

CREATINA INTRAERITROCITICA COMO VALORACION DE LA EDAD CELULAR

Nidia Lobo*, Ileana Holst**, Karl Schosinsky*, Mario Chaves* y German F. Sáenz

Key words index: Hemolytic Anemia, Creatine, Reticulocyte.

RESUMEN

El índice de reticulocitos es el parámetro más utilizado para medir la producción eritrocitaria medular. Sin embargo, como éste ha sido asociado con cierto grado de error estadístico, se ha buscado un método objetivo y de fácil realización, la determinación de creatina intraeritrocítica, para obtener una mayor información acerca de la edad eritrocitaria en determinados procesos hemolíticos. La misma se determinó por el método del diacetil alfa-naftol, observándose una linealidad hasta 400 mg/l. Los valores de creatina obtenidos en el grupo control (n= 100) fueron de 24 a 69 mg/l, y se utilizó el logaritmo de estos valores para normalizar la distribución de los datos. Se analizó un grupo de muestras de 216 pacientes con diferentes diagnósticos, obteniéndose valores aumentados del conteo de reticulocitos en un 75 por ciento de los casos de creatina intraeritrocítica en un 63 por ciento. Sin embargo, en un 13 por ciento de las muestras se obtuvieron valores aumentados de creatina intraeritrocítica con un conteo de reticulocitos normal o disminuido. Sin restarle su debida

importancia a la determinación de reticulocitos, se recomienda realizar el análisis de creatina como dato complementario en el estudio de aquellos síndromes hemolíticos idioáticos que cursen con conteos normales o subnormales de reticulocitos. (Rev. Cost. Cienc. Méd. 1990; 11(3, 4): —).

INTRODUCCION

El cómputo de reticulocitos es un parámetro muy utilizado como ayuda diagnóstica en aquellas anemias producidas por pérdida de sangre total o destrucción de glóbulos rojos (hemorragia o hemólisis), aun cuando no es una medida precisa del grado de síntesis de hemoglobina ni de la sobrevivencia eritrocítica (3, 7, 9). Este análisis se halla asociado con un grado de error estadístico, probablemente debido a los criterios subjetivos utilizados en la identificación de las células citológicamente jóvenes (13), así como por otros factores de error de tipo personal. Por ello, es importante a la adopción de nuevas metodologías de valor diagnóstico y de fácil realización, como la determinación de creatina intraeritrocítica (CRI), para aquellos cuadros anémicos de mecanismo hemolítico y de etiología oscura o indeterminada. El primer reporte de la presencia de creatina dentro del eritrocito se hizo en 1918 por Hunter y Campbell (9). Posteriormente, Griffiths y Fitzpatrick (8) reportaron que la CRI es un indicador sensible de la edad media de los eritrocitos, siendo que las células jóvenes exhiben niveles de creatina de seis a nueve veces más que las células maduras. En 1970

* Centro de Investigación de Hemoglobinas Anormales y Trastornos Afines (CIHATA); Universidad de Costa Rica.

** Cátedra de Química Clínica, Departamento de Análisis Clínicos, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

Beutler (1) propuso que posiblemente la función de la creatina dentro del eritrocito es la de reserva de fosfato de alta energía, sobre todo para la síntesis proteica en el eritroblasto. Fehr y Knob (6) estudiaron pacientes con varias anemias hemolíticas y obtuvieron una buena correlación entre la CRI y el tiempo de supervivencia de las células rojas.

En los últimos años, se han utilizado técnicas enzimáticas (2,4) para cuantificar la creatina, las cuales han resultado ser muy sensibles, precisas, y se correlacionan adecuadamente con la determinación del tiempo de supervivencia de los eritrocitos por el método de crómo radiactivo (CRI).

Aunque la CRI y el cómputo de reticulocitos (RC) no determinan lo mismo, ya que la primera indica la edad eritrocitaria, y el segundo la producción de células rojas (actividad eritropoyética), se han hecho análisis estadísticos de los dos métodos, con el objeto de determinar si la CRI puede sustituir a RC en el diagnóstico de anemias hemolíticas. (2, 4, 6,17).

