

130
2º



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO CITOQUIMICO DURANTE LA
HEMATOPOYESIS EN CULTIVO LIQUIDO DE CELULAS
TRONCO DE MEDULA OSEA HUMANA MOVILIZADAS
A LA SANGRE PERIFERICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A :
MARIA ELENA MORALES GASCA



DIRECTOR DE ESTUDIOS DE TESIS PROFESIONALES
C. ALEJANDRO MARCHE COVA

MEXICO, D. F.

NOVIEMBRE DE 1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

SECRETARIA DE CIENCIAS
DIRECCION ESCOLAR

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: "Estudio Citoquímico Durante la Hematopoyesis en Cultivo Líquido de Células Tronco de Médula Osea Humana Movilizadas a la Sangre Periférica"

realizado por Morales Gasca María Elena

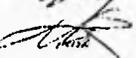
con número de cuenta 8532220-8 . pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario M.en C. Alejandro Marché Cova 

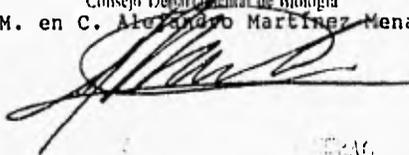
Propietario M. en C. Viktor Romero Díaz 

Propietario Q.F.B. María Aurora Judith Acosta Barreda *Ma. Aurora J. Acosta B*

Suplente Dra. en C. Marcela Esperanza Aguilar Morales *Marcela Morales*

Suplente Biol. Miguel Angel Palomino Garibay 

Consejo Departamental de Biología
M. en C. Alejandro Martínez Mena



DEDICATORIA

A mis padres por darme la vida, por su amor y comprensión; y sobre todo por la mejor herencia que recibí "Ser profesionalista".

A mi pequeño y gran amor, porque tú significas algo muy importante en mi vida.

A las personas que desgraciadamente ya no están conmigo para disfrutar de una meta más en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo es producto del esfuerzo y la ayuda de muchas personas, a las cuales les agradezco su cooperación y espero no olvidar a nadie.

Quiero expresar mi profundo agradecimiento al M. en C. Alejandro Marché Cova, quién en principio siempre fue y seguirá siendo un amigo, su apoyo, dedicación e Ingenio fueron esenciales para la realización de este trabajo. Así mismo quiero expresar mi admiración a su ejemplar desempeño como Investigador, el cual me transmitió para la mejor elaboración de la tesis.

Mi agradecimiento a la Q.F.B. Aurora Acosta Barreda por la minuciosa revisión del manuscrito y por sus acertados comentarios en relación al mismo, también le agradezco su gran ayuda y asesoramiento con respecto a las tinciones citoquímicas y sobre todo el haberme brindado su amistad.

A la Bióloga Mayte Salles Manuel le agradezco su valiosa intervención en el presente trabajo, así como los comentarios hechos respecto a este. Gracias por tu linda amistad.

Al M. en C. Viktor Romero Díaz, a la Dra. en C. Marcela Aguilar Morales y al Biol. Miguel Angel Palomino Garibay por haber aceptado revisar este manuscrito, así como el realizar comentarios y correcciones al trabajo, los cuales dieron más sustento a la tesis.

A mis Padres mi más profundo agradecimiento por todo el apoyo que me han dado a lo largo de la vida, por enseñarme a valorar las cosas importantes que

nos hacen ser mejores personas; así como el interés que tuvieron en mi trabajo y sobre todo por su apoyo moral y económico. Además hay cosas que no necesito escribir para agradecerles, en dos palabras MIL GRACIAS. Los Quiero Mucho.

Gracias Alberto por tu amor y sobre todo por tu paciencia. Quiero expresar mi admiración hacia Beto porque a pesar de todos los problemas que hemos atravesado juntos, con su optimismo siempre hemos salido adelante con éxito. Le agradezco el tratar de dar siempre lo mejor de él y por apoyarme para realizar mis sueños así como mis metas. Reitero el agradecimiento a mi pequeño y gran amor por el asesoramiento recibido sobre computación y el haber aceptado revisar este manuscrito.

Quiero agradecer especialmente a mi hermano Rubén porque a pesar que nunca hemos sido tan unidos he aprendido mucho de TI y se que eres una persona muy valiosa. A mis hermanas Lulú, Yola y Maru por sus consejos, porque cada una estuvo en el momento adecuado para dármelos, así como a mi cuñada Norma el haberme permitido conocerle un poco más, a mis cuñados Juan y Josué por esos momentos agradables que hemos tenido juntos.

Gracias a mis sobrinos Eder, Cynthia, Omar, Oscar, Ana Karen, Esteban, Fernando, Jazmín y Marco Antonio. Porque con ustedes he disfrutado mi niñez que aún conservo y espero nunca perderla, porque me han permitido pasar momentos muy felices. Al peque a pesar que todavía no te conozco se que tendremos momentos muy agradables, gracias por darme la dicha de ser nuevamente tía.
¡Bienvenido!

A mis suegros Salvador Méndez y Mercedes Martínez por su amistad y la ayuda que me han brindado en todo momento, sobre todo el haberme aceptado tal y como soy GRACIAS.

Gracias a todos los Méndez Martínez así como a sus esposas: Martín, Gloria, Luis, Margarita; a Rocío, Rosario, Alex y a la Sra. Marí por darme momentos muy agradables.

MI agradecimiento muy especial a Salvador y Lourdes por toda la ayuda que me han brindado, por sus consejos y por esos momentos muy felices que hemos tenido juntos. Ustedes saben cuanto los quiero.

MI más sincero agradecimiento a Don Alberto Méndez por haberme permitido ser una nieta para él, gracias por esos sabios consejos que siempre me has dado, por tu ternura y por los momentos tan agradables que hemos pasado.

A Lalo porque juntos hemos pasado momentos tristes y alegres, por ese apoyo incondicional que me brindaste cuando más lo necesite, y porque sabes ser un gran amigo. Gracias.

Les agradezco su vallosa amistad a Flor, Gerardo, Armando, Pili, Fer, Liz, Pepe, Ale, Samy, Pepe Navar, Tete, Mauri, LuzMa, Humberto, Carmen, Fer, Idalia, Manrique y Alicia. Porque siempre me hicieron sentirme en familia, así como su inmenso apoyo que siempre me han brindado en todo momento.

Al Dr. Saúl Villa Treviño y al Dr. Alvaro Osornio jefe de la División de Investigación Básica del Instituto Nacional de Cancerología por haberme permitido la estancia en la División, así como a todos los investigadores pertenecientes a esta

por brindarme una mejor estancia y en especial al Dr. Pedro Sobrevilla Calvo por el haber confiado en nosotros Gracias.

Muy especial el agradecimiento al Bombón por su enorme paciencia, por darme su amistad y verme como un integrante más del grupo. Porque siempre supiste llevarme adelante a pesar de mis grandes dudas y tropezos, sin tu ayuda no hubiera sido posible la realización de la tesis. Mil Gracias.

A la Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica A.C., a la compañía In Vitro S.A. y a los Farmacéuticos Lakeside S.A. de C.V. por sus valiosos donativos, ya que sin ellos no hubiera sido posible la realización del presente trabajo.

I N D I C E

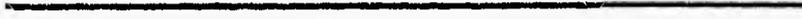
ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
I. INTRODUCCION	4
I.1 GENERALIDADES	4
I.1.1. SANGRE	4
I.1.1.1. Componentes celulares y funcionamiento de la sangre	4
I.1.1.2. Ontogenia hematopoyética	5
I.1.2. Hematopoyesis	6
I.1.2.1. Definición	6
I.1.2.2. Célula tronco hematopoyética	7
I.1.2.3. Unidad formadora de colonia	8
I.1.3. Médula ósea	10
I.1.3.1. Localización de la médula ósea y sitios de su hematopoyesis	10
I.1.3.2. Componentes celulares de la médula ósea	11
I.1.4. Desarrollo hematopoyético	11
I.1.4.1. Eritrocito	11
I.1.4.1.1. Bioquímica	13
I.1.4.1.2. Ontogenia y tipos de hemoglobina	14
I.1.4.2. Plaqueta	14
I.1.4.2.1. Fisiología	16
I.1.4.3. Neutrófilo	17
I.1.4.3.1. Fisiología	19
I.1.4.3.2. Bioquímica	19
I.1.4.3.3. Producción y Distribución	20
I.1.4.4. Eosinófilo	21
I.1.4.4.1. Fisiología	21
I.1.4.4.2. Producción y Distribución	22
I.1.4.5. Basófilo	22
I.1.4.5.1. Fisiología	22
I.1.4.5.2. Producción y Distribución	23
I.1.4.6. Monocito	23
I.1.4.6.1. Fisiología	24
I.1.4.7. Linfocito	24
I.1.4.7.1. Fisiología	26
I.1.4.7.2. Producción y Distribución	26

I.2. ANTECEDENTES	27
I.2.1. Transplante de Médula Osea	27
I.2.1.1. Definición	27
I.2.1.2. Historia del transplante	27
I.2.1.3. Tipos de transplantes	28
I.2.2. Cultivo celular	28
I.2.2.1. Definición	28
I.2.2.2. Cultivo <i>IN VITRO</i>	29
I.2.2.3. Cultivo de células hematopoyéticas	29
II. OBJETIVO E HIPOTESIS	32
II.1. OBJETIVO	32
II.2. HIPOTESIS	32
III. MATERIALES Y METODOS	33
III.1. SELECCIÓN DE MUESTRAS	33
III.2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS	33
III.3. CONCENTRADO LEUCOCITARIO	34
III.4. CULTIVO DE CMMSP	34
III.5. PROCESAMIENTO DE LAS CÉLULAS EN CULTIVO PARA LAS TINCCIONES CITOQUÍMICAS	34
III.6. TINCCION DE WRIGTH	35
III.7. TINCCIONES CITOQUIMICAS	36
III.7.1. Mieloperoxidasa	37
III.7.2. Fosfatasa Alcalina Leucocitaria	38
III.7.3. Fosfatasa Acida	39
III.7.4. Azul de Prusia	40
IV. RESULTADOS Y DISCUSION	43
V. CONCLUSIONES	78
APENDICE I	80
APENDICE II	81

APENDICE III _____ 82

APENDICE IV _____ 83

LITERATURA CITADA _____ 89



ABREVIATURAS

UFC	Unidad formadora de colonias
UFB-E	Unidad formadora de bursas-eritroides
UFC-E	Unidad formadora de colonias eritroides
UFC-GEMM	Unidad formadora de colonias de granulocitos, eritrocitos, monocitos y macrófagos
UFC-GM	Unidad formadora de colonias de granulocitos y monocitos
AP	Azul de Prusia
FAC	Fosfatasa ácida
MPO	Mieloperoxidasa
FAL	Fosfatasa alcalina
PAS	Acido peryódico de Schiff
INCan	Instituto Nacional de Cancerología
CMMSP	Células mononucleares movilizadas a la sangre periférica
FEC-G	Factor de estimulación de crecimiento granulocítico (filgrastim)
PBS	Amortiguador de fosfatos salino
LMC	Leucemia mielóide crónica
LMA-M ₄	Leucemia mielóide aguda con abundantes mielocitos, promonocitos y monocitos
LMA-M ₃	Leucemia mielóide aguda con promielocitos hipergranulares
LMC (Ph ⁺)	Leucemia mielóide crónica con cromosoma Philadelphia positivo

RESUMEN

Resultados recientes en nuestro laboratorio mostraron que las células tronco de médula ósea movilizadas a la sangre periférica y las de médula ósea sin movilizar, provenientes de pacientes con cáncer y de donadores, pueden proliferar y diferenciarse hacia los diferentes progenitores hematopoyéticos (UFC-G, UFC-GEMM y UFB-E) al menos por un periodo de doce semanas en un medio de cultivo líquido sin citocinas y sin factores de estimulación del crecimiento. Sin embargo, se desconoce si estos progenitores son capaces de madurar a los diferentes estadios de cada extirpe sanguínea, lo que consideramos importante abordar en el presente trabajo mediante un estudio citoquímico durante la hematopoyesis en cultivo líquido de células tronco de pacientes con cáncer movilizadas a la sangre periférica con filgrastim (FEC-G). La estrategia experimental fue la siguiente: se trabajó con 16 personas que se clasificaron en tres grupos, A) Con diagnóstico de malignidad y médula ósea con hematopoyesis normal (2); B) Con diagnóstico de malignidad y médula ósea con hematopoyesis malignizada (12) y C) Donadores (2). Después de recibir una dosis fija de FEC-G de 600 mg/24 H, durante seis días continuos para movilizar sus células mononucleares, estas se recolectaron durante tres días seguidos a partir del quinto de la aplicación del FEC-G. Se tomó una alícuota (0.5-1 ml) de cada producto de leucoféresis y después se obtuvo el concentrado leucocitario (CL). Los cultivos fueron iniciados en cajas de 40 x 12 mm, con inóculos de 5×10^4 células/ml de los diferentes CL. Se cultivaron en α -MEM,

suplementado con SFC (20 %) y fitohemaglutinina (2 %). Los cultivos se realizaron por triplicado y se incubaron a 37°C en 5 % CO₂ por diferentes periodos, por lo menos doce semanas, uno de ellos hasta veintidos semanas. Cada tercer día, las células fueron contadas y examinadas para a) % viabilidad; b) aspecto morfológico; c) tinciones citoquímicas diferenciales (MPO, FAL, FAC y azul de Prusia).

De la primera semana y hasta la doceava semana de cultivo se observó, para los dos pacientes del Grupo A, MPO: 0.8-72% y 0-68%, FAL: 0-3% y 0-17% respectivamente. Para 8 casos de LMC del Grupo B, MPO: 3.5-30%, 0.1-32%, 0.2-9%, 1.1-67%, 1.3-65%, 4.6-64%, 1.5-65%, 5.1-66%, FAL: 0.5-5%, 0-26%, 0.1-4.5%, 0.1-60.8%, 0.3-29%, 2.5-60%, 0.4-61%, 1.3-50% respectivamente. Para los casos restantes del Grupo B, MPO: 85-0%, 0.1-65%, 0.5-56% y 0.3-5%, FAL: 0%, 0-88%, 0-12% y 0-0.5% respectivamente. Para los 2 casos del Grupo C, MPO: 0.3-85% y 0.5-87%, FAL: 0-72% y 0-75%, FAC: 3-8% y 2-7.5% respectivamente.

Los resultados obtenidos sugieren que las células cultivadas, generaron sus propios factores de estimulación de crecimiento y de ésta forma proporcionaron el microambiente adecuado para que las células tronco proliferaran y se diferenciaron hacia progenitores hematopoyéticos, en los cuales finalmente se dió la maduración a los diferentes estadios de las células sanguíneas, que pudieron ser fácilmente detectados por las tinciones citoquímicas empleadas.

I. INTRODUCCION

I.1.GENERALIDADES

I.1.1. SANGRE

La sangre es un fluido que contiene elementos formes: eritrocitos, leucocitos y plaquetas contenidos en el plasma. El origen de las células sanguíneas es a partir de las células endoteliales del saco vitelino y de la membrana alantoldea. La formación de la sangre en el embrión empieza hasta la quinta semana de gestación y ocurre primero en el mesenquima embrionario sobre todo en el hígado, después en el bazo y finalmente en la médula ósea y en los ganglios linfáticos. Las células mesenquimatosas que rodean a los vasos endoteliales primitivos, se diferencian en elementos de los tejidos muscular y conectivo (1). En el humano, el volumen de la sangre es de cinco a siete litros en promedio en un adulto clínicamente sano, esto es alrededor del 8% de su peso corporal.

I.1.1.1. Componentes celulares y funcionamiento de la sangre

Los eritrocitos o glóbulos rojos son células que contienen una proteína llamada hemoglobina, cuya función más importante es el transporte del oxígeno y del bióxido de carbono. Los leucocitos o glóbulos blancos participan generalmente en la defensa celular y humoral del organismo contra sustancias extrañas. También son capaces de efectuar movimientos ameboides que les ayudan a circular por los vasos sanguíneos y poder penetrar en el tejido conectivo (diapedesis). Las

plaquetas o trombocitos producen la tromboplastina la cual es importante para el mecanismo de la coagulación. El plasma es un líquido que transporta las células sanguíneas así como los materiales nutritivos provenientes del aparato digestivo, bazo e hígado entre otros y las sustancias de desecho producidas en los tejidos (2).

1.1.1.2. Ontogenia hematopoyética

Durante la gestación, la formación de las células sanguíneas empieza con la célula tronco que es un derivado del mesodermo, los precursores hematopoyéticos se pueden detectar en la sangre fetal desde la quinta semana. Inicialmente las células hematopoyéticas son producidas por el saco vitelino embrionario; para la sexta semana, la hematopoyesis continúa ahora también en el hígado embrionario. Para la doceava semana en el bazo fetal comienza a contribuir a la hematopoyesis y en médula ósea empieza a ser activa a partir de la dieciseisava semana (**Figura 1**). Mientras que en los ganglios linfáticos y en el timo se da la producción de los linfocitos a partir de la dieciseisava semana de gestación (**7-10**).

