo manteniendo el tubo en baño a 37°C.
- Registrar el tiempo en minutos.

Importante: *Conservar la muestra, pues se utilizará para la prueba de retracción del coágulo*.

C) RETRACCIÓN DEL COÁGULO (RC)

Material

- Tubo con sangre coagulada de la prueba de tiempo de coagulación.
- Regla
- Asa bacteriológica o aplicador de madera

Equipo

- Baño María

- Cronómetro

Técnica

- Usando el tubo rojo de la prueba anterior, medir la altura de la columna sanguínea en milímetros (mm), registrarla.
- Desprender el coágulo de las paredes del tubo con ayuda del asa bacteriológica o de un aplicador de madera.
- Colocar el tubo en un baño María a 37° durante 1h.
- Con ayuda de un asa bacteriológica, extraer el coágulo a un vidrio de reloj (sólo el coágulo sin suero).
- Medir la altura de la columna de suero. Si después de retirar el coágulo se observa la presencia de abundantes eritrocitos, es recomendable la centrifugación a 3000 rpm por 3 minutos antes de la medición a modo de permitir la correcta lectura.
- Calcular la cantidad de suero en porcentaje con relación a la altura inicial de la columna de sangre.

D) CONTEO DE PLAQUETAS

Material

- Muestra de sangre con EDTA como anticoagulante
- Pipeta de Thoma para glóbulos blancos
- Tubo de ensayo de 13 x 100 mm
- Cámara de Neubauer
- Papel filtro
- Caja Petri

Reactivos

- Oxalato de amonio al 1% como líquido diluyente. Consultar el **Anexo 2** en donde se muestra la preparación.
- Agua destilada

Equipo

- Microscopio

Técnica

Con la pipeta de Thoma para glóbulos blancos se aspira la muestra previamente mezclada hasta la marca de 0.5, posteriormente se aspira oxalato de amonio hasta la marca de 11. Se mezcla inmediatamente durante cinco minutos, se llena la cámara de Neubauer (tras descartar las primeras seis gotas) y se deja sedimentar durante 20 min en una caja de Petri en cuyo fondo previamente se colocó un disco húmedo de papel filtro. Se cuentan las mismas superficies que para glóbulos rojos. Las plaquetas se presentan como pequeños cuerpos de alta refracción (objetivo 40X).
Hacer el cálculo considerando la dilución y las áreas contadas.

E) TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA (TTPA)

Material

- Tubo de ensaye de 13 x 100 mm
- Asa bacteriológica
- Termómetro
- Cronómetro

Reactivos

- Plasma citratado

- Kit de reactivos

Equipo

- Baño María

Técnica

Seguir técnica del proveedor que se encuentra en el blog.

F) TIEMPO DE PROTROMBINA (TP)

Material

- Material biológico: Plasma citratado
- Tubo de ensaye de 13 x 100 mm
- Asa bacteriológica
- Termómetro
- Cronómetro

Reactivos

- Estuche de reactivos

Equipo

- Baño María

Técnica

Seguir técnica del proveedor que se encuentra en el blog.

G) SOLUBILIDAD DEL COÁGULO EN UREA

Material

- Tubo de ensayo de 13 x 100 mm
- Pipeta 5 mL

Reactivos

- Coágulo formado en alguna de las pruebas anteriores (TTP o TP)
- Solución salina isotónica
- Solución de urea 5.0 M

Técnica

- Enjuagar el coágulo obtenido previamente de alguna de las pruebas de TTPa o TP con solución salina isotónica, decantar la solución y conservar el coágulo.
- Agregar 2 mL de solución de urea 5.0 M.
- Tapar y dejar reposar 12 horas.
- La prueba se considera negativa si después de transcurrido el tiempo el coágulo se mantiene como tal (es decir no se disuelve).

H) RESISTENCIA CAPILAR

Equipo

- Esfigmomanómetro
- Estetoscopio

Técnica

- Trazar un círculo de 5 cm de diámetro sobre la cara anterior del brazo.
- Colocar el esfigmomanómetro y mantener una presión intermedia entre la sistólica y la diastólica durante 5 minutos.
- Retirar y contar el número de petequias que aparecen dentro del círculo.

J) TIEMPO DE SANGRADO

Material

- Vaso de precipitados 100 mL
- Lanceta
- Papel filtro
- Torundas con alcohol al 70%

Equipo

- Esfigmomanómetro
- Estetoscopio
- Cronómetro

Técnica

- **Tiempo de sangrado modificado por Ivy**
    - Colocar el esfigmomanómetro en el brazo y mantener una presión de 40 mm Hg.
    - Realizar la asepsia del área a puncionar (parte lateral del pulpejo del dedo medio o anular).
    - Puncionar con una lanceta.
    - Activar el cronómetro.

- Secar con papel filtro el exceso de sangre procurando no tocar los bordes de la herida.
- Detener la prueba cuando la sangre deje de fluir.
- Registrar el tiempo.

- **Tiempo de sangrado. Método de Duke.**
  - Realizar la asepsia del área a puncionar (porción inferior del pabellón auricular).
  - Puncionar con una lanceta.
  - Activar el cronómetro.
  - Secar con papel filtro el exceso de sangre procurando no tocar los bordes de la herida.
  - Detener la prueba cuando la sangre deje de fluir.
  - Registrar el tiempo.

RESULTADOS

Determinación	Etapa de la hemostasia que se evalúa	Valores de referencia	Resultados
Tiempo de coagulación		5 a 8 min	
Retracción del coágulo		Entre 48 y 64%	
Conteo de plaquetas		140 000 a 450 000 por mm^3	
TTP		33 a 48 s	
TP		12 a 15 s	
Solubilidad del coágulo		Negativo	

Determinación	Etapa de la hemostasia que se evalúa	Valores de referencia	Resultados
Resistencia capilar		Anormal: más de 20 petequias	
Tiempo de sangrado		Método de Duke: 1 a 3 min	
		Metodo de Ivy: 2 a 7 min	

ACTIVIDADES

1. ¿Cuáles son los principales complejos que forma el calcio durante la fase fluida de la hemostasia?
4. ¿Cómo se da la activación de la vía extrínseca de la fase fluida de la coagulación "*in vivo*" e "*in vitro*"?
5. ¿Cómo se da la activación de la vía intrínseca de la fase fluida de la coagulación "*in vivo*" e "*in vitro*"?

REFERENCIAS

1. Ruiz Arguelles, Guillermo J. Fundamentos de hematología. 2ª ed. México, DF: Médica Panamericana, 1998.
2. Turgeon, Mary Louise. Hematología clínica: teoría y procedimientos. 4ª ed. México, D.F. : Manual Moderno, 2006.
3. McKenzie, Shirlyn B. Hematología clínica. 2ª ed. México : Manual Moderno, 2000.
4. Wintrobe, M. R. Lee, J. Foerster, J. Lukens. Wintrobe´s. Clinical Hematology. 10 ed. Lippincott, Williams & Wilkins. 1999.

10. Sistemas, grupos y compatibilidad sanguínea

OBJETIVOS

1. Analizar la importancia que tiene la detección de sistemas antígeno-anticuerpo en la sangre.
6. Realizar las principales pruebas de hemotipificación que se llevan a cabo en la práctica transfusional.
7. Realizar el procedimiento para las pruebas cruzadas.
8. Explicar el fundamento de las pruebas que validan la compatibilidad entre muestras sanguíneas.

ANTECEDENTES ACADÉMICOS

- Definición de antígeno y anticuerpo.
- Reacciones antígeno-anticuerpo.
- Sistemas sanguíneos.
- Sistema AB0.
- Sistema Rh (Eritroblastosis fetal).
- Pruebas de hemotipificación.
- Pruebas cruzadas.
- Compatibilidad sanguínea.
- Reacciones postransfusionales.

INTRODUCCIÓN

Las membranas de las células del organismo humano incluyendo los eritrocitos están formadas, entre otros componentes, por glicolípidos y glicoproteínas los cuales son determinados genéticamente y además poseen capacidad antigénica, así, los llamados

grupos sanguíneos, son el resultado de la clasificación de antígenos superficiales presentes o no en el eritrocito.

Los sistemas sanguíneos se agrupan en dos categorías principales:

Mayores: Aquellos grupos inmunológicamente fuertes (AB0, Rh o D).

Menores: Aquellos grupos inmunológicamente débiles, aunque también pueden ocasionar, reacciones inmunológicas severas (Lewis, Duffy, Kell, Lutheran, Kidd, Diego, Xg, etc).

El sistema de grupos sanguíneos AB0, descubierto hace más de 100 años por Karl Landsteiner, es uno de los sistemas más importantes en medicina transfusional. Está compuesto por los antígenos A, los antígenos B, y los correspondientes anticuerpos contra estos antígenos. Opuesto a lo que sucede en otros sistemas, como por ejemplo el Rh, en este sistema la presencia de anticuerpos naturales contra los antígenos A y B en personas que no expresan estos antígenos causa reacciones adversas, ocasionalmente fatales, luego de la primera transfusión de sangre incompatible.

Landsteiner continuó investigando sobre el tema, puesto que seguían produciéndose reacciones transfusionales y, así, descubrió, en 1940, el factor Rhesus durante sus experimentos con macacos Rhesus. Este sistema comprende varios antígenos, el más importante de los cuales es el factor D. Este factor se encuentra en la sangre del 85% de las personas, que se denominan Rh positivas, mientras que el 15% restante que carece de este factor, son Rh negativas. Por tanto, las personas se clasifican, por ejemplo, como 0 Rh positivas o AB Rh negativas, basándose en los grupos AB0 y en el Rh. De esta manera, cuando se va a realizar una transfusión hay que atender la compatibilidad de los dos factores.

El concepto de que “solo la sangre del donante compatible que no produce aglutinación de los eritrocitos puede ser transfundida”, prepara el camino para una transfusión de sangre segura.

Las pruebas cruzadas se denominan prueba mayor, menor y autotestigo. La prueba mayor se realiza mezclando glóbulos rojos del donador y plasma del receptor. Mientras que la prueba menor se realiza mezclando glóbulos rojos del receptor y plasma del donador. En

ambos casos, tras centrifugar se evalúa la lisis o aglutinación, que implica incompatibilidad entre donador y receptor.

La realización de las pruebas cruzadas es esencial por varios motivos:

- Validar el grupo tanto de donante como receptor
- Confirmar la compatibilidad AB0 entre el receptor y el donante,
- Cumplir con las regulaciones que establecen las organizaciones de bancos de sangre y las legislaciones de los diferentes países.

MATERIAL

- Muestra biológica: Sangre capilar anticoagulada (tomada en capilar con heparina)
- Adaptador para tubo al vacío.
- Agujas para adaptador de sistema al vacío.
- Algodón.
- Bolsa roja para desechos (según la NOM-087).
- Contenedor rígido para punzo-cortantes (según la NOM-087).
- Gradilla
- Guantes
- Ligadura.
- Pipetas Pasteur.
- Placas socavadas.
- Recipiente para inactivación.
- Tubos al vacío (tapón lavanda).
- Tubos de ensaye 13 x 100

REACTIVOS

- Alcohol al 70%.
- Cloro (para inactivar).

- Solución salina fisiológica.
- Suero anti-A.
- Suero anti-B.
- Suero anti-AB
- Suero anti-D.

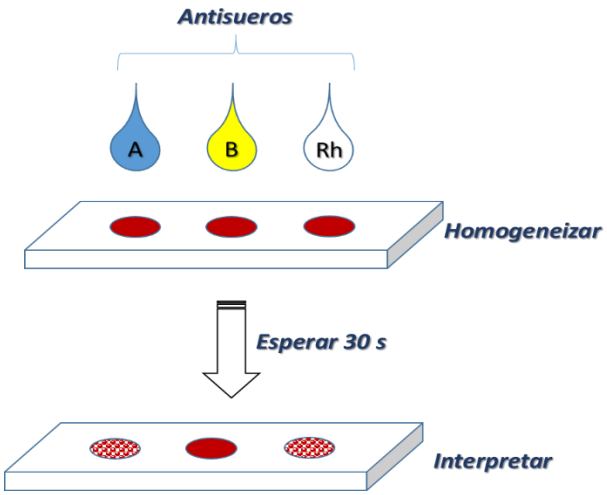
EQUIPO

- Centrífuga.

MÉTODO

Determinación de grupo sanguíneo en placa.

En una placa socavada limpia y seca, colocar una gota de sangre total anticoagulada en tres pocillos diferentes. En el primer pocillo agregar una gota de suero anti-A (tener la precaución de no tocar la sangre, para evitar contaminación), en el segundo pocillo colocar una gota de suero anti-B, finalmente en el tercer pocillo agregar 1 gota de antisuero-D. Mezclar perfectamente ayudándose con un aplicador de madera o plástico. Tomar la placa socavada y moverla sobre sus dos ejes para favorecer la mezcla. Esperar 30 segundos y observar en cuál de los pocillos se presenta aglutinación como se muestra en la figura 10.1.



10.1. Determinación de grupo sanguíneo en placa.

Determinación de grupo sanguíneo en tubo.

1)Homogeneizar el tubo de sangre anticoagulada por inversión. Se deberá lavar una porción de eritrocitos con solución salina fisiológica (0.9%) colocando 0.5mL de sangre en un tubo de 13 x 100 mm solución salina hasta ¾ partes del tubo, tapar con parafilm o un tapon adecuado para invertir hacia arriba y abajo, luego centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos, luego eliminar el sobrenadante con un a pipeta.

2)Con el lavado anterior, se prepara una suspensión de eritrocitos al 5% en solución salina fisiológica (por ejemplo 0.25mL en 475mL de solución salina).

3)Marcar 3 tubos de vidrio como A, B y AB respectivamente. En el tubo marcado A, se deberá colocar una gota de suero anti-A (azul); en el tubo B, una gota de anti-B (amarillo) y en el tubo marcado AB (incoloro) una gota de suero Anti-AB. Luego, se deberá agregar a cada tubo una gota de la suspensión de eritrocitos al 5% y mezclar.

4)Centrifugar inmediatamente durante 1 minuto a 1500 revoluciones.

5)Agitar cuidadosamente el sedimento, inclinar el tubo lentamente hasta la forma horizontal y examinar la aglutinación sobre fondo claro
6)Interpretación de resultados: Se deberá buscar la aglutinación en cada tubo y reportar en que tubo se observa. La sangre se tipificará de acuerdo al suero en el que hay aglutinación o hemólisis.

Pruebas cruzadas de compatibilidad.

La prueba cruzada se divide en tres partes:

1. **Prueba Mayor** (**PM**): Contiene el plasma del paciente y eritrocitos del donador.
2. **Prueba menor** (**pm**): Contiene el plasma del donador y los eritrocitos del receptor. (pm).
3. **Autotestigo** (**AT**): Contiene el plasma y eritrocitos del paciente.

Obtener sangre de los diferentes grupos sanguíneos en tubos con EDTA y rotular perfectamente, centrifugar los tubos a 3500 rpm durante 7 min; separar el plasma del paquete globular y etiquetar, por ejemplo “Plasma A”.

Al paquete eritrocitario, se le realizan 3 lavados con solución salina fisiológica (se agrega un volumen de solución salina igual al del paquete eritrocitario, se mezcla y centrifuga a 3500 rpm por 5 min, se descarta el sobrenadante y se repite hasta tres lavados). Una vez lavados los eritrocitos se prepara una solución al 5% de eritrocitos en solución isotónica (sugerencia: 0.5 mL de sangre + 9.5 mL de solución fisiológica).

Para hacer las pruebas cruzadas:

- Etiquetar un tubo como “Prueba mayor”, con una pipeta Pasteur colocar una gota de eritrocitos del donador previamente lavados, agregar dos gotas de plasma del receptor (paciente) y mezclar (figura 10.2).
- Etiquetar otro tubo como prueba menor, con otra pipeta Pasteur, colocar una gota de eritrocitos del receptor (figura 10.2) y agregar colocar 2 gotas de plasma del donador y mezclar.
- Colocar con una pipeta en el tubo del autotestigo (AT), dos gotas de plasma del paciente y una gota de eritrocitos del mismo (paciente).

- Mezclar perfectamente el contenido de los tubos. Centrifugar durante 30 segundos a 3500 rpm.
- Leer y reportar las observaciones.

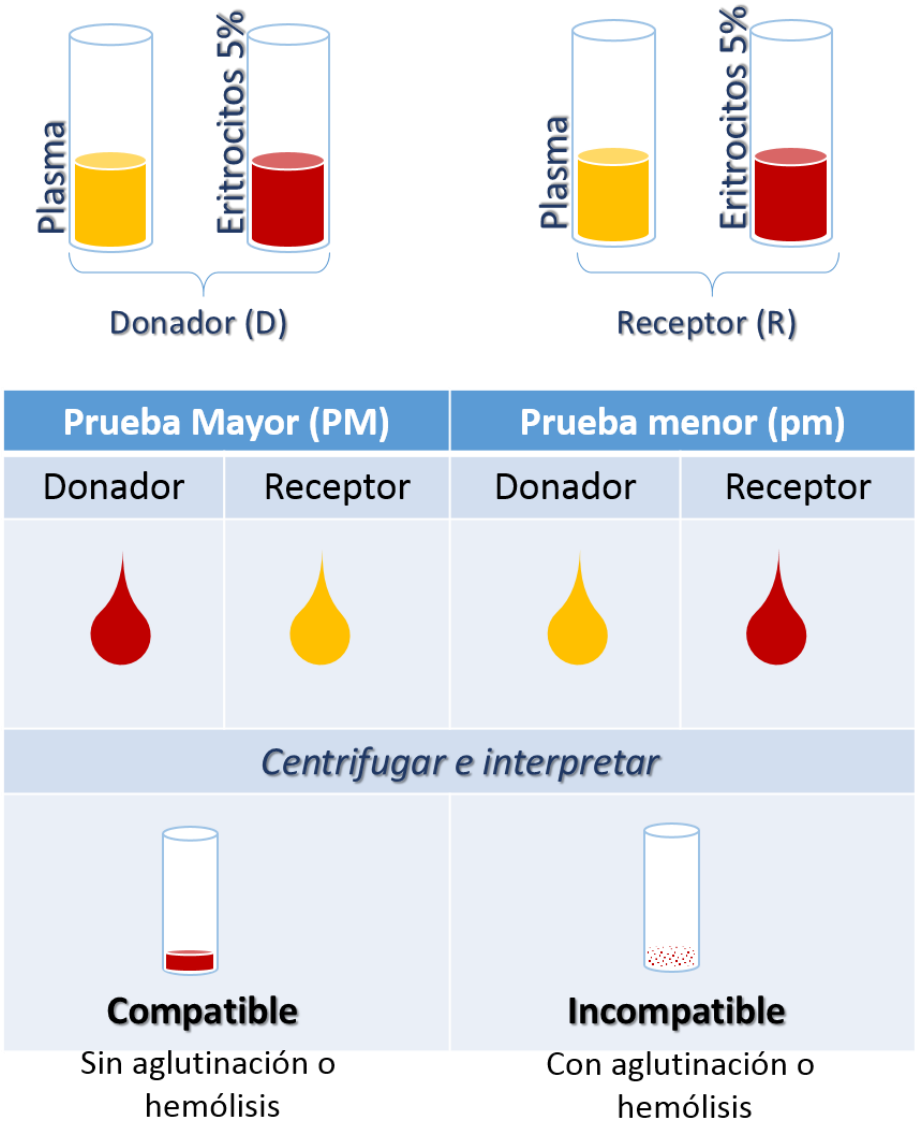


Figura 10.2. Prueba mayor y menor de compatibilidad sanguínea.

RESULTADOS

El alumno reportará la compatibilidad de las pruebas cruzadas al observar la presencia o ausencia de aglutinación y hemólisis en los tubos utilizando el siguiente formato:

Prueba	Grupo Sanguíneo del		Resultado
	Donador	Receptor	
Mayor (PM)			
Menor (pm)			

Importante: *Para las pruebas cruzadas debe evitarse los términos* ***positivo*** *o* ***negativo****, lo correcto es* ***compatible*** *o* ***incompatible***.

ACTIVIDADES

Llenar las siguientes tablas considerando el donador y receptor

Prueba Mayor (PM)	**Donador**			
Receptor	**A**	**B**	**AB**	**O**
A				
B				
AB				
O				

Prueba Menor (pm)	**Donador**			
Receptor	**A**	**B**	**AB**	**O**
A				
B				
AB				
O				

CUESTIONARIO

1. ¿Qué diferencias existen entre una aglutinación y una precipitación?
2. Realice una tabla donde anote los antígenos y anticuerpos presentes en los grupos sanguíneos del sistema AB0.
3. ¿Qué es lo que ocasiona la eritroblastosis fetal?

4. ¿Por qué es necesaria la realización de las pruebas cruzadas?
5. ¿Cuál es el fundamento de la existencia de grupos y subgrupos sanguíneos?
6. ¿Cuál es la diferencia química que existe entre los diferentes grupos del sistema ABO?

REFERENCIAS

1. Dean L. The ABO blood group. In: Dean L, ed. Blood groups and red cell antigens. Bethesda; NCBI, 2005.
2. Yamamoto F, McNiell PD, Hakamori S. Genomic organization of human histo-blood group ABO genes. Glycobiology 1995; 5: 51-58.
3. Hosoi E. Biological and clinical aspects of ABO blood group system, J Med Ivest 2008; 55: 174-182.
4. Arbeláez C. Sistema de grupos sanguíneos: ABO. Medicina & Laboratorio, 2009; 15; 1-8: 329-347. En línea
5. Norma oficial mexicana NOM-253-SSA1-2012, para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos.
6. Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA1-1993, que establece las especificaciones sanitarias de los reactivos hemoclasificadores para determinar grupos del sistema AB0.
7. Moyado HR. El Banco de Sangre y la Medicina Transfusional. México: Editorial Médica Panamericana; 2004.

Sección IV

Fisiología muscular

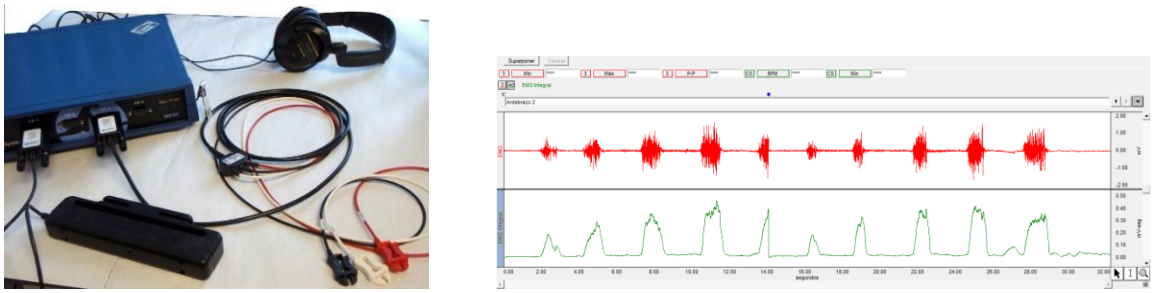
11. Tutorial para el uso del programa de registro de eventos fisiológicos

GENERALIDADES

La unidad de adquisición de datos **Biopac®** es un equipo que permite la transformación de señales eléctricas o mecánicas en información de fácil interpretación y en tiempo real. Debido a su fácil uso y la flexibilidad de adaptación, este equipo permite de manera segura la *autoexperimentación* o la experimentación con otras especies.

Este equipo consta esencialmente de un sistema de adquisición y análisis de señales fisiológicas cuyos principales elementos son:

- Unidad de adquisición de datos,
- Transductores
- Software



(a) **(b)**

Figura 11.1. (a) Unidad de adquisición de datos junto con algunos transductores, (b) Registro obtenido mediante el software Biopac Student Lab Analysis

Instalación

Para la instalación del software, se requiere cómo mínimo:

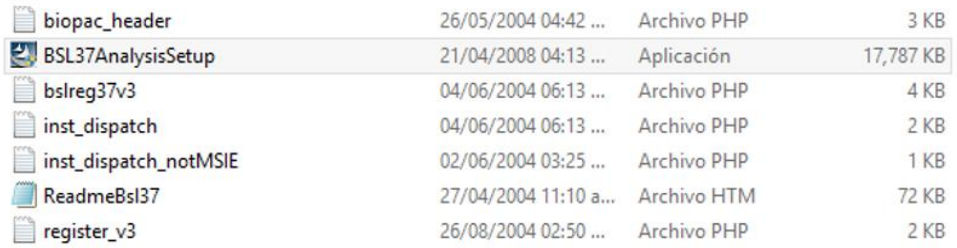
- *Windows 95* o superior
- 4 MB en memoria RAM

Existen dos versiones del software:

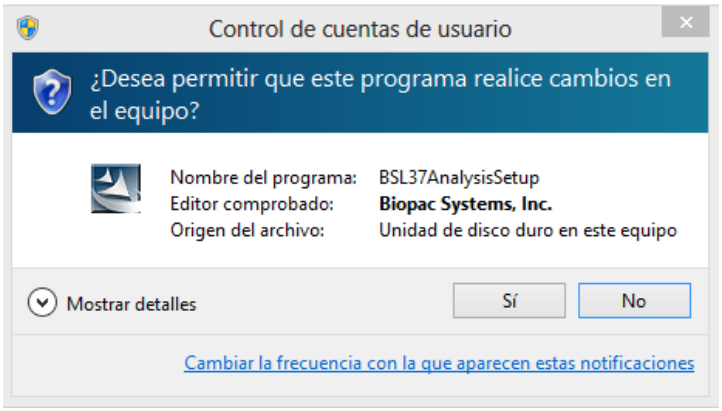
- ***Biopac Student Lab***: Esta versión es para uso exclusivo de los profesores y que a su vez se encuentran instalados en los CPU asignados a cada equipo Biopac®.
- ***Biopac Student Lab Analysis***: Esta es la versión que el estudiante deberán descargar para ser instalado en sus computadoras y realizar los análisis indicados en los protocolos correspondientes. Es posible obtener las versiones para ***Mac*** y ***Windows***, éste último en inglés y español.

El software de análisis, una vez descargado se requiere descomprimir para ello se puede obtener una licencia gratuita de **WinRar**® desde el sitio oficial http://www.winrar.es/descargas. Ya descomprimido seguimos los siguientes pasos:

1. Ejecutamos el archivo ***BSL37Analysis***, para lo cual nos dirigimos a la carpeta donde se encuentra el software descomprimido.



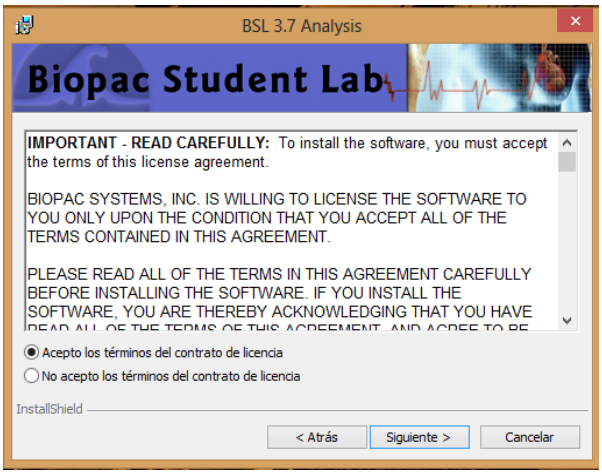
9. Damos doble clic.
10. Veremos una ventana de la que debemos seleccionar ***Si***.



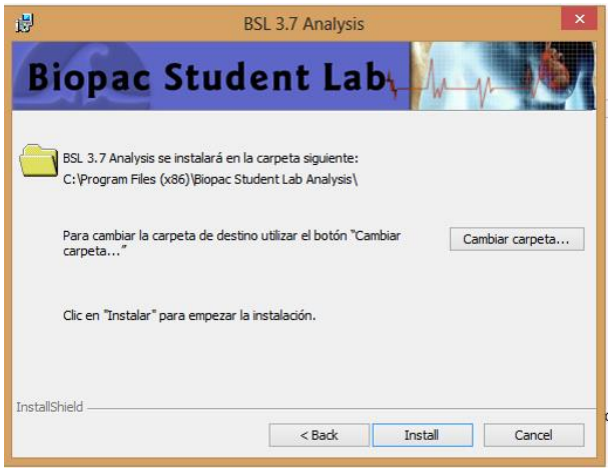
11. Con ello comienza el desempaquetamiento del software.

12. Seleccionamos, de la nueva ventana, ***Siguiente*** para la instalación

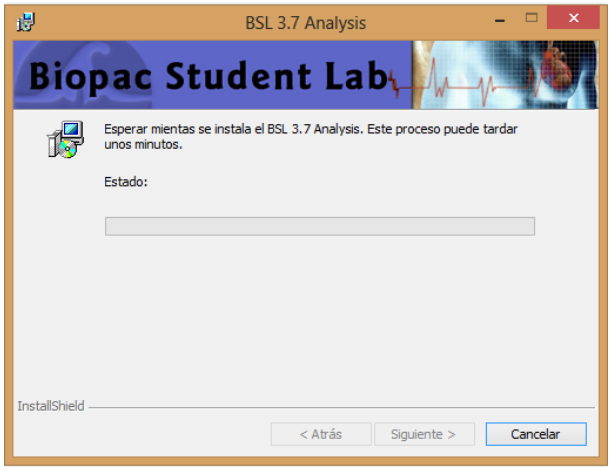
13. No olvidemos aceptar los términos de contrato para continuar con la instalación y posteriormente ***Siguiente***.



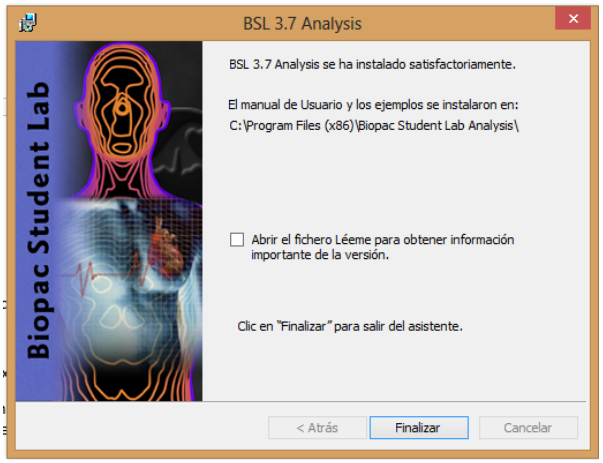
14. Ahora sí, seleccionamos ***Install*** para la instalación.



15. Esperamos a que transcurra la instalación…



16. Al término del proceso, seleccionamos Finalizar.



17. Con lo anterior estamos listos para poder analizar nuestros archivos de acuerdo a cada protocolo.

Análisis de resultados

1. Ejecutar el programa ***Biopac Student Lab***.
2. De la ventana emergente buscamos el archivo a analizar y posteriormente seleccionamos ***Abrir***.