Los propósitos del presente trabajo fueron estudiar el nivel de la CRI en diversos cuadros clínicos que involucran destrucción prematura del glóbulo rojo y comparar esos resultados con el índice de reticulocitos.

MATERIALES Y METODOS

Se recolectaron 316 muestras de sangre total anticoagulada con EDTA (1,5 mg/ml), de los laboratorios clínicos del Hospital San Juan de Dios y de la Maternidad Carit en San José, Costa Rica. Cien de esas muestras se obtuvieron de adultos sanos que acudieron al Banco de Sangre del Hospital San Juan de Dios, y se utilizaron para establecer los valores de CRI del grupo control de la investigación. Al resto de las muestras se les practicó una serie de determinaciones con el fin de detectar la presencia del proceso hemolítico. Las muestras que no fueron analizadas el mismo día para CRI, se mantuvieron por un período no mayor de tres días a 8°C. El cómputo de reticulocitos corregidos (13), se realizó el mismo día que se extrajo la

muestra, mientras que para la cuantificación de haptoglobinas séricas (Hp)(5), se congeló el plasma por un máximo de una semana.

La creatina se determinó por el método del diacetil alfa-naftol modificado por Li et al. (10) La curva de calibración se preparó a partir de un patrón de creatina de 1000 mg/l, que se diluyó para obtener concentraciones de 25; 50; 100; 200; 400; 500; 600 y 800 mg/l.

Finalmente el diagnóstico de cada uno de los casos involucrados en la investigación, fue corroborado con el estudio de los expedientes, la historia clínica y diversos parámetros bioquímicos, inmunológicos y morfológicos (14, 15, 16).

RESULTADOS

La curva de calibración de CRI mostró linealidad hasta una concentración de 400 mg/l (Fig. 1).

Los valores de CRI obtenidos en el grupo control (n=100) fueron de 24 a 69 mg/l). Con el fin de normalizar la distribución de los valores, se utilizó el logaritmo de los datos de CRI (Fig. 2).

A las 216 muestras objeto de estudio, se les determinó simultáneamente CRI y RC. En el Cuadro 1 se presentan los diferentes patrones de reticulocitos corregidos-creatina intraeritrocítica obtenidos en el estudio (RCCRI). Estos patrones de RC-CRI están expresados en términos de valores normales (N), aumentados (A) o disminuidos (D) con base en los intervalos de referencia de RC (13) y de CRI del grupo control.

En el Cuadro 2 se resumen los diferentes diagnósticos de los pacientes involucrados en esta investigación, siendo las anemias hemolíticas aproximadamente el 50 por ciento de los casos.

Se realizó un estudio de correlación lineal entre CRI y RC en pacientes con anemias hemolíticas y no hemolíticas; en pacientes con anemias hemolíticas únicamente; y en anemias hemolíticas con valores de haptoglobinas inferiores a 40 mg/dl, obteniéndose valores de 0,4739; 0,4915 y 0,7000 mg respectivamente.

DISCUSIÓN

El método del diacetil alfa-naftol para determinar CRI, mostró un intervalo analítico de 400 mg/l, lo cual elimina la necesidad de proceder a diluir las muestras con valores elevados. En ninguna de las 216 muestras analizadas, el valor de CRI excedió los 400 mg/l.

Vale la pena destacar que los valores de CRI obtenidos en el grupo control del estudio, son muy semejantes a los reportados por otros autores como valores de referencia poblacionales. Li *et al.* (10), utilizando el método colorimétrico modificado del diacetil alfa-naftol, obtuvieron valores de creatina de 42-80 mg/l. Sin embargo, Cramer *et al.* (4) y Buysee *et al.* (2), utilizando métodos enzimáticos, lograron intervalos de referencia más estrechos, de 30-70 mg/l y 40-60 mg/l, respectivamente.