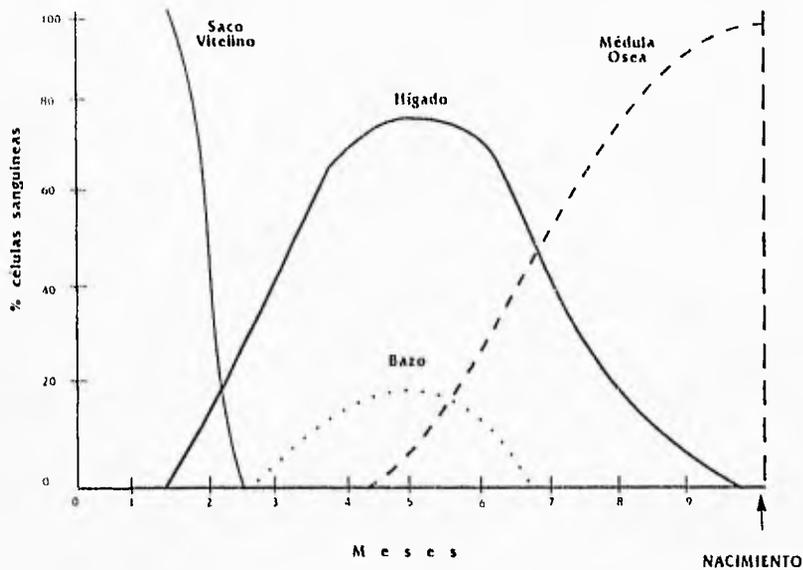


Figura 1. Desarrollo ontogénico de la hematopoyesis.

1.1.2. Hematopoyesis

1.1.2.1. Definición

La hematopoyesis es el proceso mediante el cual se forman las células sanguíneas a partir de la proliferación y diferenciación de la célula tronco hematopoyética y la maduración de las extrípes producidas: eritroide, mielóide, linfóide y megacariocítica.

1.1.2.2. Célula tronco hematopoyética

La célula tronco también es conocida como: stem cell, célula tallo, célula totipotencial, célula pluripotencial y célula madre. Las propiedades que caracterizan a la célula tronco (3) son:

- No está terminalmente diferenciada; es decir, no se encuentra en la etapa final de un camino de diferenciación.
- Al dividirse su progenie puede ser de dos tipos: células que continúan a lo largo del camino de diferenciación hasta alcanzar el estado terminal, o bien células con las mismas características de la célula tronco (autoperpetuación).

La célula tronco da una célula hija que conserva las características de la célula madre y otra célula que dará origen a las cuatro extirpes mencionadas anteriormente. De acuerdo a su microambiente hematopoyético y a la interacción de las interleucinas y los factores de estimulación de crecimiento (**Apéndices I y II**) se producirán las extirpes eritroide, mielóide, linfóide o megacariocítica. **Figura 2.**

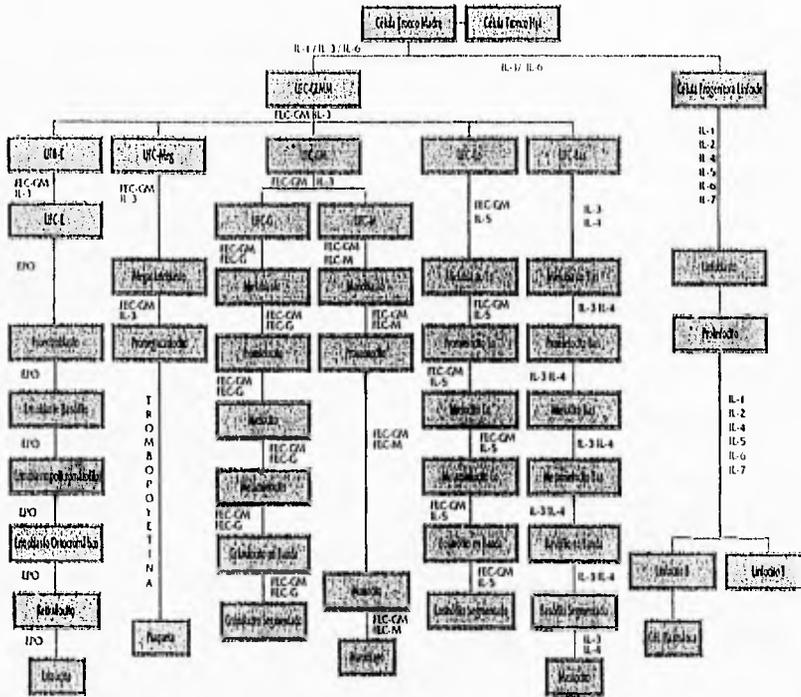


Fig. 2 Origen de las células sanguíneas a partir de la célula tronco hematopoyética (El diagrama fue cortesía de Sandoz & Shering-Plough)

1.1.2.3. Unidad formadora de colonia

Mayani y Lansdorp (4) mostraron que las células tronco derivadas de la médula ósea adulta o de cordón umbilical pueden separarse en diferentes subpoblaciones de acuerdo a la expresión del antígeno CD45RA (isoforma del antígeno común de los leucocitos) y del antígeno CD71 (receptor de transferrina). De esta forma, las células tronco que expresan altos niveles de CD45RA y bajos niveles

de CD71 darán origen a los progenitores mieloides (UFC-G), mientras que las células tronco que expresan bajos niveles de CD45RA y altos niveles de CD71 darán origen a los progenitores eritroides (UFC-E). En contraste las células tronco que expresan bajos niveles de CD45RA y de CD71 darán origen a los progenitores mixtos (UFC-GEMM).

Por lo que las unidades formadoras de colonias (UFC), son células que se originan de la diferenciación de la célula tronco. Cabe resaltar la amplia participación de la interleucina 3 durante la diferenciación hacia la línea mieloide y la línea eritroide.

Existen dos tipos de progenitores eritroides: la UFB-E y UFC-E, estos representan estadios secuenciales de la maduración eritroide. Las células formadoras de "bursas" eritroides (UFB-E), se les denomina así por su característica de crecer *in vitro* formando agrupaciones de varias colonias. La célula formadora de colonia eritroide (UFC-E) es el progenitor maduro, probablemente el precursor inmediato del proeritroblasto. Produce colonias de tamaño pequeño que están constituidas por células que contienen hemoglobina, la eritropoyetina actúa estimulando la división celular de los progenitores eritroides y su posterior maduración a proeritroblasto.

La unidad formadora de megacariocitos (UFC-Meg) requiere la presencia de dos factores de crecimiento: La trombopoyetina y el factor de estimulación del crecimiento megacariocítico. Este último, probablemente estimula la proliferación y el inicio de la maduración megacariocítica, mientras que la trombopoyetina actúa a nivel de endoreduplicación y la posterior maduración del megacariocito.

Las características más importantes de la UFC-GEMM (5,6) son: el tamaño de la célula que oscila entre los 25 a 30 μ de diámetro, el núcleo ocupa el 75% del área celular, los nucleolos son visibles y el citoplasma presenta afinidad tintoreal basofílica. Esta unidad de colonias mixta contribuye a la producción de los granulocitos, eritrocitos, monocitos y macrófagos (Apéndice I).

En la diferenciación hacia la línea linfocítica intervienen las Interleucinas 1 y 6, dependiendo si la maduración va hacia linfocito B o T respectivamente.

1.1.3. Médula ósea

1.1.3.1. Localización de la médula ósea y sitios de su hematopoyesis

La médula ósea se localiza en el hueso esponjoso y puede ser de dos tipos:

- La médula amarilla la cual contiene células adiposas, osteoblastos y osteoclastos.
- La médula roja que contiene las células hematopoyéticas.

Al nacer y hasta los cuatro años de vida en promedio la médula ósea casi en su totalidad es roja y solo una porción es médula amarilla, después de los cuatro años de edad la médula roja se forma en las porciones proximales de los huesos largos y de los huesos planos (cráneo, vértebras, tórax, hombros y pelvis), el resto del espacio medular está ocupado por médula amarilla (11).

En promedio a los veinticinco años de edad la hematopoyesis está limitada a la médula ósea de cráneo, costillas, esternón, omóplatos, clavículas, vértebras, pelvis y la mitad superior de la cresta ilíaca, así como extremos proximales de los

huesos largos (10), para este tiempo la médula ósea representa 2 a 2.5% del peso corporal de un adulto clínicamente sano (11). Después de los setenta años de edad, la celularidad de la médula ósea decrece cerca del 30% en las zonas mencionadas anteriormente (12).

1.1.3.2. Componentes celulares de la médula ósea

Se encuentran varias extirpes celulares en la médula ósea entre las cuales están las células rojas o serie roja conocida como eritrocitos y células blancas o serie blanca (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos y linfocitos), así como los megacariocitos, osteoblastos, osteoclastos y las células adiposas.

1.1.4. Desarrollo hematopoyético

1.1.4.1. Eritrocito

Dentro de la unidad formadora de colonia eritrocítica (LIFC-E) se encuentra las Islas eritroblásticas las cuales están formadas por uno o dos centros de macrófagos y alrededor de ellos van a madurar los eritrocitos (12), pasando por los siguientes estadios:

Proeritroblasto

Es el más primitivo de los estadios de maduración del eritrocito, mide de 20 a 25 μ de diámetro, su forma es oval o redonda. El núcleo ocupa un 80% del área total de la célula, la cromatina es laxa y se distribuye en cúmulos, presenta uno o varios nucleolos. El citoplasma contiene ferritina, que es

detectable cuando se utiliza la tinción del azul de Prusia (AP); cuando se llega a teñir con fosfatasa ácida (FAC) indica una naturaleza lisosomal, esta FAC es diferente a la de los granulocitos; si se tiñe con mieloperoxidasa (MPO) indica la presencia de hemoglobina ya que la densidad citoplasmática será difusa (12).

Eritroblasto basófilo

Son células más pequeñas que los proeritroblastos, miden de 16 a 18 μ de diámetro, el núcleo ocupa el 75% del área celular, la cromatina es laxa y se aglutina en la proximidad de la membrana nuclear, los nucleolos desaparecen, en el citoplasma se da la síntesis de hemoglobina. Este estadio de maduración es detectable por medio de la tinción del AP.

Eritroblasto policromatófilo

Su tamaño oscila de los 12 a 15 μ de diámetro, el núcleo ocupa el 25% del área celular, la cromatina está definida en cúmulos y semeja una red. El citoplasma se vuelve más acidófilo debido a la síntesis de hemoglobina, es positivo a la tinción del AP.

Eritroblasto ortocromático

Mide de 10 a 15 μ de diámetro, el núcleo es excéntrico, ocupa un 25% del área celular debido a su fragmentación; la cromatina se condensa; el citoplasma contiene más hemoglobina. Es positivo a la tinción AP.

Retículo

El tamaño es de 8 a 10 μ de diámetro, primero se da la enucleación. El citoplasma contiene el RNA residual y mitocondrias; después se dispersan los

filamentos intermedios y los microtúbulos se van a las orillas. Se tiñe con AP. Constituyen el 1% de los glóbulos rojos circulantes, la maduración la adquiere en sangre periférica después de que sale al torrente sanguíneo.

Eritrocito

Mide de 7 a 8.5 μ de diámetro, su forma es bicóncava, carece de núcleo, por lo que no es capaz de sintetizar proteínas y lípidos; presenta un alto contenido de hemoglobina. La membrana eritrocitaria es un complejo bifosfolipídico que está compuesto de carbohidratos, lípidos y proteínas lo que le da flexibilidad a la célula. Se reconoce con la tinción del AP (10,12).

I.1.4.1.1. Bioquímica

El eritrocito presenta una vida media de 100 a 120 días en sangre periférica, durante ese intervalo de tiempo se ha visto que existe una disminución en el contenido de enzimas glicolíticas, ATP, lípidos y proteínas.

La destrucción del eritrocito se produce en el sistema fagocítico-mononuclear del bazo, hígado y médula ósea; ya destruido el eritrocito, la globina es hidrolizada y utilizada en la síntesis de aminoácidos, el hierro liberado es fagocitado y transportado por la transferrina a las células eritroides primarias en donde se realiza una nueva síntesis de hemoglobina (12).

1.1.4.1.2. Ontogenia y tipos de hemoglobina

El proceso de maduración del eritrocito es en el saco vitelino, cuyos eritroblastos son remplazados para el segundo mes de gestación por eritocitos derivados de la eritropoyesis hepática. Entre el tercero al séptimo mes de gestación la producción de los eritrocitos se da en el bazo; y a partir del quinto mes los eritrocitos se pueden ya reconocer en la región central de la médula ósea. Al momento del nacimiento cesa la producción de eritrocitos en la fase hepática y la médula ósea será la única productora de eritrocitos (12).

Durante la secuencia de aparición del eritrocito en los diferentes órganos se da una variedad de hemoglobinas (8). La primera globina producida se le conoce como Gower I (13,14) que esta en el estado embrionario y es de tipo α . Cuando se detecta en el saco vitelino es de tipo Gower II y la hemoglobina será de tipo γ y α , y se van a localizar en hígado, bazo y médula ósea, para la onceava semana de gestación empieza aparecer la hemoglobina tipo β que estará presente en el estado adulto del individuo (8).

1.1.4.2. Plaqueta

Las principales características diferenciales de los estadios de maduración de esta célula son: la morfología nuclear, el aspecto del citoplasma y los cambios relativos en tamaño.

Megacarioblasto

Presenta un tamaño de 6 a 24 μ de diámetro, con una secuencia de maduración diferente a otras células medulares, ya que la maduración nuclear se adelanta y termina antes de que empiece la maduración del citoplasma (10). Se reconocen citoquímicamente con la tinción del ácido peryódico de Schiff (PAS).

Promegacariocito

El tamaño de este tipo celular oscila entre los 14 a 30 μ de diámetro. El citoplasma contiene gránulos azurófilos visibles, aparecen primero en la región perinuclear o en el aparato de Golgi y posteriormente en el resto del citoplasma; el núcleo es lobulado, y los nucleolos son aún visibles (10,12).

En esta etapa empieza a desarrollarse en el citoplasma un sistema membranoso de demarcación, que se forma por invaginaciones de la membrana plasmática, de este modo se separan áreas pequeñas del citoplasma que finalmente se convertirán cada una en plaquetas (10). Citoquímicamente es positivo a la tinción de PAS.

Megacariocito granular

El tamaño oscila entre los 16 a 56 μ de diámetro, el número de los gránulos y el sistema membranoso de demarcación aumenta. El núcleo es multilobular y los nucleolos desaparecen. La cantidad del citoplasma aumenta de forma notable.

Los megacariocitos producen de siete a ocho pro-plaquetas que posteriormente se transformarán en plaquetas; el núcleo permanece en médula ósea y se piensa que degenera y es eliminado por el sistema de macrófagos (10). Se reconoce por la tinción de PAS.

Plaqueta

Tiene un diámetro de 2 a 4 μ es de forma redonda u oval. Con los colorantes de Romanowski se observan dos zonas: la zona agranular intensamente basófila que suele ser central y la zona periférica que es homogénea y pálida. No se observa el núcleo. La plaqueta tiene una vida media de nueve días y medio (10,12). Es positivo a la tinción de PAS.

1.1.4.2.1. Fisiología

Las plaquetas realizan la vigilancia pasiva del revestimiento endotelial de los vasos sanguíneos debidos a una fisura o ruptura. Cuando las células endoteliales se separan estas plaquetas se adhieren a las fibras de colagena expuestas al subendotelio y evitan que la sangre escape. En caso de una lesión en la que hay ruptura real del revestimiento endotelial, las plaquetas reaccionan formando un agregado, conocido como tapón plaquetario, que detiene el sangrado. Mientras que los fosfolípidos de las membranas endoteliales llevan acabo una reacción de superficie que activa al fibrinógeno para la formación de fibrina, que sirve para estabilizar el tapón plaquetario inicial y la masa entera final se llama tapón

plaquetario secundario. Otra función es la de promover la separación tisular después de una lesión (2,12).

1.1.4.3. Neutrófilo

Mieloblasto

Es la célula más primitiva de los estadios de maduración del neutrófilo por lo tanto indiferenciada, cuyo tamaño oscila entre los 15 a 20 μ de diámetro; el núcleo es grande en relación al citoplasma, los nucleolos son visibles y contienen proteínas ribosomales, la cromatina es laxa, el citoplasma es azurófilo (15).

Promielocito

La célula presenta un tamaño de 15 a 20 μ de diámetro, el núcleo es grande con algunos nucleolos; el citoplasma presenta gránulos conocidos como gránulos primarios (gránulos azurófilos o gránulos grandes), los cuales miden unos 500nm de diámetro, algunos de ellos están conectados por pequeños filamentos, la membrana de estos gránulos es fosfolipídica y contiene enzimas como FAC, MPO, hidrolasa ácida, lisozimas y mucopolisacaridos que contienen sulfatos, que los hacen positivos a las tinciones citoquímicas respectivas.

