

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA



**Efecto del tiempo de refrigeración sobre
la estabilidad de componentes sanguíneos
en caninos (*Canis lupus familiaris*)**

TESIS

Para optar por el Título Profesional de Médico Veterinario

Presentada por el Bachiller
JHOSELL GUERSON RENGIFO ZEGARRA

Asesor
Mg. M.V. FERNANDO ALBERTO OBLITAS GUAYÁN

CAJAMARCA

2021

COPYRIGHT © 2021 por
JHOSELL GUERSON RENGIFO ZEGARRA
Todos los derechos reservados



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA
NORTE DE LA UNIVERSIDAD PERUANA
Fundada Por Ley N°14015 Del 13 De Febrero De 1962
UNIVERSIDAD LICENCIADA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
DECANATO

Av. Atahualpa 1050 – Ciudad Universitaria Edificio 2F – 205 Fono 076 365852



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

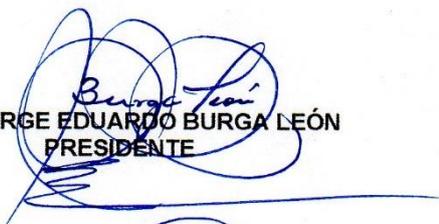
En Cajamarca, siendo las once horas del día siete de julio del dos mil veintiuno, se reunieron virtualmente los integrantes del Jurado Calificador, designados por el Consejo de Facultad, con el objeto de evaluar la sustentación de Tesis Titulada: **“EFECTO DEL TIEMPO DE REFRIGERACIÓN SOBRE LA ESTABILIDAD DE COMPONENTES SANGUÍNEOS EN CANINOS (*Canis lupus familiaris*)”**, asesorada por el docente: Mg. M.V. Fernando Alberto Oblitas Guayán y presentada por el Bachiller en Medicina Veterinaria: **JHOSELL GUERSON RENGIFO ZEGARRA**.

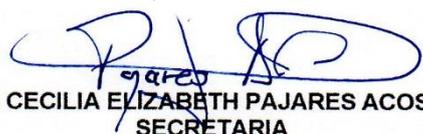
Acto seguido el Presidente del Jurado procedió a dar por iniciada la sustentación virtual y para los efectos del caso se invitó al sustentante a exponer su trabajo.

Concluida la exposición de la Tesis, los miembros del Jurado Calificador formularon las preguntas que consideraron convenientes, relacionadas con el trabajo presentado.

Después de realizar la calificación de acuerdo a las pautas de evaluación señaladas en el Reglamento de Tesis, el Jurado Calificador acordó: **APROBAR** la sustentación de Tesis para optar el Título Profesional de **MÉDICO VETERINARIO**, con el Calificativo Final obtenido de **QUINCE (15)**.

Siendo las doce horas con diez minutos del mismo día, el Presidente del Jurado Calificador dio por concluido el proceso de sustentación.


Dr. JORGE EDUARDO BURGA LEÓN
PRESIDENTE


Dra. CECILIA ELIZABETH PAJARES ACOSTA
SECRETARIA


Dr. GIUSEPPE MARTÍN REYNA COTRINA
VOCAL


Mg. M.V. FERNANDO ALBERTO OBLITAS GUAYÁN
ASESOR



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA
NORTE DE LA UNIVERSIDAD PERUANA

Licenciada el 13 de julio del 2018, Resolución N° 080-2018-SUNEDU/CD

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN

Av. Atahualpa 1050 – Ciudad Universitaria Edificio 2F – 205



“Año del Bicentenario del Perú: 200 años de independencia”

CERTIFICADO DE ORIGINALIDAD

Expido el presente certificado a fin de informar que la Tesis titulada: “Efecto del tiempo de refrigeración sobre la estabilidad de componentes sanguíneos en caninos (*Canis lupus familiaris*)”, corresponde la Autoría Original al Bachiller JHOSELL GUERSON RENGIFO ZEGARRA, como puede corroborarse con el reporte de originalidad presentado por el Asesor M.V. M. Sc. Fernando Alberto Oblitas Guayán, luego de haber sido analizado por el Software antiplagio URKUND, bajo el código D104877934, el cual arroja 6% de coincidencias, por lo que de acuerdo a la normativa vigente de la Universidad Nacional de Cajamarca, procede la sustentación respectiva. Se adjunta al presente el Reporte de Originalidad.

Atentamente,

Cajamarca, 26 de mayo del 2021



Dr. Juan de Dios Rojas
Moncada

Director de la Unidad de
Investigación

DEDICATORIA

A Dios, porque ha estado conmigo a cada paso que doy, cuidándome y dándome fortaleza para continuar, también por permitirme llegar a este momento tan especial de mi vida, por los triunfos y los momentos difíciles que me han enseñado a valorarlo cada día más.

A mis padres Rosita y Edilberto, quienes a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar y educación siendo mi apoyo en todo momento. Depositando su entera confianza en cada reto que se me presentaba sin dudar ni un solo momento en mi inteligencia y capacidad. Es por ello que soy lo que soy ahora. Los amo con mi vida.

A mis hermanos: Edwin, Helbert y Frank, por su cariño y apoyo incondicional, durante todo este proceso, por estar conmigo en todo momento y que con su amor me han enseñado a salir adelante.

JHOSELL

AGRADECIMIENTO

A Dios quien ha forjado mi camino y me ha dirigido por el sendero correcto, el que en todo momento está conmigo ayudándome a aprender de mis errores y a no cometerlos otra vez. Eres quien guía el destino de mi vida.

A la Universidad Nacional de Cajamarca, en particular a la Facultad de Ciencias Veterinarias por los conocimientos adquiridos durante mi carrera profesional.

A mis padres, por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad; muchos de mis logros se los debo a ustedes entre los que se incluye este. Me formaron con reglas y con algunas libertades, pero al final de cuentas, me motivaron constantemente para alcanzar mis anhelos.

A mis hermanos por ser parte infinita de mi vida y representar la unidad familiar. A Edwin por ser un ejemplo de desarrollo profesional a seguir, a Helbert y Frank por llenar mi vida de alegrías y amor cuando más lo he necesitado.

Al Mg. M.V. Fernando Alberto Oblitas Guayán, asesor de esta Tesis, por compartir conmigo sus conocimientos y su permanente apoyo para elaborar el presente trabajo.

¡Gracias a todos!!!

JHOSELL

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTO.....	II
ÍNDICE GENERAL.....	III
ÍNDICE O LISTAS DE TABLAS.....	V
ÍNDICE O LISTA DE FIGURAS.....	VI
RESUMEN.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I	
MARCO TEÓRICO O REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
1.1. Antecedentes de la Investigación.....	3
1.2. Bases teóricas.....	6
1.2.1. Sangre.....	6
1.2.2. Funciones de la sangre.....	7
1.2.3. Características de la sangre.....	8
1.2.4. Componentes de la sangre.....	8
1.2.4.1. Eritrocitos.....	9
1.2.4.1.1. Funciones de los eritrocitos.....	10
1.2.4.1.2. Origen de los eritrocitos.....	10
1.2.4.1.3. Eritropoyesis.....	12
1.2.4.1.4. Regulación de la eritropoyesis.....	12
1.2.4.1.5. Destrucción de los eritrocitos.....	13
1.2.4.2. Hemoglobina.....	14
1.2.4.3. Volumen Corpuscular Aglomerado (VCA) o Hematocrito.....	17
1.2.4.4. Índices Hematimétricos.....	17
1.2.4.4.1. Volumen Corpuscular Medio (VCM).....	17
1.2.4.4.2. Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media (CHCM).....	18
1.2.4.5. Leucocitos.....	19
1.2.4.5.1. Clasificación de los leucocitos.....	20
1.2.4.6. Granulocitos.....	20

1.2.4.7. Neutrófilos.....	20
1.2.4.8. Eosinófilos.....	22
1.2.4.9. Basófilos.....	23
1.2.4.10. Monocitos.....	24
1.2.4.11. Linfocitos.....	25
1.2.5. Métodos de estudio de los eritrocitos.....	27
1.2.5.1 Recuento de los eritrocitos.....	27
1.2.5.2. Dosaje de hemoglobina.....	27
1.2.5.3. Volumen Celular Aglomerado (VCA) o Hematocrito.....	28
1.3. Definición de términos básicos.....	28
CAPÍTULO II	
MARCO METODOLÓGICO.....	30
2.1. Ubicación Geográfica	30
2.2. Diseño de la Investigación.....	31
2.3. Métodos de la Investigación.....	31
2.4. Población, Muestra y Unidad de Análisis.....	32
2.5. Técnicas e instrumentos de recopilación de información.....	33
2.6. Técnicas para el procesamiento y análisis de la información.....	33
2.7. Equipos, materiales e insumos.....	33
CAPÍTULO III	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
3.1. Presentación de resultados.....	36
3.2. Análisis, interpretación y discusión de resultados.....	41
3.3. Contrastación de hipótesis.....	42
CAPÍTULO IV	
CONCLUSIONES.....	43
CAPÍTULO V	
SUGERENCIAS.....	44
REFERENCIAS.....	45
ANEXOS.....	51

ÍNDICE O LISTAS DE TABLAS

Tabla 1. Características meteorológicas y climatológicas anuales de Cajamarca.	30
Tabla 2: Efecto del tiempo de refrigeración (4°C) a 0, 3, 6, 12 y 24 horas sobre la estabilidad de los eritrocitos, hemoglobina y hematocrito.	37
Tabla 3: Efecto del tiempo de refrigeración (4°C) a 0, 3, 6, 12 y 24 horas sobre la estabilidad de los índices eritrocíticos.	38
Tabla 4: Efecto del tiempo de refrigeración (4°C) a 0, 3, 6, 12 y 24 horas sobre la estabilidad de los leucocitos y elementos de la fórmula leucocitaria relativa.	39
Tabla 5: Efecto del tiempo de refrigeración (4°C) a 0, 3, 6, 12 y 24 horas sobre la estabilidad de los elementos de la fórmula leucocitaria absoluta.	40

ÍNDICE O LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Llenado de un tubo capilar con muestra de sangre.....	63
Figura 2: Colocando el tubo capilar en la centrifuga del microhematocrito.....	63
Figura 3: Realizando un Frotis Sanguíneo.....	64
Figura 4: Kit de tinción Hemacolor.....	64
Figura 5: Observacion de muestra en el microscopio.....	65
Figura 6: Observacion a 100X, donde se observa un neutrofilo segmentado.....	65
Figura 7: Observacion a 100X, donde se observa un neutrofilo segmentado y linfocitos.	66
Figura 8: Observacion a 100X, donde se observa un monocito.	66
Figura 9: Observacion a 100X, donde se observa un eosinófilo.....	67

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en la ciudad de Cajamarca, en el laboratorio de la veterinaria Huellitas, en los meses de noviembre y diciembre del 2019, donde se tomaron muestras de sangre de 10 caninos (*Canis lupus familiaris*) clínicamente sanos; el objetivo fue evaluar el efecto del tiempo de refrigeración a partir de una temperatura de 4 °C y tiempos de 0, 3, 6, 12 y 24 horas sobre la estabilidad de componentes sanguíneos (eritrocitos, hemoglobina, hematocrito, leucocitos, VCM, CHCM, fórmula leucocitaria relativa y absoluta). La toma de muestras sanguíneas se realizó mediante venopunción en la vena cefálica, se recolectaron en tubos de 5 ml conteniendo EDTA. Cada muestra fue evaluada 5 veces; el primer análisis se realizó inmediatamente después de extraída la muestra, posteriormente la muestra fue conservada en refrigeración a 4°C para luego ser evaluada a las 3, 6, 12 y 24 horas. Los resultados muestran que la sangre no sufrió variación alguna. Se demostró mediante la fórmula leucocitaria relativa que hubo variación en los linfocitos a partir de las 3 horas de evaluación, incrementándose a las 6 horas ($p>0,05$); y disminución evidente de monocitos a las 6 horas y leve a las 24 horas. Por otro lado, la fórmula leucocitaria absoluta presenta un incremento en la cantidad de los linfocitos a las 6 horas ($p>0,05$) en relación a la 0, 3, 12 y 24 horas similar a lo ocurrido con la fórmula leucocitaria relativa y disminución de monocitos a las 6 y 24 horas. Concluyendo que no se presentaron cambios estadísticos significativos en los parámetros del número de eritrocitos, hemoglobina, hematocrito, índices hematimétricos: VCM, CHCM, HCM, leucocitos, fórmula leucocitaria relativa y absoluta.

