

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
INSTITUTO DE CIENCIAS CLÍNICAS VETERINARIAS

**LEUCORREDUCCIÓN DE SANGRE DE EQUINOS (*Equus caballus*)
PARA TRANSFUSIÓN**

Memoria de Título para ser presentada como parte
de los requisitos para optar al TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO.

MARÍA ALEJANDRA SILVA BILBAO

VALDIVIA – CHILE

2005

PROFESOR PATROCINANTE **Dr. Fernando Wittwer M.** _____

PROFESOR COPATROCINANTE **Dr. Hernán Aquilar E.** _____

PROFESORES CALIFICADORES **Dr. Rafael Burgos A.** _____

Dr. Ricardo Enriquez S. _____

FECHA DE APROBACIÓN: 5 de Enero del 2005.

**A mis padres y Blanquita por su
cariño y aliento**

INDICE

1. RESUMEN	1
2. SUMMARY	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. MATERIAL Y MÉTODOS	16
5. RESULTADOS	20
6. DISCUSIÓN	23
7. BIBLIOGRAFÍA	28
8. ANEXO	32
9. AGRADECIMIENTOS	34

1. RESUMEN

LEUCORREDUCCIÓN DE SANGRE DE EQUINOS (*Equus caballus*) PARA TRANSFUSIÓN

La presencia de leucocitos en unidades de sangre para transfundir, se asocia a reacciones adversas que pueden manifestarse en el receptor posterior a una transfusión. La leucorreducción es el proceso de remover los leucocitos contenidos en los hemoproductos para evitar reacciones adversas. El sistema Top and Bottom es un método de leucorreducción basado en la centrifugación que se emplea en forma rutinaria en sangre humana. El objetivo de este estudio es determinar la efectividad de este método en unidades de sangre de equinos, determinando el número de eritrocitos, el volumen globular, la concentración de hemoglobina y el número de leucocitos contenidos en hemoproductos, previo y posterior a ser sometido al proceso de leucorreducción mediante el sistema Top and Bottom.

Se utilizaron 10 equinos de entre 2 y 7 años de edad, de razas Fina Sangre de Carrera y Criollo Chilenos. A estos animales se les extrajo 450 ml de sangre aproximadamente, la que se recolectó en la unidad de sangre total (UST) del sistema de bolsas Optipack® cuádruples CPD/Adsol, Baxter®. Posterior al proceso de recolección, la sangre fue centrifugada a 3800 rpm durante 12 minutos a 22°C y mediante el equipo Optipress® de Baxter®, se separó el plasma y el concentrado de eritrocitos (CE) leucorreducido. De cada equino donante se obtuvieron 2 muestras de 1 ml de sangre con EDTA desde la UST y desde el contenido de la unidad de CE. En ambas muestras se determinó el número de eritrocitos/ μl , el volumen globular, la concentración de hemoglobina y el número de leucocitos/ μl mediante un autoanalyzer hematológico Sysmex KX-21N; además se determinó la fórmula diferencial leucocitaria en frotis teñidos con Wright Giemsa. Los datos obtenidos fueron analizados mediante estadística descriptiva (promedio, desviación estándar y rango) y las comparaciones entre períodos mediante “t” de Student para muestras pareadas.

En la UST los valores (promedio \pm DE) para el número de eritrocitos, volumen globular y concentración de hemoglobina fueron de $7,8 \pm 1,1/\mu\text{l}$, $39 \pm 6\%$ y $12,9 \pm 1,8$ g/dl respectivamente. En la unidad de CE se produjo una concentración, aumentando dichos valores ($p < 0,05$) a $11,1 \pm 1,5 \times 10^6/\mu\text{l}$, $57 \pm 8\%$ y $18,3 \pm 2,3$ g/dl respectivamente. El número de leucocitos disminuyó desde $7.000 \pm 1.090/\mu\text{l}$ en la UST ($p < 0,05$) a un valor de $450 \pm 210/\mu\text{l}$ en la unidad de CE, producto del procesamiento mediante el sistema Top and Bottom. El porcentaje de leucorreducción obtenido fue de $93,4 \pm 3\%$, obteniéndose valores entre 89 y 97,2%.

Estos resultados demuestran que el proceso de leucorreducción mediante el sistema Top and Bottom permite reducir eficientemente el contenido de leucocitos en el concentrado de eritrocitos para hemotransfusión en sangre de equinos.

Palabras claves: equinos, leucorreducción, sangre, transfusión.

2. SUMMARY

BLOOD LEUKOCYTE REDUCTION FOR TRANSFUSION IN HORSES (*Equus caballus*)

The presence of leukocytes in blood units for transfusion, is associated with adverse reactions that may appear in the receptor after a transfusion. Leukocyte reduction is the process of removing the white blood cells contained in bloodproducts to avoid adverse reactions. The Top and Bottom system is a leukocyte reduction method based on centrifugation and it is used in a routine form in human blood banks. The purpose of this study is to determine the effectiveness of this system in equine blood units, determining the number of red blood cells, the packed cell volume, the haemoglobin concentration and the number of white blood cells contained in the bloodproducts before and after leukocyte reduction by the Top and Bottom system.

Ten horses between 2 and 7 years of age were used, of Thoroughbred and Chilean Criollo breeds. 450 ml of blood approximately, were extracted from these animals and was collected in the total blood units (UST) of the cuadruplex Optipack® blood bag system CPD/Adsol, Baxter®. After the recollection process, the blood was centrifuged and processed in the Optipress®, Baxter® to separate the plasma and the leukocyte reduced red blood cell concentrate (CE). From each equine donor, two 1ml sample of blood with EDTA were taken from the UST and from the content of the CE unit. In these samples, the number of red blood cells/ μl , the packed cell volume, the haemoglobin concentration and the number of white blood cells/ μl were measured with a Sysmex KX-21N autoanalyzer hematologic equipment. Differential leukocyte counts were made with Wright Giemsa stained slides. The data were analyzed using descriptive statistics and “t” Student matching group test for the comparisons between periods.

The mean \pm SD obtained in the UST for the number of red blood cells/ μl , packed cell volume and haemoglobin concentration were $7,8 \pm 1,1/\mu\text{l}$, $39 \pm 6\%$ and $12,9 \pm 1,8 \text{ g/dl}$ respectively. In the CE unit there was hemoconcentration, so these values increased ($p < 0,05$) to $11,1 \pm 1,5 \times 10^6$ red blood cells/ μl , $57 \pm 8\%$ packed cell volume and $18,3 \pm 2,3 \text{ g/dl}$ of haemoglobin. The white blood cell mean \pm SD in the UST was $7.000 \pm 1.090/\mu\text{l}$ and in the CE unit the number of white blood cells decreased ($p < 0,05$) to $450 \pm 210/\mu\text{l}$, because of the processing of the blood unit in the Top and Bottom system. The percentage of leukocyte reduction was $93,4 \pm 3\%$, with values between 89 and 97,2%.

These results demonstrate that leukocyte reduction using the Top and Bottom system reduces the white blood cell count in the red blood cell concentrates from horses efficiently.

Key words: horses, leukocyte reduction, blood, transfusion.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 GENERALIDADES

El caballo moderno (*Equus caballus*) se ha formado a lo largo de 60 millones de años. Este es el tiempo que le ha llevado a su antecesor más temprano, el *Eohippus*, evolucionar hasta la familia *Equidae*. Esta familia incluye a la cebra, el burro y el caballo doméstico (*Equus caballus*), así como a los menos conocidos asnos de Asia y de África y al caballo Przewalski (Vogel, 1997).

La primera evidencia de asociación de la especie *Equus caballus* con el género humano, data desde hace 25.000 a 40.000 años, por esqueletos encontrados en Solutre, Francia. Probablemente el primer nexo que existió entre el hombre y los caballos fue por alimento (Davies, 1999).

Recién el año 4.500 A.C. surgen evidencias que sugieren el comienzo de la domesticación de esta especie. Este fue el comienzo de una serie de eventos que conllevarían a la creación de técnicas de entrenamiento, perfeccionamiento en los implementos, así como cambios en las características propias del caballo (Davies, 1999).

Hoy en día, dada la importancia económica y afectiva que han cobrado los caballos para sus propietarios, se ha hecho cada día más necesaria la implementación de nuevos procedimientos terapéuticos que favorezcan el bienestar animal. Una de las técnicas que se practican en la medicina de equinos cada vez con más frecuencia es la transfusión de sangre o sus derivados (Williamson, 1993)

En el año 1613 se iniciaron los primeros experimentos sobre transfusiones sanguíneas en animales y ante el desarrollo que ha alcanzado la medicina veterinaria, la terapia transfusional ha adquirido gran relevancia, ya que su práctica ha salvado muchas vidas (García y col., 2003).

Transfusión sanguínea o de componentes, es el procedimiento a través del cual se introduce por vía venosa, sangre reconstituida o componentes específicos para restituir o sustituir la función del elemento deficiente (García y col., 2003).

En medicina humana, los sistemas de fraccionamiento sanguíneo que incluyen remoción de la costra flogística, han evolucionado considerablemente en las últimas dos décadas. Partiendo en procedimientos de extracción manual hasta llegar a sistemas

completamente automatizados, que permiten estandarizar los procesos de extracción y contribuyen a mejorar las prácticas de laboratorio en la preparación de componentes sanguíneos (Hurtado y col., 2000).

