

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN CELULAR EN
MICROSCOPIO ÓPTICO Y DIGITALIZACIÓN DE
IMÁGENES EN HEMATOLOGÍA**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

VERÓNICA MINUTTI LÓPEZ

ASESORA DE TESIS

M. en C. IDALIA CARMEN AVILA MIYAZAWA



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de licenciatura se realizó bajo la dirección de la M. en C. Idalia C. Avila Miyazawa, en el laboratorio de Diagnóstico, en la Unidad de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El presente trabajo se logró, gracias al uso del equipamiento otorgado por el Programa de Apoyo a Proyectos Institucionales para el Mejoramiento de la Enseñanza (PAPIME) a través del proyecto con clave EN 218303.

Al jurado, por el tiempo dedicado a la revisión y evaluación de este trabajo:

Presidente	M. en C. Idalia Carmen Avila Miyazawa
Vocal	QFB. Martha Patricia Campos Peón
Secretario	QFB. René Damián Santos
Suplente	M. en C. Gloria Leticia Arellano Martínez
Suplente	QFB. Ma. de Lourdes Galván Ruiz.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres. Por su amor y paciencia, por siempre creer en mí, por su apoyo e impulso para seguir y por mil cosas mas que no terminaría de enlistar... Por darme la vida, infinitas gracias.

A mis hermanos. Por su respeto y amor ya que nunca mi valor para ellos dependió de mis triunfos o fracasos.

A mi ranita. Gracias Tere por haber llegado a mi vida a ser la chispa que me enciende cada que pretendo apagarme y por escucharme siempre.

Arturo. Porque muy a tu manera aún a jalones y empujones, te has encargado de que tenga presente que la vida es aquí y ahora, gracias por recordarme que la ambición no es mala.

A todos mis amigos y amigas por estar siempre con su hombro para llorar o su alegría para festejar por que siempre recibí palabras de aliento para llegar a la meta.

A mi asesora por la tolerancia e interés que me brindó, por todo lo que con paciencia me enseñó y recordó, por su apoyo en lo profesional y lo personal.

A todos mis maestros que pusieron su granito de arena en mi formación.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme crecer en sus aulas de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, por todos los momentos que viví en ella gratos y difíciles, por sembrar en mí el orgullo puma y brindarme el valor de seguir luchando para ser una gran profesionista. Siempre estaré orgullosa de haber estudiado en mi casa la UNAM.

En general a todas las personas que amo y me aman, por creer en mí y ser parte de la mujer que ahora soy.

A mi ángel de la guarda por no abandonarme nunca.

Y principalmente y ante todo gracias a Dios por permitirme no solo llegar a esta meta sino, por poderla compartir con todos ustedes.

ÍNDICE GENERAL

	Hoja
ÍNDICE GENERAL.	I
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.	V
ABREVIATURAS.	VII
<u>1.0 INTRODUCCIÓN.</u>	1
<u>2.0 OBJETIVOS.</u>	2
<u>3.0 GENERALIDADES.</u>	3
3.1 FAMILIA ERITROIDE.	3
3.1.1 RETICULOCITOS.	3
-Generalidades de los reticulocitos.	3
-Características estructurales de los reticulocitos.	4
-Composición química de los reticulocitos.	5
3.1.2 ERITROCITOS.	5
-Generalidades de los eritrocitos.	5
-Características estructurales de los eritrocitos.	7
-Composición química de los eritrocitos.	8
-Funciones de los eritrocitos.	17
3.2 FAMILIA DE LOS LEUCOCITOS.	18
-Generalidades de los leucocitos.	18
3.2.1 POLIMORFONUCLEARES.	21
3.2.1.1 Neutrófilos.	21
-Generalidades de los neutrófilos.	21
-Características estructurales de los neutrófilos.	21
-Composición química de los neutrófilos.	23
-Funciones de los neutrófilos.	27
3.2.1.2 Eosinófilos.	32
-Generalidades de los eosinófilos.	32
-Características estructurales de los eosinófilos.	33
-Composición química de los eosinófilos.	34
-Funciones de los eosinófilos.	35

3.2.1.3 Basófilos.	36
-Generalidades de los basófilos.	36
-Características estructurales de los basófilos.	37
-Composición química de los basófilos.	38
-Funciones de los basófilos.	38
3.2.2 MONONUCLEARES.	39
3.2.2.1 Monocitos.	39
-Generalidades de los monocitos.	39
-Características estructurales de los monocitos.	40
-Composición química de los monocitos.	41
-Funciones de los monocitos.	42
3.2.2.2 Linfocitos.	44
-Generalidades de los linfocitos.	44
-Características estructurales de los linfocitos.	46
-Composición química de los linfocitos.	47
-Funciones de los linfocitos.	51
3.3 PLAQUETAS.	58
-Generalidades de las plaquetas.	58
-Características estructurales de las plaquetas.	60
-Composición química de las plaquetas.	62
-Funciones de las plaquetas.	66
3.4 EL MICROSCOPIO DE CAMPO CLARO.	72
3.4.1 CONSIDERACIONES GENERALES.	75
3.4.2 OPERACIÓN DEL MICROSCOPIO.	76
3.4.3 CUIDADOS Y MANTENIMIENTO.	78
3.5 CÁMARA DE NEUBAUER.	80
3.5.1 DESCRIPCIÓN DE SU ESTRUCTURA.	81
3.5.2 FUNDAMENTO DE USO DEL HEMOCITÓMETRO.	86
<u>4.0 MATERIALES Y MÉTODOS.</u>	87
4.1 MATERIALES Y REACTIVOS.	88
4.2 CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS.	88

4.2.1 HEMATÍES.	88
-Fundamento y técnica.	88
4.2.2 LEUCOCITOS.	89
-Fundamento y técnica.	89
4.2.3 PLAQUETAS.	90
-Fundamento y técnica.	90
4.2.4 GENERALIDADES DE LA TÉCNICA DE CUANTIFICACIÓN.	92
4.3 TINCIONES DE SANGRE.	96
4.3.1 REALIZACIÓN DE EXTENSIONES DE SANGRE PERIFÉRICA.	96
4.3.2 TINCIONES DE ROMANOWSKY.	98
-Fundamento.	100
-Técnica de la tinción de Wright.	103
4.3.3 CRITERIO DE EVALUACIÓN Y ANÁLISIS DE UN FROTIS SANGUÍNEO CON TINCIÓN DE WRIGHT.	104
4.3.4 TINCIÓN SUPRAVITAL.	106
-Fundamento y técnica.	106
4.3.5 MÉTODO DE CONSERVACIÓN DE EXTENSIONES SANGUÍNEAS TEÑIDAS.	108
4.4 CAPTURA, DIGITALIZACIÓN Y EDICIÓN DE FOTOMICROGRAFÍAS.	108
<u>5.0 RESULTADOS.</u>	111
5.1 OBTENCIÓN DE IMÁGENES DIGITALIZADAS.	112
5.1.1 CAMPOS MICROSCÓPICOS DE SANGRE PERIFÉRICA, A DIFERENTES AUMENTOS.	113
5.1.2 RETICULOCITOS.	114
5.1.3 ERITROCITOS.	115
5.1.4 LEUCOCITOS.	
5.1.4.1 Neutrófilos en banda.	116
5.1.4.2 Neutrófilos segmentados.	117

5.1.4.3 Eosinófilos.	118
5.1.4.4 Basófilos.	119
5.1.4.5 Monocitos.	120
5.1.4.6 Linfocitos pequeños.	121
5.1.4.7 Linfocitos grandes.	122
5.1.5 PLAQUETAS.	123
5.1.6 HEMOCITÓMETRO.	124
5.1.7 CÉLULAS SANGUÍNEAS EN EL HEMOCITÓMETRO.	125
<u>6.0 DISCUSIÓN.</u>	126
<u>7.0 CONCLUSIONES.</u>	146
APÉNDICE DE REACTIVOS.	147
GLOSARIO.	149
REFERENCIAS.	153

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.

Tabla 3.1. Hemoglobinas normales en etapas de la vida del ser humano.	16
Tabla 4.1. Colorantes ácidos y básicos.	101
Tabla.4.2. Características ácido-base de algunos componentes celulares.	102
Fig.3-1. Tres reticulocitos teñidos con azul de cresil brillante.	4
Fig.3-2. Eritrocitos de sangre periférica, se observa la zona de palidez central	7
Fig.3-3. Neutrófilo en banda, el núcleo presenta una muesca pronunciada.	22
Fig.3-4. Neutrófilo segmentado en tres lóbulos.	22
Fig.3-5. Eosinófilo, se observan los gránulos rojizo-naranja.	33
Fig.3-6. Basófilo, se observa el tamaño, color y distribución de los gránulos.	37
Fig.3-8. Monocito, se observa los pliegues característicos en el núcleo.	41
Fig.3-9. Linfocito pequeño se ve el escaso citoplasma.	47
Fig.3-10. Linfocito grande se nota el citoplasma más extenso.	47
Fig.3-11 Plaquetas, se observa la presencia de los gránulos.	60
Fig.3-12 Aglomerado de plaquetas. Tinción supravital.	60
Fig.3-13. Microscopio óptico compuesto convencional.	74
Fig.3-14. Cámara de Neubauer.	81
Fig.3-15. Cámara de Neubauer vista de costado.	82
Fig.3-16 A. Ejecución simple-puente central sin dividir (una red de conteo).	82
Fig.3-16 B. Ejecución doble-puente central dividido (dos redes de conteo).	82
Fig.3-17. Red de conteo.	84
Fig.3-18. Cuadrado primario periférico superior derecho.	84
Fig.3-19. Cuadrados secundarios utilizados para conteo de eritrocitos.	85
Fig.3-20. Cuadrado secundario, se muestran las triples líneas límite.	85
Fig.3-21 Desplazamiento del cubreobjetos sobre la cámara de Neubauer.	86
Fig.3-22 Llenado de la cámara de Neubauer.	87
Fig.4-1. Pipeta para mezclado de eritrocitos (perla roja).	89
Fig.4-2. Pipeta de Thoma para mezclado de leucocitos (perla blanca).	90
Fig.4-3. Cuadro secundario indica que células deben contarse y cuales no.	92

Fig.4-4. Cuadrado primario periférico, conteo en forma de meandro.	93
Fig.4-5. Extensión de un frotis sanguíneo método de dos portaobjetos.	97
Fig.4-6. Partes de un frotis sanguíneo.	97
Fig.4-7. Método de almena para la lectura de un frotis.	105
Fig.4-8. Método longitudinal para la lectura de un frotis.	106
Fig.4-9. Método de muralla almenada para la lectura de un frotis.	106
Fig.4-10 Microscopio con cámara adaptada para captura de fotomicrografías	109
Fig. 4-11 Cámara fotográfica, muestra en la pantalla un campo microscópico.	109
Fig.5-1 - Fig.5-3. Campos microscópicos de sangre con tinción de Wright.	113
Fig.5-4 – Fig.5-9. Reticulocitos, teñidos con azul de cresil brillante.	114
Fig.5-10 - Fig.5-15. Eritrocitos de sangre periférica, teñidos con Wright.	115
Fig.5-16 - Fig.5-21. Neutrófilos en banda, teñidos con Wright.	116
Fig.5-22 - Fig.5-27. Neutrófilos segmentados, teñidos con Wright.	117
Fig.5-28 - Fig.5-33. Eosinófilos de sangre periférica, teñidos con Wright.	118
Fig.5-34 - Fig.5-39. Basófilos de sangre periférica, teñidos con Wright.	119
Fig.5-40 - Fig.5-45. Monocitos de sangre periférica, teñidos con Wright.	120
Fig.5-46 - Fig.5-51. Linfocitos pequeños, teñidos con Wright.	121
Fig.5-52 - Fig.5-57. Linfocitos grandes, teñidos con Wright.	122
Fig.5-58 - Fig.5-63. Plaquetas de sangre periférica, teñidos con Wright.	123
Fig.5-64 - Fig.5-69. Fotomicrografías del hemocitómetro.	124
Fig.5-70 – Fig.5-77. Fotomicrografías de las células sanguíneas en el hemocitómetro.	125

ABREVIATURAS.

1,3 DPG	1,3-difosfoglicerato
2,3-DPG	2,3 difosfoglicerato
3-PG	3-fosfoglicerato
5HT	5-hidroxitriptamina o serotonina
aa	Aminoácidos
Ac	Anticuerpo
ADA	Adenosindiaminasa
ADP	Adenosin difosfato
Ag	Antígeno
AK	Adenilatocinasa
AMP	Adenosin monofosfato
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
ank	Ankirina
ATP	Adenosin trifosfato
BCR	Receptor de célula B
CarbaminoHb	Carbaminohemoglobina
CarboxiHb	Carboxihemoglobina
CD	Grupo de designación (Cluster Designation).
CE	Células epiteliales
CR3	Receptor C ₃
CRC	Conteo de reticulocitos corregido
DesoxiHb	Desoxihemoglobina
DHAP	Dihidroxiacetona-fosfato
EPO	Eritropoyetina
F1,6 DP	Fructosa-1,6-difosfato
F6P	Fructosa-6-fosfato
Fc	Fracción cristalizable
FEC-GM o GM-CSF	Factor estimulador de colonias granulocito macrófago
fMLP	Formil-metionil-leucil-fenilalanina
G3P	Gliceraldehido-3-fosfato
G3P-DH	Gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa
G6P	Glucosa-6-fosfato
G6P-DH	Glucosa 6 fosfato Deshidrogenasa
GP	Glucoproteína
GS	Glutación
GSH	Glutación reducido
GMPc	Guanosinmonofosfato cíclico

GR	Glóbulo rojo
Hb	Hemoglobina
HK	Hexocinasa
HLA	Antígeno leucocitario humano
IL	Interleucina
ICAM	Moléculas de adhesión intercelular
IFN - γ	Interferón gama
Ig	Inmunoglobulina
iNOS	Sintetasa del óxido nítrico inducible
ITAM	Motivos de activación del inmunoreceptor basados en tirosina.
ITIM	Motivos de inhibición del inmunoreceptor basados en tirosina.
LFA	Antígeno asociado a la función leucocitaria
LGG	Linfocito grande granular
LR	Límite de resolución
MHC I y II	Complejo de histocompatibilidad principal
MN	Mononucleares
MO	Médula ósea
NAD	Nicotinamida-adenin-dinucleótido oxidado
NADH	Nicotinamida-adenin-dinucleótido reducido
NADP	Nicotinamida-adenin-dinucleótido fosfato oxidado
NADPH	Nicotinamida-adenin-dinucleótido fosfato reducido
NDE	Neurotoxina derivada de eosinófilo
NK	Natural killer (asesinas naturales)
osc o stc	Sistema canalicular abierto
OxiHb	Oxihemoglobina
PAF	Factor activador de plaquetas
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PAI-1	Inhibidor del activador del plasminógeno
PAS	Ácido peryódico y Schiff
PBP	Proteína básica principal
PCE	Proteína catiónica eosinófila
PE	Peroxidasa eosinófila
PEP	Fosfoenolpiruvato
PF4	Factor neutralizante de heparina
PFK	Fosfofructocinasa
PGI₂	Prostaciclina
PGDF	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas

PGK	Fosfogliceratocinasa
PK	Piruvatocinasa
PMN	Polimorfonucleares
PM	Peso molecular
RCB	Receptor de célula B
RfMLP	Receptor de Formil-metionil-leucil-fenilalanina
RGD	Secuencia arginina-glicina-aspartato
RI	Respuesta inmune
RNA	Ácido ribonucleico
RNA_m	Ácido ribonucleico mensajero
RTC	Receptor de células T
SDS	Dodecilsulfato sódico
sp	Espectrina
SRL-A	Sustancia de reacción lenta de la anafilaxia
std	Sistema tubular denso
stc u osc	Sistema tubular conector
Sup.	Superficie
Tc	Linfocito T citotóxico
TdT	Deoxinucleotidiltransferasa terminal
Th	Linfocito T cooperador
TNF_α	Factor de necrosis tumoral α
TSP	Trombospondina
Ts	Linfocito T supresor
TXA₂	Tromboxano A 2
VCAM-1	Moléculas de adhesión a células vasculares
VLA-4	Activación muy tardía del antígeno 4
Vol.	Volumen
vWF	Factor de Von Willebrand

1.0 INTRODUCCIÓN.

Conocer la composición del cuerpo humano resulta de gran utilidad al momento del diagnóstico de las diferentes enfermedades. La sangre es un tejido como la piel o la superficie del estómago, sólo que tiene la característica peculiar de ser líquido. Tiene, como los demás tejidos, un conjunto de células, agua y gran cantidad de sustancias disueltas en diferentes proporciones.

El hecho de que sea tan fácil de obtener y que la pérdida de las pequeñas cantidades requeridas para hacer los análisis se reponga automáticamente, hacen de ella un fluido corporal práctico para su análisis.³⁴

El volumen total de sangre en un adulto es de 5 a 6 L o de 7 a 8% del peso corporal; siendo el 55% la porción líquida llamada plasma de la cual aproximadamente el 90% es agua y el 10% se compone de proteínas (albúmina, globulinas y fibrinógeno), carbohidratos, vitaminas, hormonas, enzimas, lípidos y sales y el 45% restante de la sangre se compone de los elementos celulares: eritroides, plaquetarios y leucocitarios. Estos elementos celulares tienen funciones específicas, importantes para el buen funcionamiento del organismo y en algunos casos vitales, es por eso que es importante su estudio.^{10,15}

El análisis del tejido sanguíneo puede realizarse de diversas formas. En el presente trabajo se informa sobre el estudio microscópico de la sangre, abarcando las extensiones sanguíneas teñidas (frotis sanguíneo) con el objetivo de ayudar a quien lo consulte a identificar y diferenciar la morfología normal de las células presentes, permitiendo conocer su distribución; además está considerada la observación de estas en la cámara de Neubauer para ayudar a la correcta cuantificación de las mismas. Las fotomicrografías presentadas de frotis sanguíneos fueron obtenidas de sangre periférica de personas sanas y procesadas con la tinción de Wright o con la tinción supravital usando el azul de cresil brillante.

2.0 OBJETIVO GENERAL.

Generar y digitalizar fotomicrografías de eritrocitos, leucocitos y plaquetas, a partir de muestras sanguíneas normales, evaluadas en el hemocitómetro y en los frotis sanguíneos teñidos; permitiendo caracterizar las tres estirpes celulares, con el fin de ofrecer un apoyo en el estudio de estas.

Objetivos Particulares.

-Realizar extensiones de sangre periférica de personas sanas, teñirlas y conservarlas para su uso cotidiano en el estudio de células sanguíneas normales.

-Describir el uso del microscopio de campo claro para el reconocimiento de células.

-Describir la relación entre la composición química de los eritrocitos, leucocitos y plaquetas con sus características tintoriales y morfológicas, correlacionándolas a su vez con su funcionalidad.

-Identificar y fotografiar la morfología de las plaquetas, las subpoblaciones de leucocitos sanguíneos y de la estirpe eritroide, en base a las tinciones correspondientes con fines de diferenciación.

-Identificar y fotografiar la morfología de las tres poblaciones celulares, en muestras sanguíneas evaluadas en el hemocitómetro.

-Digitalizar las imágenes obtenidas de células sanguíneas más frecuentemente observadas en un análisis microscópico, conservando sus características morfológicas.

-Seleccionar y presentar las imágenes digitalizadas que sean más representativas de la morfología característica de las diferentes células de la sangre.

3.0 GENERALIDADES.

3.1 FAMILIA ERITROIDE.

3.1.1 RETICULOCITOS.

Generalidades de los reticulocitos.

El reticulocito normal es una célula que deriva del eritroblasto ortocromático, el núcleo pequeño y denso de este, presumiblemente incapaz de transcripción génica es excitado para ser ingerido por macrófagos medulares; con anterioridad a la expulsión nuclear, el eritroblasto presenta un aumento en los movimientos ondulantes, y el núcleo se expele mediante varias contracciones dinámicas alrededor de la parte media de la célula; los beneficios evolucionarios de esta enucleación son: a) descarga de peso muerto con acentuada reducción de trabajo a la bomba del corazón, b) transformación de una célula rígida esferoidal en un disco bicóncavo capaz de soportar intensas deformaciones reversibles en sus constantes pasos por la microcirculación.

El núcleo independiente se ha demostrado que retiene una delgada corona de hemoglobina (Hb), que se aprecia por el microscopio electrónico y también por técnicas histoquímicas.^{12,16,31}

Antes de salir a sangre periférica, los reticulocitos permanecen de 2 a 3 días en la médula ósea (MO), siendo liberados posteriormente a circulación, por medio de movimientos ameboides a través de la pared de los sinusoides medulares, se cree que todo esto regulado por la eritropoyetina (EPO). Una vez en sangre, la maduración de los reticulocitos se completa en aproximadamente 24-48 horas.^{14,16,31}

Estos eritrocitos jóvenes representan de 0.5 a 1.5% de la población eritroide circulante; con un valor absoluto entre 20 – 120 x 10⁹/L, en casos de anemia el recuento puede corregirse si no se realiza un recuento absoluto, calculando el conteo de reticulocitos corregido (CRC), que se obtiene multiplicando el porcentaje de reticulocitos por el hematocrito del paciente y dividiendo entre el hematocrito normal.

$$\frac{\% \text{ reticulocitos X Hematocrito del paciente}}{\text{Hematocrito normal}} = \text{CRC}$$

El recuento del número de reticulocitos en sangre periférica es un dato muy útil para establecer la efectividad global de la eritropoyesis y para determinar el origen central o periférico de una anemia, así como para valorar el carácter regenerativo de los síndromes anémicos. Así pues, se cuentan cifras altas de reticulocitos en los primeros días de la vida o después de pérdida de sangre (hemorragia). El valor relativo (%) de reticulocitos está referido a una cifra normal de hematíes. La maduración del reticulocito por pérdida de la sustancia reticular basófila da origen al eritrocito maduro intensamente acidófilo.^{2,14,23}

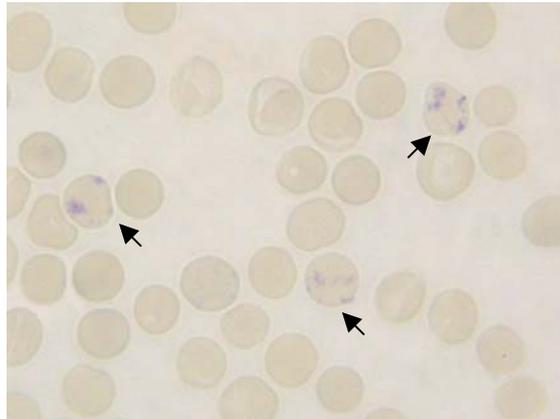


Fig.3-1. Tres reticulocitos teñidos con azul de cresil brillante. Se observa la red azul que los distingue del resto de los eritrocitos. (1000X, Tinción supravital).

Características estructurales de los reticulocitos.

Cuando se tiñen, estos corpúsculos llamados reticulocitos presentan un color azulado a causa de la basofilia difusa y clara del ácido ribonucleico llamada a menudo policromatofilia, pero la cantidad de ribosomas en el reticulocito es tan pequeña que con las tinciones de Romanowsky predomina la eosinofilia (color naranja) por la presencia de hemoglobina. Ciertos colorantes como el azul de cresil brillante, o nuevo azul de metileno, precipitan el RNA, dando origen a una delicada red de material basófilo que aparece bien coloreada en azul distribuida en filamentos reticulares, (Figura 3-1) lo cual le da el nombre de reticulocito.^{4,12,31}

Los reticulocitos miden de 8 a 10µm de diámetro, son de mayor tamaño que los eritrocitos maduros normales.¹⁵

Composición química de los reticulocitos.

Aun en MO, antes de salir a circulación los reticulocitos poseen abundantes ribosomas y aun contienen ácido ribonucleico mensajero (RNAm) suficiente para algunos días de actividad sintética principalmente de hemoglobina, equivalente al 20% restante de la contenida en el eritrocito maduro, Los reticulocitos poseen junto a un alto contenido de Hb, mitocondrias, centríolo y vestigios de las vesículas de Golgi. Las cadenas proteínicas de la Hb representan un 95% de proteína celular en los reticulocitos, siendo predominante la HbA₁ ($\alpha_2\beta_2$) aunque células precursoras en adultos siguen produciendo pequeñas cantidades de HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$) y de HbF ($\alpha_2\gamma_2$).

Los receptores de la EPO disminuyen hasta que desaparecen totalmente con la maduración a eritrocito.^{16,31}

3.1.2 ERITROCITOS.

Generalidades de los eritrocitos.

Uno de los primeros descubrimientos hematológicos realizados a través de el microscopio fue el hallazgo de Swammerdam, publicado en 1682, de que el intestino del piojo estaba irrigado por “un líquido que contenía corpúsculos”.

Antonio Van Leeuwenhoek fue el primero en reconocer al eritrocito también llamado hematíe o glóbulo rojo (GR) como el corpúsculo “que confiere a la sangre su color rojo” y así lo refirió en una carta dirigida a la Royal Society de Londres en 1674. Valoró el diámetro de estos corpúsculos rojos como la millonésima parte de un grano de arena, o sea, cerca de unas 10 μ , asombrosamente igual a su verdadera dimensión. Leeuwenhoek, en sus dibujos los representa como discos bicóncavos con capacidad de ondulación y aglutinación.

En 1868, Neumann publica sus hallazgos de que los glóbulos rojos se originan en la médula ósea a partir de células nucleadas. Ehrlich inicia el campo de la histoquímica en 1877 con la introducción de las tinciones con anilina, aplicándolas a las extensiones sanguíneas secas.

Con esto comienza el estudio de la morfología de las células de la sangre y permite la diferenciación de las células sin color de la médula ósea.

A comienzos del siglo XX, empieza el apogeo de la hematología morfológica. Los estudios de Ehrlich, Hayem; Naegeli y Jolly comienzan a perfilar las relaciones entre las alteraciones específicas de la morfolología eritrocitaria y las anemias: hemolítica y perniciosa.³¹

El nombre eritrocito deriva del griego *erythros* que significa "rojo" y *kytos* que quiere decir "hueco", actualmente traducido como "célula".⁴³

El eritrón o eritrón es el conjunto de todos los eritrocitos que circulan en sangre periférica y de todos los precursores del GR. La homeostasis de esta unidad funcional depende del equilibrio entre lo que se forma en la eritropoyesis y lo que se destruye con la hemólisis fisiológica, en el tejido.^{12,23}

En condiciones normales la producción de eritrocitos constituye una cantidad constante, los eritrocitos viven en el ser humano 120 días, a este tiempo las enzimas están a nivel crítico, el rendimiento de los ciclos metabólicos generadores de energía es insuficiente y el eritrocito es digerido por los macrófagos, principalmente en el bazo.

Un eritrocito viejo pierde la capacidad de deformarse y no puede pasar por el capilar del bazo, el cual actúa como filtro. Se trata de una secuencia de actividades iniciadas por la disminución de la generación de adenosin trifosfato (ATP) por parte de la vía no glucolítica, no oxidativa. Las cantidades menores de colesterol y fosfolípidos producen la pérdida de la permeabilidad selectiva, con aumento de Na^+ y pérdida de K^+ , que a su vez produce una disminución gradual

de la relación entre superficie y volumen. En términos morfológicos el disco eritrocitario se hace esferoidal. La membrana acumula IgG en su superficie, que le impide continuar su función y todas las actividades metabólicas se interrumpen en forma gradual.

Este hecho determina la necesidad de un reemplazo inmediato para impedir que se modifique el volumen de eritrocitos circulantes. Alrededor de 20ml de eritrocitos desaparecen por día de la circulación y, por tanto, idéntica cantidad debe ser producida por el organismo en el mismo lapso.^{7,12,37,23}

El proceso de eritropoyesis en el ser humano demora entre 5 y 6 días, y ocurre en la médula ósea del esternón, de los huesos largos y de las costillas.

La formación de eritrocitos es controlada por la EPO, esta es una hormona que estimula la proliferación y diferenciación de células progenitoras, hecho que determina la aparición de eritrocitos circulantes.^{2,7,37}

La concentración normal de eritrocitos en la sangre es de 4.0 a $5.4 \times 10^{12}/L$ en mujeres y de 4.6 a $6.0 \times 10^{12}/L$ en el hombre.

Características estructurales de los eritrocitos.

Los eritrocitos son células anucleadas, de forma redondeada u oval, con una depresión o zona mas clara en el centro, se dice que tienen forma de disco bicóncavo (Figura 3-2), esto les permite tener más superficie que volumen y es lo que les da la propiedad de deformabilidad y facilita el intercambio de gases, pasan por los capilares, que llegan a ser de $2\mu m$ (los más pequeños).

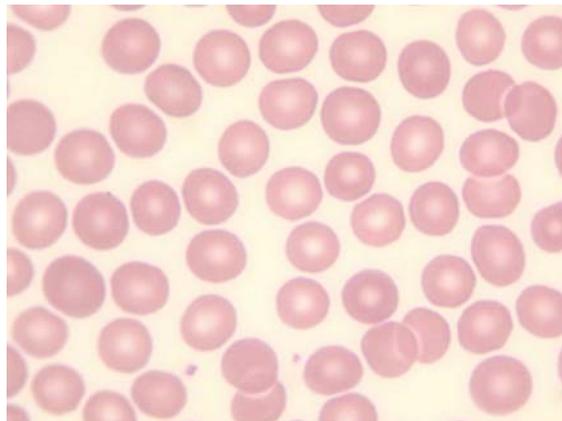


Fig.3-2. Eritrocitos de sangre periférica, se observa la zona de palidez central característica en ellos. (1000X).

Son células en extremo plegables, capaces de cambiar de forma al pasar apretadamente a través de la microcirculación. El citoplasma eritrocítico contiene a la hemoglobina, la cual proporciona a la célula su color rojo característico, gracias a su riqueza en esta, los eritrocitos son acidófilos, tiñéndose por la eosina de las soluciones tipo Romanowsky y observándose de color rosado.^{12,43}

En cuanto a su estructura, el eritrocito consta de una membrana, Hb y enzimas. La membrana tiene características bien definidas en su exterior, en tanto que en su interior, el citoesqueleto llamado esqueleto de membrana eritrocitaria, esta constituido por una red de proteínas que va tapizando la membrana plasmática y por dentro esta el

citosol que contiene la solución de Hb que representa casi el 33% del peso de la célula y una baja concentración de enzimas y otros componentes que intervienen en un número limitado de reacciones metabólicas.^{11,13} De frente, tiene un diámetro de 6.5-8.5µm, visto de perfil tiene un grosor de aproximadamente 2.6µm cerca de su borde y 0.8µm en el centro y cada uno contiene aproximadamente 29 pg de hemoglobina.^{7,12}

Composición química de los eritrocitos.

Membrana eritrocitaria.

La membrana es responsable de la característica forma discoide del glóbulo rojo y contribuye a mantener su deformabilidad y elasticidad. Regula también su volumen de acuerdo a la permeabilidad, tiene modelo de mosaico fluido y está constituida por alrededor de un 52% de proteínas, un 40% de lípidos y 8% de carbohidratos.¹⁶

Los eritrocitos tienen en su superficie de membrana cara externa diferentes carbohidratos específicos que contienen los determinantes antigénicos (antígenos de superficie), que son glicoproteínas y que han permitido subdividir a éstos en distintos sistemas, llamados ABH, MN, S, P, Rh, Ii, etc., los que determinan los diferentes grupos sanguíneos. Estas moléculas son hereditarias y cumplen con las leyes mendelianas en la distribución del carácter hereditario.^{16,38}

Por otro lado los lípidos son responsables de la permeabilidad pasiva a los cationes y de la flexibilidad mecánica en gran parte, estos se disponen en doble capa, en la que se hallan total o parcialmente sumergidas diversas proteínas, llamadas proteínas integrales, y la superficie interna está recubierta por una estructura fibrilar de proteínas periféricas, llamadas esqueleto. La interacción entre proteínas integrales, proteínas del esqueleto y lípidos condiciona la forma eritrocitaria, caracterizada por un exceso de superficie (sup.) en relación al volumen (vol.), y como ya se mencionó la relación sup./vol. es decisiva para garantizar la deformabilidad eritrocitaria.^{23,27,28}

Los lípidos, son principalmente fosfolípidos y colesterol y en menor proporción, ácidos grasos libres y glucolípidos. La disposición en doble capa de estos ocasiona que los grupos polares quedan al exterior y los apolares al interior unidos entre sí. Esta estructura es fluida por el carácter insaturable de los ácidos grasos que forman parte de los fosfolípidos.²⁸

La nomenclatura mas aceptada para designar a las proteínas de membrana de los GR es aquella que sigue un orden numérico de acuerdo a su ubicación en estudios de electroforesis sobre gel de poliacrilamida (PAGE) previo tratamiento con dodecilsulfato sódico (SDS) el cual homogeniza la carga eléctrica de las proteínas y hace que estas se separen en función de su peso molecular (PM). Las proteínas se dividen en dos grupos generales: integrales y periféricas.^{16,28}

Proteínas integrales.

Forman parte estructural de la doble capa lipídica, fuertemente unidas por interacciones hidrofóbicas, hallándose total o parcialmente incluidas en el espesor de la bicapa con dominios funcionales y estructurales dentro y a ambos lados de esta, de forma que muchas pueden desplazarse a lo largo y ancho de ella, confiriéndole gran fluidez, la presencia de carbohidratos en estas le confieren una fuerte carga negativa a la superficie celular, que reduce la interacción entre hematíes o con otras células.^{15,23,28}

Éstas proteínas son:

Banda 3 o canal aniónico; es un intercambiador de aniones, es la proteína integral mas abundante, constituye del 25 al 30% de las proteínas totales de membrana, posee elevado PM (95 kDa) y está codificada por un gen situado en el cromosoma 17.

Tiene 3 dominios: el hidrofílico citoplasmático, que interactúa con ankirina, proteína 4.1, proteína 4.2, Hb y enzimas glicolíticas; el hidrofóbico transmembranal que forma el transportador de aniones y el dominio ácido terminal de función desconocida. Cuenta con un fragmento oligosacárido que es responsable de la antigenicidad del grupo sanguíneo li; Las funciones de esta proteína, son:

- contribuir al intercambio de iones Cl^- y HCO_3^- entre el interior y el exterior del hematíe.
- contribuir a fijar el esqueleto a la bicapa lipídica.^{16,27}

Glicoforinas; son ricas en ácido siálico, las de mayor importancia son cuatro (A, B, C y D), constituyen el 2% de las proteínas de membrana y tienen 3 dominios: uno citoplasmático, uno hidrofóbico que forma doble hélice a través de la membrana y uno extracelular fuertemente glicosilado.

Los fragmentos glicosídicos de éstas proteínas quedan expuestas a la superficie externa y expresan diversos grupos sanguíneos, la glicoforina A el grupo MN, la

glicoforina B el grupo Ss y las glicoforinas D y C expresan el grupo Gerbich, la C además desempeña un papel importante en la unión del esqueleto a la bicapa lipídica a través de la unión con la proteína 4.1.^{16,23,28}

Proteínas periféricas.

Localizadas sobre la superficie interna de la bicapa lipídica y pueden ser liberadas por manipulación de la fuerza iónica u otras sustancias capaces de alterar proteínas, forman el citoesqueleto, son muy diversas y su función es conocida. La técnica de PAGE-SDS, permite identificarlas y cuantificarlas fácilmente, las proteínas periféricas son:

Espectrina (bandas 1y2); es la más abundante del citoesqueleto, representa cerca del 27% de la masa total del citoesqueleto, resulta de la unión de 2 dímeros, formados cada uno de ellos por una cadena α y una cadena β . La alfa es codificada en el cromosoma 1 y la beta en el cromosoma 14. Establece interacciones funcionales con otras proteínas del esqueleto, en especial con la actina, la proteína 4.1 y la ankirina, de forma que cada 6 unidades de espectrina se unen a un oligómero de actina, formando una red de estructura hexagonal Cada unión espectrina-actina se estabiliza por la formación de un complejo ternario con la proteína 4.1.^{16,27,28}

Actina (banda 5); representa 5% de la proporción total de proteínas, esta se une a la espectrina y contribuye a estabilizar la unión entre sus dos unidades, solo que este efecto es relativamente débil y requiere la presencia de otras proteínas especialmente la proteína 4.1.

Sinapsina (proteína 4.1); posee estructura globular, esta constituida por dos fosfoproteínas de diferente PM, contribuye a la estabilidad de la unión entre la espectrina y la actina y al anclaje del esqueleto a la bicapa lipídica con la glicoforina C y la banda 3, a esta unión contribuyen también la proteína 4.9 y la tropomiosina.

Ankirina o proteína 2.1; constituye un importante punto de anclaje del esqueleto a la bicapa lipídica, especialmente a la banda 3 y a la cadena β de espectrina.

Dematina (proteína 4.9); representa el 1% del total de las proteínas en el eritrocito proteína que junto con la espectrina, la actina y la proteína 4.1 forman el citoesqueleto, se sugiere que tiene un papel importante en la maduración celular.

Palidina (proteína 4.2); representa aproximadamente el 4% de las proteínas del eritrocito, pertenece igual que el factor XIII de la coagulación, a la familia de las transglutaminasas y existe bajo diferentes isoformas, una de las cuales es específica para las plaquetas. Se considera que esta proteína estabiliza la asociación espectrina-actina-ankirina con la banda 3, contribuye a su oligomerización y, probablemente también, a su función transportadora de aniones. También puede proteger al citoesqueleto de envejecimiento prematuro por unión al calcio y otros cofactores que normalmente activan las transglutaminasas eritrocitarias.

Aducina (banda 2.9); es una fosfoproteína ligante de calmodulina participa en la interacción entre espectrina y actina, compuesta por heterodímeros α y β .

Tropomiosina (banda 7); representa menos del 1% del total de las proteínas, las posibles funciones incluyen estabilización de los filamentos cortos de actina y la especificidad de las interacciones de los protofilamentos de actina con espectrina.