Palabras clave: Tiempo de refrigeración, *Canis lupus familiaris*, estabilidad, componentes sanguíneos.

ABSTRACT

The present research work was carried out in the city of Cajamarca, in the Huellitas veterinary laboratory, in the months of November and December 2019, where blood samples were collected from 10 clinically healthy canines (*Canis lupus familiaris*), the objective was to evaluate the effect of refrigeration time from a temperature of 4 ° C and times of 0, 3, 6, 12 and 24 hours on the stability of blood components (erythrocytes, hemoglobin, hematocrit, leukocytes, MCV, MCHC, relative and absolute leukocyte formula). Blood samples were made by venipuncture in the cephalic vein, they were collected in 5 ml tubes containing EDTA. Each sample was evaluated 5 times; the first analysis was carried out immediately after the sample was extracted, later the sample was kept in refrigeration at 4 ° C and then evaluated at 3, 6, 12 and 24 hours. The results show that the blood conserved at 4 ° C in a period of 24 hours and evaluated in several periods of this time, that its erythrocyte components and erythrocytic indices did not undergo any variation. It was demonstrated by the relative leukocyte formula that there was variation in lymphocytes after 3 hours of evaluation, increasing at 6 hours ($p > 0.05$); and evident decrease in monocytes at 6 hours and slight at 24 hours, On. Furthermore, the absolute leukocyte formula shows an increase in the amount of lymphocytes at 6 hours ($p > 0.05$) in relation to 0, 3, 12 and 24 hours similar to what occurred with the relative leukocyte formula and decrease in monocytes at 6 and 24 hours. Concluding that there were not significant statistical changes in the parameters of number of erythrocytes, hemoglobin, hematocrit, hematimetric indices: MCV, MCHC, HCM, leukocytes, relative and absolute leukocyte formula.

Keywords: Refrigeration time, *Canis lupus familiaris*, stability, blood components.

INTRODUCCIÓN

En la rama de la Medicina Veterinaria, se ha incluido al hemograma como un examen de rutina, llegando a considerar que la mayoría de los exámenes clínicos se apoyan de los informes obtenidos por los laboratorios (1). En base a lo descrito, los resultados que se obtengan contarán con respaldo de los controles de calidad garantizando la sensibilidad, especificidad, precisión y exactitud necesaria (1). Cada componente de la sangre necesita condiciones diferentes para mantenerse en buen estado hasta el momento de su utilización. La cadena de frío de la sangre cumple un rol importante para su conservación (2). Dado que la sangre, por ser una sustancia biológica, debe mantenerse fría para reducir la contaminación bacteriana y prolongar su vida útil (3). La información concerniente al tiempo de refrigeración, respecto a la viabilidad de la muestra de sangre, es escasa (4). Al considerar la diversidad de criterios, en cuanto al manejo y conservación de las muestras de sangre total, con énfasis en la realización del hemograma y ante la escasa información respecto al comportamiento de las variables hematológicas en muestras preservadas, el proceso de conservación es muy importante, debido a que los componentes tienen tiempos de vigencia limitados; además de que cada uno precisa de características de conservación específicas (1). En la presente investigación se evaluó el efecto que tiene el tiempo de refrigeración sobre la estabilidad de los componentes sanguíneos (eritrocitos, hematocrito, hemoglobina, leucocitos, índices hematimétricos, fórmula leucocitaria relativa y absoluta). Las variaciones encontradas, permitirá a médicos veterinarios clínicos y de laboratorio contar con una herramienta de apoyo para brindar los resultados claros y precisos de los exámenes hematológicos analizados en muestras conservadas en refrigeración a la

hora 0, a las 3 horas, a las 6 horas, a las 12 horas y a las 24 horas, las cuales servirán de apoyo para un correcto diagnóstico y para realizar un adecuado tratamiento.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO O REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. Antecedentes de la Investigación

Se evaluaron los parámetros hematológicos de sangre refrigerada a 4°C y a temperatura ambiente en el estudio denominado “efectos del almacenamiento de sangre sobre la estabilidad de los parámetros hematológicos”. En sangre refrigerada a 4°C recolectada con anticoagulante se realizó el recuento de leucocitos, hemoglobina, recuento de eritrocitos, volumen corpuscular medio (VCM), hematocrito, hemoglobina corpuscular media, concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) y recuento de plaquetas, estadísticamente no se mostraron cambios significativos luego de estar en almacenamiento en refrigeración por tres días. La sangre almacenada a temperatura ambiente mostró un aumento significativo de VCM en 24 horas, en el hematocrito y en la CHCM se mostraron cambios, concluyendo a partir de estos resultados que la sangre de donantes sanos normales puede servir como un control adecuado para el contador de Coulter durante tres días si se mantiene a 4°C y se mezcla de forma intermitente (5).

Del mismo modo, se compararon los resultados de recuentos de glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas, la concentración de hemoglobina (Hgb) y el VCM antes y después de almacenar la sangre canina a temperatura ambiente durante 24 y 48 horas. La cantidad de 152 muestras con EDTA-K3 de 2 hospitales veterinarios se analizaron dentro de las 4 horas de la recolección; 24 y 48 horas más tarde con

un analizador de hematología Coulter T540. Se comparó los resultados a través de Passing-Bablok, gráficos de diferencia y de acuerdo a su clasificación como normal o anormal según los intervalos de referencia. Se observó que el recuento de glóbulos rojos y la concentración de Hgb estuvieron estables durante el estudio y las diferencias de los recuentos de células variaron con la muestra, sin depender del valor inicial. El VCM aumentó de forma constante durante 2 días. Las muestras conservadas incluso por 2 días son apropiadas para el recuento de células y la medición de Hgb. Sin embargo, las variaciones potenciales deben ser conocidas para evitar interpretaciones erróneas, en particular cerca de los límites de decisión (6).

Por otro lado, en esta investigación se evaluó el efecto del tiempo en la preservación de muestras de sangre de perros y se estudiaron variables como hematocrito, hemoglobina, concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), cómputo de leucocitos y el diferencial leucocitario. Las muestras de sangre fueron extraídas de 40 caninos al azar de distinta raza, canes que fueron atendidos en el Hospital de Especies Menores y Silvestres en Panamá durante el período: agosto del 2007 y mayo del 2008. La sangre se extrajo de la vena cefálica, a través del sistema al vacío y con anticoagulante sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y se conservaron a 4°C. Se empleó métodos manuales convencionales y cada muestra se analizó cuatro veces; el primero se realizó durante la primera hora después de haber tomado la muestra y, seguidamente, a las 24, 48 y 72 horas. En el programa SAS 9,2 se realizó el cálculo de estadísticos descriptivos de cada variable y se comparó la media de cada una en el tiempo, de acuerdo al agrupamiento por terciles de los valores, para evaluar si hay efecto de la concentración y la celularidad. Se mostró diferencias mínimas no

significativas en los resultados a través del tiempo, por lo cual los resultados clínicos y, por ende, un posible diagnóstico clínico errado es improbable, dada la estabilidad de los parámetros hematológicos (1).

En este estudio se evaluó la estabilidad de varios componentes sanguíneos en distintos tiempos y temperaturas. En muestras de suero sanguíneo de 10 perros sanos se determinó colesterol, triglicéridos, proteína total, albúmina, creatinina, urea y actividad de las enzimas aspartato aminotransferasa, alanina aminotransferasa, fosfatasa alcalina, gamma-glutamil transferasa y creatina quinasa, a temperaturas de 25°C, 4°C, -4°C, 20°C y -70°C y se analizaron en períodos de 12 horas, 24 horas, 36 horas, 7 días, 15 días, 30 días, 60 días y 90 días después del muestreo. A 4 °C se mantuvo estable los componentes a diferencia de la actividad de glutamiltransferasa sin embargo, se alteró la actividad de la gamma-glutamil transferasa y la aspartato-aminotransferasa a una temperatura de -70 ° C según el análisis estadístico. Se concluyó que las temperaturas de -4 ° C y -20 ° C son las adecuadas para conservar suero durante 60 y 30 días respectivamente (7).

Por otra parte, se evaluó los efectos del tiempo y temperatura de almacenamiento y la cantidad de anticoagulante sobre los parámetros hematológicos en perros. Se colectó sangre de diez caninos de razas variadas, clínicamente sanos. Las muestras se tomaron con 1,8 mg; 3,6 mg; 7,2 mg y 14,4 mg de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) por ml de sangre, distribuidas en dos grupos: de 2 °C a 8 °C y temperatura ambiente. Después de la recolección, se evaluaron en cuatro tiempos: 0, 12, 24 y 48 horas. Se usó un contador automático, se evaluaron leucocitos, eritrocitos, hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular medio (VCM), índice de anisocitosis eritrocitaria (RDW), plaquetas y plaquetocrito (PCT). El valor del VCM disminuyó en las mayores concentraciones de EDTA

(7,2 mg mL⁻¹ y 14,4 mg mL⁻¹), con una disminución del 2,36% en la mayor concentración. La temperatura y el tiempo de almacenamiento también modificó los parámetros, es decir, hubo decrecimiento en el tiempo 12 horas a la temperatura de 2 a 8°C y aumentó en los tiempos 24 y 48 horas a la hora temperatura ambiente ($P < 0,05$). La temperatura de conservación influyó discretamente en el recuento de leucocitos y eritrocitos, que presentaron valores menores a la temperatura ambiente. Hemoglobina, hematocrito, plaquetas y PCT no presentaron cambios significativos. Los cambios observados no se comprometieron los resultados obtenidos en el contador automático, que muestra que las muestras sanguíneas, conservadas por 48 se mantuvieron en buenas condiciones para el análisis, principalmente cuando se almacenan a una temperatura de 2 a 8°C (8).

1.2. Bases teóricas

1.2.1. Sangre

La sangre es un tejido conectivo adaptado para circular dentro de los vasos, de ahí que su matriz extracelular llamada plasma se hace líquida, es de color rojo y contiene varios tipos de células: los eritrocitos, distintos tipos de leucocitos y las plaquetas (9). Dado que los eritrocitos y las plaquetas no son células completas sino derivados celulares (ambos carecen de núcleo y la plaqueta es un fragmento del citoplasma de una célula no circulante) y las células sanguíneas reciben colectivamente el nombre de elementos figurados (9). La circulación de la sangre a través del cuerpo proporciona un medio ambiente constante, en el que todas las células y tejidos realizan sus diversas funciones; de esta forma, la función principal de la sangre es mantener la homeostasis (10).

La sangre es parte del medio interno del organismo, lo mismo que la linfa y el líquido intersticial; también circula por todo el cuerpo dentro de los vasos sanguíneos, fuera de los cuales coagula, es decir sus células se aglutinan junto con componentes del plasma, y el sobrenadante del coágulo es un líquido amarillento llamado suero (9).

La sangre está compuesta por una parte líquida llamada plasma y otro celular, compuesta de elementos formes, células y fragmentos celulares (11). El plasma es un líquido de color pajizo, formado por agua (75%) y una variedad de sustancias que se encuentran disueltas: elementos nutritivos, desechos, enzimas, hormonas, gases (CO_2 , O_2 , N_2) e iones Na, K, Ca_2 , Mg_2 , Cl, HCO_3 , HPO_4 y SO_4 , de un 5-7% del plasma está constituido por moléculas proteicas entre ellas las proteínas plasmáticas primarias que son: globulina, albuminas y fibrinógeno (11).

La sangre se le considera integrante del tejido conjuntivo porque tiene origen embriológico proveniente del mesénquima, tejido primitivo formado por células indiferenciadas y pluripotentes (células que dependiendo de su código genético específico y del microambiente que las rodea pueden originar células de morfología y funcionalidad distintas) (12)

1.2.2. Funciones de la sangre

La sangre se comporta como un líquido de comunicación vital, entre los distintos tejidos del organismo y entre sus funciones, destacan la distribución de nutrientes desde el intestino a los tejidos; intercambio de gases como transporte de O_2 desde los pulmones hasta los tejidos y de CO_2 desde los tejidos

hasta los pulmones; hemostasia que presenta un mecanismo protector frente a la pérdida de sangre; mantenimiento de la presión osmótica y coloidosmótica y del nivel de hidrogeniones (pH mediante elementos amortiguadores); hemostasis calórica en los animales homeotermos (mantenimiento de la temperatura corporal e interna); transporte de productos de desecho, resultante del metabolismo celular, desde los lugares de producción hasta ser eliminados y transporte de hormonas de las glándulas endocrino hasta los tejidos diana (11).