3.2 COMPOSICIÓN DE LA SANGRE

La sangre es un tejido líquido, circulante y especializado, compuesto de células suspendidas en una sustancia intercelular líquida, el plasma. El volumen de sangre total para la mayoría de los mamíferos es aproximadamente el 7% a 8% del peso total del organismo. La sustancia intercelular o plasma, comprende el 45% a 65% del volumen total y los componentes celulares constituyen del 35 a 55%. Las células son de tres tipos: eritrocitos, leucocitos y plaquetas o trombocitos (Banks, 1995).

La producción y destrucción de los elementos sanguíneos es llevada a cabo a través de interacciones entre un complejo sistema de órganos constituido por la médula ósea, hígado, riñones, timo, bazo, nódulos linfáticos y sistema reticuloendotelial. Este sistema se denomina sistema hematopoyético (Schalm y Carlson, 1982).

3.2.1. Eritrocitos

Los eritrocitos de los equinos son células redondas, bicóncavas, anucleadas de 5 a 6 μm de diámetro, que tienen por función proteger la molécula de hemoglobina, optimizarla y transportarla (Wittwer y Ceballos, 2001). Estas células viven aproximadamente 140 a 155 días y su producción y maduración, a partir de reticulocitos, se lleva a cabo completamente en la médula ósea (Kramer, 2000). Su recuento en sangre es de $6,0- 9,5 \times 10^6/\mu\text{l}$ y comprenden entre un 30 a un 47% de la sangre de equinos (Wittwer y Ceballos, 2001).

Los parámetros eritrocitarios tales como, el volumen globular aglomerado (VGA), el recuento de eritrocitos y la concentración de hemoglobina, son influenciados por diversos factores fisiológicos en los equinos. Estos factores son la edad, estado de excitación y el ejercicio, entre otros. Esto se explica, ya que en estados de excitación o aprehensión, se produce una contracción esplénica que eleva los parámetros eritrocitarios, mediante la liberación de eritrocitos secuestrados hacia el torrente sanguíneo (Schalm, 1984). Este elevación puede alcanzar un aumento de hasta 40 % y de esta forma puede enmascarar los efectos clínicos de una hemorragia (Kramer, 2000).

3.2.2 Leucocitos

Los leucocitos son células típicas que poseen núcleo, citoplasma y otros órganos celulares. Su recuento absoluto en sangre de equinos es de 5.000 a 11.000 leucocitos/ μl (Wittwer y Ceballos, 2001).

Mientras que los glóbulos rojos realizan su principal función en la sangre, los leucocitos o glóbulos blancos, abandonan la sangre para cumplir sus funciones en el interior de los tejidos (Banks, 1995).

Existen cinco tipos de leucocitos que se clasifican en dos grupos principales; los granulocitos y los agranulocitos. Esta clasificación se basa en la presencia (granulocitos) o ausencia (agranulocitos) de gránulos citoplasmáticos específicos. La presencia de gránulos se determina por la reacción tintorial de sus gránulos. Los tres tipos de granulocitos son los neutrófilos, eosinófilos y basófilos y los agranulocitos corresponden a los linfocitos y monocitos (Banks, 1995).

El aumento en el recuento total de leucocitos en sangre se denomina leucocitosis y es un fenómeno que puede verse afectado por factores de carácter fisiológico como la edad y de carácter patológico como en el caso de una enfermedad. Es así que en equinos el recuento total de leucocitos es más bajo durante el primer mes de vida y va aumentando paulatinamente con la lactancia para después a disminuir con la edad (Kidd, 1991).

3.2.2.1. Neutrófilos. Son células en cuyo estado maduro alcanzan entre 10 y 12 μm de diámetro y comprenden cerca del 50% de los leucocitos totales. Poseen granulaciones finas en el citoplasma y un núcleo lobulado característico producido por condensación de la cromatina. Los neutrófilos más viejos presentan una mayor cantidad de lobulaciones que aquellos neutrófilos jóvenes. Es por esto que aquellos neutrófilos con núcleo en forma de herradura o U, se consideran como inmaduros y se denominan células en banda o baciliformes. Los neutrófilos tienen como función englobar bacterias y restos de tejidos, como respuesta a una infección. Para realizar esto es necesario que salgan del lecho vascular y se dirijan al tejido afectado. Los neutrófilos se consideran como la primera línea de defensa y su permanencia en la sangre es de aproximadamente 12 horas (De Mullet y col., 2003).

El aumento de su número en la sangre se denomina neutrofilia y se produce por diversos motivos. Los factores no infecciosos que determinan un aumento en el volumen circulante de neutrófilos se deben principalmente a corticoesteroides internos y externos, epinefrina, miedo, excitación y ejercicio (Kidd, 1991).

La neutrofilia de origen inflamatorio se produce principalmente por cuadros inflamatorios crónicos o agudos, de orígenes infecciosos y traumáticos. La neutropenia o disminución del recuento absoluto en sangre de neutrófilos, puede deberse a una disminución en la proliferación en la médula ósea, a una infección bacteriana o viral sobraguda, a una producción inefectiva de neutrófilos en médula ósea a causa de la utilización de drogas antineoplásicas o por una disminución en la sobrevivencia de los neutrofilos (Feldman y Ruehl, 1984).

3.2.2.2. Eosinófilos. Son células de aproximadamente 10 a 15 μm de diámetro, que tienen un núcleo bilobulado rodeado de gránulos acidófilos. Se trata de una célula con gránulos grandes

de 3 a 4 μm aproximadamente que están tan estrechamente contenidos dentro del citoplasma celular, que la membrana celular se dispone contorneando los gránulos, dando al eosinófilo un aspecto de mora. La estructura morfológica del eosinófilo del caballo es tan característica que es posible identificar la especie sólo por esta célula (Wittwer y Ceballos, 2001).

Constituyen cerca del 5% de los leucocitos totales y el aumento en el recuento total de estos en la sangre se denomina eosinofilia. En general, la eosinofilia puede tener como causas problemas bronquiales, parasitismos o procesos alérgicos. También se asocia a la eosinofilia un aumento de tamaño de vísceras huecas como intestino, útero y árbol bronquial (Feldman y Ruehl, 1984).

3.2.2.3. Basófilos. Los basófilos son células de entre 10 y 12 μm de diámetro con un núcleo bilobulado o de forma irregular y constituyen menos del 1% de los leucocitos totales. En su citoplasma se encuentran grandes gránulos de color azul a púrpura y que a menudo enmascaran el núcleo que se tiñe más claro. La función principal de los basófilos es liberar heparina e histamina hacia los tejidos infectados, con la finalidad de prevenir que la sangre coagule. Esto permite que otros leucocitos alcancen el área afectada (De Mullet y col., 2003).

3.2.2.4. Linfocitos. Los linfocitos comprenden cerca del 50 % del total de la población de glóbulos blancos en equinos (Kramer, 2000).

La mayoría de los linfocitos de la corriente sanguínea del caballo son pequeños, generalmente de unos 6 a 9 μm de diámetro con un núcleo grande y denso. Posee escaso citoplasma. La función de los linfocitos corresponde a la capacidad de responder a las sustancias inmunógenas, sintetizando y liberando anticuerpos a la circulación y estimulando respuestas inmunitarias que afectan a la inmunidad celular (Banks, 1995).

La linfocitosis es el aumento del recuento total de linfocitos en la sangre periférica y su disminución se llama linfopenia. Para ambos fenómenos existen factores de carácter fisiológicos y patológicos que intervienen, como por ejemplo el estrés (Kramer, 2000).

3.2.2.5. Monocitos. El monocito es el leucocito de mayor tamaño, alcanzando 15 a 20 μm de diámetro. La sangre del caballo posee alrededor de 4 % de monocitos y presentan un aspecto bastante típico. El citoplasma es más abundante que el de los linfocitos y es de color azul grisáceo pálido. El núcleo puede ser ovalado, en forma de riñón o herradura. La cromatina nuclear se tiñe más débilmente que en el linfocito. Los monocitos viven aproximadamente unos tres días en la corriente sanguínea y alcanzan su capacidad funcional cuando abandonan la circulación migrando a través de los capilares para penetrar en los tejidos, en donde se convierten en macrófagos y eliminan los restos tisulares y sustancias extrañas. Cualquier acúmulo de monocitos en el interior de un tejido refleja una condición de cronicidad (Banks, 1995).

3.2.3. Plaquetas

Las plaquetas o trombocitos son cuerpos irregulares pequeños de 2 a 4 μm de tamaño, derivados de la porción citoplasmática de grandes células de la médula ósea llamadas megacariocitos. Estas estructuras no poseen núcleo, por lo que no deberían ser consideradas células, sin embargo, debido a las actividades hemostáticas de adherencia, coagulación y retracción del coagulo que poseen, se les denomina células funcionales (Banks, 1995). Las concentraciones de plaquetas en equinos corresponden a unas de las más bajas dentro de los mamíferos (Kramer, 2000), siendo estas de 100,000 a 400,000/ul de sangre. Poseen una vida media promedio de 9 días (Schalm y Carlson, 1982).

3.2.4. Plasma

El plasma corresponde a la fracción líquida en la que están suspendidos los componentes celulares de la sangre. Es un sustrato rico en inmunoglobulinas, factores de coagulación, enzimas y proteínas transportadoras (Morris, 1998).