3. Al seleccionar el archivo veremos las siguientes zonas:

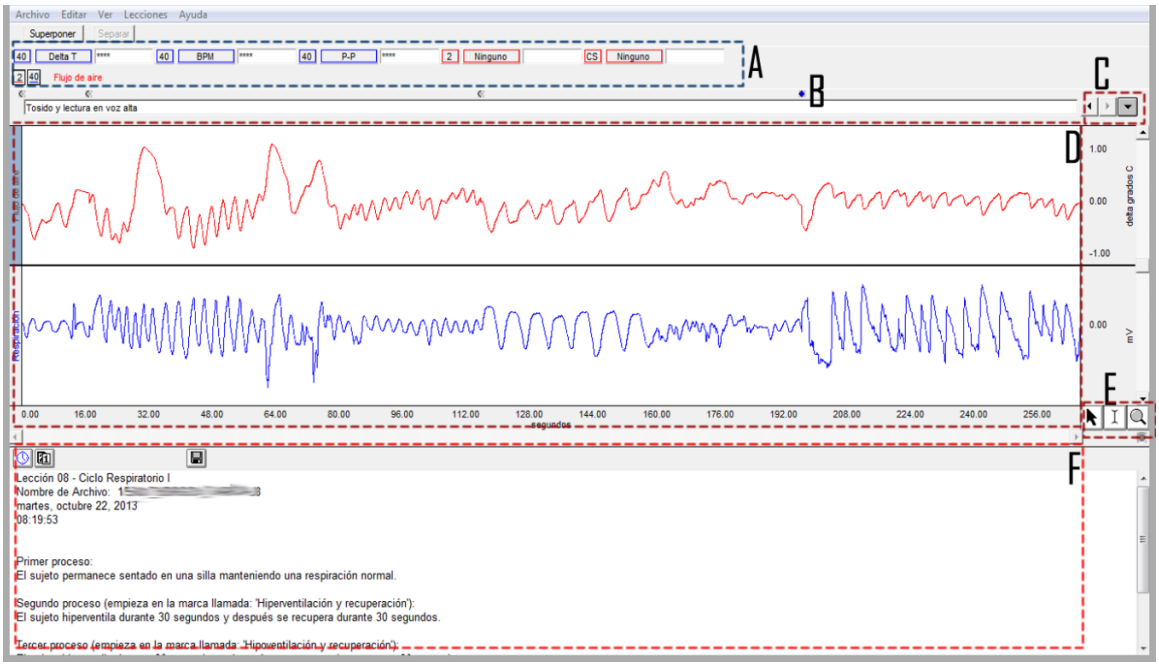


Fig. 11.2: Imagen mostrando los elementos de un registro, **A**) Canales de datos, **B**) Marcador de eventos, estos se agregan, en las practicas que así lo requieran, apretando **F9**, **C**) Botones para el avance o selección de eventos, **D**) Registro de actividad eléctrica, **E**) Botones para selección o acercamientos, **F**) Información del evento (Journal); cuando se hace una sección de un evento y se ajustan los canales, seleccionando **Ctrl + M** podremos pegar la información de la sección D a la F.

4. Realizamos el análisis según lo indique los protocolos correspondientes.

CONEXIÓN DE LA UNIDAD BIOPAC®

Es importante previo a cada práctica leer los protocolos correspondientes para identificar los elementos necesarios, y tener siempre presente algunas consideraciones y cuidados del equipo y sus accesorios.

Lo primero es familiarizarse con la unidad de adquisición, sin importar el modelo a utilizar

ya sea **MP35** o **MP36**, debemos identificar de la parte frontal:

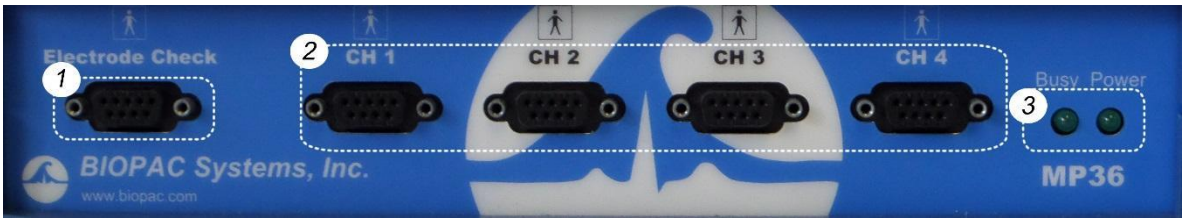


Figura 11.2: Vista frontal del Biopac®

1. **Puerto de Chequeo (*Electrode Check*)**: Puerto utilizado para realizar diagnóstico de posibles fallas en el equipo, éste sólo es utilizado por personal autorizado.
5. **Canales 1 al 4 (*CH 1-CH 4*)**: Conjunto de puertos seriales para conectar los accesorios según se requiera por práctica.
6. **Luces indicadoras (LED)**: Estas luces nos indican si el equipo se encuentra encendido (***Power***) y si se encuentra procesando algún evento (***Busy***)

Es muy importante tener presente que los accesorios que se conectan a los canales, no deberán ser atornillados, esto para evitar daños a futuro así como conectar los accesorios correctos en el canal (**CH 1 a CH 4**) para cada práctica, para ello verificar el código del

Figura 11.2: Conexión serial mostrando (**1**) el código del accesorio.

En la parte posterior podremos identificar los siguientes elementos:

Figura 11.3: Vista posterior del Biopac®

1. **Salida Analógica** (***Analog Out***): Este puerto sirve para la conexión de los audífonos mediante puerto serial.
7. **Puerto USB** (***USB***): Para enlazar el Biopac® a la computadora.
8. **Plug 3.5**: Conexión de audífonos.
9. Puerto para Impresora (*I/O Port*): Puerto para impresora.
10. Disparador (***Trigger***):
11. Conexión a la corriente eléctrica (*DC Input*): Puerto para el eliminador.
12. **Fusible** (***Fuse***): Compartimento para fusible, ***no intentar abrirlo***.
13. ***Botón de Encendido/Apagado***: No olvidar apagar el equipo después de usarlo, para verificar que lo hemos apagado observar que la luz indicadora ***Power*** no esté encendida.

CUIDADOS DEL BIOPAC®

Para el desarrollo de cada práctica, es importante leer el protocolo correspondiente y realizar las conexiones indicadas con los accesorios correctos, para un mejor funcionamiento considerar lo siguiente:

- Apagar el equipo después de utilizarlo.
- Evitar golpear el equipo y las terminales de los transductores.

- No atornillar los accesorios, ello con la finalidad de evitar daños al equipo.
- Evitar producir más vueltas de las necesarias a los cables de los transductores.
- Guardar todos los elementos en sus respectivas bolsas y recipientes.
- No mojar ningún elemento del Biopac®.

REFERENCIA

1. Kremer, J. Tutorial básico para el uso del Biopac Student Lab [Internet]. Biopac Systems, Inc.; 2000 [citado 19 de noviembre de 2013]. Recuperado a partir de: http://www.biopac.com/Manuals/bsltutorial_es.pdf

12. Tono muscular

OBJETIVOS

1. Analizar las características del tono muscular esquelético en referencia al estado de reposo, así como su incremento en relación al reclutamiento de unidades motoras.
2. Comparar la actividad muscular entre el antebrazo derecho y el izquierdo, así como entre un hombre y una mujer.

ANTECEDENTES ACADÉMICOS

- Tipos de músculo
- Músculo esquelético
- Función
    - Características estructurales y funcionales de la fibra muscular
    - Unidad Motora
    - Regulación de su funcionamiento
    - Tono muscular
    - Electromiografía

INTRODUCCIÓN

La electromiografía es una prueba médica, realizada por un especialista neurofisiólogo, la cual permite el estudio del sistema nervioso periférico y muscular, para determinar si el paciente tiene alguna enfermedad a ese nivel, permite su localización y valorar su gravedad. Por tanto, se utiliza para hacer el diagnóstico y en muchos casos muestra la intensidad de la lesión; lo cual permite orientar al médico especialista sobre el tratamiento a seguir.

Este tipo de estudio se utiliza para la evaluación del funcionamiento del músculo

esquelético. Este músculo debe su nombre a que se encuentra unido al esqueleto, su contracción mueve una parte del cuerpo con respecto a otra.

El músculo es capaz de contraerse y relajarse en virtud de su capacidad de convertir la energía química en mecánica.

La unidad funcional del músculo esquelético es la fibra muscular que es estimulada por una neurona motora cuyo impulso procede del cerebro y de la médula espinal y es capaz de inervar a varias fibras musculares y de esta manera responden en forma conjunta y coordinada. El tamaño de la unidad motora (número de fibras musculares inervadas por una motoneurona) es variable: 5, 50, 3000; dependiendo del grado de control sobre la magnitud de la contracción.

El grado de contracción de un músculo esquelético es regulado a través del número de unidades motoras y de la frecuencia de los estímulos neuronales.

El músculo esquelético en reposo experimenta un estado de contracción permanente denominado tono muscular, que es un estado de tensión leve y constante, y sirve para mantener una postura y al músculo en estado de alerta. El tono es debido a la activación alternada y periódica de un pequeño número de unidades motoras dentro del músculo desde los centros motores ubicados en el cerebro y en la médula espinal. Los movimientos suaves y controlados del cuerpo (como el caminar y el andar) son producidos por contracciones graduadas del músculo esquelético.

MATERIALES

- Juego de cables para electrodos (**SS2L**)
- Electrodos desechables de vinilo
- Audífonos para Biopac®

REACTIVOS

- Gel para electrodos
- Loción de limpieza o alcohol

EQUIPO

- Equipo Biopac®
- Computadora portátil
- Videoproyector (Cañón)

MÉTODO

La actividad práctica consta de tres etapas:

- La primera se refiere a la **preparación** del equipo y del estudiante que se someterá a la prueba,
- La segunda a la **calibración** del aparato y
- La tercera al **registro**.

PREPARACIÓN DEL EQUIPO Y DEL ESTUDIANTE

1. Encienda la computadora, asegurándose que la unidad Biopac® esté apagada.
2. Conecte los cables del electrodo (**SS2L**) en el canal de registro 3 (**CH 3**) y los audífonos en la parte posterior (Figura 12.1).
3. Encienda la unidad.

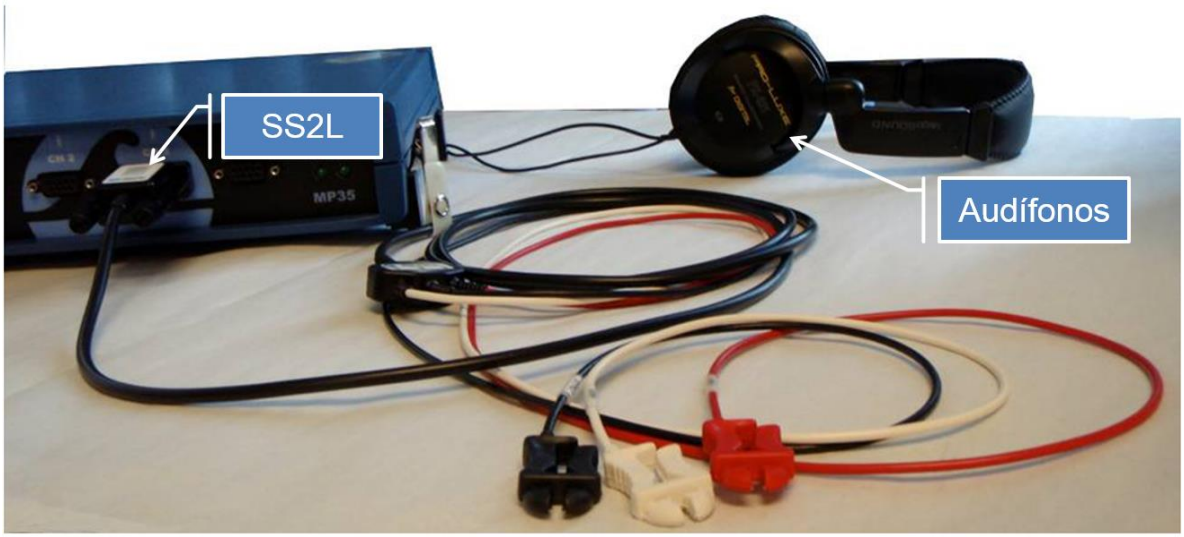


Figura 12.1. Conexión a la unidad.

4. Coloque los tres electrodos en el antebrazo y posteriormente los cables de electrodo siguiendo el código de color (Figura 12.2).

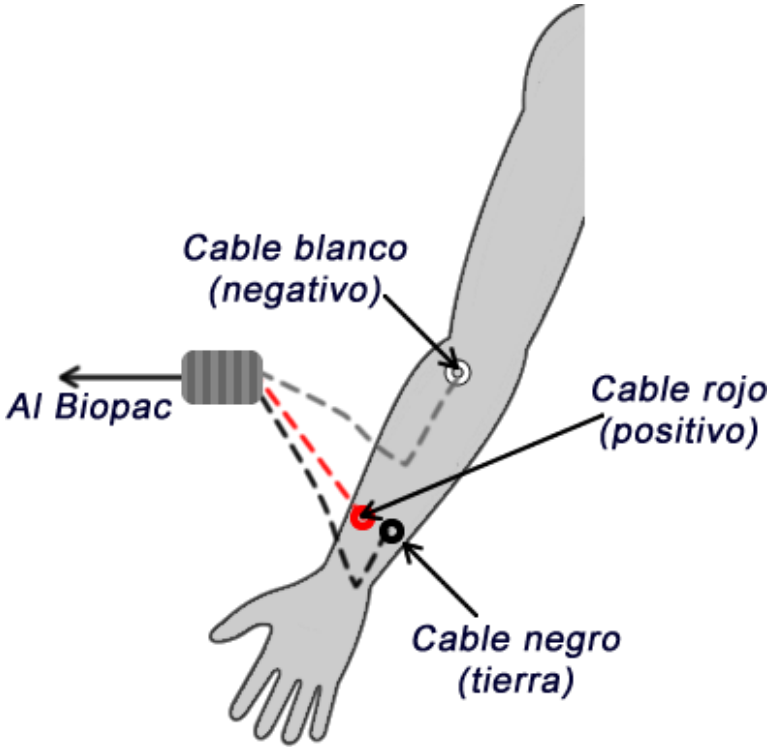


Figura 12.2. Colocación de los electrodos en el brazo.

5. Ejecute el programa **Biopac Student Lab**®,
6. Seleccione la lección "**L01-EMG-1**" y presione **OK**.
7. Para nombrar el archivo se puede utilizar el siguiente formato:
    a. *Grupo_Apellido Paterno_Apellido Materno_Nombre*.

8. Presione OK.

CALIBRACIÓN

1. Presione **Calibrar**.
2. Lea el recuadro de diálogo y presione OK.
3. Espere 2 segundos y presione su puño tan fuerte como le sea posible y luego relájelo.
4. Espere a que termine la calibración.
5. Revise los datos, si no obtuvo un registro correcto repita la calibración.

REGISTRO

1. Se registra en dos etapas, una para el ***antebrazo 1*** que corresponde al ***brazo dominante*** y la segunda para el ***antebrazo 2*** o ***brazo no dominante*** (Figura 12.3).
2. Presione Record.
    a. Apriete el puño levemente durante dos segundos
    b. Relajar por dos segundos
    c. Volver a apretar el puño, incrementado la fuerza, durante dos segundos.
    d. Relajar por dos segundos.
    e. Repetir el ciclo de tal manera que cada vez se incremente la fuerza y en el cuarto apretón se obtenga el máximo.
3. Presione Suspender.
4. Remueva los electrodos del antebrazo.
5. Pase al antebrazo 2, conecte los electrodos en el antebrazo opuesto del sujeto.
6. Presione Continuar.
    a. Apriete el puño levemente durante dos segundos
    b. Relajar por dos segundos
    c. Volver a apretar el puño, incrementado la fuerza, durante dos segundos.

d. Relajar por dos segundos.
e. Repetir el ciclo de tal manera que cada vez se incremente la fuerza y en el cuarto apretón se obtenga el máximo.

7. Presione Detener.

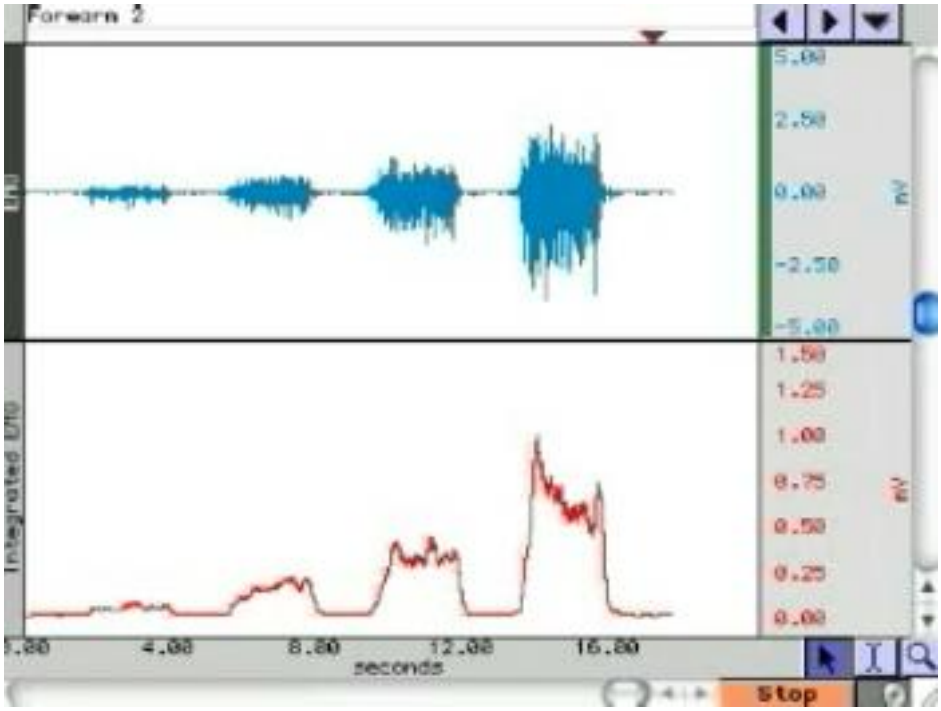


Figura 12.3. Registro correcto.

8. Para escuchar la señal del electromiograma utilice los audífonos y presione **Escuchar**.
9. Experimente variando la fuerza de contracción mientras observa la pantalla y escuche.
10. Presione **Detener** y posteriormente **Finalizar**.

11. Realice el registro con otro estudiante y compare sus resultados.

RESULTADOS

1. Ingrese en el modo de revisión de datos guardados y escoja el archivo correcto.
2. El canal 3 (**CH3**) corresponde a la electromiografía no procesada y el 40 (**CH40**) el proceso integrado matemáticamente.
3. Organice la visualización de la ventana de tal forma que pueda observar lo de un antebrazo.
4. Configure las cajas de medidas de la siguiente manera:
    a. CH 3 (**min**)
    b. CH 3 (**max**)
    c. CH 3 (**p-p**)
    d. CH 40 (**media**)
5. Con el cursor seleccione un área que contenga la primera contracción. Anote los datos.
6. De esta manera continúe con cada una de las contracciones y en ambos antebrazos.
7. Guarde sus archivos de datos en una memoria nueva o formateada.
8. Salga del programa.

INFORME

Descargar del blog el formato correspondiente para esta práctica.

ACTIVIDADES

1. ¿Cuál es el origen de las señales detectadas por los electrodos en el electromiograma?
2. ¿Cómo está constituida una unidad motora?

3. ¿Qué es la electromiografía?

REFERENCIAS

1. Planfzer R. Lecciones de Fisiología. Para el uso con el Programa Biopac Student Lab. Biopac Systems Inc.
2. De Vattuone L. Anatomía y Fisiología Humanas. España: Gz Editores; 2006.
3. Guyton A, Hall J. Fisiología Médica. 11a edición. España: Elsevier; 2006.

RECURSOS WEB

1. Electromiograma. Medicine Net: (Acceso 15 de febrero del 2009) Disponible en: http://www.medicinenet.com/electromyogram/article.htm
2. Electromiograma. Saludalia: (Acceso 15 de febrero del 2009) Disponible en: http://www.saludalia.com/docs/Salud/web_saludalia/temas_de_salud/doc/neurologia/doc/doc_electromiograma1.htm
3. El WEB de la espalda: (Acceso 15 de febrero del 2009) Disponible en: http://www.espalda.org/divulgativa/diagnostico/pruebas_neurofisiologicas/pruebas.asp

13. Trabajo y fatiga muscular

OBJETIVOS

1. Analizar las características de la contracción muscular graduada para aplicar distintas fuerzas sobre un objeto.
2. Comparar el trabajo mecánico realizado por una mujer, por un hombre y por un individuo que realice comúnmente ejercicio.
3. Analizar las causas que originan la fatiga muscular.

ANTECEDENTES ACADÉMICOS

- Tipos de músculo
- Músculo esquelético
    - Función
    - Características estructurales y funcionales de la fibra muscular
    - Unidad motora
    - Regulación de su funcionamiento
    - Tono muscular
    - Electromiografía

INTRODUCCIÓN

El trabajo mecánico se refiere a la aplicación de una fuerza, la cual resulta en el movimiento de un objeto. El músculo esquelético es capaz de realizar trabajo, ya que puede realizar una fuerza y mover objetos.

Para saber el grado de esfuerzo que ha de requerirse para realizar el trabajo, el cerebro utiliza la información sensorial de los receptores de estiramiento en el músculo, tendones asociados y capsulas de unión para determinar el número de unidades motoras requeridas

para realizar una tarea dada. Por ejemplo, cuando se levanta un peso, al inicio el cerebro activa varias unidades motoras en los músculos apropiados para mover el objeto, si la información sensorial que regresa al cerebro indica que no se logró levantar el objeto, el cerebro activa más unidades motoras hasta que el objeto es levantado; esta activación secuencial de las unidades motoras para realizar la tarea se llama reclutamiento de unidades motoras.

Una vez que se haya levantado el peso ligero, el cerebro recluta aproximadamente el mismo número de unidades motoras con el fin de mantenerlo levantado, pero de manera alternada. Durante el proceso, las fibras musculares consumen la energía almacenada en el músculo y generan la fuerza necesaria para la contracción, el reclutamiento alternado de diferentes unidades motoras permite que se relajen y recarguen sus depósitos energéticos.

Sin embargo, si los músculos esqueléticos realizan un trabajo agudo máximo o crónico submáximo de una naturaleza repetitiva eventualmente se fatigarán, la fatiga entonces es definida como una disminución en la habilidad del músculo para generar una fuerza y es causada por la depleción reversible en el suministro energético del músculo, ya que el músculo usa sus fuentes energéticas más rápidamente de lo que las genera.

Durante la contracción las células convierten la energía química en energía mecánica y térmica y en el proceso generan productos de desecho que normalmente son removidos de la zona por el sistema circulatorio pues de lo contrario se acumulan e interfieren en los procesos contráctiles, acelerando el inicio de la fatiga, además de que son los responsables del estímulo de los receptores del dolor en el tejido circundante.

En esta lección se examinará el reclutamiento de la unidad motora y la fatiga del músculo.

MATERIAL

- Juego de cables para electrodos (**SS2L**)
- Electrodos desechables de vinilo
- Dinamómetro de mano (**SS25L**)

- Audífonos para Biopac®

REACTIVOS

- Gel para electrodos
- Loción de limpieza o alcohol

EQUIPO

- Equipo Biopac®
- Computadora portátil
- Videoproyector (Cañón)

MÉTODO

La actividad práctica consta de tres etapas:

- La primera se refiere a la ***preparación del equipo y del estudiante*** que se someterá a la prueba,
- La segunda a la ***calibración*** del aparato y
- La tercera al ***registro***.

PREPARACIÓN DEL EQUIPO Y DEL ESTUDIANTE

1. Encienda la computadora, asegurándose que el Biopac® esté apagado.
2. Conecte el dinamómetro manual (**SS25L**) al canal 1 (**CH 1**), los cables del electrodo (**SS2L**) en el canal de registro 3 (**CH 3**) y los audífonos en la parte posterior.
3. Encienda la unidad. (Figura 13.1)

Figura 13.1. Conexión de los electrodos, dinamómetro y audífonos a la unidad.

4. Coloque los tres electrodos en el antebrazo y posteriormente los cables de electrodo siguiendo el código de color. (Figura 13.2)

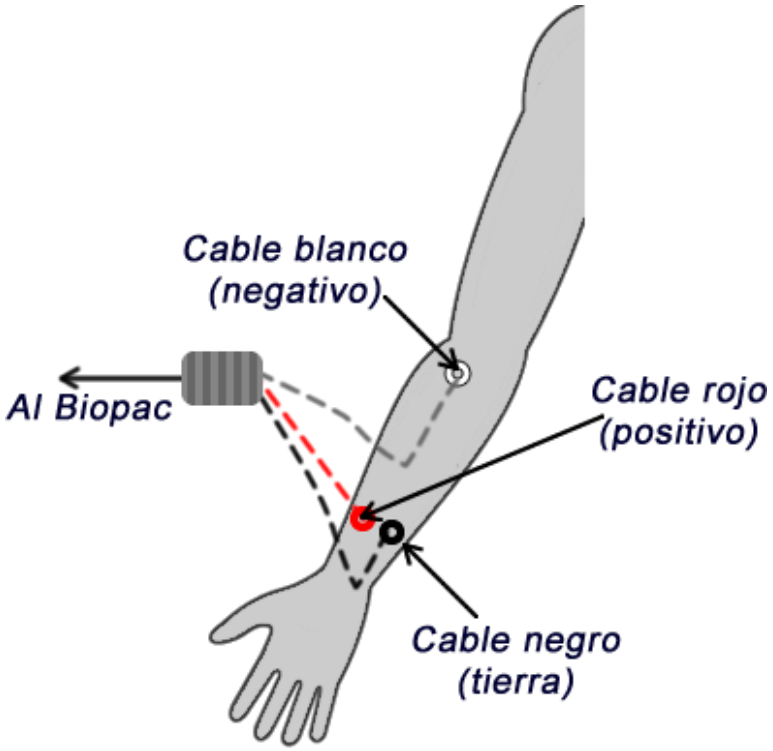


Figura 13.2. Colocación de los electrodos.

5. Ejecute el programa **Biopac Student Lab**, escoja la lección "**L02-EMG-2**"
6. Presione OK.
7. Para nombrar el archivo se puede utilizar el siguiente formato:
    a. *Grupo_Apellido Paterno_Apellido Materno_Nombre*.
8. Presione OK.

CALIBRACIÓN

1. Presione **Calibrar**.
2. Tome el dinamómetro con la mano del brazo dominante y coloque el brazo en una posición cómoda.

3. Presione OK.
4. Sujete el dinamómetro sin ejercer presión.
5. Esta posición deberá mantenerla durante las diferentes mediciones.
6. Presione OK cuando esté listo.
7. Espere 2 segundos y presione el dinamómetro tan fuerte como le sea posible y luego suéltelo.
8. Espere a que termine la calibración.
9. Revise los datos, si no obtuvo un registro correcto repita la calibración.

REGISTRO

1. Se registra en dos etapas, una para el ***antebrazo 1*** que corresponde al ***brazo dominante*** y la segunda para el ***antebrazo 2*** o ***brazo no dominante*** (Figura 12.3).
2. . Para cada antebrazo hay dos segmentos: el primero registra el reclutamiento de la unidad motora y el segundo registra la fatiga.
3. De acuerdo con la fuerza de apretamiento registrada en la calibración el equipo establece la escala vertical de su registro y los incrementos de fuerza que deberá aplicar para el primer segmento.

Fuerza de calibración	**Incremento de fuerza en cada intento**			
	1º	**2º**	**3º**	**4°**
0-25 Kg	5	10	15	20
25-50 Kg	10	20	30	40
Mayor a 50 Kg	20	40	60	80

4. Presione grabar y se debe observar el valor que deberá alcanzar en la contracción guiándose con la cuadrícula que aparece en la pantalla y muestra la fuerza a aplicar

al apretar el dinamómetro.

5. Deberá repetir ciclos de apretar-soltar-esperar.
6. Apriete el dinamómetro durante 2 segundos con el primer valor (5, 10 o 20) de acuerdo con la fuerza de calibración.
7. Suelte y espere 2 segundos, repita el ciclo con el siguiente valor de fuerza.
8. Realice un tercer y último ciclo con el tercer valor de fuerza.
9. Presione Detener
10. En caso de que el registro sea correcto continúe.
11. A continuación, se logrará la **fatiga**, presione el dinamómetro con la fuerza máxima y trate de mantenerla. Cuando la fuerza de apretamiento máximo muestra una disminución de más del 50%, suelte el dinamómetro y se presiona Suspender.
12. Proceda al antebrazo 2.
13. Coloque los electrodos en el antebrazo del sujeto y registre de la misma manera que para el antebrazo 1, tanto el segmento de reclutamiento, como el de fatiga.
14. Presione Terminado
15. En caso de no realizar algún otro registro presione detener.
16. Para escuchar la señal del electromiograma utilice los audífonos y presione Escuchar.
17. Experimente variando la fuerza de contracción mientras observa la pantalla y escuche.
18. Presione Detener.
19. Para finalizar presione Listo.
20. El registro debe ser parecido al que se muestra a continuación. (Figura 13.3)

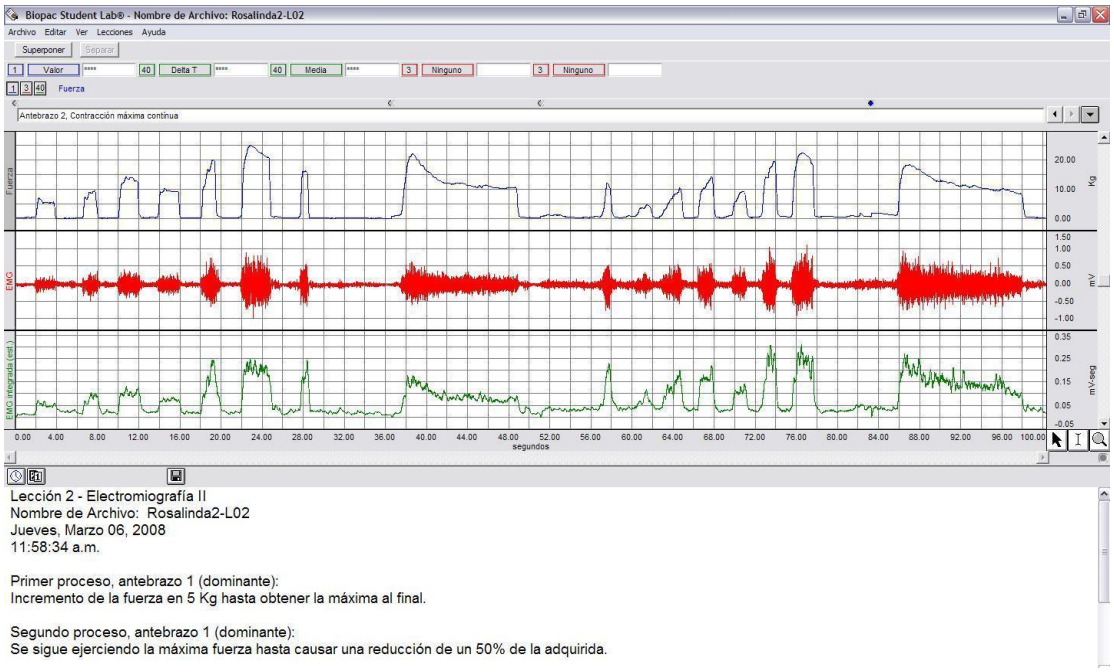


Figura 13.3. Ejemplo de registro correcto

21. Podrá iniciar el registro con otro sujeto.

RESULTADOS

1. Ingrese en el modo de revisión de datos guardados y escoja el archivo correcto. Revise las designaciones de los números de los canales CH:
    a. CH 1, corresponde a la fuerza
    b. CH3) corresponde a la electromiografía no procesada
    c. CH40) el proceso integrado matemáticamente
2. Organice la visualización de la ventana de tal forma que pueda observar el registro de un antebrazo.
3. Configure las cajas de medidas de la siguiente manera:

a. Canal CH 1 (media)
b. CH 3 (p-p)
c. CH 40 (media)

4. Con el cursor **I** seleccione un área que contenga la primera meseta.
5. Anote los datos. De esta manera continué con cada una de las mesetas y en ambos antebrazos.
6. Para el segmento de fatiga las cajas de medición deberán de estar configuradas de la siguiente manera:
   a. CH 1 (valor)
   b. CH40 (delta T)
7. Con el cursor seleccione la zona de máximo apretamiento.
8. Anote su valor.
9. Luego seleccione el área desde el punto de 50% de fuerza de apretamiento hasta el punto de máxima fuerza. Anote el valor y el tiempo de fatiga (CH40 deltaT).
10. Salga del programa.

INFORME

Descargar del blog el formato correspondiente para esta práctica.

ACTIVIDADES

1. ¿Cuáles son los factores fisiológicos que inducen la fatiga muscular?
2. ¿Cuál es el fundamento del funcionamiento de un dinamómetro?
3. ¿Cuál es el principio fisiológico por el cual unos individuos ejercen una mayor fuerza que otros?

REFERENCIAS

1. Planfzer R. Lecciones de Fisiología. Para el uso con el Programa Biopac Student Lab. Biopac Systems Inc.
2. De Vattuone L. Anatomía y Fisiología Humanas. España: Gz Editores; 2006.
3. Guyton A, Hall J. Fisiología Médica. 11a edición. España: Elsevier; 2006.