1.2.3. Características físicas de la sangre

La sangre posee distintas características físicas las cuales se describen a continuación; la sangre es más pesada y viscosa que el agua; su velocidad de flujo es menor que la del agua; la viscosidad o capacidad adhesiva puede comprobarse al tacto; la temperatura es aproximadamente 38 °C, ligeramente superior a la temperatura corporal normal; su pH es ligeramente alcalino, de 7,4 aproximadamente; el promedio de sangre constituye el 8% del peso total del animal (11).

1.2.4. Componentes de la sangre

La sangre está compuesta de células (eritrocitos, leucocitos y plaquetas) que circulan en un líquido llamado plasma; los eritrocitos o glóbulos rojos son los más numerosos, habiendo varios millones de eritrocitos por microlitro de sangre de los mamíferos, sin embargo, dependiendo de la especie los eritrocitos presentan de un cuarto a la mitad del volumen sanguíneo total, esto se mide determinando el hematocrito (4). El recuento total de leucocitos o glóbulos blancos es muy inferior al de los eritrocitos o plaquetas, variando los primeros

de $5 \times 10^3/\mu\text{l}$ a aproximadamente $20 \times 10^3/\mu\text{l}$ en los mamíferos; así también la proporción de tipos de leucocitos presentes varía dependiendo de la especie, siendo los neutrófilos el tipo de leucocitos más numerosos en la sangre de los carnívoros y los linfocitos el más numeroso en la sangre de rumiantes (4).

El plasma consiste principalmente en agua y contiene aproximadamente 6 – 8 g/dL de proteínas plasmáticas y 1,5 g/dL de sales inorgánicas, lípidos, carbohidratos, hormonas y vitaminas; este componente se obtiene en el laboratorio tomando la sangre con anticoagulantes, seguido de una centrifugación para eliminar las células sanguíneas (4). Si se toma la muestra sin anticoagulante y se permite que coagule, el líquido que se obtiene tras la centrifugación se denomina suero. La concentración de proteínas en el suero suele ser 0,2 – 0,5 g/dL inferior, que en el plasma, principalmente por la ausencia de fibrinógeno en el suero, que es consumido en la coagulación; las proteínas séricas pueden separarse mediante electroforesis, en albumina, alfa globulinas, beta globulinas y gama globulinas (4). La albumina es una proteína única que suele ser responsable de cerca de la mitad de las proteínas plasmáticas presentes por peso (4).

1.2.4.1. Eritrocitos

Los eritrocitos de los mamíferos son anucleados, mientras que en el resto de los vertebrados son células rojas nucleadas (13). En las especies domésticas (perro, gato, vaca, caballo, oveja y cabra) han sido encontrados eritrocitos bicóncavos, pero el grado de concavidad varía; los típicos están presentes en los perros, vacas y ovejas, mientras que en los caballos y los gatos los

eritrocitos presentan una concavidad menor, y en la cabra la mayoría de los eritrocitos tiene una ligera depresión en la superficie, mientras que las células rojas de las vacas y ovejas muestran protuberancias (equinocitos) y en los camélidos (camello, alpaca y llama) los eritrocitos tienen forma elíptica, en los equinos se agrupan formando hileras que semejan pilas de monedas (rouleaux), en las aves son nucleados (13).

El diámetro del eritrocito en las diferentes especies varia. En el perro y el cerdo es de 7 μm ; en el felino, 5,8 μm ; en el equino, 5,7 μm ; en el bovino, 5,5 μm y en la cabra de 4 μm (13).

1.2.4.1.1. Funciones de los eritrocitos

La forma bicóncava de los eritrocitos proporciona una superficie grande en relación a su volumen para que se realice su función principal que es el transporte e intercambio de O_2 y CO_2 , tanto en los pulmones como en el resto de los órganos del cuerpo (14).

Otra de las funciones de los eritrocitos es transportar los nutrientes contenidos en el plasma sanguíneo, los nutrientes que están en el hígado y los que proceden del aparato digestivo como glucosa, aminoácidos, lípidos y sales a todas las células del cuerpo. Además, transporta mensajeros químicos como las hormonas, también defienden el cuerpo de las infecciones, gracias a las células de defensa o glóbulos blancos (14).

1.2.4.1.2. Origen de los eritrocitos

En la fase embrionaria las células hematopoyéticas derivan del mesénquima primitivo (saco vitelino) y de la región aorta – gonadal - mesonefros (AGM).

A partir de la sexta semana de vida intrauterina, la hematopoyesis tiene lugar en el hígado, bazo y timo, persistiendo hasta el décimo mes, aunque a lo largo de toda la vida existe una pequeña capacidad hematopoyética, que en circunstancias patológicas es capaz de expresarse, como en la metaplasia mieloide hepatoesplénica. En animales adultos, la hematopoyesis tiene lugar en la médula ósea localizada en los huesos planos del esqueleto axial (cráneo, costillas, esternón, vértebras y pelvis) y en algunas epífisis de los huesos largos (fémur, húmero) (15).

Los progenitores eritroides más primitivos son denominados unidades formadoras de brotes eritroides (BFUE) los cuales tienen una alta tasa de proliferación en respuesta a las citocinas, mientras que los precursores eritroides más maduros, denominados unidades formadoras de colonias eritroide (CFUE) tienen un limitado potencial de proliferación. Estos progenitores son los que dan origen a precursores eritroides como proeritroblastos, eritroblastos basófilos, policromatófilos, ortocromáticos, reticulocitos y hematíes (16).

Para llegar al estadio de eritrocito, las células precursoras pasan por cuatro divisiones celulares, en cerca de cuatro días, durante las cuales se producen cambios a nivel nuclear y citoplasmático. Cada división de la célula lleva a una más pequeña, esta disminución del volumen se debe a la reducción del núcleo y al final la expulsión del mismo (16). En los estadios tempranos de maduración nuclear, la cromatina, está suelta reunida en pequeños agregados, con presencia de nucléolo. Conforme la maduración progresa, la cromatina nuclear se

aglutina, condensándose y haciéndose más basófila, por un proceso llamada picnocirosis, y a nivel de la cuarta división maduracional, la picnocirosis comprime al núcleo y logra eyectarlo dejando sin núcleo al ortocromático, posteriormente se transforma en reticulocito conservando algunas fibras de cromatina, las que se ponen de manifiesto con el azul brillante de cresil y manteniendo una difusa basofilia, la que se conoce como policromatofilia y al final el reticulocito alcanza la circulación, existiendo en la sangre normal hasta un 2% de reticulocitos, la maduración del reticulocito a eritrocito tarda de 24 a 48 horas; durante este tiempo las mitocondrias y los ribosomas desaparecen (16).

1.2.4.1.3. Eritropoyesis

Se ha postulado que la célula indiferenciada pluripotencial en la médula ósea produce células unipotenciales, que posteriormente darán origen a los eritrocitos, granulocitos, monocitos, o a los megacariocitos (13). Los eritrocitos son producidos por división mitótica y maduración de los rubriblastos en una secuencia definida: rubriblasto, prorubicito, rubricito basófilo, rubricito policromático, rubricito normocrómico, metarubicito, reticulocito y eritrocito maduro, por otro lado, cada rubriblasto puede dividirse en tres o cuatro mitosis y dar origen con ello a 8 o hasta 16 células maduras y conforme van madurando, las células se hacen más pequeñas, su núcleo se condensa y su citoplasma cambia de azul oscuro a rojo naranja (13).

1.2.4.1.4. Regulación de la eritropoyesis

El mecanismo por el cual se regula toda esta diferenciación, está controlado por la cantidad de transporte de O₂ a los tejidos, producto de la concentración

de la oxihemoglobina en los hematíes; cuando el O_2 disminuye, la eritropoyesis se incrementa, lo que quiere decir que el O_2 es el sensor de la eritropoyesis (16). Cuando esto ocurre, el riñón produce la eritropoyetina unida a un lípido, ya en el plasma se separa y deja a la eritropoyetina libre, para actuar sobre las células stem-cell de la medula ósea (Mo), junto con la interleucina (IL)-9. A lo largo de esta ruta de diferenciación de la eritropoyesis, la principal citocina es la eritropoyetina (EPO), que actúa como reguladora de la eritropoyesis y es producida por las células renales. La principal actividad de la eritropoyetina (EPO), está dada por el control de la producción de las células eritroides, a través de la diferenciación y maduración y supervivencia de estas células, en la que el O_2 actúa como sensor, es decir cuando disminuye la tensión del O_2 hay un incremento en la producción de eritropoyetina la que va actuar a nivel de la medula ósea (16).

1.2.4.1.5. Destrucción de los eritrocitos

Su vida media varía según la especie, 45 días en el ovino, 115 días en el canino y 160 días en el bovino. En el perro existe un reemplazo de 800,000 eritrocitos por segundo. (17).

La destrucción de los hematíes se puede producir por fraccionamiento, en pedazos suficientemente pequeños, para que sean capturados por el sistema reticuloendotelial, por agotamiento de las enzimas intracelulares haciéndolas frágiles, o rompiéndose fácilmente cuando pasan a través de capilares muy angostos, o incluso pueden ser fagocitados enteros (18).

Poco menos de 1% de la población de eritrocitos será remplazado cada día y los nuevos eritrocitos que aparecen en la circulación aún contienen ribosomas y elementos del retículo endoplásmico (19). El ácido ribonucleico (ARN) de los ribosomas puede detectarse mediante coloraciones idóneas (como azul brillante de cresil), y las células que lo contienen se denominan reticulocitos; normalmente ascienden a alrededor de 1% del recuento eritrocito total (19). El lapso de vida del eritrocito puede estar notoriamente acortado en diversas anemias hemolíticas; en estas enfermedades se observa gran incremento del número de reticulocitos, puesto que la médula ósea intenta compensar la desintegración rápida de eritrocitos al aumentar la cantidad de eritrocitos jóvenes nuevos en la circulación (19).

1.2.4.2. Hemoglobina

La hemoglobina es una proteína grande compuesta de cuatro cadenas polipeptídicas, cada una de las cuales está unida de manera covalente a un grupo hemo (20).

Es una proteína tetramérica de los eritrocitos, transporta O₂ hacia los tejidos, y favorece el transporte de CO₂ y protones hacia los pulmones. La estructura tetramérica de la hemoglobina permite interacciones cooperativas fundamentales para su función, por ejemplo, el 2,3-bisfosfoglicerato (BPG) promueve la liberación eficiente de O₂ al estabilizar la estructura cuaternaria de la desoxihemoglobina. Se usan letras griegas para designar cada subtipo de unidad (19). La composición de subunidad de las hemoglobinas principales son $\alpha_2\beta_2$ (HbA; hemoglobina normal del adulto), $\alpha_2\gamma_2$ (HbF; hemoglobina fetal),

$\alpha_2\beta_2$ (HbS; hemoglobina de células falciformes) y $\alpha_2\delta_2$ (HbA2; una hemoglobina menor del adulto). Se unen cuatro moléculas de O_2 por cada tetramero, uno por cada grupo hemo. Una molécula de O_2 se une a un tetramero de hemoglobina con mayor facilidad si otras moléculas de O_2 ya están unidas; este fenómeno, llamado unión cooperativa, permite a la hemoglobina maximizar tanto la cantidad de O_2 cargada a la PO_2 de los pulmones, como la cantidad de O_2 liberada a la presión parcial de oxígeno PO_2 de los tejidos periféricos (19). Las interacciones cooperativas, una propiedad exclusiva de proteínas multiméricas, tienen importancia crucial para la vida. Además, de transportar O_2 desde los pulmones hacia los tejidos periféricos, la hemoglobina transporta CO_2 , el subproducto de la respiración, y protones, desde los tejidos periféricos hacia los pulmones, además, la hemoglobina porta CO_2 al unirse al nitrógeno amino terminal de las cadenas polipeptídicas de la fracción apoproteica aeróbica (19).