El plasma de los equinos posee un color amarillo característico debido principalmente a bilirrubina prehepática o no conjugada. La intensidad de este color amarillo se mide en unidades U.E. y se denomina índice icterico. Existe una relación directa entre el volumen globular y los valores del índice icterico (Schalm y Carlson, 1982).

Las proteínas plasmáticas presentes en el plasma son; las albúminas que corresponden al 40-50%, las globulinas que corresponden al 50% y el fibrinógeno que no debe superar el 5%. Aunque las alteraciones de las proteínas plasmáticas suelen ser inespecíficas para una enfermedad en particular, los cambios en la concentración plasmática de las proteínas totales o la variación en los componentes de la misma tienen importancia diagnóstica (Clark, 1998).

3.3 SANGRE EQUINA

Los equinos domésticos comunes (caballos, burros, mulas) tienen algunas diferencias hematológicas sutiles. Básicamente existen dos tipos de caballos a partir de los cuales se han desarrollado muchas razas. Los caballos que descienden del caballo árabe son llamados de sangre caliente, estos incluyen a los árabes, los fina sangre, los standardbred y los cuartos de milla. Los caballos de sangre fría corresponden a los caballos de tiro y los ponys. La diferencia hematológica es el mayor número de eritrocitos en animales de sangre caliente que en los de sangre fría (Kramer, 2000).

La sangre de los equinos es única en varios aspectos comparada con otros animales domésticos. Es por esto que para su estudio se deben tener en cuenta ciertas consideraciones (Schalm y Carlson, 1982):

- La sedimentación de los eritrocitos es muy rápida, esto lleva a que la sangre se separe rápidamente y se formen estructuras como “pilas de monedas”. Por ello se debe hacer una buena homogenización de la muestra de sangre antes de realizar cualquier examen.
- El volumen circulante de eritrocitos es altamente inestable debido al gran volumen de reserva de eritrocitos que hay en el bazo, el cual se contrae bajo la influencia de ejercicio muscular y aprehensión.
- La eritropoyesis se completa en la médula ósea, incluso en situaciones de pérdida de sangre severa o anemia hemolítica. Consecuentemente es difícil determinar mediante la morfología de los eritrocitos en frotis, si existe un aumento en la eritropoyesis en respuesta a una anemia preexistente.
- El índice icterico, que corresponde al color amarillento del plasma, tiene un amplio rango de referencia de 7 a 25 U.E. en salud y varía directamente con un aumento del volumen circulante de eritrocitos. El índice icterico aumenta con el ayuno, por lo que valores aumentados no pueden ser interpretados como evidencia directa de una hepatopatía o anemia hemolítica.
- El número de linfocitos en equinos disminuye con la edad, mientras que el número de neutrófilos tiende a permanecer constante. Esto lleva a un aumento en la relación neutrófilo/linfocito a medida que avanza la edad. Es por esto que es necesario tener en cuenta la edad del animal al momento de hacer una evaluación diferencial de los leucocitos.
- El número de plaquetas, 100,000 a 400,000/ μ l en caballos es menor que en otras especies. Un recuento de 100,000/ μ l no refleja una trombocitopenia en el equino.

3.4 TRANSFUSIÓN SANGRE Y DE SUS HEMODERIVADOS

La transfusión sanguínea se define como un tratamiento de apoyo que se administra para corregir deficiencias en un paciente hasta que se haya superado el trastorno (Hohenhaus y Rentko, 2002).

La administración de **sangre entera** esta indicada para equinos que cursan con anemia severa, suficiente para impedir la correcta oxigenación de los tejidos (Sellon, 2000). Las indicaciones más frecuentes para una transfusión sanguínea en estos animales es la destrucción acelerada de eritrocitos y hemorragias masivas producto de accidentes o traumas (Williamson, 1993). Una transfusión de sangre entera esta indicada en caballos con un volumen globular menor a 13% debido a pérdida aguda de sangre o hemólisis (Porter y Green, 2003). En los

caballos después de una hemorragia o una hemólisis agudas, la magnitud del déficit eritrocitario está enmascarada por la contracción esplénica compensatoria (Morris, 1998).

Cuando se decide hacer una transfusión con sangre entera, se deben considerar ciertos factores como la severidad de la anemia, rapidez con que se desarrolló y el grado de respuesta eritropoyética (Morris, 1998). La cantidad de sangre a administrar depende del tamaño del receptor, la naturaleza y severidad del problema y la cantidad de sangre disponible (Sellon, 2000). En caballos con anemia severa, la meta de la transfusión es proveer al paciente de la suficiente capacidad para transportar oxígeno para mantener la adecuada oxigenación de los tejidos sin eliminar el estímulo de hipoxia necesario para inducir la producción de eritropoyetina desde los riñones. En la mayoría de los casos, el reemplazo del 25 a 30 % de la pérdida de sangre calculada es suficiente (Sellon, 2000).

En medicina veterinaria, la mayor parte de las veces se administra sangre fresca y completa del donante, pero es preferible administrar los componentes de la sangre por separado, porque proporciona al paciente sólo lo que necesita y se evitan reacciones adversas (Cotter y Stone, 1994).

El **plasma** ha sido utilizado en forma exitosa para terapia primaria o de soporte en muchas enfermedades de equinos, reemplazando inmunoglobulinas perdidas, factores de coagulación, enzimas, y proteínas, así como también ayuda a mantener la presión oncótica vascular (Feige y col., 2003). La terapia con plasma se utiliza en situaciones en que haya deficiencias de los componentes del plasma, como por ejemplo; caballos con enteropatía, septicemia, endotoxemia, falla en la transferencia pasiva de inmunidad a potrillos, pleuritis, nefropatías, coagulación intravascular diseminada (CID), y otras deficiencias de factores de coagulación (Feige y col., 2003). El plasma posee una serie de ventajas frente a los coloides sintéticos, como el que sea una fuente funcional de proteínas como factores de coagulación, inmunoglobulinas y complemento (Porter y Green, 2003).

La dosis necesaria de plasma varía con la enfermedad que debe tratarse, el grado de cualquier deficiencia específica en el receptor y la concentración de la proteína deficiente en el plasma receptor. Otros factores que deben considerarse son la velocidad de utilización, pérdida de la proteína y el equilibrio de las proteínas plasmáticas fuera del espacio vascular (Morris, 1998). En transfusiones de plasma para potrillos con falla en transferencia de la inmunidad pasiva, la meta es administrar la suficiente cantidad de inmunoglobulinas para aumentar la concentración de IgG plasmática sobre los 800 mg/dl. La transfusión de 1 a 2 litros de plasma es suficiente para la mayoría de los potrillos de 45 a 50 kg de peso. Para el tratamiento de una hipoproteinemia, se recomienda la transfusión de 10 a 20 ml/kg de peso vivo de plasma (Sellon, 2000).

En equinos normovolémicos y anémicos existe la alternativa de transfundir sólo **eritrocitos** en vez de sangre entera. Esto expone al receptor a una menor cantidad de proteínas extrañas (Sellon, 2000). Además la administración de sangre entera puede predisponerlo a

una sobrecarga de fluido, mientras que la administración individual del componente deficiente es más apropiada (Porter, 2003).

La mayoría de los eritrocitos de equinos transfundidos sobreviven menos de una semana en la circulación del receptor a pesar que su vida media normal es de 150 días. La transfusión sanguínea ejerce un soporte en el periodo entre la pérdida de los eritrocitos y la respuesta efectiva de la médula ósea que ocurre en 4 a 7 días aproximadamente (Porter, 2003).

3.4.1. Reacciones adversas

A pesar que las transfusiones de sangre se consideran con frecuencia como una terapia necesaria y de importancia vital, no están libres de riesgo de reacciones adversas. Debido a que cada transfusión conlleva el riesgo de hacer una reacción adversa, los médicos veterinarios deben considerar siempre los beneficios terapéuticos y el riesgo de una reacción, previo a la administración (Hohenhaus, 2000). El uso de componentes sanguíneos con alto contenido de leucocitos tienen un importante rol en reacciones postransfusionales (Benavides, 2000).

Existen 2 tipos de reacciones adversas, las hemolíticas y las no hemolíticas. A su vez las reacciones no hemolíticas pueden clasificarse en inmediatas y tardías (Zamudio, 2003).

3.4.1.1. Reacciones adversas hemolíticas. Una reacción hemolítica transfusional significa la ocurrencia de signos de destrucción aumentada de glóbulos rojos después de la transfusión. Las reacciones hemolíticas leves pueden ser causadas de varias formas. Pueden producirse por transfundir sangre que ha sido conservada por un tiempo muy prolongado, mientras que las reacciones hemolíticas severas son casi siempre causadas por transfusión de glóbulos rojos incompatibles (Contreras y Mollison, 1994). La prevención de estas reacciones depende de la correcta identificación de glóbulos rojos compatibles para transfusión (Hohenhaus, 2000).

Las reacciones hemolíticas son causadas por una reacción antígeno- anticuerpo entre los anticuerpos plasmáticos del receptor en contra del antígeno eritrocitario del donante por lo que se produce una destrucción de los glóbulos rojos, lo que desencadena una serie de efectos que pueden llegar hasta la muerte del receptor (Zamudio, 2003). Sus signos clínicos incluyen; fiebre, hipotensión, disnea, hemoglobinuria y hemorragia. Este tipo de reacción es la más severa que se puede presentar principalmente en transfusión de glóbulos rojos o de cualquier componente plasmático que presente contaminación con eritrocitos (Zamudio, 2003).