Debido a que al relacionar a distribución de los datos con el número de casos se observó un sesgo a la izquierda, dato que concuerda con lo reportado por otros autores (12, 17), se procedió a normalizar la distribución utilizando el logaritmo de los valores de CRI (Fig. 2).

En el Cuadro 1 muestra los porcentajes de los diferentes patrones (RC-CRI) obtenidos en el estudio. Se observa que en el 75 por ciento de los casos RC estuvo aumentado, de los cuales un 25 por ciento mostró niveles normales de CRI. Es importante destacar que un 13 por ciento de los casos presentaban porcentajes de RC, N o D con valores de CRI A.

En este estudio, además de lo investigado en cuanto a anemias hemolíticas, se incluyeron anemias secundarias (trastornos con insuficiencia renal crónica, absceso hepático perforado, sangrado digestivo alto, colitis aguda y ulcerativa, etc.), las cuales por presentar un hematocrito inferior al 40 por ciento en hombres, y un 37 por ciento en mujeres, se incluyeron dentro de este grupo secundario. La mayoría de éstas presentaron un patrón RC-CRI, AA (Cuadro 2) al igual que las AHAI, EH, anemia ferropriva, HPN, drepanocitosis, hemoglobinopatías, deficiencia de G6PD, eliptocitosis

hereditaria y anemia hipocrómica, ello probablemente debido a que los pacientes acudían al hospital en el momento en que presentaban manifestaciones clínicas.

Con respecto a la relación entre la CRI y RC, con los trimestres de gestación, no se observó un patrón definido en las diferentes etapas de embarazo. Esto probablemente se debió a que algunas de estas embarazadas se les administraba tratamiento para prevenir anemia, por lo que estas pacientes presentan un patrón RC-CRI muy heterogéneo, tal y como se observa en el Cuadro 2. Un caso especial se da con la anemia megaloblástica, la cual es la única en la que se presenta un patrón RC-CRI DD, como también en los casos de mujeres embarazadas quienes presentaron un patrón RC-CRI DN (Cuadro 2).

De acuerdo con los análisis estadísticos realizados, tanto al método de CRI como al de RC se han reportado correlaciones entre estos parámetros de 0,42 (17) y 0,35 (4); en contraste con otros trabajos en donde se han obtenido correlaciones altas de 0,89 (6) y 0,92 (2). En el presente estudio se obtuvo una correlación de 0,47 en muestras de pacientes con anemias hemolíticas y no hemolíticas. Sin embargo, el coeficiente de correlación obtenido con muestras de pacientes con anemia hemolítica, fue de 0,49, no observándose aumento importante en éste.

Es poco probable esperar altas correlaciones entre CRI y RC, ya que RC está sujeto a muchos factores que afectan la precisión del mismo (7). Además, hay otros posibles factores fisiológicos, como son el grado de producción de células rojas, su etapa de liberación desde la médula, su tasa de maduración intravascular, el papel del bazo reduciendo el nivel de reticulocitos en sangre periférica, y estados patológicos que destruyen los eritrocitos por muy diversas causas (3).

En cuanto al estudio comparativo entre la CRI y RC en aquellas anemias hemolíticas con valores de Hp disminuidos (menos de 40 mg/dl), se determinó que la correlación es de 0,70, con lo que se concluye que aunque el valor de Hp no se debe tomar como índice

fidedigno de la presencia de un proceso hemolítico, sí es de gran ayuda en el diagnóstico presuntivo de las anemias hemolíticas.