La relación funcional de las proteínas del esqueleto entre sí y con la doble capa lipídica, se ha establecido a partir del modelo que considera 2 tipos de interacciones:

Horizontales, son paralelas al plano de la membrana y mantienen la estabilidad global del esqueleto, y son de dos tipos: unión entre dímeros de espectrina (sp-sp) para formar oligómeros de cuatro cadenas, y uniones entre β espectrina y actina, estabilizadas a su vez por las proteínas 4.1 y 4.9 (sp-4.1-4.9-actina). Un defecto en estas interacciones produce la pérdida de la elasticidad de la membrana y por efecto de la fuerza circulatoria el eritrocito sufre un alargamiento irreversible de su estructura: eliptocitosis hereditaria y piropoiquilocitosis hereditaria.

Verticales, son perpendiculares al plano de la membrana, unen el citoesqueleto a la bicapa lipídica (membrana) y también son de dos tipos: β espectrina y banda 3 estabilizada por ankirina y proteína 4.2 (sp-ank-4.2-3) y unión entre proteína 4.1, glicoforina C, banda 3 (4.1-glicoforina-3). Un defecto en estas interacciones resulta en la desestabilización de la membrana con vesiculación y pérdida del material lipídico a consecuencia de ello, disminuye la relación sup./ vol. y el eritrocito se hace esférico lo que conduce a esferocitosis hereditaria y ovalocitosis hereditaria.^{27,28}

Las proteínas periféricas no pertenecientes al esqueleto están constituidas por un elevado número de enzimas entre las que destacan las proteincinasas, que

intervienen en la fosforilación de la espectrina y de la proteína 4.1, hidrolasas y otras enzimas orientadas hacia el exterior de la superficie eritrocitaria. Son de gran interés las enzimas relacionadas con el transporte iónico entre ellas las ATPasas como la Bomba Na, K, ATPasa que regula el intercambio de Na^+ , K^+ y Cl^- entre ambos lados de la membrana, y es de gran importancia en la regulación del volumen eritrocitario.

Enzimas del eritrocito.

Vienen con el eritrocito, a partir de su síntesis, cuando este tenía núcleo (eritroblasto), ya poseía las enzimas. Las enzimas que nos interesan son las que están involucradas en el metabolismo energético del eritrocito.²⁸

METABOLISMO DEL ERITROCITO.

La maduración eritroblástica implica la desaparición de prácticamente todas las vías presentes en cualquier otra célula. El eritrocito maduro es incapaz de sintetizar lípidos o proteínas y obtener energía a través del ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa. Su única fuente energética es la glucólisis anaerobia, cuyo rendimiento neto es de 2 ATP (adenosin trifosfato) por cada molécula de glucosa oxidada. Esta fuente energética es suficiente para que desarrolle funciones que permiten su supervivencia en circulación.

El eritrocito presenta 4 vías metabólicas:

- glucólisis anaerobia (vía de Embden-Meyerhof).
- metabolismo oxido-reductor (ciclo de la hexosa monofosfato o vía de pentosas fosfato).
- metabolismo nucleotídico
- sistema diaforásico.^{21,23,28}

Glucólisis anaerobia.

La glucosa que difunde hacia el interior del eritrocito, es oxidada a piruvato mediante un proceso de glicólisis sin consumo de O_2 (anaerobio), en un proceso que consta de 3 etapas:

La primera fase del catabolismo de la glucosa comprende la fosforilación, la isomerización y la difosforilación de la glucosa para producir fructosa 1,6-difosfato, esto sirve como sustrato de la fragmentación por parte de la aldolasa para el producto final

de I fase 1: Gliceraldehido-3-fosfato (G3P) y dihidroxiacetona-fosfato (DHAP) con consumo de 2 ATP.

La segunda fase convierte el G3P en 3-fosfoglicerato (3-PG). Durante el primer paso de la reacción, el G3P se fosforila con un fosfato de alta energía y se oxida a 1,3-difosfoglicerato (1,3-DPG) mediante la acción de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (G-3PDH), esta reacción se acopla a la reducción de NAD^+ a NADH, que esta disponible como factor esencial para la reducción de la metahemoglobina a hemoglobina. El 1,3-DPG puede desfosforilarse por acción de la fosfogliceratocinasa (PGK), para generar ATP, o puede derivarse a la vía de Rapaport-Luebering.

La tercera fase incluye la conversión de 3-PG a piruvato y lactato con la generación de ATP.

La glucólisis anaerobia posee 3 enzimas que al catalizar reacciones irreversibles constituyen etapas limitantes (cualquier falla produce anemia hemolítica). Estas son:

-hexocinasa (HK) que transforma glucosa en glucosa-6-fosfato (G6P)

-fosfofructocinasa (PFK) que transforma fructosa-6-fosfato (F6P) en fructosa-1,6-difosfato (F1,6 DP)

-piruvatocinasa (PK) que transforma el fosfoenolpiruvato (PEP) en piruvato.^{23,28}

Una derivación importante de la glucólisis anaerobia es el ciclo de Rapaport-Luebering, que transforma el 1,3 DPG en 2,3 difosfoglicerato (2,3 DPG). Este último mediante fosforilación se transforma en 3-fosfoglicerato y con ello cierra el ciclo. Ambas reacciones son catalizadas por una misma enzima, con doble función: mutasa y fosfatasa. Aunque la importancia de este ciclo deriva de la función regulatoria del 2,3 DPG sobre la función hemoglobínica, es probable que este metabolito constituya un reservorio energético frente a una disminución de pH intraeritrocitario que disminuye la actividad glucolítica.

Otra reacción importante de la glucólisis anaerobia es catalizada por la enzima G-3PDH, ya que mantiene el nicotinamida-adenin-dinucleótido (NADH) en estado reducido imprescindible para mantener al Hierro (Fe) reducido en la Hb; a través de la reacción catalizada por NADH diaforasa.^{21,23}

Ciclo de la hexosa monofosfato (Vía de las pentosas).

Una vía alternativa a la glucólisis anaerobia es el ciclo de la hexosa monofosfato (vía de las pentosas), que en condiciones deriva entre 5-10% del catabolismo de la glucosa, sin embargo, cuando el nivel de glutatión reducido GSH en los hematíes cae por un brusco aumento de la oxidación intracelular, la actividad de esta derivación se incrementa notablemente.²¹

El principal factor limitante es el cociente (NADP⁺ /NADPH) nicotinamida-adenín-dinucleótido-fosfato oxidado/ nicotinamida-adenin-dinucleótido-fosfato reducido y la enzima glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6P-DH), que precisa del cofactor NADP⁺, pero que a la vez es intensamente inhibida por NADPH.

En el desarrollo de su función, el eritrocito suele encontrarse sometido a agresiones oxidantes y el NADPH es, por sí mismo insuficiente para amortiguarlas. La célula dispone de un compuesto, el glutatión (GS), que en estado reducido (GSH) realiza esta función.

El GS es un tripéptido sintetizado por 2 enzimas que precisan consumo de ATP. Bajo forma reducida y mediante una reacción catalizada por la glutatión peroxidasa, elimina el exceso de peróxido.

El nivel de GSH generalmente elevado, se mantiene gracias a NADPH (de la vía de las pentosas) y a la actividad de la glutatión reductasa.

El poder reductor del eritrocito reside en su capacidad de regenerar NADPH, necesario a su vez, para mantener el nivel de GSH.

El déficit congénito de G6P-DH porta una gran disminución del poder reductor eritrocitario. Dado que el glutatión no difunde a través de la membrana eritrocitaria, su concentración se mantiene gracias a un sistema en el que intervienen 2 enzimas: delta-glutamylcisteina sintetasa y glutatión sintetasa.

Este sistema metabólico consume energía (ATP) procedente de la glucólisis anaerobia.

Metabolismo nucleotídico.

Junto a las enzimas glucolíticas, el eritrocito dispone de otras enzimas que también contribuyen al mantenimiento del ATP, y que actúan sobre la llamada mezcla de nucleótidos adenílicos (adenosin trifosfato (ATP) y en mucho menor

proporción adenosin difosfato (ADP) y adenosin monofosfato (AMP)). Entre ellos se destacan la adenilatocinasa (AK), la ATPasa, la adenosindiaminasa (ADA) y la pirimidina-5-nucleotidasa. AK y ATPasa contribuyen a reciclar el ADP a partir de ATP generado en la glucólisis. La ADA transforma adenosina en inosina y contribuye a su eliminación o reciclaje. La pirimidina 5 nucleotidasa interviene en la degradación del RNA.

Sistema de diaforasas.

El mantenimiento de la función respiratoria de la Hb, requiere que el Fe hemínico se encuentre en estado reducido. A ello contribuye la enzima diaforasa o metaHb-reductasa (citocromo b_5 reductasa). El eritrocito normal posee 2 sistemas diaforásicos: el principal y el secundario.

En el principal interviene la citocromo b_5 reductasa, que utiliza el NADH (glucólisis) y en el secundario otra metahemoglobin-reductasa que utiliza el NADPH (vía de pentosas fosfato).

La citocromo b_5 reductasa está presente en gran número de células del organismo y cataliza la transferencia de electrones desde el NADH al citocromo b_5 , que los cede directamente al Fe hemínico, manteniendo su estado reducido.

La diaforasa que usa NADPH como sustrato, carece de aceptor fisiológico de electrones, por lo que permanece inactiva en condiciones normales.²⁸

Hemoglobina.

Es el componente eritrocitario más abundante y su función principal es fijar reversiblemente el oxígeno molecular O_2 para transportarlo desde los pulmones a los tejidos. Es una proteína con peso molecular de 68 kDa. Cada molécula de Hb está formada por 4 subunidades proteicas (globina), con un grupo hemo cada una de ellas, las subunidades proteicas, al unirse entre sí, forman una estructura en la que se disponen unas cavidades donde se alojan los grupos hemo. En su región central, las cuatro cadenas delimitan un espacio para el 2,3 DPG, metabolito imprescindible para su función.^{2,10,20}

Según la naturaleza de las cadenas globinas, se tienen 3 tipos de Hb:

Fetal = $\alpha_2 \gamma_2$, HbA₁ = $\alpha_2 \beta_2$ y HbA₂ = $\alpha_2 \delta_2$

Los adultos normales poseen predominantemente HbA₁ en un 96% y un porcentaje mucho mas pequeño (3%) de HbA₂ conservando <1% de Hb Fetal (tabla 3.1) hay dos formas moleculares de Hb Fetal porque las cadenas gamma pueden tener en el residuo 136, alanina o glicina, se identifican como Agamma o Ggamma. Durante el desarrollo embrionario hay otras formas moleculares que son más sensibles a las bajas concentraciones de O₂: Hb GowerI = $\zeta_2 + \epsilon_2$, Hb GowerII = $\alpha_2 + \epsilon_2$, Hb Portland = $\zeta_2 + \gamma_2$.^{2,23}

Las globinas tienen la cadena alfa (α) constituida por 141 aminoácidos (141 aa) y la cadena beta (β) por 146 aa, esas son las estructuras primarias.

ETAPA	CADENA GLOBINA	HEMOGLOBINA
Intrauterina. Embriogénesis temprana (producto de eritroblastos del saco vitelino)	$\zeta_2 + \epsilon_2$ $\alpha_2 + \epsilon_2$ $\zeta_2 + \gamma_2$	Hb Gower I Hb Gower II Hb Portland
Comienza en la embriogénesis temprana, alcanza su máximo a la mitad de la gestación declina con rapidez precisamente antes del nacimiento.	$\alpha_2 \gamma_2$	Fetal
Nacimiento	$\alpha_2 \gamma_2$ $\alpha_2 \beta_2$	F 60 – 90% A 10 – 40%
Adulto (a partir de los 6 meses de edad)	$\alpha_2 \gamma_2$ $\alpha_2 \beta_2$ $\alpha_2 \delta_2$	Fetal < 1% HbA ₁ 96% HbA ₂ 3%

Tabla 3.1 Hemoglobinas normales en diferentes etapas de la vida del ser humano.^{2,20,23}

La unión de los aa va a configurar determinada estructura espacial para todas las cadenas que es una alfa hélice, o sea la estructura secundaria. Es tubular y lo suficientemente rígida, pero hay partes de la cadena que tienen una estructura al azar, y es en esos puntos donde la cadena se puede plegar, dando una configuración globular, formando la estructura terciaria. Esto hace que los grupos apolares queden incluidos en el interior de la molécula, y los polares en la superficie, confiriendo solubilidad. Próximo a la superficie de esta estructura terciaria queda un espacio donde se aloja el grupo hemo. Las 4 cadenas de globina junto a los grupos hemo forman la estructura cuaternaria, de conformación globular, que permite la interacción entre cadenas diferentes y dificulta la de cadenas homólogas, es decir alfa-beta si y alfa-alfa o beta-beta no.

Al constituir esa estructura, queda en el centro una cavidad donde se aloja el 2,3 DPG. El grupo hemo es un tetrapirrol de protoporfirina IX, y tiene un átomo de Fe en estado reducido, que ocupa la posición central.

La unión del Fe^{2+} (reducido) a la protoporfirina IX, se establece gracias a que los orbitales electrónicos más periféricos del Fe quedan disponibles, y puede formar cinco o seis enlaces llamados de coordinación dependiendo de la unión del oxígeno (u otro ligando) a la Hb; 4 de estos enlaces unen el Fe a cada grupo pirrólico y el 5º lo une con el nitrógeno del imidazol de una histidina llamada histidina proximal, el 6º lo une al oxígeno molecular que además está unido a una histidina distal.²⁰

Funciones de los eritrocitos.

La misión del GR es proteger y transportar la Hb para que esta pueda realizar su función respiratoria. Para ello, tanto el núcleo como las estructuras citoplasmáticas han sido reemplazadas por una solución altamente concentrada de Hb, en la que también se encuentran diversas enzimas, imprescindibles para mantener un reducido metabolismo celular. Al no tener núcleo, esta célula no puede replicarse ni sintetizar proteínas.²³

La función de la Hb es esencialmente respiratoria, transporta el O_2 de los pulmones y puede transportar el CO_2 desde los tejidos a los pulmones. Cada molécula de Hb puede fijar 4 moléculas de O_2 .

Hay dos formas de Hb principalmente, de acuerdo a su función:

Oxihemoglobina (oxiHb) predomina en sangre arterial, es la hemoglobina que fija O_2 , uniéndose este al Fe^{2+} y la Desoxihemoglobina (desoxiHb) que predomina en sangre venosa y no tiene oxígeno. Cuando la sangre está expuesta a diversas drogas y a los agentes oxidantes in vitro o in vivo, el hierro ferroso (Fe^{2+}) de la molécula de hemoglobina es convertido en hierro férrico (Fe^{3+}) formando metahemoglobina, pero gracias al sistema enzimático de los eritrocitos NADH-metahemoglobina reductasa, se convierte de nuevo a la metahemoglobina en hemoglobina.

También existe; Carboxihemoglobina (carboxiHb) que está unida al CO y la Carbaminohemoglobina (carbaminoHb) que está unida a CO_2 .

El predominio, ya sea de oxiHb o de desoxiHb depende de la presión parcial de O₂ del medio, de la temperatura, del pH y de la concentración de 2,3 DPG.

El 2,3-DPG y el H⁺ compiten con el O₂ para fijar la hemoglobina desoxigenada disminuyendo la afinidad de la hemoglobina para el O₂ al cambiar las posiciones de las 4 cadenas peptídicas.^{7,10,15}

3.2 FAMILIA DE LOS LEUCOCITOS.

Generalidades de los leucocitos.

Los leucocitos o glóbulos blancos, incoloros en la sangre y menos abundantes, pasaron inadvertidos hasta la aparición de mejores lentes en los microscopios. William Hewson observó por primera vez los leucocitos en sangre en el siglo XVIII, pensó que procedían de células nucleadas en la linfa y que finalmente surgían del bazo como eritrocitos. En el siglo XIX se intensificó más el interés en ellos con estudios sobre inflamación e infección microbiana. La relación de pus en áreas de inflamación con los leucocitos de la sangre la propuso William Addison en 1843, el reconoció el parecido de las células nucleadas que se encontraban en exudados de los granos y forúnculos con las células nucleadas de la sangre periférica.^{15,36}

Varios años después, Augustus Waller observó la migración de leucocitos entre células epiteliales adyacentes en las paredes de los capilares en una preparación fija de lengua de rana, hiperextendida. Julius Cohnheim confirmó el hallazgo; encontró que corpúsculos sanguíneos de tejido corneal teñidos vitalmente e implantados en ranas se podían encontrar más adelante en el saco linfático subcutáneo; esto demostró que las células sanguíneas podían abandonar los vasos sanguíneos y penetrar en los tejidos.

Más tarde, Metchnikov propuso la naturaleza defensiva de la inflamación y formación de pus al observar la presencia de células sanguíneas nucleadas que rodeaban una espina de una larva de estrella de mar introducida por debajo de la piel.

Así como hubo grandes descubrimientos sobre hematíes en el apogeo de la hematología iniciando con Ehrlich y sus tinciones aplicadas a las extensiones sanguíneas secas, también los leucocitos se pudieron distinguir en estas preparaciones de acuerdo a sus características nucleares y citoplasmáticas. Las categorías de los leucocitos de Ehrlich manifiestan naturaleza descriptiva: acidófilos, basófilos,

neutrófilos, linfocitos, mononucleares grandes y mononucleares grandes con muescas en el núcleo. Ehrlich comprendió además que algunos trastornos patológicos específicos van acompañados de variaciones en el número de leucocitos. En la actualidad se acepta que la función defensiva de estas células incluye dos acontecimientos separados pero interrelacionados: la fagocitosis y el desarrollo subsecuente de la respuesta inmunitaria.¹⁵

Los glóbulos blancos son corpúsculos esféricos con núcleo, incoloros cuando se hallan en suspensión en la sangre; se clasifican de acuerdo a la morfología nuclear en dos grupos: los polimorfonucleares (PMN) también llamados granulocitos y los mononucleares (MN). Su nombre tuvo origen en la delgada capa de sedimento blanco que se forma sobre el sedimento rojo, al dejar reposar sangre por algunas horas en un tubo. Muchos de los leucocitos se diferencian con el empleo de marcadores celulares que recibieron un código alfa-numérico por ejemplo CD1, donde CD significa grupo de designación o diferenciación (Cluster Designation).

Algunos tienen prolongaciones en su membrana llamadas pseudópodos que les facilita moverse libremente, desplazándose de una parte a otra de los vasos sanguíneos.

Los granulocitos tienen un núcleo de forma irregular y presentan gránulos específicos en el citoplasma que al microscopio electrónico, aparecen envueltos en una membrana. De acuerdo con la afinidad tintoreal de sus gránulos citoplasmáticos se distinguen en tres tipos de células: neutrófilos, eosinófilos y basófilos.^{12,14,23,38}

La transición de una fase de desarrollo a otra en los PMN es gradual y muchas células intermediarias son difíciles de distinguir unas de otras. En caso de duda, se suele incluir la célula en la categoría más madura, pues es más probable que pertenezca a ella.⁶

Los leucocitos polimorfonucleares maduros probablemente no pasen más de 8 horas en la sangre circulante, a la que abandonan para emigrar a varios tejidos, donde sobreviven 2 a 4 días y mueren por apoptosis.

Los mononucleares tienen el núcleo de forma más regular comparados con los polimorfonucleares y el citoplasma no posee granulaciones específicas, pudiendo sin

embargo presentar gránulos azurófilos inespecíficos, presentes también en otros tipos celulares; hay dos tipos de células mononucleares: los linfocitos y los monocitos.

El linfocito maduro adopta normalmente dos formas en la sangre periférica linfocito pequeño y linfocito grande (menos numeroso) y están en una concentración de 18 a 42%, mientras para el monocito es de 2 a 11 por cada 100 leucocitos.^{12,14}

El recuento total de leucocitos en la sangre periférica es alto al nacer, de 9 a 30 X 10⁹/L. Durante los primeros días logran verse unas cuantas células granulocíticas inmaduras (mielocitos y metamielocitos); sin embargo, después no hay leucocitos inmaduros en la sangre periférica, excepto en caso de enfermedad. En una semana, el recuento de leucocitos disminuye a un valor entre 5 a 21X10⁹/L

se produce una declinación gradual hasta los 8 años de edad, momento en el cual la concentración de leucocitos es de 4.5 a 11.5 X10⁹/L.^{15,23}

Las funciones de los leucocitos se efectúan en el espacio extravascular, es por ello que la sangre sólo sirve como medio para que los leucocitos puedan ir al sitio donde se hace necesaria su participación.

Constantemente los leucocitos salen de los capilares (diapédesis) pasando entre las células endoteliales para penetrar en el tejido conjuntivo.

Sin embargo cuando los tejidos son invadidos por microorganismos, los leucocitos son atraídos por quimiotaxis, es decir, por sustancias originadas en los tejidos, en el plasma sanguíneo y por los agentes infecciosos que provocan en los leucocitos una respuesta migratoria, dirigiéndose hacia los puntos donde existe mayor concentración de agentes quimiotácticos.

Clasificación de leucocitos de acuerdo a su función:

-Fagocitosis

-neutrófilos.

-monocitos.

-eosinófilos (también participan en infecciones parasitarias).

-Reacciones alérgicas, hipersensibilidad e inflamación

-eosinófilos.

-basófilos.

-Respuesta inmunitaria

-linfocitos T (inmunidad mediada por células).

-linfocitos B (inmunidad humoral).

-monocitos (producción de citocinas).^{1,10,12}

3.2.1 POLIMORFONUCLEARES.

3.2.1.1 NEUTRÓFILOS.

Generalidades de los neutrófilos.

El neutrófilo pasa por seis etapas morfológicamente identificables en el proceso de maduración desde la célula progenitora unipotencial hasta el neutrófilo segmentado funcional: 1)mieloblasto, 2)promielocito, 3)mielocito, 4)metamielocito, 5)neutrófilo en banda y 6)neutrófilo segmentado.

Las etapas de estos que se ven normalmente en sangre periférica son: neutrófilo en banda y neutrófilo segmentado. La concentración normal de los primeros es de 0 a 5% (0 a $0.575 \times 10^9/L$), mientras que el segundo es el leucocito polimorfonuclear mas abundante en la sangre periférica del adulto, encontrándose de 50 a 70% (2.25 a $8.05 \times 10^9/L$). Al nacer la concentración de neutrófilos es de cerca de 60%; este nivel desciende a 30% hacia los 4 a 6 meses de edad, después de los 4 años de vida la concentración aumenta de manera gradual hasta los valores de adultos los cuales se alcanzan a los 6 años de edad.

El neutrófilo promedio permanece en circulación de 6-8h, antes de entrar en diapédesis, aunque algunos mueren por envejecimiento; transcurrido este tiempo ingresa a tejido y permanece 2 a 3 días, para posteriormente ser eliminado por sudoración, excreciones (salival, gástrica) y por el sistema de fagocitos normales del tejido.

Si se produce infección, el estadio en sangre periférica es mas corto y pasan mas rápidamente a tejido.^{3,14,15,23}

Características estructurales de los neutrófilos.

El núcleo de estos PMN está formado por cromatina irregular densa y ya no presenta nucléolos. La forma mas joven en sangre es la célula “en banda” o “en

cayado”, la cual se considera cuando la escotadura del núcleo es mas grande que la mitad del diámetro del núcleo redondo hipotético dando un aspecto de herradura, se dice que tiene un núcleo en forma de C o S (Figura 3-3), y el diámetro de esta célula está entre 9 y 15µm, ligeramente menor que la etapa anterior de maduración.

En el neutrófilo segmentado que es la forma madura, el núcleo se segmenta en varios lóbulos unidos por pequeños puentes de cromatina, estos tienen el núcleo formado mas frecuentemente por 3 lóbulos, el tamaño de esta célula oscila entre 9-15µm (Figura 3-4), al envejecer la célula, el número de lóbulos aumenta hasta llegar a 5 lóbulos. La presencia de más de 5 lóbulos es anormal y se clasifica como neutrófilo hipersegmentado.^{12,14,15}

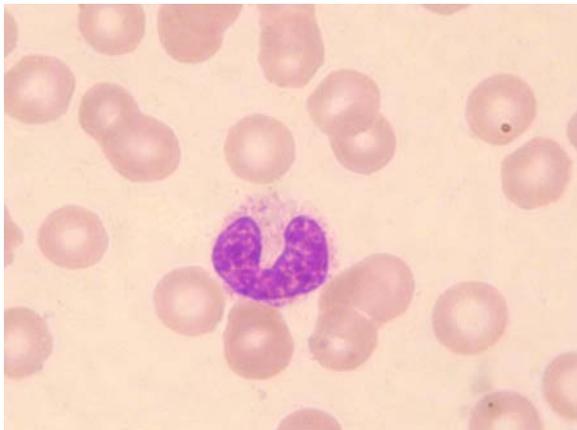


Fig.3-3. Neutrófilo en banda, el núcleo presenta una muesca pronunciada. (1000X).



Fig.3-4. Neutrófilo segmentado en tres lóbulos. La cromatina es mas condensada (1000X).

En el núcleo de los neutrófilos de personas de sexo femenino aparece frecuentemente un pequeño apéndice mucho menor que un lóbulo nuclear, con forma de raqueta o palillo de tambor y el cual se conoce como cuerpo de Barr y logra identificarse en 1 a 5% de los neutrófilos circulantes. Este apéndice contiene la cromatina sexual, constituida normalmente por un cromosoma X heterocromático.^{10,12,15}

El abundante citoplasma acidófilo de los neutrófilos esta cargado de granulaciones específicas (secundarias), cuyas dimensiones (0.3-0.8µm) se sitúan próximas al limite de resolución del microscopio óptico. Estas granulaciones son poco afines a los colorantes, se tiñen de color marrón con las coloraciones panópticas habituales, son finas y se distribuyen uniformemente.

Además de los gránulos específicos, los neutrófilos contienen gránulos azurófilos (primarios), la distinción se basa en la cronología de la aparición de cada tipo de gránulo durante la maduración de los neutrófilos en la medula ósea, en el aspecto histológico de estos y en su composición química, lo que determina diferencias en sus funciones.

Los gránulos azurófilos se producen primero, dejando de sintetizarse cuando se inicia la producción de los gránulos específicos; el número de gránulos azurófilos por célula decrece durante las divisiones mitóticas, pues se distribuyen entre las células hijas, mientras la síntesis de los gránulos específicos continúa y su número aumenta llegando a ser el tipo predominante en el neutrófilo maduro.^{4,12,28}

Composición química de los neutrófilos.

Los neutrófilos contienen en su membrana receptores de superficie, los cuales median tanto la activación como la modulación de la actividad fagocítica. La unión de un ligando al receptor, inicia una serie de procesos bioquímicos que intervienen en la modificación de moléculas efectoras, tales como citoesqueleto y proteínas contráctiles (movimiento) o el complejo enzimático NADPH oxidasa (estallido respiratorio).¹⁶

Los neutrófilos como todos los leucocitos contienen en su membrana receptores de adhesión dependiente de activación que se expresan en grado máximo cuando estos se activan por factores estimulantes (quimioatrayentes).

De acuerdo a su estructura molecular existen tres familias de estos receptores de adhesión que median la interacción del neutrófilo con el resto del sistema inmunitario y el endotelio, estas son: integrinas (β_2 -integrinas), selectinas y la familia del supergen de inmunoglobulinas (Ig), cada una de estas es una proteína transmembranal con 3 dominios: extracelular, transmembranal e intracelular.¹⁵

Las integrinas; interactúan con diversos ligandos, de las células endoteliales, de glucoproteínas de la matriz extracelular, del factor del complemento C3bi, y son necesarias para la motilidad y la migración transendotelial normal del leucocito.

Son al menos tres β_2 -integrinas presentes: antígeno asociado a la función leucocitaria (LFA-1) (CD11_a-CD18), (Mac-1) (CD11_b-CD18) y gp150/95 (CD11_c-CD18), cada uno de estos receptores con una subunidad α (CD11_a, CD11_b,

CD11_c) enlazada en forma no covalente con una subunidad β común (CD18), por eso esta familia es conocida también como complejo CD11/CD18.^{15,16}

LFA-1 está implicado en interacciones célula a célula y tiene relevancia en la adhesión de todas las células leucocitarias. Mac-1 es expresado por neutrófilos, monocitos y linfocitos granulares grandes, se reconoce también como receptor C_3 (CR₃), fija complemento (C3bi), además de ser fundamental para la adhesión de neutrófilos a células endoteliales activadas en el curso de las reacciones inflamatorias, sirve como vía para que los neutrófilos activados desencadenen una fagocitosis eficiente y el impulso de la cadena respiratoria y por último gp150/95, también es expresado por neutrófilos, monocitos y macrófagos y se une también a C3bi.

La segunda familia son las selectinas llamadas así por tener un dominio lectina; existen también tres miembros de esta familia: L-selectina, E-selectina y P-selectina. La primera está presente en concentraciones altas en neutrófilos circulantes en reposo y en el resto de los leucocitos, desempeña una función en la extravasación de los leucocitos en los sitios de lesión. Las otras dos selectinas están en células epiteliales (CE) activadas y los neutrófilos contienen en la membrana los contra receptores para ellas, la E-selectina promueve la adhesión de neutrófilos, monocitos y un subgrupo de linfocitos T a las CE y ayudan a regular la migración a las áreas tisulares de inflamación.^{15,16,24,29}

Por último la familia del supergén de inmunoglobulinas, comparten un dominio inmunoglobulina de 90 a 110 aa constituido por dos láminas β , cada una integrada por tres a cuatro hélices antiparalelas, estabilizadas por interacciones hidrofóbicas y un puente disulfuro entre dos cisteínas, cada una perteneciente a una de las hélices de cada lámina. Los miembros de esta familia son: moléculas de adhesión intercelular 1,2 y 3 (ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3), moléculas de adhesión a células vasculares (VCAM-1), antígeno asociado a la función leucocitaria 2 y 3 (LFA-2, LFA-3), receptor de célula T (RCT), CD4, CD8, complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I y II.

Algunos de estos receptores como el ICAM-1, el ICAM-2 o el VCAM-1 que se encuentran en la membrana de CE tienen contra receptores en la membrana de los leucocitos, interponen respuestas celulares y ayudan a reclutar a estos últimos a las áreas de inflamación. Otros receptores de esta misma familia como el LFA-2, RTC, CD4

y CD8 que se encuentran en linfocitos T y las moléculas MHC clase I y II, al entrar en contacto con sus contra receptores, regulan la interacción de los leucocitos con otras células en la respuesta inmunitaria y logran aumentarla.^{15,22}

Entre los péptidos quimiotácticos, el mas estudiado es el N-formil, que es un producto del metabolismo bacteriano, para el estudio del receptor de N-formil, se han usado oligopéptidos sintéticos tales como formil-metionil-leucil-fenilalanina o análogos, por eso este receptor que además es exclusivo de los neutrófilos también es conocido como receptor fMLP.¹⁶

Además de los receptores útiles para la adhesión y migración los neutrófilos tienen receptores para la activación que reconocen a los antígenos por medio de estructuras bioquímicas diferentes pero que se caracterizan por que son específicas de un grupo o clase entera de patógenos y por que reconocen moléculas que son esenciales para la supervivencia o patogenicidad de los microorganismos. Estos son de dos tipos, los receptores endocíticos que median la fagocitosis y los receptores de señalización que participan en la inducción de la respuesta inmune e inflamatoria contra el patógeno, ejemplo de los primeros esta el receptor de la manosa y los receptores tipo Toll son ejemplo de los receptores de señalización.²²

En cuanto a los gránulos presentes en los neutrófilos, en un caso normal, este tiene el doble de gránulos específicos también llamados secundarios, que de inespecíficos llamados primarios o azurófilos.

Los gránulos azurófilos al microscopio electrónico son mayores y mas electrodensos que los específicos. Por su alto contenido en hidrolasas ácidas especialmente la fosfatasa ácida, pueden considerarse lisosomas, según se ha demostrado por técnicas citoquímicas y bioquímicas contienen diversas enzimas como son: peroxidasa (mieloperoxidasa), catepsina G, elastasa, proteínas catiónicas como la lisozima, el agente microbicida permeabilizante, proteasas como la proteinasa 3, y contiene mucopolisacáridos sulfatados, los cuales contribuyen al carácter azurófilo y determinan una fuerte metacromasia al ser teñidos con azur A, como ya se dijo la fosfatasa ácida también esta en estos gránulos pero parece que no es exclusiva de estas estructuras.

La mieloperoxidasa se encuentra fundamentalmente en los gránulos primarios por lo que es específica para serie granulocítica y es el mejor marcador enzimático de estas granulaciones.

La lisozima (proteína catiónica) rica en arginina, esta presente en las granulaciones primarias en menor cantidad que en las secundarias.

Otras hidrolasas contenidas en los gránulos primarios son: β -galactosidasa, β -glucuronidasa, N-acetil- β -glucosaminidasa, arilsulfatasa, esterasa, naftilamidasa, catepsinas B y D, β -glicerofosfatasa, enzimas generantes de cininas y factor inactivante de C5a.^{4,12,16,28}

Los gránulos específicos neutrófilos empiezan a aparecer en el mielocito, están rodeados por una membrana fosfolípida que se tiñe con Sudan negro B, tienen un tamaño aproximado de 0.3-0.8 μ m y son menos densos que los gránulos inespecíficos, su composición química los diferencia de estos, son negativos a la mieloperoxidasa y contienen lisozima en proporción superior a la de los inespecíficos, contienen: colagenasa, lactoferrina, proteínas captadoras de vitamina B12, proteasa activada por el complemento, β_2 -microglobulinas, citocromo b, complejo CD11/CD18, histaminasa y receptor fMLP, activador del plasminógeno y receptor de C3bi.

La lactoferrina es una de las sustancias mas importantes para la acción bactericida no olvidando que solo se encuentra en gránulos secundarios, algunas moléculas contenidas en los gránulos están dotadas de poder bactericida y otras bacteriostático.

Con la maduración del neutrófilo los gránulos azurófilos aparentemente desaparecen, pero las enzimas como la mieloperoxidasa y la fosfatasa ácida se pueden demostrar aun; lo que sucede entonces es que la azurofilia de los gránulos se ha perdido, pues durante la maduración llegan a los gránulos vesículas con mucopolisacaridasas que degradan a estos carbohidratos dejando visibles casi únicamente a los gránulos específicos.

También existen unas estructuras vesiculares submembranales donde se localiza la fosfatasa alcalina granulocitaria, y además unos gránulos terciarios que contienen gelatinasa, con rasgos morfológicos muy similares a los secundarios pero algo menos densos, llamados también gránulos de gelatinasa.^{4,12,16,28}

Tanto los gránulos primarios como los secundarios contienen, en general, enzimas que ayudan a la digestión (degradación de lípidos, hidratos de carbono y proteínas), pero si se pretende realizar reacciones de reconocimiento de elementos de serie mieloide es importante recordar que desde que se tiene un mieloblasto con gránulos primarios, dará reacción positiva a la mieloperoxidasa. Si es blasto linfoide dará reacción negativa.⁴

Sobre la membrana del neutrófilo también existe una oxidasa la cual produce reducción enzimática de oxígeno y da lugar a la formación de metabolitos microbactericidas.

El neutrófilo es una célula en fase final de diferenciación, que realiza una síntesis proteica muy limitada. Presenta pocos perfiles de retículo endoplásmico rugoso, escasos ribosomas libres, pocas mitocondrias y complejo de Golgi rudimentario.^{12,22}

Funciones de los neutrófilos.

Son la segunda línea de defensa del organismo ya que abandonan el torrente circulatorio cuando por quimiotaxis se induce su extravasación a los tejidos donde participan como tropas de refuerzo, son las primeras células que arriban al sitio de infección, el sistema fagocitario de los neutrófilos posee muchas propiedades ventajosas como elemento de la inmunidad innata primero son atraídos por una gran variedad de estímulos que por lo general alertan acerca de la presencia de daño tisular independientemente de la causa, esto asegura que puedan responder a muchos tipos diferentes de daño incluyendo a aquellos a los que nunca se habían enfrentado, además, debido al gran número de neutrófilos que circulan de manera continua en el torrente sanguíneo y dado que casi todos responden al mismo grupo de factores quimiotácticos un buen número de estos se puede desplazar hacia el sitio de daño sin tardanza, más aún por su alta efectividad para destruir ciertas bacterias y su capacidad para digerir ciertos detritos celulares y partículas exógenas representan un primer paso fundamental en el proceso de curación.^{16,22,29}

FAGOCITOSIS

El experimento realizado por Metchnikoff con una espina de una larva de estrella de mar puede considerarse el punto de partida de la inmunología celular, él mismo

demonstró como algunos microorganismos pueden ser atacados por las células sanguíneas y destruidos dentro de estas, llamó fagocitosis a la ingestión de estas bacterias por las células sanguíneas, concluyendo que era el principal mecanismo de defensa de los organismos y descubrió los dos tipos de leucocitos circulantes con esta capacidad de fagocitar, los PMN y los monocitos (macrófagos) como leucocitos fijos con la misma capacidad.²⁴ La fagocitosis en los PMN puede dividirse en 5 etapas distintas y temporalmente secuenciales: 1)movilidad (quimiotaxis), 2)reconocimiento (opsonización), 3)ingestión (pinocitosis, fagocitosis), 4)desgranulación (de peroxidasas e hidrolasas), 5)destrucción intracelular (digestión, muerte bacteriana).

QUIMIOTAXIS

Una vez adheridos, los neutrófilos se acomodan activamente entre las células endoteliales, salen de la vénula y se introducen en el tejido adyacente mediante un proceso llamado migración, viajan por medio de movimientos ameboides, contra el gradiente de concentración de los factores quimiotácticos. La migración a través del endotelio se produce por diapédesis hasta que el neutrófilo pasa la membrana basal y las células periendotheliales para llegar al sitio de infección /inflamación.^{15,29}

Los neutrófilos pueden detectar y responder a gradientes de quimiotaxinas (factores quimiotácticos) tan bajos como 1%, en sangre son esféricos y no fagocitan, se convierten fagocíticos cuando tocan un sustrato sólido sobre el cual puedan emitir sus pseudópodos, el movimiento ameboides se inicia una vez detectado el gradiente quimiotáctico, con un cambio de forma esférica a una forma polarizada y elongada moviéndose a una velocidad de 19 a 36µm por minuto.