Cualquier paciente que presente signos de reacción transfusional hemolítica, se le deberá suspender inmediatamente la transfusión manteniendo siempre una vía venosa abierta con solución salina. A continuación se debe monitorear la presión sanguínea, ya que podría presentarse hipotensión (Hohenhaus, 2000).

3.4.1.2. Reacciones adversas no hemolíticas inmediatas. Estas reacciones son más frecuentes en la transfusión de eritrocitos y plaquetas por diversos mecanismos inmunológicos que no causan hemólisis (Zamudio, 2003). Se consideran cuatro tipos de reacciones no hemolíticas inmediatas:

3.4.1.2.1. Febril: El tipo de reacción no hemolítica más frecuentemente observada a la transfusión de sangre entera es la reacción febril no hemolítica, que es consecuencia de la presencia de citoquinas en los leucocitos del donante (Lanevski y Wardrop, 2001).

El hallazgo más común es la fiebre, a menudo precedida por calofríos que comienzan 30 a 60 minutos después de la transfusión (Contreras y Mollison, 1994). La fiebre como reacción adversa se define como un aumento de la temperatura corporal de al menos 1°C sobre el valor pretransfusión (Hohenhaus, 2000). Esta alza térmica se produce específicamente por la interacción de leucocitos y citoquinas del producto transfundido con los anticuerpos del receptor (Zamudio, 2003). El tratamiento consiste en la suspensión de la transfusión y administración de antipirético; se recomienda el uso posterior de componentes sanguíneos leucorreducidos (Zamudio, 2003).

3.4.1.2.2. Alérgica: Se presenta por reacción de proteínas plasmáticas del producto a transfundir con antígenos del receptor (Zamudio, 2003). La causa es presumiblemente una reacción entre alguna proteína extraña presente en el plasma del donante y su correspondiente anticuerpo IgE en el plasma del receptor (Contreras y Mollison, 1994). El signo clínico más frecuente es la urticaria. Si la transfusión transcurre sin otros signos clínicos evidentes, se puede continuar a una menor velocidad después de la administración de antihistamínicos (Hohenhaus, 2000).

3.4.1.2.3. Contaminación bacteriana: Es causada por la transfusión de productos contaminados con agentes infecciosos. Esto puede ocurrir por una mantención de la sangre a temperaturas no adecuadas, productos caducados o transfusiones que exceden más de 4 horas de transfusión (Zamudio, 2003).

La decoloración de la unidad de sangre, la presencia de coágulos y la identificación de microorganismos son indicativos de que la reacción adversa es causada por una transfusión con sangre contaminada (Hohenhaus, 2002). Los signos clínicos de este tipo de reacción incluyen fiebre, calofríos, náuseas y malestar general. El tratamiento consiste en la suspensión de la transfusión, mantener una vía intravenosa con solución salina y administrar antibióticos si es necesario (Zamudio, 2003). Se describe que la fatalidad en gatos es tan alta como 35 % (Hohenhaus, 2000).

A pesar de que se debería realizar un examen exhaustivo de la sangre recolectada, esto muchas veces no se hace debido a la urgencia de las situaciones que ameritan transfusiones (Hohenhaus, 2000). Es por esto que existe la posibilidad de transfundir sangre o componentes

sanguíneos contaminados y de esa forma transmitir enfermedades infecciosas (Zamudio, 2003).

3.4.1.2.4. Sobrecarga circulatoria: La sobrecarga circulatoria ocasionada por la administración de un volumen excesivo o transfusión rápida que supera la capacidad del sistema cardiopulmonar, no permite la adecuada distribución vascular, lo que produce una congestión pulmonar y cardíaca. Los signos clínicos que se presentan son hipertensión, congestión venosa, disnea, tos y crepitaciones pulmonares (Zamudio, 2003).

El tratamiento para la sobrecarga circulatoria consiste en administrar un diurético de rápida acción, venodilatación rápida con nitroglicerina y administración de oxígeno con máscara. Una forma de prevenir esta sobrecarga es administrar el menor volumen posible de sangre o administrar sólo el componente que sea necesario, por ejemplo, transfusión de glóbulos rojos en vez de sangre entera. Es importante también asegurar que la velocidad de administración no supere 1ml/kg/h (Hohenhaus, 2000).

3.4.1.3. Reacciones adversas no hemolíticas tardías. Son aquellas reacciones que ocurren después de completarse la transfusión o demoran días o meses en aparecer (Hohenhaus y Rentko, 2002).

Estas reacciones postransfusionales ocurren como resultado de respuestas inmunológicas a transfusiones previas (Hohenhaus, 2000). Es decir, que el receptor produce nuevos anticuerpos por los antígenos administrados en transfusiones anteriores, lo que estimula la respuesta inmunológica en las transfusiones subsecuentes, lo que se denomina aloinmunización. En caso de transfusión de plaquetas puede presentarse refractariedad plaquetaria, esto es la presencia de anticuerpos antiplaquetas que causan inhibición de las plaquetas administradas, por lo que no se cumple el objetivo de la transfusión. Para prevenir este tipo de reacción se recomienda el uso de productos leucorreducidos (Zamudio, 2003).

3.5 RECOLECCIÓN DE SANGRE

Para realizar una transfusión de sangre o de algún hemoderivado, es necesario recolectar la sangre de la forma más aséptica posible. La asepsia se debe mantener desde que se obtiene la sangre del animal correctamente depilado y desinfectado, hasta la obtención de un producto que no haya tomado contacto con el exterior en ningún momento y se encuentre y almacene en una bolsa estéril de transfusión a una temperatura adecuada (Sellon, 2000).

La bolsa para transfusión debe contener idealmente una solución de citrato, fosfato y dextrosa (CPD) como anticoagulante, ya que además provee un sustrato para la glicólisis de los glóbulos rojos. El componente fosfatado del CPD sirve como agente buffer y aumenta el pH de la solución a un nivel fisiológico (Williamson, 1993). El citrato de sodio inhibe la coagulación quelando el calcio requerido en la cadena de la coagulación (Sellon, 2000). Se necesitan 15 ml de CPD por cada 100 ml de sangre recolectada, es decir una relación de 1:7.

La heparina se podría utilizar en situaciones de emergencia, pero tiene una serie de desventajas. La heparina es un potente activador de plaquetas y la sangre heparinizada no debería almacenarse por más de 2 horas después de la recolección (Williamson, 1993).

El volumen de sangre a obtener dependerá del estado de salud del donante. Es así como un caballo sano de 500 kg puede donar de 6 a 8 litros de sangre entera cada 30 días sin presentar secuelas evidentes (Morris, 1998). Mientras se está extrayendo la sangre del donante, la bolsa de transfusión debe moverse en forma suave y continua para asegurar una correcta homogenización de la sangre con el anticoagulante. Las bolsas de sangre entera deben ser almacenadas a 4°C si el intervalo entre la recolección y la transfusión es mayor a 2 horas (Sellon, 2000). La duración de las bolsas de sangre entera con CPD es de 21 días a 4° C (Benavides, 2000).

3.5.1 Leucorreducción

La *leucorreducción* se refiere al proceso mediante el cual se obtiene un hemoproducto con un número reducido de leucocitos. En medicina humana, los parámetros actuales de leucorreducción para Europa y Estados Unidos exigen productos con concentraciones residuales de leucocitos menores de 1×10^6 o menor que 5×10^6 por unidad de hemoproducto respectivamente (Dzik, 2002). Para lograr estas cifras se requiere que el método de leucorreducción empleado permita obtener un producto con menos de un 20% de los leucocitos originales y que no afecte la viabilidad de las células rojas (Brownlee y col., 2000).

La leucorreducción es una técnica que se utiliza para disminuir la frecuencia de complicaciones transfusionales específicas, tales como aloinmunizaciones, refractariedad plaquetaria y reacciones febriles no hemolíticas (Dzik, 2002).

Existen diversas técnicas que se utilizan para leucorreducir la sangre, entre ellas la sedimentación, el lavado de eritrocitos y la centrifugación. En la actualidad la técnica más utilizada es la filtración (Bravo, 2002), pero este proceso no remueve las citoquinas y fragmentos de células blancas liberadas durante el tiempo de almacenamiento del componente leucorreducido (Benavides, 2000). En oposición a esto, los componentes fraccionados por centrifugación son leucorreducidos en un 80 a 90 %, siendo este el método que proporciona el menor número de leucocitos contaminantes en sangre almacenada (Benavides, 2000).

La tecnología del sistema Top and Bottom de Optisystem® fue descrita por Hogman y col. (1988), y su eficacia en términos de productividad y pureza de los componentes no ha sido superada por ningún otro método de fraccionamiento de sangre. El sistema Top and Bottom permite una elevada reducción en la contaminación de leucocitos de los diferentes componentes sanguíneos (Hurtado y col., 2000).