RECURSOS WEB

- **Sitio**: Electromiograma http://goo.gl/E5kNTQ
- **Animación**: Contracción muscular http://goo.gl/ren4ms

14. Electrocardiograma

OBJETIVOS

1. Analizar el fundamento fisiológico del registro de un electrocardiograma (ECG).
2. Correlacionar los eventos mecánicos de la contracción cardiaca con el registro electrocardiográfico obtenido en el laboratorio.
3. Interpretar el registro bajo diferentes condiciones de experimentación.

ANTECEDENTES ACADÉMICOS

- Circulación menor
- Circulación mayor
- Estructura macro y micro del corazón.
- Despolarización del músculo cardíaco.
- Factores que regulan la contracción cardíaca.

INTRODUCCIÓN

Existen varias rutas circulatorias básicas a través de las cuales viaja la sangre. La circulación mayor es la sistémica. Incluye la sangre oxigenada que sale del ventrículo izquierdo por la aorta y regresa a la aurícula derecha, después de pasar por todos los órganos, excepto los pulmones. La circulación sistémica tiene dos divisiones que son: la circulación coronaria, que irriga al miocardio y la circulación portal que corre del tracto digestivo al hígado. Cuando la sangre regresa de la ruta sistémica al corazón, sale del ventrículo derecho, a través de la circulación pulmonar a los pulmones (circulación menor). En los pulmones pierde su dióxido de carbono y toma oxígeno. Regresa a la aurícula izquierda y vuelve a la circulación sistémica.

El corazón se encuentra situado en el lado izquierdo de la cavidad torácica. Funciona como dos bombas coordinadas que envían la sangre a todo el cuerpo. Está compuesto por cuatro cámaras, dos superiores llamadas aurículas y dos inferiores, de paredes gruesas, llamadas ventrículos. Una fuerte pared muscular divide los dos lados del corazón. Hay cuatro válvulas, cruciales para permitir la entrada y salida de la sangre en las cámaras, solo en una dirección (Figura 14.1). Se abren y se cierran para dejar que la sangre fluya únicamente en una dirección cuando el corazón late:

- **La válvula tricúspide** se encuentra entre la aurícula y el ventrículo derechos.
- **La válvula pulmonar** se encuentra entre el ventrículo derecho y la arteria pulmonar derecha.
- **La válvula mitral** se encuentra entre la aurícula y el ventrículo izquierdos.
- **La válvula aórtica** se encuentra entre el ventrículo izquierdo y la aorta.

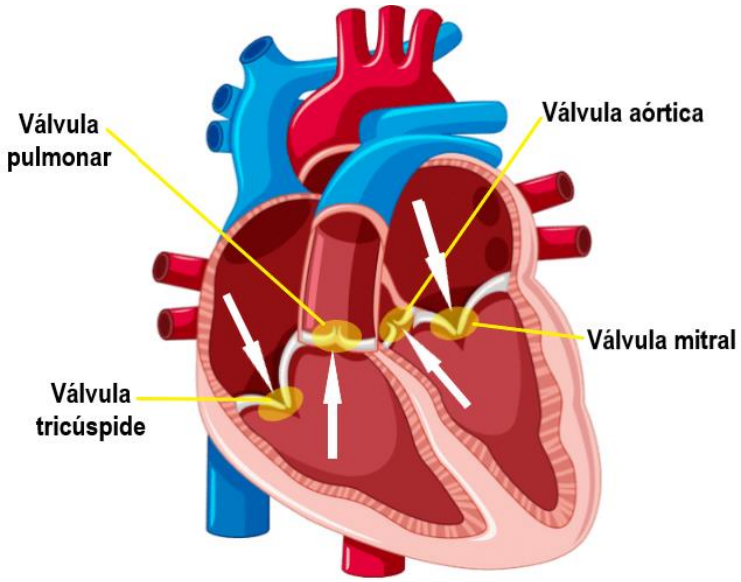


Figura 14.1. Válvulas cardiacas.

Las cuatro cámaras del corazón deben latir organizadamente. Esto se rige por un impulso

eléctrico. Una cámara del corazón se contrae cuando un impulso eléctrico se mueve a través de ella. Dicha señal comienza en un grupo de células altamente especializadas en la aurícula derecha: el nódulo sinoatrial, también llamado nódulo sinusal. Una descarga de este "marcapasos" natural hace que el corazón lata. Este marcapasos genera impulsos eléctricos a una velocidad determinada, pero las reacciones emocionales y los factores hormonales pueden afectar esta velocidad de descarga. Esto permite que la frecuencia cardiaca responda a diferentes demandas.

La aurícula derecha e izquierda es estimulada en primer lugar, y se contraen durante un breve período de tiempo antes de que lo hagan los ventrículos derecho e izquierdo. El impulso eléctrico viaja desde el nódulo sinusal hasta el nódulo atrioventricular, donde se se retrasan los impulsos durante un breve instante, y después continúa por la vía de conducción a través del haz de His hacia los ventrículos. El haz de His se divide en la rama derecha y en la rama izquierda, para proveer estímulo eléctrico a los dos ventrículos. En condiciones normales, mientras el impulso eléctrico se mueve por el corazón, éste se contrae entre 60 y 100 veces por minuto. Cada contracción de los ventrículos representa un latido. Los atrios se contraen una fracción de segundo antes que los ventrículos para que la sangre que contienen se vacíe en los ventrículos antes de que éstos se contraigan.

El electrocardiograma (ECG) es el registro gráfico de los potenciales eléctricos generados por el corazón. Las señales son detectadas con electrodos metálicos que se acoplan a las extremidades y a la pared torácica y luego se amplifican y registran con el electrocardiógrafo.

Los puntos sobresalientes del ECG son (Figura 14.2):

- **Onda P**: Es el registro de la despolarización de las aurículas, la primera parte de la onda P, corresponde a la despolarización de la aurícula derecha y la segunda parte a la de la aurícula izquierda. Es una onda de tipo simétrico, su duración en tiempo es de aproximadamente 0,06 – 0,10 segundos, siendo su voltaje menor a 0,25mV.
- **Intervalo PR**: Es el tiempo que demora la conducción del impulso desde la

aurícula, hasta el inicio de la despolarización de los ventrículos. Incluye la onda P y el segmento PR que es una porción isoeléctrica. El segmento PR corresponde al tiempo que demora la conducción a través del Nodo AV, su duración oscila entre 0,12 a 0,20 segundos.

- **Segmento PR**: Conecta la onda P con el complejo QRS.
- **Complejo QRS**: Corresponde a la despolarización de los ventrículos, está formado por tres ondas que son la Q (primera onda negativa), R (primera onda positiva) y S (primera onda negativa después de la onda R), su duración en tiempo es de 0,04 – 0,10 segundos.
- **Segmento ST**: Conecta con el complejo QRS y la onda T.
- **Intervalo QT**: Incluye el complejo QRS, el segmento ST y la onda T, representa el inicio de la despolarización ventricular hasta el final de la repolarización ventricular, su duración aproximada es de 0,40 segundos. El segmento ST es una porción isoeléctrica del intervalo QT que se relaciona con la meseta del potencial de acción ventricular.
- **Onda T**: Representa la repolarización de los ventrículos, su duración es menor a 0,20 segundos y en voltaje presenta menos de 0,5 mV.

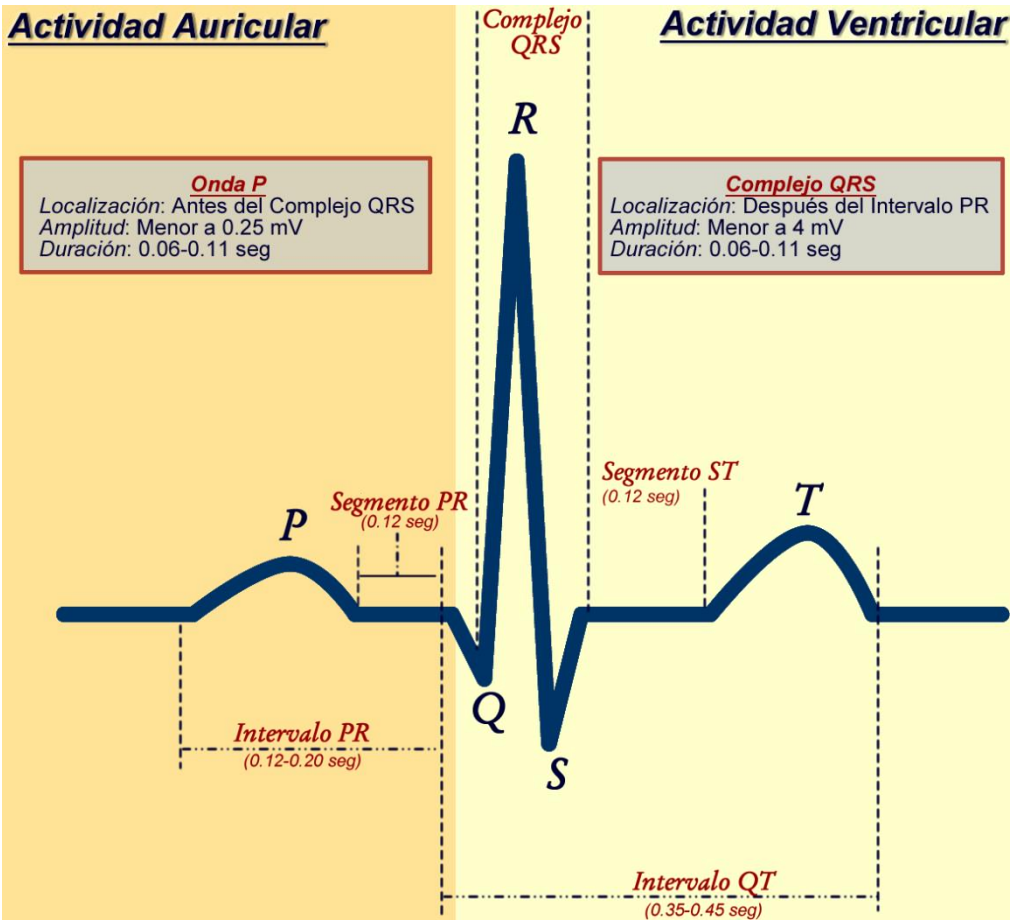


Figura 14.2. Duración y amplitud de ondas, intervalos y segmentos.

El electrocardiograma debe de analizarse teniendo en cuenta:

- La frecuencia.
- El ritmo.
- Eje cardiaco
- La zona del marcapasos dominante
- Morfología de las ondas P y QRS.

Importante: *El objetivo de la actividad tan sólo es identificar los componentes del electrocardiograma relacionándolos con la fisiología cardiaca.* ***De ninguna manera este estudio pretende identificar posibles anomalías cardíacas, las cuales se identifican con otro equipo y con la participación de especialistas*.**

MATERIAL

- Juego de cables para electrodos (**SS2L**)
- Electrodos desechables de vinilo

REACTIVOS

- Gel para electrodos
- Loción de limpieza o alcohol

EQUIPO

- Equipo Biopac®
- Computadora portátil
- Videoproyector (Cañón)

MÉTODO

La actividad práctica consta de tres etapas:

- La primera se refiere a la ***preparación del equipo y del estudiante*** que se someterá a la prueba,
- La segunda a la ***calibración*** del aparato y
- La tercera al ***registro***.

PREPARACIÓN DEL EQUIPO Y DEL ESTUDIANTE

1. Encienda la computadora, asegurándose que el Biopac® esté apagada.
2. Conecte los cables del electrodo (**SS2L**) en el canal de registro 2 (**CH 2**) (Figura 14.3).

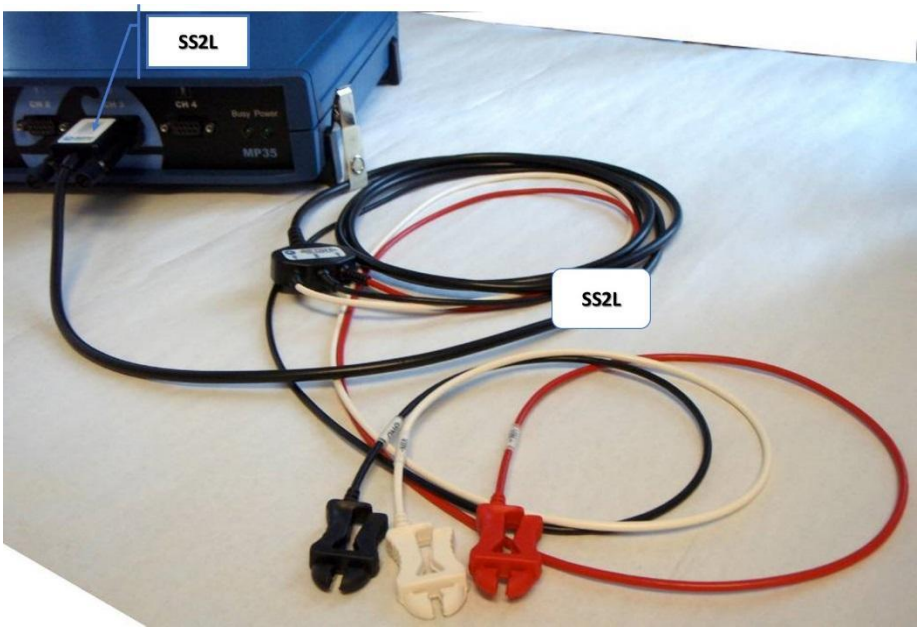


Figura 14.3. Conexión de cables a la unidad.

3. Encienda la unidad de adquisición de datos.
4. Coloque los tres electrodos (Figura 14.4), dos en la superficie interna de los tobillos y uno en la muñeca. Conecte los cables de color en los electrodos correspondientes. Los electrodos deberán de estar bien adheridos a la piel para un buen registro.

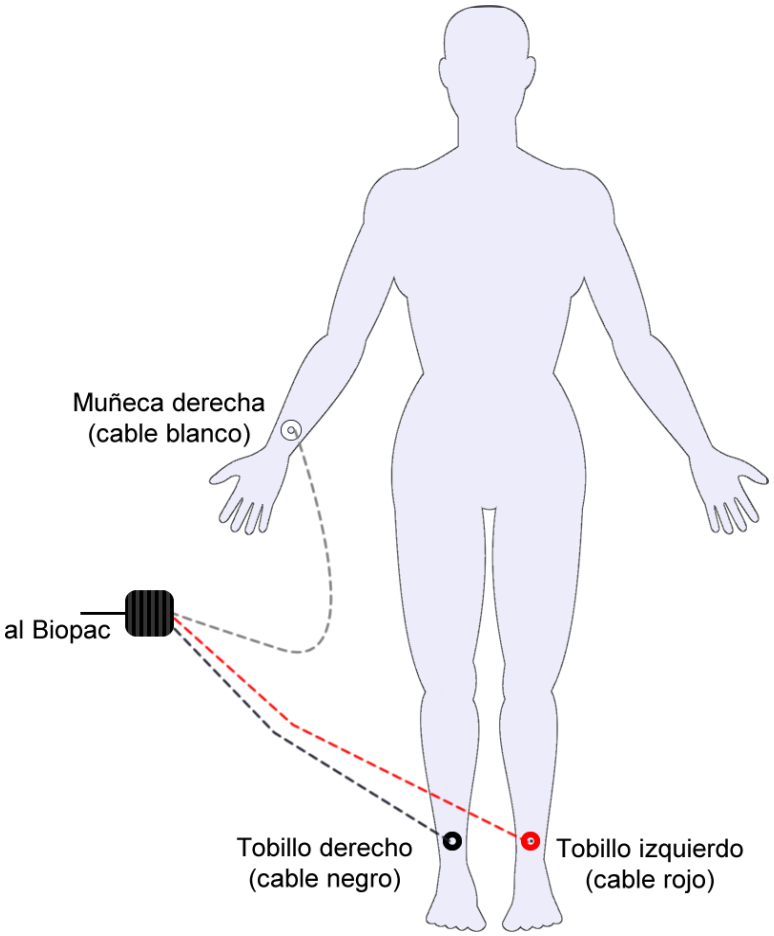


Figura 14.4. Colocación de los electrodos.

Importante: *El estudiante no deberá de tener contacto con ningún objeto metálico y deberá de permanecer acostado, relajado y en silencio*.

5. Ejecute el programa Biopac Student Lab, escoja la lección "**L05-ECG.1**"
6. Presione OK.
7. Para nombrar el archivo se puede utilizar el siguiente formato:

a. *Grupo_Apellido Paterno_Apellido Materno_Nombre*.

8. Presione OK.

CALIBRACIÓN

1. Presione **Calibrar**.
2. El proceso de calibración se detendrá automáticamente en **8 segundos**.
3. Espere a que termine la calibración.
4. Revise los datos, si tiene un buen registro continúe con la actividad, de lo contrario repita la calibración.

REGISTRO

1. El registro se realizará bajo **cuatro** condiciones:
   a. **Segmento 1**: acostado
   b. **Segmento 2**: después de sentarse
   c. **Segmento 3**: respirando profundamente
   d. **Segmento 4**: después de realizar ejercicio
2. El estudiante realizará estas tareas a intervalos entre los registros.
3. Durante todo el registro el estudiante deberá de estar relajado, en la posición que corresponda, sin moverse y sin hablar o reírse.

SEGMENTO 1

1. Presione el botón Registrar.
2. Después de 20 segundos apriete el botón Suspender.
3. Si el registro ha sido correcto continúe (Figura 14.5).

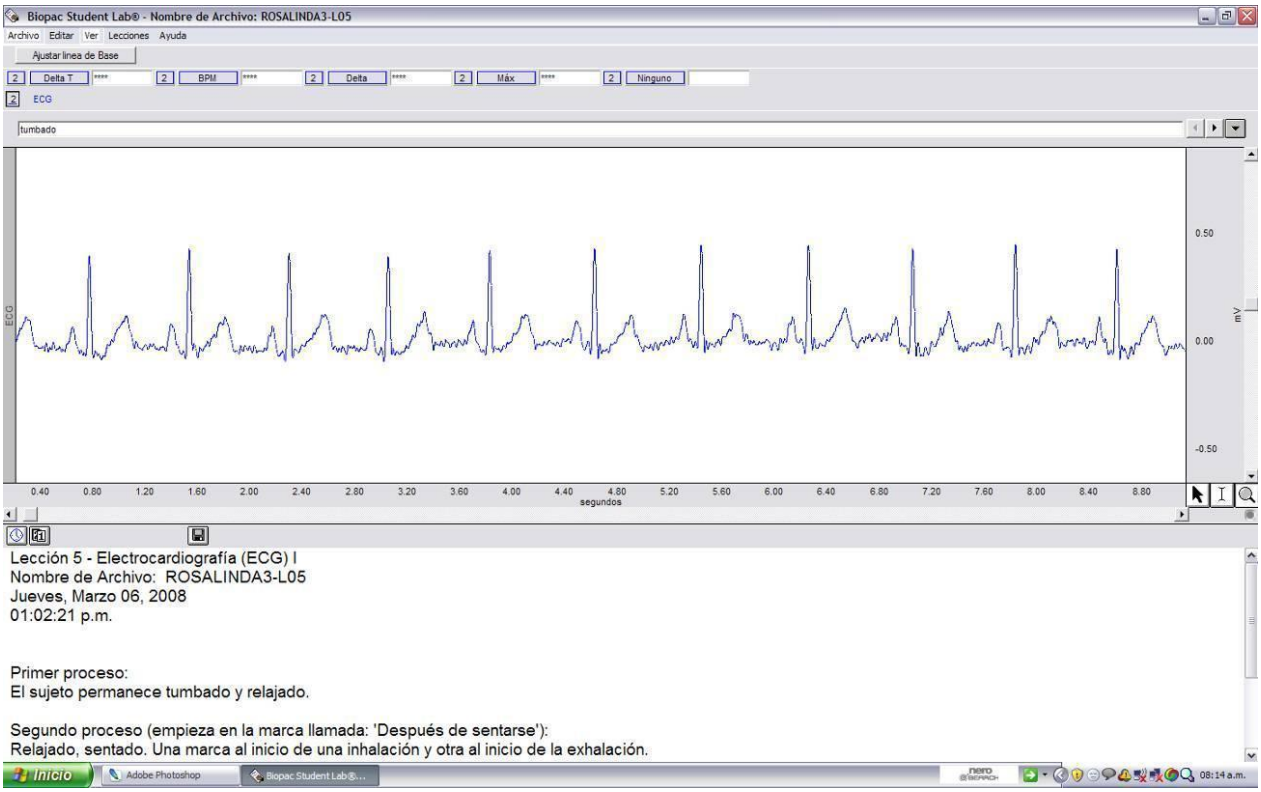


Figura 14.5. Ejemplo de un registro correcto.

SEGMENTO 2.

1. El sujeto deberá sentarse rápidamente.
2. Apriete el botón **Continuar** en el momento que el estudiante haya tomado asiento.
3. Después de 20 segundos apriete el botón **Suspender**.
4. Si el registro ha sido correcto continúe con el segmento 3.

SEGMENTO 3

1. Apriete el botón **Continuar**.
2. El estudiante se encuentra sentado y deberá de realizar 5 ciclos de respiraciones prolongadas, lentas y profundas durante los 20 segundos que dure el registro.
3. En cada inhalación y exhalación deberán de insertarse marcadores, apretando **F9**.
    a. Los marcadores se deberán agregar al inicio de la inspiración y la espiración.
4. Apriete el botón **Suspender**.
5. Si el registro ha sido correcto continúe con el segmento 4.

SEGMENTO 4.

1. Pídale al estudiante que haga ejercicio durante 5 minutos, éste podrá ser:
    a. Saltos,
    b. Sentadillas,
    c. Lagartijas
    d. Abdominales, etc.
2. Para ello retire los cables, pero ***no los electrodos***.
3. Inmediatamente que termine esta rutina ***conecte rápidamente*** los cables correctamente y oprima el botón Continuar.
4. El alumno deberá de permanecer sentado y relajado para continuar el registro durante 60 segundos.
5. Transcurrido este tiempo presione **Suspender**.
6. Apriete Hecho (Done).
7. Retire los electrodos y podrá iniciar el registro con otro sujeto.

RESULTADOS

1. Ingrese en el modo de revisión de datos guardados y escoja el archivo correcto.

2. El canal 2 (**CH 2**) corresponde al ECG.
3. Organice la visualización de la ventana (con la herramienta zoom) de tal forma que pueda observar 4 latidos del segmento 1.
4. Inicie las mediciones con los botones ajustados de la siguiente manera:
   - **CH 2** (⊗ *de Tiempo*): Tiempo final-Tiempo inicial del área seleccionada
   - **CH 2** (*BPM*): Latidos por minuto. Primero calcula la diferencia de intervalos entre el fin y el comienzo del área seleccionada. Luego divide este valor en 60 segundos/minuto.
   - **CH 2** (⊗ *de Amplitud*) Diferencia entre el último y primer punto del área seleccionada
   - **CH 2** (*max*) Amplitud máxima del área seleccionada
5. Para obtener las mediciones seleccione con el cursor desde un pico de onda **R** hasta el siguiente pico de onda **R**. Tome las medidas en otros intervalos iguales (segmento 1).
6. Haga un Zoom en un ciclo cardíaco único del segmento 1. Realice las mediciones correspondientes para llenar los cuadros del informe.
7. Continúe con la mediciones de cada uno de los segmentos de acuerdo con lo que se le solicita en el informe.

INFORME

Con los datos obtenidos llenar el siguiente cuadro:

Estado	LATIDOS POR MINUTO (BPM)
Acostado y relajado	
Sentado (principio de registro)	
Sentado (fin de registro)	
Respiración profunda (principio de registro)	
Respiración profunda (fin de registro)	
Después de ejercicio (principio de registro)	
Después de ejercicio (fin de registro)	

ACTIVIDADES

1. ¿Cómo regula el organismo la frecuencia cardíaca? ¿Cuáles son los cambios que esperaría bajo cada una de las condiciones de la actividad realizada?
2. ¿Existen diferencias en el ciclo cardíaco a causa del ciclo respiratorio?
3. ¿Qué cambios ocurren en el sístole y diástole entre el reposo y el ejercicio?

REFERENCIAS

1. Planfzer R. Lecciones de Fisiología. Para el uso con el Programa Biopac Student Lab. Biopac Systems Inc.
2. De Vattuone L. Anatomía y Fisiología Humanas. España: Gz Editores; 2006.
3. Guyton A, Hall J. Fisiología Médica. 11a edición. España: Elsevier; 2006.

15a. Propiedades del músculo liso

OBJETIVOS

1. Describir las características específicas del músculo liso
2. Analizar la estructura del músculo liso relacionándola con su función
3. Registrar la respuesta del músculo liso frente a diferentes tipos de estímulos físicos y químicos.

ANTECEDENTES ACADÉMICOS

- Ultraestructura de los miofilamentos del músculo liso
- Tipos de músculo liso
- Mecanismo de contracción del músculo liso
- Regulación del músculo liso por el sistema nervioso autónomo

INTRODUCCIÓN

El músculo liso está formado por fibras musculares lisas que corresponden a células uninucleadas, delgadas y aguzadas en los extremos, cuya longitud varía entre 20 y 500 mm. Este tipo de músculo forma la porción contráctil de la pared de diversos órganos tales como tubo digestivo y vasos sanguíneos, que requieren de una contracción lenta y sostenida. Las células se organizan en grupos, formando haces, rodeados de tejido conjuntivo fibroso que contiene vasos sanguíneos.

El núcleo de las fibras musculares lisas se ubica en el centro de la fibra y los orgánulos citoplasmáticos tales como mitocondrias, aparato de Golgi, retículo endoplásmico rugoso y ribosomas libres se localizan, mayoritariamente, en la vecindad de los polos nucleares. El resto del citoplasma está ocupado por abundantes miofilamentos finos de actina, una proporción menor de miofilamentos gruesos de miosina, y un citoesqueleto de filamentos intermedios formados por desmina. Existen, también, numerosos cuerpos densos,

estructuras que anclan filamentos finos.

Las fibras musculares lisas se disponen desplazadas una respecto de la otra, de manera que el extremo delgado de una fibra se ubica vecino a la parte ancha de la fibra vecina. Esta disposición de las fibras y la localización del núcleo en el centro, explica el aspecto del músculo liso en corte transversal.

Las fibras musculares lisas están rodeadas por una lámina basal (lámina externa) comparable a la lámina basal de los epitelios. Por fuera de la lámina externa, se dispone una trama de fibras reticulares.

En sitios discretos, las células adyacentes están asociadas por uniones de comunicación ("nexos"), de estructura y función similares a la explicada en tejidos epiteliales.

El aparato contráctil del músculo liso se contrae más lentamente que el del músculo estriado, pero permite un acortamiento mayor de las fibras musculares lisas. El mecanismo de contracción, en esta variedad de músculo, también se basa en el deslizamiento de los filamentos finos sobre los filamentos gruesos.

En estas células, la contracción es regulada también por el alza en las concentraciones citosólicas de Ca^{2+}. Sin embargo, la regulación de la contracción está asociada a miosina y no a actina. Un alza en las concentraciones citosólicas de Ca^{2+} induce la fosforilación de las cadenas livianas de la miosina lo que produce una modificación en la cola de la molécula que permite la formación de filamentos gruesos y genera un cambio conformacional en la cabeza que permite su interacción con actina.

Los filamentos gruesos preparados in vitro, a partir de miosina de músculo liso, aparecen polarizados en una sola dirección en un lado del filamento y en la dirección opuesta a lo largo del otro lado. En esta configuración no existe una zona libre de puentes, como la que se ve en el filamento grueso del músculo esquelético. Esta disposición tiene la ventaja que actina y miosina pueden interactuar sin interrupción a lo largo de todo el filamento grueso. Cuando la cabeza de la miosina se defosforila, los filamentos se desensamblan y la miosina se disocia de la actina. La fosforilación es catalizada por una enzima (quinasa de la cadena liviana de la miosina) cuya acción requiere de la presencia del complejo Ca-calmodulina.

El modelo aceptado de contracción de las fibras musculares lisas establece que manojos de filamentos finos de actina, asociados a filamentos gruesos de miosina, se anclan por un extremo a cuerpos densos adheridos a la membrana plasmática y por el otro a filamentos intermedios no contráctiles a través de cuerpos densos citoplasmáticos. La α-actinina es uno de los componentes de los cuerpos densos. El rol de los cuerpos densos es similar al de los discos Z de las miofibrillas del músculo estriado. Los manojos contráctiles se orientan oblicuos respecto del eje mayor de la célula, lo que explica el acortamiento que experimentan las fibras musculares lisas durante su contracción.

En la superficie de las células musculares lisas existen numerosas vesículas membranosas o ***cavéolas***, vecinas a cisternas o túbulos del retículo endoplásmico liso. Se cree que este sistema membranoso juega un papel en la captura y liberación de calcio, similar al que desempeña el retículo sarcoplásmico en el músculo estriado.

Además de su actividad contráctil, las células musculares lisas tienen la capacidad de sintetizar colágeno tipo III, elastina y proteoglicanos.

El músculo liso está inervado por nervios de los sistemas simpático y parasimpático. Con frecuencia, los axones de los nervios terminan en una serie de dilataciones en el conjuntivo que rodea a las células musculares. Algunas de estas dilataciones axónicas están muy próximas (10-20 nm) a la superficie de la célula muscular dando origen a uniones neuromusculares. De acuerdo a la proporción de células inervadas en un determinado músculo, se distingue el tejido muscular liso:

- **Unitario o visceral**, que posee grandes unidades motoras en las que sólo algunas células musculares poseen una unión neuromuscular propia. La excitación se transmite a un número variable de células musculares que no reciben inervación directa, a través de uniones de comunicación (nexos). Esto permite que todas las células musculares de la unidad motora se contraigan o relajen en conjunto.
- **Multiunitario** presente en órganos que requieren una modulación precisa del grado de contracción de sus células, como el iris del ojo o las arteriolas. En este tipo de

músculo liso, las unidades motoras son pequeñas, predominando aquellas en que existe asociación de sólo una célula muscular con cada terminación nerviosa.

MATERIAL BIOLÓGICO

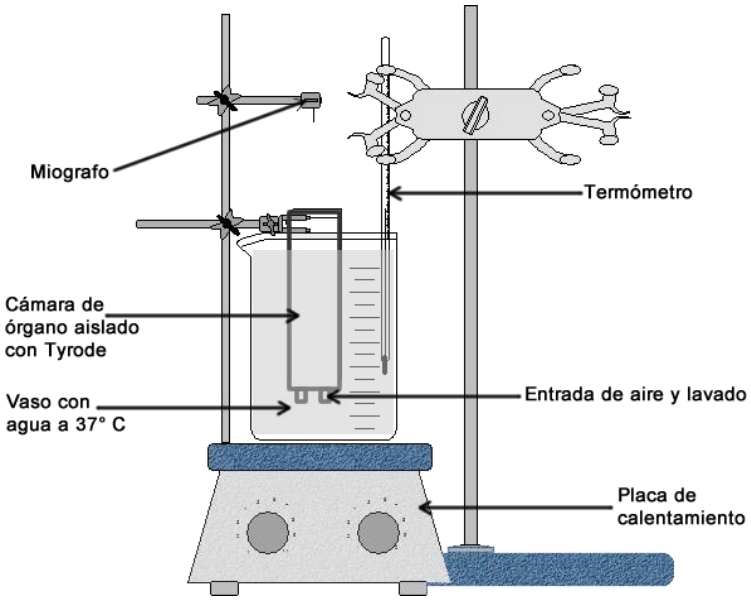
- Rata

MATERIAL

- Guantes
- Aguja curva
- Hilo delgado resistente
- Hilo grueso resistente
- Tabla de disección
- Caja de Petri
- Cámara de órgano aislado
- Bomba de aire
- Pinza para desagüe de la cámara
- Pinza para control de burbujeo
- Termómetro
- 1 vaso de precipitados de 1 L
- 3 vasos de precipitados de 250 mL
- 1 soporte universal
- 1 pinza de nuez
- 1 pinza de tres dedos
- 1 pesa de 5 g
- Anillos metálicos para sostener la muestra
- Gancho
- Estuche de disección

- Parrilla de calentamiento
- Miógrafo

Importante: *El dispositivo deberá quedar de la siguiente forma*:



REACTIVOS

- Solución de Tyrode[11] que se prepara con los siguientes compuestos en ese orden (las cantidades son en gramos por cada litro):
  - NaCl 8,
  - KCl 0.2,
  - $CaCl_2$ 0.2,
  - $MgSO_4$ 0.15,
  - $NaHCO_3$ 1.0,

[11] Para la preparación es recomendable agregar los reactivos en ese orden y una vez disuelto el anterior. En caso de que se vaya a preparar para usarse otro día, la glucosa se agrega hasta el día de su uso.