Mielocito

La célula tiene un tamaño que varía entre los 12 a 18 μ de diámetro, el núcleo disminuye en cuanto a tamaño, presenta una muesca central, la cromatina por

lo tanto se condensa, los nucleolos desaparecen por completo; el citoplasma cesa la producción de los gránulos primarios, mientras que origina los gránulos secundarios (gránulos específicos o gránulos pequeños), cuyo tamaño es de 200nm de diámetro, la membrana de los gránulos secundarios también es fosfolípida. Citoquímicamente son positivos a las tinciones de FAL, Sudan B, FAC y MPO.

Metamielocito

El tamaño de la célula oscila entre los 10 a 15 μ de diámetro, el núcleo presenta una depresión central mucho mayor, la cromatina es compacta, los nucleolos ya no son apreciables; el citoplasma contiene una mayor cantidad de gránulos secundarios, los gránulos primarios ya no aumentan en número. Citoquímicamente se puede distinguir este estadio de maduración por medio de la FAL, así como de la MPO.

Granulocito en banda

El tamaño varía de 9 a 15 μ de diámetro, el núcleo tiene una depresión central que casi llega a un cuarto del puente cromatínico; el citoplasma se vuelve cada vez más azurófilo debido a la presencia de los gránulos secundarios. En este estadio de maduración la célula ya se puede encontrar en sangre periférica. Citoquímicamente la intensidad positiva hacia FAL y a MPO es mayor.

Granulocito segmentado o Polimorfo Nuclear

Presenta un tamaño de 8 a 15 μ de diámetro, el núcleo es segmentado puede tener dos o más lóbulos, los cuales están conectados por un filamento nuclear delgado, la cromatina por lo tanto esta condensada; el citoplasma es azurófilo debido a que los gránulos secundarios que son más abundantes que los primarios. Citoquímicamente, se aumenta la intensidad positiva hacia FAL y MPO.

1.1.4.3.1. Fisiología

El neutrófilo protege al organismo de infecciones (actúa migrando a él sitio de infección por medio de factores quimiotácticos o por quimiotoxinas las cuales son generadas por la Interacción de anticuerpos con antígenos); los neutrófilos Ingieren a los microorganismos por medio de pseudopodos (fagosoma), los gránulos citoplasmáticos descargan su contenido en el fagosoma (degranulación) y de esta forma destruye a los microorganismos.

1.1.4.3.2. Bioquímica

El citoplasma de los neutrófilos contiene glucógeno y agentes antioxidantes que permiten destruir a los microorganismos.

Los gránulos citoplasmáticos son de tres tipos:

- a) El gránulo primario que es similar a los lisosomas el cual decrece conforme avanza la maduración celular, contiene proteínas microbóticas como la

peroxidasa la cual cataliza la oxidación de las estructuras celulares de los microorganismos, proteínas catiónicas que son de defensa contra invasores nocivos, así como enzimas que catalizan reacciones degradativas que incluyen la hidrólisis de proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos, estererasas y elastasas (10,12).

- b) Los gránulos secundarios son de secreción, destruyen a los microorganismos y ayudan en los sitios de inflamación (12).
- c) Los gránulos terciarios a pesar que se desconoce su origen se sabe que son también de secreción (16).

La superficie de la membrana es fosfolipídica por lo que facilita la entrada y salida de ciertas sustancias. El núcleo presenta todas las formas de RNA que necesita para la síntesis y que va decreciendo conforme va madurando la célula, en cambio el DNA no tendrá cambio alguno (10).

1.1.4.3.3. Producción y Distribución

Los neutrófilos se producen de la siguiente forma:

En médula ósea se dan dos divisiones mitóticas, en la primera división, la célula es capaz de sintetizar DNA y dar los tres primeros estadios de maduración este proceso dura de tres a seis días aproximadamente. La segunda división es la post-mitótica que corresponde a los tres estadios posteriores de maduración y dura de cinco a siete días para después ser liberado a la sangre periférica. En sangre periférica el neutrófilo permanece unas seis a diez horas para después continuar

hacia tejido. Posteriormente en el tejido los neutrófilos duran de uno a dos días más, para después ser degradados.

Finalmente los sitios en donde se puede localizar a los neutrófilos son pulmón, tracto intestinal, hígado, bazo y superficie de la mucosa nasal.

1.1.4.4. Eosinófilo

Como se observa en la **Figura 2** el eosinófilo presenta los mismos estadios de maduración que el neutrófilo, por lo tanto solo se comentara sobre el último estadio de maduración.

La célula tiene un tamaño que oscila entre los 12 a 17 μ de diámetro; el núcleo es bilobulado. El citoplasma presenta un solo tipo de gránulo, visto en microscopía electrónica son de forma ovoide, con un centro opaco o cristalino el cual esta rodeado por una densa matriz formada por arginina, que es insoluble a pH fisiológico; además se encuentran otras proteínas catiónicas como son la MPO, FAC, aril-sulfatasa, glucoronidasa, catepsinas. Y también se encuentran los fosfolípidos; por lo que citoquímicamente los eosinófilos son positivos a la FAC, MPO, Sudan B entre otras tinciones.

1.1.4.4.1. Fisiología

Fagocita y destruye a los microorganismos por medio de las enzimas que están presentes en los gránulos citoplasmáticos, el proceso de destrucción es similar al de los neutrófilos.

1.1.4.4.2. Producción y Distribución

Se producen en médula ósea mediante dos divisiones, la primera dura aproximadamente nueve días y la segunda se lleva en dos días. Posteriormente se distribuyen a sangre periférica, en donde se ha observado que duran solo unas horas (de una a ocho horas) y después viajan hacia tejido. En tejido duran unos días más, para después ser destruidos. Se pueden encontrar principalmente en piel, pulmón, tracto Intestinal, en mucosa nasal o en canales linfáticos (10).

1.1.4.5. Basófilo

Presenta el mismo origen de los eosinófilos y los neutrófilos como se observa en la **Figura 2**, por lo tanto solo se comentara sobre el último estadio de maduración.

El tamaño del basófilo oscila entre los 5 a 7 μ de diámetro, el núcleo es bilobulado por lo que la cromatina esta condensada, el citoplasma contiene gránulos ricos en histamina; más grandes en comparación con los otros tipos de gránulos de la extirpe granulocítica, la distribución en el citoplasma es irregular. Citocómicamente son reconocidos por la tinción de PAS y la de MPO.

1.1.4.5.1. Fisiología

Los basófilos actúan como mediadores ante una respuesta inflamatoria, en especial a la hipersensibilidad, esto es debido a los gránulos que liberan la histamina. Posteriormente se transforman en mastocitos.

1.1.4.5.2. Producción y Distribución

La vida media de los basófilos en la médula ósea es corta ya que dura dos días y medio, mientras que en la sangre periférica es de siete días y en tejido unos días más.

Cuando el basófilo se localiza en el tejido se conoce como **célula mastoidea** cuyo sitio de maduración es en tejido conectivo, son células redondas o elongadas cuyo tamaño varía entre los 6 a 12 μ de diámetro, el núcleo no está segmentado por lo que la cromatina está moderadamente condensada. El citoplasma va a presentar filamentos y depósitos de glucógeno, así como lípidos.

1.1.4.6. Monocito

Monoblasto

Mide unas 20 μ de diámetro, el núcleo suele ser ovoide o redondo, presenta una pequeña depresión, la cromatina es laxa y se observan varios nucleolos. Citológicamente es positivo a la esterasa y a MPO(10).

Promonocito

Presenta un tamaño de 14 a 18 μ de diámetro, el núcleo presenta una depresión profunda, la cromatina por lo tanto es condensada, el citoplasma presenta dos tipos de gránulos, una población que contiene las enzimas FAC, aril-sulfatasa y MPO, estos gránulos son análogos a los lisosomas primarios, los cuales se parecen a los primarios de los neutrófilos por microscopía electrónica. Una segunda población de gránulos diferentes a los primarios y secundarios de los neutrófilos cuyo contenido enzimático no se conoce (14).

Monocito

Son células de tamaño entre 12 a 15 μ de diámetro, el núcleo ocupa la mitad del área celular y generalmente es excéntrico, la cromatina se condensa; el citoplasma contiene gránulos primarios y secundarios. Citoquímicamente son positivos a PAS, al Sudan B, a esterasa, a MPO.

Macrófago

Esta célula reside en el tejido y presenta un tamaño de 25 a 50 μ de diámetro, el núcleo es excéntrico el cual presenta una pequeña depresión, suele tener uno o más nucleolos, el citoplasma llega a presentar muescas en las orillas.

1.1.4.6.1. Fisiología

Esta célula forma parte del sistema fagocítico-mononuclear cuyas funciones son variadas, como la fagocitosis y digestión de los microorganismos, secreción de mediadores químicos y reguladores de respuestas inflamatorias, interacción con antígenos y linfocitos en la generación de respuestas inmunes.

1.1.4.7. Linfocito

Linfoblasto

Tiene un diámetro de 10 a 20 μ , el núcleo contiene cromatina fina; son visibles uno o dos nucleolos, la membrana nuclear es densa, el citoplasma es agranular, no posee MPO, lípidos, ni esterasa, pero presenta FAC y glucógeno. Los linfoblastos con potencial para ser células T contienen esterasa del ácido

α -naftil, en tanto que los linfoblastos que pueden originar las células B contienen cantidades pequeñas de inmunoglobulinas que son detectables por medio de técnicas de inmunofluorescencia (FITC y rodamina).

Prolinfocito

Es muy difícil distinguir en médula ósea, mide entre 8 a 10 μ de diámetro, la cromatina es densa y el citoplasma es agranular (10).

Linfocito

Estas células poseen dos tamaños distintos, las células pequeñas o linfocitos T miden entre 7 a 10 μ de diámetro, el núcleo mide 8 μ , la cromatina está condensada y presentan muy poco citoplasma. Las células grandes o linfocitos B llegan a medir entre 11 a 16 μ de diámetro y el núcleo mide aproximadamente unas 10 μ , en cuanto a las demás características son similares a los linfoblastos y prolinfocitos.

Citoquímicamente los linfocitos T se puede detectar por medio de la tinción de PAS, esterasa no específica neutra y ácida, β -glucuronidasa, N-acetil- β -glucosamina y la FAC, mientras que los linfocitos B solo se tiñe con esterasa.

Célula plasmática

Presenta un tamaño de 9 a 20 μ de diámetro, su forma es oval, el núcleo es excéntrico y en ocasiones llega a presentar lóbulos, la cromatina es compacta. En condiciones normales estas células no circulan en la sangre periférica, sino que se localizan en los nódulos linfáticos, tejido conectivo o capilares

arteriales y son derivados de los linfocitos B. Citoquímicamente es positiva a la tinción de PAS y a β -glucuronidasa.

1.1.4.7.1. Fisiología

Los linfocitos constituyen los componentes esenciales del sistema inmune. Los linfocitos T participan en la citotoxicidad, la hipersensibilidad y la producción de linfoquinas, así como la producción de anticuerpos y el funcionamiento de otras células T. Los linfocitos B sintetizan inmunoglobulinas, usualmente bajo el control de las células T reguladoras y se diferencian a células plasmáticas (12).

1.1.4.7.2. Producción y Distribución

Los linfocitos se originan en médula ósea (linfocito B) y en la corteza del timo (linfocito T), las células producidas en estos órganos emigran a áreas linfoyéticas secundarias donde la linfoyesis continúa. El 65 al 85% de los linfocitos son de larga vida con periodos intermitóticos de meses a 5 años, esto se debe a que los linfocitos se quedan en la fase G_0 del ciclo celular, el otro 15 a 35% de los linfocitos son de vida corta y viven de horas hasta 5 días.

1.2. ANTECEDENTES

1.2.1. Transplante de Médula Osea

1.2.1.1. Definición

El Transplante se define como la sustitución de un tejido u órgano dañado por otro en condiciones funcionales optimas y sobre todo histocompatiblemente similar (allogénico) o igual (autólogo e isogénico).

1.2.1.2. Historia del transplante

Se tiene referencia de las transfusiones sanguíneas desde el siglo XVII. En 1667 Lower Inyectó sangre de un cordero a un hombre; en ese mismo año Denis realiza igualmente transfusión sanguínea de cordero a un hombre.

En 1828 James Bundell realizó transfusiones de sangre a pacientes con hemorragia puerperal; en 1875 se tenía registrado por lo menos 347 transfusiones de sangre humana.

Para 1900 Landsteiner descubrió los antígenos del grupo sanguíneo eritrocitario y el desarrollo de anticoagulantes no tóxicos de modo que la sangre puede ser almacenada y usada en transfusiones indirectas (12,17,18). A partir de este año se empezó a tener mayor auge las transfusiones sanguíneas.

Desde 1992 en el Instituto Nacional de Cancerología (INCan) se realizan trasplantes de médula ósea en todas sus modalidades. En 1993 el INCan realizó más de cincuenta autotrasplantes de células mononucleares movilizadas a la sangre periférica (CMMSP) y recolectadas mediante féresis de flujo continuo (19).

Estos autotransplantes se realizaron tanto en pacientes con tumores sólidos como en pacientes leucémicos.

1.2.1.3. Tipos de transplantes

Transplante autólogo.- Tanto el donador como el receptor es la misma persona y es compatible al 100%.

Transplante isogénico o singénico - El receptor y el donador son gemelos univitelinos u homocigotos, es decir, no existe entre ellos ninguna diferencia genética, ni Inmunológica (6).

Transplante alogénico o heterólogo.- El donador y el receptor poseen una notable similitud Inmunológica, pero no son gemelos univitelinos sino habitualmente son hermanos que comparten un mismo sistema HLA (9,12,17).

1.2.2. Cultivo celular

1.2.2.1. Definición

Es reproducir en seres vivos (*in vivo*) o en medios adecuados (*in vitro*) la capacidad que poseen las células de proliferar y también, en ciertos casos, de diferenciarse. Tratando de conservar en lo posible las características morfológicas y genéticas de la(s) célula(s) Inicladora(s).

1.2.2.2. Cultivo *IN VITRO*

Cultivo primario.- Es colocar en una caja de vidrio o plástico una célula o un fragmento de tejido sobre un sustrato sólido en una interfase líquido-gas a temperatura constante. Realizando cambios del medio líquido a intervalos periódicos pero sin alterar el crecimiento de las células sobre el sustrato sólido. Tiene la característica principal de no ser inmortal.

Cultivo secundario.- Se deriva de los cultivos primarios, se le denomina también primera resiembra y consiste en tomar una o varias células del cultivo primario y crecerlas en condiciones similares a las que se encontraba inicialmente. El medio de los cultivos puede ser sólido o semisólido con una interfase sólido-gas o sólido-líquido-gas respectivamente. Una de sus aplicaciones es la propagación de una línea celular.

Línea celular.- Su principal característica es la inmortalidad y es el producto de resembras sucesivas de una clona de células (20).

1.2.2.3. Cultivo de células hematopoyéticas

El estudio de la granulopoyesis *in vitro* se inició en 1966 cuando simultáneamente Bradley y Metcalf en Australia, Plutznik y Sacks en Israel (21) ponen en marcha el cultivo *in vitro* de las células hematopoyéticas de ratón. En 1970 Pike y Robinson adoptan dicha metodología para el cultivo de células hematopoyéticas humanas (22).

El cultivo hematopoyético es un procesamiento *in vitro* de una fase inicial de separación celular de la muestra de médula ósea o de sangre y su posterior suspensión de las células en un medio de cultivo que suele ser semisólido, ya sea en agar, metilcelulosa o plasma coagulado. Estas sustancias proporcionan el soporte adecuado para el crecimiento celular y evitan que las células que crecen formen agrupaciones y emigren del soporte, quedando las células hematopoyéticas y su progenie retenidas en una zona de agrupamiento en la que puede ser detectadas en forma de colonias cuando se observan al microscopio invertido.

Dexter *et al* demostraron que los linfocitos, granulocitos y eritrocitos de médula ósea pueden propagarse en cultivos líquidos, en la cual se formarán monocapas que le servirán de matriz a las células sanguíneas (23,24).

Coulombel (25) y Gordon (26) demostraron que las células mononucleares de médula ósea humana puede adherirse durante un periodo de incubación de dos horas, así como favorecer los precursores estromales para que pueda mantenerse la hematopoyesis por un periodo de cultivo a largo plazo. Además que las UFC-GM están directamente relacionadas con el número de células mononucleares usadas en el cultivo y van disminuyendo conforme pasen los días en cultivo.

Marché-Cova *et al* (27-29) demostraron que las células tronco de CMMSP y las de médula ósea, provenientes de pacientes con cáncer y de donadores, pueden proliferar y diferenciarse hacia los diferentes progenitores hematopoyéticos (UFC-G, UFC-GEMM y UFC-E) al menos por un periodo de doce semanas en un medio de cultivo líquido sin citocinas y sin factores de estimulación del crecimiento. Estos

experimentos también dejaron entrever la posibilidad de que durante dicho tiempo de cultivo se realice la maduración de las diferentes extirpes sanguíneas. De esto último, se deriva el objetivo del presente trabajo.

II. OBJETIVO E HIPOTESIS

II.1. OBJETIVO

Detectar mediante tinciones citoquímicas específicas los estadios de maduración de las extirpes sanguíneas durante la hematopoyesis en cultivo líquido de células tronco movilizadas a la sangre periférica.