Este sistema se basa en la centrifugación, mediante la cual se logra reducir sobre un 80% de leucocitos totales. El método consiste en centrifugar la unidad de sangre total,

recolectada del donante con anticoagulante (CPD) para dividirla en tres capas; plasma, costra flogística y eritrocitos. Posterior a esto se separan mediante presión las tres capas anteriormente descritas, depositando el plasma en una bolsa que se ubica en la parte superior de la unidad de sangre entera y los eritrocitos en una bolsa que se ubica en la parte inferior de la unidad de sangre entera y que contiene Adsol como líquido diluyente. La costra flogística permanece dentro de la bolsa donde se encontraba la unidad de sangre entera. Este procedimiento se hace posible mediante un sensor óptico que detecta el movimiento de la costra flogística a medida que la unidad de sangre entera se vacía, regulando el paso del plasma y de los eritrocitos a sus respectivas bolsas (Benavides, 2000).

No hay información en la literatura consultable sobre el empleo de la leucorreducción en sangre de equinos, técnica que permitiría reducir la presentación de reacciones transfusionales adversas y optimizar el uso la sangre. Con dicho propósito es necesario hacer un estudio para evaluar el grado de leucorreducción en sangre de caballos, con la finalidad de poder implementar esta técnica en la medicina equina.

3.6. HIPÓTESIS

El proceso de leucorreducción mediante el sistema Top and Bottom reduce sobre el 80% el contenido de leucocitos en el concentrado de eritrocitos para hemotransfusión obtenido de sangre de caballos.

3.7. OBJETIVOS

3.7.1. General:

Establecer el porcentaje de leucorreducción en concentrados de eritrocitos de caballos obtenido mediante el sistema “Top and Bottom”.

3.7.2. Específico:

3.7.2.1 Determinar la cantidad de eritrocitos, concentración de hemoglobina y volumen globular previo y posterior al proceso de leucorreducción mediante el sistema “Top and Bottom” en sangre de caballos.

3.7.2.2 Determinar la cantidad de leucocitos presentes previo y posterior al proceso de leucorreducción mediante el sistema “Top and Bottom” en sangre de caballos.

3.7.2.3 Determinar el porcentaje de leucorreducción en el concentrado de eritrocitos logrado mediante el sistema “Top and Bottom” en sangre de caballos.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1. Material biológico

Se utilizaron 10 equinos clínicamente sanos de edades entre 2 y 7 años y de razas Fina Sangre de Carrera y Criollo Chilenos. Los animales cumplieron con los siguientes requisitos:

- Entre 3 y 12 años de edad.
- Hembras no gestantes.
- Poseer un temperamento dócil.
- Estar clínicamente sanos (determinado por anamnesis y examen clínico general)
- Tener hemogramas dentro de los rangos correspondientes a la especie.

Con el propósito de establecer el cumplimiento de estos requisitos, a los 10 equinos se les practicó un examen clínico general y un hemograma control para certificar su idoneidad para este estudio.

4.1.2. Material de leucorreducción

- Sistema de bolsas Optipack® cuádruples marca Baxter® (Figura 1). El sistema esta compuesto por una bolsa madre denominada unidad de sangre total (UST), que contiene 63 ml del anticoagulante CPD (citrato fosfato y dextrosa) y tiene un puerto de salida superior, otro inferior y un puerto de entrada conectados a tres bolsas satélites; dos sobre la bolsa de la UST para el plasma pobre en plaquetas (PPP) y el concentrado plaquetario (CP) y una en la parte inferior para el concentrado de eritrocitos (CE). Esta última contiene 100 ml de solución de ADSOL que permite la preservación de eritrocitos por 42 días, compuesta por una solución salina que mantiene el medio isotónico, adenina para la mantención del ATP, dextrosa como nutriente y manitol para evitar la lisis de los glóbulos rojos.
- Centrífuga Sorvall Instruments modelo RC-3B.
- Equipo de procesamiento Optipress® marca Baxter.
- Sellador Hematrón IV® de Baxter.

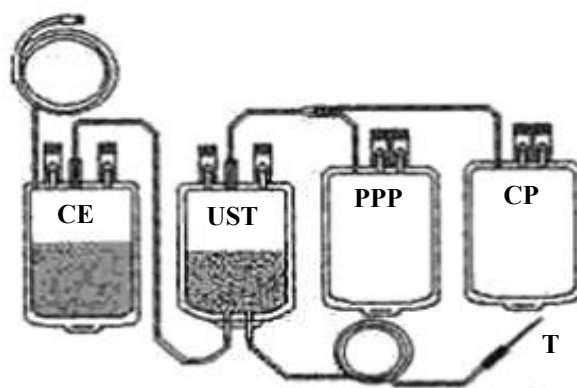


Fig 1. Sistema de bolsas Optipack ®:

UST: Unidad de sangre total con CPD
 CE: Concentrado de eritrocitos con Adsol
 PPP: Plasma pobre en plaquetas
 CP: Concentrado plaquetario
 T: Tubo con aguja de extracción de sangre.

4.1.3. Material de laboratorio

- Analizador hematológico Sysmex KX- 21N.
- Microscopio óptico Olympus

La obtención de muestras de sangre y análisis hematológicos se llevaron a cabo utilizando equipos, materiales y reactivos del Laboratorio de Patología Clínica del Hospital Veterinario de la Universidad Austral de Chile.

El proceso de leucorreducción se realizó utilizando equipos facilitados por el Banco de Sangre del Hospital Base del Servicio de Salud, Valdivia.

4.2 MÉTODOS

4.2.1. Selección de los donantes

A cada equino se le realizó un examen clínico general y se obtuvieron muestras de sangre con EDTA, mediante venopunción yugular para realizar un hemograma en el que se determinó la concentración de hemoglobina (Hb), el volumen globular aglomerado (VGA), el recuento de leucocitos totales y la fórmula leucocitaria diferencial relativa y absoluta.

Se seleccionaron aquellos individuos que estaban sanos y presentaban los valores hematológicos dentro de los rangos de referencia para su especie y raza.

4.2.2 Recolección de la sangre

A los equinos seleccionados se les extrajo sangre mediante venopunción yugular. Antes de la punción se realizó limpieza, depilación y desinfección de la zona. La sangre fue recolectada en bolsas Optipack® cuádruples (Figura 1).

Las bolsas de unidad de sangre total (UST) se llenaron por diferencia de gravedad, moviéndose de forma suave constantemente hasta obtener aproximadamente 450 ml de sangre. Al finalizar este procedimiento se anudó el tercio proximal del flebo de entrada y se cortó su extremo libre.

La unidad de sangre total fue transportada al Hospital Base del Servicio de Salud de Valdivia, dentro de 5 horas de obtenida. El traslado de la muestra se realizó en una caja termo aislante para asegurar una temperatura ambiente constante.

4.2.3. Procesamiento de la unidad de sangre total (UST)

El proceso de leucorreducción se llevó a cabo en el Banco de Sangre del Hospital Base de Valdivia, utilizando el sistema Top and Bottom, en dos fases, centrifugación y extracción.

4.2.3.1. Centrifugación. Para llevar a cabo este proceso se pusieron las bolsas de sangre dentro de bolsas plásticas y después en los vasos de una centrífuga Sorvall Instruments modelo RC-3B, donde fueron centrifugadas a 4700 g durante 12 minutos a una temperatura de 22° C.

Como resultado de este proceso la sangre se separó en 3 capas con interfases bien diferenciadas. En la parte superior el plasma, al medio la interfase plasma – costra flogística - eritrocitos y abajo los eritrocitos.

4.2.3.2. Extracción. Las bolsas con las 3 capas diferenciadas se pusieron en el extractor neumático Optipress® para la separación automática de sus componentes. Este extractor opera con tres sistemas; neumático, óptico y eléctrico.

El sistema neumático implica que a través de dos placas paralelas se ejerce presión sobre la bolsa UST centrifugada, haciendo que el plasma fluya hacia la salida superior y los eritrocitos hacia la salida inferior. El sistema óptico mantiene la costra flogística en el medio de la bolsa original mediante una fotocelda y un haz de luz de 940 nm, controlando el flujo de salida; al terminar el fraccionamiento envía una señal eléctrica para terminar el proceso de extracción.

El resultado del procedimiento es una bolsa con el concentrado de eritrocitos leucorreducidos (CE), otra con plasma pobre en plaquetas (PPP) y la bolsa original con la costra flogística. La cuarta bolsa, correspondiente al concentrado plaquetario, no se utilizó, ya que no se realizó el procedimiento de obtención de plaquetas.

4.2.4. Obtención de muestras

Se tomaron dos muestras con EDTA (1-2-mg/ml) de 1-3 ml cada una. Una muestra se obtuvo inmediatamente después de terminado el proceso de recolección de sangre desde la UST y la otra después del proceso de leucorreducción desde la unidad de CE.

Estas muestras fueron transportadas en una caja termo aislante al Laboratorio de Patología Clínica del Instituto de Ciencias Clínicas Veterinarias de la Universidad Austral de Chile.

4.2.5. Análisis de laboratorio

Se realizaron las siguientes determinaciones:

4.2.5.1. Eritrograma

- Recuento de eritrocitos (número/ μ l), mediante citometría de flujo (Sysmex KX-21N).
- Concentración de hemoglobina (g/dl), mediante citometría de flujo (Sysmex KX-21N).
- Volumen globular aglomerado (VGA), mediante citometría de flujo (Sysmex KX-21N).