- NaH_2PO_4 0.04,
- glucosa 1.0

- Solución de $CaCl_2$ (1M)
- Solución de KCl (1M)
- Solución de NaCl (1M)
- Atropina (en caso de no contar con atropina puede sustituirse con hioscina).
- Adrenalina (en caso de no contar con adrenalina puede sustituirse con nifedipino).
- Acetilcolina (en caso de no contar con acetilcolina puede utilizarse una infusión concentrada de ruda (*Ruta graveolens*) o zoapatle (*Montanoa tomentosa*), se sugiere el uso de ambas por separado y posteriormente juntas).

EQUIPO

- Equipo Biopac®
- Computadora
- Videoproyector (Cañón)

MÉTODO

La actividad práctica consta de tres etapas:

- la primera se refiere a la **preparación** del equipo y del animal de experimentación que se someterá a la prueba,
- la segunda a la **calibración** del aparato y
- la tercera al **registro**.

PREPARACIÓN DEL EQUIPO

1. Encender la computadora, asegurándose que la unidad esté apagada.
2. Conecte el miógrafo (***Variable Force Transducer***, ***BSL-SS12LA***) en el canal de registro 1 (**CH 1**).

3. Coloque el gancho en la primera argolla (en la marca de 50 g).

Figura 15.1. Miografo con gancho en la posición de 50 g

4. Ejecute el programa ***Biopac Student Lab PRO***,
5. Abra el archivo: **MUSCLISOLIMPIO.acq**, sálvelo con un nuevo nombre, se sugiere el siguiente formato:
    a) Grupo_Musculo_Liso
6. El equipo estará listo para proceder a la **Calibración**.
7. Montar el dispositivo como se muestra en la figura 15.2

PREPARACIÓN DEL ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN

La eutanasia de la rata se realizará en una cámara de CO2, en apego a la normatividad (**NOM-062-ZOO-1999**). Su muerte debe confirmarse mediante dislocación. Tras la eutanasia, realizar de manera inmediata:

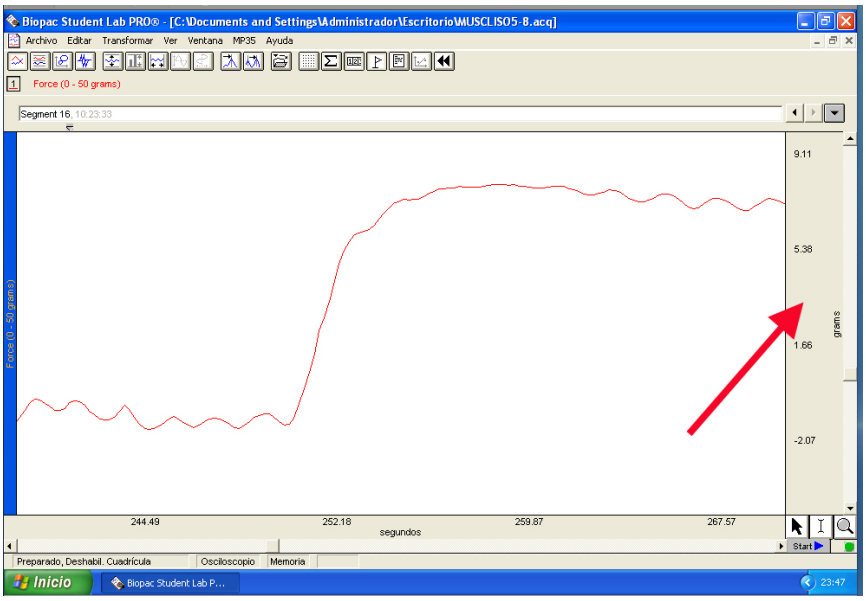
8. La disección del primer segmento del intestino delgado. Tomar un fragmento del intestino, lavarlo con solución Tyrode (a 37.5 °C), colocarlo en una caja Petri y mantenerlo siempre sumergido en la solución a 37.5 °C, con el burbujeo constante de 4 burbujas por segundo.
9. Fijar hilos a cada extremo de la porción de intestino utilizando una aguja,

    a) Un extremo se atará en la base de la cámara de órgano aislado.
    b) El extremo opuesto quedará listo, con un amarre en forma de asa, para ser fijado al miógrafo.

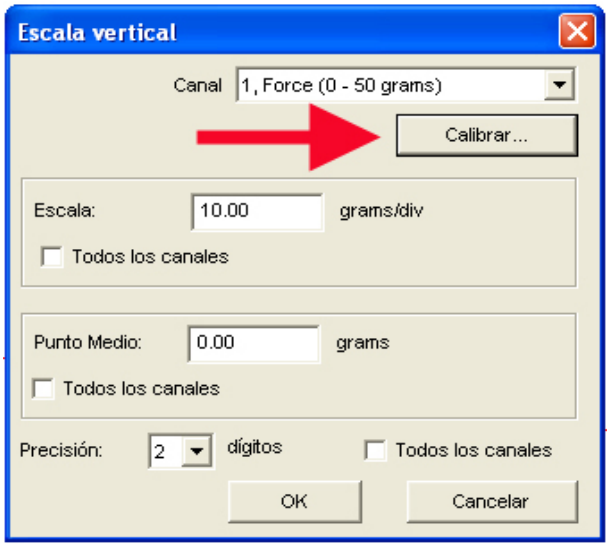
CALIBRACIÓN

Importante: *Debido a que la fuerza generada por el intestino de la rata es muy débil, se realizará una calibración con una pesa de 5 g o menor*.

1. Haga doble clic en el eje de las **ordenadas** de su ventana del registro.



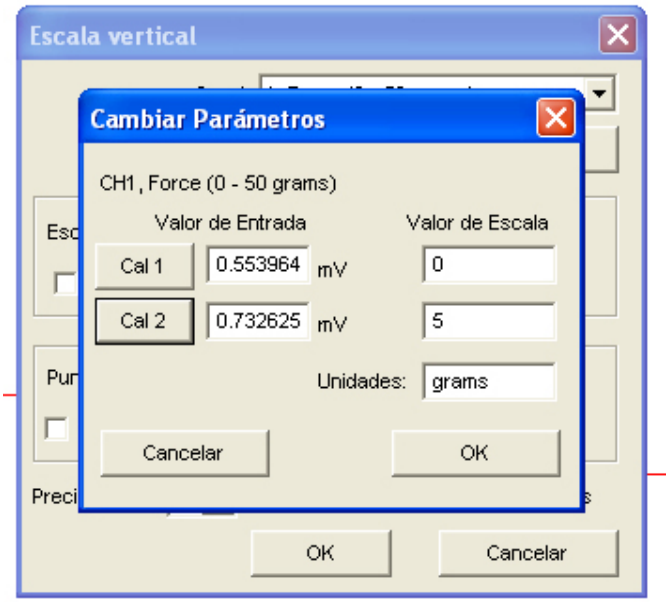
2. Con ello aparece una ventana de diálogo donde deberá presionar el botón de calibrar.



3. En la ventana "***Cambiar parámetros***", realizar los siguientes cambios en:

a. **Valor de Escala**:
   i. *Casilla superior*: 0 (cero)
   ii. *Casilla inferior*: el valor real de la pesa (5 o menos)

b. **Valor de Entrada**:
   i. Sin colocar la pesa, pero si el gancho, presione **Cal 1**,
   ii. Posteriormente coloque la pesa y presione **Cal 2**.



4. Presione finalmente el botón **OK** hasta salir de los cuadros de diálogo.

REGISTRO

1. Una vez realizada la **Calibración**, supervise las condiciones de temperatura y burbujeo en la cámara y sujete el hilo del extremo superior del músculo al miógrafo.

2. Verifique que los hilos estén tensionados en forma suficiente y en posición perpendicular a la mesa del laboratorio.
3. Durante el registro deberá de atender a las siguientes recomendaciones:
    a. Para iniciar el registro haga clic en la flecha que se encuentra en el ángulo inferior derecho de la ventana de registro.
    b. Permita que el músculo retorne la contracción normal antes de cualquier prueba.
    c. Grabe continuamente, sólo deberá detenerse para salvar su registro.
    d. Salve después de cada manipulación.
    e. Siempre grabe un registro de contracciones normales antes y después de cualquier prueba, antes de que se detenga el registro para salvarlo.
    f. Inserte un marcador cuando comience un nuevo experimento, cambie de soluciones, agregue alguna sustancia o manipule de alguna forma el tejido. Para ello presione la tecla **F9** y anote en la casilla inferior a lo que se refiere dicha marca.
4. Después de la grabación de 20 segundos de contracción basal, proceder a realizar las siguientes pruebas.

EFECTO DE LA TENSIÓN DE OXÍGENO

1. Verifique que la temperatura sea la indicada (37.5° C), el burbujeo de aire a razón de 4 por segundos.
2. Registre durante un minuto, inserte una marca.
3. Suspenda la oxigenación por 30 segundos y registre el efecto sin detener en ningún momento.
10. Transcurridos los 30 segundos restablezca la oxigenación.
11. Registre otro minuto.

EFECTO DE LA TEMPERATURA AMBIENTE

1. Cambie la solución Tyrode por una que se encuentre a temperatura ambiente.
12. Registre por un minuto.
13. Cambie la solución Tyrode por una a 37° C y registre por 30 segundos.
14. Repetir los pasos 1 a 3 utilizando la solución:
    a) Refrigerada
    b) A 40° C

EFECTO DE LA ADRENALINA

1. Realizar un registro basal por un minuto.
2. Agregar directamente a la cámara húmeda, unas dos gotas de **adrenalina**, indique el momento de la adición en su registro insertando una marca.
3. Registre por 30 segundos, detenga el registro y cambie el Tyrode para lavar su preparación en por lo menos dos ocasiones.

EFECTO DE LA ACETILCOLINA

1. Después de un minuto de registro basal, sin detener el registro agregue dos gotas de ***acetilcolina***.
4. Registre por 30 segundos, detenga el registro y cambie el Tyrode para lavar su preparación en por lo menos dos ocasiones.

EFECTO DE LA ATROPINA

1. Después de un minuto de registro basal, sin detener el registro agregue dos gotas de ***atropina***.
5. Registre por 30 segundos, detenga el registro y cambie el Tyrode para lavar su

preparación en por lo menos dos ocasiones.

EFECTO DE LA TEMPERATURA

1. Cambie la solución Tyrode por una que se encuentre a temperatura de refrigeración.
15. Registre por un minuto.
16. Cambie la solución Tyrode por una a 37° C y registre por 30 segundos.
17. Repetir los pasos 1 a 3 utilizando la solución de 40 a 45° C.

EFECTO DE LOS IONES (SODIO, CALCIO Y POTASIO)

1. Después de un minuto de registro basal, sin detener el registro agregue dos gotas de $\boldsymbol{Na^+}$.
2. Registre por 30 segundos, detenga el registro y cambie el Tyrode para lavar su preparación en por lo menos dos ocasiones.
3. Repetir los pasos 1 y 2 utilizando primero $\mathbf{CaCl_2}$ y por último **KCl**.

Una vez concluida la práctica, los restos de los animales serán colocados en una bolsa de polietileno de color amarillo y serán llevados al bioterio para su adecuado procesamiento (**NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002**).

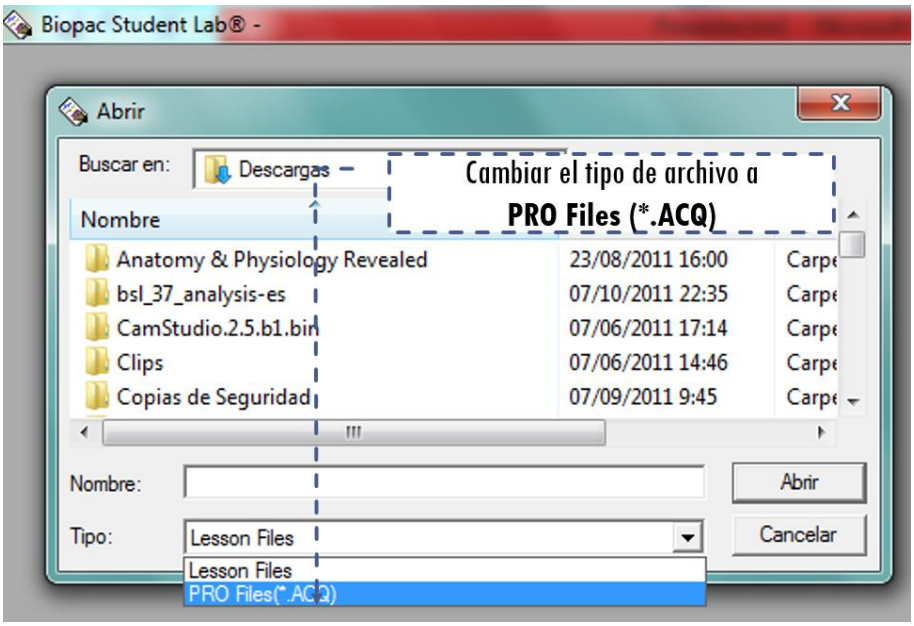
RESULTADOS

ABRIR ARCHIVO MÚSCULO LISO

Para el análisis de los resultados de músculo liso, a diferencia de las otras prácticas, no

se podrá abrir una vez ejecutado el software de análisis, para ello se requiere seguir estos sencillos pasos:

1. Ejecutar el software de Biopac Student Lab.
2. En la ventana emergente cambiamos de la sección ***Tipo*** la opción ***Lesson Files*** a ***PRO Files (*.ACQ)***



3. Buscamos el archivo con los resultados de la práctica de músculo liso
4. Seleccionamos Abrir.
5. Realizar el análisis según se indica.

AJUSTES

En esta parte de la actividad se tomarán las medidas de la fuerza generada por el músculo calculando la media (g), el valor máximo (g) y el mínimo (g). Además, registrará la frecuencia (Hz) de las contracciones en cada caso.

1. Ingrese en el modo de revisión de datos guardados, con el programa Biopac Student Lab y escoja el archivo correcto.
18. El canal 1 (**CH 1**) corresponde a la actividad del músculo liso registrada.
19. Organice la visualización de la ventana (con la herramienta **zoom**) de tal forma que pueda observar el registro normal junto con la prueba realizada.
20. Inicie las mediciones con los botones ajustados de la siguiente manera:
    a) **CH 1** (*Media*) Promedio de la fuerza en el área seleccionada.
    b) **CH 1** (*Frecuencia*) Expresada en Hz.
    c) **CH 1** (*Máximo*) Valor máximo de la contracción
    d) **CH 1** (*Mínimo*) Valor mínimo de la contracción
21. Marque toda la zona donde se realiza la prueba para obtener el dato de Media, Máximo y Mínimo.
22. Para obtener las mediciones de frecuencia seleccione con el **cursor** desde un pico de una onda de contracción hasta el siguiente pico de la onda contigua.
23. Haga un zoom en un fragmento de cada prueba para realizar una mejor medición para llenar su cuadro de resultados.

INFORME DE RESULTADOS.

Prueba	Media (g)	Frecuencia (Hz)	Máximo (g)	Mínimo (g)
Tensión de O_2				
Temperatura ambiente				
Adrenalina				
Acetilcolina				
Atropina				
Disminución de la temperatura				
Aumento de la temperatura				
NaCl 1M				
$CaCl_2$				
KCl 1M				

ACTIVIDADES

1. ¿Cuál es el mecanismo de acción de la atropina y que efecto produce sobre la motilidad del músculo liso?
2. ¿Qué tipo de receptores para la acetilcolina existen en el músculo liso del intestino?
3. Mediante un cuadro representa las diferencias estructurales y fisiológicas entre los tres tipos de músculo.

REFERENCIAS

1. De Vattuone L. Anatomía y Fisiología Humanas. España: Gz Editores; 2006.
2. Guyton A, Hall J. Fisiología Médica. 11a edición. España: Elsevier; 2006.
3. Levine SD, Hahn DW, Cotter ML, Greenslade FC, Kanojia RM, Pasquale SA, Wachter M, McGuire JL. The Mexican plant zoapatle (Montanoa tomentosa) in

reproductive medicine. Past, present and future. J Reprod Med. 1981;26(10):524-8.

4. Waller DP, Martin A, Oshima Y, Fong HH. Studies on zoapatle. V. Correlation between in vitro uterine and in vivo pregnancy interruption effects in guinea pigs. Contraception. 1987;35(2):147-53.
5. Gutiérrez-Pajares JL1, Zúñiga L, Pino J. Ruta graveolens aqueous extract retards mouse preimplantation embryo development. Reprod Toxicol. 2003;17(6):667-72.
6. Ross MH. y Pawlina W. Histología, texto y atlas, correlación con biología molecular y celular. 7a edición. España: Editorial Médica Panamericana; 2015.
7. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
8. Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, Protección ambiental-Salud ambiental-Residuos peligrosos biológico-infecciosos- Clasificación y especificaciones de manejo.

RECURSOS WEB

- **Documento:** NOM-062-ZOO-1999 [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999_220801.pdf].
- **Documento**: NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002 [https://www.cndh.org.mx/sites/default/files/doc/Programas/VIH/Leyes%20y%20normas%20y%20reglamentos/Norma%20Oficial%20Mexicana/NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002%20Proteccion%20ambiental-salud.pdf].

15b. Propiedades del músculo liso (uso del simulador)

El dilema ético en la experimentación animal en la docencia busca tratar de cumplir con las normas éticas y bioéticas buscando cumplir sus objetivos de educación y conocimiento sin atentar contra los principios éticos y seguir los lineamientos normativos.

Por lo que se presenta la siguiente opción práctica para cumplir con los objetivos planteados en el curso y en el presente manual.

OBJETIVOS

1. Describir las características específicas del músculo liso.
2. Analizar la estructura del músculo liso relacionándola con su función.
3. Registrar la respuesta del músculo liso frente a diferentes tipos de estímulos físicos y químicos.
4. Comparar la respuesta del músculo liso con la del músculo esquelético y cardiaco, en respuesta a diversos agentes químicos (agonistas y antagonistas).

ANTECEDENTES ACADÉMICOS

- Ultraestructura de los miofilamentos del músculo liso
- Tipos de músculo liso
- Mecanismo de contracción del músculo liso
- Regulación del músculo liso por el sistema nervioso autónomo

Introducción

Las funciones de movimiento de los seres vivos son ejecutadas por órganos llamados músculos. Existen dos tipos generales: el músculo estriado y el músculo liso. A su vez el primero se clasifica en esquelético y cardiaco. (3)

Los órganos huecos del organismo, excepto el corazón, para cumplir su función requieren ejecutar una contracción lenta y sostenida, proporcionada por el músculo liso de sus paredes. Las capas que forman este tipo de músculo permiten la modificación continua del volumen del órgano y de esta manera, por ejemplo, ajustan el flujo sanguíneo en los vasos o la conductancia de las vías aéreas.(1)

El músculo liso está compuesto por células uninucleadas, delgadas y fusiformes. Llegan a tener longitudes que varían desde 20 m en las paredes de los vasos sanguíneos hasta 400-500 m en las paredes del útero, y diámetros de 2 a 10 m. Su núcleo y los orgánulos citoplasmáticos se ubican en el centro de la fibra; La fibra lisa no contiene un sistema de túbulos T ni de cisternas terminales, pues su retículo sarcoplásmico está pobremente desarrollado, pero sí contiene numerosas cisternas membranosas o caveolas. (1)

Se reconoce la existencia de dos tipos de fibras de músculo liso, aun cuando estas realmente representan los extremos de un espectro continuo de tipos de fibras musculares lisas (1) :

1. Tipo unitario, también denominado visceral o sincitial, lo cual significa que haces de miles de fibras, rodeadas de tejido conectivo, están dispuestas en capas y unidas mediante uniones estrechas intercelulares, que permiten que la fuerza generada en una célula se transmita a la siguiente. En este tipo de tejido se observa una oscilación espontánea, graduada y rítmica del potencial de membrana. Las despolarizaciones pueden alcanzar el umbral de disparo de potenciales de acción y provocar contracciones denominadas fásicas, que pueden ser moduladas por hormonas. (1)

2. Tipo multiunitario, constituido por células musculares que actúan de forma relativamente independiente. Presentan pocas uniones comunicantes y pocas uniones estrechas, por lo que tienden a tener mayores densidades de inervación. Estas células no presentan oscilaciones de su potencial de membrana, no poseen el mecanismo autogenerador de potenciales de acción y sus contracciones son

graduadas, según el nivel de despolarización causado por la actividad de la inervación. (1)

Ultraestructura de los miofilamentos

Los filamentos de miosina del músculo liso son más largos que los del músculo esquelético, y toda la superficie del filamento está cubierta por cabezas de miosina. Esta organización singular permite que el músculo liso se estire mientras mantiene, a la vez, suficiente superposición para generar tensión óptima. (6)

Los filamentos intermedios y los cuerpos densos proteicos forman un citoesqueleto. La actina se une a los cuerpos densos. Cada molécula de miosina está rodeada de filamentos de actina. (6)

Mecanismo de contracción muscular

Los eventos moleculares de contracción del músculo liso son:

1. Un aumento del Ca^{2+} citosólico inicia la contracción. Este Ca^{2+} es liberado del retículo sarcoplásmico, pero también ingresa del líquido extracelular.

2. El Ca^{2+} se une a la calmodulina, una proteína de unión a calcio hallada en el citosol.

3. La unión del Ca^{2+} a la calmodulina es el primer paso de una cascada que finaliza con la fosforilación de las cadenas livianas de miosina.

4. La fosforilación de las cadenas livianas de miosina aumenta la actividad de la miosina ATPasa y provoca contracción. Por consiguiente, la contracción del músculo liso es controlada por procesos reguladores vinculados a la miosina y no a través de la tropomiosina. (6)

Control de la contracción del músculo liso; IP_3: Inositol trifosfato; IP_3-R:

Canal receptor activado por IP_3 (6)

Material

- Computadora portátil con las siguientes características mínimas:
  - Windows 8
  - 128 MB RAM
  - 100 MB de DD
- Simulador Virtual Cat versión 3.0.0 instalado (podrá obtenerlo en la siguiente dirección: http://spider.science.strath.ac.uk/sipbs/software_sims.htm)

Método

Con base en los principios bioéticos de la experimentación animal y los principios de las 3R[12], esta práctica podrá ser realizada mediante el uso de simuladores.

[12] Los principios de las 3R plantean que se puede hacer uso de tecnologías o enfoques que *reemplacen* o eviten directamente el uso de animales en experimentos.

Introducción a Virtual Cat

Virtual Cat pertenece al “Strathclyde Pharmacology Simulations”, desarrollado por la universidad de Strathclyde de Glasgow, este programa simula experimentos farmacológicos en tejidos aislados o animales completos.

El simulador Virtual Cat permite observar la presión arterial, frecuencia cardíaca (músculo cardíaco), músculo esquelético y las contracciones de la membrana nictitante (músculo liso) a través de un registro gráfico simulado, aplicar una variedad de fármacos diferentes y observar sus efectos.

Familiarizándose con el simulador

I. Una vez instalado el simulador lo ejecutaremos abriéndolo desde la barra de búsqueda o bien dando doble clic sobre un acceso directo en el escritorio.

II. Una vez abierto el simulador se observa la interfaz del programa. En esta podremos observar lo siguiente:

1. **New Experiment:** Nos permite iniciar un experimento independiente a los realizados con anterioridad.
2. **Stimulator:** Nos permite seleccionar una o varias vías de estimulación:
    a. Nervio vago (Vagus Nerve).
    b. Membrana nictitante (Nintitanting Membrane).
    c. Músculo esquelético (Skeletal Muscle).
3. **Agonist:** Grupo de sustancias químicas que se unen a un mismo receptor celular produciendo un mismo efecto con una misma o diferente duración y/o intensidad.
4. **Antagonists:** Grupo de sustancias químicas que se unen a un mismo receptor celular que los agonistas, inhibiendo su actividad.

5. **Unknowns:** Despliega una lista de fármacos desconocidos.
6. **Dose:** permite el empleo de distintas dosis de agonistas en ug/Kg, y de antagonistas en mg/ Kg.
7. **Inject Drug:** permite administrar una dosis de fármaco seleccionado a medida que se grafica el experimento.
8. **Apartado gráfico:** en este se encuentran cuatro canales distintos, correspondientes a los parámetros:
    a. **La Presión Arterial** (ABP) registra valores de sístole, diástole y la media.
    b. **Frecuencia cardiaca** (HR) registra el valor de la frecuencia.
    c. **Membrana Nictitante** (NIC) registra la actividad del músculo liso, así como la fuerza de contracción.
    d. **Músculo Esquelético** (SKM) muestra el registro de la actividad del músculo esquelético, así como la fuerza de contracción.
9. **Start:** Permite iniciar con el experimento
10. **Window size:** permite modificar la escala de tiempo observada

III. Activar la estimulación de los 3 tipos de músculos (liso, esquelético y cardíaco) dando clic en: **Vagus nerve, Nictitating Membrane** y **Skeletal Muscle.**

Efecto de los fármacos.

IV. Seleccionar Histamina de la lista de fármacos disponibles en la sección de agonistas. Seleccionar 1 mg/kg; en el apartado de **Dose.**

V. Iniciar el registro dando clic en el botón **start**. El cuadro del experimento comenzará a

graficar el tiempo(s) de la contracción muscular y la fuerza de contracción medida (gr). Registrar el estado basal del músculo durante 1 minuto.

VI. Una vez transcurrido el minuto adicione la histamina dando clic en **Inject drug**, observe el comportamiento de las gráficas hasta que estas regresen a su estado basal.

VII. Una vez se llegue al estado basal, permita que pasen 30 segundos.

Efecto de los antagonistas

VIII. Seleccione de la lista de antagonistas disponibles propranolol a una concentración de 1 mg/Kg y adicionarla dando clic en **inject drug.**

IX. Registre el comportamiento observado hasta que las gráficas regresen a su estado basal.

X. Repita el procedimiento empleando los agonistas y antagonistas señalados en la siguiente tabla:

Agonista	**Antagonista**
Histamina	Propranolol
Adrenalina	Propranolol
Adrenalina	Tubocurarina

Resultados

XI. Una vez obtenidas las gráficas del simulador detenga el experimento dando clic en el botón stop.

XII. Empleando la barra móvil dentro de la ventana (característica por su color verde), comience a buscar dentro de las gráficas obtenidas los picos máximos obtenidos en cada tipo de músculo frente a los distintos estímulos generados.

XIII. Anote, para su posterior análisis, los datos obtenidos de las gráficas de agonistas y de antagonistas empleados.

Análisis de resultados

XIV. Una vez obtenidos los resultados de las gráficas, elabore en su computadora, celular o cuaderno la siguiente tabla:

Agonista.	**Antagonista.**	**Músculo Afectado**	**Resultado**
Adrenalina	Ninguno.	Liso	
	Vecuronio.	Liso	

		Esquelético
	Tubocurarina.	Lis

XV. Con los datos obtenidos, discuta los cambios vistos en las distintas gráficas y explique su comportamiento.

Actividades complementarias

Como actividad complementaria a la práctica, puede emplear la siguiente lista de agonistas y antagonistas en el simulador, observar los distintos comportamientos obtenidos por las distintas parejas empleadas.

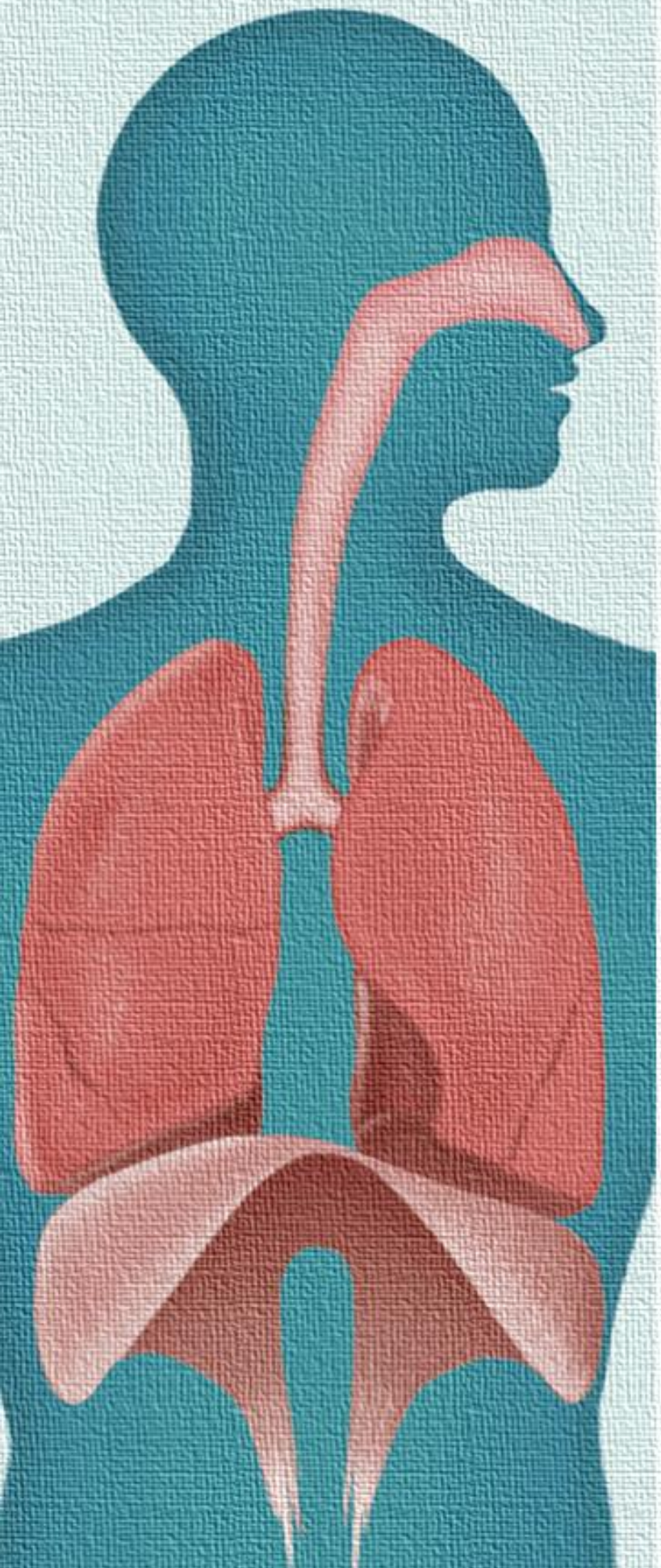
Agonista	**Antagonista**
Adrenalina	Vecuronio, hexametonio, y propanolol
Acetilcolina	Tubocurarina, galamina y vecuronio.
Histamina	Mepiramina
Noradrenalina	Propranolol

Referencias

1. J.Tresguerres, C. Ariznavarreta, V. Cachofeiro, D. Cardinali, et all. Fisiología humana. 3a Edición. McGraw.Hill Interamericana de España, 2005.
2. Ruiz Díaz, Daniel Nicolás, Nora Cristina, et all. Hormonas Catecolamínicas Adrenales. Universidad Nacional del Nordeste; Cátedra de Bioquímica Facultad de Medicina. 2010.
3. John E. Hall. Tratado de Fisiologia Medica. 12a ed. Guyton y Hall. España. 2011.
4. Udec.cl. [citado el 11 de mayo de 2023]. Disponible en: http://www2.udec.cl/farmacologia/LabVirtual/vlab.htm
5. Guillermo A., Arias M. Neuromodulación e histamina: regulación de la liberación de neurotransmisores por receptores H3. Revista de salud mental. Vol 35 No. 4. Agosto 2012. pag. 345-352.
6. Silverthorn. Fisiología Humana un enfoque integrado. 8a edición. Editorial médica Panamericana; Ciudad de México. 2019.
7. Principios de las 3R.