II.2. HIPOTESIS

Si en los cultivos líquidos hay proliferación y diferenciación durante la hematopoyesis de células tronco movilizadas a la sangre periférica, entonces se puede ver la maduración de dichas células por medio de tinciones citoquímicas específicas.

III. MATERIALES Y METODOS

III.1. SELECCIÓN DE MUESTRAS

Se trabajó con 16 personas cuyas características clínicas y hematológicas más importantes se resumen en la **Tabla 1**. Las personas se clasificaron en tres grupos:

- A) Con diagnóstico de malignidad y médula ósea con hematopoyesis normal.
- B) Con diagnóstico de malignidad y médula ósea con hematopoyesis malignizada.
- C) Donadores.

III.2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Las personas de los grupos A y B, excepto el caso 3 (**Tabla 1**) recibieron una dosis fija de FEC-G de 600 μ g/24 H, durante 6 días continuos para movilizar sus células mononucleares a la sangre periférica, estas células se recolectaron durante tres días seguidos a partir del quinto día de la aplicación del FEC-G, mediante fésis de flujo continuo. Los productos de leucofésis ó CMMSP (muestras) fueron proporcionados por el Departamento de Hematología del INCan.

En el grupo C se utilizaron dos unidades de sangre las cuales fueron proporcionadas por el Banco de Sangre del INCan.

III.3. CONCENTRADO LEUCOCITARIO (30,31)

Se tomó una alícuota de 0.5 ml de cada una de las diferentes muestras, se colocó en tubo de Wintrobe y se centrifugó a 3,000 rpm. por 15 minutos a temperatura ambiente (centrífuga clínica BECKMAN). Obteniéndose así el concentrado leucocitario de cada muestra.

En cada concentrado leucocitario se determinó viabilidad celular por exclusión del azul Tripano (0.4%) en dos alícuotas de 10 µl cada una, el número de células y la cuenta diferencial por autoanalizador en una alícuota de 100 µl.

III.4. CULTIVO DE CMMSP (27-29)

Se sembraron 50,000 células/ml en cajas de petri (NUNC) de 4 x 12mm, con α -MEM, fitohemaglutinina (2%) y suero fetal de carnero [SFC] (20%), todos los cultivos se realizaron por triplicado. Los cultivos se mantuvieron a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% y cada tercer día se retiró una caja de cultivo para su procesamiento citoquímico.

III.5. PROCESAMIENTO DE LAS CÉLULAS EN CULTIVO PARA LAS TINCCIONES CITOQUÍMICAS

Se retiró el sobrenadante de las cajas, se vertió en tubos Eppendorff de 2 ml. Se centrifugó en una microfuga (BECKMAN) a 15,000 rpm por ocho segundos, obteniendo así una pastilla. Se eliminó el medio de cultivo y la pastilla se resuspendió en PBS, para posteriormente volver a centrifugar el mismo tiempo, se

realizaron tres lavados más con PBS, centrifugando entre cada lavado y finalmente la pastilla se resuspendió en agua bidestilada.

Posteriormente se realizaron frotis de gota, los cuales consistieron en poner 6 gotas por portaobjetos de cada una de las muestras (gotas de 10 μ l), se revisaron al microscopio invertido (Olympus), y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Ya realizados los frotis de gota se rotularon y se guardaron para realizar posteriormente la tinción de **Wright** y las tinciones citoquímicas correspondientes:

- **Mieloperoxidasa**
- **Fosfatasa Alcalina Leucocitaria**
- **Fosfatasa Ácida**
- **Azul de Prusia**

III.6. TINCION DE WRIGHT (32)

Fundamento

Uno de los colorantes de Romanowsky más ampliamente utilizado es el empleado en la tinción de Wright. La propiedad más notable es la de lograr sutiles diferencias de tonos y tinción diferencial de las estructuras celulares en base a la combinación de un colorante ácido (eosina) y otro básico (azul de metileno).

Los grupos ácidos de las estructuras celulares son afines al azul de metileno, mientras que los básicos a la eosina. Por consiguiente las diferencias de tinción observadas son producto del grado de acidez o basicidad de dichas estructuras a pH fisiológico; así como del tiempo de tinción.

Técnica

La técnica original aparece en el **Apéndice III**.

1. Poner los frotis en forma horizontal y cubrir con el colorante de Wright por intervalo de diez minutos.
2. Pasado este tiempo se le añade el amortiguador de fosfatos de pH 7.2 por un periodo de quince minutos, en ese momento se forma una película de brillo metálico.
3. Se Lavan los frotis con suficiente agua corriente.
4. Se dejan secar los frotis para después ser montados con bálsamo de Canadá.

Interpretación

- Núcleos de leucocitos: Violeta rojizo.
- Gránulos eosinófilos: Rojo brillante hasta rojo pardusco.
- Gránulos basófilos: violeta oscuro.
- Gránulos de neutrófilos: violeta claro.
- Citoplasma de linfocitos: azul.
- Citoplasma de monocitos: azul grisáceo.
- Eritrocitos: rosa pálido.

III.7. TINCIONES CITOQUÍMICAS

III.7.1. Mieloperoxidasa (33)

Fundamento

La mieloperoxidasa es una enzima a base de porfirina de hierro, que se localiza en los gránulos primarios de las células mieloides y de los monocitos, formando parte del sistema oxígeno dependiente antimicrobiano.

La peroxidasa cataliza la reducción del agua oxigenada por la benzidina dando lugar a un complejo colorido que va del azul hasta el café en el sitio de reacción (gránulos primarios).

Técnica

La técnica original se describe en el **Apéndice IV**.

1. Introducir los frotis en la mezcla de incubación durante dos minutos.
2. Lavar con agua corriente y secar a temperatura ambiente.
3. Contrastar con safranina al 0.5% por un minuto.
4. Lavar con agua corriente y montar con bálsamo de Canadá.

Interpretación

- Gránulos de los neutrófilos (en cualquier estado de desarrollo): azul intenso.
- Gránulos de los eosinófilos: café o verde a negro.
- Gránulos de los basófilos: azul intenso a negro.
- Gránulos de los monocitos: azul pálido.
- Citoplasma y núcleo de los granulocitos y monocitos: rojo pálido.
- Linfocitos, eritrocitos, plaquetas y blastos son negativos: rojo pálido.

III.7.2. Fosfatasa Alcalina Leucocitaria (34,35)

Fundamento

La Fosfatasa Alcalina Leucocitaria es una técnica citoquímica para la determinación de Leucemia Mielóide Crónica (LMC) y de otras enfermedades de tipo mielo-proliferativa, especialmente la Mielofibrosis, la Policitemia Vera y otros procesos inflamatorios.

La enzima que se localiza en los gránulos secundarios, se expone al sustrato (fosfato naftol) en presencia de una sal de diazonio a pH alcalino de 9.5. El sustrato se hidroliza por la enzima, eliminando un fosfato y axil-naftol-amida, que se une inmediatamente con la sal de diazonio, formando un colorante azo-insoluble de color marrón.

Técnica

La técnica original se describe en el **Apéndice IV**.

1. Introducir los frotis en la mezcla de incubación recién preparada, por treinta minutos.
2. -Lavar con agua bidestilada por diez segundos y secar al aire.
3. -Contrateñir con azul de Comaslee por un minuto.
4. -Lavar con agua corriente y secar al aire
5. -Montar con Aquatex (Merck) y observar al microscopio de campo claro.

Interpretación

La tinción aparece solamente en el citoplasma de algunas formas en banda y de granulocitos segmentados.

- Gránulos secundarios: rosa pálido a rojo brillante.
- Citoplasma: rojo.
- Núcleo: azul-negro.
- Todas las demás formas hematopoyéticas incluyendo las plaquetas no se tiñen.

III.7.3. Fosfatasa Acida (36,37)

Fundamento

La actividad enzimática de la fosfatasa ácida se ha detectado en los linfocitos; con patrones variables de tinción. Cuando se incuba con el ácido naftol-AS-BI-fosfórico se detecta la actividad enzimática específicamente en las células T linfoblásticas y en células plasmocíticas. También, la FAC de células neoplásicas de pacientes leucémicos se puede inhibir con el ácido tartárico.

Esta enzima cataliza la hidrólisis de esteres fosfóricos en un medio ácido. A partir del naftol-AS-BI-fosfato se libera el naftol-AS-BI y una sal de diazonio, para dar un azo-colorante pardo-rojizo que se precipita en la células.

Técnica

La técnica original se describe en el **Apéndice IV**.

1. Introducir los frotils en la mezcla de incubación por tres horas y guardar en oscuridad.
2. Lavar con agua bidestilada durante veinte segundos.
3. Contrateñir con azul de Comisare por un minuto.

4. -Lavar con agua corriente.

5. Secar al aire y montar con Aquatex (Merck), observar al microscopio.

Interpretación

La reacción citoquímica de la fosfatasa ácida ha sido especialmente útil en el estudio de las células T linfoides tanto normales como leucémicas y el color de las células positivas es de color pardo rojizo.

III.7.4. Azul de Prusia (38,39)

Fundamento

Los gránulos sideróticos son gránulos de hierro, que pueden ser de ferritina y/o hemosiderina dependiendo de las condiciones en que se encuentre la célula. En condiciones normales, se localizan depósitos en el citoplasma de los eritroblastos y eritrocitos de médula ósea cuya síntesis de hemoglobina se está llevando a cabo, por lo que estas células reciben el nombre de sideroblastos y siderocitos respectivamente.

El hierro de los gránulos sideróticos al combinarse con el ferrocianuro de potasio en medio ligeramente ácido, forma un precipitado azul intenso de ferrocianuro férrico.

Técnica

1. Fijar los frotis con metanol por diez minutos.
2. Lavar con agua desionizada y dejar secar.
3. Adicionar la mezcla de incubación por un período de treinta minutos.

4. Lavar durante cuatro minutos con agua corriente.
5. Contrastar con safranina por un minuto.
6. Lavar con agua corriente y dejar secar al aire.

Interpretación

- Gránulos sideróticos debido a la ferritina: azul claro a verde claro
- Gránulos debido a la hemosiderina: azul intenso a negro.
- Todos los gránulos sideróticos: rojo pálido.

TABLA 1.- DATOS CLÍNICOS Y HEMATOLOGICOS MAS IMPORTANTES DE LOS CASOS ESTUDIADOS

GRUPO Y CASO	SEXO/EDAD	DIAGNOSTICO	PARAMETROS HEMATOLOGICOS*		
			Hb	LEUC x 10 ⁹	PLQTS x 10 ⁹
A.1	M/31	LINFOMA NO HODGKINS	14.2	10.3	95
A.2	M/29	CARCINOMA TESTICULAR	15.9	17.3	880
B.3	M/40	LEUCEMIA BLASTICA	15.3	11.0	95
B.4	M/29	LMC (T)	12.2	23.2	470
B.5	M/38	LMC	13.1	11.0	510
B.6	M/40	LMC (T)	12.5	11.7	69
B.7	M/39	LMC	12.0	11.7	177
B.8	M/44	TMA	11.0	11.0	110
B.9	M/30	LMC	11.0	11.0	110
B.10	M/54	LMC	11.0	11.0	110
B.11	M/45	LMC	11.0	11.0	110
B.12	M/63	LMC	11.0	11.0	110
B.13	M/72	LMC	11.0	11.0	110
B.14	M/72	LMC	11.0	11.0	110
B.15	M/72	LMC	11.0	11.0	110
B.16	M/71	LMC	11.0	11.0	110

*Hb: Hemoglobina LEUC: Leucocitos PLQTS: Plaquetas

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

Grupo A

Tanto el caso 1 que corresponde al Linfoma No-Hodgkin's; así como el caso 2 que pertenece a Carcinoma Testicular se mantuvieron en cultivo por un periodo de doce semanas, ambos casos presentaron un comportamiento muy semejante en cuanto al desarrollo de las células hematopoyéticas. A continuación se describe cada uno de los casos y sus tinciones correspondientes:

Caso 1

Tinción de Wright

Se observó en el día cero de cultivo un 11% de monocitos, el cual fue aumentando notablemente hacia la primera semana con un 35%, mientras que para la cuarta semana de cultivo se observó un 39% de estas células, disminuyendo a un 20% para la octava semana y al final del cultivo se obtuvo un 10% de monocitos.

También se identificaron mieloblastos pero no al inicio del cultivo sino al cabo de la primera semana en un 18%, que posteriormente aumentó a 20% en la cuarta semana y de ahí en adelante no se volvieron a observar.

Esto nos indica que los mieloblastos, comenzaron a madurar hacia el siguiente estado de maduración de la extirpe.

Al igual que con los mieloblastos no se obtuvo en el día cero de cultivo promielocitos, sino hasta la primera semana de cultivo en un 2%, para la cuarta

semana se incrementó a un 18%, en la octava semana de cultivo aumentó a un 60% y finalmente disminuyó en la doceava semana de cultivo hasta un 15%.

Lo que hace pensar que las células promielocíticas estaban madurando hacia su siguiente estadio.

También se encontraron mielocitos y metamielocitos los cuales aparecieron en la cuarta semana de cultivo en un 10%, aumentando a un 20% para la octava semana, y al final de la doceava semana de cultivo se presentó un 75%.

Lo anterior corrobora que las células estaban madurando hacia polimorfonuclear. Por lo que si se hubiera suplementado el cultivo con factores de estimulación para dicha extirpe tal vez se hubieran desarrollado los dos últimos estadios de maduración de los granulocitos (**Tabla 2 y Figura 3**).

Por lo que se puede concluir que al inicio del cultivo se tenía células indiferenciadas, las cuales fueron diferenciándose y madurando hacia la serie granulocítica conforme transcurrió el tiempo de cultivo, lo que se corroboró con las tinciones de MPO y FAL, que a continuación se explican.

Tinción de MPO

En la primera semana de cultivo se observó un 0.8% de células positivas, el cual fue aumentando constantemente, así en la segunda semana de cultivo se obtuvo un 5%, en la cuarta semana 16%; en la sexta semana un 29%, en la octava semana de cultivo un 50%, en la décima semana un 60% y finalmente para la doceava semana de cultivo se observó un 72% de células positivas (**Tabla 3, Figuras 4 y 9A**).

Los datos obtenidos en esta tinción muestran que las células sembradas en el cultivo eran inmaduras, fueron diferenciándose y madurando conforme avanzaba el tiempo, ya que presentan un alto porcentaje de positividad a la tinción en las últimas semanas de cultivo.

Tinción de FAL

En la primera semana de cultivo la tinción fue negativa, en la segunda semana de cultivo presentó 1% de células positivas, para la cuarta semana de cultivo se tenía un 10% de células positivas y en la sexta semana se tuvo un 13%, mientras que en la octava semana de cultivo presentó un 17% de células positivas, en cambio para la décima semana el porcentaje disminuyó al 10% y en la doceava semana se tenía sólo un 3% (Tabla 3 y Figura 4).

Esto indica que a partir de la segunda semana de cultivo se obtuvieron mielocitos y metamielocitos, conforme avanzó el tiempo las demás células iban madurando hacia estos estadios, pero en la octava semana de cultivo estas células maduras fueron entrando en un proceso apoptótico, por tal motivo al final del cultivo se observó un bajo porcentaje de células positivas a la tinción.

Caso 2

Tinción de Wright

Al realizar esta tinción se pudo observar que en el día cero de cultivo se tuvo un 35% de monocitos, los cuales fueron disminuyendo en la primera semana a un

25%, en la cuarta semana a un 15%, aumentando ligeramente a un 20% en la octava semana y finalmente se observó un 10% de estas células en la doceava semana.

Los mieloblastos fueron apareciendo a partir de la primera semana de cultivo en un 7%, mientras que en la cuarta semana de cultivo se tenía un 15% y ya no se observaron en las semanas subsecuentes. Por lo que los mieloblastos continuaron a los siguientes estadios de maduración.

Con respecto a los promielocitos se pudo observar que estos se presentaron a partir de la cuarta semana de cultivo en un 10%, aumentando notablemente para la octava semana a un 45% y finalmente disminuyeron a un 9%, para el final del cultivo.

Esto hace pensar que los promielocitos fueron diferenciándose hacia los siguientes estadios de maduración de los granulocitos.

Los mielocitos y metamielocitos aparecieron en la cuarta semana en un 7%, aumentando a un 19% en la octava semana y notablemente en la doceava semana alcanzaron un 75% (Tabla 2 y Figura 3).

Finalmente, se observó también a partir del primer mes de cultivo la presencia de megacarioblastos (Figura 7A) que fueron madurando a promegacariocitos en el transcurso del segundo mes (Figura 7B), hasta madurar a megacariocitos granulares al final de la doceava semana de cultivo (Figura 7C).

Tinción de MPO

Presento un patrón muy similar al caso anterior, en la primera semana de cultivo fue negativa, en la segunda semana se obtuvo un 5% de células positivas, en la cuarta semana se incrementó a un 10%; para la sexta semana se presentó un

20% de células positivas, en la octava semana un 42%, en la décima semana un 54% y finalmente en la última semana de cultivo se presentó un 68% de células positivas a MPO (Tabla 3 y Figura 4).