4.2.5.2. Leucograma

- Recuento de leucocitos totales (número/ μ l), mediante citometría de flujo (Sysmex KX-21N).
- Fórmula leucocitaria diferencial relativa. Se determinó por conteo manual diferenciando 100 leucocitos en frotis preparados en cubreobjetos de 22 x 22 mm teñidos con Giemsa y observados en microscopio óptico con aumento de 800 X.
- Fórmula leucocitaria absoluta. Se calculó el número/ μ l de cada tipo de leucocito mediante regla de tres utilizando los valores de recuento de leucocitos totales y de la fórmula leucocitaria diferencial relativa.

4.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el programa computacional Statistix 8.0. Se determinaron los valores de estadística descriptiva (promedio \pm desviación estándar) y se compararon los valores obtenidos para cada variable en las dos muestras mediante el análisis de "t" de Student para muestras pareadas. Además se determinó el valor de la correlación de Pearson entre los valores de los recuentos de leucocitos de las unidades UST con las unidades de CE. Se consideró como significativo un valor de $p < 0,05$.

La eficiencia del proceso de leucorreducción se determinó por la diferencia porcentual entre el número de leucocitos previo y posterior al procedimiento de leucorreducción mediante el sistema Top and Bottom. Los valores que se utilizaron fueron los obtenidos de los leucogramas de las muestras de la UST y de la subunidad de CE.

5. RESULTADOS

El volumen de sangre obtenido en la bolsa UST del sistema Top and Bottom fluctuó entre 400 y 500 ml, volumen que se recolectó en un período de 15 a 20 minutos. Solo dos animales en este estudio se observaron inquietos y ansiosos al momento de la recolección de sangre, los que coincidieron con los menores volúmenes recolectados de sangre.

El número de eritrocitos, el volumen globular y la concentración de hemoglobina de la sangre de los caballos aumentó ($p < 0,05$) después del procedimiento de leucorreducción, en el contenido de la unidad CE, con relación al valor obtenido en la bolsa UST (Tablas 1, 2 y 3).

Tabla 1: Número de eritrocitos en sangre de equinos (promedio, desviación estándar y rango) en la unidad de sangre total (UST) y en la unidad de concentrado de eritrocitos (CE) posterior a la leucorreducción mediante el sistema Top and Bottom.

Eritrocitos (N° x10 ⁶ /μl)	Promedio	DE	Rango	
			Mínimo	Máximo
En unidad UST	7,8 ^a	1,1	5,5	9,0
En unidad CE	11,1 ^b	1,5	7,0	12,4

Letras diferentes señalan diferencias entre promedios $p < 0,05$

Tabla 2: Volumen globular en sangre de equinos (promedio, desviación estándar y rango) en la unidad de sangre total (UST) y en la unidad de concentrado de eritrocitos (CE) posterior a la leucorreducción, mediante el sistema Top and Bottom.

Volumen globular (%)	Promedio	DE	Rango	
			Mínimo	Máximo
En la unidad UST	39 ^a	6	28	46
En la unidad CE	57 ^b	8	36	63

Letras diferentes señalan diferencias entre promedios $p < 0,05$

Tabla 3: Concentración de hemoglobina en sangre de equinos (promedio, desviación estándar y rango) en la unidad de sangre total (UST) y en la unidad de concentrado de eritrocitos (CE) posterior a la leucorreducción mediante el sistema Top and Bottom.

Hemoglobina (g/dl)	Promedio	DE	Rango	
			Mínimo	Máximo
En la unidad UST	12,9 ^a	1,8	9,4	15,3
En la unidad CE	18,3 ^b	2,3	12,3	20,2

Letras diferentes señalan diferencias entre promedios $p < 0,05$

Tabla 4: Número de leucocitos en sangre de equinos (promedio, desviación estándar y rango) en la unidad de sangre total (UST) y en la unidad de concentrado de eritrocitos (CE) posterior a la leucorreducción mediante el sistema Top and Bottom.

Leucocitos (N°/ μ l)	Promedio	DE	Rango	
			Mínimo	Máximo
En la unidad UST	7000 ^a	1090	4800	8500
En la unidad CE	450 ^b	210	200	800

Letras diferentes señalan diferencias entre promedios $p < 0,05$

El número de leucocitos totales de la sangre de equinos previo a la leucorreducción en la unidad UST fue de un promedio de 7000 por μ l. Esta cifra se redujo ($p < 0,05$) después del proceso de leucorreducción, alcanzando un promedio de 450 por μ l (Tabla 4).

En las 10 unidades de sangre se obtuvo una reducción del $93,4 \pm 3\%$ del número de leucocitos producto del proceso de leucorreducción con un mínimo de eficiencia del 89,1% (Tabla 5).

Sólo en 3 frotis de las unidades de CE fue posible observar leucocitos, encontrándose estos en cantidades insuficientes para realizar un recuento diferencial, por lo tanto no fue posible registrar la información. El único tipo de leucocitos encontrados fue eosinófilos.

El valor de la correlación de Pearson obtenido entre el recuento de leucocitos de la bolsa de la UST con el de la unidad de CE fue de $r = 0,0430$ ($p > 0,05$) demostrando así que el número de leucocitos remanentes en la unidad de CE fue independiente del contenido inicial de leucocitos de la UST.

Tabla 5: Porcentaje de leucorreducción en unidades de concentrado de eritrocitos (CE) de sangre de 10 equinos, posterior al proceso de leucorreducción mediante el sistema Top and Bottom.

Casos	Leucorreducción (%)
1	94,5
2	95,8
3	92,5
4	93,7
5	90,1
6	89,1
7	93,7
8	97,6
9	97,2
10	90,0
Promedio	93,4
DE	3,0

6. DISCUSIÓN

Actualmente la obtención de plasma de sangre equina se realiza utilizando la elevada velocidad de la sedimentación de los eritrocitos de equinos, permitiendo la recolección del plasma cuando los eritrocitos hayan sedimentado en la base de la bolsa o botella de recolección, lográndose acelerar la sedimentación mediante centrifugación (Feige y col., 2002).

A pesar de que las técnicas para recolección de eritrocitos y plasma en equinos, como la sedimentación por gravedad o la centrifugación de la sangre entera, son fáciles de realizar y no requieren de equipos especiales, la mayor ventaja de la leucorreducción utilizando el sistema Top and Bottom sobre estas técnicas, es la obtención de plasma y eritrocitos pobres en leucocitos de manera estéril. Sin embargo, se señala que existe una mayor pérdida de eritrocitos que con el método clásico de extracción de la costra flogística (Hurtado y col., 2000).

Para este estudio la recolección de sangre, la obtención de plasma y del concentrado de eritrocitos se hizo en base a un protocolo de trabajo (Anexo 1), el cuál se basó en el existente para sangre humana, utilizado en forma rutinaria en el Hospital Base de Valdivia. Este protocolo contiene una serie de 15 pasos secuenciales desde la anamnesis del donante hasta la obtención de las tres fracciones de sangre separadas en tres bolsas.

La sangre recolectada fue leucorreducida a menos de 5 horas de su recolección, a diferencia de lo indicado por Rider y col. (2000), que sugieren una mantención de la sangre a temperatura de 4°C durante 12 horas, con el fin de permitir la fagocitosis de cualquier contaminante bacteriano. Esto no se realizó de esta forma, ya que la finalidad de este estudio fue evaluar la efectividad de la técnica y no utilizar los hemoproductos para transfusiones.

El número de eritrocitos (Tabla 1), la concentración de hemoglobina (Tabla 2), el valor del volumen globular (Tabla 3) y el número de leucocitos (Tabla 4) obtenidos de las muestras de la unidad de sangre total (UST), se encontraban dentro de los rangos de referencia para la edad y especie equina (Wittwer y Ceballos, 2001). Estos valores obtenidos en las UST fueron de suma importancia, debido a que permitieron continuar con el estudio, demostrando que los animales tenían sus valores hematológicos normales.

En las bolsas de las UST no se detectaron anomalías en la sangre tales como hemólisis o coagulación. Esto debido posiblemente a que la bolsa de la UST contiene 63 ml del anticoagulante CPD, que constituye un método de almacenamiento óptimo, el cual logra los mejores valores hematológicos para sangre de equinos (Mudge y col., 2004).

El número de eritrocitos, la concentración de hemoglobina y el volumen globular aumentaron después de realizada la leucorreducción en la unidad de concentrado de eritrocitos en comparación con los valores obtenidos de la UST (Tablas 1, 2 y 3). Este aumento también se pudo observar en el estudio realizado con sangre de caninos, en el que se obtuvieron valores de $8,7 \times 10^6/\mu\text{l}$ para los eritrocitos, 57% de volumen globular y 20,7 g/dl para la concentración de hemoglobina (Ortiz, 2004). El aumento observado en ambos estudios se debió a que se concentraron los glóbulos rojos producto de la extracción del plasma al leucorreducir la UST mediante el sistema Top and Bottom.

Al comparar los valores obtenidos en las unidades de CE de equinos con los valores en las unidades CE de caninos (Ortiz, 2004) podemos observar que el número de eritrocitos/ μl en equinos es relativamente mayor, mientras que el volumen globular permanece igual. La concentración de hemoglobina se registró levemente más alta en las unidades de CE de caninos. Estas diferencias se explican por el menor tamaño de los eritrocitos de los equinos comparado con el de los caninos (Wittwer y Ceballos, 2001).