Recursos Web

- **Sitio:** Alternativas y las 3R [https://www.animalresearch.info/es/el-diseno-de-la-investigacion/alternativas-y-las-3r/].
- **Infografía:** Principios Bioéticos en la Experimentación Animal. Principio de las 3R [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/780417/Infografia_principio_bioeticos_exp_carta.pdf].



Sección V

Fisiología de la respiración

16. Frecuencia respiratoria

OBJETIVOS

1. Registrar y medir ventilación utilizando un neumógrafo y transductor de aire y temperatura.
24. Mostrar como la ventilación se relaciona a los campos de temperatura en el flujo de aire a través de uno de los orificios nasales.
25. Observar y registrar la expansión del pecho y la contracción y modificación en la velocidad y la profundidad del ciclo respiratorio debido a la influencia cerebral y la influencia de quimiorreceptores sobre los centros medulares de control.

ANTECEDENTES ACADÉMICOS

- Funciones del sistema respiratorio
- Ciclo respiratorio
- Regulación de la ventilación
- Hipoventilación e hiperventilación

INTRODUCCIÓN.

Las tres funciones principales del sistema respiratorio son proporcionar oxígeno para las necesidades energéticas del cuerpo, proporcionar una salida para el CO_2 y ayudar a mantener el pH del plasma sanguíneo. El ciclo respiratorio sirve a estos propósitos múltiples en conjunto con el sistema circulatorio.

La mecánica del ciclo respiratorio consiste de procesos alternados, la **inspiración** y la **espiración.** Durante la inspiración, los músculos esqueléticos (tales como el diafragma y los intercostales externos) se contraen, de allí que aumenta el volumen dentro de la capacidad torácica y los pulmones. El aumento de volumen crea una presión menor que la

atmosférica dentro de los pulmones, y así el aire va hacia los pulmones. Durante la espiración en reposo, los músculos inspiratorios se relajan, causando que el volumen de la capacidad torácica y los pulmones se reduzca. Esta reducción de espacio obliga al gas a regresar a la atmósfera. Normalmente una espiración no forzada, en reposo, es un evento pasivo determinado por la relajación de los músculos inspiratorios. Durante ejercicio o una exhalación forzada, por ejemplo, al toser, la espiración llega a ser un evento activo que depende de la contracción del músculo espiratorio que tiran la caja torácica y comprime los pulmones.

Durante la inspiración, el oxígeno que ingresa a los pulmones difunde a los capilares pulmonares y es transportado a las células atreves de los eritrocitos (células rolas sanguíneas). Las células usan el oxígeno para generar energía para los procesos metabólicos. Cuando se está produciendo la energía, estas células liberan dióxido de carbono como producto de desecho. Algo del dióxido de carbono reacciona con el agua en el cuerpo para formar ácido carbónico, el cual luego se disocia en iones H^+ y bicarbonato. Los eritrocitos transportan CO_2 y H^+ de regreso a los pulmones. Una vez en los pulmones, los H^+ y el HCO_3^{1-} se recombinan para formar agua y CO_2 (Figura 16.1)

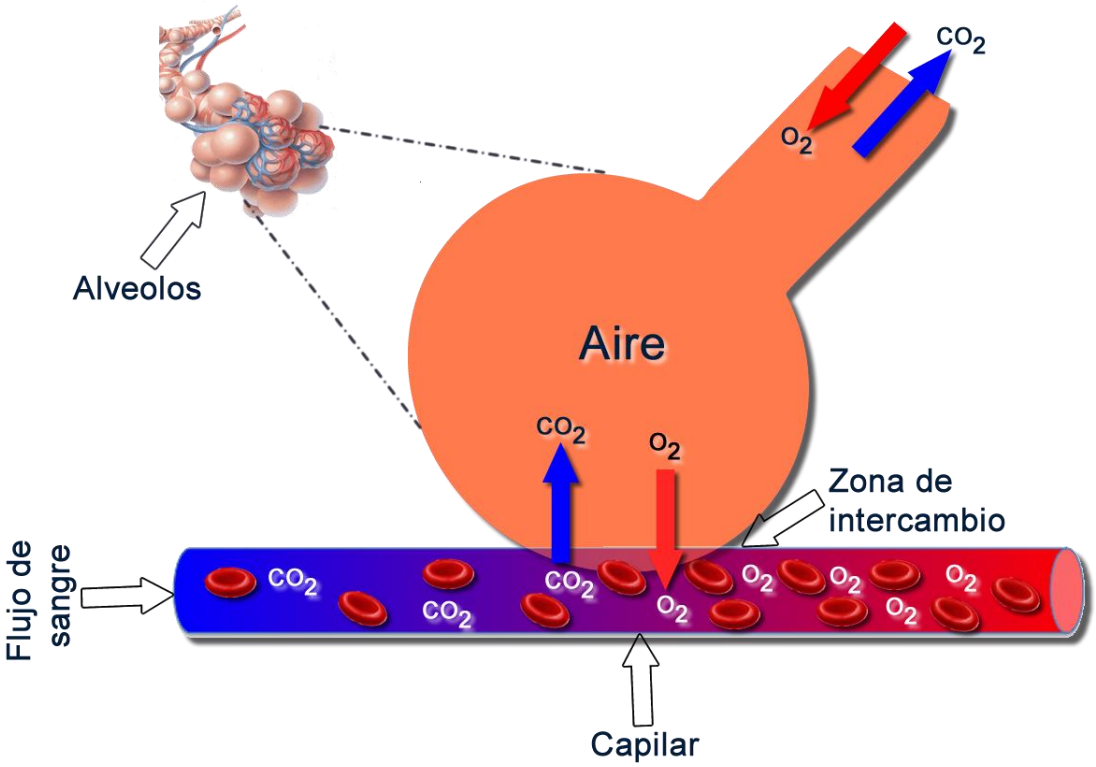


Figura 16.1. Intercambio gaseoso.

Muchos factores están involucrados en la regulación de la **ventilación**, la velocidad y la profundidad de la respiración. El **ritmo** básico de respiración se establece por los centros respiratorios **inspiratorio** y **espiratorio** de la médula.

- El ***centro inspiratorio*** inicia la inspiración por medio de la activación de los músculos inspiratorios. Durante la respiración en reposo (**eupnea**), la velocidad respiratoria promedio (**RR**) es 12-14 ciclo/minuto. El centro inspiratorio siempre se activa para producir una inspiración activa.
- En contraste, el ***centro espiratorio*** actúa limitando y luego inhibiendo el centro inspiratorio, de allí que produce una espiración pasiva.

Este patrón de respiración básica es afectado por:

a) Los centros superiores en el cerebro.
b) La retroalimentación desde la periferia y quimiorreceptores en el sistema arterial y medular, respectivamente.
c) Receptores de estiramiento en los pulmones.
d) Otros receptores sensoriales en el cuerpo.

Por ejemplo, el control cerebral de los centros respiratorios medulares es observado cuando un sujeto intenta enhebrar una aguja. El ciclo temporalmente cesa de modo que se minimizan los movimientos del cuerpo para que la aguja puede ser enhebrada más fácilmente. El control cerebral también es evidente durante el habla, ya que se requiere que el aire espiratorio pase por sobre las cuerdas vocales.

Quimiorreceptores distintos censan los niveles de O_2, CO_2 y H^+ en la sangre y en el fluido cerebroespinal de la célula. En **hiperventilación,** la velocidad de respiración y la profundidad de la respiración aumentan de tal manera que los pulmones eliminan el dióxido de carbono del cuerpo más rápido que de lo que es producido. Los iones Hidrogeno son eliminados de los fluidos corporales y el pH se hace más elevado. Esto tiende a bajar la ventilación hasta que los niveles de dióxido de carbono e iones hidrógeno se hacen normales. El cese temporal de la respiración después de hiperventilación voluntaria es conocido como ***apnea vera***.

En **hipoventilación** (respiración baja y/o lenta) se gana dióxido de carbono en los flujos corporales (hipercapnia) ya que los pulmones fallan en remover el dióxido de carbono tan rápidamente como está siendo formado. El aumento en la formación de ácido carbónico resulta en una ganancia neta de iones hidrogeno por lo cual disminuye el pH de los fluidos corporales. En consecuencia, la retroalimentación de los quimiorreceptores causa que la velocidad aumente hasta que los niveles de dióxido de carbono y el pH del fluido extracelular regresen a lo normal.

El organismo humano es más sensible a los cambios en los niveles de CO_2 que a los cambios de O_2 en la sangre. Los quimiorreceptores de la médula central son expuestos al fluido cerebroespinal (***CFS***), ya que el CFS no está tamponado, (a diferencia de la sangre), los cambios adquiridos por la disolución del CO_2 son más pronunciados.

En algunos individuos se llega a presentar una condición estimulada por los bajos niveles de O_2 en las grandes alturas. Los bajos niveles de O_2 estimulan un aumento en la ventilación, lo cual disminuye el CO_2 y los iones H^+. Esto causa que el pH aumente y se dé la ***alcalosis respiratoria***. Un tratamiento simple para los efectos de la alcalosis respiratoria es hacer que la persona respire en una bolsa. Cuando la persona inhala los niveles elevados CO_2 restablece el balance de pH de su sangre.

En esta lección se medirá la ventilación registrando la velocidad y profundidad del ciclo respiratorio usando un **transductor neumográfico.** Este transductor convierte los cambios en la expansión del pecho y la contracción en cambios de voltaje, los cuales aparecerán como una onda. Un ciclo respiratorio entonces se registrará como un aumento de voltaje (segmentos ascendentes) durante la inspiración y una disminución del voltaje (segmento descendente) durante la espiración.

Asimismo, se registrará la temperatura del flujo de aire de entrada y salida de uno de los orificios nasales con una cánula de medición de temperatura. La temperatura del aire pasa por la cánula de temperatura y está inversamente relacionada a la expansión o contracción del pecho del sujeto. Durante la inspiración (cuando el pecho se expande) el sujeto respira en un aire relativamente frío (comparado a la temperatura corporal del sujeto), mientras que el aire enviado del cuerpo durante la espiración (cuando el pecho se contrae) es más caliente.

MATERIALES

- Transductor respiratorio **Biopac SS5LB**
- Transductor de temperatura **Biopac SS6L** (termistor de respuesta rápida)

- Cinta de lado único o cinta adhesiva

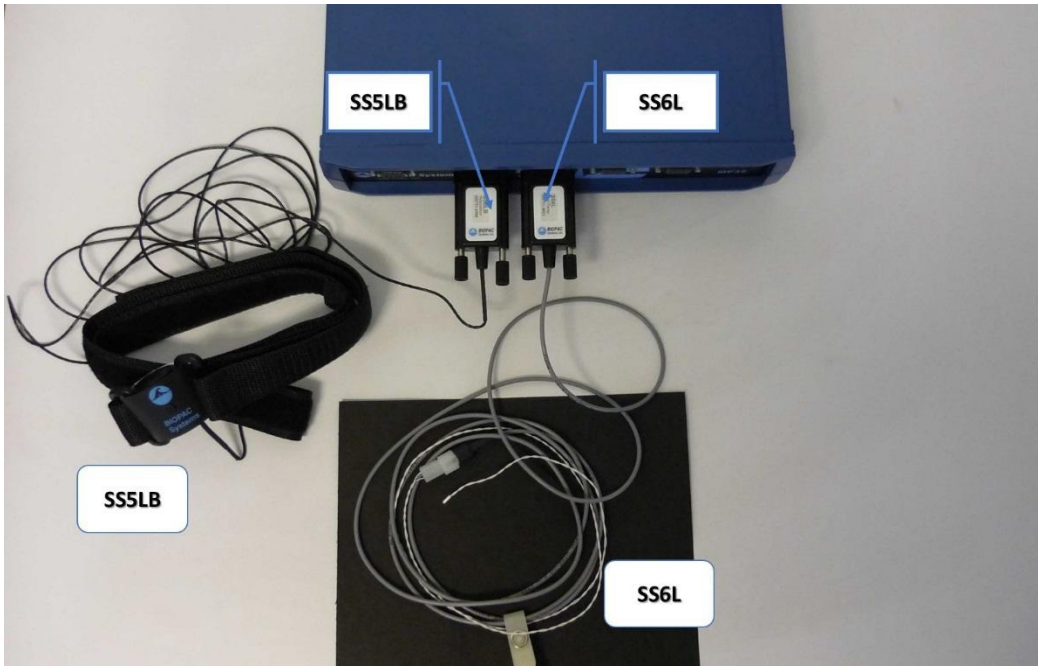


Figura 16.2. Conexión de los transductores al equipo.

EQUIPO

- Equipo Biopac®
- Computadora portátil
- Videoproyector (Cañón)

MÉTODO

La actividad práctica consta de tres etapas:

- La primera se refiere a la ***preparación del equipo y del estudiante*** que se

someterá a la prueba,

- La segunda a la ***calibración*** del aparato y
- La tercera al ***registro***.

PREPARACIÓN DEL EQUIPO Y DEL ESTUDIANTE

1. Encender la computadora.
2. Verificar que el equipo **BIOPAC** se encuentre apagada.
3. Conectar los accesorios Biopac como se indica:
    a. Transductor respiratorio **SS5LB** a **CH 1**
    b. Transductor de temperatura **SS6L** en **CH 2**
4. Encienda el equipo.
5. Colocar el transductor respiratorio **SS5LB** al sujeto, rodeando el pecho por debajo de las axilas y por encima de los pezones, tal como se muestra (Figura 16.3):

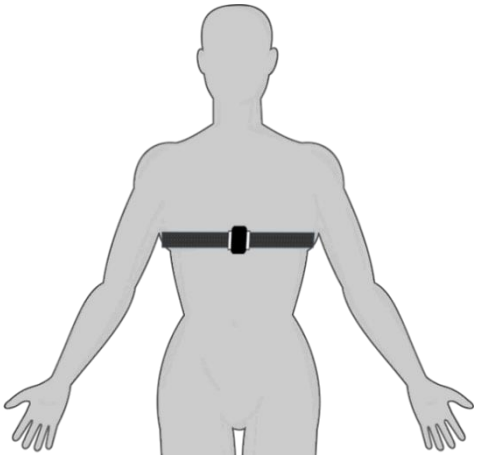


Figura 16.3. Colocación del transductor respiratorio al individuo.

6. La tensión correcta es crítica, el transductor debe estar ligeramente apretado en el

punto de máxima expiración.

7. Se puede colocar el transductor por encima de una camisa delgada.
8. Colocar el transductor de temperatura **SS6L** al estudiante posicionando por debajo de los orificios de la nariz sin tocar el rostro y sujetando con una cinta adhesiva (Figura 16.4).

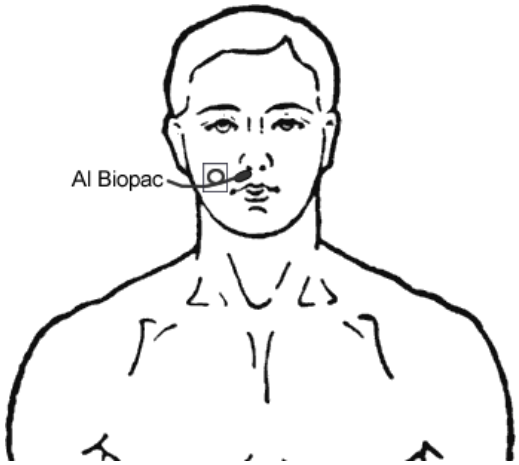


Figura 16.4. Colocación del transductor de temperatura al individuo.

9. Ejecute el programa Biopac Student Lab, escoja la lección "**L08-CicloR.1**"
10. Presione OK.
11. Para nombrar el archivo se puede utilizar el siguiente formato:
    a. *Grupo_Apellido Paterno_Apellido Materno_Nombre*.
12. Presione OK.

CALIBRACIÓN

1. El estudiante deberá estar sentado, relajado y respirar normalmente.
2. Presione **Calibrar**.

3. Esperar ***dos segundos*** posteriormente respirar profundamente por 1 ciclo y después normalmente.
4. El proceso de calibración se detendrá automáticamente en 8 segundos.
5. Espere a que termine la calibración.
6. Revise los datos, si tiene un buen registro continúe con la actividad, de lo contrario repita la calibración.

Importante: *Se observará el registro de aire o temperatura en un canal (CH 2) y expansión del pecho en el otro (CH 1)*.

REGISTRO

Consideraciones Generales

1. El registro se realizará bajo cuatro condiciones:
    a. **Segmento 1**: respiración normal.
    b. **Segmento 2**: hiperventilación y recuperación.
    c. **Segmento 3**: hipoventilación y recuperación y toser.
    d. **Segmento 4**: leer en voz alta.
2. El estudiante realizará estas tareas a intervalos entre los registros.
3. Durante todo el registro el estudiante deberá de estar relajado, en la posición que corresponda, sin moverse y sin hablar o reírse.
4. Al iniciar el registro el estudiante debe permanecer sentado en una silla respirando normalmente.

SEGMENTO 1

1. Presione el botón **Registrar**.
2. Después de 15 segundos apriete el botón **Suspender**.
3. Si el registro ha sido correcto continúe con el siguiente segmento.

4. En caso contrario apriete **Repetir**.

SEGMENTO 2

1. Apriete el botón **Seguir**.
2. El sujeto hiperventila por 30 segundos y luego se recupera de la hiperventilación por otros 30 segundos.
3. Apriete el botón **Suspender**.
4. Si el registro ha sido correcto continúe,
5. En caso contrario apriete **Repetir**.

SEGMENTO 3.

1. Apriete el botón **Seguir**.
2. El sujeto hipoventila por 30 segundos y luego se recupera de la hipoventilación por otros 30 segundos.
3. Apriete el botón **Suspender**.
4. Si el registro ha sido correcto continúe con el otro segmento
5. En caso contrario apriete **Repetir**.

SEGMENTO 4.

1. Apriete el botón Reasumir.
2. El sujeto deberá toser una vez y leer en voz alta.
3. Apriete Suspender.
4. Si el registro ha sido correcto continúe.
5. En caso contrario apriete Rehacer.
6. Apriete Hecho (Done).
7. Retire los transductores de temperatura y respiración y podrá iniciar el registro con

otro sujeto.

RESULTADOS

1. Entrar al modo de Revisión de Datos y elija el archivo correcto.
26. Verificar que se observen los siguientes canales con sus respectivas muestras:

Canal	**Corresponde**
CH 2	Flujo de aire
CH 40	Respiración

27. Verificar o preparar las cajas de medición como se indica:

Canal	**Medición**
CH 40	Delta Tiempo (ΔT)
CH 40	BPM
CH 40	P-P
CH 2	P-P

SEGMENTO 1

1. Haga un Zoom en una sección pequeña del segmento 1.
28. Seleccione con el cursor el área de inspiración (Figura 16.5).

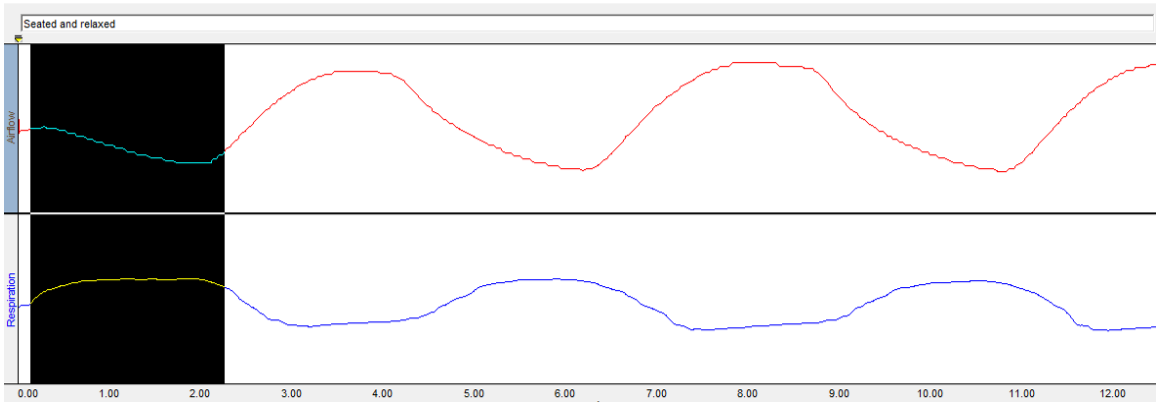


Figura 16.5. Sección de inspiración.

29. Seleccione con el cursor el área de espiración (Figura 16.6).

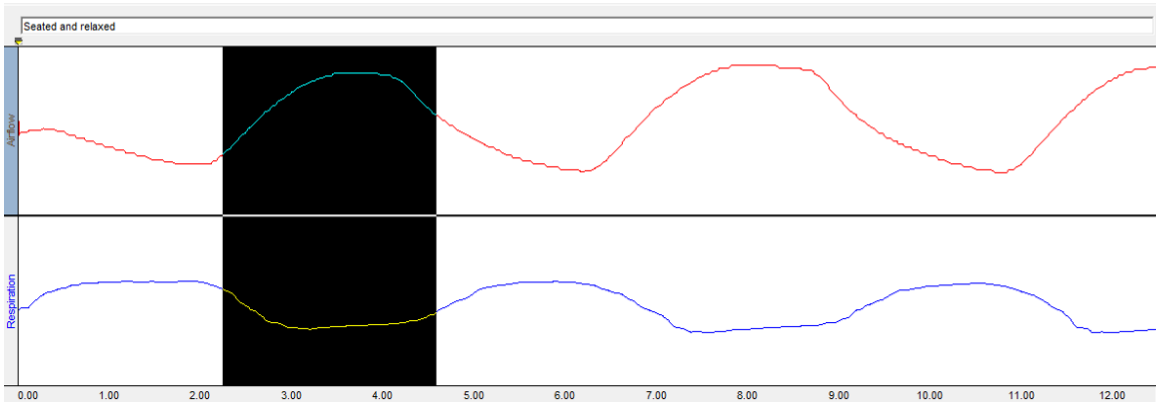


Figura 16.6. Sección de espiración.

30. Repetir las mediciones de inspiración y espiración por dos segmentos adicionales en el segmento 1 de datos (Figura 16.7)

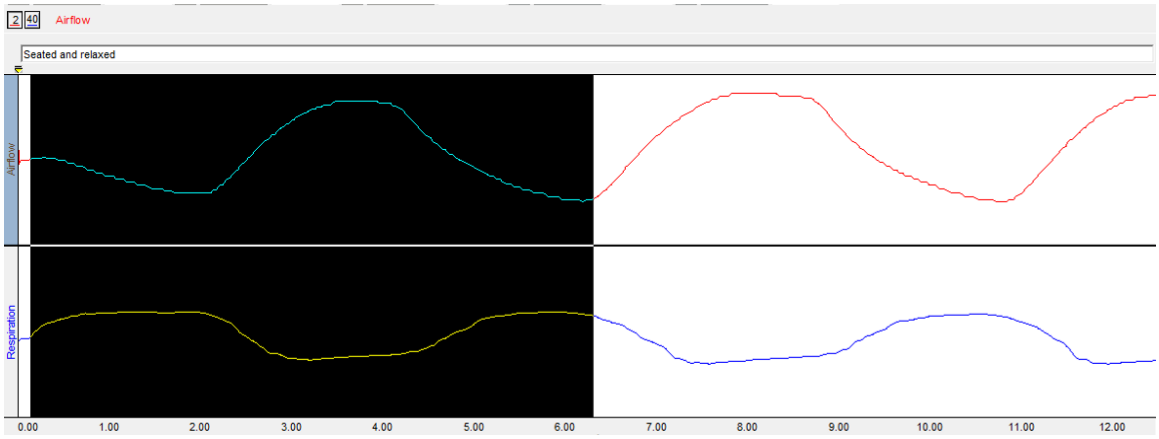


Figura 16.7. Sección de inspiración y espiración.

31. Seleccione un área dentro del segmento 1 desde el comienzo hasta el final de un mismo ciclo.
32. Repetir las mismas mediciones en cada uno de los **tres segmentos restantes**.
33. Seleccione tres ciclos individuales en cada uno de los cuatro segmentos y determine la amplitud de la respiración para cada uno.
34. El segmento 4 toser solo requiere una medición.

INFORME DE RESULTADOS

Complete la siguiente tabla de acuerdo a los resultados obtenidos

Segmento	BPM (CH 40)
Respiración basal	
Hiperventilación	
Recuperación de la hiperventilación	
Hipoventilación	
Recuperación de la hipoventilación	
Leer en voz alta	

ACTIVIDADES

1. ¿Después de un periodo breve de hiperventilación, ocurre “apnea vera”?

35. Defina hiperventilación e hipoventilación.
36. Describa el sistema de retroalimentación que causa apnea vera.
37. ¿Cuáles son los efectos de la hipoventilación?
38. ¿Qué cambios ocurren en el cuerpo con hipoventilación?
39. ¿Cómo es que el cuerpo ajusta la velocidad y profundidad de la ventilación para contrarrestar los efectos de la hipoventilación?
40. En que parte del ciclo respiratorio la temperatura es:
    a) Más alta

b) Más baja

41. Explique por qué la temperatura varía con el ciclo respiratorio.
42. Describa o defina toser en términos de modificación del ciclo.
43. ¿Qué modificaciones ocurren en el ciclo respiratorio cuando se lee en voz alta? ¿Por qué?
44. Refiérase a los datos de la tabla del segmento 1 durante eupnea. El sujeto inspira inmediatamente después del fin la espiración o hubo una pausa? Explique el estímulo y el mecanismo que inicia la inspiración.
45. Refiérase a los datos de la tabla de profundidades y conteste; ¿Hay diferencias en las profundidades de ventilación relativas?

REFERENCIAS

1. Pflanzer R, McMullen M. Lección 8: Ciclo Respiratorio, en Lecciones de Fisiología para el uso con el programa *Biopac Student Lab*®.
46. Cardinali, DP, Dvorkin AB, Taylor B. Bases Fisiológicas de la Práctica Médica. 13ª ed. Editorial Médica Panamericana, México 2003
47. Tórtora, GJ, Derrickson, BH. Principios de Anatomía y Fisiología 11ª ed. Editorial Médica Panamericana, México 2007.

Sección VI

Homeóstasis

17a. Metabolismo y función de los triglicéridos

OBJETIVOS

1. Analizar la importancia fisiológica de los triglicéridos.
2. Determinar la concentración de triglicéridos en una muestra de sangre.
3. Analizar los procesos de síntesis, absorción y transporte de los triglicéridos, así como la relación clínico-patológica de los niveles alterados de triglicéridos.

ANTECEDENTES ACADÉMICOS

- Síntesis, función, transporte y catabolismo de los triglicéridos.
- Implicaciones clínicas de los niveles altos y bajos de triglicéridos.
- Características de las lipoproteínas VLDL y quilomicrones.

INTRODUCCIÓN

Los triglicéridos son ácidos grasos esterificados a una molécula de glicerol, constituyen el grupo mayoritario de los lípidos de reserva energética del organismo y se encuentran de forma abundante en el tejido adiposo animal así como en las semillas y frutos de las plantas oleaginosas.

Se almacenan en los adipocitos y dado que son hidrófobos, entran en coalescencia y constituyen gotas aceitosas casi anhidras que son la reserva energética principal del organismo, son moléculas altamente reducidas.

Las células transforman por combustión los ácidos grasos a CO2 y H_20, generando una gran cantidad de energía lo cual hace a esta forma de almacenamiento de energía altamente eficaz y un mecanismo conservado por el humano a través de su evolución, el rendimiento de su oxidación hasta CO_2 y H_2O es de 9 kcal/g.

Para la síntesis de triglicéridos (la cual se efectúa principalmente en el hígado) se requiere de los ácidos grasos que a su vez dependen del balance energético (es decir del consumo y uso de alimentos) y del glicerol fosfato que es el aceptor inicial de ácidos grasos y que a su vez se elabora a partir de la glucosa tanto en hígado como en adipocito.

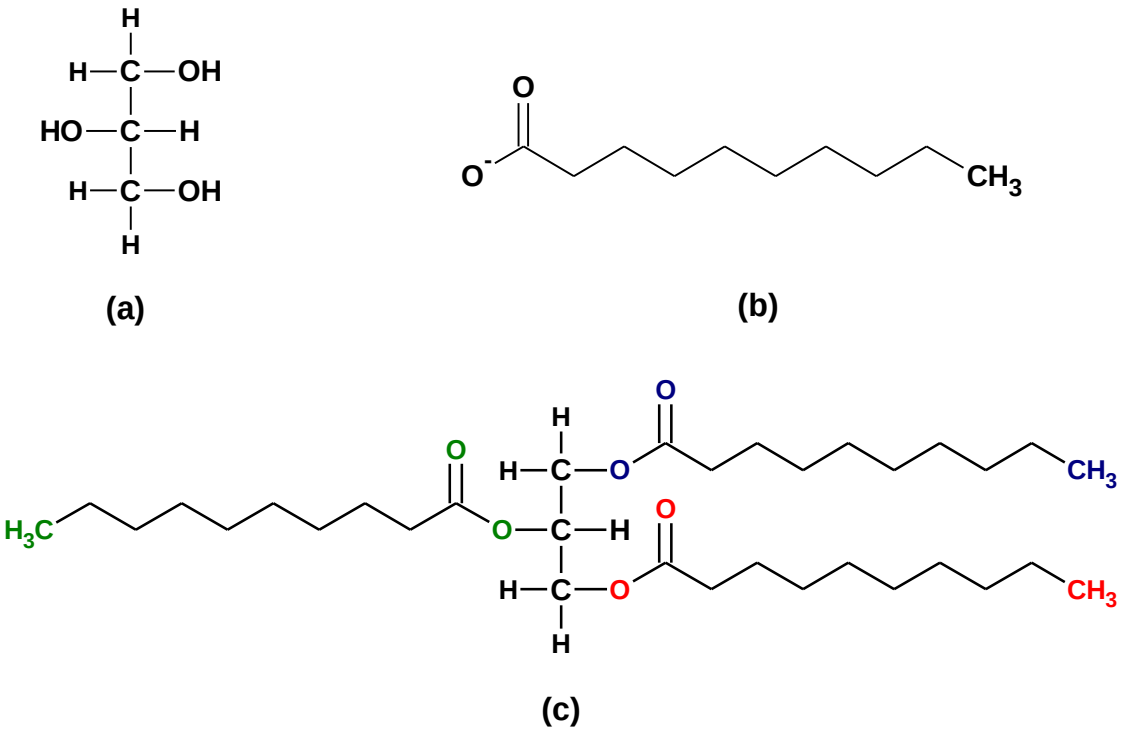


Figura 17a.1 Estructura de glicerol (**a**) y ácidos grasos (**b**), componentes de los triglicéridos (**c**).

Una vez sintetizados los triglicéridos, dada su insolubilidad en plasma, en su mayoría se exporta empacado con ésteres de colesterilo, colesterol, fosfolípidos y proteínas (apolipoproteína B-100) en las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), que lo descargan hacia los tejidos (Figura 17 a.2).

Por lo tanto, la síntesis de triglicéridos depende del estado energético del organismo, por lo que ante un exceso de nutrientes (ya sean carbohidratos o proteínas) se favorece la síntesis y almacenamiento de triglicéridos en el adipocito condicionando la obesidad y otros problemas de salud.