La hemoglobina absorbe oxígeno contenido en el aire de los pulmones con el que forma oxihemoglobina, sustancia que con facilidad libera su oxígeno a los tejidos con el que entra en contacto, y su mayor formación ocurre en la fase del eritrocito denominado normoblasto ortocromático antes de la formación del reticulocito (21).

El dosaje de hemoglobina determina la cantidad de hemoglobina en gramos, presentes en un decilitro de sangre (g/dl), existe variaciones del dosaje de hemoglobina en relación al sexo y edad, debido a que en caninos estos valores

comienzan a disminuir a partir del nacimiento, seguidas de un incremento gradual hasta los cuatro meses (21).

La absorción de hierro, sustancia importante para la formación de hemoglobina, se realiza desde la dieta, lo cual depende de la edad, especie, reservas de hierro, capacidad de eritropoyesis, inflamaciones y preñez, como también la cantidad y la forma química ingerida. Un pequeño porcentaje de hierro en la dieta es absorbido en animales adultos normales, la absorción de hierro ocurre a través de los eritrocitos del duodeno y el yeyuno proximal como ion libre o grupo HEMO por distintos caminos (22).

Químicamente la hemoglobina, es un complejo compuesto orgánico formado por cuatro pigmentos rojos de porfirina (hemes), cada uno de los cuales contiene un átomo de hierro más globina, que es una proteína globular constituida por 4 cadenas de aminoácidos. La hemoglobina absorbe oxígeno contenido en el aire de los pulmones con el que forma oxihemoglobina, sustancia que con facilidad cede su oxígeno a los tejidos con los que entra en contacto (23). Debido a la presencia de hemoglobina, la sangre lleva 60 veces más oxígeno que una cantidad igual de agua en condiciones similares. El oxígeno procedente de los pulmones forma una débil combinación con cada hierro de hemoglobina, y el producto es oxihemoglobina. este proceso es una oxigenación y no una verdadera oxidación, pero para que ocurra se requiere de hierro ferroso en la molécula de hemoglobina. La cantidad de oxígeno combinado es proporcional a la del hierro presente, con dos átomos de oxígeno

combinados con cada uno de hierro. Así cada gramo de hemoglobina podrá transportar 1,34 ml de oxígeno (23).

1.2.4.3. Volumen Celular Aglomerado (VCA) o Hematocrito

El objetivo de medir el hematocrito, es determinar el porcentaje de eritrocitos que circulan por la sangre periférica en el momento de la extracción; es uno de los análisis más frecuentes, ya que es fácil, rápido y extremadamente preciso, proveyendo así mismo de valiosa información sobre los demás componentes sanguíneos (24). Los términos “Volumen Celular Aglomerado” y “hematocrito” son generalmente intercambiables, aunque su significado sea ligeramente distinto. Hematocrito significa “dividir o separar la sangre”, así que de hecho usamos técnicas de hematocrito para determinar el volumen celular aglomerado (24). El auténtico mecanismo de estos análisis es la ley de la gravedad: cuanto más denso es un objeto, caerá más rápidamente. El eritrocito maduro tiene una mayor densidad que los demás componentes de la sangre, y si al extraerla se la deja reposar, los eritrocitos se “aglomeran” en el fondo de una columna de sangre. Debido a la lentitud a la que se produce esta separación (excepto en el caballo), se utiliza una centrifugadora para acelerar el proceso (24).

1.2.4.4. Índices hematimétricos

1.2.4.4.1. Volumen Corpuscular Medio (VCM)

El VCM representa el volumen medio de un único eritrocito en fentolitros. Y se determina de forma más precisa por medición directa, mediante los contadores celulares electrónicos o puede calcularse de forma indirecta dividiendo el hematocrito (HCT) (como un porcentaje), por el recuento de

eritrocitos (RBC) (en millones de células por microlitro) y multiplicándolo por 10, pero este valor calculado es menos preciso, porque se requieren dos mediciones separadas (4). El VCM varía mucho entre especies. Los mamíferos tienen eritrocitos más pequeños que las aves, reptiles o anfibios. Las especies con eritrocitos más grandes, tienen recuentos menores de eritrocitos (RBC), resultando en HCTs similares en mamíferos y aves. Los VCMs pueden variar con la edad, siendo mayores en los caballos viejos y el vacuno, pero, en los caballos de carrera de velocidad, existen ligeros incrementos del VCM (de cerca de 1 fL) (4).

El VCM nos puede indicar la presencia de mastocitos y microcitosis, se puede apreciar a partir de exámenes microscópicos de una extensión en lamina porta; también se puede calcular a partir del hematocrito y el recuento de eritrocitos (25).

1.2.4.4.2. Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media (CHCM)

La concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), representa la concentración media de hemoglobina en los eritrocitos. Se calcula dividiendo el valor de hemoglobina (en gramos por decilitro) por el hematocrito (HCT) (como un porcentaje) y multiplicando por 100. La CHCM se expresa en g/dL de eritrocitos (Nota: Los valores de hemoglobina en sangre se expresan como g/dL de sangre completa) (4). Los intervalos de referencia establecidos por el uso de valores de HCT determinados por contadores celulares electrónicos tienden ser ligeramente superiores a los determinados, empleando los valores

del HCT, medidos por centrifugación por la presencia de pequeñas cantidades de plasma atrapadas en las muestras centrifugadas (4).

1.2.4.5. Leucocitos

Los leucocitos, también llamados células blancas sanguíneas, son las unidades móviles del sistema protector del organismo, corresponden a las diferentes células blancas nucleadas de la sangre que incluyen a los neutrófilos, monocitos, eosinófilos, basófilos y linfocitos; todos ellos participan en mecanismos de defensa, pertenecen a dos sistemas: el sistema fagocítico y el sistema inmunocítico; además, los dos sistemas inmunológicos son funcionalmente interdependientes (27). El sistema fagocítico está formado por los granulocitos y el sistema monocito/macrófago y el sistema inmunocítico está compuesto por linfocitos circulantes T y B (26). Los factores producidos por los monocitos/macrófagos influyen profundamente la función de los linfocitos y diversos productos de los linfocitos, a su vez, influyen la función de los fagocitos (26). Los fagocitos (es decir, granulocitos, sistema monocito/macrófago) constituyen la primera línea de defensa contra los microorganismos invasores; son atraídos a los focos de infección y allí, por un proceso de fagocitosis, ingieren y destruyen bacterias y cualquier otro agente en contacto y, por lo tanto, se puede considerar a los fagocitos como el sistema inmunológico no específico; en contraposición, el sistema inmunocítico constituye el sistema inmunológico específico. Sus células ejecutoras (es decir, los linfocitos T y B) son responsables tanto de la producción de la inmunidad humoral en la forma de anticuerpos dirigidos contra antígenos

específicos, como de la inmunidad celular, al producir citoquinas específicas. (26).

1.2.4.5.1. Clasificación de los leucocitos

Existen cinco tipos de leucocitos en la sangre: Neutrófilos, Eosinófilos, Basófilos (granulocitos), Monocitos y Linfocitos (agranulocitos). Además, hay un gran número de plaquetas, que son fragmentos de otro tipo de célula similar a los leucocitos que se encuentran en la medula ósea, el megacariocito (27).

1.2.4.6. Granulocitos

Se les llama granulocitos o polimorfo nucleares porque contienen gránulos dentro del citoplasma, los cuales son teñidos con los colorantes que se usan por ejemplo (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) (13).

1.2.4.7. Neutrófilos

Los neutrófilos son células fagocíticas móviles del sistema inmunitario innato, constituyen el mayor porcentaje de células blancas en la mayoría de las especies (60-65%), excepto en los rumiantes (20-25%), los neutrófilos tienen una vida en sangre corta (vida media de unas 12 horas), pero en los tejidos su longevidad se incrementa hasta varios días (28).

Emergen al torrente sanguíneo alrededor de 3 a 5 días en el perro, 4 a 6 días en el bovino y 7 a 11 días en el hombre. Son células con un núcleo formado por entre dos y cinco segmentos, unidos por filamentos de cromatina y gránulos en el citoplasma, que toman una coloración neutra (29). La segmentación del núcleo acompaña el envejecimiento de la célula, así los neutrófilos jóvenes

tienen el núcleo aún en forma de bastón no segmentado y son llamados de cayados y los adultos tienen el núcleo formado por varios segmentos unidos por filamentos de cromatina y son llamados segmentados, normalmente menos de 6% de neutrófilos circulantes son bastonetes o inmaduros (29).

Los neutrófilos son esenciales en la defensa contra los microorganismos invasores, en particular bacterias. Para ser eficaces, deben reconocer señales inflamatorias, abandonar la sangre, migrar a través de tejidos hasta un sitio donde haya bacterias y luego neutralizarlas. Los neutrófilos exhiben moléculas de adhesión glucoproteicas sobre sus superficies que son necesarias para diversas funciones dependientes de la adhesión incluyendo la adhesión al endotelio y estructuras subendoteliales, diseminación, quimiotaxis y fagocitosis (4).

Desempeñan una función clave en la inflamación aguda, por ejemplo, cuando entran bacterias en los tejidos, sobrevienen varios fenómenos que se conocen en conjunto como la “respuesta inflamatoria aguda”. Incluyen: aumento de la permeabilidad vascular; entrada de neutrófilos activados en los tejidos; activación de plaquetas, y resolución espontánea si se ha luchado exitosamente con los microorganismos invasores (19).

En caninos presenta un tamaño de 12-15 μm de diámetro, que es de 2 a 2,5 veces el tamaño del eritrocito; su núcleo es lobulado o parcialmente segmentado con cromatina densa, de coloración púrpura oscuro (30). El neutrófilo maduro presenta de 2-4 lobulaciones. Su citoplasma es rosa pálido o azul claro según el tipo y la calidad de la tinción utilizada finamente granular,

liso. La mayoría de los neutrófilos circulantes tienen formas segmentadas, muy pocos tienen forma de bandas (30).

Los neutrófilos en banda tienen un núcleo ligeramente retorcido con forma de U o J y con menos condensación de cromatina que los neutrófilos maduros, la lobulación nuclear está ausente o pobremente definida, además, las constricciones en el núcleo de los neutrófilos en banda suponen menos de la mitad del ancho del resto del núcleo (31).

Dentro de la morfología normal del neutrófilo canino podemos encontrar cuerpos de Barr, los cuales se describen como un pequeño apéndice del núcleo, correspondiente a una lobulación sexual, indicando que el animal es una hembra (30).

1.2.4.8. Eosinófilos

Los granulocitos eosinófilos representan el 2% del total de leucocitos circulantes; una vez producidos en la médula ósea, los eosinófilos quedan almacenados durante varios días antes de ser liberados a la circulación en donde permanecen 3 - 8 horas antes de emigrar a los lugares donde son necesarios, preferentemente la piel y los sistemas respiratorio y digestivo (32). El número de eosinófilos circulantes muestra una variación marcada a lo largo del día, siendo máximo en la mañana y mínimo en el atardecer (32).

Son fagocitos, es decir, que son capaces de ingerir partículas extrañas sólidas, y parecen desempeñar un papel importante frente a infecciones por helmintos, estos microorganismos son demasiado grandes para ser fagocitados por una

sola célula, los eosinófilos secretan unas proteínas que atacan la membrana externa de los parásitos y los inactivan o los destruyen (32). La infección por parásitos determina una sobreproducción mantenida de eosinófilos. También pueden funcionar para localizar y anular el efecto destructivo de las reacciones alérgicas, causado por la liberación de sustancias contenidas en los gránulos de los mastocitos (como la histamina), mediante la producción de un factor que inhibe la desgranulación de los mastocitos. Los eosinófilos son atraídos hasta los lugares de inflamación por unas sustancias químicas liberadas por los mastocitos. De modo que la exposición de individuos alérgicos a su alérgeno, provoca un aumento transitorio del número de eosinófilos (eosinofilia) (32).

Los eosinófilos caninos tienen un tamaño de 12-20 μm de diámetro, parecido o ligeramente mayor que un neutrófilo y tienen un núcleo lobulado o parcialmente segmentado con la cromatina densa, purpura oscuro muy similar al de los neutrófilos, pero los segmentos a menudo no están tan definidos (26)

Presentan gránulos citoplasmáticos naranja-rojizos durante la tinción con eosina, redondos variables en tamaño y número y también aparecen en el citoplasma múltiples vacuolas de tamaños variados, en ocasiones los eosinófilos caninos pueden contener un único gránulo grande y redondo que recuerda en tamaño y forma a un eritrocito (26).