Las sustancias quimiotácticas pueden ser de origen exógeno como los productos del metabolismo bacteriano (péptidos de formil), o pueden ser de origen endógeno entre los que destacan los derivados activos del complemento sérico como: las anafilotoxinas C5a, o C3a, fragmentos de fibrina, factor activador de plaquetas (PAF) o los producidos en el sitio de inflamación por neutrófilos o macrófagos como el leucotrieno B₄ o la interleucina 8 [IL-8].^{12,16,29}

La migración se regula por mecanismos de reconocimiento de leucocito-célula endotelial, se ha planteado que se requiere de tres acciones secuenciales: 1) adhesión primaria de leucocitos y células endoteliales (reversible), 2) activación de leucocito por

señales quimioatrayentes o por contacto celular que desencadena la expresión de receptores secundarios de adhesión de leucocitos (receptores dependientes de activación), y 3) fijación sostenida, fuerte, del leucocito a la célula endotelial.

Los neutrófilos emplean pseudópodos para deslizarse a través de las células endoteliales, el movimiento celular dirigido depende de ondas coherentes de ensamble y dispersión de actina y miosina.^{15,16}

OPSONIZACIÓN

Una vez que llega el fagocito, debe reconocer a la sustancia extraña antes de que se produzca fijación y de inicio la fagocitosis. Muchos tipos de partículas, incluyendo la mayoría de las especies bacterianas encapsuladas, no interaccionan eficientemente con algún receptor celular y por tanto no pueden ser fagocitados directamente; no obstante puede llevarse a cabo si su superficie se encuentra cubierta con ciertas proteínas del huésped, como anticuerpos, complemento o ambas cosas, para que sean aceptadas por el neutrófilo, es en cierta forma, un anclaje del fagocito sobre la sustancia extraña para poder producir una fagocitosis y digestión de mayor efectividad.

La opsonización tiene lugar por que el fagocito tiene receptores de superficie específicos para las opsoninas (receptores Fc y receptores para complemento) y cuando estas cubren la partícula blanco se favorece su fagocitosis. Dos opsoninas que están bien definidas son la IgG y el componente de complemento C3b.^{15,29}

El reconocimiento del antígeno se produce por medio de 2 tipos de receptores presentes en la membrana del fagocito:

- receptor para la fracción cristalizante de la Ig.
- receptor para fracción C3 activada del complemento.¹⁶

INGESTIÓN Y DESGRANULACIÓN.

Es la etapa propia de incorporar la sustancia extraña al fagocito, inicia al activar un sistema contráctil de interacción entre las proteínas: actina y la proteína fijadora de actina y miosina, el neutrófilo emite pseudópodos alrededor de la partícula, que al tocarse entre si se fusionan dejándola encerrada y formando así el fagosoma, limitado por la membrana citoplasmática volteada hacia adentro, esto evita que la célula se lesione así misma al atacar microorganismos. Durante la ingestión se activa una

oxidasa fija a la membrana plasmática, que produce reducción enzimática de oxígeno y da lugar a metabolitos microbactericidas.^{15,16,24}

Posteriormente se produce la liberación de gránulos de los fagocitos hacia el fagosoma para fusionarse con él, disuelven su contenido en el interior de la vacuola digestiva y forman el fagolisosoma. Esta fusión y liberación se conoce como desgranulación.

Los gránulos de los fagocitos contienen algunas enzimas y sustancias que causan la muerte del microorganismo, pero el efecto directo del contenido granular es la digestión del microorganismo ya muerto. La secreción de los gránulos secundarios ayudan también a regular la inflamación. Hay datos de que se realiza también cierta desgranulación hacia el exterior de la célula.^{15,16}

DIGESTIÓN.

La acción lítica o digestiva se da por dos mecanismos básicos:

1) Oxígeno independiente, se basa en 2 principios.

1) Cambio de pH; las sustancias liberadas desde el interior de los gránulos del fagocito producen un cambio brusco de pH. esta variación puede deberse al contenido de los gránulos azurófilos o a una bomba de iones, el pH del fagolisosoma puede ser tan bajo como 4.0 debido a la acumulación de ácido láctico, lo que previene el crecimiento de la mayoría de los patógenos. Además este microambiente ácido optimiza la actividad de numerosas enzimas microbicidas.

2) Por el uso de sustancias presentes dentro de los neutrófilos, numerosas hidrolasas ácidas, entre estas se encuentran: las proteasas, nucleasas, glucosidasas, lipasas, etc. También contienen moléculas que inactivan microorganismos como las proteínas catiónicas, presentes en gránulos primarios, estas dañan la permeabilidad de la membrana celular por interacción con sus superficies cargadas negativamente, la lisozima que esta en gránulos específicos e inespecíficos, tiene la capacidad de hidrolizar los mucopéptidos de la pared celular bacteriana, pero sirve mas en su capacidad digestiva que microbicida, y la lactoferrina, presente en gránulos secundarios, la cual, quela al Fe presente e impide que la bacteria pueda utilizarlo, llevando acabo su acción bacteriostática.^{16,22}

II) Oxígeno dependiente, es el más importante y puede ser dependiente o independiente de la peroxidasa.

Los fagocitos destruyen microorganismos por generación de especies reactivas de oxígeno con potente actividad microbicida. En este mecanismo conocido como “estallido respiratorio”, la célula aumenta la respiración celular, incorporando gran cantidad de oxígeno que sigue una secuencia de transformaciones, primero en anión superóxido (O_2^-), que es sumamente agresivo porque ataca cualquier organismo vivo y lo destruye. El O_2^- puede originar peróxido de hidrógeno (H_2O_2), bases y radicales libres. Al mismo tiempo, la célula comienza a oxidar grandes cantidades de glucosa a través de la vía de hexosa monofosfato, por la cual también se obtienen especies reactivas de oxígeno.

El O_2^- y el H_2O_2 son productos inmediatos del estallido respiratorio usados como materia prima para la producción de oxidantes microbicidas que pueden ser de dos tipos:

- 1) Halógenos oxidados como el hipoclorito que se produce por la oxidación del Cl^- en presencia de H_2O_2 y que es un agente microbicida extraordinariamente potente.
- 2) Radicales oxidantes como el radical hidroxilo (OH^-).

El H_2O_2 que actúa como sustancia bactericida, necesita de mieloperoxidasa para ejercer su acción, que también está presente en los gránulos del neutrófilo. Si esta enzima no se encuentra presente, el oxígeno no puede formar peróxido.^{15,16,22} La deficiencia de mieloperoxidasa, se compensa en parte por el aumento de la actividad de los sistemas independientes de mieloperoxidasa.

Algunos microorganismos llegan a producir H_2O_2 con lo cual ayudan a la actividad microbicida de los neutrófilos, ya que este puede ser tóxico si está en concentraciones elevadas tanto para el microorganismo que lo formó como para otras especies microbianas.¹⁵

Todo se produce como acción conjunta de digestión y eliminación. Después de la digestión, al neutrófilo se le presentan 2 opciones: muere en el proceso de fagocitosis; en el exudado y es fagocitado por macrófagos, opción que se presenta normalmente en procesos infecciosos donde se forma pus, o continúa en tejido después de la

degradación, sintetizando leucotrienos a partir del ácido araquidónico de sus membranas celulares, esto sucede en el caso de los procesos inflamatorios.¹⁰

Los gránulos específicos pueden descargar su contenido accidentalmente al exterior del neutrófilo durante la formación del fagosoma, ya que la desgranulación suele iniciarse antes de que la partícula blanco sea engullida por completo, la exocitosis o degranulación extracelular es un fenómeno común y es útil al momento de destruir microorganismos adheridos que por su tamaño no han sido ingeridos, pero aunque la degranulación extracelular es benéfica en algunas circunstancias también conlleva el riesgo de producir un daño serio a los tejidos del huésped.²⁹

Por otro lado los neutrófilos además de participar en la muerte de microorganismos por fagocitosis, interactúan en otros procesos fisiológicos; estimulan la coagulación y liberan una sustancia que desencadena la conversión de precalicreína a calicreína, la cual activa el primer factor de contacto de la coagulación sanguínea.

La calicreína también convierte al cininógeno en cinina, la cual es responsable de la dilatación vascular y aumento de la permeabilidad vascular, así como de atraer a otros neutrófilos al sitio de inflamación por su acción quimiotáctica. Los neutrófilos activan la producción de cininas pero al acumularse las células también las desdoblan. Por último los neutrófilos contienen interleucina-1 (IL-1) la cual es un pirógeno, por lo que causa una elevación de temperatura en el individuo.¹⁵

3.2.1.2 EOSINÓFILOS.

Generalidades de los eosinófilos.

Las etapas de maduración de este PMN son semejantes a las descritas para los neutrófilos con formación de muescas y segmentación nuclear gradual, el eosinófilo se distingue como tal a partir de que comienza el precursor a formar gránulos específicos, que corresponde al paso de mielocito a metamielocito, ya que hasta promielocito existe predominio de las granulaciones primarias, a medida en que progresa la maduración estas disminuyen y aumentan las granulaciones específicas, como ocurre en los neutrófilos.^{15,28}

Estos son mucho menos numerosos que los neutrófilos, llegando apenas al 1-3% del total de los leucocitos durante toda la vida, es decir de 0.045 a 0.345 X10⁹/L,

aunque durante los primeros tres meses de vida, la cuenta de eosinófilos puede ser tres veces mayor que la del adulto. Dado que la proporción de eosinófilos suele ser baja en frotis de médula ósea y sangre periférica la separación rutinaria de estos en mielocitos, metamielocitos, en banda y segmentados, no ofrece utilidad clínica. Sin embargo, si la proporción de eosinófilos se halla notablemente aumentada, conviene efectuar un análisis de porcentaje de las diferentes fases de maduración.

La mayor parte de la población de eosinófilos del cuerpo esta por debajo de la capa epitelial en los tejidos que están expuestos al ambiente externo, como las vías nasales, piel y vías urinarias.

Estas células pasan poco tiempo en sangre periférica de 1 a 8 horas antes de migrar a los tejidos donde logran vivir varias semanas. Los eosinófilos tisulares pueden regresar a la circulación y a la MO.^{6,15}

Características estructurales de los eosinófilos.

El núcleo es generalmente bilobulado, pudiendo en algunas ocasiones tener tres lóbulos, presenta cromatina condensada (densa) y mide de 12 a 17 μ m (Figura 3-5), un tamaño semejante a los neutrófilos, se caracterizan por tener en su citoplasma gránulos acidófilos mayores que en los neutrófilos de forma redondeada o esférica todos, con un tamaño de 0,5 y 1,5 μ m en su eje mayor, son más numerosos, ocupan todo el citoplasma de la célula y se tiñen por la eosina de color rojizo-naranja o rosa salmón intenso, siendo muy refringentes.^{12,14,15}

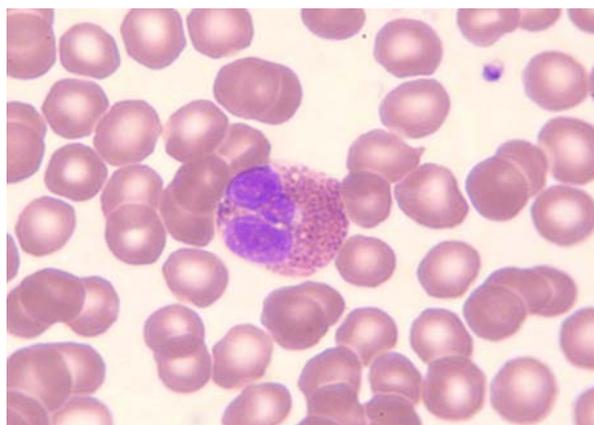


Fig.3-5. Eosinófilo, se observan los gránulos rojizo-naranja y el núcleo bilobulado. (1000X).

Observando la parte mas fina del campo microscópico, aumentando la iluminación y prestando atención al tamaño, uniformidad y aspecto de los gránulos, mas que al color solamente, se pueden llegar a distinguir las células dudosas.⁶

Composición química de los eosinófilos.

En su membrana tienen receptores para IgE pero son del tipo de poca afinidad por tanto casi no se ocupan cuando la concentración de IgE se encuentra dentro de límites normales. Aproximadamente 10 a 30% de los eosinófilos en individuos normales también tienen receptores para IgG de poca afinidad o intermedia y de 40 a 50% exhiben receptores para componentes de complemento, cuando se activan, la densidad de estos receptores aumenta.²⁹

Los gránulos eosinófilos específicos representan el 95% de sus granulaciones están limitados por una membrana fosfolípida, al microscopio electrónico puede advertirse en el interior de cada gránulo la presencia de un cuerpo cristalino electrodenso en el centro de la granulación paralelamente al eje mayor.^{28,29}

Este es un cristalino también llamado internum, es una estructura cristalina alrededor de la que se encuentran las diferentes enzimas hidrolíticas y otras.

El principal componente del internum es la proteína básica principal (PBP) rica en arginina, que constituye el 50% de las proteínas del gránulo y es responsable de su acidofilia.

En el gránulo la zona que rodea al internum es menos densa a los electrones, es rica en fosfatasa ácida, y se denomina externum o matriz; en esta zona se encuentran: la proteína catiónica eosinófila (PCE), la peroxidasa eosinófila (PE), y la neurotoxina derivada de eosinófilo (NDE), conocida también como proteína X de la cual se conoce muy poco.

Los gránulos específicos de los eosinófilos son lisosomas, que contienen también, β -glucuronidasa, catepsinas, arilsulfatasa, fosfolipasa, histaminasa, ribonucleasa y desoxirribonucleasa, colagenasa y pueden contener catalasa, como parte del externum.

El citoplasma está ocupado casi enteramente por los gránulos específicos pero estos generalmente no se disponen por encima del núcleo. El retículo endoplásmico, las mitocondrias y el complejo de Golgi están poco desarrollados.^{12,15,28}

Funciones de los eosinófilos.

Tienen múltiples funciones biológicas y contribuyen a una diversidad de mecanismos de defensa inmunitaria, se relacionan con reacciones alérgicas, donde la cantidad de eosinófilos en sangre periférica está elevada, en infecciones parasitarias e inflamación crónica.

Productos como la histamina, liberados por basófilos y células cebadas, las linfocinas de linfocitos sensibilizados y reacciones antígeno-anticuerpo de alergia, son algunos quimiotácticos para el eosinófilo.

Las citocinas IL-3, IL-5 y el factor estimulador de colonias granulocito-macrófago (FEC-GM o GM-CSF) promueven la adherencia iniciada por quimioatrayentes. Los eosinófilos tienen un mecanismo de reclutamiento de los tejidos independiente de la β_2 -integrina, el cual parece ser modulado por el receptor de adhesión de eosinófilos, activación muy tardía de antígeno-4 (VLA-4) del cual se ha visto su ligando en células epiteliales (CE) y VCAM-1.¹⁵

En realidad este PMN no tiene una capacidad fagocítica marcada como el neutrófilo, en cambio sí tiene capacidad antihelmíntica, donde la agregación de eosinófilos alrededor del parásito tiende a su eliminación por desgranulación externa. Se liberan los gránulos y de esta manera mediante la proteína básica principal (PBP) se produce el ataque al helminto, causándole lisis, ya que esta es citotóxica para protozoarios y helmintos además de que estimula la liberación de histamina de los basófilos y células cebadas lo cual atrae a más eosinófilos.

Otras proteínas del internum, participan también de la defensa contra los parásitos. La PCE, es capaz de matar células, además estimula la liberación de histamina en basófilos y células cebadas, inhibe la proliferación de linfocitos T y preactiva el plasminógeno, por otro lado aumenta la producción de moco en los bronquios y estimula la producción de glucosaminoglicano por los fibroblastos.

La PE; es citotóxica para células tumorales y del huésped, también estimula la liberación de histamina por las células correspondientes y la desgranulación de la mayor parte de las células y también inactiva leucotrienos.

Por último la NDE, conocida también como proteína X tiene la capacidad de provocar disfunción cerebral y cerebelar en animales e inhibir las respuestas de la célula T.

Los eosinófilos son células proinflamatorias que tienen la capacidad de proteger o dañar al huésped de acuerdo con la situación, hay pruebas de que producen moléculas como la PE que inactiva leucotrienos e histaminasa que actúa sobre la histamina, disminuyendo la función realizada por las células que producen la histamina y los leucotrienos modulando así la inflamación.

En una persona alérgica por el ingreso de agentes extraños se genera la producción de anticuerpos (Ac) específicos para formar complejos antígeno- anticuerpo (Ag-Ac).^{12,15}

3.2.1.3 BASÓFILOS.

Generalidades de los basófilos.

Como en los otros dos PMN las etapas de maduración se caracterizan por muescas y segmentación gradual del núcleo. Estos se distinguen con facilidad de otros granulocitos a partir de la etapa de mielocito por la presencia de sus grandes gránulos, pero igualmente es difícil de diferenciar entre una y otra etapa posterior de maduración de él mismo, lo que no es muy importante dado que la proporción de basófilos suele ser baja en frotis de sangre periférica y la separación rutinaria de estos en sus etapas de maduración, no ofrece utilidad clínica.

Los basófilos son las células menos abundantes en la sangre periférica, en cantidad de 0 a 1% con un valor absoluto de 0 a $0.115 \times 10^9/L$. Es común no encontrar basófilos en un recuento diferencial de 100 células, sin embargo el hallazgo de una basofilia es muy importante, ya que con frecuencia indica la presencia de malignidad hemática.

Son células en etapa terminal capaces de proliferar y solo duran algunas horas en sangre periférica y tejidos.^{6,12,15}

Características estructurales de los basófilos.

Son los granulocitos mas pequeños su tamaño oscila entre los 10 y 14µm. El núcleo de cromatina densa, es voluminoso con forma irregular, generalmente con aspecto de letra S.

Posee generalmente 2 o 3 lóbulos unidos por puentes de cromatina, en ocasiones difíciles de visualizar, dada la presencia de las numerosas granulaciones basófilas que tapan el núcleo (Figura 3-6). El tamaño de dichas granulaciones varía entre 0.2 y 1µm y son de color morado o rojo violeta oscuras.^{12,15,28}

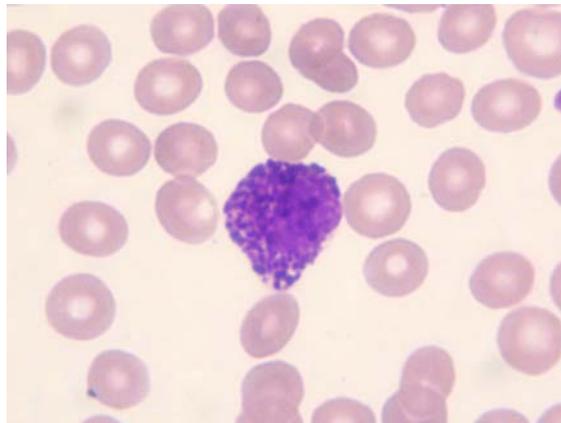


Fig.3-6. Basófilo, se observa la dificultad para distinguir el núcleo, por el tamaño, color y distribución de los gránulos presentes. (1000X).

A estos gránulos se les ha llamado bolsas suicidas por que la liberación de grandes números de estos en un choque anafiláctico llega a provocar la muerte del huésped.¹⁵

Algunos de los componentes en los gránulos de los basófilos son hidrosolubles, es por eso que pueden estar desteñidos en parte o por completo en células que están fijadas de manera deficiente y aparecen los gránulos como vacuolas vacías en el citoplasma. Cuando los portaobjetos se fijan correctamente es posible que los gránulos cubran el núcleo, fenómeno que dificulta el reconocimiento de detalles nucleares.

La característica principal de los gránulos es su metacromasia, con los colorantes vitales (azul de metileno, azul de toluidina), es decir con los colorantes azules adquiere una tonalidad rojiza.

El citoplasma puede aparecer de color rosado o lavanda, o tal vez no se tiña en lo absoluto.^{11,14,23,28}

Composición química de los basófilos.

Los basófilos expresan CD40L que es el ligando para CD40 un antígeno de los linfocitos B, lo que junto con la interleucina 4 (IL-4) induce la síntesis de Ig E, la membrana plasmática de los basófilos, posee receptores para las inmunoglobulinas E (IgE), así como para fragmentos de complemento C3_a, C4_a y C5_a, estas células producen citocinas como las IL-13, IL-4 y factor de necrosis tumoral α (TNF α).

Los gránulos basófilos contienen, omegahexonucleasa, histamina, factores quimiotácticos para eosinófilos y neutrófilos, también contienen proteoglicanos sulfatados, heparina y condroitín-4-sulfato, responsables de la metacromasia, la calicreína de reacción lenta observada en la anafilaxia y un factor activador de plaquetas (PAF). Estas células son positivas a la peroxidasa y a la reacción de ácido peryódico y Schiff (PAS).^{15,23,28,29}

Funciones de los basófilos.

El basófilo funciona como mediador de la respuesta inflamatoria, en especial de las de hipersensibilidad inmediata (alergia), función que comparte con las células cebadas.

Como ya se dijo expresan el ligando para CD40 (CD40L), uniéndose así a linfocitos B, provocando la síntesis de IgE, por la interacción entre estos y la interleucina 4 (IL-4), es por eso que se dice que desempeña una función importante en la inducción y mantenimiento de las reacciones alérgicas.

Al tener presentes los receptores para la inmunoglobulina E (Ig E), cuando esta se fija al receptor del basófilo y el antígeno a esta Ig, la célula entonces se activa y se inicia la desgranulación, la cual libera histamina y citocinas (moléculas proinflamatorias), enzimas vasoactivas, broncoconstrictoras y quimioatrayentes (especialmente para eosinófilos). Dicha liberación de mediadores inicia los signos clínicos típicos de la hipersensibilidad inmediata.

También, actúan fosfolipasas en ciertos fosfolípidos del interior del basófilo para formar ácidos araquidónicos, que se metabolizan para producir leucotrienos C₄, D₄ y E₄

llamados anteriormente sustancias de reacción lenta de la anafilaxis, estos también activan leucocitos y originan su migración al sitio del reto antigénico.^{10,15}

Las prostaglandinas y los leucotrienos son metabolitos producidos por el ciclo de oxigenación y lipo-oxigenación enzimática, respectivamente, del ácido araquidónico, constituyen las dos familias principales de mediadores inflamatorios, cuyos integrantes exhiben diversas propiedades vasoactivas, constrictoras del músculo liso y quimiotácticas. Los tromboxanos y las lipoxinas son otros derivados del ácido araquidónico con efectos adicionales.

Además de la activación mediada por IgE, los basófilos pueden activarse por acción de lectinas como la concanavalina A, componentes del complemento C3_a o C5_a, ionóforos de calcio o ciertas enzimas incluyendo la fosfolipasa A, se desconoce con certeza la función de estos activadores en la enfermedad clínica, pero pudieran ser la base para las reacciones no inmunológicas de tipo alérgico a ciertos agentes.

La histamina es un mediador inflamatorio, es una amina bioactiva que ejerce sus efectos fisiológicos al interactuar con cualquiera de los tres receptores blanco llamados H₁, H₂ y H₃, los principales efectos mediados por el receptor H₁ incluyen la contracción del músculo liso bronquial, intestinal y uterino, así como aumento de la permeabilidad vascular en las vénulas poscapilares, el enlace de los receptores H₂ aumenta la secreción gástrica ácida y de glándulas mucosas de la nariz y de los bronquios, por último el enlace del receptor H₃ afecta principalmente la síntesis y liberación de histamina. Una característica de los basófilos es que suelen sintetizar más gránulos después de la desgranulación.²⁹

3.2.2 MONONUCLEARES.

3.2.2.1 MONOCITOS.

Generalidades de los monocitos.

Los precursores del monocito en la medula ósea son el monoblasto y el promonocito, éstas células existen en abundancia solo en los procesos leucémicos, después de estar en MO, pasan a sangre periférica, donde permanecen aproximadamente 3 días, de allí pasan a tejido y se incorporan como macrófagos propios de cada tejido donde terminan de madurar, esta transición se caracteriza por

crecimiento celular progresivo, el núcleo se vuelve redondo, aparecen nucléolos y el citoplasma se aprecia de color azul. Los macrófagos llegan a vivir durante meses en tejido. Por lo regular no reingresan a la sangre pero en áreas de inflamación, algunos logran tener acceso a la linfa, penetrando finalmente a sangre.

Los monocitos constituyen de 2 a 11% de los leucocitos en adulto con valor absoluto entre 0.09 a $1.26 \times 10^9/L$, y son las células normales más grandes de la sangre periférica, en los niños tienen una concentración un poco mas alta, durante las dos semanas de vida iniciales prevalece un aumento de monocitos absoluto, con una media de $1 \times 10^9/L$.^{15,22,23}

Son las células mas difíciles de identificar y distinguir de otras, pueden confundirse con neutrófilos por que pueden contener gránulos visibles y núcleos lobulados. Frecuentemente se toman por grandes linfocitos por que el citoplasma es azul, los gránulos pueden ser indistintos, el núcleo redondo o muy poco hendido, la red filiforme de cromatina poco visible, pueden faltar los seudópodos obtusos y las vacuolas digestivas, por eso es importante una observación detallada.⁶

Características estructurales de los monocitos.

Esta célula tiene la capacidad de adherirse al vidrio y se expande o envía multiples seudópodos lo que da como resultado una amplia variación de tamaño y forma en los frotis de sangre, característica que también depende de su actividad.

Es una célula de 12 a $20\mu m$, posee un núcleo (ovoide) en forma de riñón o herradura generalmente excéntrico, irregular con pliegues, que a menudo presenta aspecto de burbujas de jabón y cuyas extensiones similares a lóbulos parecen superponerse entre si, la cromatina de distribución mas laxa que la de los linfocitos (Figura 3-8), contiene dos o tres nucléolos que a veces llegan a verse en las extensiones comunes.

El citoplasma es abundante, levemente basófilo, tiene aspecto de vidrio esmerilado y presenta un numero moderado de finas granulaciones azurófilas de un diámetro aproximado de $0.4\mu m$ algunos están al limite de la resolución del microscopio óptico, y tienen un interior homogéneo bastante electrodenso. Estos pequeños gránulos azurófilos pueden llenar todo el citoplasma dándole una coloración turbia como polvo de color lila. La membrana lipídica de los gránulos se tiñe con sudan negro B.^{10,11,12,15}

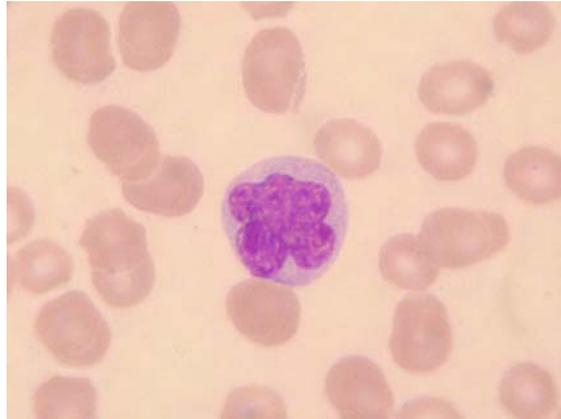


Fig.3-8. Monocito, se observa el color gris azulado opaco del citoplasma y los pliegues característicos en el núcleo. (1000X).

El retículo endoplásmico rugoso está poco desarrollado, en el citoplasma hay pocos polirribosomas, depósitos de gránulos de glucógeno, numerosas mitocondrias pequeñas y el complejo de Golgi es grande, participando de la formación de los lisosomas (gránulos azurófilos).^{10,12}

Las 3 características más típicas de los monocitos y que son de mayor utilidad para su identificación son el color gris azulado opaco del citoplasma, los seudópodos obtusos y las circunvoluciones cerebroides del núcleo.

El color del citoplasma no debe compararse con ilustraciones del libro de texto o células hipotéticas, si no con neutrófilos conocidos que se encuentren en el mismo campo o zonas adyacentes.

Los monocitos tienen tendencia a deformar y comprimir las células adyacentes, en cambio los linfocitos grandes a menudo son profundamente deformados por células vecinas y presentan puntas salientes y prolongaciones agudas.⁶

Composición química de los monocitos.

Citoquímicamente, estas células se caracterizan por su riqueza en esterasas inespecíficas (naftol-As-D-acetatoesterasa, alfa-naftilacetatoesterasa ácida y butiratoesterasa), que se inhiben casi totalmente con el fluoruro sódico. Así mismo son ricas en fosfatasa ácida, lisozima, β -glucuronidasa, catepsina y arilsulfatasa, la actividad de la peroxidasa es débil pero existe, lo que significa que estos gránulos son parecidos a los lisosomas de los neutrófilos (gránulos azurófilos) pero es poco lo que se sabe

sobre el contenido de los otros gránulos no obstante si se sabe que a diferencia de los gránulos específicos de los neutrófilos no contienen fosfatasa alcalina ni lactoferrina.^{15,28} Los macrófagos son aquellos histiocitos que contienen en su interior restos de material fagocitado, fáciles de identificar, se observan con frecuencia en medula ósea, ganglios linfáticos, en el bazo, o en diferentes tejidos.

A diferencia de lo que sucede con otras líneas hematopoyéticas los conocimientos fenotípicos de la diferenciación monocítica son relativamente escasos. Cuando la célula progenitora monocítica CD34+ adquiere el CD33 y el CD4, se cree que indica diferenciación monocítica. Cuando madura pierde el CD34 y adquiere el CD11b, el CD14 y el CD68 y finalmente expresa el CD15 y el CD16 la expresión del CD14 incrementa a la vez que las células aumentan su intensidad de expresión del CD45 en la membrana.²⁸

Los monocitos pueden ser atraídos al sitio de trauma o infección a través de un proceso de adherencia que resulta idéntico al descrito para los neutrófilos y emplea muchas de las proteínas de adhesión y factores quimiotácticos que aplican para estos tienen igual que los neutrófilos receptores para la porción Fc de la inmunoglobulina G (subclases IgG₁ e IgG₃) y para la proteína C₃ activada del complemento.^{15,29}

Funciones de los monocitos.

Los monocitos pueden servir como sistema de resguardo para los neutrófilos en las infecciones agudas, pero fagocitan con menor eficiencia y carecen de muchos de los potentes sistemas bactericidas del neutrófilo, los primeros tienen relativamente poca capacidad fagocítica en circulación hasta que se diferencian como macrófagos a nivel de tejido donde tienen gran importancia como tal en infecciones crónicas, estos no solo fagocitan microorganismos si no que también, actúan como depuradores al fagocitar detritos celulares, células propias deterioradas, envejecidas o muertas con el objetivo de mantener la homeostasis del organismo y además se fijan a células tumorales matándolas por efecto citolítico directo, si la célula tiene inmunoglobulinas fijadas, el receptor Fc del macrófago se enlaza con la porción Fc de la Ig y entonces se ejerce el efecto lítico. Tomando en cuenta que se localizan en los lugares por los que el microorganismo puede entrar al huésped, se consideran la primera línea de defensa

contra las infecciones.

Los macrófagos suelen responder a los microorganismos casi tan rápido como los neutrófilos, pero persisten mucho más tiempo en los lugares de inflamación, por este motivo son células efectoras que predominan en las fases avanzadas de la respuesta inmunitaria innata. Los macrófagos viven más que los neutrófilos y a diferencia de ellos, no se encuentran en un estado de diferenciación terminal, si no que pueden dividirse en una zona de inflamación.^{1,15,22,29}

La fagocitosis es semejante a la llevada a cabo por los neutrófilos, siguiendo los mismos pasos.

Quimiotaxis: las quimiocinas específicas reconocidas por los monocitos y por neutrófilos si difieren ya que estas células expresan receptores quimiotácticos diferentes, como consecuencia la combinación particular de quimiocinas producidas en un tejido, determinan si las células de defensa atraídas serán monocitos, neutrófilos u otros leucocitos, los receptores están menos comprendidos que los de los neutrófilos, sin embargo se produce en respuesta a oligopéptidos N-formilados sintéticos y al C5_a del suero. El reclutamiento es mayormente afectado por materiales quimiotácticos liberados a partir de linfocitos T sensibilizado.

Opsonización: los receptores para IgG y C₃ hacen que el proceso de opsonización sea muy semejante al de los neutrófilos. Las especies de *Mycoplasma* tienen la capacidad interesante de adherirse a los macrófagos en ausencia de anticuerpos o de complemento, al adherirse retardan los movimientos del fagocito. Al agregar el anticuerpo específico, los *Mycoplasmas* son fagocitados y destruidos.

Ingestión: los monocitos ingieren bacterias con más lentitud que los neutrófilos, destruyéndolas con menos eficacia, y utilizan predominantemente las vías metabólicas dependientes de oxígeno (fosforilación oxidativa), no obstante, un estallido respiratorio acompaña el encuentro monocito-bacteria con formación de H₂O₂, O₂⁻ y OH⁻. Los macrófagos cuentan también con un segundo sistema de generación de radicales libres, la sintetasa del óxido nítrico inducible (iNOS). Esta se induce durante la fagocitosis y cataliza la generación de óxido nítrico (NO) que es también un potente microbicida.

La desgranulación y digestión: los monocitos no poseen las proteínas catiónicas bactericidas de los neutrófilos; no tienen lactoferrina, sin embargo, el sistema mieloperoxidasa- H_2O_2 -haluro opera al parecer.

La mayoría de las bacterias fagocitadas sufren un destino similar, aunque algunas, como las micobacterias pueden sobrevivir e incluso replicarse dentro de estas células de defensa.

Hay una relación definida entre la actividad endocítica y la formación de lisosomas; a medida que los monocitos maduran hay elevación progresiva en los lisosomas y en su contenido de enzimas hidrolíticas y se desarrollan sobre una base continua que refleja el lapso prolongado de vida de estos fagocitos y su capacidad para sintetizar nueva membrana y nuevos receptores de membrana.^{1,22,29}

Además de la función fagocítica de los monocitos, estos secretan una diversidad de sustancias (citocinas), que activan la reacción inflamatoria, la proliferación y maduración de otras células, así como su función, en especial la de los linfocitos y estos a su vez secretan productos solubles (linfocinas) que modulan las funciones monocíticas.

La inhibición del crecimiento de microorganismos por parte de los monocitos requiere de su activación por productos solubles de los linfocitos T. La muerte por monocitos activados es inespecífica, es decir las secreciones de células T sensibilizadas para un microorganismo en particular activará en los monocitos un mecanismo de muerte no solo para ese patógeno sino también para otros microorganismos.

Los monocitos ingieren en circulación factores de coagulación activados, con lo cual limitan el proceso de coagulación, también ingieren proteínas desnaturalizadas y complejos anfégeno-anticuerpo.^{10,15,29}

3.2.2.2 LINFOCITOS.

Generalidades de los linfocitos.

Muchos años se consideró que los linfocitos eran un componente insignificante de la sangre y de la linfa. Desde 1960, los importantes adelantos en inmunología han

señalado al linfocito como el director de las actividades de todas las demás células en la respuesta inmunitaria.

Se reconocen tres etapas de maduración en la médula ósea: linfoblasto, prolinfocito y linfocito, siendo lo normal observar solo los últimos en sangre periférica. Existen dos tipos de linfocitos maduros morfológicamente idénticos, pero inmunitaria y funcionalmente diversos, dependiendo de las moléculas localizadas en su membrana: los linfocitos T y los linfocitos B con diversos subtipos, además de los linfocitos T y B existe una tercera variedad, las células NK (natural killer o asesinas naturales). La evaluación morfológica de la población de linfocitos en general es suficiente en la mayor parte de los casos, cuando es necesario diferenciar la especificidad T o B de estas células suelen utilizarse anticuerpos monoclonales.^{15,28}

La concentración de linfocitos varía con la edad del individuo, cerca de 30% de los leucocitos al nacer son linfocitos, después aumenta a alrededor del 60% hacia los 4 a los 6 meses y continúa en este nivel hasta los 4 años de edad, luego declina de un modo gradual hasta alcanzar un nivel de alrededor de 34% a los 21 años. La concentración en un adulto varía de 0.81 a 4.83 $\times 10^9/L$ con un valor relativo de 18 a 42% y va disminuyendo después de los 65 años esto en ambos sexos.^{15, 23}

Cerca del 60 a 80% del total de linfocitos de la sangre periférica son linfocitos T, los precursores de linfocitos T medulares llegan al timo y sufren un proceso de maduración y adquieren inmunocompetencia, estos se diversifican tardíamente como: T cooperador (T_H) o T citotóxico /supresor (T_C /T_S), la relación de célula cooperadora a supresora en la circulación es de 2:1, posteriormente abandonan el timo y pasan a la sangre periférica y a los órganos linfáticos secundarios transformándose en linfocitos T funcionalmente maduros, los linfocitos B constituyen del 15 al 30% de linfocitos en sangre periférica estos sufren proliferación y diferenciación a célula plasmática secretoras de inmunoglobulinas en los centros germinales de los tejidos linfoides secundarios y por último la tercera población de células linfoides corresponde al restante 5 a 10% formado por las células NK llamadas comúnmente por descripción morfológica linfocitos grandes granulares (LGG).^{10,15,28}

La mayor parte de los linfocitos vírgenes (no activados) tienen un periodo de vida corto pues dichas células están programadas para morir en el transcurso de unos

cuantos días después de abandonar la MO o el timo. No obstante si estas reciben señales que indican la presencia de sustancias extrañas o un patógeno específico, responden inmediatamente por medio de la activación, que es el proceso en el cual pueden realizar varios ciclos sucesivos de división celular durante varios días. Algunas de las células descendientes se diferencian como células efectoras y sobreviven poco, desde unas horas hasta 5 días, otras regresan al estado de reposo para convertirse en linfocitos de memoria, es decir células semejantes a linfocitos vírgenes T o B de los cuales derivan, pero que pueden sobrevivir durante muchos años quizá hasta 20 o más aunque todavía no está establecido si sobreviven sin estimulación antigénica o si son mantenidos por una estimulación de baja intensidad de forma crónica por antígenos persistentes o ambientales que presentan reacción cruzada con el antígeno que inició la respuesta. Estas células de memoria representan una proporción grande de células en el sistema inmunitario de un adulto y siempre están listas para desarrollar ciclos adicionales de activación y de división celular.^{1,29}

Características estructurales de los linfocitos.