Estos datos nos confirman que realmente las células cultivadas de este caso fueron maduraron hacia las etapas finales de la serie granulocítica.

Tinción de FAL

Fue negativa en la primera semana de cultivo, en la segunda semana se observó un 8% de células positivas, en la cuarta semana de cultivo se incrementó notablemente a un 37% de células positivas el cual fue disminuyendo gradualmente a un 33% en la sexta semana de cultivo, y en la octava semana a un 3%. Nuevamente hacia la décima semana de cultivo hubo un incremento paulatino de células positivas del 7%, hasta que finalmente en la doceava semana se observó un 17% de células positivas para FAL (Tabla 3 y Figura 4).

El aumento de células positivas se puede deber a su diferenciación y maduración hacia las etapas finales de la serie granulocítica, la disminución conforme pasa el tiempo puede ser por su periodo de vida de las células que es corto. El hecho que vuelva aumentar el porcentaje de células positivas en la doceava semana tal vez se deba a que aún había células inmaduras a la mitad del tiempo transcurrido del cultivo.

Grupo B

En este grupo se trabajó con doce casos, siete de los cuales se mantuvieron por un periodo de doce semanas en cultivo, otros cuatro duraron dieciseis semanas y un caso veintidos semanas. En lo que respecta a la tinción de Wright sólo se incluyeron el caso 14 que corresponde a LMA-M₃ y el promedio de los ocho casos de LMC (casos 4,5,7,9-13), debido a que presentaron un patrón muy similar entre ellos (**Tabla 2 y Figura 3**). Respecto a las tinciones citoquímicas se trabajaron por separado todos los casos debido a que se tenían diferencias entre ellos y por tal motivo no se pudo realizar un promedio.

LMC (8 casos)

Tinción de Wright

En el día de cultivo se inició con un 2% de monocitos, este porcentaje se mantuvo constante durante todo el tiempo de cultivo.

Los mieloblastos se presentaron en un 5% al inicio del cultivo, posteriormente aumentaron a un 40% en la primera semana de cultivo, y disminuyeron notablemente en la cuarta semana a un 17%, en la octava semana de cultivo 2%, por último aumentaron a un 15% hacia el final del cultivo.

Con respecto a los promielocitos al inicio del cultivo se observaron en un 60%, disminuyendo notablemente en la primera semana a un 10%, posteriormente se incrementaron de nuevo en la cuarta semana de cultivo a un 37%.

mantiéndose este porcentaje hasta la octava semana y al final del cultivo se incrementaron hasta un 85%.

Estos resultados sugieren que en la primera semana de cultivo se tuvo un decremento debido a que las células presentaron un proceso de adaptación al medio de cultivo y posteriormente éstas células lograron su proceso de maduración.

Los mielocitos y metamielocitos se presentaron en un 35% al inicio del cultivo, en la primera semana de cultivo se observaron en un 45%, manteniéndose casi constante hacia la cuarta semana de cultivo, posteriormente aumentaron en un 60% para la octava semana de cultivo y en la doceava semana ya no se observaron (Tabla 2 y Figura 3).

El comportamiento presentado por las células después de la octava semana tal vez se debió a que entraron en un proceso de apoptosis, ya que éstas células tienen una vida media de aproximadamente 7 días, lo que indica que la maduración que se dio durante el tiempo de cultivo fue a causa de las demás células que estaban en un proceso de diferenciación.

Caso 3

Tinción de MPO

En este caso se obtuvo un 85% de células positivas desde la primera semana de cultivo el cual fue decreciendo a un 60% en la cuarta semana y de ahí en

adelante no se volvió a observar células positivas durante el tiempo de cultivo (Tabla 4, Figuras 5, 9B y 9C).

Tinción de FAL

Durante todo el tiempo que duró el cultivo no se observaron células positivas a la tinción (Tabla 4 y Figura 5).

Recordemos que la tinción de MPO es positiva en la extirpe mieoloide desde el estadio de promielocito y la tinción de FAL es positiva a partir de los mielocitos. Esto sugiere que las células cultivadas no eran de extirpe mieoloide puesto que no se obtuvo positiva la tinción de FAL. Por lo tanto, es muy posible que en este caso no se cultivaron células hematopoyéticas sino otro tipo de células que también son positivas a la tinción de MPO (40). Debido a que se encontraron células positivas desde el principio y hasta la cuarta semana de cultivo.

Caso 4

Tinción de MPO

En la primera semana de cultivo se tenía un 3.5% de células positivas a la tinción, el cual fue aumentando considerablemente hacia la cuarta semana a un 10%, después en la octava semana de cultivo se observaron un 35% de células positivas, disminuyendo al 30% en la doceava semana (Tabla 4 y Figura 5).

Tinción de FAL

En la primera semana de cultivo se presentó un 0.5% de células positivas a la tinción, el cual fue aumentando en la cuarta semana a un 5.3% y posteriormente a

un 15% en la octava semana y finalmente disminuyó nuevamente a un 5% en la doceava semana de cultivo (**Tabla 4 y Figura 5**).

Caso 5

Tinción de MPO

Se observó en la primera semana de cultivo un 0.1% de células positivas, aumentó a un 5% para la cuarta semana, en la octava semana ya se tenía un 35% de células positivas a la tinción y se mantuvo hasta la doceava semana (**Tabla 4 y Figura 5**).

Tinción de FAL

Durante la primera semana de cultivo las células fueron negativas a FAL, en la cuarta semana se observó un 0.5%, aumentando notablemente para la octava semana de cultivo a un 27%, manteniéndose así hasta la doceava semana de cultivo (**Tabla 4 y Figura 5**).

Caso 7

Tinción de MPO

En la primera semana de cultivo se obtuvo un 0.2% de células positivas, en la cuarta semana aumentó a 15%, manteniéndose constante en la octava semana y posteriormente disminuyó a un 10% en la doceava semana y se mantuvo así hasta la dieciséisava semana de cultivo (**Tabla 4 y Figura 5**).

Tinción de FAL

En este caso, en la primera semana de cultivo se observó un 0.1% de células positivas, en la cuarta semana de cultivo aumentó a 10%, posteriormente disminuyó en la octava semana a 8%, manteniéndose así en la doceava semana y finalmente en la dieciseisava semana de cultivo se observó un 4.5% de células positivas (**Tabla 4 y Figura 5**).

Caso 9

Tinción de MPO

Se observó en la primera semana de cultivo un 1.1% de células positivas, aumentando considerablemente para la cuarta semana a 48%, continuando el aumento en la octava semana con 55% y en la última semana se obtuvo un 67% de células positivas a la tinción (**Tabla 4 y Figura 5**).

Tinción de FAL

El comportamiento observado fue similar a la tinción de MPO ya que en la primera semana de cultivo se tuvo un 0.1%, aumentando considerablemente desde la cuarta semana de cultivo con un 17.8%, posteriormente en la octava semana a un 43.5% y finalmente en la doceava semana a un 60.8% de células positivas (**Tabla 4 y Figura 5**).

Caso 10**Tinción de MPO**

En este caso, se presentó un 1.3% de células positivas en la primera semana de cultivo, posteriormente en la cuarta semana un 54%, en la octava semana un 63% manteniéndose hasta el final del cultivo (**Tabla 4 y Figura 5**).

Tinción de FAL

En la primera semana se observó un 0.3% de células positivas, en la cuarta semana un 25%, en la octava semana un 20% y finalmente en la doceava semana de cultivo se observó un 29% de células positivas (**Tabla 4 y Figura 5**).

Caso 11**Tinción de MPO**

En este caso, se observó en la primera semana de cultivo un 4.6% de células positivas, aumentando notablemente en la cuarta semana a 57%, para la octava semana se mantuvo en un 60% y finalmente en la doceava semana de cultivo se observó un 64 % de células positivas (**Tabla 4 y Figura 5**).

Tinción de FAL

En la primera semana de cultivo se obtuvo un 2.5% de células positivas, para la cuarta semana un 48%, en la octava semana un 56% y finalmente en la doceava semana un 60% (**Tabla 4, Figuras 5 y 10A**).

Caso 12**Tinción de MPO**

En la primera semana de cultivo se observó un 1.5% de células positivas, en la cuarta semana aumentó considerablemente a un 35%, continuando el aumento en la octava semana con un 60%, en la doceava semana un 63% y se mantuvo hasta la dieciséisava semana de cultivo (**Tabla 4 y Figura 5**).

Tinción de FAL

En la primera semana de cultivo se observó un 0.4% de células positivas el cual aumentó considerablemente hacia la cuarta semana a un 15.6%, en la octava semana se obtuvo un 35.5%, en la doceava semana un 58%, manteniéndose casi constante hasta la última semana de cultivo (**Tabla 4, Figuras 5 y 10B**).

Caso 13**Tinción de MPO**

En la primera semana de cultivo se observó un 5.1% de células positivas, en la cuarta semana un 48 %, en la octava semana un 53%, en la doceava semana un 59% y en la dieciséisava semana se obtuvo un 66% de células positivas (**Tabla 4 y Figura 5**).

Tinción de FAL

En la primera semana se observó un 1.3% de células positivas, en la cuarta semana un 22%, en la octava semana un 35%, en la doceava semana 40% y finalmente un 50% para la última semana de cultivo (**Tabla 4, Figuras 5 y 10C**).

En todos los casos anteriores (4,5,7,9-13) se observó la proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas, lo que se pudo constatar al ser positivas las tinciones de MPO y FAL. La diferenciación de las células muy probablemente fue a la serie granulocítica, ya que si se hubiera diferenciado hacia la serie monocítica la tinción de FAL hubiera sido negativa. Por otra parte, estos cultivos adquirieron por lo menos la maduración de promielocitos a mielocitos si consideramos la secuencia de aparición de las dos enzimas.

Caso 6

Este caso de LMC no se incluyó dentro del promedio de los otros 8, debido a que el patrón de cultivo presentado difirió considerablemente respecto a la proliferación y tiempo de cultivo (veintidos semanas) de los otros casos. El seguimiento de este caso sólo se llevó hasta la dieciséisava semana debido a que el diseño experimental contemplaba el número de cajas necesario para dichas semanas, por lo que sólo 4 cultivos se mantuvieron hasta la semana veintidos, con el objeto de observar su aspecto morfológico (colonias) y su proliferación (número total de células).

Tinción de Wright

Durante la primera semana se presentaron mieloblastos (**Figura 8A**) que maduraron a promielocitos al cabo de un mes (**Figura 8B**), al final de la doceava semana ya se observaron mielocitos (**Figura 8C**) que finalmente maduraron a metamielocitos al término de la doceava semana de cultivo (**Figura 8D**).

Tinción de MPO

En la primera semana de cultivo se observó un 0.1%, aumentando considerablemente en la cuarta semana de cultivo a un 46%, en la octava semana se observó un 50%, en la doceava semana disminuyó a un 28% y nuevamente se incrementó en la dieciseisava semana a un 65% (Tabla 4 y Figura 5).

Tinción de FAL

El comportamiento de las células hacia esta tinción fue similar al de MPO ya que en la primera semana de cultivo no se observaron células positivas y conforme pasaron las semanas fue aumentando considerablemente de un 19% en la cuarta semana, un 15% en la octava semana, en la doceava semana un 48% y en la dieciseisava semana de cultivo un 88% de células positivas (Tabla 4 y Figura 5).

Caso 8

Tinción de MPO

En la primera semana de cultivo se observó un 0.5% de células positivas en la cuarta semana un 45 %, en la octava semana 51% y finalmente en la doceava semana de cultivo un 56%. (Tabla 4 y figura 5).

Estos resultados son sugerentes de que el proceso de maduración de las células fue muy rápido.

Tinción de FAL

En esta tinción no se observaron células positivas en la primera semana de cultivo, en la cuarta semana se presentó un 5% de células positivas el cual aumentó

en la octava semana a un 9% y finalmente en la doceava semana se observó un 12% de células positivas (Tabla 4 y Figura 5).

Esto indica que al inicio del cultivo se tenía preferentemente células inmaduras que fueron diferenciándose hacia la serie granulocítica y que muy probablemente permanecieron en el estado mielocítico (Figura 5), debido a que se observó un bajo porcentaje de células FAL⁺. Recordemos que esta tinción es positiva a partir del estadio de mielocitos y es negativa para la serie monocítica.

Si se consideran los resultados de ambas tinciones, se puede pensar que la tendencia de maduración en los cultivos fue más hacia la serie granulocítica que a la monocítica, no obstante que el diagnóstico de este caso es de una LMA-M₄ (leucemia mieloide aguda con abundantes mielocitos, promonocitos y monocitos).

Caso 14

Tinción de Wright

En el día de cultivo se obtuvo un 2 % de monocitos y ya no se observaron en las semanas siguientes.

El porcentaje encontrado de estas células es indicativo de que eran células maduras que tuvieron su proceso apoptótico normal y el hecho de no observarlas durante los días de cultivo fue porque no se dio diferenciación ni maduración hacia serie monocítica.

Los mieloblastos se observaron desde el momento en que se realizó el cultivo en un 5%, fueron incrementándose durante la primera semana a 40%, para después

disminuir drásticamente hasta un 12% en la octava semana y desaparecer en la doceava semana.

Los promielocitos se observaron en gran cantidad desde el inicio del cultivo un 95%, posteriormente se observó un 35% en la primera semana, en la cuarta semana un 40%, para la octava semana aumentó a un 57% y finalmente disminuyeron a un 30% en la doceava semana.

Los mielocitos y metamielocitos se presentaron en un 5% al inicio del cultivo aumentando a un 25% para la primera semana, en la cuarta semana de cultivo se incrementaron a un 40, disminuyendo posteriormente a un 30% en la octava semana y a 20% en la doceava semana.

En este caso se pudo constatar la congruencia entre el diagnóstico del paciente (LMA-M₃) y el comportamiento de sus CMMSP en cultivo. Puesto que se observó desde el inicio un alto porcentaje de promielocitos, mismo que se mantuvo a lo largo de las semanas de cultivo. Y también se observó que un bajo porcentaje de estas células maduró hacia el siguiente estadio (**Tabla 2 y Figura 3**).

Tinción de MPO

En la primera semana de cultivo se obtuvo un 0.3% de células positivas, en la cuarta semana de cultivo un 0.9%, en la octava semana un 1.3% y finalmente en la doceava semana un 5% (**Tabla 4 y Figura 5**).

Tinción de FAL

Durante todo el cultivo prácticamente no se observaron células positivas, excepto en la doceava semana en la que se observó un 0.5% (**Tabla 4 y Figura 5**).

Considerando los resultados de las dos tinciones se puede pensar que las células cultivadas se diferenciaron hacia la serie granulocítica pero su maduración se detuvo en el estado promielocítico, esto último se puede corroborar con los resultados obtenidos en la tinción de Wright.

Grupo C

Corresponde al grupo de los donadores el cual por presentar datos muy semejantes se decidió realizar un promedio, por lo tanto se trabajo de la siguiente forma:

Tinción de Wright

En el día de cultivo se observó un 30% de monocitos, en la primera semana un 25%, en la cuarta semana un 20%, en la octava semana un 5% y finalmente un 2% para la doceava semana.

Los mieloblastos se observaron en la primera semana de cultivo en un 7%, en la cuarta semana en un 15% y ya no se observaron estas células en las otras semanas.

Esto indica que tal vez los mieloblastos pasaron al siguiente estadio de maduración.

Los promielocitos aparecieron en la cuarta semana de cultivo en un 2%, fueron aumentando hacia la octava semana a un 10% y finalmente dieron un 20% para la doceava semana.

Esto indica que las células promielocíticas conforme pasaban los días iban madurando al siguiente estadio.

Los mielocitos y metamielocitos aparecieron en la cuarta semana de cultivo en un 5%, aumentando considerablemente hacia la octava semana a un 25% y finalmente a un 80% en la última semana de cultivo.

Este último resultado corrobora que efectivamente las células fueron madurando (**Tabla 2 y Figura 3**).

Por otra parte, realizando un estudio comparativo entre el grupo A y el C respecto a la tinción de Wright se puede observar que presentan un comportamiento muy similar en cuanto a la aparición de los diferentes estadios de maduración en una misma serie. Si recordamos que las personas incluidas en ambos grupos no tienen hematopoyesis malignizada en médula ósea, es entendible porque son similares los resultados.

Tinción de MPO

En la primera semana de cultivo se obtuvo un 0.4% de células positivas, en la segunda semana de cultivo un 5%, en la cuarta semana de cultivo un 8%, para la sexta semana un 29%, en la octava semana un 61%, en la décima semana un 72% y en la doceava semana de cultivo un 86% de células positivas (**Tabla 5 y Figura 6**).

Como se puede observar la maduración de las células se produjo durante todo el tiempo de cultivo. Por otra parte, el gran porcentaje de células positivas a la MPO en la última semana de cultivo es sugerente de que puede haber maduración hacia los últimos estadios de la serie granulocítica si se le adiciona a los cultivos algún factor estimulante específico (**Apéndices I y II**).