La CRI está presente durante los 120 días de vida del eritrocito y sus niveles son mayores en los eritrocitos jóvenes. Además permanece en las células durante más tiempo que la breve vida de los reticulocitos. Por lo tanto, pareciera que aunque la CRI no puede en ningún momento sustituir a RC, sí es un parámetro útil para la detección de anemia hemolítica, y que en unión del RC, puede dar una idea más precisa del grado del proceso hemolítico. Así mismo, existe un pequeño porcentaje de anemias hemolíticas idiopáticas que cursan con valores normales o disminuidos de RC y aumentados de CRI, demostrándose la utilidad de esta determinación. A todo esto cabe agregar, que es una técnica sencilla, de bajo costo, que puede ser automatizada y que podría llegar a establecerse en un futuro en Costa Rica como una de las técnicas de rutina en el estudio de las anemias hemolíticas.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece la colaboración del laboratorio de Hematología del Hospital San Juan de Dios, así como del laboratorio clínico de la Maternidad Carit por facilitarnos las muestras analizadas en este estudio. Así mismo, se reconoce la ayuda brindada por el Banco de Sangre del Hospital San Juan de Dios al proporcionar las sangres de donadores sanos para obtener los valores de creatina en el grupo control de la investigación.

ABSTRACT

The reticulocyte count is the most used parameter to measure the medular erythrocyte production. However, since it has been associated with certain degree of statistical error, the investigators have been looking for a new and objective method, like the determination of erythrocyte creatine, to obtain more information concerning the

erythrocyte age in age in certain hemolytic anemias. Creatine was determined by the diacetyl-alfa-naphthol reaction. The method was linear up to 400 mg/l. The creatine values obtained from the control group (n=100) were from 24 to 69 mg/l and the distribution of the data was normalized with the logarithm of the values of CRI. A group of 216 samples from patients with different diagnoses were analyzed, obtaining high values of the reticulocyte count and creatine determination in 75% and 63% of the cases respectively. However, 13% of the samples had elevated values of creatine with a low or normal count of reticulocytes. Without underestimating the importance of the reticulocyte count, it is recommended to analyze creatine levels as complementary information in the study of those idiopathic hemolytic syndromes that have with normal or subnormal reticulocyte counts.

BIBLIOGRAFIA

1. Beutler, E.: Is red cell creatine metabolic garbage? *N. Engl. J. Med.* 1970; 282: 979-980.
2. Buysee, A. M.; Delangue, J. R.; De Buyzere, M. L.: Enzymatic erythrocyte creatine determinations as an index for cell age. *Clinical Chimica Acta* 1990; 187: 155-162.
3. Cline, M. J.; Berlin, N. I.: The reticulocyte count as an indicator of the rate of erythropoiesis. *Am. J. Clin. Pathol.* 1963; 39:121-128.
4. Cramer, H.; Dauwalder, H.; Meier, H.: Enzymatic determination of red cell creatine as an index hemolysis. *Clinical Biochemistry* 1987; 20:329-332.
5. Chaves, M.; Sáenz, G. F.: Cuantificación de haptoglobinas séricas. En: Sáenz, G. F.; Barrantes, A.; Chaves, M.: *Hematología Analítica*, 2ª ed., San José, Costa Rica: Editorial Universidad de Costa Rica; 1987:275-284.
6. Fehr, J.; Knob, M.: Comparison of red cell creatine and reticulocyte count in