El linfocito maduro tiene una gran variabilidad de tamaño que depende principalmente de la cantidad de citoplasma presente. Los llamados linfocitos pequeños varían en tamaño entre 7 a 10 μ m y son mayoría, su núcleo tiene el tamaño aproximado de un eritrocito y ocupa cerca del 90% del área celular, es esférico relativamente voluminoso, la cromatina es condensada se dispone en grumos gruesos de modo que el núcleo aparece de un color morado oscuro intenso en las preparaciones, característica que favorece su identificación (Figura 1-9), no se aprecian nucléolos a nivel óptico aunque siempre están presentes y se llegan a observar como pequeñas áreas claras.¹⁵

El citoplasma es escaso y se dispone en forma de una estrecha franja perinuclear, es débilmente basófilo tiñéndose en azul claro en los frotis, y a veces no es visible, llegan a estar presentes unos cuantos gránulos azurófilos.

Los linfocitos grandes poseen un diámetro aproximado de 11 a 16 μ m, el núcleo es de cromatina menos condensada y se sitúa en posición central o algo excéntrica (Figura 3-10), ligeramente más grande que en el linfocito pequeño.

El citoplasma es mas extenso; por lo que la variación de tamaño se atribuye principalmente a la cantidad de este, es de tonalidad débilmente basófila y puede

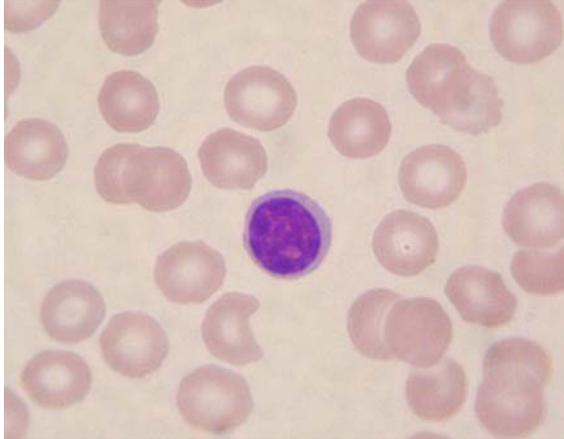


Fig.3-9. Linfocito pequeño se ve el núcleo morado oscuro y escaso citoplasma. (1000X).



Fig.3-10. Linfocito grande se nota el citoplasma más extenso. (1000X).

tener vacuolas pero esto no es lo común y puede contener algunos gránulos azurófilos, que no son exclusivos de los linfocitos y los cuales se diferencian de los de las células precursoras de granulocitos por ser negativos a la peroxidasa pero por los que a veces se denominan linfocitos granulares grandes.^{12,15}

Composición química de los linfocitos.

Entre las características fenotípicas de los linfocitos que les permiten identificarse como linfocitos T o linfocitos B se encuentran las enzimas, los receptores de superficie y otros antígenos de membrana.

La capacidad del cuerpo para formar una respuesta inmunitaria (RI) contra un antígeno extraño en particular es controlada por genes de RI situados en el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en el cromosoma 6, el término usado para describir el grupo del gen MHC en el ser humano es la región del antígeno leucocitario humano (HLA). Los genes de HLA están situados en regiones específicas del complejo conocidos como HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-D y HLA-DR, las regiones se clasifican de acuerdo a su estructura y a la función específica que desempeñen en la respuesta inmunitaria. Hay dos clases principales de productos de gen MHC: molécula clase I y clase II, las primeras son cadenas simples unidas con β_2 -microglobulinas, las clase II son complejos bimoleculares cadena α y cadena β . Los genes de HLA-A, B y C

codifican para las proteínas de reconocimiento de superficie de la célula de clase I (prácticamente toda célula nucleada), estas proteínas son necesarias para que el linfocito T_C distinga a los antígenos propios de los no propios. Los genes HLA-D codifican para antígenos de clase II en el linfocito B, monocito, macrófago y linfocitos T activados, y también se conocen como antígenos Ia, estos determinan la capacidad de las células inmunitarias para cooperar e interactuar en la RI.¹⁵

Los linfocitos T alcanzan la madurez con la expresión en la membrana citoplasmática de los receptores del linfocito T, estructuras que actúan como receptores específicos para el antígeno (receptores de célula T o RCT).

Los RCT son unos heterodímeros compuestos por dos cadenas polipeptídicas unidas por un puente disulfuro, existiendo dos tipos de estos uno constituido por las cadenas α y β , presente en la mayoría de linfocitos T periféricos aproximadamente en un 90 a 95% y el otro heterodímero, formado por las cadenas γ y δ en el restante 5 a 10% de los linfocitos en sangre, ambos receptores unidos al complejo molecular CD3 constituido por cinco polipéptidos para formar el complejo receptor de la célula T (RCT-CD3), entre los receptores de superficie, se encuentran también el receptor 3 del antígeno de función del linfocito (LFA-3) (CD2) conocido anteriormente como receptor E, que se enlaza con los eritrocitos de carnero formando una roseta, siendo el marcador más útil para identificar estas células, el receptor para la fracción cristalizante (Fc) de inmunoglobulina M (IgM) e (IgG) (CD16), en la actualidad se sabe que los linfocitos T son capaces de cambiar la especificidad de su receptor Fc bajo estimulación antigénica, otras de las moléculas que están presentes en la superficie del linfocito T maduro son: CD7, CD5, CD45 RA, el complejo de histocompatibilidad principal (MHC) clase I y el MHC clase II cuando está activado.^{15,28}

Durante el proceso de diferenciación a célula linfoide T madura existe una secuencia de reordenamientos de genes que codifican los receptores T, así como cambios en la superficie de la membrana. En la fase timocito inmaduro o pretimocito, expresan además de la enzima deoxinucleotidiltransferasa terminal (TdT), los antígenos CD44 y CD25 y son negativas para los antígenos CD4 y CD8, del 1 al 4% de las células fuera del timo son CD4 - CD8 -, son linfocitos dobles negativos casi todos estos expresan el tipo alterno de receptor constituido por polipéptidos γ y δ , en una segunda

fase el timocito intermedio; pierde la expresión de la TdT y se caracteriza por presentar el antígeno CD1, por ser negativo para el CD44 y CD25 y por adquirir los antígenos CD4 y CD8 estas representan aproximadamente el 1% de células extratímicas, son células dobles positivas CD4⁺ CD8⁺ cuya función se desconoce, la última fase de desarrollo del linfocito T la representa el timocito maduro, el cual pierde el CD1, expresa intensamente el complejo CD3 junto al receptor RCT $\alpha\beta$ y se diferencia en dos poblaciones: una que expresa el antígeno CD4 y otra el CD8. Las células con cualquiera de estos fenotipos con frecuencia se conocen como linfocitos simples positivos y son las que más a menudo participan en la respuesta inmune.

Entre un 70% y un 75% expresa la molécula CD4 que constituye la población linfoide que induce o ayuda en la respuesta inmune, conocida como linfocitos T cooperadores estos presentan un receptor para la Fc de IgM y facilita la diferenciación de linfocitos B, el 25% a 30% posee el antígeno CD8 que constituye a la población T citotóxica.

La correlación CD4 o CD8 con la función de T_H y T_C, respectivamente es fuerte pero no absoluta, unas cuantas CD8 tienen actividad cooperador y algunas CD4 son citotóxicas. En realidad la expresión CD4 o CD8 se correlaciona más de cerca con el tipo de proteína MHC que una célula T puede reconocer.^{28,29}

La mayoría de los linfocitos CD4 positivos y una proporción de CD8 positivos son de tamaño pequeño y agranulares. El 50% de linfocitos CD8 positivos y una minoría de CD4 positivos presentan la morfología de linfocito grande granular.

Los linfocitos grandes granulares de sangre periférica constan de dos poblaciones celulares distintas una CD3 positiva que expresa además el receptor de linfocito T y reordenamiento de los receptores T, y la otra CD3 negativa que son las auténticas células NK que no expresan receptor de célula T ni reordenamiento de los receptores T.

La subpoblación de linfocitos T CD3 negativos (células NK) que no expresa receptor de célula T ni reordenamiento de los receptores T, si expresa receptores para Fc de la IgG que se identifica con el anticuerpo monoclonal (CD16) y los antígenos CD11, CD56 y CD57, también expresa antígenos CD2 y CD7 que son asociados a

linfocitos T, la ausencia de CD3 y la presencia de CD56 y CD16 o ambos, son los marcadores más característicos de la célula NK.²⁸

Los linfocitos T contienen enzimas como las esterasas, β -glucuronidasas, N-acetil- β -glucosaminidasa, y un patrón parecido al punteado de positividad a fosfatasa ácida.¹⁵

Estos linfocitos activados pueden liberar linfocinas como: el factor quimiotáctico del macrófago, el factor inhibidor de macrófagos, el factor de inhibición de leucocitos, el factor activador de macrófagos, el interferón gamma, las IL-2, IL-4, IL-5 y IL-6, entre otras.

Los linfocitos B alcanzan la madurez funcional con la expresión de receptores de reconocimiento antigénico en su membrana, de entre las muchas moléculas que tienen en la membrana los linfocitos B una destaca por que identifica a este tipo de células, se trata de su receptor para antígeno denominado receptor de célula B (BCR) análogo a los TCR de los linfocitos T, este receptor consta de unas cadenas variables llamadas inmunoglobulinas ligeramente modificadas para que permanezcan ancladas a la membrana, unidas a dos cadenas invariables o comunes a todos los linfocitos B denominadas CD79 α y β la cadena β es común para todas las Ig de superficie, pero la α es específica de isotipo.

La inmunoglobulina es el componente implicado en la unión del antígeno y la CD79, molécula que se asocia con las Igs de superficie y esta implicada en la transducción de señales tras la unión de las Igs con el antígeno, a semejanza de lo que sucede con el CD3 y la molécula del receptor T en los linfocitos T en una etapa ya se identifican cadenas pesadas μ de las Igs en citoplasma pero aun no se observan cadenas ligeras ni Igs de superficie, a medida que maduran se van expresando las cadenas ligeras y la célula expresa entonces Ig M de superficie, llamándose linfocito B inmaduro, el linfocito B maduro sintetiza ya IgM e IgD y continua expresando CD19 y CD24, también CD20, CD21 y CD22 además del MHC clase I y II, ya como linfocito B maduro es que pasa a sangre periférica.^{15,22,28}

La mayor parte de los linfocitos B expresan IgM de superficie (y a menudo simultáneamente IgD) una pequeña porción expresa el BCR con otro isotipo, los IGM⁺D⁺ son linfocitos maduros que aun no han sido estimulados por el antígeno que

reconocen, los demás ya han reconocido a algún antígeno y se han especializado en la síntesis de alguna Ig.

Un tipo especial de linfocitos B que expresan en su membrana CD5 sintetizan y expresan principalmente IgM pero no IgD, estos poseen una capacidad especial que les permite interactuar con muchos antígenos diferentes se piensa que pueden ser importantes en el reconocimiento de antígenos bacterianos contribuyendo al establecimiento inicial de la respuesta inmune de una manera casi innata. A estos linfocitos se les ha denominado B1 mientras que a los convencionales se les conoce como B2, para algunos autores los linfocitos B1 son el equivalente en el linaje B a los T γ δ .²²

Hay antígenos de histocompatibilidad (HLA-A,-B,-C y-D), las células B activadas muestran un aumento en la cantidad de moléculas codificadas para la región D en la superficie. Otros componentes de la superficie de los linfocitos B incluyen receptores del complemento CR₁ y CR₂, el último conocido como CD21, una enzima fija a membrana llamada 5'nucleotidasa cuya función se desconoce, la proteína fijadora de oligosacárido similar a la lectina y las proteínas de adhesión antígeno funcional leucocitario tipo 1 (LFA-1), moléculas de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), receptores para constituyentes en la pared celular de las bacterias y la proteína CD40 implicada en recibir ayuda de la célula T.^{15,29}

Funciones de los linfocitos.

Los linfocitos T y B y el macrófago interactúan en una serie de sucesos que permiten que el organismo ataque y elimine antígenos extraños, lo cual se conoce como respuesta inmunitaria.¹⁵

El trabajo de los linfocitos T o B puede dividirse en 3 fases: reconocimiento, activación y función efectora. Si un patógeno logra sortear las eficaces barreras inmunes innatas y establecer una infección, se ponen en marcha los mecanismos de inmunidad adaptativa. A menudo esta se pone en marcha de todos modos, simplemente para reforzar la inmunidad innata en futuras infecciones.

Los linfocitos vírgenes reconocen los antígenos o se activan por otros estímulos e inician las respuestas inmunitarias adaptativas. Finalmente, si las células no entran en contacto con un antígeno, mueren mediante un proceso de apoptosis.^{1,22}

Los linfocitos T, son responsables de la parte conocida como inmunidad mediada por células, reconocen al antígeno por medio de su RCT de estructura homologa al RCB pero a diferencia del linfocito B no lo hace en forma soluble si no que reconoce pequeños péptidos unidos a las moléculas MHC propias de cada individuo, después de esto se produce la activación para la que se requiere que se den simultáneamente sobre él dos tipos de señales la primera proviene del antígeno y la segunda se la da una célula coestimuladora, si no es así no solo no se activa si no que se puede convertir en inactivo o anérgico, y ya no responder más a dicho antígeno. Se ha sugerido que este reconocimiento doble sirve para evitar la inactivación de las células T por antígenos libres circulantes. Una vez activado apropiadamente, comienza el proceso de proliferación para generar un número suficiente de linfocitos que eliminarán al patógeno, fase que requiere de una semana aproximadamente.^{15,22,29}

Por último se da la diferenciación, mediada por citocinas distintas a las que mediaron la proliferación, como ya se dijo estos linfocitos pueden diferenciarse en células efectoras o de memoria, las primeras incluyen a los linfocitos T cooperadores (T_H), que expresan proteínas de superficie que interactúan con ligandos sobre células, como macrófagos y linfocitos B y secretan citocinas que activan otras células y por otro lado a los T citotóxicos (T_C), que producen gránulos que contienen proteínas que destruyen las células infectadas por virus y células tumorales. Por lo tanto estos linfocitos son necesarios para diferentes tipos de reacciones, como regular la producción de inmunoglobulinas, mediar la hipersensibilidad tardía y destruir células infectadas.

Para los linfocitos T o B que se diferencian en células de memoria su función radica en producir respuestas rápidas y de mas intensidad ante una segunda o subsiguientes exposiciones al antígeno.^{1,29}

El linfocito T_H fija al antígeno en la superficie del macrófago o célula presentadora de antígeno mediante el receptor de células T (RCT). La población $CD4^+$ de células T,

reconoce el antígeno junto con las moléculas clase II y la CD8+ el antígeno junto con las moléculas de la clase I.^{15,29}

La activación de células cooperadoras y efectoras para la hipersensibilidad tardía por antígenos solubles, requiere interacciones como ya se dijo con células accesorias como son: los macrófagos, linfocitos B y T activados y en algunos casos células endoteliales, que tienen dos funciones; primero procesan y presentan el antígeno y los productos del gen MHC en forma adecuada para que puedan ser reconocidos por el RCT, esta función requiere que se tenga una densidad suficiente de moléculas MHC clase II, y después, sintetizan y secretan materiales solubles necesarios para que prosiga la activación completa de la célula T. Algunos de los materiales solubles son interleucinas como la IL-1, también conocida como monócina si es secretada por el macrófago. La unión de antígeno - MHC II, y el efecto de la IL-1, estimula la secuencia de acontecimientos bioquímicos y morfológicos en el linfocito T_H , que da como resultado la proliferación y diferenciación de linfocitos T sensibilizados de manera específica.

Los linfocitos T activados liberan linfocinas que actúan en forma inespecífica para antígenos, sobre otras poblaciones de células mononucleares entre ellas las células B, los monocitos-macrófagos, y otras células del sistema inmunitario e incluso de otros linfocitos T, por ejemplo el interferón gamma mejoran la actividad citolítica de macrófagos, el factor estimulador de colonias y la IL-3 apoyan el crecimiento y diferenciación de monocitos, el factor de crecimiento de células B estimula la proliferación y diferenciación de una subpoblación de estas y la interleucina 2 (IL-2) que puede ser sintetizada por algunas células T en las cuales, si están en reposo no tiene efecto alguno sobre su proliferación, sin embargo si están activadas puede sostener su proliferación. El efecto de la IL-2 es actuar como factor de crecimiento o diferenciación. La activación de la célula T también induce a estas a expresar un ligando para CD40 (llamado CD40L) y la interacción entre CD40 que se encuentra en los linfocitos B y CD40L suministra señales críticas para la diferenciación de la célula B.^{15,29}

Hay dos poblaciones de linfocitos T_H que difieren en su función cooperadora, pero que no es posible aun distinguirlos por marcadores celulares, T_{H1} y T_{H2} , los primeros requieren contacto físico entre el linfocito B y el linfocito T, a través de los TCR y el complejo antígeno-molécula MHC II en el linfocito B para estimular a este último, la

población T_H2 no requiere de este contacto físico, pero media la función de estos a través de la liberación de mediadores solubles, este mecanismo no está restringido por MHC.¹⁵

Las citocinas producidas por estas subpoblaciones de linfocitos T no solo determinan sus funciones efectoras, sino que también participan en el desarrollo y la expansión de las subpoblaciones respectivas. Por ejemplo el $IFN-\gamma$ secretado por los linfocitos T_H1 estimula una mayor diferenciación de T_H1 e inhibe la proliferación de las células T_H2 , los T_H1 secretan además IL-2 y $TNF-\beta$. Por otro lado, la IL-4 producida por los linfocitos T_H2 estimula la diferenciación T_H2 en tanto que la IL-10, también sintetizada por estas (así como por otras células) inhibe la activación de los linfocitos T_H1 , los T_H2 secretan también IL-5, IL-6, e IL-13.

La vía de diferenciación T_H1 es la respuesta a los microorganismos que infectan o activan a los macrófagos y a aquellos que activan a los linfocitos NK, la diferenciación a T_H2 aparece en respuesta a helmintos y alérgenos, lo que produce una estimulación crónica de los linfocitos T, a menudo sin una respuesta inmunitaria innata o una activación de macrófagos significativa.²⁹

Los linfocitos T citotóxicos (T_C) conocidos también como células T efectoras, son pocos en un individuo sano, estos actúan en citólisis restringida de MHC de clase I específica para antígeno. El enlace de antígeno-MHC I y la IL-2 a receptores específicos de linfocito T_C estimula su proliferación. Este tipo de linfocitos reconoce y destruye células autólogas modificadas por virus.¹⁵

Los linfocitos T_C interactúan con células diana, y liberan unas proteínas llamadas perforinas que lisan a estas últimas en pocos minutos, en algunos casos la lisis se lleva a cabo sin la intervención de las perforinas, tras la interacción de cierta molécula en la membrana de los linfocitos T (CD95L) con una molécula de la célula diana (CD95), esta unión induce lisis programada (apoptosis) de la célula diana.²²

La respuesta inmunológica a antígenos extraños trasplantados, desencadenada en el individuo, se caracteriza también por la generación de linfocitos T citotóxicos (T_C) para el aloinjerto. Estas células aparecen en dos etapas, en la primera las células CD4 positivas reconocen las moléculas clase II del aloinjerto como extrañas y se activan, la

segunda etapa incluye la generación de células efectoras citotóxicas entre la población de células CD8 positivas.

Para el completo desarrollo de estas que reconocen moléculas MHC clase I del aloinjerto se requiere la secreción de IL-2 por células CD4 positivas.

Además de su función efectora, los linfocitos T intervienen en forma crucial en la regulación de la reactividad inmunológica como linfocitos T supresores (T_S) identificados por el antígeno CD8, modulando el desarrollo de células plasmáticas que secretan Igs a partir de células B y la reactividad de otras células T.

Esto es por medio de dos vías: la secreción de materiales reguladores solubles por los linfocitos T e interacciones directas entre células T y B.

Cabe mencionar que las células T y B no necesitan compartir la misma especificidad antigénica para que las células T proporcionen ayuda.^{15,29}

Las diferentes funciones efectoras y reguladoras mediadas por células T, representan las capacidades de sus poblaciones que se distinguen por diferencias en sus fenotipos.²⁹

Los linfocitos B son responsables de la parte de la respuesta inmunitaria conocida como inmunidad humoral, el proceso de reconocimiento, activación y proliferación, es semejante a como ocurren en los linfocitos T, solo que estos hacen el reconocimiento con antígenos de los patógenos extracelulares o sus productos solubles en su conformación nativa (proteínas, carbohidratos y lípidos) por medio de su receptor de células B (BCR) y en la diferenciación los linfocitos B se transforman en células que sintetizan y secretan anticuerpos de forma activa. Otra de las funciones de estos linfocitos es como células presentadoras de antígeno altamente eficaces.^{1,22,29}

La actividad funcional de este linfocito incluye la síntesis y secreción de anticuerpos. Así mismo, la inmunoglobulina de superficie actúa como receptor del antígeno transformado, el cual se enlaza tanto al macrófago como al linfocito T_H .

Además del enlace del antígeno presentado por el macrófago, las moléculas MHC II del linfocito B se enlazan a los receptores de este en el linfocito T_H , este complejo de las tres células inicia la formación del inmunoblasto del linfocito B, que se transforma en célula plasmática secretora de anticuerpos.¹⁵

Después de la estimulación mitógena o antigénica, los linfocitos B siguen cualquiera de las dos ramas de la vía. Pueden diferenciarse (con o sin división celular) en células plasmáticas que secretan grandes cantidades de Igs, o dividirse y después regresar a un estado de reposo como pequeños linfocitos posmitóticos, estos últimos se llaman linfocitos B de memoria, por que pueden transformarse con rapidez en células plasmáticas después de una segunda exposición al mismo antígeno.

La formación de células pre-B y la descendencia de células B, no requiere estimulación antigénica u otros estímulos ambientales. Por otra parte los antígenos y otros mitógenos son esenciales para activar las células B en reposo e iniciar su proliferación y diferenciación subsiguiente.²⁹

Las células NK tienen la capacidad biológica de destruir espontáneamente células blanco, su actividad va dirigida principalmente a células infectadas con virus y algunos otros microorganismos intracelulares y se dirige también a células neoplásicas, en estos casos es muy común que las células ya no expresen el MHC de clase I.

A diferencia de los linfocitos T_C no es necesaria la sensibilización previa para la actividad lítica de las células NK y la citolisis no se restringe al MHC, aunque parece que el interferón si aumenta la actividad de estas células.

Cuando las NK se activan son capaces de producir citocinas como el interferón γ (IFN- γ), el TNF- α , GM-CSF e IL-3 y por lo tanto pueden ejercer funciones de activación de otros linajes celulares importantes en la erradicación de tumores o agentes infecciosos.

Además también pueden responder a citocinas ya que expresan en su membrana algunos receptores especialmente para IL-2, IL-12 y TNF- α , su actividad se estimula por la IL-15 e IL-12, producidas por macrófagos siendo la IL-15 un factor de crecimiento para las NK, y la IL-12 un potente inductor de la actividad citolítica de los NK y de la síntesis de IFN- γ en ellas que a su vez activan a los macrófagos.^{1,15,22,28}

Las NK reconocen células diana recubiertas de anticuerpos mediante el FcR11a (CD16), un receptor de baja afinidad de las porciones Fc de los ac. IgG1 e IgG3. Cuando esto ocurre el receptor transmite una señal de activación a las NK, y puede entonces ejercer su acción citotóxica y/o producir y secretar citocinas al medio, la transducción de la señal se realiza a través de una proteína que se asocia no

covalentemente a CD16 que puede ser la cadena γ del receptor $Fc\gamma RI$ o la cadena ζ del TCR ambas cadenas contienen motivos (ITAM del inglés Immunoreceptor Tyrosin-based Activation Motifs). Los linfocitos NK también son capaces de lisar células que no estén recubiertas de anticuerpos. Existen varios receptores que se unen a ligandos y cadenas transmisoras de señales, los ligandos a receptores activadores no están bien definidos, pero pueden incluir moléculas que se expresan con frecuencia en las superficies de la mayoría de las células y algunos productos microbianos con una característica común que es la presencia de ITAM (motivos de activación del inmunoreceptor basado en tirosina).

Los receptores inhibidores de los linfocitos NK son cadenas señalizadoras con secuencias de inhibición del inmunoreceptor basadas en tirosina (ITIM del inglés Immunoreceptor Tyrosin-based Inhibition Motives) en sus colas citoplasmáticas, estos receptores se unen a moléculas del MHC de clase I que se expresa en la mayoría de las células normales. Cuando ambos receptores activadores e inhibidores están ocupados por su ligando, domina la influencia de los inhibidores y la célula NK no se activa. Este mecanismo evita la destrucción de células normales del huésped. La infección de células del individuo, especialmente por algunos virus, provoca a menudo una inhibición de la expresión del MHC clase I y por lo tanto la pérdida de los ligandos de los receptores de células NK, dando como resultado que estas salgan de su estado normal de inhibición y destruyan a las células infectadas además estas células carentes de MHC clase I resultan invisibles para los linfocitos T_C así que las células NK complementan perfectamente el papel de estos.^{1,22} El mecanismo de citólisis mediada por NK es prácticamente igual que el de los linfocitos T_C tienen gránulos que contienen una proteína denominada perforina, que crea poros en las membranas de la célula diana y enzimas conocidas como granzimas, que entran por los poros de las perforinas e inducen la apoptosis de la célula diana. El $IFN-\gamma$ activa y aumenta la capacidad de los macrófagos para destruir los microorganismos fagocitados.¹

3.3 LAS PLAQUETAS.

Generalidades de las plaquetas.

De los tres elementos formes de la sangre, la plaqueta fue el último en ser descubierto. Varias circunstancias retrasaron su hallazgo, entre ellas, su tamaño, notablemente más pequeño que el de los eritrocitos y leucocitos, así como las limitaciones ópticas de los elementales microscopios empleados durante los siglos pasados, particularmente el problema de la aberración cromática.

Otro factor que impidió reconocerlas, fue su carácter agregable, ya que durante la toma de muestras o al realizar los extendidos de sangre obtenida por punción cutánea se agregaban convirtiéndolas en un conglomerado que impedía observarlas como partículas independientes.

En los años siguientes a la invención del microscopio, varios observadores reportaron la presencia de partículas diminutas en la sangre.

Durante el siglo XIX, numerosos observadores reportaron la presencia en la sangre de corpúsculos más pequeños que los glóbulos rojos y los glóbulos blancos, pero reinaba una gran confusión acerca de su papel y de su origen. Se propusieron varias explicaciones, entre ellas, que se trataba de productos de desintegración de los otros elementos formes, como los glóbulos rojos y blancos, o que eran precursores en la formación de los eritrocitos; también fueron confundidas con bacterias. A lo largo de esa época, el estudio de la composición de la sangre se basaba en observar tanto la separación de sus partes después de la coagulación, como su reacción a medios físicos (calor o frío), o químicos, al agregarle diferentes sustancias, entre ellas ácidos y álcalis. Quien logró entender mejor el papel de las plaquetas y reconocerlas como un elemento distinto en la sangre fue el italiano Giulio Bizzozero (1841-1901), y las llamó "petites plaques" (describió cómo se agrupan en los vasos dañados y forman el tapón hemostático en forma diferente de la coagulación del plasma y mencionó que se trataba de dos eventos independientes y paralelos).

Hasta que en 1906, el destacado patólogo norteamericano James Homer Wright (1869-1928), quien perfeccionó la tinción que lleva su nombre y la aplicó al estudio de la sangre y de la médula ósea, descubrió, mediante preparaciones histológicas

convincientes, que los megacariocitos de este tejido daban lugar a las plaquetas después de la fragmentación de su citoplasma. En los años siguientes, numerosos autores, sobre todo de la escuela italiana aceptaron el hecho, que fue apoyado por la similitud histoquímica y de coloración que existía entre los megacariocitos y las plaquetas.

A pesar de esos avances a fines del siglo XIX, durante los primeros lustros del presente siglo aún había confusión sobre las plaquetas y no todos los autores prestaban suficiente atención a su conteo en la citometría hemática aunque se reconocía que su descenso se asociaba con algunas enfermedades hemorrágicas.

En los años que siguieron a las primeras observaciones de este tercer elemento de la sangre, la plaqueta pasó de la misteriosa partícula apenas visible, causa de grandes polémicas acerca de su significado, hasta el elemento que determina funciones vitales como la hemostasia, y que participa en enfermedades hemorrágicas y, sobre todo, en enfermedades trombóticas con una elevada tasa de mortalidad, como la aterosclerosis.^{19,35}

Los conocimientos alcanzados acerca de las características estructurales y funcionales de las plaquetas han permitido una mejor comprensión de los mecanismos de trombogénesis, estas características, son importantes ya que esto constituye la base, entre otros aspectos, para el diseño de fármacos y estrategias de tratamiento antitrombótico.

Las plaquetas son fragmentos citoplasmáticos que se producen como consecuencia de la ruptura de los megacariocitos de la médula ósea, éstas son células extraordinariamente grandes (20µm de diámetro), con un núcleo altamente poliploide y un citoplasma subdividido por capas de membranas onduladas. Las plaquetas se forman a partir de vesículas que se desprenden en grandes cantidades de las membranas externas de los megacariocitos.³³ Las plaquetas jóvenes son mas grandes y de menor densidad que las viejas, metabólicamente mas activas y efectivas en la hemostasia, aproximadamente dos tercios de las plaquetas que se producen se van a la circulación, mientras que el otro tercio se hallan retenida en el interior del bazo, aunque en un exquisito equilibrio con las circulantes, así constantemente entra en el bazo una cantidad de plaquetas igual a la cantidad que lo abandona. Una persona tiene

normalmente un promedio de 250×10^9 /L (intervalo de 150 a 450×10^9 /L) plaquetas en circulación.

Durante 7 a 12 días las plaquetas permanecen en el torrente circulatorio y si no se destruyen en los lugares que actúan, se destruyen por apoptosis, según se cree, las plaquetas dañadas, no funcionales o envejecidas, recubiertas de inmunoglobulinas, son removidas de circulación principalmente por macrófagos del bazo.^{3,7,23,31}

Características estructurales de las plaquetas.

Circulan en la sangre en forma de disco biconvexo de aproximadamente 2 a $3\mu\text{m}$ de diámetro, $4\text{-}7\mu\text{m}^3$ de volumen y 10 pg de peso, están desprovistos de núcleo. Poseen carga eléctrica negativa en su superficie.^{15,33}

En los frotis se observan con frecuencia aglomeradas debido a su gran capacidad de agregación (Figura 3-12). Lo normal es observar de 3 a 10 plaquetas aproximadamente por cada 100 GR o grupos ocasionales por campo, visto con objetivo de inmersión no debe existir menos de una plaqueta por campo.³⁹

Presentan dos zonas claramente delimitadas, una central donde se disponen las granulaciones azurófilas, denominada cromómero la cual se observa como con gránulos teñidos en púrpura y otra periférica hialina e incolora denominada hialómero, que se observa al microscopio en color azul claro (Figura 3-11).¹² Con el fin de simplificar la complicada estructura de las plaquetas esta se divide en cuatro zonas.

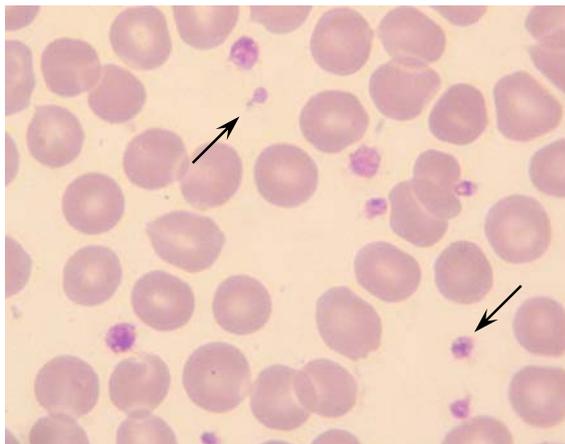


Fig. 3-11 Plaquetas, se observa la presencia de los gránulos. (1000X).

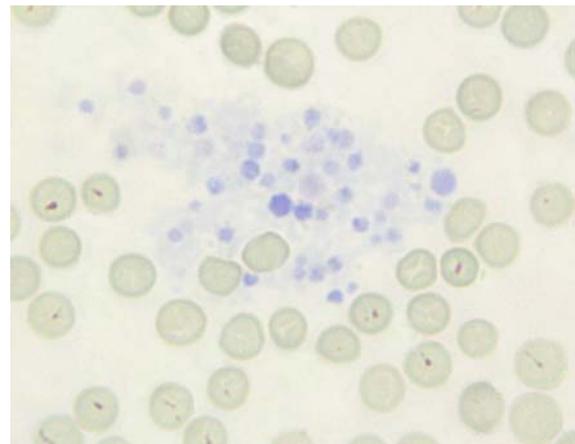


Fig. 3-12 Aglomerado de plaquetas. Tinción supravital. (1000X).

Zona periférica

Comprende 3 dominios: la cubierta exterior o glicocálix, la capa media es la típica unidad de membrana con la estructura de bicapa lipídica y la región submembrana es el área que se encuentra inmediatamente por debajo de la unidad de membrana representa el tercer componente de la zona periférica.

Zona de la matriz citoplasmática

Contiene varios sistemas de fibras en distintos estados de polimerización (microtúbulos y microfilamentos) que mantiene la forma discoide de las plaquetas y representa el sistema contráctil que participa en el cambio de forma emisión de pseudópodos, contracción interna y secreción.

Zona de organelos

Existe una fase sol, donde se hallan los principales gránulos, estos son: los gránulos alfa, cuerpos densos, peroxisomas, lisosomas y mitocondrias.

1.-*Gránulos alfa*: estructuras esféricas o alargadas con membrana propia, hay alrededor de 50 a 80 por célula, con un contenido principalmente de proteínas secretoras multifuncionales: proteínas adhesivas, factores de coagulación, factores de crecimiento, proteasas, proteoglicanos e inmunoglobulinas.

2.-*Gránulos densos*: organelos de 200 a 300 nm de diámetro, tienen normalmente de 3 a 8 gránulos, se ven oscuros y es donde se almacenan fundamentalmente las sustancias proagregantes.

3.-*Lisosomas*: vesículas distintas, más pequeñas que los gránulos alfa, contienen en general enzimas hidrolíticas que pueden aumentar de manera sinérgica la actividad de la cascada de coagulación intrínseca.

4.-*Peroxisomas*: su existencia se ha evidenciado por la demostración de actividad catalásica. Son pequeños y escasos y no han sido suficientemente caracterizados en estructura y función.

Sistema de membranas o sistema tubular:

Hay un sistema de túbulos internos, llamado sistema tubular denso (std); es una estructura tubular que recorre la plaqueta a lo largo de su mayor circunferencia proporcionándole el aspecto discoide.

El sistema tubular conector (stc) o sistema canalicular abierto (osc), se forma de las invaginaciones presentadas en la membrana plasmática. Tanto stc. cómo std. están comunicados, se cree que el std es el equivalente del aparato de Golgi del megacariocito; estos dos sistemas regulan la entrada y salida de calcio en la plaqueta.^{3,7,16,40}

Composición química de las plaquetas.

Zona periférica.

El glicocálix es rico en carbohidratos y posee característicamente carga negativa, se han descrito al menos ocho glicoproteínas mayores (Ia, Ib, Ic, IIa, IIb, IIIa, IV y V).

La membrana se constituye de una bicapa lipoproteica con glicoproteínas que funcionan como receptores de los agonistas fisiológicos de las plaquetas como: el ADP, el tromboxano A₂ (TXA₂) y la trombina, también de proteínas adhesivas (fibrinógeno, fibronectina, laminina, trombospondina, vitronectina, factor de Von Willebrand (vWF) y para ligandos fibrosos como el colágeno; además posee fosfolípidos, y enzimas importantes para el funcionamiento celular. Es responsable de la interacción de la célula con el medio circundante a través de receptores entre las que figuran las integrinas, las cuales se caracterizan por enlazarse a proteínas que tienen la secuencia arginina-glicina-aspartato (RGD): fibrinógeno, fibronectina, vitronectina, vWF, colágeno. Las integrinas más estudiadas han sido GPIIb/IIIa y la GPIb.

La GPIIb/IIIa ocupa una gran proporción de la superficie plaquetaria (15% de la proteína total de la membrana y 3% de la célula).^{16,33}

Hay de 3 a 8 réplicas en la plaqueta en reposo, es un heterodímero de 228 kDa, dependiente de calcio, cuyas subunidades a y b son codificadas por genes diferentes. La mayor proporción de esta glicoproteína es extracelular y dispone de 2 segmentos transmembrana y 2 cortos segmentos citoplasmáticos formados por los extremos C terminales. En la plaqueta en reposo se encuentra en forma de monómero, ya que la asociación de las subunidades requiere calcio extracelular, que se enlaza a la subunidad IIb.

La GP Ib/IX es un heterodímero formado por la asociación de las GPIb y IX. La GPIb consta de una cadena a y una b enlazadas por puentes disulfuro.