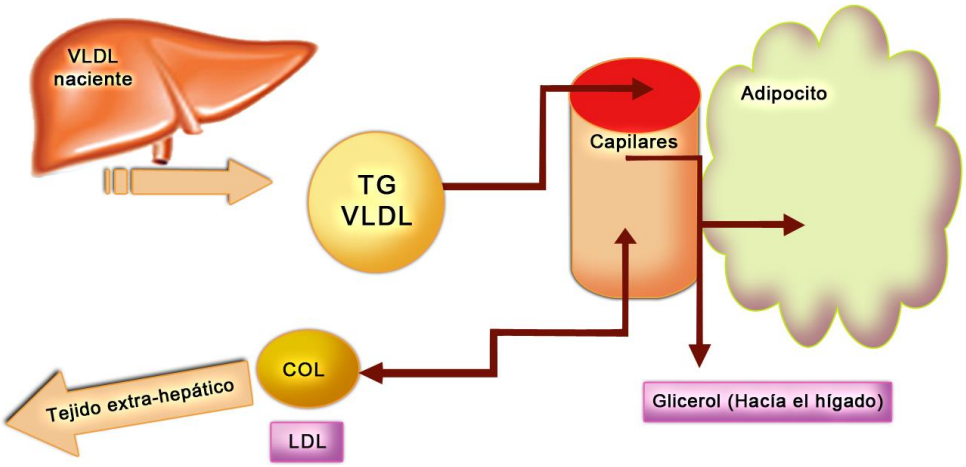


Figura 17a.2. Movilización de triglicéridos de origen endógeno, metabolismo de VLDL y LDL.

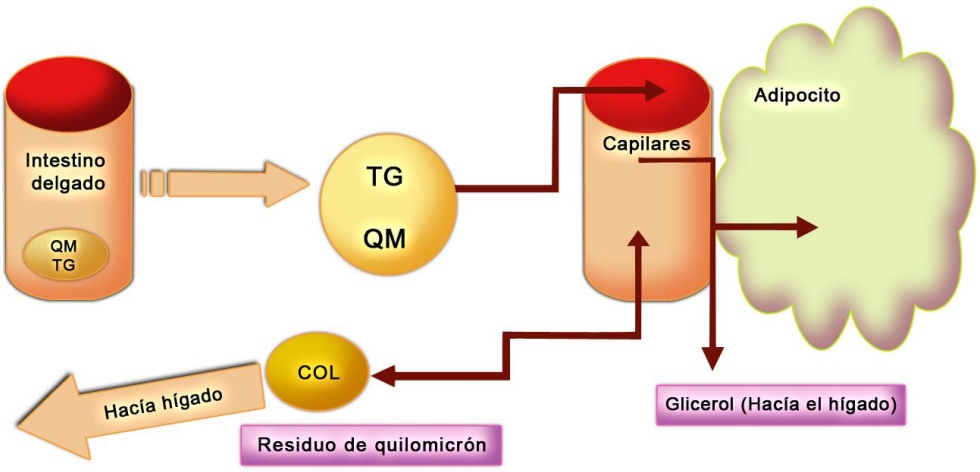


Figura 17a.3 Movilización de los triglicéridos de origen exógeno (QM:quilomicrón).

Respecto a los triglicéridos de origen exógeno, es decir de la dieta, durante la digestión de los alimentos en el lumen intestinal, se hidrolizan a ácidos grasos libres y monoglicéridos, los cuales son absorbidos por las células intestinales, resintetizados en triglicéridos y liberados en los vasos linfáticos como lipoproteínas de otro tipo llamadas quilomicrones (Figura 17.a.3).

La concentración de triglicéridos en el plasma, en un momento dado representa un equilibrio entre la velocidad de ingreso al plasma y su velocidad de remoción.

La concentración sanguínea fluctúa entre 30 y 150 mg/100mL, la concentración es regulada enzimáticamente. Una concentración en exceso es el primer paso hacia las alteraciones lipoproteicas, que contribuyen al desarrollo de alteraciones cardiovasculares, síndrome metabólico, obesidad, diabetes entre otras enfermedades, de ahí la importancia de su determinación.

MATERIAL

- Material biológico: Suero
- Material para toma de muestra sanguínea por venopunción.
- Pipetas para medir 0.010 mL y 1mL.
- Baño María

Importante: *Para la determinación se requiere un ayuno mínimo de 10 horas.*

REACTIVOS

- Kit comercial

EQUIPO

- Centrífuga
- Espectrofotómetro
- Celdas.

MÉTODO

FUNDAMENTO

El método para la determinación de triglicéridos (GPO) está basado en la determinación enzimática de glicerol utilizando la enzima oxidasa glicerol fosfato después de la hidrólisis por la lipoproteína lipasa. El principio de este método lo describió por primera vez Fossati con la secuencia clásica de reacciones Trinder. Este procedimiento de único reactivo cuantifica el total de glicéridos en suero incluyendo mono y diglicéridos, así como las fracciones libres del glicerol.

Los triglicéridos del suero son hidrolizados a glicerol y ácidos grasos libres mediante la lipasa. En presencia de ATP y la quinasa del glicerol (GK) el glicerol se convierte en glicerol-1-fosfato. El glicerol-1-fosfato se oxida por la acción de la enzima oxidasa glicerol fosfato

(GPO), para producir peróxido de hidrógeno. La condensación del peróxido de hidrógeno con 4-clorofenol y 4-aminofenazona (4-AA) en la presencia de peroxidasa (POD) produce una coloración roja de la quinonimina que se absorbe aproximadamente a 500 nm. La intensidad del complejo colorante formado es directamente proporcional a la concentración de triglicéridos de la muestra.

PRINCIPIO DE LA REACCIÓN

Varias secuencias de reacción enzimática están disponibles para la medición de TG. En todas se emplean lipasas para separar los ácidos grasos del glicerol.

$$\text{Triglicéridos} + H_2O \xrightarrow{\text{Lipasa Bacteriana}} \text{Ácido graso} + \text{Glicerol}$$

$$\text{Glicerol} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{Glicerocinasa}} \text{Glicerofosfato} + \text{ADP}$$

$$\text{Glicerofosfato} + O_2 \xrightarrow{\text{Oxidasa de glicerofosfato}} \text{Dihidroxiacetona} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + \text{Colorante} \xrightarrow{\text{Peroxidasa}} \text{Color}$$

PROCEDIMIENTO

Previo ayuno de mínimo 10 h se toma una muestra sanguínea por venopunción, tras coagular se centrifuga a 3500 rpm durante 10 min. Se separa el suero y se sigue la técnica indicada por el proveedor del estuche.

VALORES DE REFERENCIA

- Sospechoso a partir de 150 mg/dL
- Elevado a partir de 200 mg/dL

RESULTADOS

Los resultados obtenidos se comparan con los valores de referencia y se reportará el nombre del paciente, la edad, el peso y el sexo.

ACTIVIDADES

4. ¿Cuáles son las fuentes de los triglicéridos endógeno y exógeno?
5. ¿Cuál es la relación de los triglicéridos con los diversos tipos de lipoproteínas?
6. ¿En qué casos se recomienda cuantificar los triglicéridos en sangre?
7. ¿Qué es una dislipidemia y cuáles son sus consecuencias?
8. ¿A qué se le llama reacciones Trinder y en qué se fundamentan?

REFERENCIAS

1. Champe PC. Bioquímica. 3a ed. México D.F.: Mc Graw Hill. 2006.
2. Tórtora GJ, Derrickson B. Principios de anatomía y fisiología. 11ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana. 2007.
3. Silverthorn DU, Ober WC, Garrison CW, Silverthon AC, Johnsosn BR. Fisiología humana, en enfoque integrado. 4ª ed. Buenos Aires: Ed. Médica Panamericana 2008.
4. Ángel, M. G. Interpretación clínica del laboratorio. 7ª ed. Bogotá: Editoral Médica Internacional. 2006.
5. Davidsohn I, Henry JB. Diagnóstico clínico por el laboratorio. Todd-Sanford. 8ª. Ed. México: Salvat. Editores, 1991.
6. Treseler KM. Laboratorio clínico y pruebas de diagnóstico, México: Editorial Manual Moderno, 1999.

7. Lynch M. Métodos de Laboratorio. 15a ed. México: Editorial Interamericana, 2006.
8. Kaplan LA, Pesce AJ Química clínica. Técnicas de laboratorio. Métodos de análisis. Buenos Aires: Médica Panamericana, 1986.

17b. Metabolismo y función del colesterol

OBJETIVOS

1. Analizar la importancia fisiológica del colesterol y las lipoproteínas.
2. Determinar la concentración de colesterol en una muestra de sangre.
3. Analizar las diferentes patologías producidas por valores elevados de colesterol en sangre y sus repercusiones.

ANTECEDENTES ACADÉMICOS

- Estructura y características químicas del colesterol.
- Fuentes endógenas y exógenas del colesterol.
- Principales funciones del colesterol.
- Características y funciones de las lipoproteínas HDL, LDL, IDL y VLDL.

INTRODUCCIÓN

Químicamente el colesterol es un alcohol esteroide derivado del ciclopentanoperhidrofenantreno. Es un componente esencial de la membrana celular, precursor de hormonas esteroideas, ácidos biliares y vitamina D, por lo cual es crítico que las células cuenten con una provisión ininterrumpida de colesterol y el organismo ha desarrollado una serie de mecanismos de transporte biosintéticos y reguladores en los cuales el hígado desempeña una función central.

El colesterol ingresa en la reserva hepática (de la dieta o biosintetizado) y se elimina desde hígado sin modificar o como sales biliares.

Respecto al colesterol endógeno, éste es sintetizado en casi todos los tejidos, pero principalmente en el hígado, intestino, corteza suprarrenal y tejidos de la reproducción.

Su síntesis ocurre en el citoplasma celular, participan enzimas citosólicas y del retículo endoplásmico, el acetato es el donador de carbonos y el NADPH ofrece los equivalentes reductores, la vía es impulsada por la hidrólisis del enlace de alta energía de la acetil-CoA, y del enlace terminal de alta energía del ATP.

La distribución se hace a través de las lipoproteínas, que son partículas esféricas constituidas por una porción interna hidrofóbica donde se encuentran los lípidos insolubles rodeada de una capa externa hidrofílica formada por fosfolípidos, colesterol libre y proteínas de estructura helicoidal llamadas apoproteínas o apolipoproteínas.

Las diferencias que existen entre las lipoproteínas son el principal tipo de lípido transportado, el sitio de formación, las apoproteínas que expresan (que actúan como molécula de reconocimiento en los tejidos) y el sentido del transporte, lo cual se resume en el cuadro 17b.1.

Cuadro 17b.1 Características básicas de las lipoproteínas.

Lipoproteína	Lípidos principales	Sitio de producción	Función
Quilomicrones	Triglicéridos exógenos	Intestino	Transporta lípidos exógenos.
VLDL	Triglicéridos endógenos	Hígado e intestino	Transporta lípidos endógenos.
IDL	Colesterol y triglicéridos	Catabolismo de quilomicrones y VLDL	

LDL	Colesterol	Catabolismo de VLDL	Transporta colesterol a células periféricas.
HDL	Colesterol y fosfolípidos	Hígado e intestino	Transporta colesterol de células periféricas a hígado

Dado el sentido en el cual las lipoproteínas transportan y depositan al colesterol, se les ha calificado como malo (LDL) o bueno (HDL).

Puesto que en el hombre no es preciso un balance entre ganancia y pérdida de colesterol éste puede acumularse lo cual está asociado con la formación de ateromas, disminución del calibre de las arterias y el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. (Figura 17b.1)

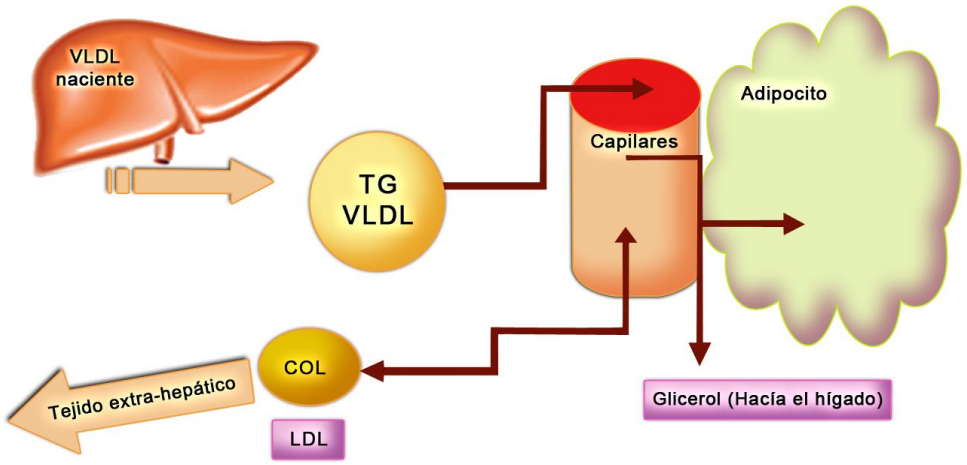


Figura 17b.1 Origen de las LDL, movilización de colesterol hacia tejido extra-hepático.

Es por esto, que la LDL como partícula que mueve el colesterol hacia los tejidos periféricos, se ha denominado colesterol malo y el colesterol HDL, que mueve el colesterol en sentido inverso (de los tejidos hacia el hígado para ser degradado o eliminado como sales biliares) se reconoce como el colesterol bueno, (Figura 17b.2)

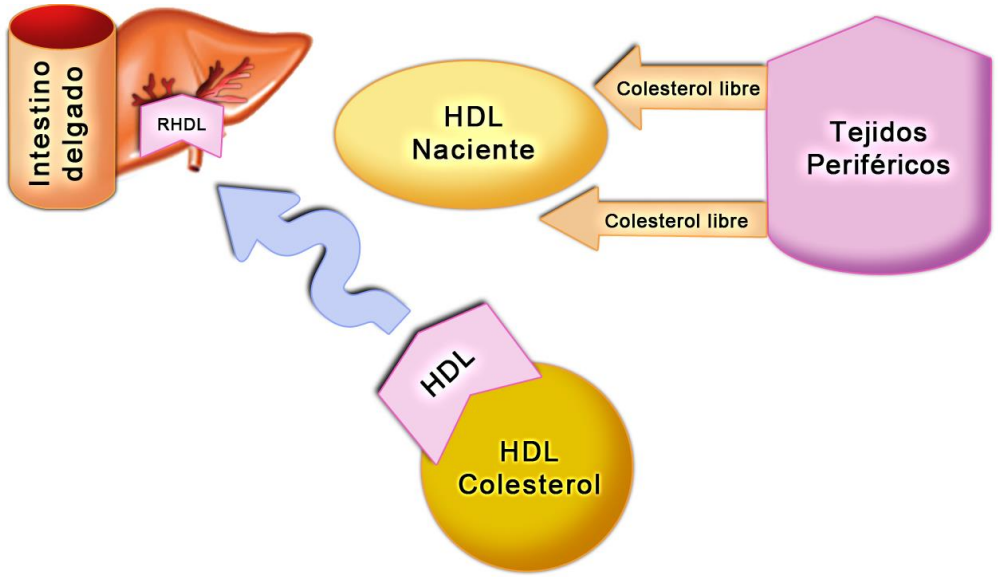


Figura 17b.2. Metabolismo de las HDL.

En la clínica, cada vez es más común la solicitud de la determinación no sólo de colesterol total, sino también de las fracciones HDL y por cálculo, la LDL, siendo la ecuación de Freidewald la más usada para conocer el valor de LDL. Sin embargo, una de las limitantes de ésta ecuación es que solo se puede usar cuando el valor de los triglicéridos es menor o igual 400mg/dL.

LDLc = Colesterol total - HDLc - VLDL ó LDLc= Colesterol total - HDLc - (TG/5)

Donde:

LDLc: Colesterol LDL

HDLc: Colesterol HDL

VLDL: Triglicéridos/5 (lipoproteínas de muy baja densidad)

Actualmente existen otras fórmulas que se pueden utilizar, cuya aplicación se da en pacientes con hasta 800mg/dL de triglicéridos, como lo es la ecuación de Sampson.

MATERIAL

- Material biológico: Suero
- Material para toma de muestra sanguínea
- Pipetas para medir 0.010mL y 1mL.

REACTIVOS

- Kit comercial

EQUIPO

- Centrífuga
- Espectrofotómetro, celdas.
- Baño María

MÉTODO

Fundamento

El método comercial más común es el Chod-PAP enzimático en una sola etapa, en el cual el colesterol es oxidado enzimáticamente por el colesterol oxidasa (CHOD), previa hidrólisis

enzimática de los ésteres mediante una lipasa. El peróxido de hidrógeno generado en la oxidación se condensa con 4-clorofenol y 4-aminofenazona (4-AA) en la presencia de peroxidasa (POD) y produce una coloración roja de la quinonimina que absorbe aproximadamente a 500 nm. La intensidad del complejo colorante formado es directamente proporcional a la concentración de colesterol de la muestra.

PRINCIPIO DE LA REACCIÓN

El método atribuido a Flegg lleva a cabo tres reacciones enzimáticas:

- **Hidrólisis** de los ésteres colesterol mediante **colesterolesterasas** (**CE**).
- **Oxidación** del colesterol mediante **colesterol oxidasa** (**CO**).
- **Reducción** del peróxido mediante una **peroxidasa** (**P**).

Etapa 1)

$$\text{Ésteres de Colesterol} \xrightarrow{\text{CE}} \text{Colesterol + Ácidos Grasos}$$

Etapa 2)

$$\text{Colesterol} \xrightarrow{\text{CO}} \text{Coles-4-eno-3-ona} + H_2O_2$$

Etapa 3)

$$H_2O_2 + \text{4-Aminoantipirina} + \text{Fenol} \xrightarrow{\text{Peroxidasa}} \text{Quinoneimina} + 4H_2O$$

CE = Colesterol esterasa

CO = Colesterol Oxidasa

PROCEDIMIENTO

Previo ayuno de mínimo 10 horas se toma una muestra sanguínea por venopunción, tras coagular se centrifuga a 3500 rpm durante 10 minutos. Se separa el suero y se sigue la técnica descrita por el proveedor.

VALORES DE REFERENCIA

- Sospechoso a partir de 150 mg/dL
- Elevado a partir de 200 mg/dL

RESULTADOS

Los resultados obtenidos se comparan con los valores de referencia y se reportará el nombre del paciente, la edad, el peso y el sexo.

ACTIVIDADES

1. ¿Cómo se determina la concentración de las fracciones LDL y HDL colesterol?
2. ¿En qué casos se encuentra el nivel alto de colesterol en sangre?
3. ¿En qué casos se recomienda cuantificar colesterol en sangre?

REFERENCIAS

1. Champe PC. Bioquímica. 3a ed. México D.F.: Mc Graw Hill. 2006.
2. Tortora GJ, Derrickson B. Principios de anatomía y fisiología. 11ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana. 2007.
3. Angel, M. G. Interpretación clínica del laboratorio. 7ª ed. Bogotá: Editoral Médica Internacional. 2006.
4. Davidsohn I, Henry JB. Diagnóstico clínico por el laboratorio. Todd-Sanford. 8ª. Ed. México: Salvat. Editores, 1991.
5. Treseler KM. Laboratorio clínico y pruebas de diagnóstico, México: Editorial Manual

Moderno, 1999.

6. Lynch M. Métodos de Laboratorio. 15a ed. México: Editorial Interamericana, 2006.
7. Kaplan LA, Pesce AJ Química clínica. Técnicas de laboratorio. Métodos de análisis. Buenos Aires: Médica Panamericana, 1986.
8. Sampson, Maureen et al. “A New Equation for Calculation of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Patients With Normolipidemia and/or Hypertriglyceridemia.” *JAMA cardiology* vol. 5,5 (2020): 540-548. doi:10.1001/jamacardio.2020.0013

18. Metabolismo y función de la glucosa

OBJETIVOS

1. Determinar la concentración de glucosa sérica basal y posprandial, mediante un método analítico enzimático.
2. Conocer las diversas pruebas para la valoración del metabolismo de la glucosa, como apoyo diagnóstico de Diabetes.
3. Analizar los factores que influyen en la regulación de la concentración plasmática de glucosa
4. Analizar la importancia clínica de la determinación de glucosa.
5.

ANTECEDENTES ACADÉMICOS

- Funciones y metabolismo de la glucosa.
- Regulación hormonal de la concentración de glucosa en sangre.
- Implicaciones clínicas de la alteración del metabolismo de la glucosa, tipos de diabetes.

INTRODUCCIÓN

Los carbohidratos son biomoléculas con importantes funciones estructurales y metabólicas tanto en vegetales como en animales. La glucosa es el carbohidrato más importante, ya que la mayoría de los carbohidratos de la dieta se absorben al torrente sanguíneo como glucosa, la cual proviene de la hidrólisis de los carbohidratos de la dieta, así mismo, otros azúcares son convertidos a glucosa en el hígado. La glucosa es el principal combustible metabólico de los mamíferos; es la única fuente de energía para algunos tipos de células y

es precursor para la síntesis de todos los carbohidratos en el cuerpo incluidos glucógeno, ribosa, desoxirribosa, galactosa, etc.

El glucógeno es el principal carbohidrato de almacenamiento en los animales, es un polímero ramificado de D glucosa que se encuentra sobre todo en hígado y músculos; proporciona una fuente de glucosa fácilmente disponible para glucólisis dentro del músculo, mientras que su función en hígado es almacenar glucosa y exportarla para mantener los niveles de glucosa sanguínea entre comidas.

La regulación de la glucosa es un proceso muy importante puesto que su alteración, deriva en una de las enfermedades más frecuentes considerada un problema de salud a nivel mundial, como es la Diabetes mellitus (DM), la cual es la primera causa de muerte en población general en nuestro país, así como la primera causa de amputación de miembros de origen no traumático.

La DM es una enfermedad sistémica, crónica no transmisible, de carácter heterogéneo con grados variables de predisposición hereditaria y con participación de diversos factores ambientales que se caracteriza por hiperglucemia crónica debido a la deficiencia en la producción de la insulina, o bien a la acción ineficaz de esta hormona, lo que afecta al metabolismo intermedio de los carbohidratos, proteínas y lípidos y a largo plazo se asocia con daño, disfunción y falla de varios órganos como son los ojos, riñones, corazón y vasos sanguíneos.

Se ha clasificado como tipo 1, aquella en la cual la mayoría de los casos se deben principalmente a la destrucción de los islotes de las células beta del páncreas, lo que provoca la deficiencia en la producción de la insulina e hiperglucemia crónica que puede corregirse con la administración de insulina, (por lo que igual se ha denominado DM1 o dependiente de insulina) y en DM2, en la que existe una capacidad residual de secreción de insulina pero los niveles no superan la resistencia que existe en los tejidos, por lo cual

se manifiesta la hiperglucemia, este tipo de diabetes se inicia durante la etapa adulta y su incidencia se incrementa notablemente durante la vejez.

La principal causa de la hiperglucemia crónica característica de la DM2 es la resistencia a la insulina, la cual se define como una respuesta biológica atenuada o disminuida en los tejidos aún en presencia de concentraciones normales o altas de insulina, de manera clásica esto se refiere a defectos en la sensibilidad a la insulina mediada por glucosa.

La insulina es una hormona peptídica secretada por las células beta del páncreas, de manera normal realiza varias funciones como mantener los niveles plasmáticos de glucosa al facilitar su captura por las células en los diferentes tejidos, regula el metabolismo de los carbohidratos y los lípidos además de promover la división y el crecimiento celular a través de sus efectos mitogénicos. Su secreción se ve influida por sustancias nutrientes, como la glucosa, o por no nutrientes que actúan vía neural a través de estímulos colinérgicos y adrenérgicos o por hormonas y aminoácidos catiónicos. (Figura 18.1)

Figura 18.1 Liberación de insulina mediada por glucosa.

Se ha propuesto que la resistencia a la insulina es una manifestación de mala señalización secundaria a defectos celulares a nivel post-receptor, así como varios mecanismos como la disminución de la expresión del receptor como medida de retroalimentación negativa ante el exceso de insulina, deficiencias o polimorfismo genético en la fosforilación del receptor, o de las diversas proteínas intracelulares que extienden la cascada de señalización que en sujetos sanos concluye con la incorporación correcta de la glucosa a la célula para su metabolismo (Figura 18.2).

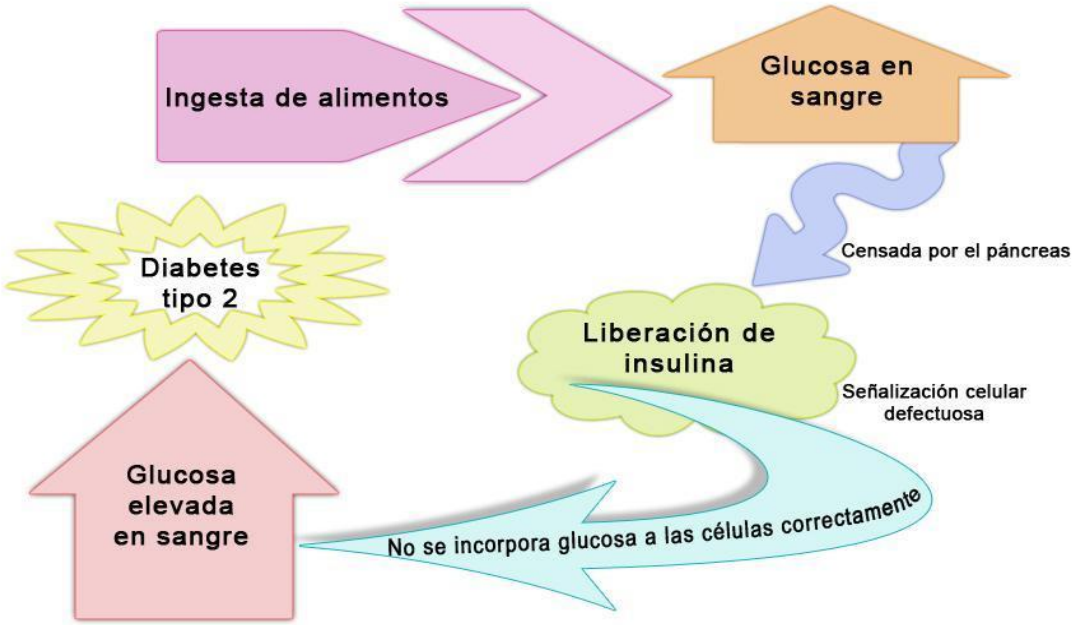


Figura 18.2 Metabolismo de la glucosa en la Diabetes Mellitus 2

A pesar de que la causa de la DM2 no se determinado puesto que es un padecimiento multifactorial, la DM se reconoce como un problema de salud y económico muy importante en nuestro país, por tanto su correcto diagnóstico y tratamiento es indispensable, de ahí la importancia de la presente práctica en la cual se abordarán algunas de las diferentes pruebas más usuales en el diagnóstico de esta enfermedad.

MATERIAL BIOLÓGICO

- Suero

MATERIAL

- Material para toma de muestra sanguínea
- Celdas
- 2 vasos de precipitado
- Micropipetas o Pipetas para medir 0.010mL y 1mL

EQUIPO

- Centrífuga
- Espectrofotómetro
- Balanza de dos platos
- Baño María

REACTIVOS

- Kit comercial para la determinación de glucosa

MÉTODO

Las pruebas más utilizadas en el diagnóstico de prediabetes y diabetes son: glucosa en ayunas, glucosa posprandial o glucosa post carga . A continuación, se describen las pruebas que podrán ser realizadas en el laboratorio. Con cada prueba se requiere determinar la concentración en suero de glucosa en ayunas.

Glucosa en ayunas

Previo ayuno de mínimo 8 h se toma una muestra sanguínea por venopunción, tras coagular se centrifuga a 3500 rpm durante 10 minutos. Se separa el suero y se sigue la técnica del proveedor. Se hacen los cálculos por comparación con el estándar.

Prueba de Glucemia Postprandial a las dos horas

Se toma la muestra en ayunas para la determinación de la concentración de glucosa a tiempo cero (la muestra se procesa de acuerdo con lo descrito en la glucosa en ayunas). Inmediatamente después de la punción el donador debe consumir un desayuno completo. Finalizado el desayuno se registra la hora y exactamente dos horas después se toma una segunda muestra en la que se determina la concentración de glucosa de acuerdo con la técnica descrita para la medición de glucosa en ayunas.

VALORES DE REFERENCIA[13]

- **Glucosa en ayuno**
  - Normal: menor a 100 mg/dL
  - Intolerancia o glucosa anormal en ayuno: mayor a 100 y menor a 125 mg/dL
  - Diabetes : mayor a 126 mg/dL
- **Glucosa postprandial:**

[13] Valores de referencia establecidos en la Norma Oficial Mexicana **NOM-015-SSA2-2010** Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus.

- Normal: menor a 140 mg/dL dos horas después de la ingesta de alimento.

DIAGNÓSTICO

Se establece el diagnóstico de prediabetes o diabetes de acuerdo con los siguientes criterios tomados de la Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010.

Prueba/Diagnóstico	Pre diabetes	Diabetes*
Glucosa casual (mg/dL)	----	≥ 200
Glucosa en ayunas (mg/dL)	100-125	≥ 126
Glucosa post carga de 75g (mg/dL)	140-199	≥ 200

** En presencia de síntomas clásicos de hiperglucemia, sin embargo, no olvidar que estos criterios se deben confirmar repitiendo la prueba en un día diferente.*

PRINCIPIO DE LA REACCIÓN

La cuantificación de la glucosa puede efectuarse por diversos métodos, sin embargo la reacción de la ***Glucosa Oxidasa*** (**GOD**) es la más común.

Etapa 1) β-D-Glucosa + O_2 + H_2O $\xrightarrow{GOD}$ Ácido glucónico + H_2O_2

Etapa 2) H_2O_2 + Fenol + Ampirona $\xrightarrow{POD}$ Quinona + H_2O

GOD = Glucosaoxidasa

POD = Peroxidasa

RESULTADOS

La técnica espectrofotométrica se basa en la comparación con un estándar por lo cual para los cálculos se consideran las absorbancias de cada muestra y del estándar, y la concentración de éste (usualmente de 100mg/dL).

Se reportarán los resultados, indicando el nombre del paciente, el peso, la edad, el sexo y si tiene antecedentes familiares de diabetes.

ACTIVIDADES

1. Explique el sitio de formación y función de las siguientes hormonas: insulina, glucagón, adrenalina, hormona de crecimiento y glucocorticoides.
2. Defina: glucólisis, glucogénesis, gluconeogénesis, glucogenólisis, glucosuria.
3. ¿Por qué previo a la prueba de tolerancia a la glucosa debe determinarse los niveles de glucosa en sangre y en orina?
4. ¿Por qué una determinación de glucosa en ayunas no es suficiente para el diagnóstico de la diabetes mellitus?
5. Explique el papel de la obesidad y de los factores genéticos en el desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2.
6.

REFERENCIAS

1. Ángel, G. Interpretación clínica del Laboratorio. 3ª edición. Médica Panamericana. Bogotá, Colombia, 1990.
2. Davidsohn, I. y Henry, J. B. Diagnóstico clínico por el laboratorio. Todd-Sanford. 8ª. Ed. México: Salvat. Editores, 1991.
3. Dinneen, S Gerich J., Rizza R. Carbohydrate metabolism in noninsulin-dependent diabetes mellitus, N Engl J Med 1992; 327: 707.
4. Eisan, Ll. Longo, M. Glucose transporters, Anmn Rev Med 1992; 43: 377.

5. Felig, P., y col. Endocrinología y metabolismo. México: Mc Graw Hill, 1981.
6. Goldfine ID, Pilch P. Insulin secretion and action and diabetes mellitus. J. Cell. Biochem 1992; 48: 1.
7. Howell, SL. The mechanism of insulin secretion, Diabetologia 1984; 26: 319.
8. American Diabetes Association. Clinical Practice Recommendations 2000: Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2000; 23 (suppl 1): S4-S19.
9. Kaplan, L. A. y Pesce, A. J. Química clínica. Técnicas de laboratorio. Métodos de análisis. Argentina: Médica Panamericana, 1986.
10. Lynch, R.; Spore, M. et al. Métodos en el laboratorio. 2ª. Ed. México: Interamericana, 1985.

Sección VII

Fisiología renal

19. Depuración renal

OBJETIVOS

1. Realizar la cuantificación de creatinina en suero y orina.
2. Realizar el cálculo del índice de filtración glomerular y de la depuración de creatinina.
3. Analizar la importancia y las implicaciones clínico-patológicas de cada una de las determinaciones realizadas.

ANTECEDENTES ACADÉMICOS

- Definición del término tasa de filtración glomerular. Factores que la afectan.
- Concepto de depuración.
- Principales sustancias empleadas para evaluar la depuración renal.