- appraising the severity of hemolytic processes. *Blood* 1979; 53:966-976.
7. Gilmer, P. R.; Koepke, J. A.: The reticulocyte. An approach to definition. *Am. J. Clin. Pathol.* 1976; 66: 262-267.
 8. Griffiths, W. J.: Estimation of creatine in red cells. *J. Clin. Pathol.* 1968;21:412-413.
 9. Hunter, A.; Campbell, W. R.: The amount and the distribution of creatinine and creatine in normal human blood. *J. Biol. Chem.* 1918;33:165-191.
 10. Li, P. K.; Lee, J. T.; Li, C.: Improved method for determining erythrocyte creatine by the diacetyl alpha-naphthol reaction; elimination of endogenous glutathione interference. *Clin. Chem* 1982;28:92-96.
 11. Linares, G. J.: Anemias hemolíticas inmunes. En: *Inmunología y transfusión*, 1ª ed., Caracas: Editorial Cromotip C. A.; 1986; 198-227.
 12. Opalinsky, A.; Beutler, E.: Creatine, 2-3 diphosphoglycerate and anemia. *N. Engl. J. Med.* 1971;285:483-486.
 13. Sáenz, G. F.; Alvarado, M.: Cómputo de células sanguíneas. En: Sáenz, G. F.; Barrantes, A.; Chaves, M.: *Hematología Analítica*, 2ª ed., San José, Costa Rica; Editorial Universidad de Costa Rica; 1987: 57-70.
 14. Sáenz, G. F.; Chaves, M.: Hemoglobinometría. En: Sáenz, G. F.; Barrantes, A.; Chaves, M.: 2ª ed., San José, Costa Rica; Editorial Universidad de Costa Rica; 1987:71-81.
 15. Sáenz, G. F.; Chaves, M.: El índice de hematocrito. En: Sáenz, G. F.; Barrantes, A.; Chaves, M.: *Hematología Analítica*, 2ª ed., San José, Costa Rica; Editorial Universidad de Costa Rica; 1987:82-86.
 16. Schosinsky, K; Jiménez, M.; Vargas, M.; Brilla, E.; Gutiérrez, A.; Vinocuor, E.: *Manual de técnicas de laboratorio*, 8ª ed., San José, Costa Rica: Editorial Universidad de Costa Rica; 1988; 123-128.
 17. Smith, B. J.; Mohler, D. N.; Willis, M. R.; Savory, J.: Erythrocyte creatine levels in anemia. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 1982; 12: 439-446.

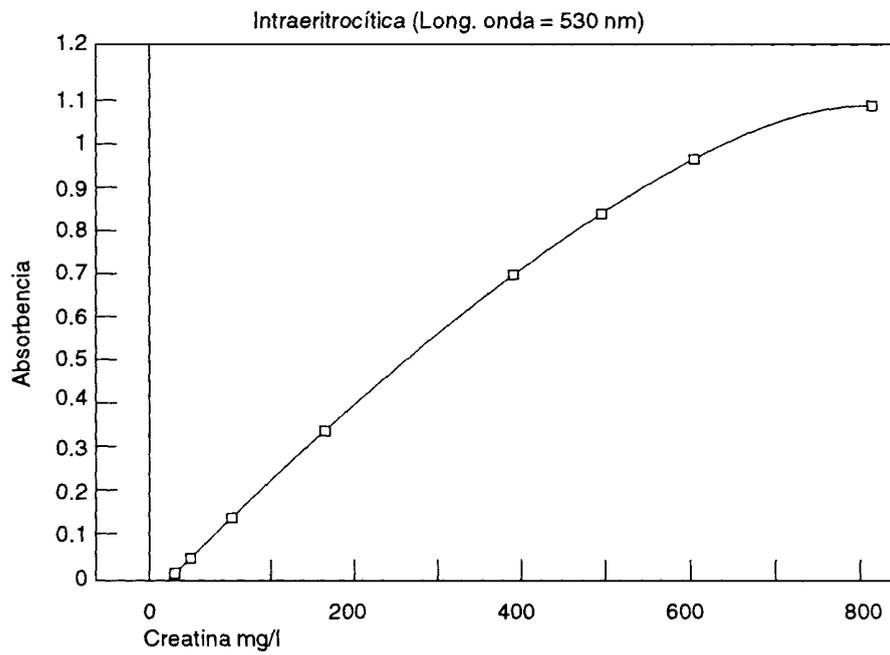
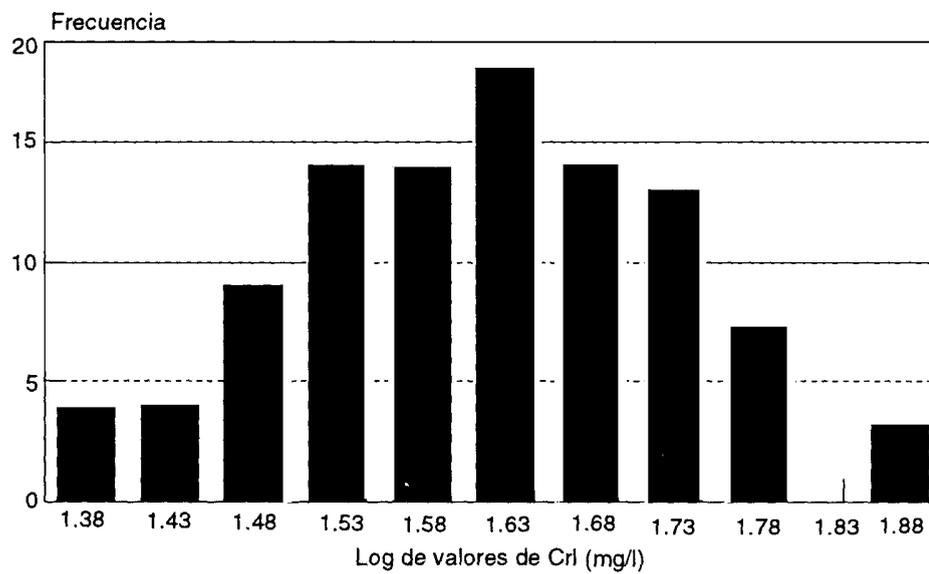