1.2.4.9. Basófilos

Los basófilos caninos tienen un tamaño de 12-20 μm en diámetro, similar o ligeramente mayor que un neutrófilo y el citoplasma de los basófilos es generalmente azul pálido-purpura, el núcleo usualmente es menos segmentado

que el del neutrófilo, así también, los gránulos en los basófilos caninos generalmente aparecen morados y no son lo suficientemente numerosos como para llenar el citoplasma incluso pueden estar ausentes (26).

Los basófilos desgranulados tienen un citoplasma azul en ausencia de los gránulos, pero, en otras especies es difícil identificar con certeza basófilos en banda pues los gránulos ocultan u oscurecen el núcleo, esto es menos frecuente en los perros (26).

1.2.4.10. Monocitos

Son grandes células sanguíneas con capacidad fagocítica intensa, que viajan por la sangre hasta los tejidos, donde se forma una línea armada de vigilancia contra la infección, transformándose en células especiales llamadas macrófago (33). Representan el 5% de los leucocitos de la sangre y tienen su origen en alguna parte del sistema reticuloendotelial; sus enzimas entran en acción contra los agentes patógenos más peligrosos, como los que provocan reacción inflamatoria granulomatosa y también suelen ser numerosos en procesos infecciosos crónicos en los que hay que eliminar detritus tisulares. mide entre 12 y 18 micras (33, 34).

Cuando los monocitos se trasladan a los tejidos, se denominan macrófagos, pues expresan numerosos receptores de superficie, que incluyen antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo I y II (CMH de clases I y II), los cuales juegan un papel primordial en el reconocimiento y la presentación de antígenos (28). Los macrófagos difieren en su morfología según los tejidos,

y así se denominan de diferentes maneras; por ejemplo, en los órganos linfoides estas células son macrófagos, mientras que en el hígado se conocen como células de Kupffer (28). Los macrófagos derivan de células hematopoyéticas de la médula ósea e inicialmente se denominan monoblastos, los cuales maduran y se dirigen hacia la circulación, conociéndose entonces como monocitos. Los macrófagos son más grandes que los neutrófilos y disponen de un retículo endoplásmico rugoso y un aparato de Golgi desarrollados, lo cual indica su gran capacidad para producir y secretar proteínas inmunorreguladoras (28).

Los monocitos en el canino tienen un tamaño de 15-20 μm , son ligeramente mayores a los linfocitos. Su núcleo es de forma irregular, con cromatina ligeramente reticulada (26).

Los núcleos de los monocitos caninos frecuentemente tienen forma de banda por lo que pueden ser confundidos con neutrófilos en banda y por su color, con neutrófilos con cambio tóxico. Un criterio que ayuda a diferenciarlos es que los extremos del núcleo de los monocitos están agrandados y con forma de perilla. El citoplasma de los monocitos caninos es abundante, de gris a azul-grisáceo (26).

1.2.4.11. Linfocitos

Los linfocitos representan un grupo heterogéneo de células tanto morfológicas como funcionalmente y son la base en el desencadenamiento y ejecución de la respuesta inmune también, se producen en la médula ósea, en los órganos linfoides como el timo, los nódulos linfáticos y bazo, además de los tejidos

linfoides viscerales, que incluyen las placas de Peyer, las amígdalas y apéndices (35). La médula ósea en los mamíferos es el mayor órgano linfopoyético; sin embargo, excepto en el suministro de precursores linfoides para la colonización de los órganos linfoides periféricos, la linfopoyesis en la médula ósea y el timo es ineficaz (35).

Durante la vida intrauterina a la célula madre pluripotencial indiferenciada se origina primero del saco vitelino y después del hígado, bazo y médula ósea fetales, además, bajo la influencia de un adecuado microambiente y otros estímulos, estos progenitores linfoides originados en médula ósea continuamente colonizan los órganos linfoides primarios - Bursa de Fabricio en las aves o médula ósea en los mamíferos, y el timo (35). Estas células entonces migran a los órganos linfoides secundarios o periféricos (como los nódulos linfáticos y bazos), donde se encuentran preferentemente localizadas en porciones típicas y dan inicio, en respuesta al estímulo antigénico apropiado, a la proliferación de subseries inmunocompetentes de linfocitos T o B (35). El tiempo de producción de los linfocitos se estima entre 6 y 8 horas, y en algunos casos pueden ser menos de 2 horas. El número de mitosis implicado varía con el tipo celular (6 a 8 horas para las células T y 2 a 3 horas para B); se menciona que la linfopoyesis es estimulada por la exposición antigénica y deprimida por corticoides, hormonas sexuales y malnutrición (35).

1.2.5. Métodos de estudios de los eritrocitos

1.2.5.1. Recuento de los eritrocitos

Determina la cantidad de eritrocitos por unidad de volumen (mm^3 o L) de sangre (24). El método manual más usado es el recuento en cámara de Neubauer que consta de una gruesa placa de cristal, en la que hay dos plataformas centrales elevadas rodeadas por un surco y cuenta con unos bastidores al lado del foso, diseñado para sostener una cubierta de cristal 0,1 mm por encima del nivel de las plataformas (24).

1.2.5.2. Dosaje de hemoglobina

La hemoglobina es el componente principal de los eritrocitos, representa el 32% de la masa total del eritrocito y es el mejor índice para medir la capacidad de transporte de gases de la sangre (36).

El dosaje de hemoglobina determina la cantidad de hemoglobina que se expresa en gramos por decilitros (g/dL) (11). Existen diversas técnicas, siendo la más empleada por su rapidez, exactitud y facilidad el método colorimétrico de la cianometahemoglobina el cual nos permite determinar la concentración de Hb que aumenta en las policitemias y disminuye en las anemias (11).

La relación hemoglobina – hematocrito, consiste en calcular el valor de la hemoglobina al dividir el hematocrito entre un factor, usualmente entre 3 y la relación inversa de obtener hematocrito a partir de multiplicar la concentración de hemoglobina por este factor (36).

La creencia de que el valor de hematocrito es equivalente a 3 veces la concentración de hemoglobina, es una proporción matemática que solo se cumple en los individuos “normales”, con valores “normales” de hemoglobina y hematocrito, y eritrocitos “normocíticos normocrómicos” (36).

1.2.5.3. Volumen Celular Aglomerado (VCA) o hematocrito

Corresponde al volumen porcentual que ocupan los eritrocitos en la sangre, el cual en los mamíferos fluctúa entre 28% a 45%; su valor depende directamente del número de eritrocitos y de su tamaño. El VCA se determina mediante centrifugación durante 5 minutos a 12,000 revoluciones por minuto (RPM) de un volumen de sangre depositado en un tubo capilar, mediante el método de microhematocrito (11).

El hematocrito aumenta en las policitemias y disminuye en las anemias, constituyendo la prueba aislada más útil en hematología por la información que entrega, su facilidad, costo, precisión y exactitud (11).

1.3. Definición de términos básicos

Sangre: La sangre se define como un líquido viscoso de color rojo, también se le conoce como un tejido circulante especializado, compuesto de células suspendidas en una sustancia intracelular líquida; a diferencia de otros tejidos, las células no conservan una relación especial permanente entre sí, lo que se mueve continuamente de un lugar a otro (10).

Índices hematimétricos: Los índices hematimétricos son los parámetros que relacionan el hematocrito, el número de eritrocitos y la concentración de

hemoglobina. Estos índices eritrocíticos definen el tamaño y el contenido de hemoglobina del eritrocito de valores obtenidos por la cuenta eritrocítica, la concentración de hemoglobina y el hematocrito; estos índices son obtenidos mediante cálculos matemáticos y son los siguientes: volumen corpuscular medio, concentración de hemoglobina corpuscular media (37).

Volumen corpuscular medio (VCM): Es el índice hematimétrico que se expresa en fentolitros (fl). Indica el tamaño de los eritrocitos. Se calcula a partir del hematocrito y del número de eritrocitos, mediante la fórmula (24).

$$VCM = \frac{VGA(\text{Números enteros}) \times 10}{\text{Recuento Total de GR}(\text{millones/mm}^3)}$$

Concentración de hemoglobina corpuscular media CHCM: Es aquel índice se expresa en gramos sobre decilitro (g/dl). Corresponde a la concentración de hemoglobina en 1 decilitro, se calcula a partir de la concentración de hemoglobina y el valor del hematocrito, mediante la siguiente fórmula (24).

$$CHCM = \frac{\text{Hemoglobina}(\text{g/dl}) \times 100}{VGA(\text{Números enteros})}$$

CAPÍTULO II

MARCO METODOLÓGICO

2.1. Ubicación Geográfica

El presente trabajo de investigación se realizó en el departamento de Cajamarca, provincia de Cajamarca, ciudad de Cajamarca, que se encuentra en la región altoandina del Perú, en el laboratorio de la Veterinaria Huellitas, ubicada en Vía de Evitamiento Norte 2230 – Cajamarca, la cual cuenta con un laboratorio de Análisis Clínicos para animales mayores y menores, donde se realizó el examen clínico y los análisis correspondientes.

Tabla 1. Características meteorológicas y climatológicas anuales de Cajamarca.

Altitud	2750 msnm
Latitud sur	7° 09' 8"
Longitud oeste	78° 29' 29"
Clima	templado seco
Temperatura promedio	14,20°C
Temperatura mínima promedio	6,40°C
Temperatura máxima promedio	21,60°C
Precipitación pluvial	795 mm
Humedad relativa promedio	75 %
Presión barométrica	745,34 hPa

Fuente: Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología Cajamarca (40)

2.2. Diseño de la Investigación

Según el problema propuesto y los objetivos planteados, la presente investigación es de diseño no experimental.

Se realizó la toma de las muestras de sangre de los 10 caninos a evaluar. Los parámetros evaluados fueron: Recuento de eritrocitos y leucocitos; Volumen Globular Aglomerado (Hematocrito); Dosaje de Hemoglobina: Índices hematimétricos (VCM y CHCM); Recuento diferencial relativo (%) y absoluto: Se utilizó un análisis de varianza completamente al azar y para la significancia una prueba de Tukey.

2.3. Métodos de la Investigación

La presente investigación se basó en el método de investigación empírico.

Para la toma de muestra los caninos fueron trasladados a la Veterinaria Huellitas, en donde se realizó la anamnesis, el examen clínico, al determinar que los caninos estaban sanos y después del consentimiento informado dado por sus propietarios (Anexo 8) se realizó la toma de muestra de sangre, a los caninos que se les realizó este procedimiento se les registró en una ficha clínica (Anexo 9).

Para la extracción de sangre, se procedió a desinfectar la zona de donde se debía tomar la muestra (vena cefálica) con alcohol y algodón. La sangre se recolectó en tubos de 5 mL, conteniendo anticoagulante EDTA mediante el sistema de extracción al vacío, se agitó lentamente para formar una mezcla homogénea y así evitar la formación de coágulos y aglutinaciones.

Parte de la muestra fue analizada inmediatamente y el resto se le sometió a refrigeración a una temperatura de 4 ° C, para ser analizados transcurridos el tiempo de 3 horas, 6 horas, 12 horas y 24 horas, los resultados obtenidos fueron comparados con el primer análisis realizado.

Se analizaron los siguientes parámetros:

Recuento de eritrocitos y leucocitos: Se utilizó el Método Hemocitométrico. (Anexo 1 y Anexo 2); Volumen Globular Aglomerado (Hematocrito): Con el Método del Microhematocrito. (Anexo 3); Dosaje de Hemoglobina: Se realizó mediante conteo matemático (Anexo 4); Índices hematimétricos (VCM y CHCM): método matemático (Anexo 5); Recuento diferencial relativo (%) y absoluto: frotis sanguíneo y método matemático (Anexo 6 y Anexo 7).

2.4. Población, Muestra y Unidad de Análisis

2.4.1. Población:

La población estuvo constituida por todos los caninos que llegaron al laboratorio de la Veterinaria Huellitas en los meses de noviembre y diciembre del año 2019 en la ciudad de Cajamarca.

2.4.2. Muestra:

La muestra estuvo constituida por 10 caninos clínicamente sanos que llegaron al laboratorio de la Veterinaria Huellitas en los meses de noviembre y diciembre del año 2019 en la ciudad de Cajamarca.