En un estudio con sangre humana se obtuvieron UST con valores de $4,0 \times 10^6$ eritrocitos/ μl , volumen globular de 36% y concentración de hemoglobina de 12 g/dl. Los valores obtenidos posteriores a la leucorreducción en este estudio fueron $6,4 \times 10^6$ eritrocitos/ μl , 61% de volumen globular y 19,6 g/dl para la concentración de hemoglobina (Hurtado y col., 2000). La concentración de eritrocitos en la unidad de CE de equinos fue mayor que en humanos, mientras que la hemoglobina presentó un valor levemente menor.

Similar concentración de sangre se observa en las unidades CE de sangre de humanos obtenidas en el Hospital Base de Valdivia en el año 2003^(*) utilizando el mismo método de leucorreducción. En donde los valores promedios obtenidos para el número de eritrocitos en las UST y en la unidad CE fueron de $4,0 \times 10^6$ y $6,3 \times 10^6/\mu\text{l}$, respectivamente. Los valores promedio para el volumen globular fueron de 37% para la UST y de 57% para la unidad CE, mientras que los valores promedio para la hemoglobina fueron 12,4 g/dl para la UST y 19,1 g/dl para la unidad de CE.

Cabe mencionar que el valor de volumen globular más alto obtenido de las unidades CE de sangre de equinos en este estudio fue de 63%, superior al obtenido en humanos de un 61% (Hurtado y col., 2000). Este valor de volumen globular relativamente elevado representa una dificultad al momento de administrar la unidad de CE al paciente receptor, ya que al ser la unidad de CE muy viscosa, se dificulta la transfusión. En estos casos es necesario mezclar la unidad de CE con solución fisiológica para alcanzar una velocidad de transfusión adecuada. Esto a su vez aumenta las posibilidades de contaminación de la unidad por manipulación (Williamson, 1993).

(*) Planilla de control de calidad del sistema de leucorreducción Optisystem II del Banco de Sangre del Hospital Base de Valdivia en el año 2003.

Como era de esperarse, el número de leucocitos en la unidad CE de sangre de equinos fue menor ($p < 0,05$), producto del proceso de leucorreducción a la que fue sometida. Se obtuvo un valor promedio de 450 leucocitos/ μl (Tabla 4), lográndose un 93,4% de reducción en la unidad de CE (Tabla 5). En un estudio con sangre de caninos, realizado en forma paralela a este trabajo, se obtuvo un valor de 790 leucocitos residuales/ μl en la unidad de CE con un porcentaje de leucorreducción similar de 95,5% (Ortiz, 2004).

El porcentaje de leucorreducción alcanzado en este estudio supera las expectativas de lo propuesto por el manual de operación de Optysystem® para sangre humana. Este manual garantiza una leucorreducción entre un 80 y un 90% en sangre humana utilizando el sistema Top and Bottom. Sin embargo estos valores fueron menores que los obtenidos por Brownlee y col. (2000), al leucorreducir sangre de caninos posterior a almacenamiento por 4 horas a 4°C, utilizando un método de filtración. Este aumento en la capacidad de leucorreducción concuerda con Rider y col. (2000), que describe una leucorreducción de un 99% utilizando filtros de tercera generación en sangre humana. Además se describe que la leucodepleción utilizando filtros es significativamente más eficiente al mantener las UST a 4°C por 12 a 18 horas antes de someterla al proceso de leucorreducción (Rapaille y col., 1997).

Las unidades de CE de sangre humana leucorreducidas mediante el sistema Top and Bottom en el Hospital Base de Valdivia, presentan un número promedio de 1.967 leucocitos/ μl (*), similar al descrito por Hurtado y col. (2000) de 1.792 leucocitos/ μl obtenidos con este mismo sistema en sangre humana. Sin embargo, estos valores son mayores a los obtenidos en este trabajo con sangre de equinos. El porcentaje de leucorreducción obtenido por Hurtado y col. (2000), también fue menor a lo obtenido en equinos. En unidades de CE de humanos el porcentaje de leucorreducción fue de 86,3%. Estos resultados demuestran que el método de leucorreducción mediante el sistema Top and Bottom es más eficiente si se procesan UST de sangre de equinos.

La filtración de sangre entera constituye un método de menor complejidad para leucorreducir sangre, sin embargo estos filtros también remueven plaquetas, lo que los hace inadecuados para leucorreducción de sangre entera destinada a producción de plaquetas (Rider y col., 2000). Ha sido demostrado en diferentes estudios que la pérdida de eritrocitos es mayor con el sistema Top and Bottom que con el sistema de filtración, esta pérdida se puede minimizar haciendo ajustes en los parámetros de los sistemas de centrifugación y fraccionamiento (Hurtado y col., 2000).

La definición de leucorreducción según Lombana y col. (2002), es el proceso de remover sobre el 90 % de los leucocitos contenidos en un hemoproducto de un Banco de Sangre de humanos. Este objetivo se cumplió en 9 de las 10 UST, obteniéndose sólo en una, un valor levemente menor (89,1%), por lo que se puede inferir que la leucorreducción de

(*) Planilla de control de calidad del sistema de leucorreducción Optysystem II del Banco de Sangre del Hospital Base de Valdivia en el año 2003.

sangre de equinos mediante el sistema Top and Bottom permite obtener unidades de CE de calidad comparable a las unidades de CE de humanos.

El costo de transfundir un hemoproducto leucorreducido mediante el sistema Top and Bottom es aproximadamente cuatro veces menor al valor de la leucorreducción utilizando un sistema de filtros (Lombana y col., 2002). En el Hospital Base de Valdivia el procesamiento de la unidad de CE, para leucorreducción mediante el sistema Top and Bottom, tiene un costo aproximado de \$22.000, mientras que la leucorreducción mediante un sistema de filtros, actualmente tiene un costo de aproximadamente \$30.000 pesos. Esta situación es importante de tener en consideración en equinos dado el mayor volumen requerido, lo que limita su empleo a animales de mayor valor comercial.

El procesamiento de una UST de sangre de equinos con el sistema Top and Bottom, permite optimizar la utilización de sangre del donante, ya que de una unidad se obtienen tres unidades distintas. Una unidad de concentrado de eritrocitos, una de plasma pobre en plaquetas y una de plaquetas y costra flogística, a partir de la cual se puede obtener un concentrado plaquetario. De esta forma se pueden beneficiar tres receptores a partir de un donante (Hohenhaus y Rentko, 2002). Otra ventaja que permite la obtención de hemoproductos leucorreducidos es que se le administra al paciente sólo el producto que necesita, evitando así una sobrecarga circulatoria y reduciendo al mínimo la exposición a proteínas extrañas para evitar reacciones adversas post transfusión (Cotter y Stone, 1994).

El Consejo Europeo para la Producción y Almacenamiento de Hemoproductos de sangre de humanos recomienda que las unidades de CE de buena calidad deben tener como valores, un volumen globular de 50 a 70 %, una concentración de hemoglobina superior a 9,5 g/dl y un número de leucocitos menor a 2666/ μ l. Al comparar estos valores con los obtenidos de las unidades de CE de sangre de equinos, se observa que este sistema es muy eficiente en esta especie, ya que los valores no sólo se encuentran dentro de los valores de calidad recomendados para la especie humana, sino que también los superan.

6.1. CONCLUSIONES

1. El sistema Top and Bottom permite obtener unidades de concentrado de eritrocitos leucorreducidas entre un 89 a 97%, con un promedio de 93,4%.
2. Las unidades de concentrado de eritrocitos de sangre de equinos procesadas mediante el sistema Top and Bottom, presentaron valores de eritrocitos de $11,1 \pm 1,5/\mu$ l. El volumen globular fue de $57 \pm 8\%$ y la concentración de hemoglobina fue de $18,3 \pm 2,3$ g/dl.

3. Las unidades de sangre total previo a la leucorreducción tenían como promedio 7.000 leucocitos/ μl y después de ser sometidas la sistema Top and Bottom quedaron con 450 leucocitos residuales/ μl .
4. El número de leucocitos por μl de sangre del donante, no influye en el porcentaje de leucorreducción que se puede lograr en la unidad de concentrado de eritrocitos, obtenida al procesar sangre de equinos mediante el sistema Top and Bottom.

7. BIBLIOGRAFÍA

- BANKS, W. 1995. Sangre periférica. En: BANKS, W. *Histología Veterinaria Aplicada*. 2ª ed., El Manual Moderno, México, D.F., México.
- BENAVIDES, M.E. 2000. *Optisystem: Manual de operaciones*. Gráfica y Científica Ltda., Bogotá, Colombia.
- BRAVO, A. 2002. Leucorreducción. ¿Para que? ¿Cuándo? ¿Cómo? *Gac. Méd. Mex.* 138: 40-41.
- BROWNLEE, L., K. WARDROP, R. SELLON, K. MEYERS. 2000. Use of a prestorage leukoreduction filter effectively removes leukocytes from canine whole blood while preserving red blood cell viability. *J. Vet. Intern. Med.* 14: 412-417.
- CLARK, E.S. 1998. Técnicas para la evaluación de las proteínas plasmáticas. En: COLAHAN, P. *Medicina y Cirugía Equina*. 4ª ed., Interamericana, Buenos Aires, Argentina.
- CONTRERAS, M., P.L. MOLLISON. 1994. Complicaciones inmunológicas de la transfusión. En: CONTRERAS, M. *ABC de la Transfusión*. 2ª ed., Publicaciones Técnicas Mediterráneo Ltda., Madrid, España.
- COTTER, S., M. STONE. 1994. Consejos prácticos para las transfusiones. En: KIRCK, R. *Terapéutica Veterinaria de Pequeños Animales*. 11ª ed., Interamericana, México.
- DAVIES, M. 1999. Introducción. In: *Equine Reproductive Phisiology, Breeding and Stud Managment*. CABI Publishing. London, UK.
- DE MULLET, J., S. JANIK, L. CLOUGH. 2003. Overview of Leukoreduction. Online Continuing Education Course for Nursing and Clinical Laboratory Professionals provided by Baxter Healthcare Corporation. Accredited by American Nurses Credentialing Center's Commission on Accreditation.
[www.baxter.com/services/professional_education/iv_therapy_ce/leukoreduction/leukoredaction.html#top]
- DZIK, W. 2002. Leukoreduction of blood components. *Curr. Opin. Hematol.* 9: 521-526.