Figura 1. Curva de calibración de creatina.

Figura 1. Curva de calibración de creatina.



Val. creatina grupo control (24-69 mg/l)
N = 100

Figura 2. Valores de creatina intraeritrocítica del grupo control.

CUADRO 1

PORCENTAJES DE LOS DIFERENTES PATRONES RC-CRI, SEGUN EL NUMERO DE CASOS QUE SE PRESENTARON EN EL ESTUDIO

Patrón RC-CRL	Número de casos	Porcentaje (%)
AA	109	50,0
AN	54	25,0
NN	21	10,0
NA	18	8,0
DA	10	5,0
DN	3	1,5
DD	1	0,5
Total	216	100,0

Patrón RC-CRI = porcentaje de reticulocitos corregidos-CRI. AA = reticulocitos y CRI aumentados; AN = reticulocitos aumentados y CRI normal; NN = reticulocitos y CRI normales; NA = reticulocitos normales y CRI aumentada; DA = reticulocitos disminuidos y CRI aumentada; DN = reticulocitos disminuidos y CRI normal DD = reticulocitos y CRI disminuidos.

CUADRO 2

PATRON RC-CrI DE LOS DIFERENTES DIAGNOSTICOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO

Diagnóstico	Nº casos	Porcentaje casos (%)	Porcentaje del patrón RC-CRI en cada diagnóstico						
			AA	NN	AN	NA	DA	DN	DD
AHAI	22	11	43	14	19	14	10	—	—
EH	21	11	69	—	19	6	6	—	—
Anemia ferropriva	12	6	50	12	12	12	12	—	—
HPN	10	5	56	—	33	11	—	—	—
Drepanocitosis	9	5	89	—	11	—	—	—	—
Hemoglobinopatías (SC, CC, SF)	8	4	67	—	33	—	—	—	—
Talasemias	7	4	33	33	33	—	—	—	—
AH en estudio	6	3	50	—	50	—	—	—	—
Anemia megaloblástica	5	3	40	40	—	—	—	—	20
Leucemias	3	2	33	33	33	—	—	—	—
Def. G6PD	3	2	100	—	—	—	—	—	—
Eliptocitosis hereditaria	2	1	100	—	—	—	—	—	—
Anemia hipocrómica*	2	1	100	—	—	—	—	—	—
Anemia secundaria	35	18	64	6	24	6	—	—	—
Embarazo	42	22	24	22	17	15	15	7	—
Otros**	5	3	60	20	20	—	—	—	—

* Sin diagnóstico.

** Incluye los casos que no tienen anemia: cáncer gástrico, disgamaglobulinemia, embolia pulmonar, malaria y policitemia secundaria.

AHAI = Anemia hemolítica autoinmune; EH = Esferocitosis hereditaria; HPN = Hemoglobinuria paroxística nocturna.