2.4.3. Unidad de Análisis:

La unidad de análisis estuvo constituida por cada una de las muestras de sangre provenientes de los 10 caninos que llegaron al laboratorio de la Veterinaria Huellitas en los meses de noviembre y diciembre del año 2019 en la ciudad de Cajamarca.

2.5. Técnicas e instrumentos de recopilación de información

2.5.1. Ficha Clínica

En esta ficha se recopilaron datos de paciente como nombre, especie, sexo, raza, color, entre otros, así como signos clínicos como peso, temperatura, entre otros. Además de los datos de propietario del animal (Anexo 9).

2.6. Técnicas para el procesamiento y análisis de la información

Para la colección de la información obtenida se realizó una base de datos en el programa Excel, el procesamiento de datos fue realizado mediante análisis descriptivo, y las frecuencias se realizaron en un programa estadístico. Los resultados obtenidos durante el desarrollo del presente trabajo de investigación se evaluaron mediante un análisis de varianza completamente al azar y para la significancia una prueba de Turkey.

2.7. Equipos, materiales e insumos

2.7.1. Material biológico

El presente estudio se realizó con muestras de sangre obtenidas de 10 caninos indistintamente de raza, sexo, edad; en tubos con tapa de color lila que contienen anticoagulante ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

La determinación de la condición de caninos clínicamente sanos se realizó evaluando las constantes fisiológicas y comparándolas con las establecidas para esta especie, como son: frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, llenado capilar, temperatura y condición corporal y además que hayan sido desparasitados en un plazo igual o mayor a 15 días antes de la toma de muestra.

Los animales que no cumplían con estos requisitos no fueron considerados dentro del estudio.

2.7.2. Materiales y equipos de laboratorio

2.7.2.1. Materiales de laboratorio

- ✓ Tubos de ensayo al vacío con anticoagulante EDTA
- ✓ Tubo de goma y boquilla de caucho
- ✓ Tabla para lectura de microhematocrito
- ✓ Tubos capilares heparinizados y plastilina
- ✓ Gradillas
- ✓ Láminas porta objetos
- ✓ Mascarillas, guantes y mandil
- ✓ Pipetas de Thoma para leucocitos (glóbulos blancos)
- ✓ Pipetas de Thoma para eritrocitos (glóbulos rojos)
- ✓ Papel filtro
- ✓ Alcohol
- ✓ Algodón
- ✓ Termómetro
- ✓ Estetoscopio

- ✓ Termómetro para refrigeradora

2.7.2.2. Equipos de laboratorio

- ✓ Microscopio binocular con fuente de luz incorporada
- ✓ Cámara de Neubauer
- ✓ Refrigeradora
- ✓ Equipo para extracción de sangre (sistema al vacío): soporte y agujas de 18 G x 1,5"
- ✓ Centrífuga para el hematocrito, marca Heltich, Modelo Haematokrit 210.

2.7.3. Materiales de campo

- ✓ Cuaderno de apuntes
- ✓ Lapicero
- ✓ Cámara fotográfica

2.7.4. Reactivos

- ✓ Solución de Gower
- ✓ Solución de ácido acético al 1%
- ✓ Kit de tinción Hemacolor
- ✓ Agua destilada

2.7.5. Materiales de escritorio

- ✓ Laptop
- ✓ Papel bond A4
- ✓ Fólderes
- ✓ Lapiceros y marcadores

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Presentación de resultados

Las tablas N° 1 y 2 muestran que la sangre conservada en un periodo de 24 horas a una temperatura de $+4^{\circ}\text{C}$ y evaluada en varios periodos de este tiempo, que sus componentes eritrocitarios, Hb, Ht, e índices eritrocíticos no han tenido ninguna variación. De igual manera, las tablas N° 3 y 4 indican que la fórmula leucocitaria relativa presenta variación en los linfocitos a partir de las 3 horas de evaluación, incrementándose a las 6 horas ($p>0,05$) con respecto a las 0, 3, 12 y 24 horas; y disminución evidente de monocitos a las 6 horas y leve a las 24 horas. Por otro lado, la fórmula leucocitaria absoluta presenta un incremento en la cantidad de los linfocitos a las 6 horas ($p>0,05$) en relación a la 0, 3, 12 y 24 horas similar a lo ocurrido con la fórmula leucocitaria relativa y disminución de monocitos a las 6 y 24 horas.

Tabla 2: Efecto del tiempo de refrigeración (4°C) a 0, 3, 6, 12 y 24 horas sobre la estabilidad de los eritrocitos, hemoglobina y hematocrito.

VARIABLES						
Tiempo (Horas)	Eritrocitos		Hemoglobina (Hb)		Hematocrito (Ht)	
	(10 ¹² /L)		(g/dL)		(%)	
	X ± DE	C.V.	X ± DE	C.V.	X ± DE	C.V.
0	7,7 ± 2,9 a	37,4	14,8 ± 1,3 a	9,0	46,8 ± 4,0 a	8,5
3	5,9 ± 7,4 a	12,5	14,4 ± 1,4 a	9,8	45,6 ± 4,2 a	9,3
6	5,6 ± 5,0 a	8,9	14,4 ± 1,2 a	8,3	45,7 ± 3,6 a	7,9
12	6,2 ± 13,0 a	21,0	14,2 ± 1,3 a	9,4	45,1 ± 4,0 a	8,8
24	6,9 ± 18,6 a	27,2	15,0 ± 2,3 a	15,2	47,3 ± 6,9 a	14,5

Fuente: Elaboración propia

Tabla 3: Efecto del tiempo de refrigeración (4°C) a 0, 3, 6, 12 y 24 horas sobre la estabilidad de los índices eritrocíticos.

Tiempo (Horas)	VARIABLES					
	VCM		CHCM		HCM	
	(fL)		(%)		(pg)	
	X ± DE	C.V.	X ± DE	C.V.	X ± DE	C.V.
0	65,7 ± 15,2 a	23,1	31,6 ± 0,2 a	0,5	18,3 ± 4,6 a	25,1
3	78,4 ± 14,4 a	18,4	31,6 ± 0,2 a	0,6	22,2 ± 3,1 a	13,9
6	81,7 ± 9,9 a	12,2	31,6 ± 0,1 a	0,4	23,3 ± 3,6 a	15,4
12	74,9 ± 13,7 a	18,2	31,5 ± 0,2 a	0,6	21,7 ± 4,5 a	20,8
24	71,9 ± 15,0 a	20,9	31,6 ± 0,2 a	0,7	20,2 ± 5,0 a	24,9

Fuente: Elaboración propia

Tabla 4: Efecto del tiempo de refrigeración (4°C) a 0, 3, 6, 12 y 24 horas sobre la estabilidad de los leucocitos y elementos de la fórmula leucocitaria relativa.

VARIABLES (%)														
Tiempo	Leucocitos		N. segmentados		N. baciliformes		Eosinófilos		Basófilos		Linfocitos		Monocitos	
Horas	x ± DE	CV	x ± DE	CV	x ± DE	CV	x ± DE	CV	x ± DE	CV	x ± DE	CV	x ± DE	CV
0	10,7±0,9 a	8,1	63,4±6,3 a	9,9	2,1±1,1 a	52,4	1,2±1,5 a	122,9	0,7±0,8 a	117,6	30,5±4,0 a	13,2	2,1±1,7 a	82,3
3	10,2±1,6 a	15,4	66,1± 5,9 a	8,9	1,5±0,9 a	56,7	0,6±1,0 a	161,0	0,3±0,5 a	161,0	29,3±5,9 a	20,0	2,2±0,6 a	28,8
6	11,1±1,6 a	15,8	65,1±6,0 a	9,2	1,4±1,4 a	96,4	0,5±0,5 a	105,4	0,3±0,5 a	161,0	31,9 ±6,9 a	21,5	0,8±0,8 b	98,6
12	9,6±1,3 a	13,0	66,5±6,1 a	9,2	1,8 ±1,0 a	57,4	0,3±0,5 a	161,0	0,5 ±0,7 a	141,4	28,9±5,6 ab	19,2	1,9±1,2 a	63,0
24	9,4± 1,7 a	17,8	72,1 ± 6,0 a	8,3	1,2± 0,4 a	35,1	0,7±0,5 a	69,0	0,6 ±0,5 a	86,1	24,1±5,5 b	22,9	1,4±1,7 ab	49,9

Letras iguales en columna = p >0,05 **Fuente:** Elaboración propia.

Tabla 5: Efecto del tiempo de refrigeración (4°C) a 0, 3, 6, 12 y 24 horas sobre la estabilidad de los elementos de la fórmula leucocitaria absoluta.

VARIABLES (10 ⁹ /L)												
Tiempo	N. segmentados		N. baciliformes		Eosinófilos		Basófilos		Linfocitos		Monocitos	
Horas	x ± DE	CV	x ± DE	CV	x ± DE	CV	x ± DE	CV	x ± DE	CV	x ± DE	CV
0	6,8±0,9 a	13,	0,2±0,1 a	55,3	0,1±0,2 a	125,1	0,08±0,9 a	121,4	3,3±0,5 ab	13,8	0,2±0,2 a	74,9
3	6,8±1,4 a	20,8	0,1± 0,09 a	58,9	0,07±0,1 a	163,6	0,03±0,5 a	161,5	3,0±0,7 ab	22,0	0,2±0,07 a	32,0
6	7,3±1,7 a	23,1	2,1±1,6 a	101,7	0,06±0,6 a	107,6	0,04±0,6 a	162,3	3,5±0,6 a	17,2	0,09 ±0,09 b	101,1
12	6,4±0,9 a	14,5	0,2±0,1 a	60,1	0,03 ±0,5 a	161,3	0,05±0,7 a	144,6	2,8 ±0,7 b	24,7	0,2±0,1 a	66,4
24	6,8± 1,4 a	21,1	0,1 ± 0,05 a	43,9	0,6± 0,5 a	72,2	0,05±0,5 a	90,0	2,2 ±0,6 c	27,2	0,1±0,7 ab	55,8

Letras iguales en columna = p >0,05 **Fuente:** Elaboración propia

3.2. Análisis, interpretación y discusión de resultados

En este trabajo, el efecto del tiempo de refrigeración a 0, 3, 6, 12 y 24 horas sobre la duración del número de eritrocitos, hemoglobina, hematocrito e índices eritrocíticos no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$), incluso a las 24 horas de refrigeración. Los resultados obtenidos en este trabajo sobre la conservación de la sangre en varios periodos de tiempo, coinciden con los resultados de otras investigaciones en las cuales se mostraron diferencias mínimas no significativas en las células sanguíneas y parámetros hematológicos durante el tiempo de 72 horas (1). Es posible que los pequeños cambios producidos se asocien a factores intrínsecos y técnicos de los métodos analíticos, pero no estarían relacionados a cambios sustanciales en la composición de la sangre (1,6,41). En este trabajo se utilizó un protocolo y el uso de anticoagulante EDTA para la toma de muestra de sangre que influye de alguna manera en la conservación de la sangre debido a que se obtuvo resultados no significativos en las variables hematológicas. Así también, se recolectó la cantidad exacta de sangre que especifica el tubo con anticoagulante, se almacenó las muestras a 4°C y se procesaron en condiciones hospitalarias, todas estas acciones de cierta forma contribuyen a que se conserve los componentes hematológicos. En otros estudios se ha demostrado que el recuento de glóbulos rojos y la concentración de hemoglobina son las variables más estables en sangre de caninos debido a que no se han mencionado alteraciones antes de un periodo mínimo de 48 a 65 horas en refrigeración (1,6), teniendo concordancia con los resultados de este trabajo porque no variaron estos dos parámetros de manera significativa. Los recuentos de glóbulos blancos se mantuvieron casi constantes en las diferentes temperaturas. Los resultados de estudios similares son variables. En comparación con un estudio, los glóbulos

blancos se mantuvieron estables hasta una temperatura de 60 °C (41) sin embargo, en otras investigaciones inicialmente los glóbulos blancos notaron un aumento relativo, mientras que después de 72 h el número total de glóbulos blancos disminuyó (4,42).