INTRODUCCIÓN

La formación de la orina conlleva la eliminación de productos de desecho potencialmente tóxicos, es por eso que desde hace cientos de años, los médicos saben que la orina refleja el funcionamiento del cuerpo, de modo que, para ayudar a diagnosticar enfermedades, solían llevar consigo frascos especiales para la recolección e inspección de la orina del paciente.

Actualmente sabemos que existen ciertos procesos básicos involucrados en la formación de la orina: la filtración (llevada a cabo en los glomérulos), la reabsorción y la secreción (llevadas a cabo en los túbulos renales). A través de estos procesos, el riñón regula la cantidad de diversas sustancias orgánicas y es capaz de mantener el medio interno de modo que sea posible un funcionamiento adecuado de todas las células del organismo.

Dado que aproximadamente un 25% de la sangre del organismo que es bombeada por el corazón circula a través de los riñones, se calcula que cada minuto circulan por el riñón de

1 a 1.5 L de sangre, filtrándose en el glomérulo a una velocidad aproximada de 130 mL/min; lo que recibe el nombre de *"índice de filtración glomerular (IFG)"* que representa un parámetro importante en el estudio de la fisiología renal. Este filtrado está compuesto básicamente por plasma sin proteínas.

La función glomerular es determinada mediante la prueba de depuración de creatinina, definida como el volumen de plasma del cual se elimina completamente una sustancia en la orina por unidad de tiempo.

La depuración, es una prueba renal basada en el índice de excreción renal de la creatinina producida metabólicamente. La cantidad en orina depende así, de la excreción renal ya que esta sustancia es filtrada libremente, no sufre reabsorción y es secretada en pequeñas cantidades.

Debido a estas propiedades la creatinina puede ser empleada para estimar el índice de filtración glomerular comúnmente en muestras de orina de 24 horas con la siguiente ecuación:

$$Depuración\ de\ creatinina\ \left(\frac{mL}{min}\right) = \frac{U\ x\ V}{P} x \frac{1}{t} x \frac{1.73}{A^2}$$

Donde:

U= Creatinina urinaria (mg/L)

V= Volumen de orina excretado por unidad de tiempo (mL)

P= Creatinina plasmática (mg/L)

t= Tiempo transcurrido en la colecta de orina (minutos)

A^2= Altura en metros elevado al cuadrado

Como la depuración de creatinina es aproximadamente igual al IFG y debido a la naturaleza engorrosa de la recolección de orina, se han desarrollado ecuaciones para estimar la

depuración de creatinina a partir de la medición de la creatinina sérica.

MATERIAL

- Material biológico: muestra de orina de 24 horas y suero (del mismo donador).
- Tubos de ensayo de 13 x 100 mm
- Gradilla
- Micropipetas o pipetas para medir 0.2 mL y 1.2 mL.
- Material para realizar dilución de orina (1:50)
- Cronómetro

REACTIVOS

- Agua destilada
- Kit de reactivos

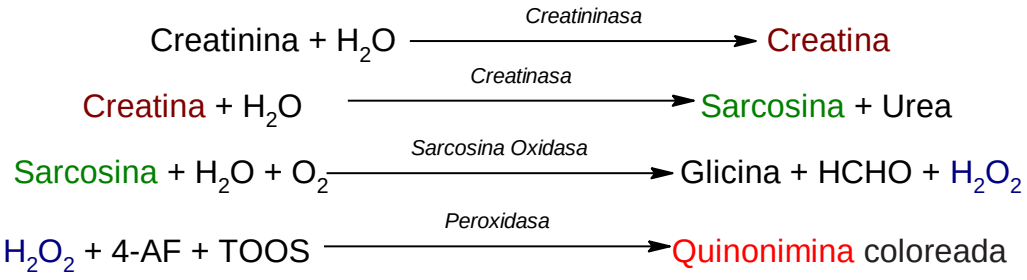
EQUIPO

- Espectrofotómetro
- Celdas

MÉTODO

- Seguir la técnica descrita por el proveedor.

PRINCIPIO DE LA REACCIÓN



RESULTADOS

Sexo ♀/♂	**Edad**	**Orina (mL/24h)**	**Orina (mL/min)**	**Amuestra en plasma**	**A muestra en orina**	**Depuración (mL/min)**

ACTIVIDADES

1. ¿Qué entiende por tasa de filtración glomerular?
2. ¿Qué desventajas presenta su empleo en la práctica clínica?
3. ¿Qué propiedades posee el compuesto llamado inulina que lo hace “ideal” para la determinación de la depuración renal?
4. De manera detallada explique dónde y cómo se llevan a cabo los procesos de filtración, reabsorción y secreción en la nefrona.

5. ¿Qué diferencia existe entre la secreción y la excreción de una sustancia?

REFERENCIAS

1. Anderson S. C, Cockayne S. Clinical chemistry: concepts and applications. México: Interamericana McGraw-Hill, 1995
2. Pesce J. A, Kaplan A L. Química clínica: métodos. Buenos Aires; México: Médica Panamericana, 1990.
3. Silverthorn, D. U. Fisiología humana : un enfoque integrado. Buenos Aires ; México : Médica Panamericana, 2008

20. Características de la orina

OBJETIVOS

1. Identificar los elementos evaluados en el análisis general de orina y su significado clínico.
2. Analizar la utilidad diagnóstica del examen general de orina.

ANTECEDENTES ACADÉMICOS

- Fisiología renal, proceso de formación de la orina.
- Características del análisis de orina: físico, químico y microscópico.
- Valor diagnóstico del análisis general de orina.

INTRODUCCIÓN

El análisis de orina es una prueba de laboratorio que puede proveer una amplia variedad de datos clínicos referentes al riñón y a las enfermedades sistémicas que pueden afectar a este órgano. Es posible dilucidar desórdenes anatómicos y fisiológicos del riñón y tracto urinario inferior, también obtener información secuencial acerca de la enfermedad, su causa y pronóstico. Un cuidadoso examen reduce el diagnóstico clínico diferencial de numerosas enfermedades del sistema urinario. El propósito del examen es detectar individuos asintomáticos, de bajo riesgo, diagnosticar al paciente sintomático, y ayudar en el monitoreo terapéutico de condiciones que afectan el sistema urinario. Como procedimiento de tamizaje, su valor reside en la facilidad de obtener muestras y en la rápida determinación de los componentes químicos mediante el uso de tiras reactivas.

El examen general de orina es un estudio cuidadoso y sistemático de las propiedades físicas, químicas y de las estructuras microscópicas presentes en este fluido, involucra:

- La observación macroscópica de las características del espécimen biológico,
- La cuantificación de diversas sustancias químicas que se excretan como productos de desecho, para el mantenimiento de la homeostasis y en diferentes condiciones fisiológicas y patológicas,
- Un análisis microscópico que, para rendir utilidad al diagnóstico, requiere una actividad mental inductiva por parte del analista, la cual se basa en el conocimiento de los elementos que observa, los factores que afectan sus características y el significado clínico-patológico de los mismos.

La cuidadosa recolección de las muestras, así como su pronto análisis son factores esenciales para obtener información óptima. La orina debe recogerse en un recipiente limpio y estéril de boca ancha y tapa hermética, el cual debe rotularse con el nombre del paciente, fecha y hora. La primera orina de la mañana suele ser la más recomendada ya que es la más concentrada, la recolección debe ser higiénica, tomando la parte media de la micción, desechando el primer chorro para evitar la contaminación de la uretra distal. La muestra debe estar libre de secreciones vaginales y otros detritos extraños; debe ser analizada dentro de las dos horas de haber sido recogida, si la demora no puede evitarse entonces la muestra debe ser refrigerada (2 a 8 ºC). Se sugiere que para esta práctica el donador de la muestra sea una persona con antecedentes de enfermedad renal o una persona anciana.

En el cuadro 20.1 de sintetizan algunas características del examen general de orina.

Cuadro 20.1 Componentes del examen general de orina

Examen	Implica:	Parámetros determinados
Examen físico	Evaluación de las características del espécimen que se pueden captar por medio de los sentidos.	Volumen, color, aspecto y olor.
Examen químico	Determinación cuantitativa y semicuantitativa de diversos parámetros y sustancias excretadas por la orina mediante reacciones químicas.	Densidad, pH, glucosa, cetonas, bilirrubina, urobilinógeno, proteínas, nitritos, hemoglobina y leucocitos
Examen microscópico	Identificación y cuenta microscópica de las diversas partículas insolubles que arrastra la orina en su paso por las vías de formación y excreción.	Células (del urotelio, eritrocitos, leucocitos) Cristales (ácido úrico, oxalato de calcio, fosfato) Sales (uratos, fosfatos) Microorganismos (bacterias, levaduras) Cilindros

En esta práctica se realizará el examen general de orina y se correlacionarán los datos obtenidos con la fisiología renal normal y en caso de enfermedades.

MATERIAL

- Material biológico: Muestra de orina (chorro medio de la primera orina de la mañana).

- Tubos de ensaye de 13 X 100 mm
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Pipetas Pasteur

REACTIVOS

- Tiras reactivas para el análisis general de orina.
- Ácido sulfosalicilico al 3% (p/v)

EQUIPO

- Centrífuga clínica
- Microscopio

MÉTODO

ANÁLISIS FÍSICO

Se realiza comúnmente por la observación directa de la muestra. Es recomendable observar la muestra en un tubo limpio y sin raspaduras, previa agitación de la muestra.

Se debe contar con iluminación adecuada y un fondo blanco para la observación del color y un fondo negro opaco para la evaluación del aspecto. El color se reporta como amarillo I, II y III; el aspecto como transparente, turbio o ligeramente turbio. El olor generalmente se reporta como sui generis a menos de que la orina presente un olor diferente el cual pueda ser indicativo de patologías. Para este examen ha de recurrirse a la asesoría de los profesores.

ANÁLISIS QUÍMICO

Tira Reactiva

Agitar la muestra y transferir 7 mL a un tubo de ensaye, introducir la tira reactiva permitiendo que se humedezcan perfectamente todas las almohadillas, retirar y escurrir agitando la tira sobre una toalla de papel. De acuerdo al tiempo de lectura indicado por el proveedor comparar los colores de las almohadillas con el código de color del frasco contenedor de las tiras y anotar los resultados (figura 20.1 y 20.2).

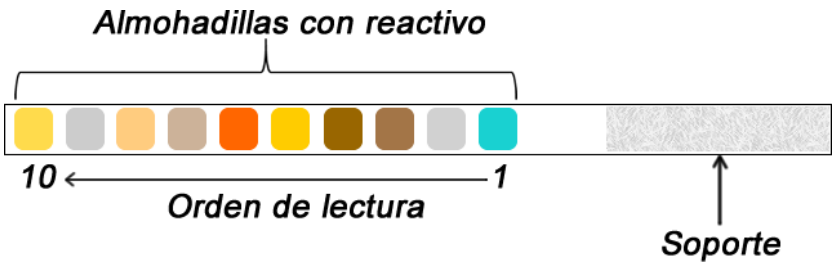


Figura 20.1. Esquema de una tira reactiva para 10 parámetros.

***Importante**: En el blog podrás encontrar una tabla que describe el principio químico de la tira reactiva.*

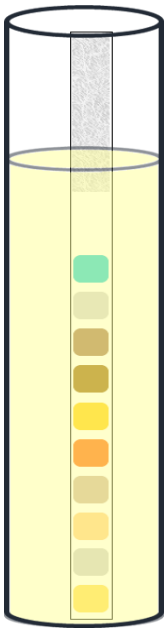


Figura 20.2. Esquema de la forma como deber sumergirse la tira en la orina.

Método semicuantitativo para proteínas

Además de la albúmina, se pueden encontrar otras proteínas en la orina, por lo que su análisis puede complementarse con un método semicuantitativo. Las proteínas son desnaturalizadas por el ácido sulfosalicílico, precipitándolas y formando turbidez, observándose la muestra de orina más turbia a mayor concentración de proteínas

En un tubo de ensayo colocar 5 mL de orina centrifugada y agregar cuidadosamente y por las paredes del tubo, 5 ml de ácido sulfosalicílico al 3% (p/v) (3 gramos de ácido sulfosalicilico y aforar a 100 mL con agua). Tapar el tubo y mezclar por inversión y gentilmente durante 60 segundos. Dejar reposar por 2 minutos y observar el grado de turbidez de la orina, frente a un escrito impreso (a 30 cm de

distancia detrás del tubo), se deberá clasificar tomando en cuenta la siguiente escala:

- Negativo (-): No se observa turbidez y el texto se lee completamente.
- (+):Turbidez baja y se puede leer el texto completo
- (++): Turbidez moderada, el texto se puede leer parcialmente
- (+++): El texto es ilegible, pero son visibles algunas líneas o puntos
- (++++): No es posible leer el texto a través de tubo por alta turbidez o precipitado

ANÁLISIS MICROSCÓPICO

Agitar la muestra y transferir 7 mL de muestra a un tubo, centrifugar por 5 minutos a 1500 rpm, desechar el sobrenadante por inversión total del tubo, resuspender el sedimento en la alícuota residual (aproximadamente de 0.5 mL) y de ésta tomar una alicuota, se recomienda un volumen de aproximadamente 20 microlitros si ha de usarse un cubreobjetos de 24X24 mm (considerar que una gota es igual a 50 microlitros) y colocarla sobre un portaobjetos limpio y desengrasado, colocar el cubreobjetos y observar a seco débil y seco fuerte. Con el aumento de 40x recorrer la preparación para detectar células, cristales, sales amorfas y microorganismos. Las células epiteliales y renales se reportan en cruces en función de su abundancia, al igual que los cristales, las sales amorfas y los microorganismos (bacterias o parásitos). Los leucocitos y eritrocitos se reportan contando el número de células por campo. Para la identificación de las estructuras deberán apoyarse de algún atlas de examen de orina y de sus profesores.

RESULTADOS

Llenar el siguiente reporte.

Nombre:		
Edad:		
Examen General de Orina		
Prueba	**Resultado**	**Valores de referencia**
Examen físico		
Volumen		
Color		
Aspecto		
Examen químico		
Glucosa		Negativo
Bilirrubina		Negativo
Cetonas		Negativo
Densidad		1.010 – 1.030 g/mL
Sangre		Negativo
pH		5 - 7
Proteínas		Negativo
Urobilinógeno		Negativo
Nitritos		Negativo
Leucocitos		Negativo
Turbidez de proteínas		Negativo

Examen de sedimento		
Células epiteliales		
Células renales		
Sales amorfas		
Cristales		
Leucocitos		
Eritrocitos		
Levaduras		
Bacterias		
Mucina		
Otros		

ACTIVIDADES

1. ¿Cuál es el fundamento de las reacciones químicas que se llevan a cabo en la tira para determinar glucosa, proteínas, nitritos, leucocitos, eritrocitos y cetonas en la orina?
2. Explique el significado clínico de un resultado positivo en la tira reactiva para glucosa, proteínas, cetonas, bilirrubina y nitritos en la orina.
3. Mencione las sales, cristales y células que se pueden encontrar con mayor frecuencia en la orina y su relación con patologías renales.
4. Si al analizar una muestra de orina encuentra que la tira reactiva detecta nitritos y leucocitos positivo, y al hacer la observación microscópica encuentra bacterias incontables y leucocitos abundantes, ¿qué patología sugieren los resultados?

REFERENCIAS

1. King SS. Líquidos corporales y análisis de orina. México D.F.: Manual Moderno; 1991. 352pp.
2. Graff SL. Análisis de orina. Buenos Aires: Ed. Médica Panamericana; 1987. 222pp.
3. Argeri NJ, Lopardo HA. Análisis de orina. Fundamentos y práctica. Buenos Aires: Ed. Médica Panamericana; 1993. 224pp.
4. Heintz R, Althet S. El sedimento urinario. 5ª ed. Madrid: Ed. Médica Panamericana; 1998. 140pp.
5. Kaplan L, Pesce A, Kazmierczak S. Clinical Chemistry. 4a ed. St. Louis Missouri: Ed. Mosby; 2003. 1179pp.
6. Fogazzi GB. Crystalluria : A neglected aspect of urinary sediment analysis. Nephrol Dial Transplant 1996;11:379-87. Disponible en: http://goo.gl/HSeN9g
7. Velásquez Penagos JA, Zuleta Tobón JJ, López Jaramillo JD, Gómez Marulanda NL, Gómez Gallego J. Use of sulfosalicylic acid in the detection of proteinuria and its application to hypertensive problems in pregnancy. Iatreia. 2011, 24 (3): 259 – 266. doi: 10.17533/udea.iatreia.10546

21. Diuresis

OBJETIVOS

1. Explicar qué es la diuresis.
2. Analizar los principales factores que modifican la eliminación de agua por el riñón.
3. Evaluar los cambios que suceden por variaciones en el volumen y composición de los líquidos corporales sobre la cantidad y características de la orina formada.

ANTECEDENTES ACADÉMICOS

- Funciones de la hormona antidiurética o vasopresina y la aldosterona.
- Mecanismos de regulación de la función renal.

INTRODUCCIÓN

Los riñones son un par de órganos vitales que realizan varias funciones para mantener la sangre limpia y químicamente equilibrada. Algunas funciones del riñón son:

a) Regulación de la composición iónica de la sangre.
b) Regulación del pH sanguíneo.
c) Regulación del volumen plasmático.
d) Regulación de la presión arterial.
e) Mantenimiento de la osmolaridad sanguínea.
f) Producción de hormonas.
g) Regulación de la concentración de glucosa sanguínea.
h) Excreción de desechos y sustancias extrañas.

Cada día, los riñones de una persona procesan aproximadamente 190 litros de sangre para eliminar alrededor de 2 litros de productos de desecho y agua en exceso. Los desechos y

el agua en exceso se convierten en orina que fluye hacia la vejiga a través de unos conductos llamados uréteres. La vejiga almacena orina hasta que la libera al orinar.

Los desechos en la sangre provienen de la descomposición normal de tejidos activos, como los músculos, y de los alimentos. Después de que el cuerpo toma lo que necesita de los alimentos, los desechos se envían a la sangre. Si los riñones no los eliminaran, estos desechos se acumularían en la sangre y dañarían el cuerpo.

Para la formación de orina como se observa en la figura 21.1, se llevan a cabo tres procesos básicos, *la filtración glomerular, reabsorción y secreción tubular*.

- ***Filtración glomerular***. Se lleva a cabo en el glomérulo y es el paso de líquidos desde el capilar glomerular a la nefrona por procedimientos exclusivamente físicos. En el interior del glomérulo, los capilares sanguíneos se encuentran en estrecha relación con el espacio de Bowman, que los envuelve para recoger los componentes del plasma que atraviesan la barrera de filtración hacia la cápsula de Bowman y el túbulo contorneado proximal. Dicha barrera está formada por tres capas: el endotelio capilar, la membrana basal y el epitelio visceral. El proceso de filtración es selectivo y la composición de líquido tubular inicial es un ultrafiltrado del plasma, ya que los componentes celulares de la sangre y las proteínas de peso molecular medio y alto son retenidos, mientras que el agua y electrolitos se encuentran en el túbulo en proporción casi idéntica a la del plasma.
- ***Reabsorción y secreción***. La finalidad del transporte tubular renal es la modificación del líquido filtrado mediante la reabsorción de las sustancias esenciales para el organismo desde la luz tubular hacia los capilares sanguíneos; o mediante la secreción desde la sangre a la luz tubular de aquellas sustancias no filtradas en el glomérulo o filtradas en poca cantidad porque circulan en el plasma unidas a proteínas, y que es necesario eliminar del organismo.

El transporte a través de los diferentes segmentos tubulares

- ***Túbulo proximal****.* En este segmento tubular se produce la reabsorción del 60-70% de la carga filtrada en el glomérulo (sodio, agua, bicarbonato y calcio) y el 100% de

glucosa y aminoácidos y una cantidad variable de fosfato y potasio. Este transporte depende de la bomba de Na^+, K^+-ATPasa en la membrana basolateral que genera un gradiente electroquímico de Na^+ dentro de la célula. Este gradiente permite la entrada de Na^+ por la membrana luminal a través de sistemas de cotransporte de Na^+ con glucosa, aminoácidos, ácidos orgánicos y fósforo, o de cotransporte con H^+.

- ***Asa de Henle***. Las sustancias transportadas en el asa de Henle están en función del segmento, ya que la permeabilidad para el agua, como para diversos solutos, varía en cada segmento.
    - *L*a ***rama descendente*** del asa de Henle: aquí principalmente se produce la reabsorción de agua no acompañada de solutos, el líquido que sale de esta rama es hiperosmótico.
    - La ***rama ascendente*** del asa de Henle: es impermeable al agua pero permeable a solutos. En el segmento grueso se reabsorbe Na^+, K^+, Cl^-, Mg^{++}, y el HCO_3^- que no haya sido absorbido en el túbulo proximal. El paso de solutos desde la luz hacia el intersticio, sin reabsorción de agua, aumenta la osmolaridad del intersticio y disminuye la del contenido tubular que se hace hipoosmótico. En el segmento delgado se produce fundamentalmente secreción de urea favorecida por un gradiente de concentración.
    - ***Túbulo distal****:* Funcionalmente se considera una continuidad del asa de Henle y se extiende hasta la mácula densa. Es impermeable al agua, y su función principal es reabsorber Na+, Cl- y Ca++.
    - ***Túbulo colector***: En el túbulo colector se pueden distinguir 3 secciones que son estructural y funcionalmente diferentes: cortical, medular y papilar.
    - En la cortical: se producen principalmente 3 eventos:
        - Reabsorción de Na^+, secreción de K^+ y H^+ y reabsorción de agua.

- La medular: Es una continuación del túbulo colector cortical sin una transición clara. Las células principales van desapareciendo y son sustituidas por células secretoras de H^+. Aquí se produce reabsorción de agua dependiente de la hormona antidiurética (HAD). Por ello, en el túbulo colector se realiza la regulación final de la excreción de agua cuya permeabilidad está controlada por la HAD. Cuando se secreta esta hormona, el túbulo colector se hace permeable y reabsorbe el agua a favor de gradiente ya que el fluido tubular es hipoosmótico respecto al intersticio; en este caso el líquido del túbulo colector se vuelve hiperosmótico, pues se iguala con el intersticio y se elimina un pequeño volumen de orina concentrada. Si no hay secreción de HAD, el epitelio del túbulo colector medular es impermeable al agua; por tanto no se absorbe ésta. En consecuencia, el líquido tubular permanece hipoosmótico y se elimina un gran volumen de orina diluida.
- La papilar: Es permeable a la urea aún en ausencia de HAD por la que las sustancias son aportadas desde el espacio intersticial a la luz del túbulo. La diferencia entre la cantidad reabsorbida y la secretada de una sustancia constituye la cantidad neta de dicha sustancia transferida por los túbulos.

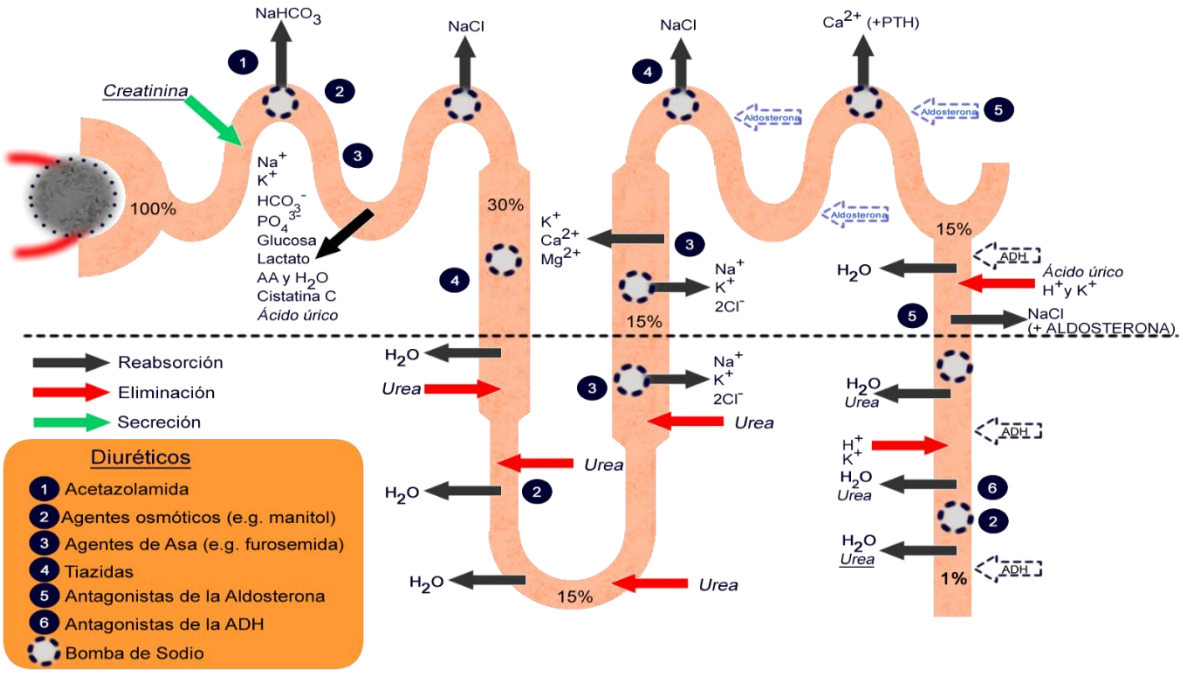


Figura 21.1. Formación de la orina y acción de diversos diuréticos.

DIURESIS

El organismo necesita eliminar diariamente una cantidad determinada de solutos, que varía según la situación metabólica y la ingesta, cifrándose en unos 700 mOsm por día. La excreción de solutos requiere un volumen de agua tal que la concentración sea equivalente a la máxima que pueda lograrse en la médula renal. Esa mínima cantidad de agua, que se calcula en poco más de medio litro, constituye la diuresis obligada diaria.

En una situación normal, la excreción de un volumen mayor obedece a la necesidad de mantener una concentración fisiológica para el medio interno y está en relación con la ingesta de agua y solutos. La hormona antidiurética (HAD) es la encargada de regular la diuresis final que soportará diariamente el organismo.

En esta práctica se utilizarán diferentes sustancias que actúan como diuréticos y que

provocan por diversos mecanismos un aumento en la excreción de agua (diuresis). Los cambios producidos en los líquidos corporales debidos a la ingesta de una gran cantidad de líquidos, de ciertas sustancias y de cambios en algunas situaciones funcionales, se observarán midiendo el volumen de orina por unidad de tiempo, peso específico y pH de la orina.

MATERIAL

- Vasos para bebidas
- Vasos de precipitados para recoger la orina
- Probetas graduadas de 100 mL
- Tiras de papel indicador de pH

REACTIVOS

- Agua
- Agua con azúcar
- Agua de jamaica sin azúcar
- Té (manzanilla o limón) sin azúcar
- Disolución de bicarbonato de sodio al 0.4%
- Té de hierba *Cola de caballo*
- Perejil
- Castaños de india
- Agua de piña
- Té de hinojo

EQUIPO

- Refractómetro

MÉTODO

1. Se excluirán del experimento los alumnos que presenten algún problema de salud.
2. Los sujetos de experimentación no deberán ingerir alimentos o bebidas, 2 horas previas al experimento
3. A cada equipo se le asignará una solución a ingerir o actividad a realizar de las indicadas a continuación.

Grupo	Bebida o actividad
1	10 mL de agua por kilogramo de peso.
2	5 mL de la solución de bicarbonato de sodio por kilogramo de peso.
3	500 mL de agua de jamaica sin azúcar.
4	500 mL de bebida de Té.
5	Realizar ejercicio intenso durante 5 minutos
6	10 mL de agua potable por kilogramo de peso.
7	Este es el grupo control, no ingieren líquidos durante la prueba.

Las muestras se recolectarán de la siguiente forma:

4. Eliminar la primera orina de la mañana, registrar la hora.
5. Antes de tomar líquidos o realizar la actividad indicada, (una vez en la escuela) todos los participantes deberán:
    a. Colectar la orina, medir el volumen eliminado y registrar la hora.

b. Dividir el volumen entre el tiempo en minutos que han transcurrido desde la primera orina, este dato será el flujo (mL/min) al tiempo cero.
c. Tomar una alícuota y determinar el índice de refracción y pH.

6. Se procede a ingerir la bebida correspondiente en un periodo de no más de ***diez minutos*** o se siguen los pasos indicados para cada equipo, se toma el tiempo y a partir de este momento
7. Se recolectarán muestras de orina cada 30 minutos, midiendo volumen de cada una
8. Posteriormente tomar una alícuota y determinar el índice de refracción y pH durante dos horas treinta minutos.

DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD

1. Para determinar la densidad usaremos el refractómetro (figura 21.2)

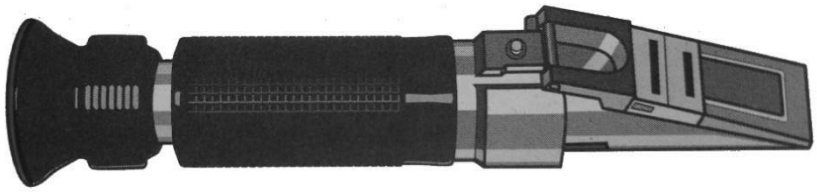


Figura 21.2. Uno de los modelos de refractómetro, en este caso se muestra el modelo portátil.

2. Colocar una gota de orina en refractómetro y observar (ver figura 21.3).

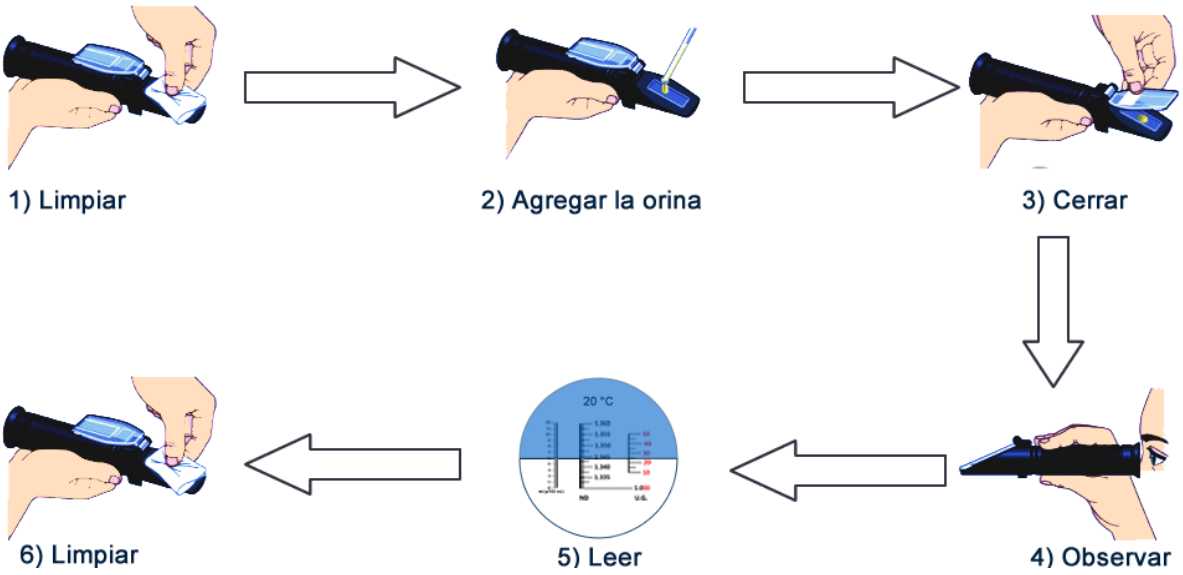


Figura 21.3. Forma de utilizar el refractómetro.