Tiene regiones extracelulares (40 nm), que poseen los dominios de identificación y garantizan la interacción con los ligandos vWF y trombina y las inmediatas transmembrana y citoplasmática, que actúan como anclaje del complejo a la célula. Esta glicoproteína es rica en leucina. Después de la GPIIb/IIIa es la mayoritaria en la membrana plaquetaria ($1-3 \times 10^4$ moléculas /plaqueta). Las subunidades GPIa y b y la GPIX son codificadas por genes diferentes, localizados en cromosomas diferentes.

Las diferentes regiones de este complejo tienen una función: la región extracelular facilita el acceso al subendotelio y la interacción con trombina y vWF como ya se dijo; la región intracitoplasmática une los dominios funcionales extraplaquetarios con el citoesqueleto de actina; la región transmembrana actúa como anclaje de la glicoproteína en la membrana plaquetaria.

En esta también están la Na/K ATPasa y la bomba de aniones, las que mantienen el gradiente iónico de la membrana.

La región submembrana esta constituida por un sistema de elementos filamentosos ubicados por fuera de la banda circunferencial de microtúbulos.

Zona de la matriz citoplasmática.

Contiene partículas de glucógeno diseminadas o aglomeradas que constituyen la fuente energética de esta célula en forma similar a las células musculares. Contiene ribosomas en muy pocas cantidades, fundamentalmente en las células jóvenes, lo que concuerda con la casi nula actividad de síntesis proteica.

Soporta, además, el más prominente de los sistemas de fibras de la matriz, la banda circunferencial de microtúbulos, es un grupo de 8 a 24 perfiles circulares de aproximadamente 25 nm de diámetro ubicados de manera concéntrica y que mantienen la forma discoide de la célula y garantizan su resistencia a la deformación.

Los microfilamentos constituyen el segundo sistema de fibras de la matriz citoplasmática y son parte del sistema contráctil. Miden alrededor de 50 Å de diámetro.^{16,33}

Citoesqueleto.

Es un gel visco-elástico que contiene filamentos de actina entrecruzados, conectados a la GPIb por proteínas enlazantes de actina y tiene como funciones:

a) La regulación de las propiedades de la membrana, tales como sus

contornos y estabilidad, junto a los microtúbulos propicia el mantenimiento de la forma de la plaqueta en reposo.

b) Mediación de la distribución lateral de las glicoproteínas receptoras en la membrana.

c) Constituye una barrera para la exocitosis. Su alteración puede llevar a la fragmentación del citoplasma formando micro partículas.

Gel contráctil.

Está formado por largos filamentos de actina enrejados, conectados con el citoesqueleto submembranoso y miosina que se encuentra en forma no polimérica en la célula en reposo. Constituye el cuerpo de los organelos celulares, los cuales se desplazan hacia el centro de la célula a consecuencia de la contracción del gel.³³

Zona de organelos.

Los gránulos de almacenamiento y secreción son los órganos más característicos, constituyendo en conjunto alrededor del 20% del volumen plaquetario. La disposición espacial de los gránulos en las plaquetas no estimuladas es al azar y homogénea; cuando se produce activación los gránulos se funden con las membranas del (osc) y vierten su contenido al exterior, desde un punto de vista morfológico y funcional se distinguen:

Gránulos alfa.

Son organelos esféricos de 140 a 400nm en diámetro, distintivos de las plaquetas, son ricos en macromoléculas con una porción de alta densidad en electrones. Sus membranas contienen GPIIb/IIIa, pequeñas cantidades de GPIb, GPIX y P selectina. Tienen una importante participación en el funcionamiento celular, al propiciar la interacción entre plaquetas, es la población granular mas numerosa, de ahí que la cantidad de gránulos α (como promedio 50-80 gránulos por plaqueta) determina el valor funcional de la célula. También participan en la interacción con otras células a través de la liberación de su contenido, el cual se puede dividir en dos grandes grupos: a) proteínas específicas plaquetarias ausentes en el plasma: Factor 4 plaquetario (F4P) conocido también como factor neutralizante de heparina, β -tromboglobulina y b) proteínas idénticas a las del plasma, algunas sintetizadas por el megacariocito: Factor von Willebrand (FvW), Factor V, trombospondina (TSP), entre otras y aquellas no

sintetizadas por el megacariocito e incorporadas desde el plasma: fibrinógeno (factor I), albúmina.

Como proteínas adhesivas además del FvW el fibrinógeno y la trombospondina, se encuentran también, la fibronectina, la P-selectina y la vitronectina.

Como proteínas del sistema hemostático que contienen los gránulos alfa están además del Factor V, FVIII, FIX, proteína S, cininógeno de alto peso molecular, plasminógeno, el inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1), α 2 antiplasmina, α -2 macroglobulina, α -1 antitripsina.

Contienen también Factores de crecimiento: factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PGDF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformador (TGF β).

Por ultimo otros componentes de los gránulos α : son, IgA, IgG, osteonectina, colagenasa, elastasa e inhibidores de proteasas.^{16,31,33,40}

Gránulos densos.

Organelos de 200 a 300 nm de diámetro, tienen normalmente de 3 a 8 gránulos densos por plaqueta, se caracterizan por su alta densidad electrónica que le confiere el elevado contenido en calcio (50% del total, en una concentración 2 mol/L) y fósforo inorgánico, magnesio, almacenan alrededor de los 2/3 del contenido total de nucleótidos de las plaquetas ATP y ADP, contienen también: serotonina, calcio ionizado, adrenalina, epinefrina, norepinefrina y dopamina.^{7,16,33,40}

Lisosomas.

Son los gránulos más pequeños, menos de 300 nm de diámetro, almacenan enzimas hidrolasas, estos son ricos en fosfatasa ácida, arilsulfatasa, β -glucuronidasa, entre otras, a diferencia de lo que ocurre en otras células no se ha encontrado la función de digestión en su interior, por lo que constituirían lisosomas primarios que secretan su contenido durante la activación de la plaqueta.^{16,40}

Peroxisomas.

Además de los gránulos secretores descritos previamente, se puede demostrar en plaquetas con una técnica citoquímica que detecta catalasa, la presencia de gránulos pequeños que son similares a los peroxisomas encontrados en otros tejidos.⁴⁰

Sistema de membranas o sistema tubular.

Sistema canalicular abierto, llamado también sistema tubular conector, está formado por canales ramificados, se conecta a la membrana externa y posee características similares a ella en cuanto a su composición. A través de este sistema se transportan las GPIIb/IIIa y la GPIb hacia los gránulos α .

Sistema tubular denso, es un sistema de membranas que aparece en la vecindad de los microtúbulos y rodea los organelos, con apariencia, y funciones similares a las del retículo endoplásmico liso de otras células. Regula la activación plaquetaria mediante el secuestro o liberación de calcio, de forma similar a los túbulos del músculo esquelético y por un mecanismo más rápido que el de las mitocondrias. También posee ATPasas, enzimas del metabolismo del ácido araquidónico y adenilato ciclasa.

Las plaquetas poseen organelos inespecíficos, como mitocondrias, liso-somas y peroxisomas, que tienen características y funciones similares a los de otras células pero, además, portan organelos específicos, que son los gránulos alfa y los gránulos densos.³³

Funciones de las plaquetas.

Su función principal se encuentra en el mecanismo de la coagulación. Las plaquetas son esenciales para la hemostasia normal y para desarrollar cuatro distintas funciones en respuesta al daño vascular.

1.-Mantenimiento continuo de la integridad vascular al sellar las deficiencias menores del endotelio.

2.-Detención inicial de la hemorragia a través de la formación de tapones plaquetarios.

3.-Estabilización del tapón hemostático al contribuir con la actividad pro-coagulante (factor 3 plaquetario) haciendo que la cascada de coagulación forme fibrina.

4.-Promoción de la reparación vascular al estimular la migración de células endoteliales y la migración y proliferación de células musculares lisas mediales (a través de la liberación del mitógeno, factor de crecimiento derivado de plaquetas PDGF).³⁰

Las plaquetas se caracterizan por un consumo muy extenso de oxígeno, es 6 veces más rápido que en las células musculares en reposo. La fuente de energía es la glucosa que se obtiene a partir del glucógeno y la vía fundamental es la glicólisis anaerobia, que convierte la glucosa en lactato e iones de hidrógeno, los cuales son captados por el acetato, que entra a las mitocondrias para su oxidación en el ciclo del ácido tricarboxílico (ciclo de Krebs), lo que propicia la síntesis de ATP por la fosforilación oxidativa y la estabilización del pH celular.

Incorporan a su interior (por un mecanismo independiente de energía) fragmentos de membrana que contienen GPIIb/IIIa y también fibrinógeno, y (por un mecanismo dependiente de energía), fragmentos de membrana que contienen GPIb, esto permite la regeneración de los receptores de membrana.

Estas células concentran la mayoría de la serotonina de la sangre la que toman unida a calcio mediante transporte activo. También toman del plasma ligandos como fibrinógeno, colágeno, fibronectina y aminas biógenas.³³

Activación plaquetaria.

La participación de las plaquetas en los procesos de hemostasia depende de la ocurrencia de 3 eventos: la adhesión plaquetaria; el cambio de forma y la agregación plaquetaria. Si el estímulo y la concentración de los inductores es fuerte la secuencia se lleva por completo, pero si el estímulo es débil o hay presentes inhibidores potentes, se detiene e incluso puede revertirse, la naturaleza del inductor es otro factor condicionante.^{17,33}

Cambio de forma.

Todos los inductores tanto de la adhesión como de la agregación plaquetaria provocan el cambio de forma de discocito a esferocito, es la primera manifestación física de la activación plaquetaria, se acompaña de un incremento en la superficie desde $8.02 \mu\text{m}^2$ (en la plaqueta en reposo) a $13.0 \mu\text{m}^2$ (en la plaqueta activada), exponiendo así receptores que mantenía en la parte más recóndita de su membrana. Disminuye la longitud del subesqueleto submembrana cuya evaginación aporta membranas para este proceso. Se produce la redistribución de los microtúbulos, lo que le confiere la característica de deformabilidad celular y la posibilidad de emitir

seudópodos. Los microtúbulos que están en estrecho contacto con el gel contráctil, se trasladan hacia el centro de la célula.

Se procede a la desintegración del citoesqueleto y se restituye a partir de la internalización de fragmentos de la membrana externa.

Este es un proceso dependiente de energía e independiente de calcio, pues no se inhibe con EDTA, que es un potente inhibidor de la adhesión y agregación.

Puesto que en presencia de concentraciones óptimas de inductores potentes, los cambios morfológicos preceden a la reacción de adhesión, se acepta que los procesos “espinosos” favorecen la adhesión a superficies extrañas así como la agregación entre célula y célula.

El cambio morfológico inducido por concentraciones muy bajas del inductor, por ejemplo pequeñas concentraciones de trombina, es reversible.^{17,33}

Adhesión plaquetaria

Las plaquetas son capaces de adherirse a superficies artificiales, sobre las cuales se expanden. Utilizan como ligando al fibrinógeno, a través de su unión a GPIIb/IIIa. También se adhieren al colágeno (fundamentalmente de los tipos I y III), vWF, fibronectina, laminina.

En condiciones de bajo flujo sanguíneo, este evento es mediado por la interacción vWF-GPIb, pero en condiciones de alto flujo también se requiere la participación de GPIIb/IIIa. Se forman enlaces firmes que dependen de la estructura fibrilar del colágeno y de la cantidad de subunidades RGD.

La adhesión plaquetaria al colágeno requiere de la interacción del colágeno con vWF del plasma, GPIb, GPIIb/IIIa de la membrana plaquetaria que durante la formación del coágulo establecen enlaces plaqueta-fibrina. Se produce la internalización de las mallas de fibrina o de colágeno, que son rodeados de microfilamentos.³³

Agregación plaquetaria.

Las plaquetas activadas se agregan entre sí, formando pelotones de plaquetas. Esta agregación al principio puede ser reversible, pero posteriormente se hará irreversible.

Estímulos fisiológicos para la activación plaquetaria son la trombina, el colágeno, el ADP, la epinefrina, el TXA₂. Los eventos posteriores tienen elementos comunes y

otros que lo diferencian, por ejemplo, ocurren como resultado de la estimulación de receptores específicos. En el caso de la trombina, el ADP y el TXA₂, se trata de receptores acoplados a proteínas enlazantes de nucleótidos de guanina (proteínas G). El de trombina es una glicoproteína con 7 dominios transmembrana, de la cual hay de 1,500 a 2,000 copias que se desensibilizan rápidamente al producirse la activación, estas no son recuperables. El receptor del ADP, se caracteriza por activarse frente al ADP y por inhibirse frente al ATP, algunas evidencias experimentales recientes, sugieren que se trata de 3 receptores, uno P2Y₁, igual al que media la vasodilatación y que es causante del aumento del calcio citoplasmático, el cambio de forma y la agregación plaquetarias, otro P2Y₂, que media la inhibición de la adenilciclase y uno P2X₁ (no acoplado a proteína G) con una menor significación.

Se plantea que al menos una glicoproteína, la GPVI, actúa como receptor para la fase de activación inducida por el colágeno y que su estimulación es una señal para una fosfolipasa C.

Un evento que sigue a la activación es el incremento de la concentración de calcio citoplasmático, cuyo mecanismo bioquímico no ha sido determinado totalmente en la mayoría de los casos.

Con respecto a la trombina, el colágeno y el TXA₂, se ha demostrado la ocurrencia de activación de la fosfolipasa C, que da lugar a la formación de 1,4,5 trifosfato de inositol el cual libera calcio del sistema tubular denso y activa una miosina cinasa y el 1,2 diacilglicerol que activa la proteína cinasa C, que desencadena una serie de fosforilaciones de proteínas que parecen importantes para el proceso de agregación plaquetaria.

En el caso del TXA₂ se cree que también hay entrada a la célula del calcio extracelular a través de una intensificación del intercambio Na⁺/H⁺ de lo cual depende más de la mitad del incremento del calcio citoplasmático.

La trombina, el ADP y la epinefrina inducen inhibición de la actividad adenilciclase en la plaqueta, cuya implicación en el resultado final no está bien determinado.

Se desconocen los mecanismos bioquímicos que llevan a la activación de la GPIIb/IIIa y el enlace del fibrinógeno, pero hay evidencias de que este último es independiente del calcio.

La activación plaquetaria por agentes como trombina, colágeno, ADP y epinefrina, puede conducir a la activación de la fosfolipasa A_2 citoplasmática, que requiere concentraciones fisiológicas de calcio para activarse, la cual cataliza la hidrólisis de los fosfolípidos de membrana y da lugar al ácido araquidónico que se metaboliza preferencialmente por la vía de la TXA_2 sintetasa para dar lugar al TXA_2 , producto inestable (sólo 5s dura su actividad) cuyos precursores, los endoperóxidos cíclicos, son también capaces de activar el receptor. De esta manera el TXA_2 constituye un amplificador de la señal de activación plaquetaria.

La irreversibilidad del proceso anterior sucede cuando las plaquetas liberan todo el contenido de sus gránulos.

Después de un estímulo fuerte los gránulos alfa y densos se alargan y emiten pseudópodos, se aproximan a la membrana plasmática (lo que es posible debido a la disolución del sistema canalicular abierto), se funden con la membrana, aumentan de volumen debido a la entrada de agua y esto propicia la liberación de su contenido al medio exterior, lo que se denomina secreción.

Un elemento que distingue a los agentes inductores de agregación plaquetaria es el peso relativo que tienen la síntesis de TXA_2 y la secreción en el resultado final, por ejemplo, la agregación inducida por trombina, es resultado fundamentalmente de la señal dada por la activación de su receptor, ya que no es afectada por la inhibición de la síntesis del TXA_2 por aspirina. El ADP produce una primera fase de agregación reversible, de aproximadamente 30s de duración y que es consecuencia de la señal de activación del receptor, a lo que sigue una segunda fase irreversible y que depende de la síntesis de TXA_2 , que parece requerir de la liberación de ADP.

La conocida susceptibilidad a la aspirina de la agregación inducida por colágeno, sugiere la importancia de la liberación de TXA_2 en su mecanismo de activación plaquetaria.

La epinefrina se considera un agonista débil que amplifica el efecto de otros estímulos a través del incremento de la concentración de calcio intracelular, y de la actividad adenilato ciclasa.^{7,33}

Regulación fisiológica de la adhesión / agregación plaquetaria.

Las plaquetas circulantes se encuentran en una interacción dinámica con los componentes del plasma, los demás elementos formes de la sangre y con el endotelio vascular a través de las glicoproteínas de las membranas plaquetarias y de diferentes mediadores químicos. Los eritrocitos, que viajan por la parte central de la corriente sanguínea, desplazan a las plaquetas hacia las cercanías de la pared del vaso, lo que puede dar lugar a enlaces reversibles.

La adhesión plaquetaria sólo será efectiva cuando se produzcan enlaces irreversibles. La célula endotelial libera mediadores químicos que impiden que ocurra la adhesión plaquetaria a un endotelio sano, estos mediadores son la prostaciclina (PGI_2), principal metabolito del ácido araquidónico en la célula endotelial, y el óxido nítrico (NO), producto del metabolismo de los aminoácidos.² La PGI_2 estimula la adenilciclasa en la plaqueta y aumenta los niveles intracelulares de AMPc, mientras el NO estimula la síntesis de GMPc, que es el más potente inhibidor de la hidrólisis del AMPc. Ambos inhiben la adhesión plaquetaria y además, estimulan la reducción del calcio libre intracelular modulando así la agregación plaquetaria.

Entre los mecanismos que favorecen la adhesión/ agregación están la liberación de ADP de los eritrocitos, que se lisan, la liberación del factor activante de plaquetas (PAF) que es un potente estimulante de la agregación plaquetaria cuya función fisiológica en el humano no se ha determinado y TXA_2 de los leucocitos activados, la exposición de P selectina en las membranas de células endoteliales y plaquetas, que media la interacción intercelular a través del reconocimiento de estructuras hidrocarbonadas ricas en ácido siálico y fucosa. Otro elemento influyente es el "shear stress" del flujo sanguíneo, que induce agregación plaquetaria a través del enlace del vWF con la GPIb y con una fuerte participación del ADP liberado.

El estímulo para la participación de las plaquetas en los procesos de hemostasis y trombosis es la lesión del endotelio vascular, considerado como tal el daño físico con

exposición de la membrana basal rica en colágeno o la disfunción endotelial con desbalance de la producción de mediadores anti y pro-agregantes.

Cuando las plaquetas se adhieren al endotelio atraen más plaquetas P selectina positivas. Se reclutan y activan a los leucocitos, los cuales se unen irreversiblemente a la superficie plaquetaria por medio de la molécula de adhesión ICAM-2. La activación del receptor para el fibrinógeno soluble y la participación de los fosfolípidos de la membrana plaquetaria como cofactores para la cascada de reacciones enzimáticas de la coagulación, favorece la formación del trombo arterial.

Por otra parte algunos componentes de los gránulos plaquetarios, que se liberan durante la activación, influyen sobre otras células, uno de ellos es el factor de crecimiento derivado de la plaqueta (PDGF), que estimula la proliferación celular y juega un papel importante en la cicatrización de heridas y al parecer también en el proceso de aterogénesis, el TXA₂ y la 5-hidroxitriptamina (5HT) o serotonina, que son potentes vasoconstrictores, aminoran el calibre de la luz de vasos lesionados facilitando todavía más el complejo proceso de hemostasia y el inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1), que tiene acción antifibrinolítica.^{7,33}

3.4 EL MICROSCOPIO DE CAMPO CLARO.

El ojo humano solo puede discriminar (resolver) dos puntos separados por más de 0.1mm (= 100µm). La mayoría de las células miden menos de ese tamaño y las estructuras celulares son más pequeñas aún; por eso, para el estudio de las células, es necesario usar instrumentos que permitan observarlas de mayor tamaño. Este instrumento es el microscopio (del griego mikros = pequeño y skopein = mirar).

Existen numerosos tipos de microscopios, adaptados para diferentes usos, algunos emplean una fuente energética diferente: microscopio de rayos X, ultravioletas, infrarrojo, de rayos beta, de ultrasonidos, electrónicos, protónicos, de neutrones, fotónicos, etc.

Los microscopios más potentes que se han construido hasta el momento son los electrónicos; con éstos se puede obtener una información directa de estructuras que oscilan entre 0.4 y 200 nm.

Sin embargo, este tipo de microscopio es muy costoso, teniendo fines de investigación.^{5,12,47}

Por su amplia aplicación y costo relativamente bajo, en enseñanza e investigación se utiliza especialmente el microscopio óptico compuesto de campo claro convencional, perteneciente al grupo de los microscopios ópticos o fotónicos, que utilizan la fracción visible del espectro.

El microscopio óptico convencional es compuesto porque posee dos sistemas principales de lentes convergentes (ocular y objetivo) (Figura 3-13), en cambio los microscopios simples o lupas, de menor aumento, presentan un solo sistema de lentes biconvexas o plano-convexas montadas en una armadura metálica. La mayoría de los modelos actuales son binoculares, aunque también los hay monoculares.

El microscopio compuesto convencional se denomina "de campo claro" o "de campo brillante" porque todo el campo se ilumina con una lente condensadora común, a diferencia de variedades que utilizan luz difractada, de fondo oscuro. Las muestras que se observan en el microscopio compuesto convencional deben ser translúcidas y estar teñidas para generar contraste.

El rendimiento y calidad de este microscopio dependen principalmente de sus lentes, de la forma en que se combinan y de la iluminación empleada.

Un buen microscopio proporciona aumento adecuado, detalles exactos y entrega imágenes contrastadas de contornos definidos.

Además, la estructura mecánica debe poseer las características de estabilidad, confiabilidad y comodidad.⁴⁷

En la imagen del microscopio utilizado en el presente trabajo se pueden observar las partes de un microscopio compuesto (Figura 3-13)

Sistema óptico.

- OCULAR: Lente situada cerca del ojo del observador, amplía la imagen del objetivo.
- OBJETIVO: Lente situada cerca de la preparación, amplía la imagen de ésta.

- CONDENSADOR: Lente que concentra los rayos luminosos sobre la preparación.
- DIAFRAGMA: Regula la cantidad de luz que entra en el condensador.
- FOCO: Dirige los rayos luminosos hacia el condensador.

Sistema mecánico.

- SOPORTE: Mantiene la parte óptica, tiene dos partes: el pie o base y el brazo.
- PLATINA: Lugar donde se deposita la preparación.
- CABEZAL: Contiene los sistemas de lentes oculares, puede ser monocular o binocular.
- REVÓLVER: Contiene los sistemas de lentes objetivos, permite, al girar, cambiar los objetivos.
- TORNILLOS DE ENFOQUE: Macrométrico que aproxima el enfoque y micrométrico que consigue el enfoque correcto.⁵

COMPONENTES DE UN MICROSCOPIO ÓPTICO

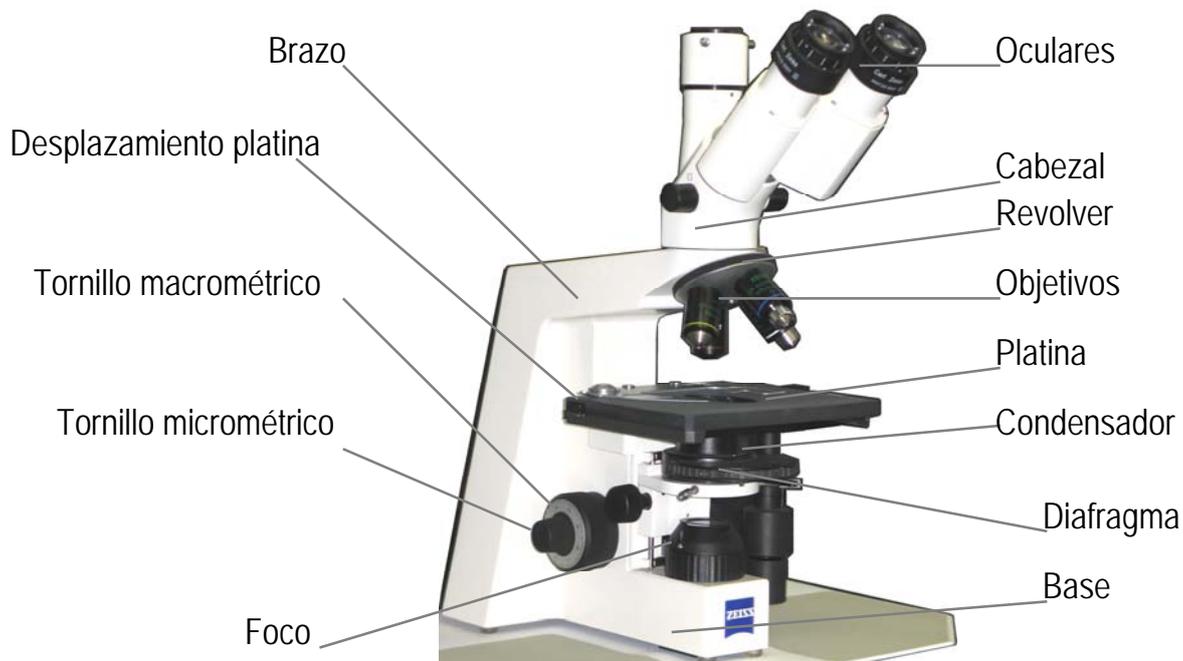


Fig.3-13. Microscopio óptico compuesto convencional.

3.4.1 CONSIDERACIONES GENERALES.

El aumento visual:

Es la relación entre el tamaño de la imagen producida por el microscopio y el tamaño real del objeto observado. Indica el número de veces que la imagen es mayor que el objeto y se expresa en "X", por ejemplo 40X significa que la imagen es 40 veces mayor que el objeto.

Como el microscopio compuesto posee dos sistemas de lentes que aumentan sucesivamente la imagen, el aumento total se obtiene multiplicando el aumento del sistema ocular por el aumento del sistema objetivo, siempre que la distancia entre ambos sea la correcta (largo mecánico del tubo generalmente 160 o 170 mm) y que no existan otras lentes intermedias.

La resolución:

Es la propiedad de un sistema óptico de discriminar detalles muy finos. Consiste en hacer visibles como independientes dos puntos muy cercanos entre sí. El inverso del poder de resolución es el límite de resolución (L.R.), distancia mínima entre dos puntos del objeto observados como distintos.

Los microscopios ópticos modernos tienen un límite de resolución de 0.2 a 0.4 μm , aproximadamente $1/20$ del diámetro de un eritrocito humano normal.

El límite de resolución depende de la longitud de onda de la emisión empleada y del ángulo que forman los rayos más externos que penetran a la lente. Cuanto menor sea la longitud de onda empleada y más ancho el cono de luz, menor será el límite de resolución y en consecuencia mayor su poder

La definición:

Es la capacidad de producir imágenes de contornos delimitados y nítidos. Los mejores poderes de definición se encuentran en sistemas de lentes objetivos con alto grado de corrección óptica, que eliminan al máximo las aberraciones.

Existen lentes con diferentes grados de corrección de las aberraciones: acromáticos, apocromáticos, semiapocromáticos. Los más utilizados y más económicos son los acromáticos, en los que está corregida la aberración esférica de un color y la aberración cromática de dos colores.

Se denominan aberraciones a los defectos de corrección del sistema óptico. Las aberraciones cromáticas producen imágenes difusas con un halo coloreado alrededor del campo debido a la diferencia de longitud focal en función de la longitud de onda. Al pasar de un medio a otro de diferente índice de refracción, cada color que forma parte de la luz blanca experimenta una desviación diferente.

Las aberraciones de esfericidad se deben a que los rayos cuando atraviesan la zona periférica de una lente simple recorren un trayecto algo mayor que cuando pasan por el centro, produciéndose un efecto de prisma. A partir de un foco lumínico puntual se forman imágenes superpuestas de diferentes tamaños, dando una imagen poco nítida de bajo contraste.

Luminosidad:

Es la impresión visual de la luz reflejada o emitida por una superficie. La luminosidad de la imagen microscópica depende de la fuente de iluminación, el condensador, los filtros, el medio óptico y la luminosidad del objetivo. La fuente lumínica más utilizada es la lámpara incandescente.^{5,47}

3.4.2 OPERACIÓN DEL MICROSCOPIO.

El microscopio es un instrumento de precisión que debe tratarse con cuidado y manejarse correctamente para evitar errores, cansancio y pérdida de tiempo.

1. Colocar el objetivo de menor aumento en posición de empleo y bajar la platina completamente. Si el microscopio se recogió correctamente en el uso anterior, ya debería estar en esas condiciones.
2. Colocar la preparación sobre la platina sujetándola con las pinzas metálicas.
3. Ajustar la distancia entre los oculares de acuerdo a la separación de los ojos del observador, asegurando que la observación se realice con ambos ojos abiertos, para evitar la contracción muscular y la presión sobre el globo ocular.^{5,46,47}
4. Comenzar la observación con el objetivo de 4X (que ya está en posición) o colocar el de 10 aumentos (10X) dependiendo de la preparación que se vaya a observar.
5. Para realizar el enfoque:

- a. Acercar al máximo la lente del objetivo a la preparación, empleando el tornillo macrométrico. Esto debe hacerse mirando macroscópicamente, no a través de los oculares, ya que se corre el riesgo de incrustar el objetivo en la preparación pudiéndose dañar alguno de ellos o ambos.
 - b. Mirando, ahora sí, a través de los oculares, ir separando lentamente el objetivo de la preparación con el tornillo macrométrico y, cuando se observe una imagen nítida de la muestra, girar el micrométrico hasta obtener un enfoque fino.
6. Pasar al siguiente objetivo (40X). La imagen debería estar ya casi enfocada y suele ser suficiente con mover un poco el tornillo micrométrico para lograr el enfoque fino. Si al cambiar de objetivo se perdió por completo la imagen, es preferible volver a enfocar con el objetivo anterior y repetir la operación desde el paso 4. El objetivo de 40X enfoca a muy poca distancia de la preparación y por ello es fácil que ocurran dos tipos de percances: incrustarlo en la preparación si se descuidan las precauciones anteriores y mancharlo con aceite de inmersión si se observa una preparación que ya se enfocó con el objetivo de inmersión.
7. Empleo del objetivo de inmersión:
 - a. Bajar totalmente la platina.
 - b. Subir totalmente el condensador para ver claramente el círculo de luz que nos indica la zona que se va a visualizar y donde habrá que colocar la gota de aceite.
 - c. Girar el revólver hacia el objetivo de inmersión dejándolo a medio camino entre éste y el de 40X.
 - d. Colocar una gota mínima de aceite de inmersión sobre el círculo de luz.
 - e. Terminar de girar suavemente el revólver hasta la posición del objetivo de inmersión.
 - f. Mirar directamente al objetivo, subir la platina lentamente hasta que la lente toca la gota de aceite. En ese momento se nota como si la gota ascendiera y se adosara a la lente.

- g. Enfocar cuidadosamente con el tornillo micrométrico. La distancia de trabajo entre el objetivo de inmersión y la preparación es mínima, aun menor que con el de 40X por lo que el riesgo de accidente es mayor.
- h. Una vez se haya puesto aceite de inmersión sobre la preparación, ya no se debe volver a usar el objetivo 40X sobre esa zona, pues se mancharía de aceite. Por tanto, si desea enfocar otro campo, hay que bajar la platina y repetir la operación desde el paso 4.
- i. Una vez finalizada la observación de la preparación se baja la platina y se coloca el objetivo de menor aumento girando el revólver. En este momento ya se puede retirar la preparación de la platina. Nunca se debe retirar con el objetivo de inmersión en posición de observación.
- j. Limpiar el objetivo de inmersión con cuidado empleando un papel especial para óptica. Comprobar también que el objetivo 40X está perfectamente limpio.⁵

3.4.3 CUIDADOS Y MANTENIMIENTO.

1.-Se debe mantener el microscopio en un lugar estable, el observador debe colocarse de espaldas a los focos de luz, prefiriéndose la luminosidad amortiguada, lejos de las ventanas y sobre una mesa negra para eliminar luces parásitas y evitar una fatiga innecesaria.

2.-Debe colocar el microscopio lejos del extremo del mesón, para evitar que se vuelque. La mayoría de los desperfectos se producen por golpes.

3.-El microscopio se transporta verticalmente, sujeto por el brazo con una mano y por la base con la palma de la otra. El transporte incorrecto puede dañar alguno de sus componentes.

4.-Debe cubrirse mientras no se usa y no es conveniente sacarle los oculares. El polvo se deposita en las lentes y desgasta los componentes.

5. No es correcto tocar los lentes oculares, objetivos ni condensador con los dedos ya que las manchas de grasa y sudor los daña.

6.-Las lentes pueden soplarse enérgicamente con una pera de goma pero no deben limpiarse con un paño seco (las partículas de polvo pueden rayarlas), ni

soplado con la boca (una película líquida es muy difícil de eliminar). Si queda polvo debe emplearse papel especial o un pincel que se carga electrostáticamente acercándolo a una ampolleta encendida, lo cual permite recoger las partículas.

7.-Debe observarse con ambos ojos abiertos. Al estar un ojo cerrado prolongadamente, la contracción muscular y la presión sobre el globo ocular causan cansancio y a veces dolor ocular o de cabeza.⁴⁷

8.-Debe mirar a través del microscopio, no "en" el microscopio. Si el observador mira como si la imagen estuviese junto al ojo, la vista se cansa innecesariamente y puede producirse dolor ocular.

9.-Se debe mantener una distancia adecuada entre el ojo y el ocular, acercándose desde algunos centímetros poco a poco hasta observar el campo visual grande y definido.

10.-Toda observación comienza con lupa y pasa ordenadamente a mayores aumentos. Esto facilita centrar y enfocar, da un campo visual inicial amplio que proporciona visión de conjunto, facilita la interpretación y permite ubicar fácil y rápidamente las estructuras. La zona de la preparación que desea observarse debe quedar en el centro del campo antes de pasar al siguiente aumento.

11.-Las preparaciones que tengan cubreobjetos se colocan con este hacia arriba. Si la preparación está al revés, al tratar de enfocar choca el objetivo con la preparación y se daña.

12.-No colocar aceite de inmersión sobre objetivos secos (lupa, menor, mayor) ni utilizar el objetivo a inmersión como objetivo seco, porque se puede rayar.

13.-Para limpiar las lentes de los objetivos es común utilizar papel seda, y solo de vez en cuando para una limpieza mas profunda suele utilizarse un paño humedecido ligeramente con una solución de agua-alcohol isopropílico al 70%-acetona por partes iguales, no muy frecuentemente ya que el alcohol disuelve el adhesivo de las lentes, el xilol no se recomienda debido a que contiene un compuesto carcinógeno (benceno) y también es deficiente limpiador, deja una película oleosa en la lente, no debe hacerse con algodón, pues deja fibrillas pegadas al vidrio dificultando la visión.^{3,23,47}

14.-Al finalizar el trabajo, se debe dejar puesto el objetivo de menor aumento en posición de observación, asegurarse de que la parte mecánica de la platina no sobresale del borde de la misma.⁵

15.-Cuidar de no derramar líquidos sobre el microscopio, si esto sucediera accidentalmente debe secarse de inmediato y evitar manejar el microscopio con los dedos húmedos.

16.-Apagar el microscopio mientras no se usa, para evitar así su calentamiento excesivo, ya que su ampolla es de alto costo y tiene una vida útil limitada.

17.-Las lentes están montadas en forma muy precisa, sólo se deben limpiar externamente, sin desmontarlas. Sólo un técnico especializado puede hacerlo para una limpieza completa.

18.-No se debe invertir ni ladear el microscopio sin quitar previamente el ocular, que entra por deslizamiento.⁴⁷

19.-El cambio de objetivo se hace sosteniéndolo por el revolver y no del tubo del mismo y no debe hacerse mientras se está observando a través del ocular.⁵

20.-Para retirar o colocar una preparación no debe estar el objetivo mayor (40X) o el objetivo de inmersión (100X) en posición de trabajo, porque pueden rayarse las lentes frontales.

21.-Al terminar de usar el microscopio debe bajarse la intensidad de luz al mínimo antes de apagarlo, para proteger la fuente de luz y prolongar su tiempo de vida.

22.-Cada vez que el microscopio se deja de usar debe guardarse en forma adecuada: a)ubicación lejos del borde del mesón, b)lámpara apagada, c)cable de la lámpara desenchufado, d)platina limpia y ubicada al tope inferior, e)el objetivo de menor aumento (4X) en posición de trabajo, f)carro en posición central, g)condensador en su posición más alta, h)diafragma abierto.⁴⁷

3.5 LA CÁMARA DE NEUBAUER.

La cámara de conteo llamada también cámara de Neubauer o hemocitómetro, es una pieza de vidrio óptico especial de precisión. Se utiliza para contar células u otras partículas en suspensiones bajo el microscopio de campo claro. Las cámaras de conteo se utilizan principalmente para el análisis de sangre (conteo de leucocitos, eritrocitos y

trombocitos), aunque sirven también para el conteo de pulgadas en el licor, el conteo de bacterias y esporas del moho.

3.5.1 DESCRIPCIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LA CÁMARA DE RECuento.

Todas las cámaras de conteo están básicamente construidas bajo el mismo principio. Es una placa base rectangular y gruesa de vidrio óptico especial, en la figura 3-14, se indica el tercio medio en el que se encuentran las ranuras longitudinales (A), que transcurren en paralelo con respecto a los laterales cortos.

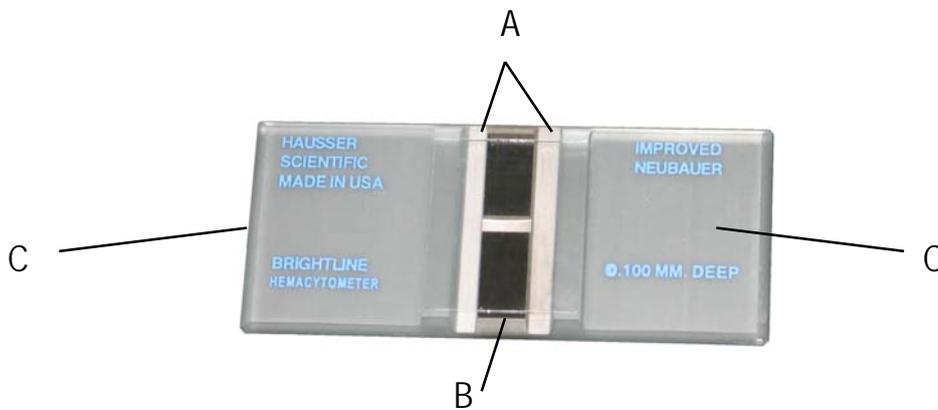


Fig.3-14. Cámara de Neubauer.