3.3. Contrastación de hipótesis

A partir de la prueba estadística escogida y con la obtención de un $p > 0.05$ concluimos que no se rechaza la hipótesis nula, por lo tanto, no existen diferencias significativas u efectos en las muestras de sangre según los diferentes tiempos de refrigeración con lo que se trabajó en esta investigación.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES

Se concluye que:

1. Los efectos que causa la refrigeración de la sangre a 4°C en un tiempo de 0, 3, 6, 12, 24 horas sobre la estabilidad de eritrocitos hemoglobina y hematocrito no son significativos.
2. Los efectos que causa la refrigeración de la sangre a 4°C en un tiempo de 0, 3, 6, 12, 24 horas sobre la estabilidad de leucocitos no es significativo.
3. Los efectos que causa la refrigeración de la sangre a 4°C en un tiempo de 0, 3, 6, 12, 24 horas sobre la estabilidad de los índices hematimétricos (VCM, CHCM) no son significativos.
4. Los efectos que causa la refrigeración de la sangre a 4°C en un tiempo de 0, 3, 6, 12, 24 horas sobre la estabilidad de la fórmula leucocitaria relativa y absoluta no son significativos.

Por lo tanto, los hemogramas realizados dentro de las 24 horas después de tomada la muestra y que ésta haya sido refrigerada, cuentan con el respaldo y la calidad que garantiza que los resultados no tienen cambios significativos, por lo que siguen siendo válidos.

CAPÍTULO V

SUGERENCIAS

Se sugiere seguir realizando investigaciones en este tema debido a que no existe mucha información sobre los efectos que causaría en los componentes de la sangre la refrigeración de ésta por más de 48 horas, lo cual es tema de gran importancia para el ámbito de la medicina veterinaria.

De la misma manera, se recomienda realizar estudios en cuanto al grado de temperatura en la que las muestras de sangre pueden ser guardadas.

REFERENCIAS

1. Meneses A, Bouza L, Romero J. Efecto del tiempo sobre la estabilidad de variables hematológicas en muestras de sangre de caninos. Rev. Ciencias Veterinarias [Internet] 2010 [consultado 2019 sep 15]; 28 (1), p 37 – 44. Disponible en: <https://www.revistas.una.ac.cr/index.php/veterinaria/article/view/5426/5258>
2. OMS. La cadena de frío de la sangre. Guía para la selección y adquisición de equipos y accesorios [Internet]. Ginebra: Organización mundial de la salud. 2004 consultado 2019 sep 15]. Pág. 1 – 2. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42829/9243545795.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
3. Danahé San Juan. Mundo HVAC&R. El frío y la sangre. Preservando la vida [Internet]. Editorial Puntual Media, 2018 [Consultado 2019 agosto 10] Disponible en: <https://www.mundohvacr.com.mx/2018/03/el-frio-y-la-sangre-preservando-la-vida/>
4. Meyer D, Harvey J. El laboratorio en medicina veterinaria. Interpretación y diagnóstico. 3^{era} ed. Buenos Aires: Editorial Inter-Médica; 2007.
5. Cohle S, Saleem DA, Makkaoui DE. Efectos del almacenamiento de sangre sobre la estabilidad de los parámetros hematológicos. Clin. Pathol [Internet] 1981 [consultado 2020 agosto 18]. 76 (1). P 67–69. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7258152/>

6. Médaille CA, Briend-Marchal, Braun JP. Estabilidad de variables hematológicas seleccionadas en sangre canina mantenida a temperatura ambiente en EDTA durante 24 y 48 horas. *Vet. Clin. Pathol.* 2006. 35(1): p18-23.
7. Rosato PN, Gama FG, Brunet MA, Gomes MO, Santana AE. Los efectos del tiempo de almacenamiento y la temperatura sobre la bioquímica son los resultados del suero canino. Resumen Nr. 288. Actas del 34º Congreso Mundial de Veterinaria de Pequeños Animales WSAVA 2009. São Paulo, Brasil.
8. Oliveira CJ, Ribeiro F, Guimarães JD, Silva AR, W. de Ferreira Dantas, L. de Paula Bonfál y S. Kreutzfeld de Farias. Concentración de anticoagulante, tiempo de almacenamiento y temperatura sobre parámetros hematológicos en hemograma automatizado. *Ciencia 2010 Rural* 40: 2221-2226.
9. Hib J. *Histología de Di Fiori, Texto y Atlas.* Buenos Aires: Editorial El Ateneo; 2001.
10. Dellman H, Brown E. *Histología veterinaria.* 3^{era} ed. México: Editorial Acribia; 1996.
11. Wittwer F. *Manual de patología clínica veterinaria.* 2^{da} ed. Chile: Editorial Ediciones UACH; 2012.
12. Montalvo E. Tejido Sanguíneo y hematopoyesis. En: Graue E, director. *Biología celular e histología médica.* México. Editorial de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México; 2018. pag 54 – 59.

13. Núñez L, Bouda J. Patología clínica veterinaria. 2^{da} ed. México: Editorial de la UNAM; 2007.
14. Megías M, Molist P, Pombal M. (2011). Atlas de histología vegetal y animal. Vigo: Editorial de la Universidad de Vigo, 26 de enero del 2019 [Consultado 2019 octubre 16] Disponible en: <https://mmegias.webs.uvigo.es/8-tipos-celulares/eritrocito.php>
15. Ayala R, Díaz P, Álvarez G, Martínez J. “Hematopoyesis. Eritropoyesis. Fisiopatología Eritroide”. Medicine-Programa de formación médica continuada acreditada [Internet] 2001 [consultado 2019 jun 15]; Pp 2613 - 2620. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304541201704945>
16. Quezada N. Hematología clínica. Lima: Editorial Logargraf; 2017.
17. Plonait H. (1984). Elementos de análisis clínico veterinario. Zaragoza: Editorial Acribia. 1984.
18. Kerr M. Exames laboratoriais em medicina veterinaria. 2^a ed. São Paulo: Editorial Roca; 2003.
19. Murray R, Bender D, Botham K. Bioquímica ilustrada. 28^{ava} ed. México: Editorial Interamericana; 2010.
20. Andrés, E. (2014). Manual de procedimientos para transfusiones sanguíneas en caninos. En: Trabajo de graduación. Managua: Editorial de la Universidad Nacional Agraria. Managua; 2014. Pág. 6 – 8.

21. Kraft W, Dürr U M. (2000). Diagnóstico clínico de laboratorio en veterinaria. México: Editorial Grass; 2000.
22. Harvey J W. Veterinary Hematology diagnostic guide and color atlas. Florida: Editorial Saunders; 2012.
23. Frandson HR, Spurgeon TL. Anatomía y Fisiología de los animales domésticos. 5^a Ed. México: Editorial Interamericana. 1995.
24. Voigt GL. Conceptos y técnicas hematológicas para técnicos veterinarios. Zaragoza: Editorial Acribia S A; 2003.
25. Aguiló J. (2001). Valores hematológicos. revista oficial de AVEPA, Asociación Veterinaria Española de Especialistas en Pequeños Animales. 2001; Vol. 21 (2): p. 75-84.
26. Rebar A. (2003). Hemograma canino y felino. Argentina: Editorial the Gloyd Group.Inc; 2003.
27. Guyton AC, Hall JE. Tratado de Fisiología médica. 11^{ava} ed. Barcelona: Editorial Elsevier; 2006.
28. Klein B. Fisiología veterinaria. 5ta ed. Barcelona: Editorial Elsevier; 2014.
29. García N, Pachaly C. (1994). Manual de hematología veterinaria. São Paulo: Editorial Varela; 1994.

30. Rebar, A. Manual de hematología de perros y gatos. Barcelona: Editorial Multimédica S A; 2006.
31. Cowell R, Tyler R, Meinkoth J, DeNicola D. Diagnóstico citológico y hematológico del perro y el gato. 3ra ed. Madrid: Editorial Elsevier; 2009
32. Lamb J F, Ingram C G, Johnston I A, Pitman R M. Fundamentos de fisiología. 2ª ed. Zaragoza: Editorial Acribia S A; 1988.
33. Berrio M, Correa MC, Jiménez ME. El Hemograma: análisis e interpretación con las tres generaciones. Medellín: Universidad de Antioquia; 2003. p 138.
34. Soodikoff, CH. Pruebas diagnósticas y de laboratorio en las enfermedades de pequeños animales. 2da ed. España: Editorial Mosby; 1995.
35. Dos Anjos ST, Welker A, Pires A. Manual de patología clínica de veterinaria 3ª edición. Brasil: Departamento de Clínica de Pequeños Animales. Universidad Federal De Santa María. 2007.
36. Forrellat M, Hernández P, Fernández N, Pita G. (2010). ¿Se cumple siempre la relación hemoglobina – hematocrito? Rev. Cub. De Hematología, Inmunología y Hemoterapia [Internet] 2020 [Consultado 2020 enero 15]; Vol. 4. (26): P 356 – 361. Disponible en: <http://scielo.sld.cu>
37. Benjamín M. Manual de patología clínica en veterinaria. México: Editorial Limusa; 1991 México. Pág. 7 – 15.

38. Rodak B, Carr J. Atlas de hematología clínica. 5 ed. Buenos Aires: Editorial Panamericana; 2017.
39. Merck. Tecnigen Salud. [Internet] 2019 [consultado 2019 junio 10] Disponible en: https://www.tecnigen.cl/documento_tcl.php?documento=756
40. Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología del Perú [Internet]; 2018 [Consultado 2018 Sep 15] Disponible en: <https://biblioteca.senamhi.gob.pe/portal/> o.
41. Athanasiou, L. V., Polizopoulou, Z., Kalafati, M. R., Ntararas, G., Kontos, V. (2016). Effects of pre-analytical handling on selected canine hematological parameters evaluated by automatic analyzer. *Veterinary research forum : an international quarterly journal*, 7(4), 281–285.
42. Guevara M. “Efectos del tiempo transcurrido de la extracción de la muestra sanguínea de perros (*Canis lupus familiaris*) sobre la estabilidad de los parámetros hematológicos en el distrito de Lambayeque 2019. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo; 2019.

ANEXOS

ANEXO 1: Recuento de Eritrocitos: Método Hematocitómetro.

Benjamín (37), describe el siguiente procedimiento:

Método: Método del Hematocitómetro.

Muestra: Sangre con anticoagulante.

Reactivos:

- Solución de Gower a base de:
 - Sulfato de sodio 15,63 g
 - Ácido acético 41,65 ml
 - Agua destilada 250 ml

Material: Pipeta de Thoma, tubo de goma, cámara de Neubauer, gradillas porta tubos.

Técnica:

1. Colocar el tubo de goma a la pipeta cuenta glóbulos de Thoma, la que se identifica con la marca 101 por encima del bulbo.
2. Homogenizar la muestra de sangre, aspirar suavemente las muestras de sangre hasta la marca 0,5 de la pipeta. Limpiar las paredes exteriores con papel absorbente.
3. Aspirar el diluyente (Solución de Gower), hasta la marca 101. Poner la pipeta en forma horizontal y tapar la punta con el dedo antes de retirar la

pieza de caucho. Agitar por lo menos 2 a 3 minutos con un simple movimiento en ocho.

4. Descartar las 3 a 4 primeras gotas, limpiar el área graduada de la cámara de Neubauer. Llenar el espacio comprendido entre la cámara y el cubreobjetos anteriormente colocado.
5. Observar al microscopio con el objetivo de 40X, se cuentan todos los eritrocitos de 5 de 25 cuadrados del área central.

Cálculo:

- Células contadas x 10 (0,1 mm de profundidad de cámara Neubauer) x 5 (1/5 de mm² de los cuadraditos de la cámara Neubauer) x 200 (dilución 1:200) = eritrocitos /μl.

Y así se puede efectuar la suma de las células en los 5 cuadrados pequeños x 10, 000 = eritrocitos/μl.

ANEXO 2: Recuento de Leucocitos: Método Hematocitómetro.

Benjamín (37), describe el siguiente procedimiento:

Método: Método del Hematocitómetro

Muestra: Sangre con anticoagulante.

Reactivos:

- Diluyente original, elaborado con:
 - Ácido acético glacial 1 ml
 - Solución alcohólica de violeta de genciana: 2,5 ml
 - Agua destilada 100 ml

Material: Pipeta de Thoma, pieza de caucho, cámara de Neubauer, gradilla porta tubos.