3. Verificar que la muestra se distribuya uniformemente en el refractómetro. (figura 21.4)

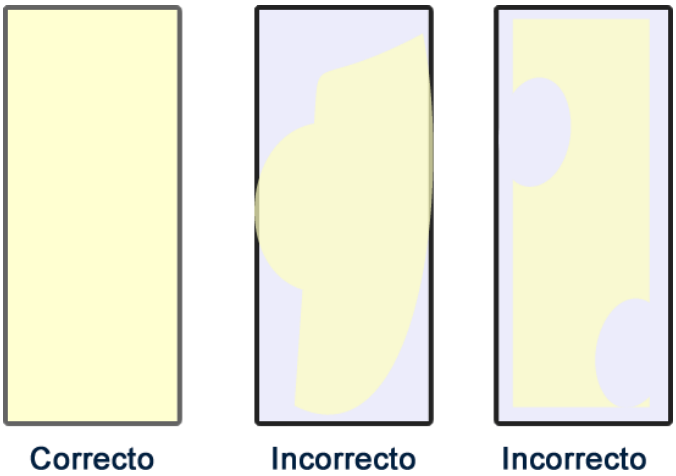


Figura 21.4. La orina deberá distribuirse uniformemente, de lo contrario volver a limpiar y colocar la muestra.

4. Leer directamente el valor indicado en la escala del dispositivo, la cifra correcta deberá incluir tres decimales (ver figura 21.5).

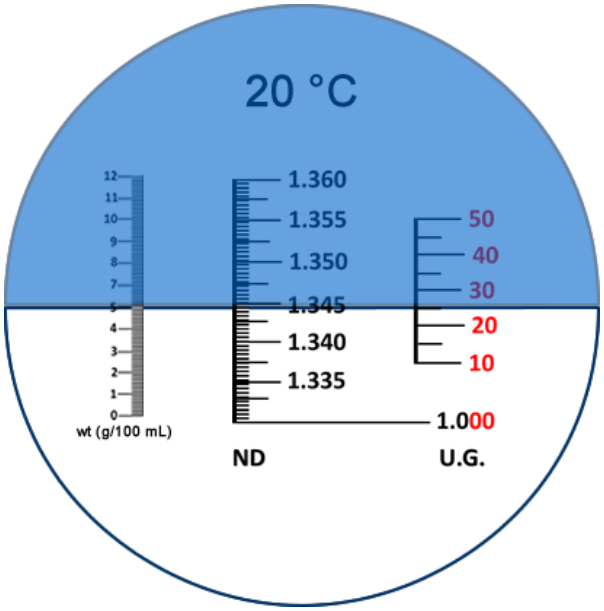
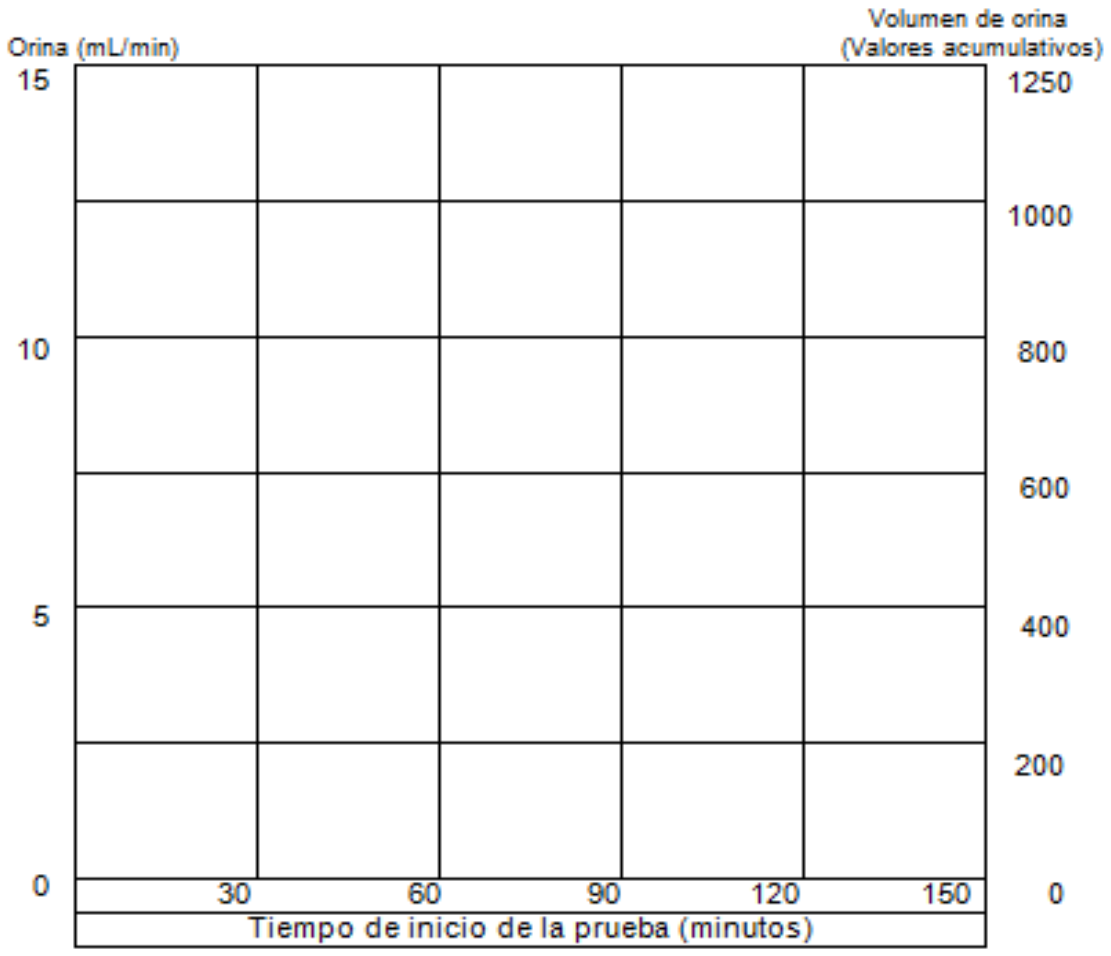


Figura 21.5. La lectura se realiza en la escala **U.G**. sustituyendo los últimos dos dígitos por el valor, en este caso la división entre ambas zonas se localiza en 25, por lo tanto la densidad es de **1.025**.

RESULTADOS

1. Graficar. Medir el volumen de orina en una probeta y expresar los resultados en la gráfica 21.1, en mL de orina por minuto y en relación con el volumen total de orina producida (volumen acumulado).



21.1. Gráfica de volumen por minuto y acumulativos de orina excretada.

La cantidad de soluto presente en la orina se determina a partir del peso específico de la muestra, empleando el denominado coeficiente de Long. Los gramos de soluto excretado por litro de orina se calculan multiplicando las dos últimas cifras decimales del peso específico por el factor 2.66.

Por ejemplo una muestra de orina de 24 horas, cuyo peso específico es de 1.020 y su volumen total de 1000 mL, contiene una cantidad de solutos igual a 20 x 2.66= 53.2 g/L/24 h.

Determinar el pH de cada una de las muestras, y anotar los resultados y compararlos con el tipo de alimentación de la persona sometida a la experimentación.

A partir de los resultados obtenidos, hay que estimar el tiempo requerido para conseguir eliminar completamente las disoluciones ingeridas, tomando en cuenta que en condiciones normales la velocidad de formación de la orina es de aproximadamente, 1 mL/Kg/h.

Llenar el cuadro correspondiente al protocolo para la evaluación de los cambios experimentados en las características de la orina.

Nombre:							
Hora de la micción previa a la prueba:							
Solución ingerida:				**Volumen (mL)**			
Peso Corporal:							
Muestra	**Minuto**	**Volumen de Orina**	**mL/min**	**Densidad**	**Cantidad de soluto**	**pH**	**Aspecto**

ACTIVIDAD

1. Esquematice y explique las funciones de las distintas partes y estructuras de la unidad funcional del riñón.
2. ¿Cuál es el mecanismo diurético de cada uno de los factores experimentados en la práctica?
3. ¿Qué factores estimulan la liberación de la hormona antidiurética y cuál es su sitio de acción?
4. ¿Cuál es el efecto del cigarro y las bebidas alcohólicas sobre la eliminación de orina? ¿Y por qué?

Anexos

El presente manual consta de los siguientes anexos los cuales se pueden localizar en el blog o en el mismo manual.

Nombre del Anexo	Consultar en…
Anexo 1: Normatividad por práctica.	Blog del manual
Anexo 2: Consentimiento Informado	Blog del manual
Anexo 3. Empleo de Sujetos de Experimentación No Humanos	Manual y Blog
Anexo 4: Toma de muestra sanguínea y Anticoagulantes	Manual
Anexo 5: Realización de Frotis Sanguíneo	Manual
Anexo 6: Uso de la Cámara de Neubauer	Blog del manual

Anexo 3. Empleo de Sujetos de Experimentación No Humanos

La utilización de animales en la docencia ha sido un tema de debate y controversia durante décadas. Si bien es cierto su empleo ha permitido avances científicos y educativos significativos, es fundamental garantizar que se realice de manera ética, responsable y acorde a los principios bioéticos, normativos y deontológicos establecidos. Para ello se debe garantizar los siguientes aspectos:

- *Respeto por la vida animal*: Es un principio fundamental que debe guiar el uso de animales en la docencia. Esto implica reconocer el valor intrínseco de los animales como seres vivos que experimentan dolor y sufrimiento. La utilización de animales debe justificarse por motivos educativos o científicos relevantes y solo debe realizarse cuando no existan alternativas viables.
- *Bienestar animal*: Esto implica minimizar el dolor, el sufrimiento y el estrés que puedan experimentar los animales. Se deben implementar medidas de cuidado y manejo adecuados, así como garantizar el uso de técnicas anestésicas y analgésicas cuando sea necesario.
- *Transparencia*: Fundamental para generar confianza en el uso de animales en la docencia. Las instituciones educativas deben contar con protocolos claros y transparentes que definan los criterios para la selección de animales, las técnicas de investigación y los procedimientos de cuidado. La comunidad educativa debe tener acceso a esta información y la posibilidad de participar en la toma de decisiones.
- *Educación en bioética*: Esencial para formar a los futuros profesionales en el uso responsable de animales. Los estudiantes deben conocer los principios bioéticos que rigen el uso de animales en investigación y docencia, así como las normas y regulaciones existentes. La educación en bioética debe fomentar la reflexión crítica y la responsabilidad ética en el manejo de animales.

En conclusión, el uso de animales en la docencia debe realizarse de manera ética, responsable y acorde a los principios bioéticos, normativos y deontológicos establecidos.

Para lo anterior se deben considerar a la hora de utilizar un sujeto de experimentación no humano, tener los protocolos necesarios para:

- Procedencia
- Manejo

- Eutanasia
- Confirmación de la muerte
- Disposición del cadáver

Procedencia

Todo sujeto de experimentación debe tener una procedencia legal

Manejo

Los animales deben ser manipulados de tal manera que se le someta a un mínimo de estrés.

Eutanasia

Para el caso de roedores el método más aceptado es el uso de la Cámara de CO_2.

Para otras especies se debe elegir el método más adecuado para la especie utilizada, considerando aquella técnica menos invasiva y dolorosa y estar detallado el procedimiento en el manual, siendo éste con estricto apego a las normas vigentes o códigos bioéticos.

Confirmación de la Muerte

Luego de efectuar la técnica de eutanasia, es obligatorio ejecutar un procedimiento de verificación de la muerte. Entre las diversas técnicas disponibles, se debe seleccionar aquella que no altere los resultados y que preserve la estética en la medida de lo posible.

Las técnicas de confirmación más utilizadas y con una valoración estética mayor son:

- Dislocación.
- Corte de corazón

Disposición del Cadáver

Depositar los cadáveres dentro de una bolsa de RPBI amarilla, alternando capas de animales con capas de cal hasta alcanzar el 80% de la capacidad de la bolsa.

Anexo 4: Toma de muestra sanguínea y Anticoagulantes

Previo a cualquier toma de muestra, el encargado de la punción debe asegurarse que el paciente se encuentre en una posición cómoda (en el caso de muestras de sangre venosa, de preferencia sentado con el brazo extendido, para lo cual puede ser necesario un descansa brazos) y que el material a emplear esté completo, listo y al alcance de la mano.

RECOLECCIÓN DE SANGRE VENOSA

MATERIAL

- Guantes
- Ligadura
- Torundas con alcohol al 70%
- Sistema de tubos al vacío.
- Gradilla
- Etiquetas o marcador para identificar las muestras.

PROCEDIMIENTO

1. Mostrar al paciente que la aguja a emplear es nueva.
2. Inspeccionar ambos brazos en busca de las venas usadas con mayor frecuencia (cefálica, basílica y mediana cubital).

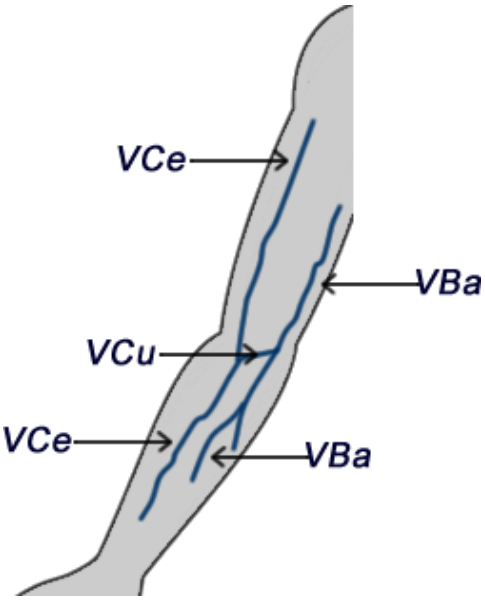


Figura A3.1 Venas usadas con mayor frecuencia para la venipunción; cefálica (**VCe**), basílica (**VBa**) y cubital (**VCu**).

3. Colocar la ligadura aproximadamente cuatro dedos por arriba de la zona a puncionar.
4. Pedir al paciente que abra y cierre la mano. Por lo general, esto hace que las venas se hagan más prominentes.
5. Palpar con el dedo índice una vena apropiada.
6. Con una torunda con alcohol al 70% realizar la limpieza del área a puncionar con movimiento circular del centro a la periferia procurando no regresar sobre un área una vez que se limpia. Es importante permitir que la piel seque.
7. Realizar la punción de la vena introduciendo la aguja con el bisel hacia arriba, procurando mantener un ángulo aproximado de 20°. En el caso del uso del sistema de tubos al vacío (consultar la figura 2 para el orden de las muestras), es importante sostener de manera firme el soporte o camisa (pues tendrá que aplicar fuerza para

que una porción de la aguja penetre el tapón del tubo), a modo de no generar movimiento en la porción de la aguja que penetra la vena. En caso de no contar con el sistema de tubos al vacío, pueden llegar a emplearse jeringas para la toma de muestra, no obstante es una práctica poco frecuente y no recomendada sobre todo en el caso de requerirse muestras múltiples.

8. Debe retirarse la ligadura en cuanto la sangre empieza a fluir.
9. Tras obtener la cantidad de muestra necesaria, colocar una torunda que contenga alcohol al 70% sobre la zona de punción, teniendo cuidado de que esté bien exprimida y de que no se ejerza presión sobre la aguja para no lastimar al paciente. Posteriormente, retirar de manera rápida la aguja (en caso de emplear el sistema de tubos con al vacío, debe retirarse primero el tubo) y presionar la torunda para evitar el sangrado.
10. Rotular el tubo que contenga la muestra con los datos del paciente como su nombre o las iniciales.
11. Pedir al paciente que mantenga presionado el sitio de punción con la torunda por un lapso de 3 a 5 minutos a la vez que dobla el brazo (en caso de ser posible).
12. Desechar el material con sangre en los contenedores para RPBI según lo indica la NOM-087 ECOL-SSA1-2002 Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

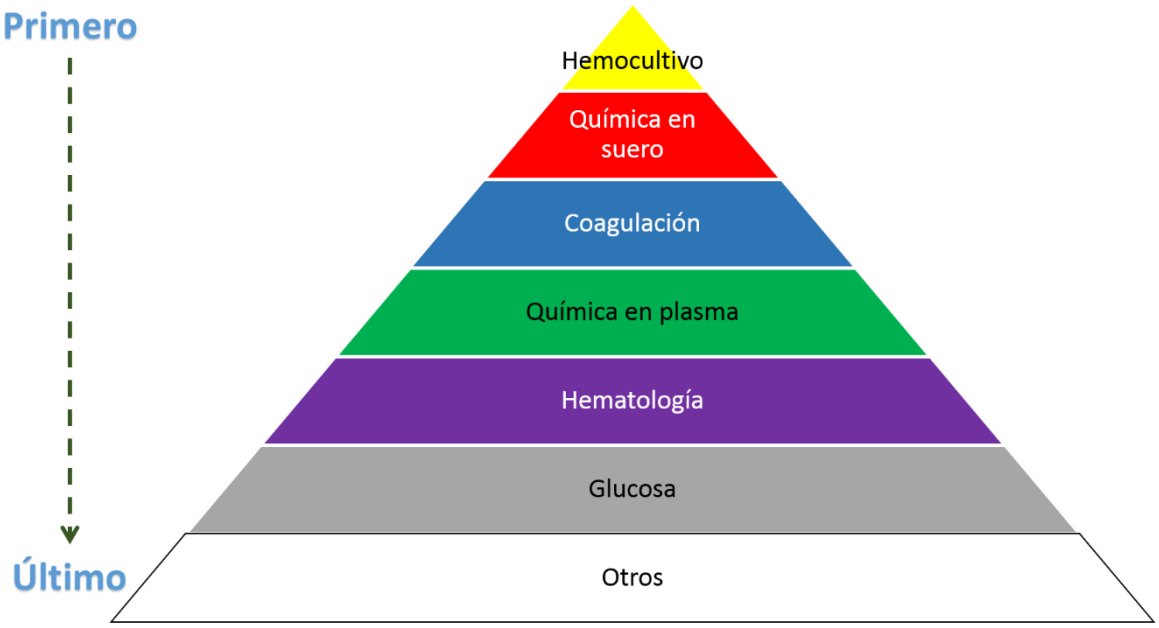


Figura A3.2 Orden para la toma de muestra cuando se requieren diversos tubos.

TOMA DE MUESTRA DE SANGRE CAPILAR

MATERIAL

- Guantes
- Torundas
- Alcohol al 70%
- Lancetas
- Equipo necesario para la recolección (portaobjetos, capilares, etc.)

PROCEDIMIENTO

1. Debe seleccionarse el sitio adecuado para la punción*. Los más frecuentes son: pulpejo de los dedos medio o anular en su porción lateral, parte lateral del talón (común en recién nacidos) y lóbulo de la oreja.

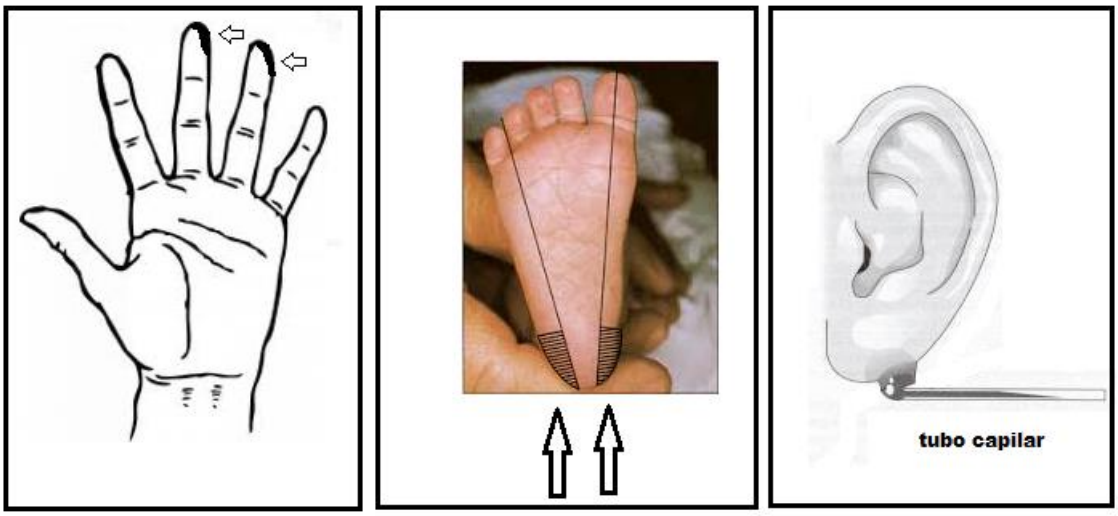


Figura A3.3 Principales sitios para toma de muestra de sangre capilar.

2. Limpiar el área con una torunda con alcohol al 70% y dejar secar.

3. Puncionar una vez con un movimiento firme.
4. Limpiar la primera gota debido a que puede contener alcohol.
5. Aplicar una presión *suave* para obtener las siguientes gotas.
6. Recolectar la muestra, para lo cual es frecuente el empleo de tubos capilares.
7. Rotular las muestras con los datos del paciente como son su nombre o las iniciales.
8. Limpiar el área con una torunda con alcohol al 70% bien exprimida y mantener una presión hasta que el sangrado cese.
9. Desechar la lanceta en el contenedor de RPBI según lo indica la **NOM-087 Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo**.

---

*Es sumamente importante que el sitio de la recolección se encuentre tibio para asegurar el flujo sanguíneo, por lo que puede ser necesario masajear suavemente unos minutos o bien colocar compresas calientes sobre el área.

REFERENCIAS

1. Vives Corrons J. L. Manual de técnicas de laboratorio en hematología. 3ª ed. España: Masson, 2006.
2. Turgeon, Mary Louise. Hematología clínica: teoría y procedimientos. 4ª ed. México, D.F.: Manual Moderno, 2006.

ANTICOAGULANTES

La sangre sufre un proceso espontáneo de coagulación pasados de 3 a 7 minutos después de su extracción. En una primera etapa, se forma una masa semisólida de color rojo, llamada coágulo, que está formado por una red de fibrina que envuelve a las células sanguíneas. Posteriormente se contrae y libera un líquido de composición parecida al plasma que se conoce como suero. Los estudios hematológicos en su mayoría requieren la obtención de una muestra de sangre sin coagular, por lo que es necesario el empleo de sustancias que retarden o impidan el proceso de coagulación. Dichas sustancias son conocidas como **anticoagulantes**, los cuales generalmente se clasifican de la siguiente manera:

1. Anticoagulantes “in vitro” cuyo mecanismo de acción es la remoción del ión calcio de las muestras sanguíneas.
2. Anticoagulantes “in vivo” dentro de los que destacan los llamados orales (dicumaroles, cumarinas e indanedionas) que reciben este nombre debido a que se administran en forma de píldoras por esta vía. De estos anticoagulantes, las cumarinas se han convertido en las más usadas, siendo su mecanismo de acción evitar la formación de trombina por inhibición de la vitamina K, necesaria para la carboxilación de los residuos de ácido glutámico de los factores II, VII, IX y X.
3. Anticoagulantes que actúan “in vivo” e “in vitro”. Dentro de estos se destaca a la heparina, que interacciona con la antitrombina III. Ésta a su vez inactiva a las serinas proteasas, a la trombina y a los factores XIIa, XIa, IXa, Xa.

Cuadro A3.1 Anticoagulantes usados con mayor frecuencia en el laboratorio clínico.

Tapón	Aditivo	Mezclado	Concentración	Proporción	Mecanismo de acción	Efecto de un exceso de anticoagulante
ROJO	Activador de coagulación, silicon.	5 veces				
AMARILLO	Activador de coagulación con gel separador.	5 veces				
LILA	EDTA-K_2	8 veces	3.7-5.4 M	1.5-2.2mg por cada mL de sangre.	Ejerce un efecto quelante sobre el calcio ionizado, fijándolo sin llegar a precipitarlo.	Induce modificaciones leucocitarias o de la morfología eritrocitaria (retracción celular, lo que ocasiona disminución en el valor del hematócrito y un aumento de la CMHC).
AZUL	Citrato de sodio	3 a 4 veces	3.2% 0.106M	1 parte/9 de sangre para pruebas de coagulación. 1parte/4 de sangre para VSG.	Precipitación del calcio.	Puede ocasionar un tiempo de coagulación prolongado en las pruebas TTPa y TP. Aconsejable repetir la toma de muestra
VERDE	Heparina de sodio / litio	8 veces		15-20U (0.1-0.2 mg) por mL de sangre. 1mg de heparina en polvo equivale a 150 U.	Interacciona con la antitrombina III. La cual inactiva a la trombina y a los factores XIIa, XIa, IXa, Xa.	Alteración de los resultados**.**

Tapón	Aditivo	Mezclado	Concentración	Proporción	Mecanismo de acción	Efecto de un exceso de anticoagulante

Una lista más completa puede ser consultada en la página de BD [http://goo.gl/ZawFSa].

REFERENCIAS

- McKenzie, Shirlyn B. Hematología clínica. 2ª ed. México: Manual Moderno, 2000.
- Vives Corrons J. L. Manual de técnicas de laboratorio en hematología. 3ª ed. España: Masson, 2006.
- González de Buitrago J. M. Técnicas y métodos del laboratorio clínico. 3ª ed.España: Elsevier-Masson, 2010.

Anexo 5: Realización de Frotis Sanguíneo (extendido sanguíneo)

Un frotis (extendido) de sangre es esencial para asegurar la evaluación de la morfología celular.

TÉCNICA DEL PORTAOBJETOS EN CUÑA

Es la técnica más conveniente y común para hacer un frotis de sangre periférica.

MATERIAL

1. Portaobjetos de vidrio para microscopía de alta calidad, de 75 X 25 mm con bordes biselados.
2. Sangre anticoagulada con EDTA

MÉTODO

1. En un extremo de un portaobjetos limpio y seco (portaobjetos soporte), con una pipeta Pasteur se coloca una gota de sangre anticoagulada de aproximadamente 3 mm de diámetro.
2. Otro portaobjetos limpio y seco (portaobjetos extensor) se coloca en un ángulo de 35-45º, delante de la gota de sangre que esta sobre el portaobjetos soporte. Figura A4a. 1a.

Importante: *Procurar que la sangre se extienda entre el borde del portaobjetos extensor y el portaobjetos soporte.*

3. El portaobjeto extensor se desliza hasta tener contacto con la gota de sangre y se sostiene en esa posición hasta que la sangre se esparce en todo lo ancho del portaobjetos. Figura A4a.1b.

4. El portaobjetos extensor se desliza con rapidez y suavidad hacia el otro extremo del portaobjetos soporte. Figura A4a.1c.
5. Dejar secar al aire los frotis sanguíneos preparados antes de teñir.

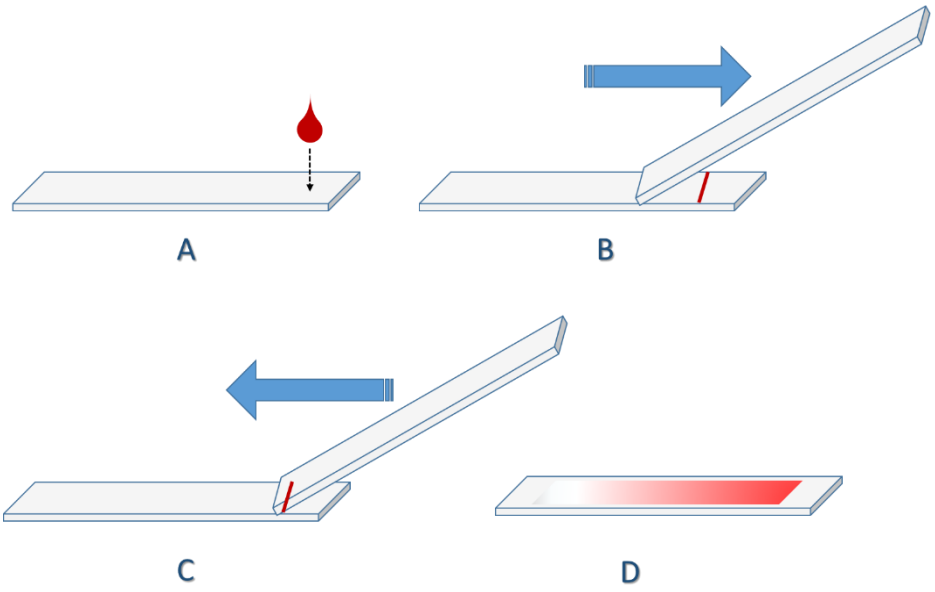


Figura A4.1 Técnica del portaobjetos en cuña.

CONSIDERACIONES:

- Es importante que se extienda toda la gota de sangre.
- Un movimiento lento del portaobjetos extensor provoca una incorrecta distribución de las células porque lleva a los monocitos y granulocitos a la parte final del frotis y a las orillas.
- El ángulo entre los portaobjetos debe ser constante y la presión firme durante toda la extensión.
- Para muestras de sangre con hematocritos mayores al normal, el ángulo de los

portaobjetos debe disminuirse. Y para los hematocritos menores, el ángulo debe aumentarse.

CARACTERÍSTICAS DEL FROTIS (EXTENDIDO) BIEN REALIZADO

Un buen frotis debe cumplir con ciertas características como son:

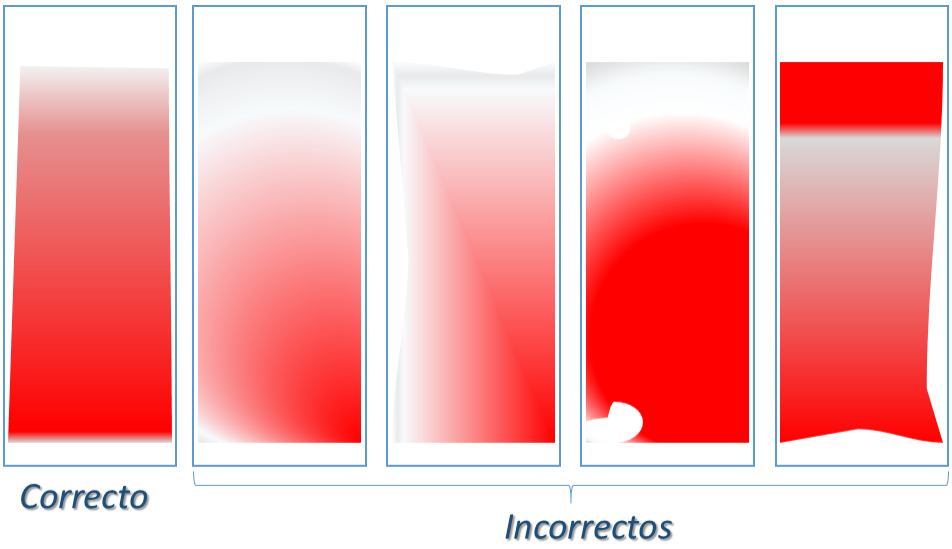


Figura A4.2 Comparación entre diversos frotis.

TÉCNICA DE TINCIÓN

La tinción de Wright y Giemsa son las más utilizadas para la tinción de frotis de sangre periférica o de médula ósea. Ambas contienen eosina (colorante aniónico) y azul de metileno (colorante catiónico), se denominan tinciones policrómicas. La naturaleza ácida o básica de las estructuras celulares determina la avidez por los colorantes de la tinción, lo

que provoca una amplia variedad de colores y sombras que permiten distinguir sutiles diferencias en las estructuras celulares.

MÉTODO DE GIEMSA.

1. Fijar durante 3 minutos con metanol los frotis secos. Quitar el exceso de metanol sin enjuagar.
2. Colocar colorante de Giemsa diluido sobre el frotis hasta cubrirlo en su totalidad y dejar teñir, de 7 a 10 minutos. El tiempo de tinción puede variar porque se establece conforme a la capacidad de tinción del colorante.
3. Enjuagar el frotis con agua destilada y dejarlo secar al aire en posición vertical.
4. Observar al microscopio óptico con objetivo 10x (seco débil) para verificar la calidad del frotis.

MÉTODO DE WRIGHT.

Importante: *Para esta técnica no es necesario fijar previamente el extendido debido a que el colorante en su formulación incluye alcohol metílico*.

1. Cubrir el frotis con colorante de Wright durante 2 minutos.
2. Sobre el frotis con colorante, añadir agua destilada sin que la mezcla se derrame y dejar teñir durante 4-5 minutos hasta que aparezca una capa metálica.
3. Enjuagar el frotis con agua destilada y dejarlo secar al aire en posición vertical.
4. Observar al microscopio óptico con objetivo 10x (seco débil) para verificar la calidad del frotis.

REFERENCIAS

1. Carr JH, Rodak BF. Atlas de hematología clínica. 3ª ed. China: Médica Panamericana; 2011.