Tinción de FAL

En la primera semana de cultivo la tinción fue negativa, en la segunda semana se observó un 0.1% de células positivas, en la cuarta semana un 5%, en la sexta semana un 14%, en la octava semana un 19%, el cual se incrementó a un 61% para la décima semana de cultivo y para la doceava semana fue del 73% de células positivas (Tabla 5 y Figura 6).

Tinción de FAC

Durante las dos primeras semanas de cultivo se observó un 2% de células positivas, en la cuarta semana de cultivo decreció a un 0.3% e incluso fue negativa la tinción en la sexta semana pero después se volvió a incrementar hacia la octava semana de cultivo a 2%, el cual paulatinamente aumentó a un 4% en la décima semana de cultivo y en la doceava semana se presentó un 8% de células positivas (Tabla 5, Figuras 6, 10D y 10E).

Esto sugiere que en las primeras semanas del cultivo la cantidad de linfocitos era mínima y fueron muriendo lentamente; el nuevo aumento de las células se debió muy probablemente a la fitohemaglutinina del medio de cultivo que las estimuló a proliferar lo que condicionó a que estos nuevos linfocitos produjeran interleucinas necesarias para la diferenciación y maduración de las otras extirpes hematopoyéticas, lo que se corroboró por los porcentajes obtenidos en las tinciones de MPO y de FAL, así como por el patrón celular observado en la tinción de Wright.

Finalmente, el hecho de no haber realizado otro tipo de tinciones citoquímicas como son la de Sudan B, esterasa o PAS, fue por una parte, porque estas tinciones

reconocen los estadios de maduración de las células sanguíneas de forma similar a las tinciones citoquímicas descritas anteriormente (37,41). Y por otra, porque no fue posible disponer de los reactivos necesarios para realizar estas tinciones.

BASES DE DATOS PARA LA ELABORACION DE LA TABLA 7. RESULTADOS DE LA ANALISIS DE LA DIFERENCIAL DE LAS SUMAS INCLUSIVE

TABLA 7 - DIFERENCIAL RESPECTO AL NUMERO DE SUMAS INCLUSIVE

SINOPSIS	Estrategia de Aprendizaje				Estrategia de Evaluación			
	Metodología	Instrumentos	Procedimientos	Aspectos	Metodología	Instrumentos	Procedimientos	Aspectos
1								
2								
3								
4								
5								
6								

TABLA 3. PORCENTAJE DE CELULAS POSITIVAS DE LAS TINCCIONES MPO Y FAL* RESPECTO AL NUMERO DE SEMANAS EN CULTIVO (GPO. A)

SEMANAS	MPO		FAL	
	C1	C2	C1	C2
1	0.8	0	0	0
2	5	5	1	8
4	16	10	10	37
6	29	20	13	33
8	50	42	17	3
10	60	54	10	7
12	72	68	3	17

C= Caso

* Promedio de tres cajas de cultivo, contando por separado 300 cels.

TABLA 4. - PORCENTAJE DE CELULAS POSITIVAS DE MPO Y FAL* RESPECTO AL NUMERO DE SEMANAS EN CULTIVO (GPO. B)

CASOS	MPO					FAL					
	S	1	4	8	12	16	1	4	8	12	16
3		85	60	0	0	0	0	0	0	0	0
4		3.5	10	35	30	-----	0.5	5.3	15	5	-----
5		0.1	5	35	32	-----	0	0.5	27	26	-----
6		0.1	46	50	28	65	0	19	15	48	88
7		0.2	15	13	10	9	0.1	10	8.5	7	4.5
8		0.5	45	15	56	-----	0	5	9	12	-----
9		1.1	48	55	67	-----	0.1	17.8	43.5	60.8	-----
10		1.3	54	63	65	-----	0.3	25	20	29	-----
11		4.6	57	60	64	-----	2.5	48	56	60	-----
12		1.5	35	60	63	65	0.4	15.6	35.5	58	61
13		5.1	48	53	59	66	1.3	22	35	40	50
14		10.3	0.2	1.5	1.5	-----	1.0	0	0	0.5	-----

S= Semana

* Promedio de tres cajas de cultivo, contando por separado 300 cels

TABLA 5. - PORCENTAJE DE CELULAS POSITIVAS DE LAS TINCIONES DE MPO, FAL Y FAC* RESPECTO AL NUMERO DE SEMANAS EN CULTIVO (G.P.O.C)

SEMANAS	MPO		FAL		FAC	
	C.15	C.16	C.15	C.16	C.15	C.16
1	0.3	0.5	0	0	3	2
2	5	5	0.1	0.2	2.1	1.3
4	8	9	4.3	4.9	0.1	0.5
6	28	30	14	15	0	0
8	60	62	19	20	2	3
10	71	74	60	63	5	4
12	85	87	72	75	8	7.5

C= Caso

* Promedio de tres cajas de cultivo contando por separado 300 cels.

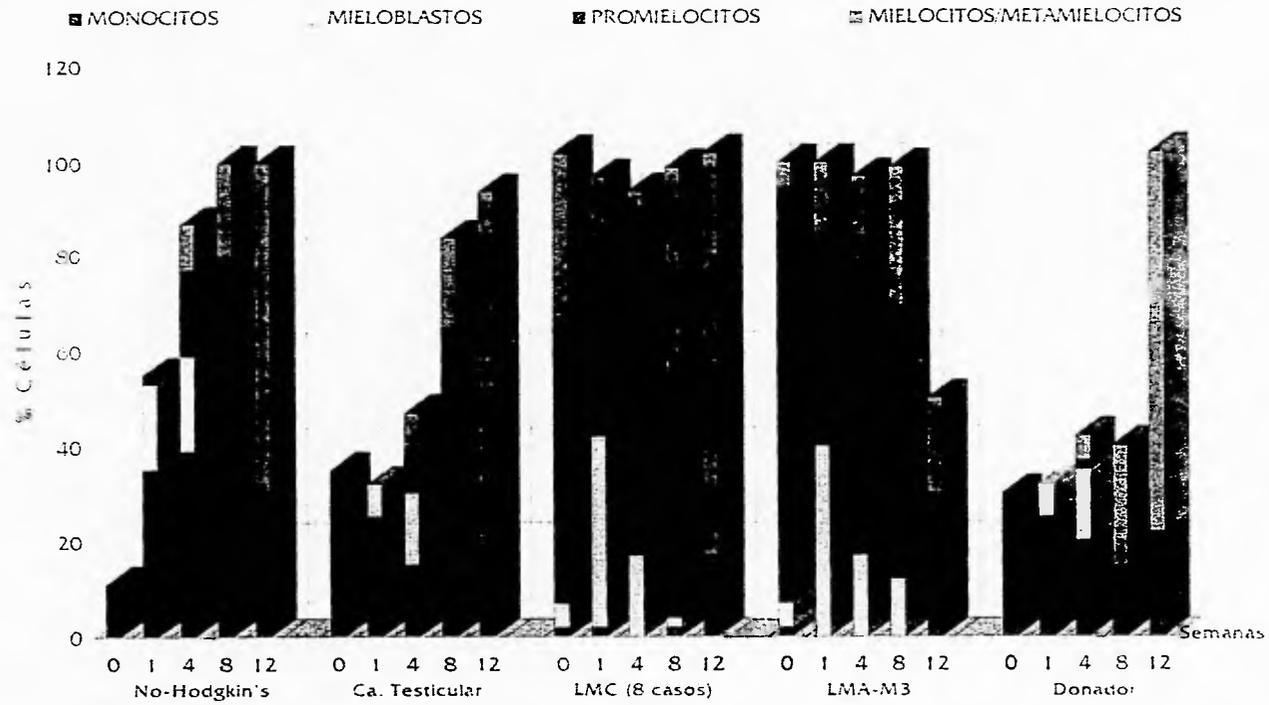


Figura 3. Cuenta diferencial de los casos estudiados respecto al número de semanas en cultivo.

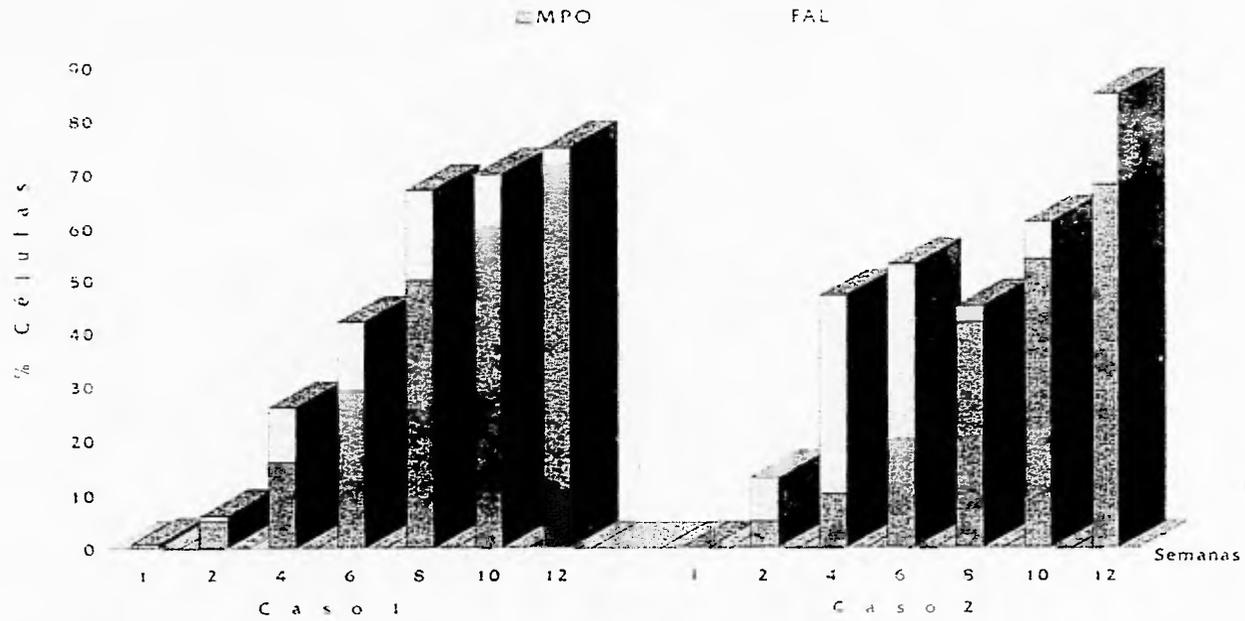


Figura 4. Porcentaje acumulado de células positivas respecto al número de semanas en cultivo, de las tinciones de MPO y FAL (Grp. A)

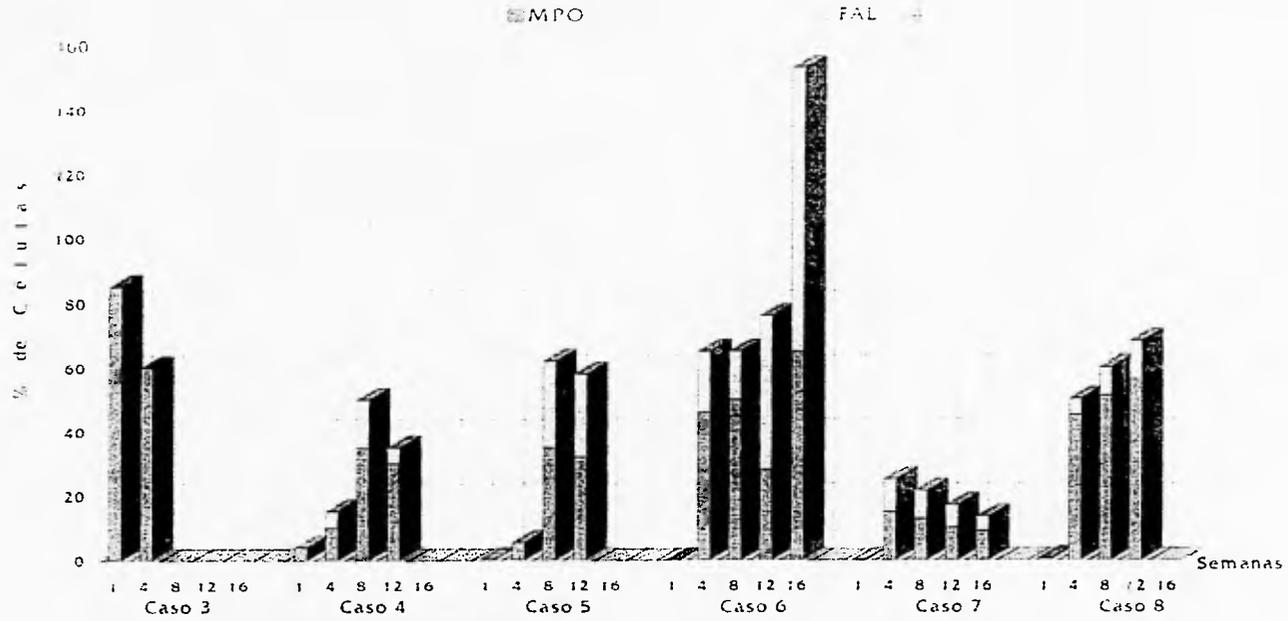


Figura 5. Porcentaje acumulado de células positivas respecto al número de semanas en cultivo, de las tinciones de MPO y FAL (Grp. B)

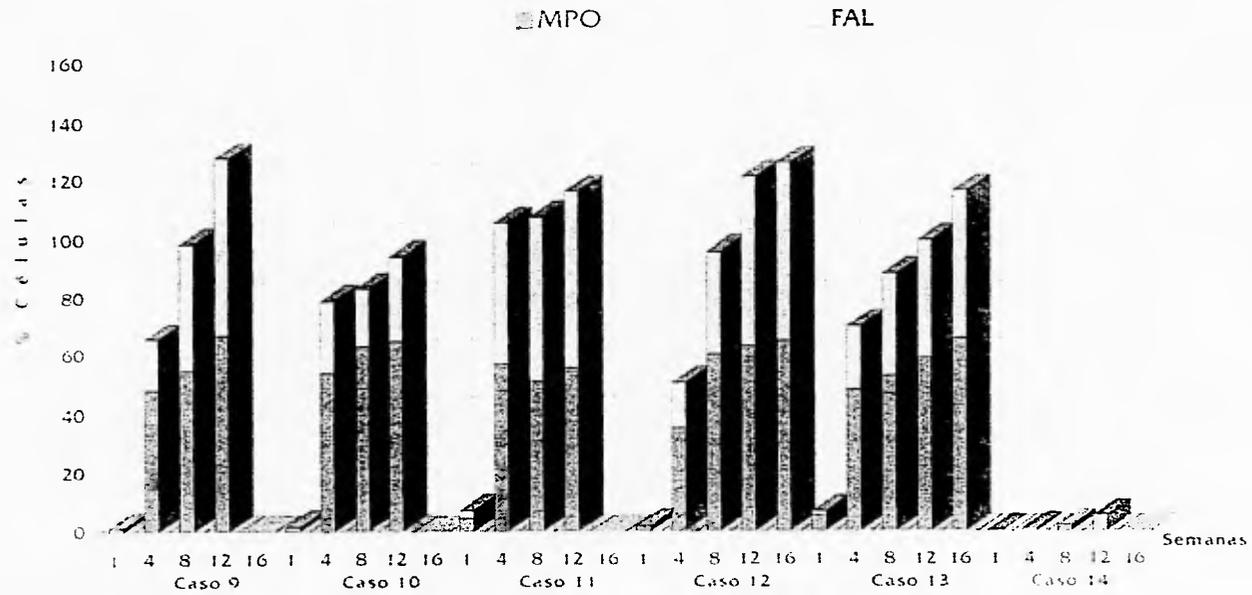


Figura 5 (Cont.). Porcentaje acumulado de células positivas respecto al número de semanas en cultivo, de las tinciones de MPO y FAL (Grp. B)