Técnica:

1. Colocar la pieza de caucho a la pipeta cuenta glóbulos de Thoma, la que a diferencia de la utilizada para recuento de eritrocitos se identifica con la marca 11 por encima del bulbo.
2. Homogenizar la sangre y llenar la pipeta hasta la marca 0,5 con ésta, luego secar la parte externa y aspirar uniformemente el diluyente original hasta la marca 11, esto proporciona una dilución de 1:20.
3. Agitar por unos 3 minutos para que se mezcle bien. Se descarta de 2 a 3 gotas de la pipeta antes de llenar la cámara contadora. Se deja por lo menos 1 minuto para que los eritrocitos se lisen y que los leucocitos se sedimenten.

4. Con el objeto de poco aumento (10 x), se cuentan las células de cada uno de los 4 cuadrados grandes de las esquinas.
5. El conteo se realiza de izquierda a derecha, se debe tener cuidado de no contar dos veces la misma célula, pues al final se reflejará con una diferencia enorme de lo que tiene en realidad el animal.
6. Se requiere contar las células que estén sobre la línea izquierda y la línea superior para incluirlas o, por el contrario, se cuentan las células que se encuentran sobre la línea derecha o la inferior del cuadro no se incluyen en la cuenta.
7. Ya que se tiene la cuenta final (en la cual no debe haber una diferencia superior de 25 % entre cada cuadro de las esquinas).

Cálculo:

- ✓ Así se obtiene la suma de las células de las cuatro esquinas de los cuatro cuadrados $\times 50 = \text{leucocitos}/\mu\text{l}$.

ANEXO 3: Determinación del Volumen Globular Aglomerado (VGA)

Según Wittwer (11), describe el siguiente método para la obtención del volumen globular aglomerado (VGA)

Método : Método del microhematocrito

Fundamento : El principio de centrifugar es el de obtener la máxima aglomeración de eritrocitos y que lo mínimo del plasma permanezca entre los eritrocitos.

Muestra : Sangre con anticoagulante

Material : Tubos capilares, centrífuga para microhematocrito, plastilina, escala de lectura.

Técnica:

1. Mesclar la sangre, llenar los tubos capilares con sangre hasta $2/3$ a $3/4$ de su capacidad.
2. Limpiar las paredes externas, sellar en un extremo del tubo con plastilina.
3. Centrifugar por 5 minutos 15,000 rpm.

Una vez obtenido el capilar se mide con el escalímetro especial para medir el hematocrito o VGA y obtener la lectura en porcentaje.

ANEXO 4: Dosaje de hemoglobina

El dosaje de hemoglobina se realizó mediante un método matemático, dividiendo el hematocrito entre el factor 3.

ANEXO 5: Determinación de Índices Hematimétricos

Benjamín (37), manifiesta que los índices eritrocíticos definen el tamaño y el contenido de hemoglobina del eritrocito de valores obtenidos por la cuenta eritrocítica, la concentración de hemoglobina y el hematocrito; estos índices son obtenidos mediante cálculos matemáticos y son los siguientes:

Volumen corpuscular media (VCM): Expresa el volumen promedio del eritrocito individual, es una forma de calcular el tamaño del eritrocito, y se calcula con la siguiente fórmula:

$$VCM = \frac{VGA(\text{Números enteros}) \times 10}{\text{Recuento Total de GR}(\text{millones/mm}^3)}$$

El resultado expresa el volumen medio del eritrocito en fentolitros (fl).

Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media: Expresa el volumen promedio del eritrocito individual, es una forma de calcular el tamaño del eritrocito, y se calcula con la siguiente fórmula:

$$CHCM = \frac{\text{Hemoglobina}(\text{g/dl}) \times 100}{VGA(\text{Números enteros})}$$

El resultado se expresa en gramos por decilitro (g/dl).

ANEXO 6: Recuento Leucocitario Diferencial Relativo

A. Preparación del frotis sanguíneo

Según Rodak y Carr (38), esta técnica requiere por lo menos de dos portaobjetos de vidrio limpio de 75 x 25 mm. Se coloca una gota de sangre con anticoagulante EDTA de aproximadamente 3 mm en un extremo de la lámina portaobjetos y con la lámina extensora se coloca de manera segura por delante de la gota sangre en un ángulo de 35 a 45° con respecto al otro portaobjetos, la lámina extensora se desliza hacia atrás hasta que tome contacto con la gota de sangre y se la sostiene ahí hasta que la sangre se esparce por todo el ancho del portaobjetos. A continuación, el extensor se desliza con rapidez y suavidad hacia el otro extremo del portaobjetos que sirve como soporte para el extendido, con lo que se crea el extendido en forma de cuña. Es importante que se tome y se extienda toda la gota de sangre.

B. Tinción hemacolor

Fundamento: La tinción con Hemacolor® proporciona un resultado de tinción que corresponde a la tinción de Pappenheim, con núcleos celulares teñidos principalmente de color rojo púrpuro, cosa que está basada en la interacción molecular entre el colorante Eosina A y un complejo Azur B-ADN. Los dos colorantes forman un complejo Eosina A - Azur B-ADN, dependiendo la intensidad de la tinción resultante del contenido de Azur B y de la relación de Azur B respecto a la Eosina A. El resultado de la tinción puede ser influenciado además por factores como la fijación, los tiempos de tinción, el valor pH de las soluciones y las sustancia tampón. A través del uso de soluciones tampón pH 7,2, el kit de tinción Hemacolor® permite conseguir una elevada estabilidad de la tinción (39).

Técnica:

1. Sumergir el frotis secado al aire en la solución fijadora 5 veces por aproximadamente 1 segundo.
2. Luego sumergir 3 veces por aproximadamente 1 segundo en el reactivo de coloración de eosina.
3. Se retira el excedente con papel absorbente y se sumerge 3 veces por aproximadamente 1 segundo en el reactivo de coloración de azul de metileno.
4. Finalmente se enjuaga con agua destilada de un pH 7,2 para eliminar el exceso de tinción y dejar secar en un plano inclinado.

Observación

El frotis se observa colocando una gota de aceite de inmersión y con el objetivo 100 x. el recuento diferencial incluye el conteo y la clasificación de 100 leucocitos de acuerdo a sus características morfológicas de cada uno de ellos y el informe se da en porcentaje de los diferentes tipos de leucocitos.

ANEXO 7: Recuento Leucocitario Diferencial Absoluto

Relacionado con el número de leucocitos obtenidos en el recuento total y con el valor porcentual relativo de cada uno de los diferentes tipos de leucocitos obtenido en la fórmula relativa, se puede determinar el número absoluto de cada uno de ellos por unidad de volumen de sangre (mm^3). Para demostrar el valor del recuento absoluto, se puede emplear una regla de tres simples.

ANEXO 8: Consentimiento Informado

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA TESIS "EFECTO DEL TIEMPO DE REFRIGERACIÓN SOBRE LA ESTABILIDAD DE COMPONENTES SANGUÍNEOS EN CANINOS (*Canis lupus familiaris*)

Por medio de la presente le extiendo un cordial saludo y le hago llegar mi invitación de la manera más cordial a participar de un proyecto de investigación que permitirá determinar el efecto que tiene el tiempo de refrigeración sobre la estabilidad de componentes sanguíneos en caninos. Para este estudio se le extraerá 5 ml de sangre por venopunción de la vena cefálica en 1 tubo con anticoagulante EDTA, para luego ser analizados en el laboratorio.

La información obtenida es confidencial y anónima: en ningún lugar se hará público el nombre de los propietarios y sus mascotas participantes ni sus características. Solo serán publicados datos generales.

Si usted acepta participar permitiendo que su mascota sea parte de este estudio le agradeceremos que preste su conformidad por escrito completando y firmando el formulario.

Yo, José Griseldo Dáquila Guevara....., con DNI
N°: 80476563....., con domicilio en: Jiron Cumbe Mayo 402.....

....., acepto que mi mascota de nombre: Clifor.....,
raza: Criolla....., sea parte de este estudio que se está realizando.

Nombre y apellido: José Griseldo Dáquila Guevara

DNI N°: 80476563

Firma:

[Firma manuscrita]



ANEXO 9: Ficha Clínica

FICHA CLÍNICA

N°

DATOS DEL PACIENTE

Nombre: <i>Clitor</i>	Especie: <i>Canino</i>	Fecha Nac.: <i>4 años</i>
Sexo: <i>Macho</i>	Raza: <i>Briollo</i>	Color: <i>Blanco - Amarillo</i>

DATOS DEL PROPIETARIO

Nombre <i>José Griseldo Davila Guevara</i>	DNI: <i>80476563</i>
Dirección: <i>Jr. Cumbemayo 402</i>	Teléfono:
Correo Electrónico:	

Fecha: *13-12-2019*

Signos Clínicos: Peso: *8 Kg* T°: *38.4°C* F.C: *108 /min* F.R: *24 /min.*
 Est. General: Mucosas: *Rosadas* T. LL. C: *2 segundos*
 Dieta: *Dogchow y comida cocera* Otros Datos:

Anamnesis: *Anteriormente fue tratado por problemas digestivos (6 meses)
 Recibió su vacuna sextuple hace 5 meses, fue desparasitado
 hace 4 mes, Tiene buen estado zoonico y buen apetito*

Hallazgos clínicos: *ojos brillantes, dientes limpios, sin presencia
 de sarro, oídos limpios.*

Dx. Presuntivos: *—*Exámenes Auxiliares: *Hemograma.*Resultados: *—*Dx. Definitivo: *Paciente clínicamente sano*Tratamiento: *—*

Observaciones: *La muestra obtenida fue utilizada para ser
 evaluada como parte del Trabajo de
 investigación*

ANEXO 10: Panel Fotográfico

Figura 1. Llenado de un tubo capilar con la muestra de sangre



Figura 2. Colocando el tubo capilar en la centrífuga de micro hematocrito



Figura 3. Realizando un frotis sanguíneo



Figura 4. Kit de tinción Hemacolor



Figura 5. Observación de las muestras en el microscopio



Figura 6. Observación a 100X, donde se observa un neutrófilo segmentado.

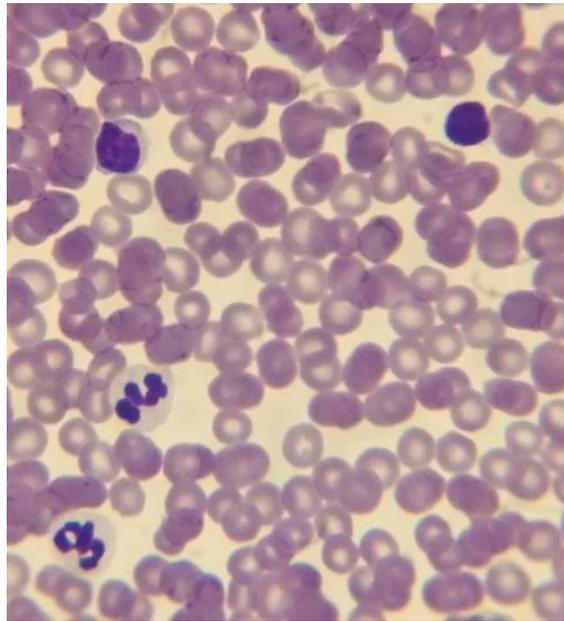


Figura 7. Observación a 100X, donde se observa Neutrófilos segmentados y linfocitos.



Figura 8. Observación a 100X de un monocito

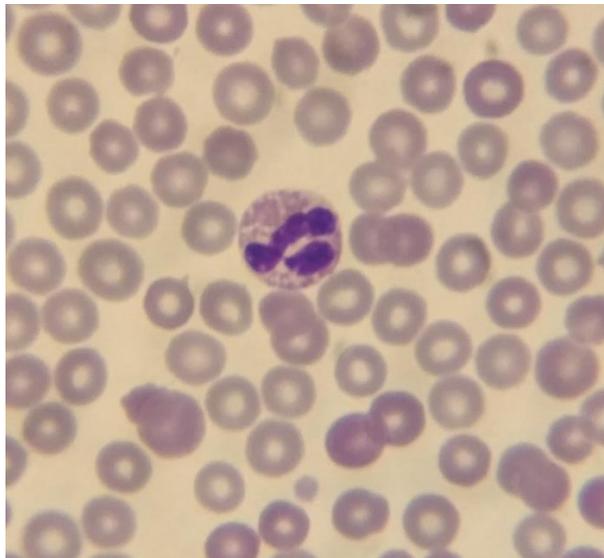


Figura 9. Observación a 100X de un eosinófilo