El puente central y los dos puentes exteriores están rectificadas planos y pulidos. La superficie del puente central es más profunda que los dos puentes exteriores. En el puente central (fondo de la cámara) es donde están grabadas las redes de conteo (B). Las dos superficies laterales más grandes están sin trabajar y sirven para la rotulación (C), en estas, generalmente están impresas las siguientes indicaciones:

- El nombre y la marca registrada del fabricante.
- La profundidad de la cámara en milímetros.
- La superficie del cuadrado más pequeño en mm^2 .

Cuando se coloca un cubreobjetos sobre los puentes exteriores, entre la cara inferior de este y el puente central de la cámara de conteo se produce una ranura capilar de 0.1mm (Figura 3-15).

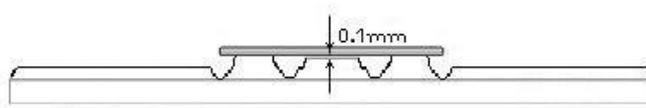


Fig.3-15. Cámara de Neubauer vista de costado. Se observa la profundidad de 0.1mm entre el cubreobjetos y el puente central.

Los diferentes sistemas de cámaras de conteo se diferencian por la ejecución de la red de conteo y la profundidad de la cámara. La red de conteo está compuesta de una división de red cuadrada que sólo queda visible con el microscopio (aproximadamente 100 aumentos).

División de redes:

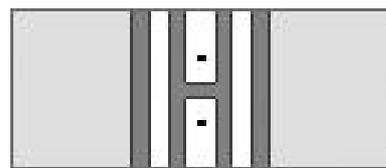
Existen dos tipos diferentes de división de redes, la normal y la de líneas claras:

En la división de redes normal, la red de conteo está directamente grabada en el vidrio. En la división de redes de líneas claras, primero se recubre con rodio el fondo de la cámara y luego se raya la red de conteo en la capa de rodio. Mediante el desplazamiento del contraste, debajo del microscopio es posible la inversión de color, de manera que la red de conteo se puede ver opcionalmente en líneas claras u oscuras. También existe (Figura 3-16 A y B) la ejecución simple en la que hay solo una red de conteo y la ejecución doble cuando se tienen dos redes de conteo.⁴²

Tipos de Ejecución Fig.3-16.



A. Simple-puente central sin dividir (una red de conteo) (Cortesía de MARIENFELD LABORATORY GLASSWARE).



B. Doble-puente central dividido (dos redes de conteo) (Cortesía de MARIENFELD LABORATORY GLASSWARE).

Fabricación.

A grandes rasgos, el mecanizado comprende varias operaciones parciales, seguidas de los correspondientes controles rigurosos.

El puente interior (fondo de la cámara) y los dos exteriores se rectifican y pulen. Gracias a este mecanizado se consiguen superficies especialmente planas y el puente interior se rebaja exactamente en la profundidad de la cámara deseada. Después de estas operaciones de trabajo, en la máquina divisora se graba con un diamante la red de conteo correspondiente. Finalmente se efectúa la fase de impresión y secado al horno. Todas las cámaras de conteo se someten a un riguroso control final, que es regido por las exigencias de la norma DIN (Deustcher Industrie Normen o Normas de la Industria Alemana) en vigor y las prescripciones de contraste.

Control de calidad.

Las desviaciones de límites según la norma DIN 12847 son las siguientes:

- Para la profundidad de la cámara en la zona de una red de conteo + 2 % del valor nominal.
- Para las distancias inferiores a 0.4 mm entre cualquier línea + 2 μ m.
- Para las distancias superiores a 0.4 mm entre cualquier línea + 0.5 % del valor nominal.
- Para los ángulos de la distribución de red + 1 grado.
- El ancho de las marcas no podrá ser superior a 5 μ m.

La tolerancia de planeidad, según la norma DIN 7184, parte 1, es la siguiente:

- Para el fondo de la cámara en la zona de una red de conteo es de 2 μ m.
- Para las superficies de apoyo en la zona de una red de conteo es de 2 μ m.
- Para las láminas cubreobjetos es de 3 μ m (según la norma DIN 58884).

Neubauer.

La superficie de los cuadrados es la siguiente:

Uno de los cuadrados grandes llamados también cuadros primarios: 1 mm² (L)

Uno de los cuadrados medianos (del cuadro principal central) llamados también cuadros secundarios: 0.04 mm²

Uno de los cuadrados pequeños: 0.0025 mm², presentes solo en el cuadrado grande central

La profundidad de la cámara es de 0.100 mm. La división de red de esta cámara muestra un cuadrado de 3 x 3 mm, con una separación entre dos líneas consecutivas de 0.25 mm, en los cuadrados grandes (Figura 3-17), así pues el área sombreada y

marcada como L corresponde a 1 mm^2 . La depresión central está hundida 0.1 mm respecto a la superficie, de forma que cuando se coloca en la división de red un cubreobjetos, éste dista de la superficie marcada 0.1 mm y el volumen comprendido entre la superficie L y el cubreobjetos es de 0.1 mm^3 , es decir $0.1 \mu\text{l}$. Los 4 cuadrados grandes ubicados en las esquinas (L) se utilizan para el conteo de los leucocitos.^{42,44}

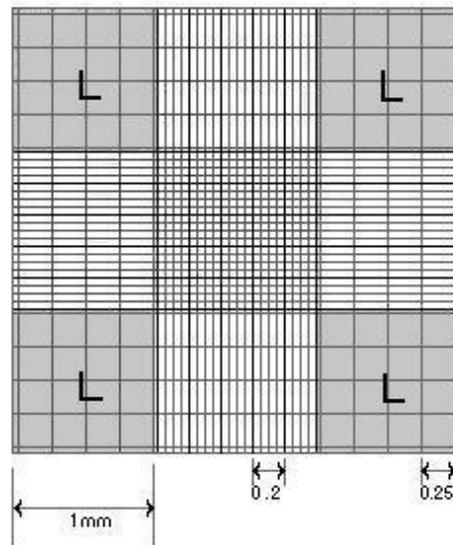


Fig.3-17. Red de conteo.

En la figura 3-18 se puede observar el aspecto de una de las regiones marcadas como L y que en el microscopio se ven como una cuadrícula de 16 cuadrados medianos de 0.25 mm de lado cada uno.⁴⁴

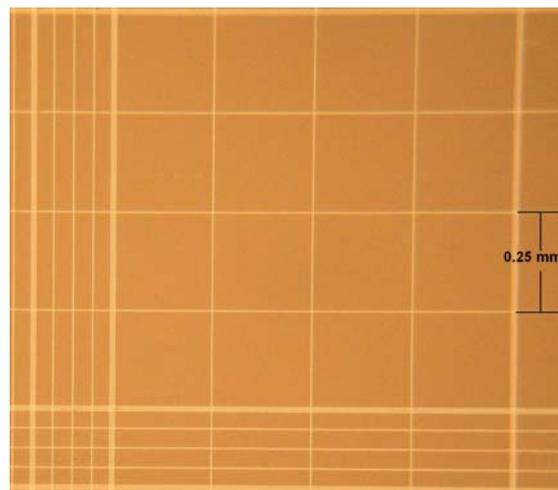


Fig.3-18. Cuadrado primario periférico superior derecho, uno de los 4 cuadros donde se cuentan leucocitos. (40X)

Esta imagen ha sido obtenida con el microscopio de campo claro utilizado a lo largo del presente trabajo.

El gran cuadrado en el centro llamado cuadro primario central está adicionalmente dividido en 5 cuadrados, en grupos de 5 con una longitud lateral de 0.2 mm cada uno (Figura 3-17), y una superficie de 0.04 mm². A su vez, los cuadrados de los grupos llamados cuadrados medianos o secundarios (R) ubicados en el cuadrado primario central, están subdivididos en 16 cuadrados pequeños de 0.0025 mm² cada uno. Cinco de estos cuadros secundarios son utilizados en el conteo de eritrocitos (Figura 3-19).⁴²

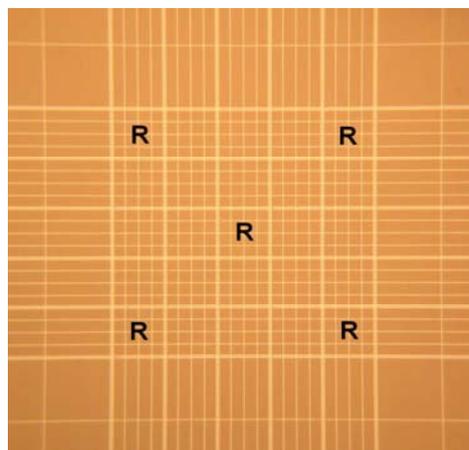


Fig.3-19. Cuadrados secundarios utilizados para conteo de eritrocitos, marcados con R. (40X)

Merece especial atención el hecho de que la cámara muestre triples líneas límite por todos los lados (Figura 3-20), de las cuales la línea central ha de considerarse la línea de medida propiamente dicha. Esto es importante para valorar si las células que están en la zona límite, han de ser o no contadas también.

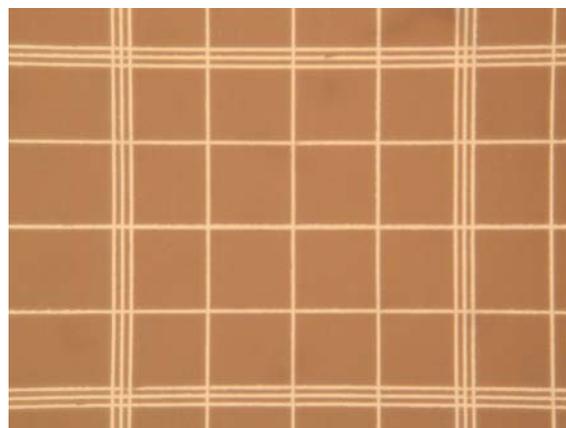
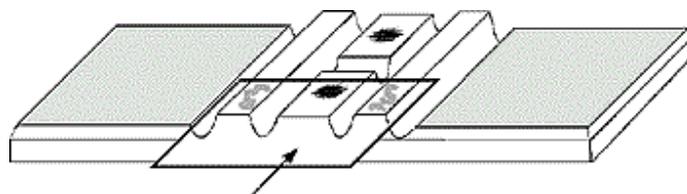


Fig.3-20 Cuadrado secundario en el que se muestran las triples líneas límite.

3.5.2 FUNDAMENTO DE USO DEL HEMOCITÓMETRO.

Llenado de una cámara de conteo.

Desplazamiento del cubreobjetos: Los puentes exteriores se humedecen con agua destilada y luego se coloca el cubreobjetos a suave presión desde el frente sobre la cámara de conteo (teniendo cuidado de no romper el cubreobjetos) (Figura 3-21).⁴² La formación de líneas de interferencia (anillos de Newton) entre los puentes exteriores y el cubreobjetos indica que este ha sido correctamente colocado.



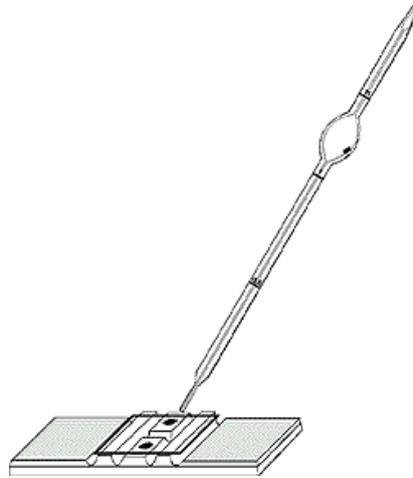
*Fig.3-21 Desplazamiento del cubreobjetos sobre la cámara de Neubauer.
(Cortesía de MARIENFELD LABORATORY GLASSWARE).*

Alimentación.

Una vez con la mezcla ya preparada en la pipeta, quitarla del mezclador y eliminar las primeras 3 a 4 gotas, aproximadamente 0.2 ml, para eliminar el diluyente que no se mezcló con la muestra.

Limpiar, secando desde el exterior la pipeta y luego mantenerla inclinada en un ángulo aproximado de 45° hasta que se haya formado una pequeña gota en la punta de la misma.

Esta gota se sitúa en el punto entre el cubreobjetos y la cámara de conteo (Figura 3-22) en ocasiones en este sitio hay una muesca en forma de v. Se llena la hendidura entre el cubreobjetos y el fondo de la cámara (puente central) por capilaridad y con un flujo constante de líquido para obtener una distribución regular, antes de que la solución de sangre pueda dispersarse en los bordes de la cámara, deberá haberse retirado de nuevo la punta de la pipeta. Si son visibles las burbujas de aire o si el líquido se dispersa sobre los bordes en las ranuras, deberá limpiarse la cámara y alimentarse de nuevo, finalmente una vez que la cámara esta cargada debe cuidarse de no mover el cubreobjetos.^{23,42}



*Fig.3-22 Llenado de la cámara de Neubauer.
(Cortesía de MARIENFELD LABORATORY GLASSWARE).*

4.0 MATERIALES Y MÉTODOS.

Dada la importancia que tiene la identificación de las diferentes células de la sangre, así como su distribución, con plena certeza de lo observado al microscopio, resulta de gran ayuda el tener un apoyo visual con imágenes representativas de las características celulares observadas comúnmente en una persona en condiciones normales de salud, es por eso que este trabajo pretende brindar por medio de fotomicrografías este apoyo.

Para la digitalización de las imágenes microscópicas obtenidas en este trabajo se utilizó el microscopio óptico de campo claro marca Carl Zeiss, adaptado a una cámara digital marca Canon modelo Power Shot G5 y un programa de edición de imágenes Canon Utilities ZoomBrowser EX 4.1.

Obteniendo muestras de sangre periférica de personas sanas de las cuales se realizaron extensiones sanguíneas tanto para la tinción de Wright como para la tinción supravital, y realizando el procedimiento de medición correspondiente en cámara de Neubauer para leucocitos, eritrocitos y plaquetas con el fin de obtener las fotomicrografías correspondientes.

4.1 MATERIALES Y REACTIVOS.

- Microscopio de campo claro.
- Cámara fotográfica con adaptador para microscopio.
- Computadora.
- Ligadura.
- Jeringas de 3 ml.
- Gradilla de alambre.
- Algodón.
- Tubos de ensayo de 12 x 75 mm.
- Cámara de Neubauer.
- Pipetas de mezclado para leucocitos y eritrocitos.
- Boquillas.
- Agitador de pipetas de mezclado.
- Portaobjetos.
- Cubreobjetos.
- Charola de tinción.
- Estuche para laminillas
- EDTA al 5%.
- Alcohol etílico al 70%.
- Diluyente Turck.
- Diluyente Hayem.
- Oxalato de amonio al 1%.
- Azul de cresil brillante.
- Colorante Wright.
- Buffer de fosfatos pH 6.4-6.5
- Resina.
- Aceite de inmersión.

4.2 CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS.

4.2.1 HEMATÍES.

Fundamento.

El recuento de GR, se basa en diluir una muestra de sangre con anticoagulante 200 veces con un líquido isotónico que impide la lisis y la formación de grumos para después contar los hematíes en la cámara. Los métodos manuales se realizan en raras ocasiones, debido a la inexactitud del recuento.

Técnica de conteo.

La pipeta de Thoma para eritrocitos presenta una dilatación (bulbo) aproximadamente en la tercera parte de la longitud total del tubo capilar, el tallo o

extremo más largo de la pipeta esta dividido en 10 partes iguales; después del bulbo, en la parte mas corta de la pipeta, se encuentra la señal 101 (Figura 4-1), cuando se llena hasta esta el bulbo, contiene 100 veces el volumen correspondiente a las divisiones de la parte más larga. Se aspira sangre hasta la señal 0.5 exactamente y se termina de llenar con el líquido de dilución hasta la marca 101 exactamente. Al mezclarla, la sangre del bulbo esta diluida 1:200.



Fig.4-1. Pipeta para mezclado de eritrocitos (perla roja).

Con la cámara lista para cargarse, es decir con el cubreobjetos colocado, se expulsan 3 a 4 gotas para descartar el líquido de dilución del tallo capilar de la pipeta y se alimenta la cámara como antes se mencionó.

Con un objetivo seco débil (10X), se observa la cuadrícula de la cámara para asegurarse de que la distribución de las células es homogénea. Se pone ahora el objetivo seco fuerte (40X) reduciendo adecuadamente la iluminación, y se procede a contar las células en los 80 cuadrados pequeños o 5 cuadrados secundarios, el central y las 4 esquinas del gran cuadrado central.^{14,23}

4.2.2 LEUCOCITOS.

Fundamento.

La pipeta para leucocitos es semejante a la utilizada para eritrocitos, pero con un bulbo menor y graduaciones diferentes. La solución hipotónica de ácido acético (ácido débil) destruye los eritrocitos y el cristal violeta permite observar mejor a los leucocitos por teñirlos ligeramente, aunque puede prescindirse de este.

Técnica de cuantificación.

El tallo de la pipeta se divide en 10 partes iguales con señales de 0.5 y 1; en el tallo corto por encima del bulbo esta la señal 11 (Figura 4-2). Cuando se aspira sangre

hasta la señal 0.5 y el líquido de dilución hasta 11 la muestra de sangre del bulbo esta diluida 20 veces.

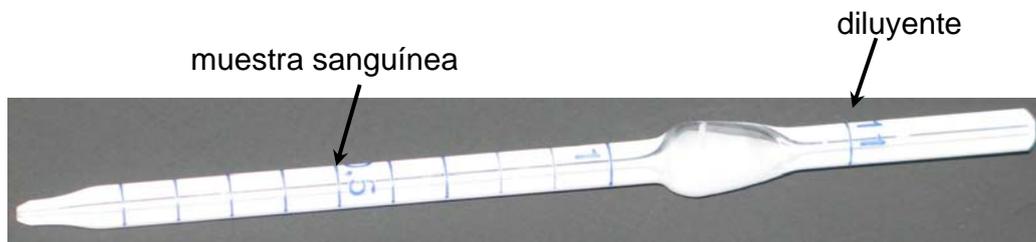


Fig.4-2. Pipeta de Thoma para mezclado de leucocitos (perla blanca).

El diluyente utilizado en este caso es una solución acuosa al 2 o 3% de ácido acético glacial, con una cantidad de cristal violeta suficiente para dar un color azul violeta pálido. Se mezcla y se dejar reposar la pipeta tres a diez minutos para asegurar la lisis de los eritrocitos después de este tiempo se alimenta la cámara como ya se explicó anteriormente, ya con la muestra en la cámara esperar un par de minutos para que las células sedimenten. Se observa en objetivo de bajo aumento (10X), debe percatarse de que la distribución de los leucocitos sea homogénea, después se cuentan los leucocitos en los cuatro cuadrados grandes periféricos. Si en la muestra estuvieran presentes eritroblastos, estos no se lisan por acción del diluyente, siendo posible que se confundan con leucocitos. Si se detectan 5 o mas eritrocitos nucleados por cada 100 leucocitos en el conteo diferencial, el recuento debe corregirse; esto se hace multiplicando el recuento leucocitario no corregido por 100, entre el número de eritrocitos nucleados entre 100 leucocitos, más 100 y se reporta como conteo leucocitario corregido.^{14,23}

$$\frac{\text{Recuento leucocitario no corregido X 100}}{\text{No. De eritrocitos nucleados / 100 + 100}} = \text{RLC}$$

4.2.3 PLAQUETAS.

Fundamento.

En el recuento de plaquetas, una muestra de sangre entera con anticoagulante EDTA, se diluye 100 veces con oxalato de amonio al 1% que lisa los eritrocitos no

nucleados, para después contarlas en la cámara de Neubauer, de preferencia en un microscopio de contraste de fases.²³

Técnica de cuantificación.

Para este método se utiliza la pipeta de Thoma para eritrocitos, se aspira sangre hasta la marca de 1 y finalmente líquido de dilución hasta la señal 101, dando como resultado una dilución de 1:100, esta dilución es la mas comúnmente utilizada, aunque de acuerdo a la cantidad de plaquetas observadas, se pueden realizar diferentes diluciones; si se cuentan menos de 50 plaquetas, es decir en casos de plaquetopenia, se recomienda repetir el procedimiento con una dilución 1:20 ya sea con la pipeta de Thoma de leucocitos o en tubo, si por el contrario el número de plaquetas esta por encima del límite superior normal, la dilución sería 1:200, solo debe incluirse el factor de dilución apropiado en el cálculo de los resultados.^{23,25,39}

En el caso del método con la pipeta de Thoma, primero se mezcla 20 a 30 seg. a mano posteriormente se pone sobre el agitador durante 2 o 3 minutos, después de desechar las 3 primeras gotas se llenan los dos lados de la cámara de recuento y se deja sedimentar 20 minutos, en una caja petri cuyo fondo tiene un disco de papel filtro húmedo para evitar que la muestra se seque.

Se observan con el objetivo de 40X, a menudo se ven “fantasmas” de eritrocitos en el fondo, es muy recomendable realizar el conteo de plaquetas en un microscopio de contraste de fases. Se cuenta toda la superficie del cuadrado grande central, es decir los 25 cuadrados medianos, debe contarse ambos lados del hemocitómetro y se toma el promedio de estos.

El cálculo es igual que para las otras dos estirpes celulares pero el factor de dilución es 100, por lo tanto el número de plaquetas se multiplica por 1000 para dar la cifra por mm^3 de sangre, este conteo puede corroborarse realizando una estimación en el extendido de sangre periférica debiendo observarse de 3 a 10 plaquetas aproximadamente por 100 glóbulos rojos o varias plaquetas y grupos ocasionales por campo.^{14,23,25,39}

4.2.4 GENERALIDADES DE LA TÉCNICA DE CUANTIFICACIÓN.

El conteo presupone un conocimiento exacto de las líneas límite de las cámaras utilizadas. Éstas se pueden ver en la figura 4-3, en la que se esquematiza un cuadrado mediano (secundario) de 0.04 mm², constituido a su vez por 16 cuadrados pequeños que equivale cada uno a 0.0025 mm².

Para que las células, que están en o cerca de las líneas de limitación, se consideren en el conteo y no se cuenten dos veces, hay que apegarse a determinadas reglas, se cuentan todas las células dentro de una zona de medición definida, también se cuentan las células (marcadas en negro), a pesar de que ya aparenten estar fuera de la zona de medición, mientras se apoyen o toquen la línea central de los dos laterales izquierdo y superior, pero respecto a los laterales derecho e inferior se cuentan únicamente las células que estén completamente dentro de la zona de medición y no se cuentan las células (marcadas en gris) de estos laterales una vez que tocan la línea intermedia como se ve en la figura 4-3, debiendo considerarse en este ejemplo particular 18 células.⁴²

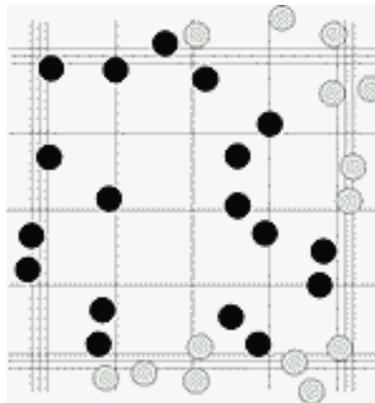


Fig.4-3. Cuadrado secundario donde se indica que células deben y cuales no deben contarse. (Cortesía de MARIENFELD LABORATORY GLASSWARE).

Esto es válido para la operación de conteo propiamente dicha, que debe efectuarse en forma de meandro, el recuento se inicia en el ángulo superior izquierdo en dirección de la flecha, indicado en la figura 4-4 en la que se presenta un cuadrado primario periférico.

Cuidados en el recuento.

a) En todos los conteos de células en cámara, el diafragma del condensador en el microscopio deberá estar cerrado en gran parte.

b) Es muy conveniente realizar la cuantificación por duplicado utilizando para esto las dos redes de conteo que tiene la cámara. Teniendo en cuenta que la muestra no se esté secando, esto puede evitarse llenando la red inferior justo antes del recuento y este se realice después del tiempo de sedimentación.

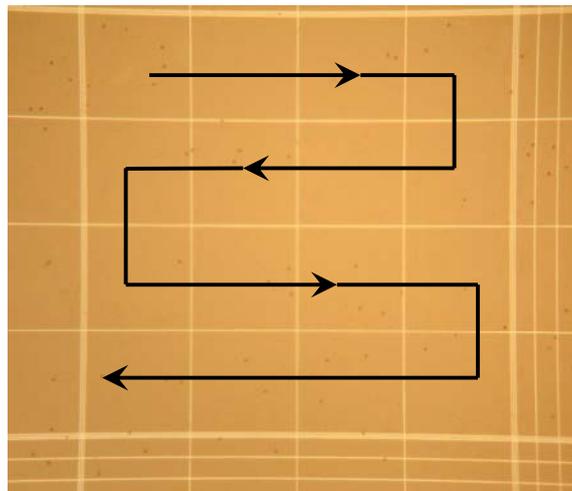


Fig.4-4. Cuadrado primario periférico donde se ejemplifica el conteo en forma de meandro.

c) La diferencia entre el recuento mas bajo y el mas alto en los ocho cuadrados grandes (cuando se hace por duplicado contando las dos redes) no debe superar las 15 células, lo mismo ocurre en caso de los eritrocitos al estar contando en los cuadrados medianos.

d) La diferencia entre el recuento de ambas redes de conteo no podrá ser superior a 10 células.

e) El valor medio de los conteos se aplica luego en una fórmula de cálculo o se multiplica por el factor correspondiente, el cual es obtenido sencillamente realizando las operaciones matemáticas que involucran los valores constantes como son: el volumen y la dilución que se maneje en cada caso.^{23,42}

Cálculos realizados para reportar los resultados de la cuantificación

Fórmula:

$$\frac{\text{Número de células}}{\text{superficie contada (mm}^2\text{) x profundidad de la cámara (mm) x dilución}} = \text{células / } \mu\text{L sangre}$$

Ejemplo:

a) Leucocitos.

1. Células contadas 161 leucocitos.
2. Superficie contada en 4 cuadrados principales periféricos(= 4 x 1 mm²) = 4 mm²
3. Profundidad de la cámara 0.1 mm
4. Dilución 1:20

$$\frac{161}{4 \text{ mm}^2 \times 0.1 \text{ mm} \times 1/20} = \frac{161 \times 20}{4 \times 0.1 \times 1 \mu\text{L}} = 8050 \text{ leucocitos / } \mu\text{L sangre}$$

El factor para leucocitos es 50, así 161 x 50 = 8050 leucocitos / μL de sangre.

$$\frac{20}{4 \times 0.1 \times 1} = 50$$

b) Eritrocitos.

1. Células contadas 507 eritrocitos.
2. Superficie contada 5 cuadrados secundarios (= 5 x 0.04 mm²) = 0.2 mm²
3. Profundidad de la cámara 0.1 mm.
4. Dilución 1:200

$$\frac{507}{0.2 \text{ mm}^2 \times 0.1 \text{ mm} \times 1/200} = \frac{507 \times 200}{0.2 \times 0.1 \times 1 \mu\text{L}} = 5.07 \times 10^6 \text{ erit/} \mu\text{L sangre}$$

El factor para eritrocitos es 10,000, así 507 x 10,000 = 5.07 x 10⁶ eritrocitos / μL de sangre.

$$\frac{200}{0.2 \times 0.1 \times 1} = 10,000$$

c) Plaquetas.

1. Células contadas 200 plaquetas.
2. Superficie contada 25 cuadrados secundarios ($= 25 \times 0.04 \text{ mm}^2$) = 1 mm^2
3. Profundidad de la cámara 0.1 mm.
4. Dilución 1:100

$$\frac{200}{1 \text{ mm}^2 \times 0.1 \text{ mm} \times 1/100} = \frac{200 \times 100}{1 \times 0.1 \times 1\mu\text{L}} = 200,000 \text{ plaquetas / } \mu\text{L sangre}$$

El factor para plaquetas es 1,000, así $200 \times 1,000 = 200,000$ plaquetas/ μL de sangre

$$\frac{100}{1 \times 0.1 \times 1\mu\text{L}} = 1000$$

Limpieza del material.

Inmediatamente después del conteo realizado, se quita el cubreobjetos y este, así como la cámara de conteo se limpian con agua o en caso necesario con alcohol al 95%.

A continuación, la cámara se seca por completo al aire o con un paño blando y limpio o antes se lava con acetona, de vez en cuando se puede lavar todo en ácido sulfúrico o nítrico al 50% durante 15 min. Enjuagándolo después con agua y secándolo bien al final.

También es importante que se haga una limpieza de las pipetas, esta se puede hacer pasando a través de ellas líquido en el siguiente orden: agua, alcohol al 95%, éter y secarlas con aire o bien; agua, acetona y dejar secar el aire.^{13,14,25,42}

Ventajas y desventajas de la utilización de la cámara de Neubauer.

En la práctica llega a haber errores al utilizar la cámara de Neubauer, debido a que:

- El cubreobjetos no está puesto correctamente (no hay anillos de interferencia).
- La cámara de conteo no está limpia.
- Hay burbujas de aire en el llenado de la cámara.
- La cámara está sobrellenada.

-El tiempo de sedimentación fue demasiado corto o demasiado prolongado.

Sin embargo sigue teniendo ventajas frente al uso de contadores eléctricos.

- En laboratorios menores no vale la pena la compra de aparatos electrónicos costosos, principalmente por el número de muestras que se manejan.
- Las cámaras de conteo se usan también para el recuento de células de licor o de efusiones, bacterias, conteo de huevos de parásitos y esporas del moho, entre otros.
- En los contadores eléctricos con frecuencia se distinguen los tipos de células por tamaño, resultando errores a causa de partículas de polvo u otros contaminantes.
- Para el conteo de pocos trombocitos los instrumentos eléctricos son menos exactos que las cámaras de conteo.

Los contadores eléctricos tienen ventajas como:

- Su uso en laboratorios mayores (gastos altos de inversión).
- La evaluación es rápida y el error estadístico menor con el recuento de muchas partículas.^{23,42}

4.3 TINCIONES DE SANGRE.

4.3.1 REALIZACIÓN DE LAS EXTENSIONES DE SANGRE PERIFÉRICA (FROTIS).

La extensión sanguínea es de gran importancia en algunas enfermedades hematológicas, ya que su diagnóstico puede realizarse o sospecharse sólo con observar la morfología de las células de la sangre.

Uno de los métodos más empleados para la realización del frotis sanguíneo es el método de los dos portaobjetos. Consiste en la extensión de una gota de sangre sobre un portaobjetos mediante otro portaobjetos. La técnica es la siguiente:

- 1.- Depositar una pequeña gota de sangre en el extremo de un portaobjetos.
- 2.- Con el borde de otro portaobjetos a 45 grados, tocar la gota, esperar a que la sangre se distribuya por capilaridad y después deslizar suavemente un portaobjetos sobre el otro en sentido longitudinal hasta que la gota quede bien extendida sobre la superficie del primer portaobjetos (Figura 4-5).
- 3.- Dejar secar el frotis.

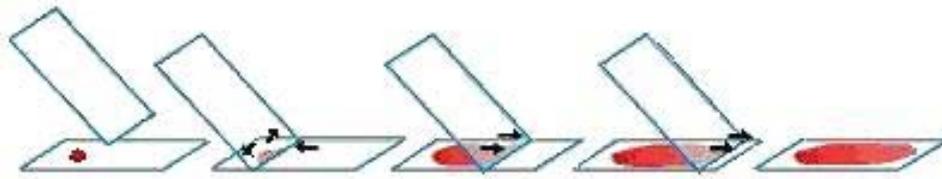


Fig.4-5. Extensión de un frotis sanguíneo método de dos portaobjetos.

El frotis presenta tres zonas diferenciadas (Figura 4-6), la zona en que inicialmente se depositó la gota llamada “cabeza”, es excesivamente gruesa y no puede ser valorada adecuadamente, a continuación se extiende el “cuerpo” de la extensión, que corresponde a la región intermedia del frotis y en ella existe un reparto equilibrado de las células; es la zona ideal para la observación microscópica y por último, al final de la extensión, se encuentran las “barbas” o la “cola”, es una zona fina dónde las células adoptan una disposición de cordones.



Fig.4-6. Partes de un frotis sanguíneo.

Otros métodos que se pueden emplear para realizar la extensión son: el de los dos cubreobjetos o mediante dispositivos automatizados.^{3,23}

El método de dos cubre objetos permite una distribución mas homogénea de las células y a menudo produce resultados excelentes, sin embargo, se prefieren los porta objetos que: 1) son mas fáciles de manipular; 2) se rompen menos; 3) se pueden rotular mas fácilmente y 4) no requieren montaje y pueden archivar de forma automática.

La técnica de preparación de dos cubreobjetos es como sigue:

Se toma en cada mano un cubreobjetos de vidrio cuadrado, sin grasa limpio y seco sujetándolo por los bordes.

El primero se coloca horizontalmente por el centro sobre una gota de sangre que esta saliendo de una punción cutánea se retira cuando se le ha adherido una gota de

sangre de unos 2 mm inmediatamente se pone diagonalmente el segundo cubreobjetos sobre el primero.

La sangre se extiende de inmediato como película delgada y uniforme, en seguida antes de que se extienda por completo los cubreobjetos sujetos horizontalmente por las esquinas se separan por deslizamiento en plano horizontal, se dejan secar y se tiñen con la película de sangre hacia abajo sobre un vidrio de reloj, o puede ser con la sangre hacia arriba sobre un tapón de goma y de un modo semejante a los portaobjetos. Al finalizar la tinción y ya seca se montan con algún adhesivo de montaje sobre portaobjetos limpios poniendo la sangre hacia abajo.

Aun en los mejores frotis, a causa de la diferencia de tamaño, densidad, etcétera los leucocitos muestran una distribución particular.

Los grandes monocitos y los polimorfonucleares predominan en los bordes y al final de la extensión, mientras que los linfocitos más pequeños, se distribuyen en forma mas uniforme, y debido a la localización preferencial de los demás leucocitos, parecen predominar en la parte media. Esta distribución desigual no se presenta en los frotis sobre cubreobjetos.¹⁴

4.3.2 TINCIONES DE ROMANOWSKY.

Para poder diferenciar los componentes de un corte histológico o extendido sanguíneo es necesario teñirlos.

Witt en 1876, fue el primero que propuso la teoría de los cromógenos y auxócromos en la cual se relaciona la estructura química con el color producido.

Esta teoría sostiene que todos los cromógenos, es decir todos los compuestos orgánicos conformados principalmente por un esqueleto de anillos bencénicos, contienen dentro de su estructura química la capacidad de dar origen a una sustancia colorante produciendo una coloración dentro de un rango del espectro determinado por su relación con la longitud de onda que modifique. Aunque en principio el mismo compuesto cromógeno sea incoloro, estos compuestos se constituyen entre otras cosas por uno o varios grupos cromóforos, estos son grupos radicales, no saturados, que al estar presentes en una sustancia cromógena provocan un color determinado.

Pero para poder ser adicionado el binomio cromógeno-cromóforo, al tejido como tinte se requiere de que actúe un auxócromo o grupo radical donador de electrones, con la capacidad de unir el colorante con el tejido por medio de la salificación del compuesto original, desarrollando o aumentando el color del cromóforo y por lo tanto del cromógeno.

Hewitt y Mitchell, mediante sus observaciones con base en trabajos y estudios propios, observaron que la oscilación de la frecuencia principal, es menor y por lo tanto, el color es mas intenso cuando la cadena conjugada o adicionada es mayor.

Sircar, apoyando y generalizando esta regla, concluyó que la intensidad del color es directamente proporcional a la longitud de la cadena conjugada o adicionada en la parte de la molécula que tenga el grupo auxócromo.

En 1913 Adams y Rosenstein, sugirieron que el cristal violeta es responsable de la oscilación de un electrón, esta idea es retomada por Bury en 1935, aplicándola a varios colorantes, reduciendo que existen estructuras de resonancia extrema, asegurando que en los colorantes básicos la resonancia esta asociada con el catión mientras que en los ácidos se relaciona con el anión. Tratando de explicar así, que la función de un auxócromo es introducir la posibilidad de la resonancia en la molécula de un compuesto cromógeno.

En 1923 Stieglitz al publicar su teoría de la oxidación crea un puente entre las viejas teorías y el concepto de resonancia del color, el menciona que si los colorantes pierden el color por reducción o por oxidación deben existir en un estado intermedio de oxido-reducción, por lo que si un cromógeno contiene un cromóforo y un auxócromo como grupos oxidantes y reductores respectivamente, se tiene la presencia de dos grupos donadores de electrones dentro de la molécula, pero como una transferencia intramolecular de electrones y no hacia el exterior.⁹

Los colorantes empleados en ciencias biológicas, se han clasificado arbitrariamente de muchas formas. Una de ellas por su origen, es la mas común; compuestos naturales y sintéticos. A excepción de algunos compuestos inorgánicos usados en procesos especiales todos los colorantes empleados en ciencias biológicas son químicos orgánicos sintéticos. Los colorantes sintéticos se clasifican de acuerdo a sus características químicas estructurales y por el método de aplicación. El primero es

el grupo de colorantes directos, los que al aplicarse en solución directamente producen colores visibles en la muestra. En el segundo se encuentran los colorantes indirectos, los que se aplican después de que la muestra ha sido tratada con algún mordente, de este modo el cromógeno se puede mantener en la muestra. El tercer grupo son los colorantes que requieren de revelado, son compuestos parecidos a los colorantes directos pero requieren de una reacción química para modificar su estructura, esto es, el grupo radical auxócromo debe ser modificado para poder producir un color visible. El último grupo es el de los colorantes dispersos o de dispersión, los que se caracterizan por ser suspensiones coloidales con partículas muy pequeñas, en soluciones alcalinas.