- FELDMAN, B., W. RUEHL. 1984. Interpreting absolute WBC counts. *Mod. Vet. Pract.* 65: 446 – 449.
- FEIGE, K., B. EHRAT, S. KASTNER, C. SCHWARTZWALD. 2003. Automated plasmapheresis compared with other plasma collection methods in the horse. *J. Vet. Med.* 50: 185-189.
- GARCÍA, A., L. ZAMUDIO, A. AGUILAR. 2003. Terapia de componentes sanguíneos. *Gac.Med.Mex.* 139: 35-40.
- HÖGMAN, C. F., L. ERIKSSON, K. HEDLUND, J. WALLVIK. 1988. The bottom and top system: a new technique for blood component preparation and storage. *Vox Sang.* 55: 211-217.
- HOHENHAUS, A. 2000. Transfusion reactions. In: FELDMAN, B. Schalm's Veterinary Hematology. 5th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, USA.
- HOHENHAUS, A., V. RENTKO. 2002. Transfusiones sanguíneas y sustitutos de la sangre. En: DIBARTOLA, S. Terapéutica de líquidos en pequeñas especies. 2^a ed., McGraw- Hill Interamericana, Iztapalapa, México.
- HURTADO, C., S. BONAND, M. SOLER, V. MIRABET, I. BLASCO, M. PLANELLES, A. DE MIGUEL. 2000. Quality analysis of blood components obtained by automated buffy-coat layer removal with a Top and Bottom system (Optipress® II). *Haematológica.* 85: 390-395.
- KIDD, R. 1991. Interpreting the leukogram: Noninfectious factors that affect leukocyte production. *Vet. Med.* 86:472-479.
- KRAMER, J. 2000. Normal Hematology of the Horse. In: FELDMAN, B. Schalm's Veterinary Hematology. 5th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, USA.
- LANEVSKI, K., J. WARDROP. 2001. Principles of transfusion medicine in small animals. *Can. Vet. J.* 42: 447- 454.
- LOMBANA, O., L. CORTÉS, H. DIEZ. 2002. Evaluación del desarrollo de la refractariedad plaquetaria en pacientes con neoplasias de origen hematológico, transfundidos con concentrado de plaquetas obtenidos por el método de CB- BC en presencia o ausencia de filtros desleucocitarios. *Universitas Scientarum.* 7: 17-22.

- MORRIS, D.D. 1998. Tratamiento de las enfermedades hemolinfáticas. En: COLAHAN, P. Medicina y Cirugía Equina. 4ª ed., Interamericana, Buenos Aires, Argentina.
- MUDGE, M., M. Mc DONALD, S. OWENS, F. TABLIN. 2004. Comparison of 4 blood storage methods in a protocol for equine pre- operative autologous donation. *Vet. Surg.* 33: 475
- ORTIZ, D. 2004. Leucorreducción de sangre de caninos (*Canis familiaris*) para transfusión. Memoria de Título, M.V. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.
- PORTER, M., E. GREEN. 2003. Blood and blood component therapy. In: ROBINSON, N. E. Current Therapy in Equine Medicine. 5th ed., Saunders, Philadelphia, USA.
- RAPAILLE, A., G. MOORE, J. SIQUET, J. FLAMENT, D. SONDAG- THULL. 1997. Prestorage leukocyte reduction with in- line filtration of whole blood : Evaluation of red cells and plasma storage. *Vox Sang.* 73: 28- 35
- RIDER, J., E. WANT, M. WINTER, J. TURTON, D. PAMPHILON, P. NOBES. 2000. Differential leucocyte subpopulation analysis of leucodepleted red cell products. *Transfus. Med.* 10: 49-58.
- SCHALM, O.W., G. P. CARLSON. 1982. The blood and blood forming organs. In: MANSMANN, R. Equine Medicine and Surgery. 3rd ed., American Vet. Publications. California, USA.
- SCHALM, O.W. 1984. Manual of equine hematology. Veterinary Practice Publishing Co. Culver City, Ca, USA.
- SELLON, D. 2000. Blood Transfusions in Large Animals. In: FELDMAN, B. Schalm's Veterinary Hematology. 5th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, USA.
- VOGEL, C. 1997. Manual del Cuidado del Caballo. 2ªed., Artes Gráficas Toledo S.A., España.
- WILLIAMSON, L. 1993. Highlights of blood transfusions in horses. *Compendium on Continuing Education for practicing Veterinarians* . 15: 267-269.
- WITWER, F., CEBALLOS, A. 2001. Generalidades sobre Hematología Veterinaria. Versión 1.0. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. CD-ROM.

ZAMUDIO, L. 2003. Reacciones transfusionales. *Gac.Med.Mex.* 139: 173-175.

8. ANEXO 1

PROCOLO DE BIOSEGURIDAD PARA LA TOMA DE MUESTRAS

1. Realizar anamnesis y examen clínico general del donante.
2. Tomar muestra de sangre (1 ml) con EDTA con jeringa desechable de 21 G por punción de la vena yugular en el lado izquierdo.
3. Realizar un hemograma a la muestra y constatar que todos los valores se encuentren dentro de los rangos correspondientes a la especie.
4. Llevar al donante a un lugar tranquilo.
5. Con ayuda de algún colaborador, se depila la zona a puncionar sobre la vena yugular. Posteriormente se hace aseo de la zona, pasando un algodón con povidona yodada al 1%.
6. Abrir la unidad de recepción y ponerla en una bolsa plástica transparente y limpia. Haciendo una sujeción mecánica del animal, se procede a puncionar la vena yugular haciendo que la sangre entre por gravedad a la unidad de recepción.
7. La unidad de recepción se llenará hasta su máxima capacidad con sangre (450 ml). A partir de este momento pasa a denominarse unidad de sangre total.
8. Antes de sellar la unidad de sangre total (ST), se mueve por última vez para homogenizar la sangre con la solución CPD y tomar una muestra de 1 ml con EDTA, y almacenarla a una temperatura de 4 °C para realizarle, posteriormente, un eritrograma y un leucograma.
9. Marcar la unidad ST con una cinta adhesiva previamente rotulada con el número de ficha del donante.
10. Para mayor seguridad, dibujar una letra E de color azul, para identificar que las muestras pertenecen a equinos.
11. Depositar las bolsas Optipac[®] dentro de una caja termoaislante, para ser transportadas al Hospital Base Valdivia.

12. En el Hospital Base Valdivia, centrifugarla a 3.800 rpm durante 12 minutos a 22°C, con freno en 1, teniendo la precaución de que ninguna tubuladura este en contacto con la unidad ST.
13. Utilizar el equipo Optipress[®] en el programa D, y el ajuste del nivel del sensor en 3.
14. Ajustar el volumen de la costra flogística utilizando la bolsa de calibración (que contiene 90 ml totales de líquido sin aire en su interior). Montar la bolsa de calibración en el equipo Optipress[®] con la etiqueta hacia la pared fija del equipo. Presionar la tecla PRESS y esperar 2 a 3 segundos que encienda la luz de estatus; de no ser así, mover la perilla de ajuste.
15. Montar con precaución la unidad ST centrifugada en los “ganchos” del equipo Optipress[®] manteniendo la etiqueta siempre hacia la pared fija del equipo. Cerrar la tubuladura de la bolsa de plaquetas (nudo corredizo o clamp), y pasar la tubuladura de la bolsa de plasma por el clamp superior y de la bolsa de eritrocitos por el clamp inferior. Abrir el paso de los eritrocitos.

9. AGRADECIMIENTOS

- Primero que todo quisiera agradecer a mi familia por apoyarme y empujarme siempre a ser mejor.
- A Francisco Haro por su paciencia y ayuda en todo.
- A Don Esteban Fried y a la Sra. Magdalena Reinitz por su cariño y preocupación hacia mi.
- Al Dr. Fernando Wittwer por su infinita paciencia y dedicación.
- Al Dr. Hernán Aguilar por hacer los contactos que hicieron posible la realización de este estudio.
- A la Sra. Helga, Sra. Hella y a Atilio por su disposición y ayuda y también por el ambiente tan cordial de trabajo en el laboratorio, que sólo se da con gente como ellos.
- También quisiera agradecer a mis amigos Daniela Ortiz, Sofia Von Furstenberg y Rodrigo Briones por su colaboración desinteresada en la parte práctica de este estudio.
- Al Sr. Reinaldo Denis y a todo el personal del Banco de Sangre por su colaboración.
- Mis agradecimientos van también hacia el Dr. Iván Castelblanco del Haras Carioca, que me facilitó algunos de los caballos utilizados en este estudio.