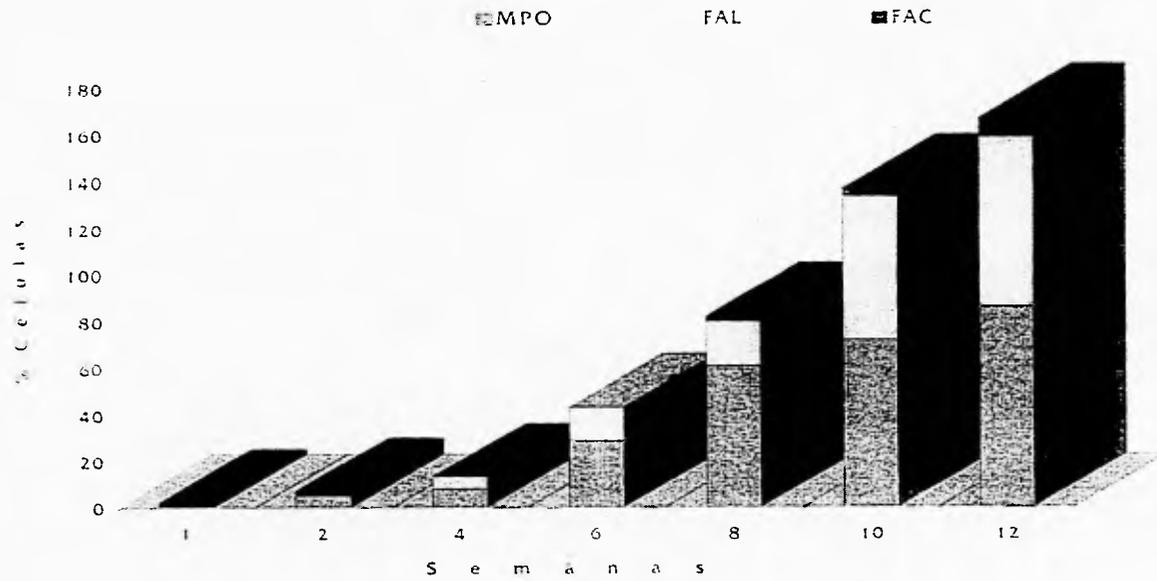
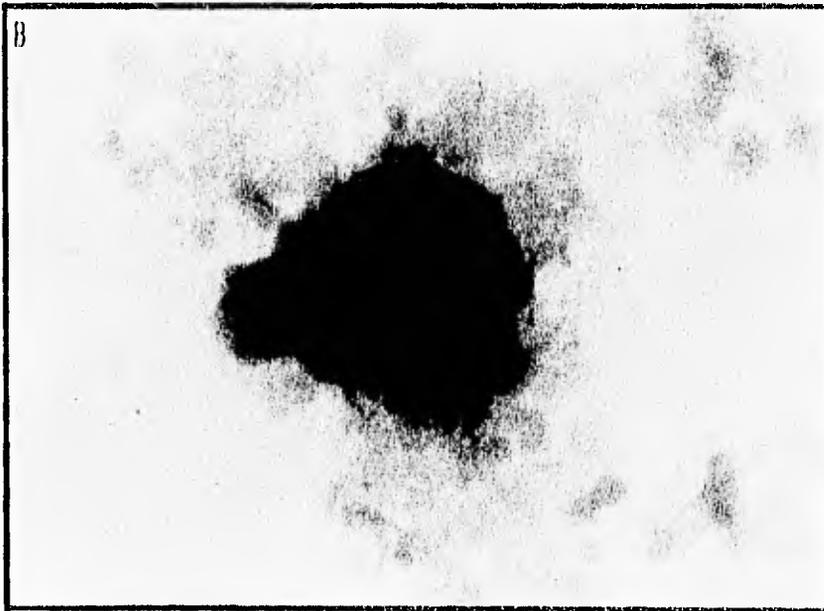


Figura 6. Porcentaje acumulado de células positivas respecto al número de semanas en cultivo, de las tinciones de MPO, FAL y FAC (Grp. C Promedio de dos donadores)



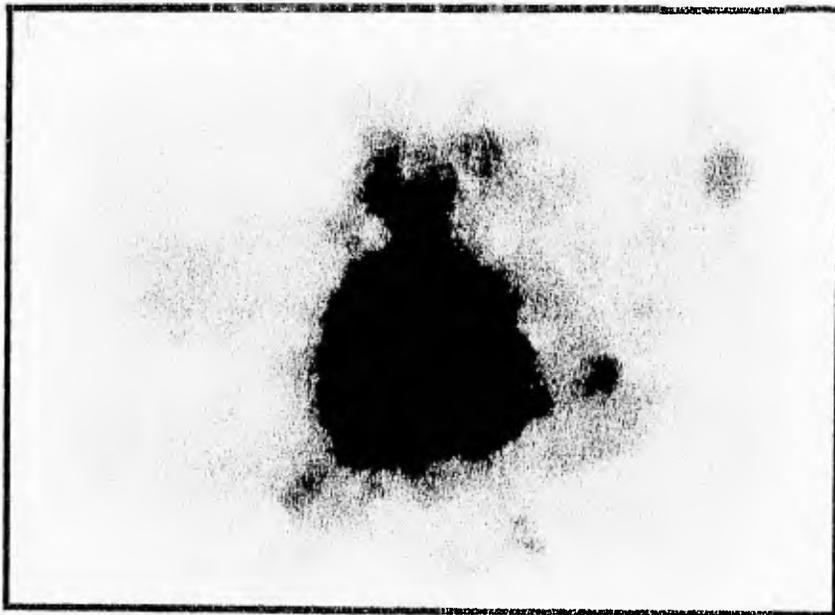


Figura 7. Maduración hacia extirpe megacariocítica. Caso 2. A) Megacarioblasto observado en la cuarta semana de cultivo. B) Promegacariocito observado en la octava semana de cultivo. C) Megacariocito granular observado en la doceava semana de cultivo. En todos los casos se realizó la tinción de Wright, aumento 1000X.

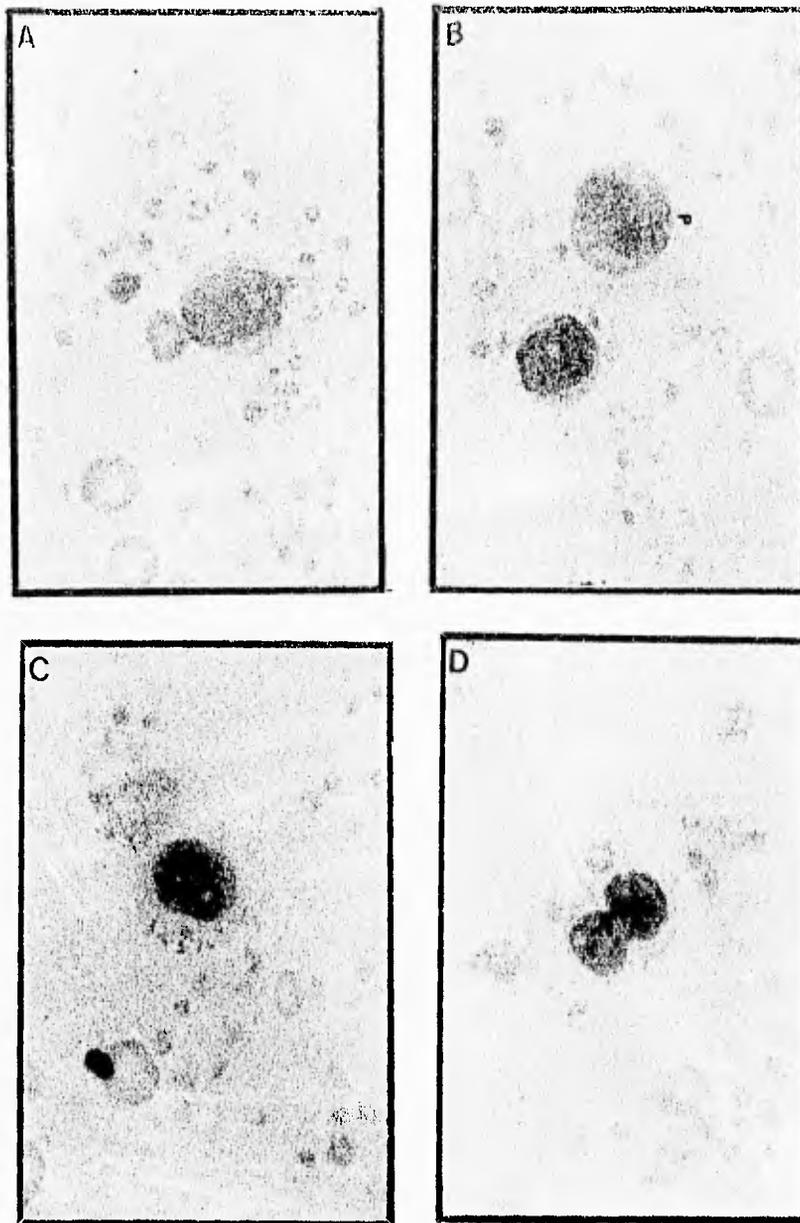


Figura 8. Maduración hacia serie granulocítica, caso 6. A) Mieloblasto observado durante la primera semana de cultivo. B) Promielocito (P) y Promielocito tardío, madurando hacia el estadio de mielocito, cuarta semana de cultivo. C) Mielocito, octava semana de cultivo D) Metamielocito temprano, doceava semana de cultivo. En todos los casos se realizó la tinción de Wright. aumento 1000X.

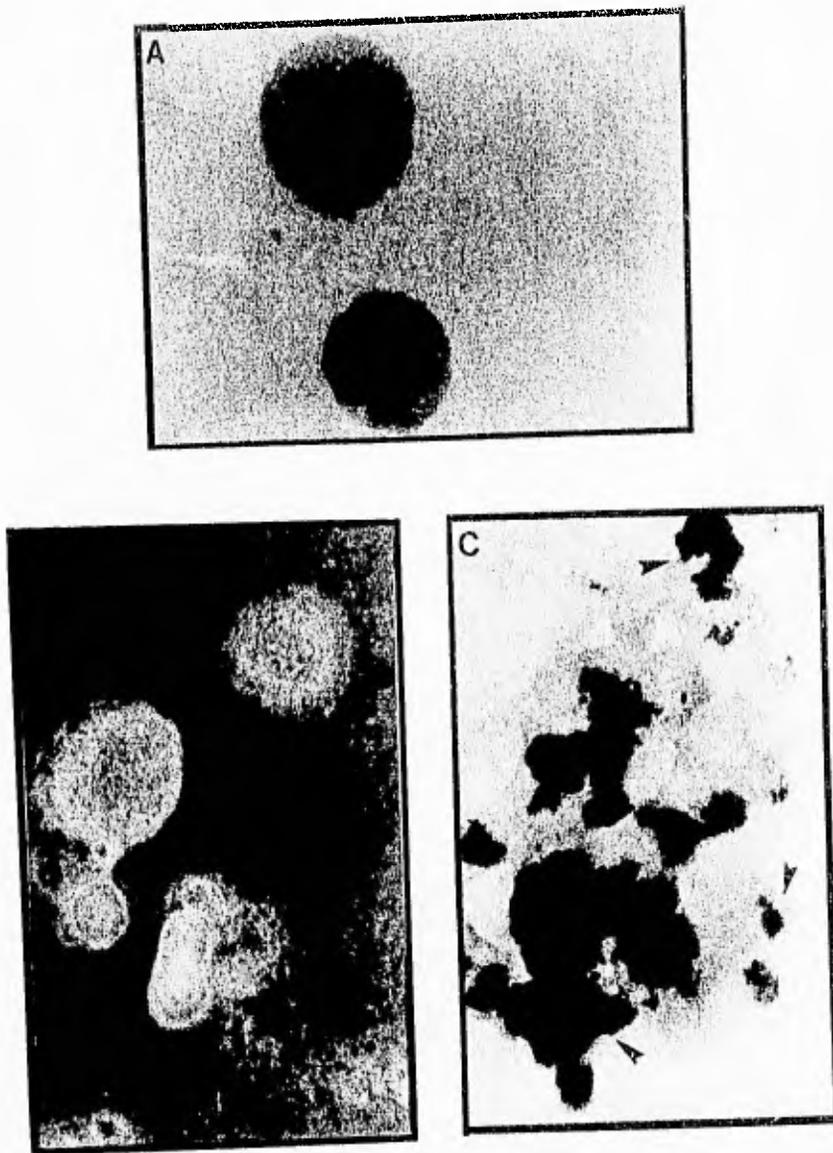
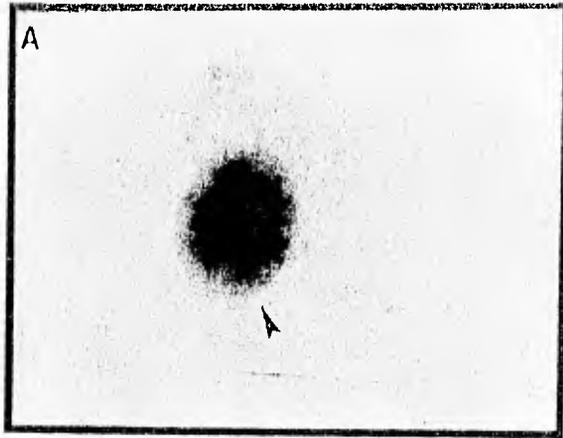


Figura 9. Tinción de la Mieloperoxidasa. A) Células MPO positiva (parte superior) y negativa (parte inferior) del caso 1, observados durante la segunda semana de cultivo. B) Imagen en contraste de fases de células hematopoyéticas y de neuroblastoma (flechas) del caso 3, observadas durante la primera semana de cultivo. C) Células de neuroblastoma del caso 3 MPO⁺ de un mes de cultivo, aumento 1000X.



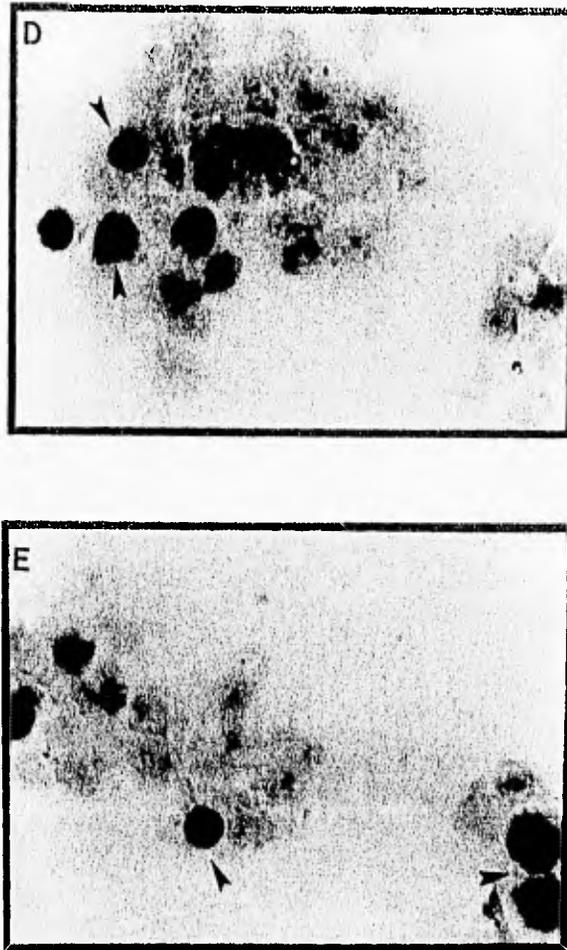


Figura 10. Tinciones de las Fosfatasa Alcalina (FAL) y Acida (FAC). A) Célula FAL⁺ (flecha) del caso 11, observadas en la primera semana de cultivo. B) Células FAL⁺ (flechas) del caso 12, observadas en la cuarta semana de cultivo. C) Células FAL⁺ (flechas) del caso 13, observadas a los 4 meses de cultivo. D) y E) Células FAC⁺ (flechas) de cada uno de los donadores a los 3 meses de cultivo, aumento 1000X.

V. CONCLUSIONES

1. El objetivo del presente trabajo se cumplió por consiguiente la hipótesis planteada fue confirmada.
2. Las células tronco movilizadas a la sangre periférica de las 16 personas estudiadas permanecieron en cultivo por lo menos 12 semanas.
3. La permanencia máxima en cultivo de las CMMSP de los pacientes del Grupo A fue de doce semanas; del Grupo B: cinco casos de LMC, 1 de LMA-M₄ y 1 de LMA-M₃ fue de doce semanas, 1 de neuroblastoma metastásico a médula ósea y los otros tres casos de LMC fue de dieciseis semanas, 1 caso de LMC (Ph⁺) fue de veintidos semanas y para el Grupo C: fue de doce semanas.
4. En cuanto a la tinción de Wright el comportamiento de las CMMSP observado a lo largo del cultivo para el Grupo A fue muy similar al del Grupo C. Lo que era de esperarse si se considera que las personas incluidas en ambos grupos no tenían médula ósea malignizada.
5. En cuanto a la tinción de Wright el comportamiento de las CMMSP observado a lo largo del cultivo para el Grupo B fue totalmente distinto al de los otros dos grupos, pero muy similar entre los pacientes con el mismo padecimiento, LMC, a excepción del caso 6.
6. Por lo que respecta a la tinción de Mieloperoxidasa el comportamiento de las CMMSP observado a lo largo del cultivo para el Grupo A fue muy similar al del Grupo C sobre todo a partir de la sexta semana.

CONCLUSIONES

7. Por lo que respecta a la tinción de Mieloperoxidasa el comportamiento de las CMMSP observado a lo largo del cultivo para el Grupo B fue totalmente distinto al de los otros dos grupos y tan sólo fue similar durante la primera semana en los pacientes con el mismo padecimiento, LMC, a excepción del caso 6.
8. Por lo que respecta a la tinción de Fosfatasa Alcalina Leucocitaria el comportamiento de las CMMSP observado a lo largo del cultivo fue totalmente distinto en los tres grupos.
9. Por lo que respecta a la tinción de Fosfatasa Acida Leucocitaria el comportamiento de las CMMSP observado para los donadores fue primero de franca disminución llegando incluso a ser negativa en la semana seis de cultivo y posteriormente tuvo un ascenso paulatino hasta la semana doce.
10. Por lo que respecta a la tinción del Azul de Prusia fue negativa en todos los casos. sin embargo resultó útil para identificar hallazgos durante el cultivo, específicamente: Eritrofagocitosis por macrófagos.
11. De las conclusiones anteriores se deriva que en todos los cultivos líquidos de las 16 personas estudiadas se observó proliferación y diferenciación de sus células tronco hematopoyéticas y maduración principalmente de la extirpe mieloide y en especial de la serie granulocítica.