Otra clasificación se basa en el grado de acidez de un compuesto, ya sea en estado sólido o en solución. Existen colorantes ácidos, estos contienen grupos radicales que por sus características químicas confieren un mayor o menor grado de acidez a la molécula del compuesto en total, por ejemplo: grupos sulfonio y carboxil. Los colorantes básicos contienen grupos amino, que con la adición de un ácido orgánico forman una sal. Y los colorantes neutros e indiferentes, que por tener la misma cantidad de grupos radicales ácidos y básicos se mantienen en un rango de pH cercano a 7.⁹

En los laboratorios hematológicos se emplean colorantes basados en la tinción de Romanowsky, haciendo una combinación de colorantes ácidos (eosina) y colorantes básicos (tiacinas). Las tiacinas son el azul de metileno y sus derivados obtenidos por desmetilación oxidativa (colorantes tipo azur).^{25,48}

Cuando se utilizan los colorantes hematológicos habituales, la fijación se produce durante la aplicación del colorante concentrado por el alcohol metílico que se utiliza como solvente. Cuando se prefiere trabajar con un colorante acuoso o diluido, por ejemplo el Giemsa los frotis fijados al aire deben ser fijados primero cubriéndolos durante 3 a 5 minutos con alcohol etílico o metílico absoluto.¹⁴

Fundamento.

Estas coloraciones se consideran policromáticas, por que contienen eosina y azul de metileno, el metanol presente en estas tinciones fija las células al portaobjetos. El teñido real de las células o de los componentes celulares no tiene lugar hasta que se agrega el buffer, el azul de metileno oxidado y la eosina forman un complejo tiacina-

eosinato, que tiñe los componentes neutros.

El fundamento de la coloración de los frotis es que los colorantes ácidos se unen con los componentes básicos de la célula (Hb y gránulos eosinófilos). Inversamente, los colorantes básicos son atraídos por los compuestos ácidos de la célula y se combinan con ellos (ácidos nucleicos y nucleoproteínas del núcleo).^{14,23}

Con la tinción de los elementos formes de la sangre se pueden distinguir los siguientes aspectos morfológicos de las células:

- 1.- La forma, dimensión y contorno de los hematíes (de color rosa pálido), leucocitos (células nucleadas) y plaquetas (pequeñas células anucleadas granulares).
- 2.- El núcleo: de color púrpura.
- 3.- El citoplasma: de color azulado o gris en los linfocitos y monocitos.
- 4.- Granulaciones: mezcla de colores pardos (neutrófilos), anaranjadas (eosinófilos) y azul oscuro (basófilos).

Aunque cada laboratorio emplea su técnica, los colorantes o métodos de tinción más empleados son: tinción de Giemsa, tinción de May-Grünwald-Giemsa y tinción de Wright, siendo esta última la utilizada en el presente trabajo.

El colorante de Wright, se utiliza ampliamente, sobre todo en América. En su preparación, la policromía del azul de metileno se obtiene por calentamiento con bicarbonato de sodio. Puede comprarse en solución lista para el uso o en forma de polvo. El fundamento es el mismo que en cualquier tinción de Romanowsky.

Los colorantes, en combinación adecuada, actúan de dos formas, por tinción diferencial, permiten reconocer algunos componentes tisulares debido a que el color se imparte en distinta medida, según la afinidad. Las sustancias **basófilas** reciben este nombre porque muestran afinidad por colorantes básicos o alcalinos. Mientras que las **acidófilas** lo hacen por colorantes ácidos.

ÁCIDOS	BÁSICOS
Fracción Cromógena (-), aniónico. para teñir sustancias acidófilas (+).	Fracción Cromógena (+), catiónico para teñir sustancias basófilas (-).
Eosina, Orange g, Fucsina ácida	Azul de metileno, Azul de toluidina, Hematoxilina

Tabla 4.1. Colorantes ácidos y básicos.⁴¹

En un colorante básico la fracción cromógena posee carga positiva (el catión del colorante imparte color). También llamado colorante catiónico.

Los colorantes ácidos y básicos se encuentran como sales; y serán ácidos o básicos según si la fracción cromógena (generadora de color) posee carga positiva o negativa.

En un colorante ácido la fracción cromógena posee carga negativa (el anión del colorante imparte color). También llamado colorante aniónico.

Durante la coloración las fracciones cromógenas se unen a componentes tisulares de carga contraria (tabla 4.1.).

COMPONENTE CELULAR	CONTENIDO / CARACTERÍSTICA	COLORANTE QUE FIJA	NOMBRE QUE RECIBE	COLOR OBSERVADO
Cromatina	ADN contiene fosfato	Azur II (azul de metileno).	Metacromático (azurófilo)	rosa-violeta
Ribosomas	ARN posee fosfato	Azul de metileno	Basófilo	azul-celeste
Proteínas citoplasmáticas (Hb)	Proteína catiónica	Eosina	Acidófila o eosinófila	rojizo-grisáceo
Gránulos primarios (inespecíficos)	Proteínas: glucosamina sulfatada	Azur II	Azurófilo	rosa-violeta
Gránulos secundarios neutrófilos	Proteínas catiónicas y aniónicas (anfótero)	Eosina y azul de metileno	Neutrófilo	pardo
Gránulos eosinófilos	Proteínas catiónicas	Eosina	Acidófilo (eosinófilo)	naranja.
Gránulos basófilos	Heparina (mucopolisacárido ácido)	Azul de metileno	Metacromático (mal llamado basófilo)	púrpura oscuro a negro

Tabla.4.2. Características ácido-base de algunos componentes celulares y como se comportan frente a los colorantes).

Para saber donde se va a unir un colorante es necesario identificar sus características ácido-base.^{32,41}

Una coloración es metacromática, cuando tiñe selectivamente determinadas estructuras de otro color distinto al colorante. Esto se produce con colorantes derivados de las tiacinas (poseen un grupo auxocromo básico); como por ejemplo el azul de metileno, azul de toluidina y la tionina.

El color de las tiacinas depende del grado de polimerización del colorante. Una solución diluida de un colorante tiacínico es azul, debido a que se encuentra como monómero. Si la solución es concentrada, el colorante se agrega y forma polímeros por lo que el color vira a rojo.

Así un colorante tiacínico puede presentar distinto color de acuerdo con el estado de agregación de las moléculas y es precisamente este estado de agregación, que puede ser modificado por los componentes tisulares, el que produce la metacromasia.

El azul de metileno se caracteriza porque al encontrarse:

- diluido esta presente como monómero, dando una coloración celeste.
- intermedio esta presente como dímero, dando una coloración azul-violácea.
- concentrado esta presente como polímero, dando una coloración rojo violácea.

Los componentes tisulares capaces de ser teñidos metacromáticamente poseen polianiones de alto peso molecular y agregan las moléculas del colorante en consecuencia el colorante vira. Estos compuestos son en su mayor parte los muy ácidos glucosaminoglucanos sulfatados y la heparina polianiónica.¹¹

Técnica de la tinción de Wright.

- 1) El frotis sanguíneo realizado con el método de dos portaobjetos debe ser secado al aire tan rápido como se pueda, para evitar los artefactos que produce el secado lento, incluso es conveniente utilizar un pequeño ventilador. No debe soplar sobre él ya que la humedad de la respiración hace que los eritrocitos adquieran un aspecto "apolillado", con centros huecos.
- 2) Se colocan los portaobjetos con la sangre hacia arriba, sobre una gradilla de tinción (dos varillas de vidrio paralelas separadas por 5 cm).
- 3) La extensión se cubre con el colorante sin diluir, que se deja actuar por lo menos 1 a 3 minutos, para fijar las células al vidrio (el tiempo de permanencia es variable

dependiendo de la maduración del colorante).

4) Se diluye el colorante sobre el frotis con un amortiguador de fosfatos (pH 6.4 a 6.5), hasta que aparezca una escarcha metálica, con el cuidado de no derramarlo.

5) Se deja actuar durante unos 5 minutos, pero es muy importante confirmar la presencia de la escarcha metálica y también en este paso el tiempo puede ser variable.

6) Sin mover el portaobjetos se lava con agua destilada hasta que las partes mas delgadas del frotis tengan un color rosado a púrpura, puede lavarse con agua corriente a chorro suave y limpiar la cara posterior del portaobjetos si es necesario.

7) Se coloca el frotis de manera vertical en una gradilla para secarlo al aire y se observa al microscopio de campo claro.^{14,18,23}

4.3.3 CRITERIOS DE EVALUACIÓN Y ANÁLISIS DE UN FROTIS SANGUÍNEO CON TINCIÓN DE WRIGHT.

Las extensiones una vez teñidas y secadas pueden ser observadas al microscopio óptico. Inicialmente se debe observar la extensión con el objetivo de aumento bajo (10X), aumento total (100X) con este se pueden visualizar áreas suficientemente extensas para tener una idea global del aspecto del frotis, color y distribución de las células, observando rápidamente los bordes laterales y la parte delgada del frotis. Una cantidad desproporcionada de células grandes, como monocitos, vista en cualquiera de los bordes puede indicar un extendido mal hecho y debe repetirse, se debe notar la presencia de filamentos de fibrina si existen y rechazar la muestra en este caso, observar la distribución de eritrocitos o incluso ver que no estén aglutinados, por último debe revisarse si existe alguna célula anormal grande como blastos, linfocitos reactivos o incluso parásitos inesperados.

El paso siguiente es usar el objetivo seco fuerte (40X), aumento total (400X), con este es fácil seleccionar la zona correcta del extendido en el que se debe iniciar el recuento diferencial y evaluar la morfología celular. Se puede calcular el número de leucocitos aproximado, solo como control de calidad interno del laboratorio, el número promedio de leucocitos por campo (viendo de 8 a 10 campos) a gran aumento se multiplica por 2000 para obtener una aproximación adecuada del recuento leucocitario.

La correcta apreciación de los detalles morfológicos de las células de la sangre se realiza con el objetivo de inmersión en aceite (100X), aumento total de (1000X). El campo de visualización es más reducido, pero se ven mucho mejor los detalles celulares, de plaquetas, de eritrocitos y de leucocitos, así como la presencia de granulaciones normales o tóxicas, vacuolas, nucleación o cualquier indicio de anomalía si es que existe, y esto debe ser reportado.^{18,23}

La lectura del diferencial se hace al contar y clasificar 100 células leucocitarias, y se informa como porcentajes de leucocitos.

Una vez seleccionada la zona correcta, la forma de observar el frotis es realizando un barrido sobre el mismo, de forma que evitemos (salvo que expresamente deseemos lo contrario) pasar dos veces por la misma zona disminuyendo al mínimo los errores de distribución, para lo cual existen 3 métodos; el de almena o cruzamiento seccional, en el cual los leucocitos se cuentan en campos consecutivos conforme se va moviendo el frotis en el microscopio de un extremo al otro (Figura 4-7), el conteo se inicia de la parte mas delgada hacia la mas gruesa pero solo de la zona llamada cuerpo.

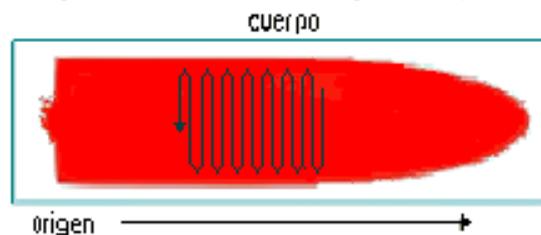


Fig.4-7. Método de almena para la lectura de un frotis.

El segundo método utilizado es el longitudinal en el cual el barrido se hace hacia adelante y atrás, contando campos consecutivos desde la cola hacia la cabeza del frotis como se muestra en la figura 4-8, se realizarán los recorridos necesarios para el conteo de 100 leucocitos, y por último el método de muralla almenada, en el cual se usa el modelo de almena solo que se realiza únicamente en los bordes horizontales del frotis (Figura 4-9) hasta cubrir las 100 células requeridas para el conteo diferencial.³

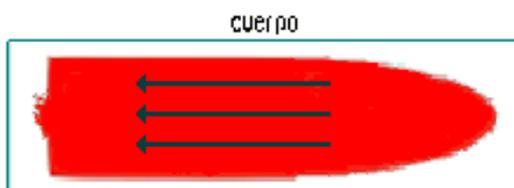


Fig.4-8. Método longitudinal.



Fig.4-9. Método de muralla almenada.

4.3.4 TINCIÓN SUPRAVITAL.

Fundamento.

Tinción de reticulocitos. El RNA residual de los hematíes inmaduros es precipitado y teñido con una tinción supravital usando el nuevo azul de metileno o el azul de cresil brillante. Debido a la liberación prematura o retardada desde la médula ósea y a los diferentes grados de maduración, los reticulocitos no siempre reflejan la actividad eritroide absoluta.

Sin embargo, la facilidad con que pueden ser contados en forma seriada en el mismo individuo hace del conteo de reticulocitos un excelente método para valorar las variaciones del grado de producción eritrocitaria.³²

Técnica.

- 1.- Colocar dos a tres gotas de la solución colorante en un tubo pequeño.
- 2.- Añadir seis a ocho gotas de sangre (capilar, recogida sobre EDTA u oxalatada) y se mezclan.
- 3.- Incubar a 37°C durante 10 a 20 min. (no debe pasarse de este tiempo).
- 4.- Realizar extensiones finas y se secan al aire (no se aconseja tinción de contraste con Romanowsky).
- 5.- Se enfoca primero el frotis con el objetivo de 10X procurando localizar áreas sin células agrupadas y se pasa al objetivo de 40X con el que es fácil seleccionar la zona correcta del extendido en el que se debe iniciar el recuento, después empleando aceite de inmersión, se localiza una zona donde haya aproximadamente 100 a 200 células de la estirpe eritroide (reticulocitos y eritrocitos), por campo, contando el número de reticulocitos que son los que tienen la red de material basófilo y el número de eritrocitos hasta llegar a un total de alrededor de 1,000 células esto se realiza utilizando el método de almena para leer el frotis (Figura 4-7).

Para que un recuento sea exacto, los hematíes no deben observarse en grupos o en pilas de monedas.^{3,14,32}

Cálculo de resultados.

$$\frac{\text{No. Reticulocitos X 100}}{\text{No. Total de células contadas}} = \% \text{ reticulocitos}$$

El conteo de reticulocitos se da por cada 100 hematíes o se convierte el porcentaje en valores absolutos de la manera siguiente:

$$\frac{\% \text{ reticulocitos X hematíes / mm}^3}{100} = \text{reticulocitos / mm}^3$$

La cifra absoluta de reticulocitos por término medio es del orden de 60,000/mm³. La cifra normal de reticulocitos en el adulto normal expresada en porcentajes es de 0.5 a 1.5%. Los recién nacidos tienen niveles de 2 a 6 % pero estos valores descienden hasta los valores normales de los adultos en 2 a 5 días.

$$\frac{\% \text{ reticulocitos X Hematocrito del paciente}}{\text{Hematocrito normal}} = \text{CRC}$$

Cuando el recuento de reticulocitos es superior a 10 %, debe contarse un mayor número de campos completos, en proporción a los campos en los que solo se contaron reticulocitos.³² El conteo de reticulocitos corregido (CRC) se calcula de la manera mostrada anteriormente.

Este resultado constituye un índice indirecto de la magnitud de la eritropoyesis en médula ósea, cuando la velocidad de producción de GR incrementa la creación de los mismos y se envían a sangre periférica formas inmaduras de ellos, la CRC se encuentra incrementada de manera característica en anemias hemolíticas, pérdidas de sangre, recuperación de anemias por deficiencia de B₁₂, hierro o folato. En anemias por deficiencia de hierro, aplásica, sideroblástica, megaloblástica, en anemias hipoplásicas donde se observa la disminución absoluta de tejido hematopoyético en la MO, la CRC se encuentra disminuida.^{18,26}

4.3.5 MÉTODO DE CONSERVACIÓN DE EXTENSIONES SANGUÍNEAS TEÑIDAS.

Para evitar que las extensiones se deterioren con el paso del tiempo, si éstas desean ser conservadas, hay que aplicar algunos procedimientos adicionales. Los frotis teñidos por Romanowsky se destiñen si no son conservados adecuadamente.

Generalmente, el frotis se observa después de haberse secado y teñido, sin colocarle un cubreobjetos, pero si deseamos conservar las extensiones hay que colocar un cubreobjetos tras depositar sobre el portaobjetos una sustancia adherente. Si esto se realiza después de observar el frotis con aceite de inmersión, hay que limpiar la extensión con xilol para eliminar todo resto de aceite.

Aunque las extensiones antiguas pueden decolorarse y volverse a colorear los resultados nunca son satisfactorios.^{14,48}

4.4 CAPTURA, DIGITALIZACIÓN Y EDICIÓN DE FOTOMICROGRAFÍAS.

El equipo utilizado para la obtención de fotomicrografías que se muestra en la figura 4-10, fue el constituido por el microscopio óptico de campo claro marca Carl Zeiss unido por medio de un tubo adaptador a una cámara digital marca Canon modelo Power Shot G5 que se conecta a la computadora por medio de un cable con entrada USB, para la captura de las fotomicrografías, haciendo posible digitalizarlas para después editarlas en caso necesario por medio del programa Canon Utilities ZoomBrowser EX 4.1.

Una vez conectado todo el equipo se comienza la búsqueda con el microscopio de manera habitual, hasta localizar una imagen satisfactoria, se ubica la célula de interés en el centro del campo microscópico, se enfoca buscando la mejor resolución posible, se da inicio al programa de captura llamado RemoteCapture, se enciende la cámara digital y se conecta al programa. En este momento por medio de la ventana llamada salvar captura remota (Save RemoteCapture), se debe programar manualmente el sitio específico donde se desean guardar las fotomicrografías usando el menú archivo que ofrece la opción denominada preferencias, la que permite elegir si esto se realiza solo en la computadora o además en la cámara. Aquí mismo se establece el nombre genérico que llevarán las fotomicrografías, así como un número designado de dígitos.

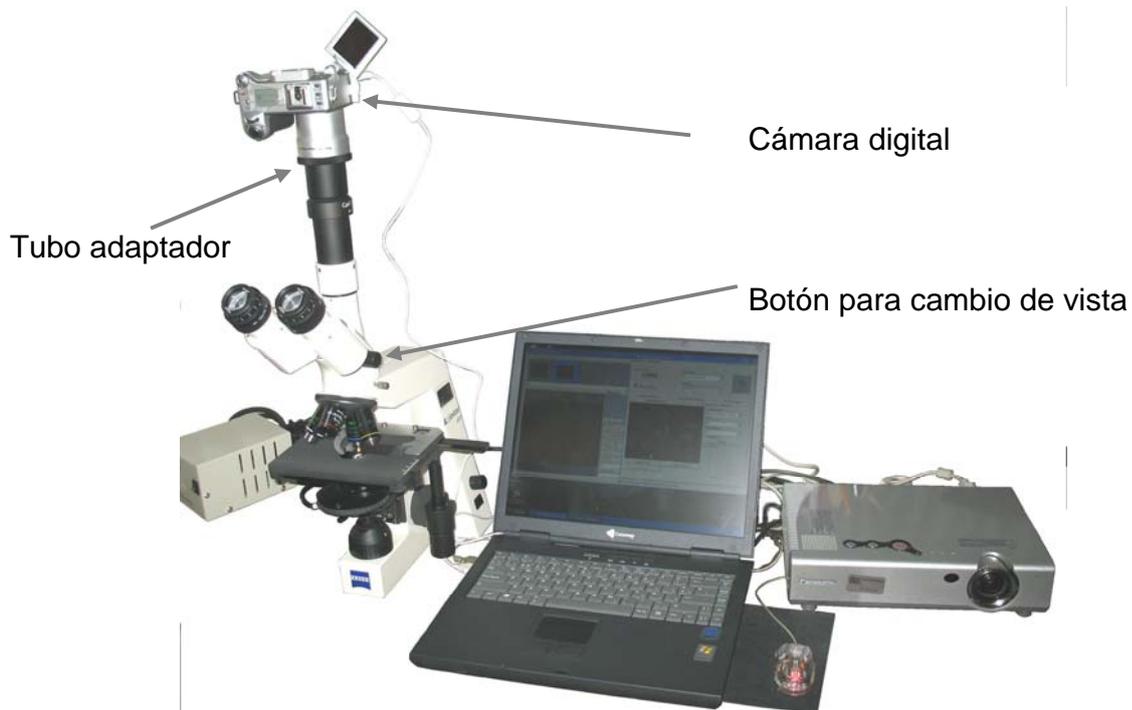


Fig. 4-10 Microscopio con cámara adaptada para captura de fotomicrografías.

Al conectar la cámara, también se abre en el monitor una ventana llamada Shooting RemoteCapture, que presenta diferentes propiedades a establecer, habiendo un menú desplegable llamado cámara(C) que presenta dos opciones, la primera es configuración de cámara (Camera Settings), la cual permite escribir la hora y fecha en que se toma la fotografía, y personalizar el conjunto de imágenes, la segunda opción, llamada configuración de imagen de cámara (Camera Display Settings) es en la que se elige si se quiere ver la imagen solo en el monitor, en el monitor y en la pantalla de la cámara (figura 4-11) al mismo tiempo o tener salida a una terminal de video.



Fig. 4-11 Cámara fotográfica, muestra en la pantalla un campo microscópico.

Una vez establecidos dichos datos y ya con un buen enfoque de la imagen, se procede a girar un botón localizado en el cabezal del microscopio (figura 4-10) que bloquea la observación a través del ocular y da paso a la imagen hacia el monitor.

Existe otro menú llamado Shooting(S) en el que se da la opción para ejecutar el disparo de fotografiado y para rotar la fotografía obtenida.

En la misma ventana pueden establecerse combinaciones de tamaño y calidad con que se requiere capturar la fotomicrografía, proporcionando opciones de tamaño: grande, mediano y pequeño, en tanto que las opciones de calidad son: superfino, fino, normal, medio y en original.

Por otro lado la pestaña de ajuste de ángulo (angle adjustment) presenta un recuadro en el que se puede observar la imagen, en tanto se manipule la barra de control con la que se elige el zoom requerido para tomar la fotomicrografía, teniendo el cuidado de no exceder el acercamiento para asegurar que la imagen no se distorsione y mantenga la definición, bajo este recuadro hay dos botones: uno es el buscador de imagen (Viewfinder), que puede estar encendido o apagado, haciendo posible que este visible o no dicha imagen y el segundo botón que sirve para reflejar los cambios realizados a ésta (Reflect changes).

Otra pestaña donde se programa el modo de disparo (Shooting modes adjustment), al tomar la fotomicrografía, incluye menús desplegable que se mencionan a continuación.

Flash: encendido, apagado o automático.

Modo de medición (Metering mode): puntual (spot) o evaluativo (evaluative)

ISO speed: 50, 100, 200, 400 o automático.

Balance de iluminación (White Balance): automático, luz de día, nublado, luz de tungsteno, fluorescente, flash o personalizado.

Compensación de la exposición (Exposure Compensation): dando un rango de +2 hasta -2

Compensación de la exposición del flash (Flash Exposure Compensation): dando el mismo rango del anterior.

Efectos de la foto (Photo Effect): sin efectos, vívido, neutro, biselado, sepia o blanco y negro.

Por último se pueden hacer ajustes de forma manual en la obertura y la velocidad del disparo o dejar los ya establecidos por el programa.

Existe otra pestaña llamada configuración de disparo (shooting settings) que es un cuadro informativo, el cual muestra las propiedades establecidas que quedarán guardadas junto con la fotografía.

Otra herramienta que ofrece el programa es la posibilidad de establecer intervalos de tiempo en minutos y segundos para los disparos de la cámara en forma automática, en esta pestaña el programa brinda algunos cuidados que se deben tener al momento del disparo como: no tocar los botones de la cámara durante el disparo, deshabilitar el modo de pausa de la computadora y que se tenga la cámara encendida con el adaptador de corriente alterna.

Una vez decididas y programadas las propiedades, observando la imagen en el monitor de la computadora, pueden realizarse algunos ajustes de intensidad de luz, tratando de no mover el enfoque ya que puede verse afectada la resolución de la fotomicrografía, hecho lo anterior, se da el disparo para tomar la fotomicrografía, ya sea en la cámara, en el monitor o por medio de la barra espaciadora en el teclado de la computadora, y automáticamente esta se guarda en la carpeta asignada inicialmente.

Las fotografías capturadas estarán disponibles para su edición posterior, con cualquier programa que tenga ese fin. En este trabajo se utilizó el Canon Utilities ZoomBrowser EX 4.1., que da la opción de abrir la imagen elegida y modificar, características como el color, el brillo y el contraste, así como realizar el corte de una sección deseada de la fotografía.

5.0 RESULTADOS.

El estudio microscópico de la sangre, que abarca las extensiones sanguíneas teñidas (frotis sanguíneo), así como la cuantificación de las diferentes estirpes celulares por medio de la cámara de Neubauer, resulta ser una herramienta muy útil a la hora de diagnosticar, corroborar o descartar de manera certera un padecimiento, por este motivo es de suma importancia identificar y diferenciar adecuadamente la morfología normal de las células presentes, así como conocer la distribución de las mismas.

Al analizar un frotis sanguíneo debemos tomar en cuenta que no siempre observaremos las células exactamente iguales entre un extendido y otro o comparándolas con algún atlas consultado, ya que hay algunas variables que pueden afectar la morfología, la tinción e incluso la distribución de estas, estos factores incluyen no solo el estado de salud del individuo si no también variables que sin indicar una anormalidad podrían ser causa de dudas para el analista. Algunos de estos factores son: los grados de maduración de las estirpes celulares, la actividad celular, el procedimiento de tinción realizado, (cambios de pH, tiempos de permanencia de reactivos) e incluso los referentes al individuo, como son sexo y edad, a pesar de estas variantes es importante conocer las características químicas y tintoreales, que se mantienen constantes y las funcionales estrechamente relacionadas a las anteriores y que permiten finalmente la identificación certera, si se tuvo el cuidado de tener preparaciones bien realizadas que favorezcan la identificación.

En ocasiones debido a estos mismos factores e incluso al criterio del observador encontramos leves diferencias entre los datos que ofrece un autor y otro por ejemplo en el color que designan a cada célula pero no salen de lo químicamente probable, es decir podemos encontrar que se describa a los gránulos eosinófilos como de color rosa salmón o anaranjados, pero siguen siendo eosinófilos, los rasgos señalados en este trabajo son validos para células humanas, maduras, a excepción de los reticulocitos y únicamente se consideran características que en la actualidad gozan de una aceptación.

5.1 OBTENCIÓN DE IMÁGENES DIGITALIZADAS.

Las fotomicrografías presentadas de frotis sanguíneos fueron obtenidas de sangre periférica de personas sanas y fueron procesadas con la tinción de Wright a excepción de las que muestran reticulocitos en las que se utilizó la tinción supravital. De igual modo las obtenidas a partir de la cámara de Neubauer provienen de personas sanas.

5.1.1 CAMPOS MICROSCÓPICOS A DIFERENTES AUMENTOS DE FROTIS DE SANGRE PERIFÉRICA TEÑIDOS CON COLORANTE WRIGHT.

A la izquierda fotomicrografías originales; a la derecha el acercamiento de un corte.

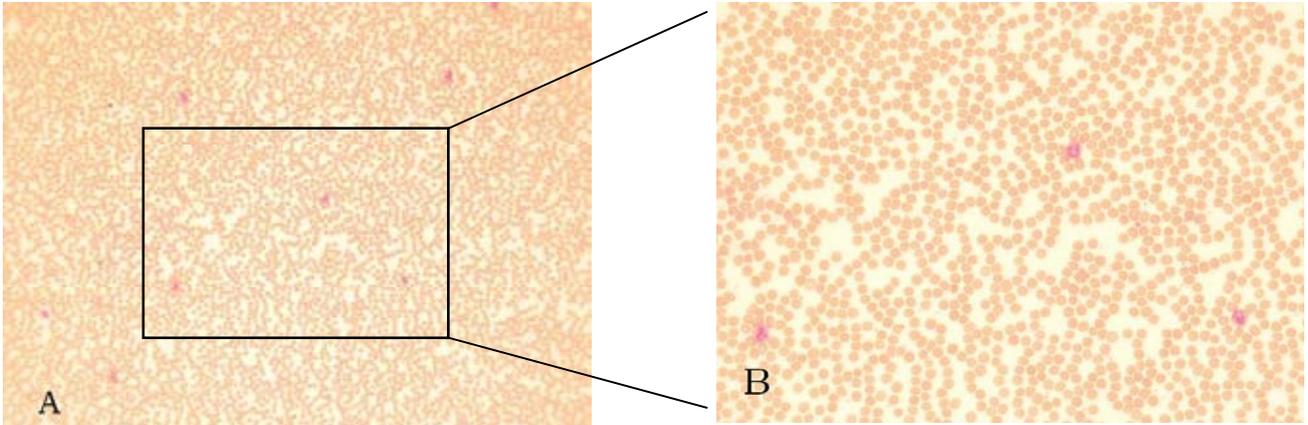


Fig.5-1. Aumento de 100X. A) Original; B) Acercamiento de un corte. Este campo nos permite visualizar la calidad de la tinción y la presencia de diferentes tipos de células.

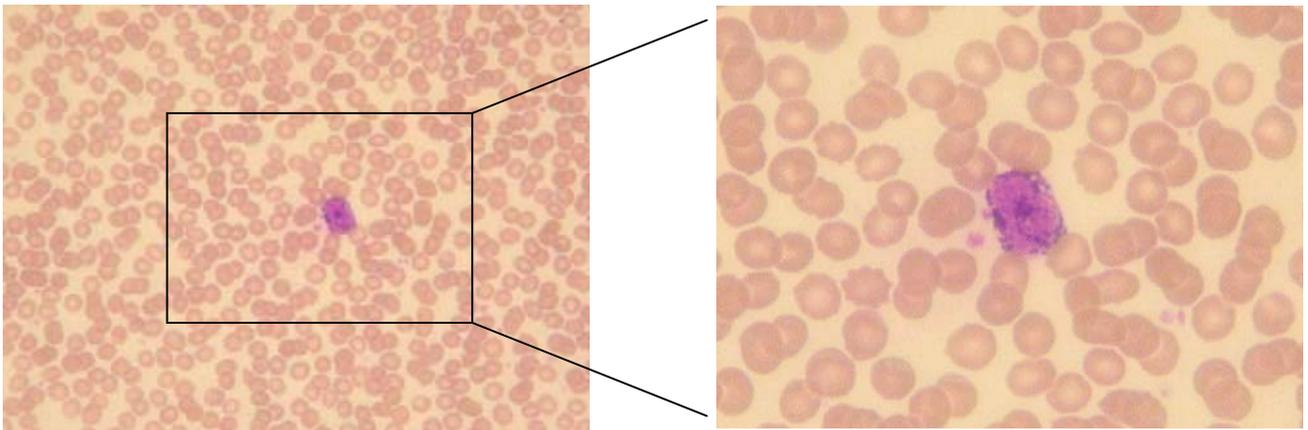


Fig.5-2. Aumento de 400X. Este aumento nos permite elegir una zona adecuada de lectura de los frotis.

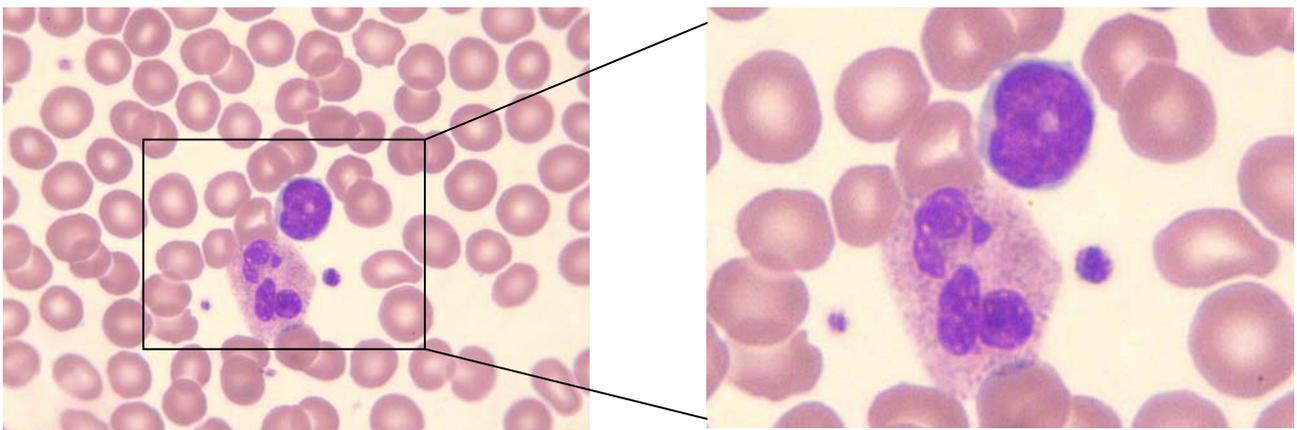


Fig.5-3. Aumento de 1000X. Aquí podemos tener un criterio adecuado de la morfología y la distribución celular.

5.1.2 RETICULOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA, CON AZUL DE CRESIL BRILLANTE.

Con las tinciones de Romanowsky presentan una basofilia difusa por el RNA, predominando la eosinofilia por la abundante Hb. Colorantes como el azul de cresil brillante, precipitan el RNA, dando origen a una delicada red de material basófilo azul, en filamentos reticulares, que les dan su nombre.

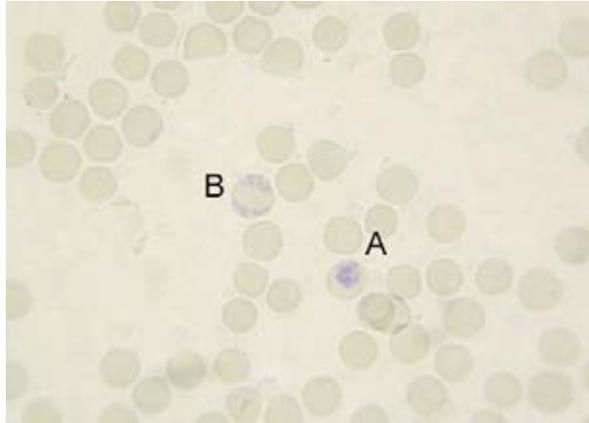


Fig.5-4. Se ve el precipitado de material basófilo. B) Presenta la red en la periferia. (1000X)

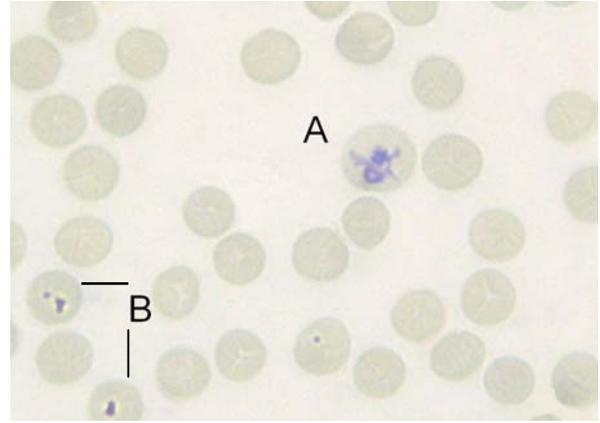


Fig.5-5. A) Tiene una abundante red basófila. B) Eritrocitos, esto no debe confundirse con la red de RNA. (1000X)

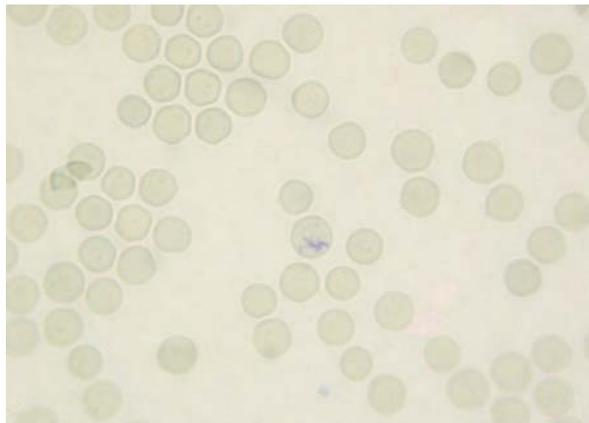


Fig.5-6. El RNA precipitado ayuda a distinguirlo del resto de los eritrocitos. (1000X).