ESTA TESIS ES PARTE
DE LA BIBLIOTECA

APENDICE I

INTERLEUCINAS QUE INTERACTUAN DURANTE LA HEMATOPOYESIS (12)

INTERLEUCINA (IL)	ORIGEN	EFEECTO BIOLÓGICO
IL-1	Monocitos Macrófagos Células Endoteliales Queratinocitos	<ul style="list-style-type: none"> • Aumenta la activación de cels. T y la síntesis de IL-2 • Factor de crecimiento hematopoyético temprano • Síntesis de fibroblastos
IL-2	Activación de células T	<ul style="list-style-type: none"> • Es el factor de crecimiento de cels. T y B • Incrementa la citotoxicidad de cels. T
IL-3	Activación de linfocitos T y B	<ul style="list-style-type: none"> • Factor de crecimiento multipotencial hematopoyético
IL-4	Activación de células T y algunas células malignas	<ul style="list-style-type: none"> • Factor de crecimiento de células mastoideas • Factor de activación de cels. T y B
IL-5	Células T	<ul style="list-style-type: none"> • Induce la diferenciación de células T, B y los Eosinófilos
IL-6	Monocitos Fibroblastos	<ul style="list-style-type: none"> • Induce el factor de diferenciación de cels. B • Activa el factor de estimulación de colonias
(*) IL-11	Hígado, Riñón	<ul style="list-style-type: none"> • Células T, B, UFC-GEMM, Macrófagos.
(*) Factor Stem Cell Ligando C Kit	No se ha identificado	<ul style="list-style-type: none"> • Progenitores primitivos

(* cita 9).

APENDICE II

FACTORES DE ESTIMULACIÓN DE CRECIMIENTO DURANTE LA HEMATOPOYESIS
(12)

FACTORES DE ESTIMULACIÓN	LOCALIZACIÓN DEL GEN Y EN LOS DIFERENTES SITIOS CELULARES	EFECTOS BIOLÓGICOS
FEC-GM	Cromosoma 17 Macrófagos Células endoteliales Fibroblastos	<ul style="list-style-type: none"> • Estimula la formación de colonias granulocíticas <i>in vitro</i> • Actúa con la IL-3, FEC-GM y FEC-M para estimular la formación de megacariocitos, granulocitos y monocitos • Estimula la proliferación y maduración de células malignas • Estimula <i>in vivo</i> la producción de neutrófilos
FEC-GM	Cromosoma 5 Linfocito T Células Endoteliales Fibroblastos	<ul style="list-style-type: none"> • Estimulación de colonias granulocíticas-monocíticas <i>in vitro</i> • Actúa con otros factores para estimular los megacariocitos, células blastoideas y UFB-E <i>in vitro</i> • Activación fagocítica y citotóxica en los neutrófilos maduros • Incrementa la adhesión de las células maduras en los neutrófilos • Inhibe la movilidad de los neutrófilos maduros
FEC-M	Cromosoma 5 Macrófagos Células endoteliales Fibroblastos	<ul style="list-style-type: none"> • Estimula la formación de colonias de macrófagos <i>in vitro</i> • Actúa con otros factores de crecimiento en la formación de colonias <i>in vitro</i> • Da la diferenciación y sobrevivencia de macrófagos <i>in vitro</i>
Multi-FEC Interleucina-3	Cromosoma 5 Linfocitos T	<ul style="list-style-type: none"> • Estimula la formación de UFC-GEMM <i>in vitro</i> • Actúa con la EPO para estimular la formación de colonias de UFB-E y con FEC-M
Eritropoyetina (EPO)	Cromosoma 7 Células renales intersticiales	<ul style="list-style-type: none"> • Estimula la formación de colonias eritroides (UFC-E) <i>in vitro</i> • Actúa con la IL-3 para estimular la formación de UFB-E <i>in vitro</i> • Controla la eritropoyesis

APENDICE III

TINCIÓN DE WRIGHT

Preparación de reactivos

A) Colorante de Wright

Eosina-azul de metileno _____ 0.24g

Alcohol metílico absoluto _____ 100 ml

Mezclar el colorante con el alcohol metílico absoluto y posteriormente filtrar y guardar en un frasco.

B) Amortiguador de fosfatos a pH 7.2

Fosfato dibásico de sodio _____ 1.14 g

Fosfato monobásico de potasio _____ 0.49 g

Agua bidestilada _____ 1000 ml

Pesar las dos sales de fosfato y disolverlas en el agua bidestilada, para después ajustar el pH a 7.2. Se mantiene a 4 °C en frasco color ámbar hasta su uso.

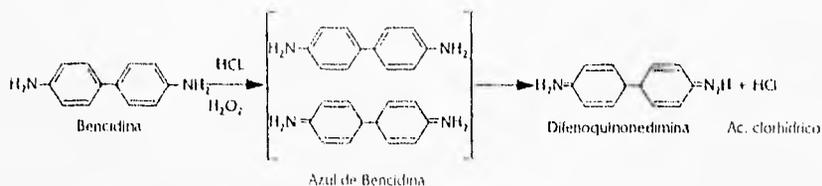
Técnica

1. Fijar los frotis con alcohol metílico absoluto por un minuto.
2. Poner los frotis en forma horizontal y cubrir con el colorante de Wright por intervalo de tres a cinco minutos.
3. Añadir el amortiguador por un período de cinco a siete minutos.
4. Lavar los frotis con agua corriente.
5. Dejar secar los frotis y montar con bálsamo de Canadá.

APÉNDICE IV

TINCIÓN DE MPO

Reacción



Preparación de reactivos

A) Etanol al 30 %

Alcohol etílico absoluto _____ 30 ml

Agua bidestilada _____ 70 ml

Mezclar 30 ml de alcohol etílico absoluto y 70 ml de agua bidestilada.

B) Sulfato de zinc heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) 0.132 M

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ _____ 0.379 g

Agua bidestilada _____ 100 ml

Pesar los 0.379 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ y disolverlo en 100 ml de agua bidestilada

C) Hidróxido de sodio 1N

NaOH 1N _____ 4.0 g

Agua bidestilada _____ 100 ml

Disolver los 4 g de hidróxido de sodio 1N en 100 ml de agua bidestilada

D) Mezcla de incubación pH 6.0 \pm 0.05

Alcohol etílico absoluto al 30 % _____ 100 ml

Hidrocloruro de bencidina _____	0.3 g
ZnSO ₄ • 7 H ₂ O al 0.132 M _____	1.0 ml
Acetato de sodio _____	1.0 g
Peróxido de hidrogeno al 3% _____	0.7 ml
Hidróxido de sodio 1N _____	1.5 ml
Safranina O _____	0.2 g

Los reactivos deben mezclarse en el orden listado, utilizando un agitador magnético (Fischer Scientific). Con la adición del ZnSO₄ se forma un precipitado el cual se disuelve con la adición restante de los reactivos. El pH de la solución debe ser de 6.00 ± 0.05. La solución se filtra y se guarda en un frasco color ámbar con tapa de plástico para evitar que los vapores oxiden la tapa; se mantiene a temperatura ambiente.

Técnica

1. Fijar los frotis con la solución fijadora por un minuto.
2. Lavar con agua corriente de quince a treinta segundos.
3. Introducir los frotis en la mezcla de incubación durante treinta segundos.
4. Lavar con agua corriente y secar al aire.
5. Montar con báisamo de Canadá.

TINCIÓN DE FAL**Preparación de reactivos**

Se utilizó un equipo de tinción citoquímico para fosfatasa alcalina leucocitaria (Merck), por lo que sólo se preparó la mezcla de incubación, la cual se realizó de acuerdo a la técnica descrita en el equipo.

Técnica

1. Fijar los frotis con una solución fijadora durante un minuto.
2. Lavar los frotis con agua corriente diez segundos y secar a temperatura ambiente.
3. Introducir los frotis en la mezcla de incubación recién preparada, por quince minutos.
4. Lavar con agua bidestilada por diez segundos y secar al aire.
5. Contrateñir con hemalumbre de Mayer por cinco minutos.
6. Lavar con agua corriente por dos a tres minutos y secar al aire.
7. Montar con aquatex y observar al microscopio.

TINCIÓN DE FAC**Preparación de reactivos**

Se utilizó un equipo de tinción para fosfatasa ácida (Merck), por lo cual solo se procedió a realizar la mezcla de incubación como lo indica el equipo.

Técnica

1. Fijar los frotis en solución fijadora por un minuto.
2. Lavar con agua bidestilada un minuto.
3. Introducir los frotis en la mezcla de incubación de dos a tres horas y guardar en la oscuridad.
4. Lavar con agua bidestilada durante veinte segundos.
5. Contrateñir con hemalumbre de Mayer por quince minutos.
6. Lavar con agua corriente por dos a tres minutos.
7. Montar aquatex.

Tinción del azul de Prusia

Reacción



Preparación de reactivos

A) Solución de ácido clorhídrico al 1%

Acido clorhídrico _____ 1.0 ml

Agua desionizada _____ 100 ml

Adicionar el ácido clorhídrico al agua desionizada.

B) Solución de ferrocianuro de potasio al 2%

Ferrocianuro de potasio _____ 2.0 g.

Agua desionizada _____ 100 ml

Se pesa el ferrocianuro de potasio y se mezcla con agua desionizada. Solo se prepara el necesario ya que esta solución es inestable.

C) Solución de safranina al 0.5%

Safranina O _____ 0.5 g

Agua desionizada _____ 100 ml

Se pesa la safranina y se mezcla con un poco de agua desionizada, posteriormente se mezcla con el resto del agua desionizada, se guarda en un frasco.

D) Mezcla de incubación

Acido clorhídrico al 1% _____ 3 volúmenes

Ferrocianuro de potasio al 2% _____ 1 volumen

Esta mezcla de incubación se prepara al momento de realizarse la tinción ya que puede oxidarse muy rápido.

LITERATURA CITADA

1. Keith L. Moore, M.Sc. Ph.D. 1989. *Embriología clínica. Interamericana México. pp. 64-65*
2. Leeson CR, TS. Leeson y AA. Paparo. 1987. *Histología. Interamericana México. pp 159-179*
3. López-Revilla R, Tsutsumi Víctor, Frixione E. 1986. *Temas selectos de biología celular. CINVESTAV México. cap.6*
4. Mayani H., W. Drayowska and P. M. Lansdrop. Characterization of functionally distinct subpopulations of CD34⁺ cord blood cells in serum-free long-term cultures supplemented with hematopoietic cytokines. *Blood 1993, 82(9):2664-22672.*
5. Williams N. The origin, development and regulation of megakaryocytes. *Br J Haem 1982, 52(2):173-180.*
6. Sans-Sabrafen J. 1988. *Hematología clínica. Doyma. Barcelona. cap.2, 5*
7. Beaupain D, C. Martin and F. Dieterlen-Liéure. Are developmental hemoglobin changes related to the origin of stem cells and site of erythropoiesis? *Blood 1979, 53:212-225.*
8. Stamatoyannopoulos GM, AW. Niehuis, PW. Majerus and H. Varmos. 1987. *The molecular basis of blood diseases. Saunders. USA. pp. 88*
9. Richard-Lee G, TC. Bithell, J. Foerster, JW. Athens and JN. Lukens. 1993. *Wintrobe's clinical hematology (vol.1). Lee y Febiger. Philadelphia. cap. 3 y 22*
10. Lea and Febiger. 1991. *Hematología clínica. El Manual Moderno. México. cap.1, 2*
11. Tood and Sanford. 1982 *Diagnostico clínico por el laboratorio. Salvat. Barcelona. pp 178.*

12. William W, E. Beutler, Aj. Ersleu and MA. Lichtman. 1990. *Hematology. McGraw-Hill. N.Y. cap 3, 16, 17, 27, 30-41, 80-84, 89-95, 100-105, 126-130, 171*
13. Huehns, ER. and N. Dance. Human embryogenic Haemoglobins. *Nature 1964, 201(4923):1095-1097.*
14. Hecht, F. Predominance of hemoglobin Gower I in early human embryonic development. *Science 1966, 152:91-95.*
15. Alberts B, Bray P, Lewis J, Ralf M, Roberts K., Watson JD. 1983. *The cells nucleus in molecular biology of the cell. Garland. N.Y. cap. 8*
16. Murphy G, Bretz U, Baggjolini M.JJ, Reynolds. The latent collagenase and gelatinase of human polymorphonuclear neutrophil leucocytes. *Biochem J 1980, 192:517-525.*
17. Henry JD. 1991. *Diagnostico y tratamiento clínico por el laboratorio. Todd-Sanford-Davissohn . Salvat México. pp 124, 1247-1303*
18. Leavel BS. 1973. *Hematología clínica. Interamericana. México. pp 624-626*
19. Sobrevilla-Calvo P., Acosta-Barreda A., Meza-Ciria C. *II Congreso Iberoamericano de Bancos de Sangre y Medicina Transfusional .(abr) Acapulco, Gro. 1993*
20. Müller-Sleburg C, B. Torok-Storb, J. Visser and R. Storb. 1992. *Hematopoyetic stem cells: animal models and human transplantation. Springer-Verlay. USA. pp 95-105, 123-149, 169-214.*
21. Bradley TR, D. Metcalf. The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *J Biol Med 1966, 44:287-300.*
22. Freshney RI. 1994. *Culture of animal cells. Wiley-Liss. USA. pp 1-76, 344-348*
23. Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro *J Cell Physiol 1977, 91:335-345.*
24. Dexter DL, Barbosa JA, Calabresi P. N,N-dimethylformamide-induced alteration of cell culture characteristics and loss of tumorigenicity in cultured human colon carcinoma cells. *Cancer Res 1979, 39:1020-1025.*

25. Coulombel L., AC. Eaves and CJ. Eaves. Enzymatic treatment of long-term human marrow cultures reveals the preferential location of primitive hemopoietic progenitors in the adherent layer. *Blood* 1993, **62(2):291-297**.
26. Gordon MY. Plastic-adherent cells in human bone marrow generate long-term hematopoiesis in vitro. *Leukemia* 1994, **8(5):865-870**.
27. Marché-Cova A., Acosta-Barreda A., Salles-Manuels MT, Morales-Gasca ME., Sobrevilla-Calvo P. Mantenimiento y diferenciación de células tronco hematopoyéticas en cultivo líquido sin factores estimulantes. *Bioquímica* 1995, **(Nº especial):59-111**.
28. Marché-Cova A, Fernández-Ortiz AA, Morales-Gasca ME, Sobrevilla-Calvo P, Rojas-Ochoa A, Fattel-Fazenda S, Arce-Popoca E, Villa-treviño S. Glutación sulfídrico transferasa clase Pi marcador temprano de células iniciadas durante la carcinogénesis química en roedores: Perspectivas para su aplicación en cánceres humanos. (Parte 3: Perspectivas). *Bioquímica* 1996, **21(1):425-434**.
29. Marché-Cova A, Sobrevilla-Calvo P, Acosta-Barreda A, Salles-Manuel MT, Morales-Gasca ME, Fernandez-Ortiz AA. Early detection of malignant GST- π cells during hematopoiesis in liquid culture from PBSC: clinical application before PBSC autotransplant into cancer patients. *Br J Haem* 1996, **93(Suppl.2):213**.
30. Efratl, P. And L. Rozenszajn. The morphology of buffy coat in normal human adults. *Blood* 1960, **16:1012-1019**.
31. Marché-Cova A. 1987. *Estudio citoquímico del concentrado leucocitario de pacientes con diagnóstico de anemia aplásica*. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México pp.100
32. Washburn AH. A combined peroxidase and Wright's stain for routine blood smears. *J Lab Clin Med* 1929, **14:246-248**.
33. Kaplow, LS. Simplified myeloperoxidase stain using benzidine dihydrochloride. *Blood* 1965, **26(2):215-219**.

-
34. Kaplow LS and MD. Cytochemistry of leukocyte alkaline phosphatase. *J Clin Pathol* 1963, 39(5):439-449.
 35. Figueroa GW. 1981. *Hematology. Willey. USA. pp 393-399*
 36. Katayama I, Li CY, and Yam LT. Histochemical study of acid phosphatase isoenzyme in leukemic reticuloendotheliosis *Cancer* 1972, 29(1):157-164.
 37. Ruzman. 1990. *Ultraestructura celular en hematología. Salvat. Barcelona. pp 255-275*
 38. Sundberg D. and H. Broman. The application of the Prussian blue stain to previously stained films of blood and bone marrow. *Blood* 1955, 10:160-166.
 39. Carson FL. 1990. *Histotechnology. ASCP Press. USA. pp 142-144, 214-215.*
 40. Ferrandis E, J. Da Silva, G. Riou and Y. Bernard. Coactivation of the MDRI and MYCN genes in human neuroblastoma cells during the metastatic process in the nude mouse. *Cancer Res* 1994, 54:2256-2261.
 41. Sheehan HL. and GW. Storey. An improved method of staining leucocyte granules with Sudan black b. *J Path Bact* 1947, 59:336-337.