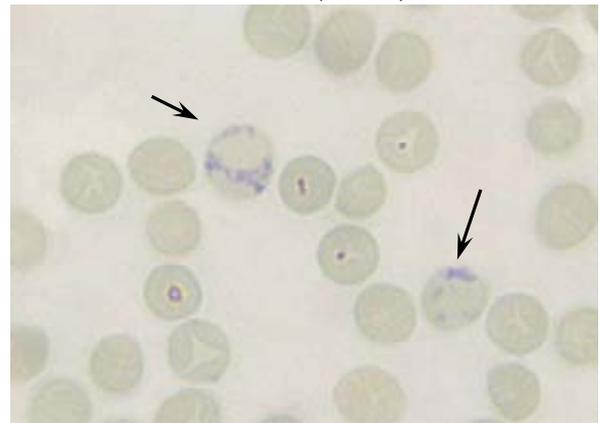


Fig.5-7. Se nota la diferencia de tamaño entre los eritrocitos y los reticulocitos señalados (1000X)

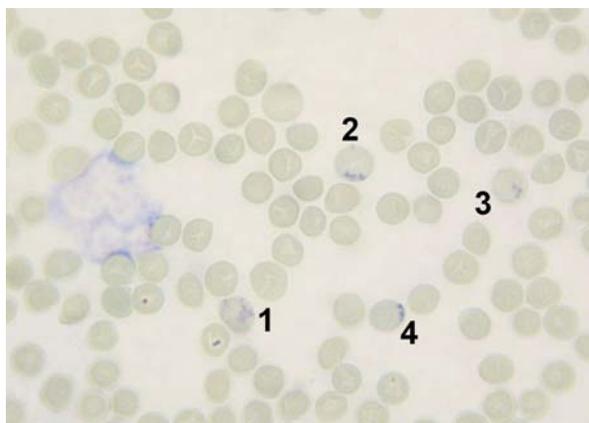


Fig.5-8. Se observan 4 reticulocitos y un leucocito ligeramente teñido. (1000X)

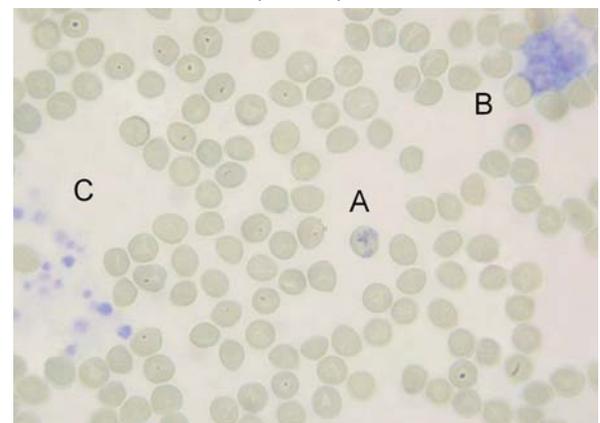


Fig.5-9. A)Reticulocito B) leucocito C)aglomerado de plaquetas. (1000X)

5.1.3 ERITROCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA, TEÑIDOS CON WRIGHT.

Son anucleados, de forma redondeada u oval, con una zona mas clara en el centro, por la forma de disco bicóncavo, contienen a la hemoglobina, lo que los hace acidófilos, tiñéndose por la eosina de las soluciones tipo Romanowsky observándose de color rosado, variando en ocasiones debido a la madurez del colorante.

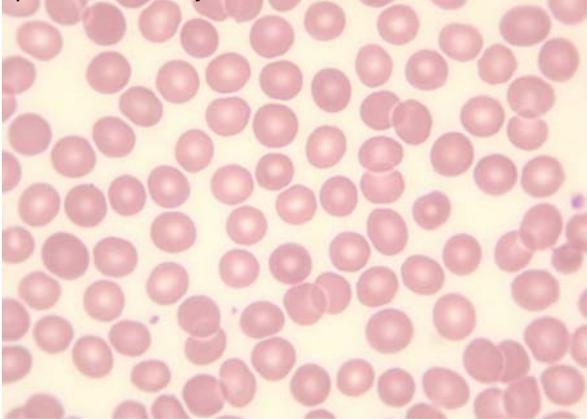


Fig.5-10. Se observa claramente la ausencia de núcleo en estas células. (1000X)

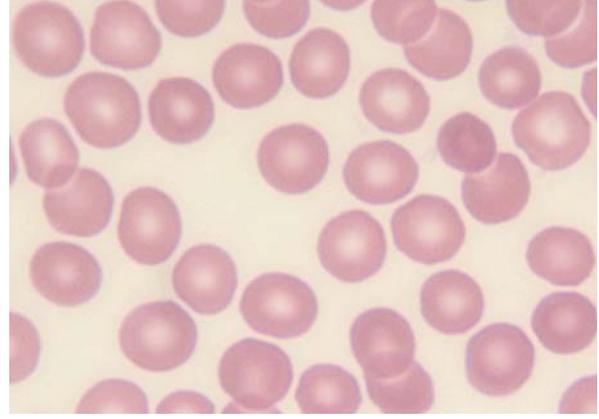


Fig.5-11. Se ven de color rosado gracias a la acidofilia característica de estos. (1000X)

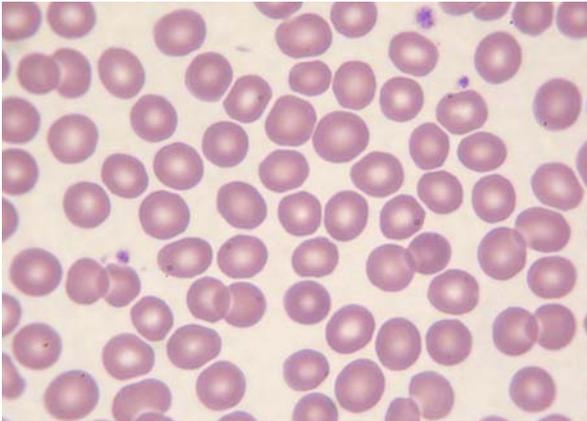


Fig.5-12. Se observa la abundancia de población eritroide en un extendido sanguíneo. (1000X)

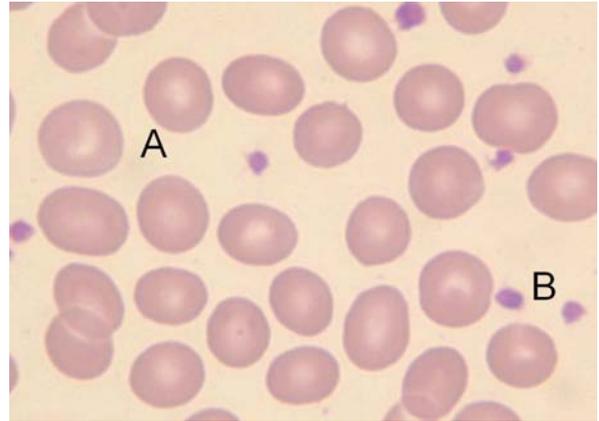


Fig.5-13. A) Eritrocitos normales con forma oval o redondeada B) plaquetas. (1000X)

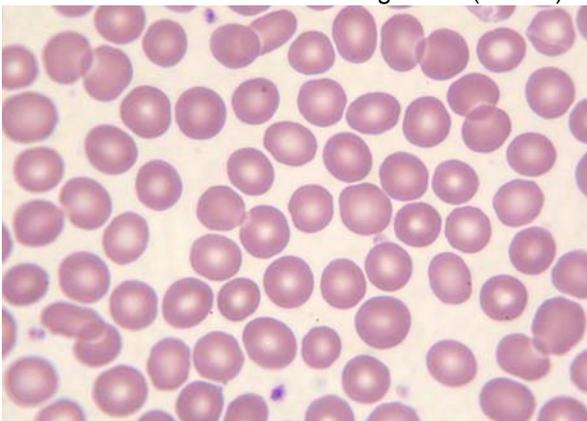


Fig.5-14. Se ve una ligera variación en forma y tamaño sin salir de la normalidad y algunos esferocitos. (1000X)

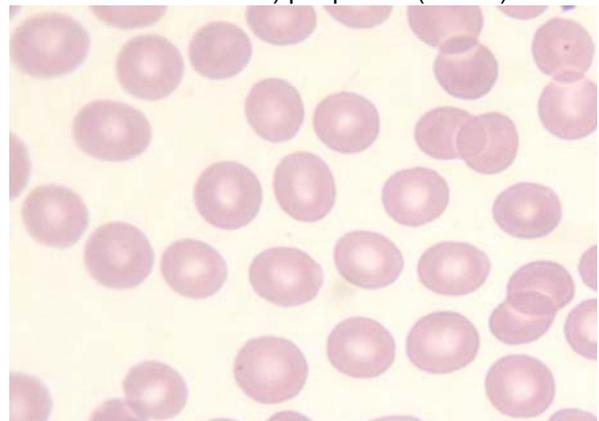


Fig.5-15. Eritrocito maduros, se ve la palidez central característica. (1000X)

5.1.4 LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA, TEÑIDOS CON WRIGHT.

5.1.4.1 NEUTRÓFILOS EN BANDA.

La forma mas joven de los PMN en sangre es la célula “en banda” o “en cayado”, se considera así cuando la escotadura del núcleo es mas grande que la mitad del diámetro del núcleo redondo hipotético dando un aspecto de herradura, su cromatina es irregular y densa y ya no presenta nucléolos.

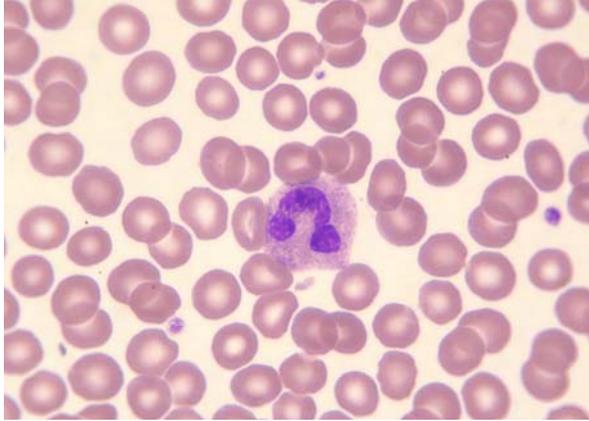


Fig.5-16. Se observa la forma característica de herradura en el núcleo. (1000X)

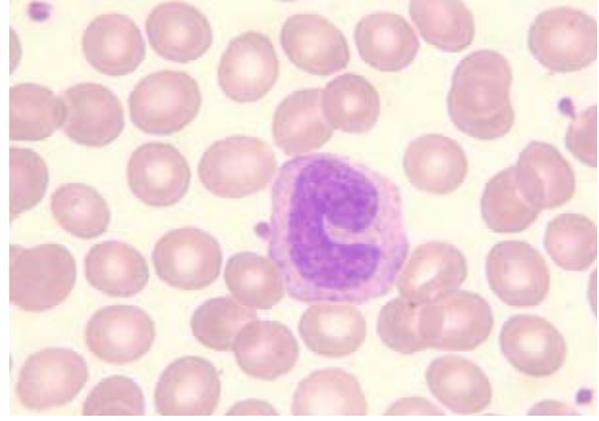


Fig.5-17. Se nota la diferencia de tamaño comparado con los eritrocitos. (1000X)



Fig.5-18. El núcleo se llega a observar en forma de C o S. (1000X)

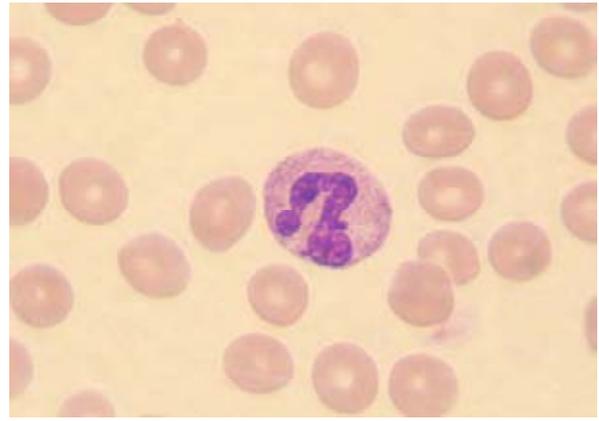


Fig.5-19. Neutrófilo en cayado muy cercano a convertirse en segmentado. (1000X)

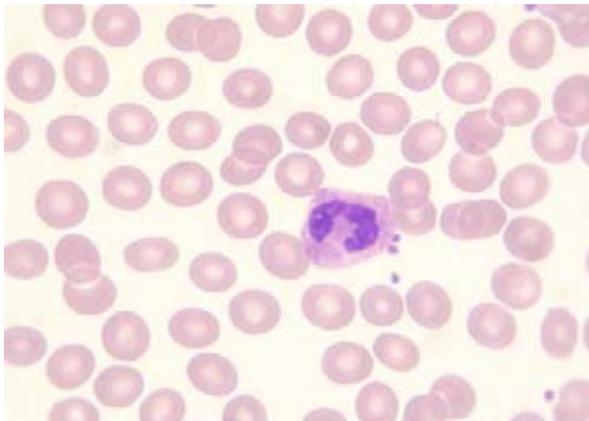


Fig.5-20. Se ve la escotadura mas grande que la mitad del diámetro del núcleo redondo hipotético. (1000X)

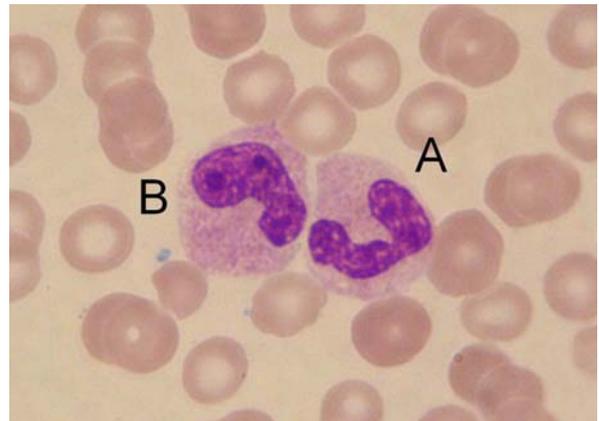


Fig.5-21. A) Se ve la cromatina irregular densa. B) Esta es una célula mas joven. (1000X)

5.1.4.2 NEUTRÓFILOS SEGMENTADOS DE SANGRE PERIFÉRICA, TEÑIDOS CON WRIGHT.

El núcleo se segmenta comúnmente en 3 lóbulos, unidos por pequeños puentes de cromatina. En las mujeres aparece frecuentemente un pequeño apéndice mucho menor que un lóbulo nuclear, con forma de raqueta o palillo de tambor, el cual se conoce como cuerpo de Barr, su abundante citoplasma acidófilo está cargado de granulaciones específicas que son poco afines a los colorantes y se tiñen de color marrón.

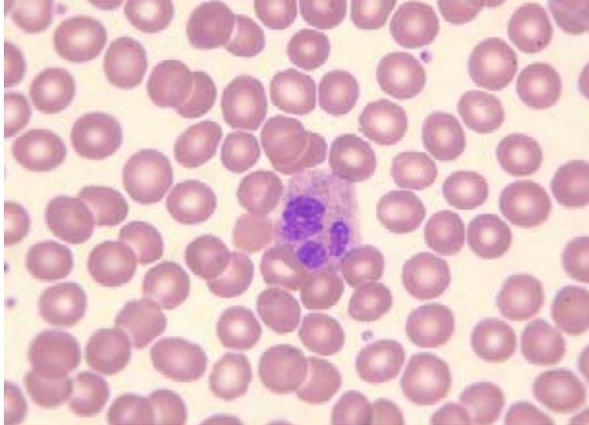


Fig.5-22. El citoplasma presenta gránulos específicos e inespecíficos de color marrón. (1000X)



Fig.5-23. Se observa un pequeño apéndice menor que un lóbulo, que contiene la cromatina sexual. (1000X)

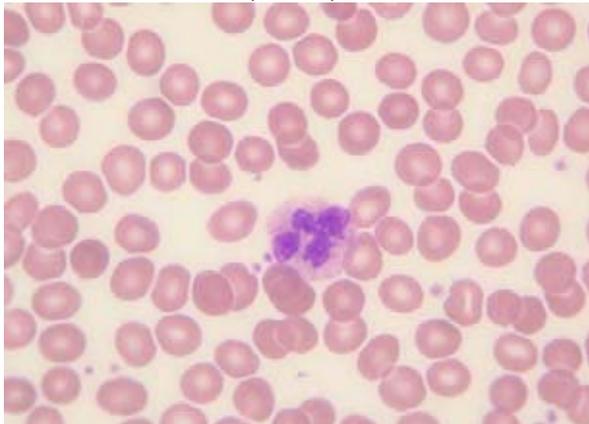


Fig.5-24. Segmentado en cuatro lóbulos, esto indica un mayor grado de madurez. (1000X)

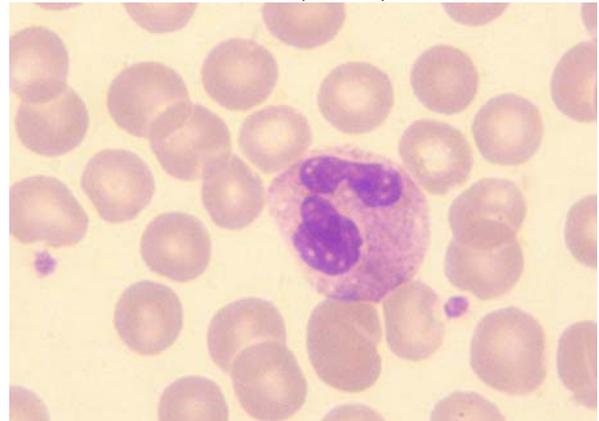


Fig.5-25. Neutrófilo segmentado joven, dos lóbulos unidos por un delgado puente de cromatina. (1000X)

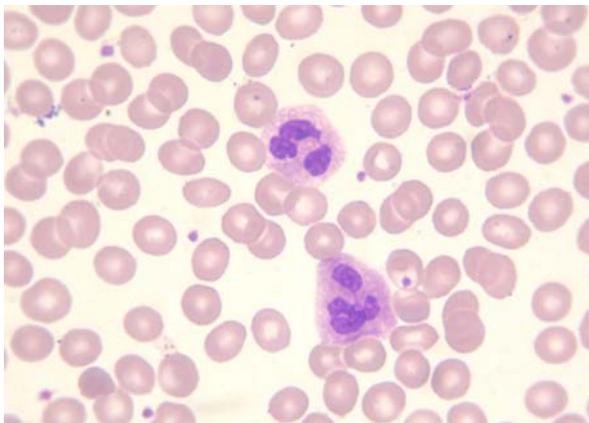


Fig.5-26. Llamados polimorfonucleares por la forma del núcleo. (1000X)



Fig.5-27. Su tamaño es entre 9-15µm, los delgados puentes de cromatina son evidentes.

5.1.4.3 EOSINÓFILOS DE SANGRE PERIFÉRICA, TEÑIDOS CON WRIGHT.

El núcleo es generalmente bilobulado, aun que puede tener tres lóbulos, presenta cromatina condensada (densa), se caracterizan por tener en su citoplasma gránulos acidófilos de forma redondeada o esférica, muy numerosos, ocupan todo el citoplasma y se tiñen por la eosina de color rojizo-naranja o rosa salmón intenso.

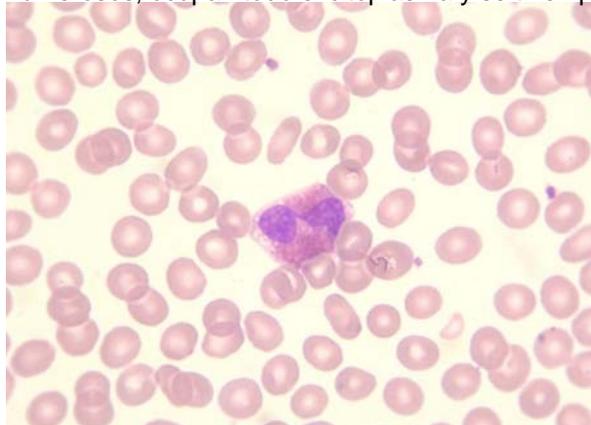


Fig.5-28. Mide de 12 a 17 μ m, se observa generalmente el núcleo bilobulado. (1000X)

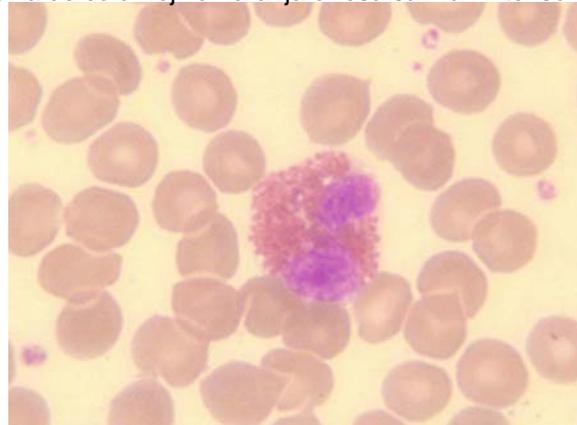


Fig.5-29. Se nota la cromatina condensada y el citoplasma lleno de gránulos, así como el núcleo simétrico. (1000X)

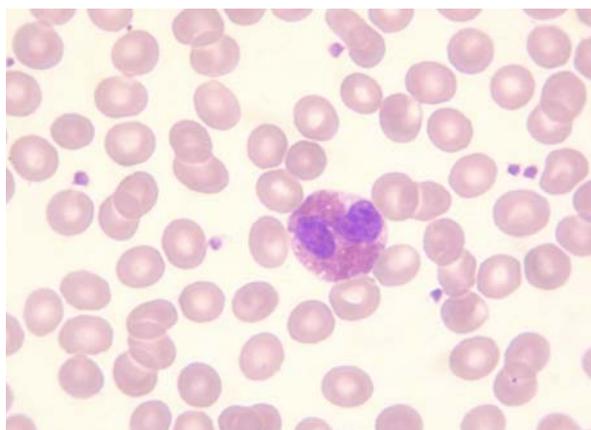


Fig.5-30. Los gránulos se tiñen en rojizo-naranja o rosa salmón intenso por la eosina. (1000X)

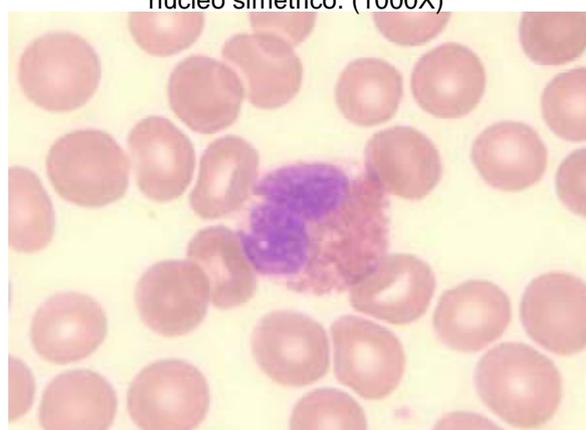


Fig.5-31. Se ve el tamaño, uniformidad y aspecto de los gránulos que son característicos de este PMN. (1000X)

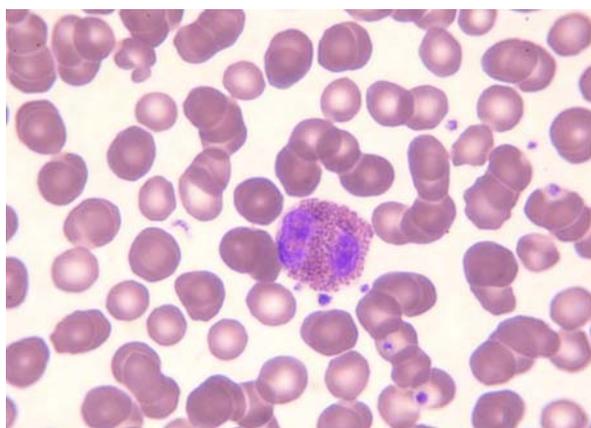


Fig.5-32. En este PMN los gránulos son más numerosos, ocupan todo el citoplasma aunque si permiten ver el núcleo. (1000X)

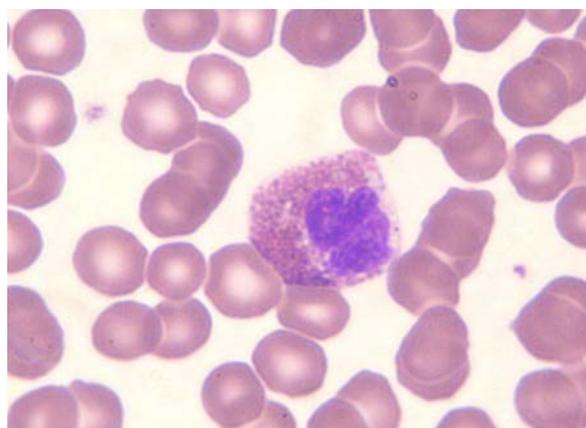


Fig.5-33. En su citoplasma los gránulos acidófilos de forma redondeada o esférica, con un tamaño de 0,5 y 1,5 μ m. (1000X)

5.1.4.4 BASÓFILOS DE SANGRE PERIFÉRICA, TEÑIDOS CON WRIGHT.

Su núcleo de cromatina densa, es voluminoso e irregular, posee generalmente 2 o 3 lóbulos unidos por puentes de cromatina. La característica principal de los gránulos es su metacromasia, observándose de color morado o rojo violeta oscuros, el citoplasma puede aparecer rosado o lavanda, o tal vez no se tiña.

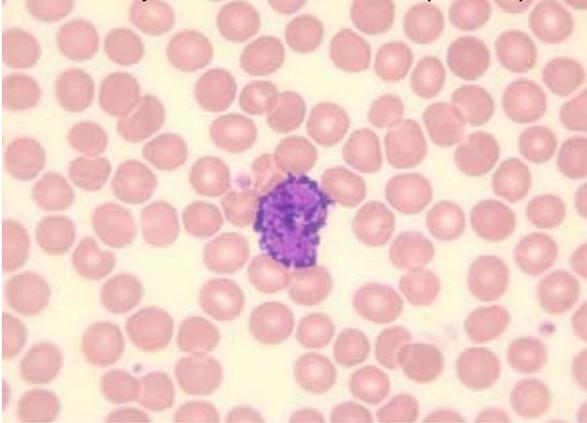


Fig.5-34. Se ve la metacromasia en los gránulos, que son morados o rojo violeta oscuros. (1000X)

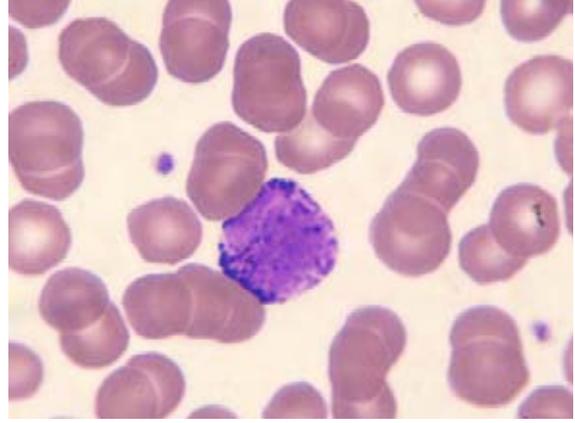


Fig.5-35. Es el PMN mas pequeño, su tamaño oscila entre los 10 y 14µm. (1000X)



Fig.5-36. En ocasiones los gránulos parecen escasos por la disolución parcial de su contenido. (1000X)

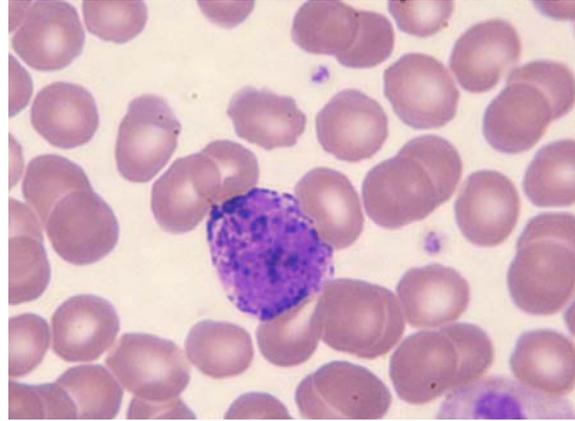


Fig.5-37 El tamaño de los gránulos es entre 0.2 y 1µm. La cromatina densa e irregular, difícil de apreciar. (1000X)

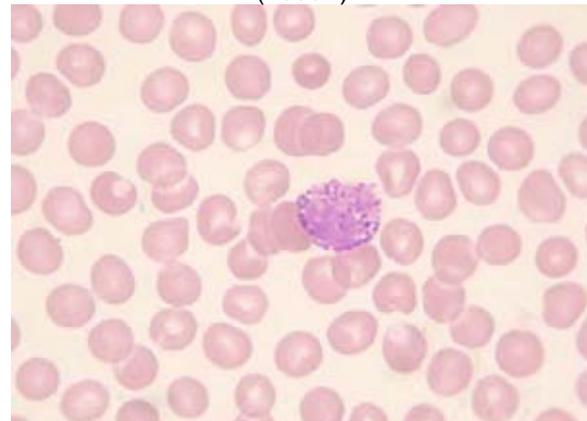


Fig.5-38. El citoplasma se ve rosado o no se tiñe. Los gránulos no parecen abundantes. (1000X)



Fig.5-39. Lóbulos unidos por puentes de cromatina, difíciles de ver, por las numerosas granulaciones. (1000X)

5.1.4.5 MONOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA, TEÑIDOS CON WRIGHT.

Poseen un núcleo generalmente excéntrico, irregular, con pliegues que parecen superponerse entre si, su cromatina es laxa, puede tener dos o tres nucléolos que llegan a verse en las extensiones comunes, el citoplasma abundante es levemente basófilo, con aspecto de vidrio esmerilado por las finas granulaciones.

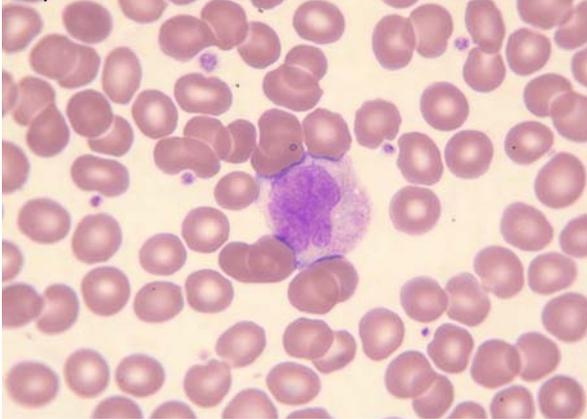


Fig.5-40. Presenta moderadas granulaciones azurófilas de diámetro aprox. a $0.4\mu\text{m}$. (1000X)

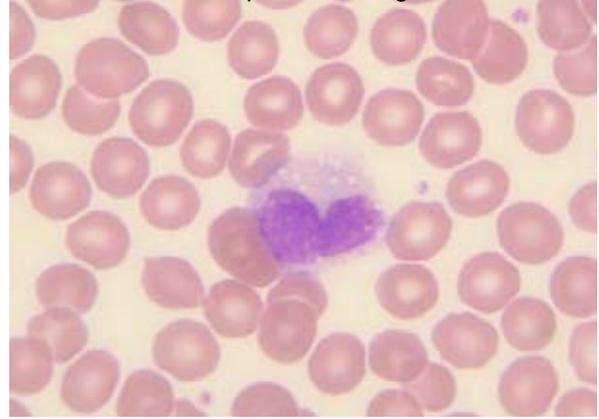


Fig.5-41. Se nota el núcleo en forma de riñón, excéntrico y las pequeñas vacuolas en el citoplasma. (1000X)



Fig.5-42. La cromatina es laxa, y el citoplasma color gris azulado opaco. (1000X)

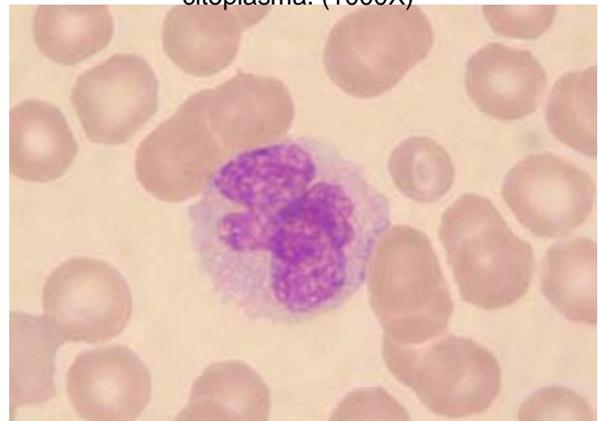


Fig.5-43. Nótese los seudópodos obtusos y la forma cerebroide del núcleo. (1000X)



Fig.5-44. Es una célula de aproximadamente 12 a $20\mu\text{m}$. (1000X)

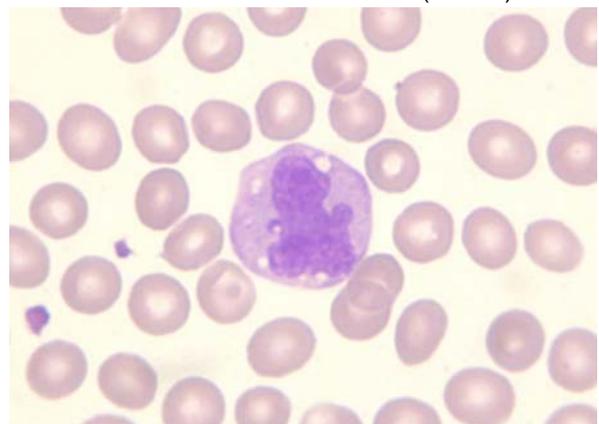


Fig.5-45. Se ve el citoplasma abundante, basófilo, con aspecto de vidrio esmerilado y presenta vacuolas. (1000X)

5.1.4.6 LINFOCITOS PEQUEÑOS DE SANGRE PERIFÉRICA, TEÑIDOS CON WRIGHT.

Varían en tamaño de 7 a 10 μ m y son mayoría, de núcleo esférico y voluminoso, la cromatina es condensada y de color morado oscuro intenso, no es común apreciar nucléolos a nivel óptico aun que si están presentes, el citoplasma es escaso y se dispone en forma de una estrecha franja alrededor del núcleo, débilmente basófilo y a veces no es visible, llegan a estar presentes unos cuantos gránulos azurófilos.

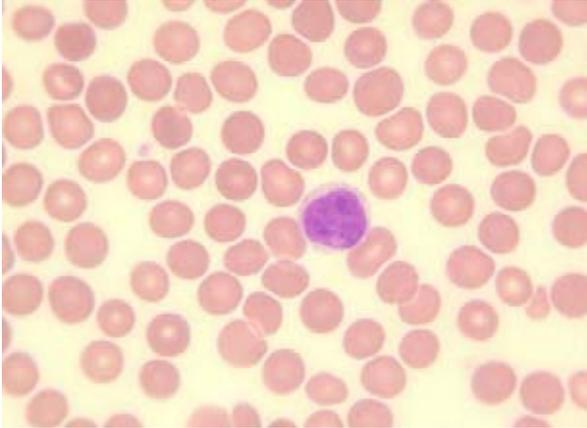


Fig.5-46. Se observa el citoplasma escaso y en forma de una estrecha franja perinuclear. (1000X)



Fig.5-47. Se pueden observar los nucléolos a nivel óptico como pequeñas áreas claras. (1000X)

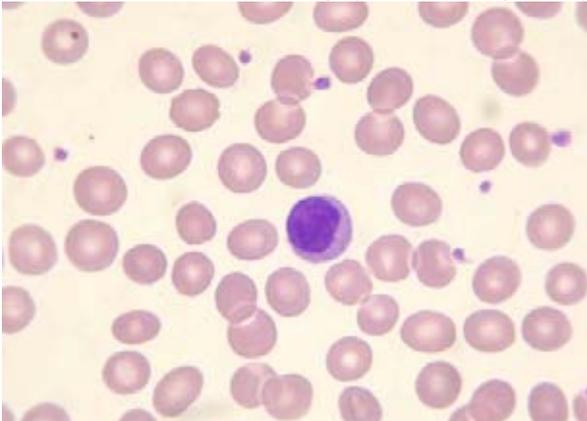


Fig.5-48. Este MN mide entre 7 a 10 μ m, la cromatina se dispone en grumos gruesos. (1000X)



Fig.5-49. Nótese el citoplasma débilmente basófilo, llegan a verse granulaciones azurófilas. (1000X)

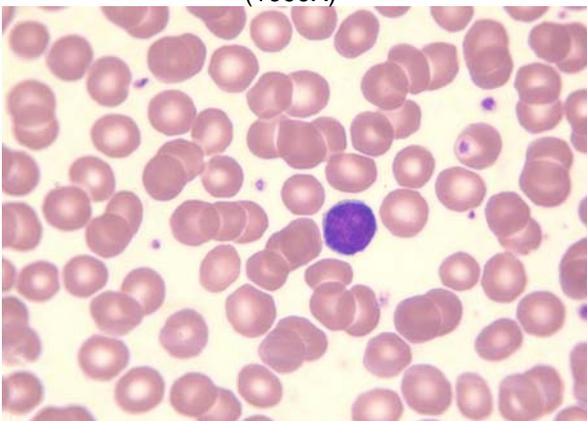


Fig.5-50. El núcleo morado intenso, es esférico, y el citoplasma no es visible. (1000X)



Fig.5-51. Su núcleo tiene el tamaño aproximado de un eritrocito y ocupa cerca del 90% del área celular. (1000X)

5.1.4.7 LINFOCITOS GRANDES DE SANGRE PERIFÉRICA, TEÑIDOS CON WRIGHT.

Miden aproximadamente de 11 a 16 μ m, el núcleo es de cromatina menos condensada, ligeramente más grande que en el linfocito pequeño, el citoplasma es mas extenso; la variación de tamaño se atribuye principalmente él, de tonalidad débilmente basófila y puede tener vacuolas y contener algunos gránulos azurófilos, que no son exclusivos de los linfocitos.

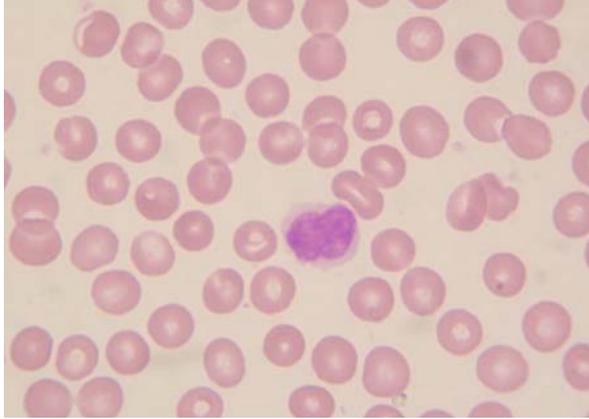


Fig.5-52. El núcleo es de cromatina menos condensada que en el linfocito pequeño. (1000X)



Fig.5-53. Se observa el citoplasma más extenso; la variación de tamaño se atribuye principalmente a él.(1000X)



Fig.5-54. Nótese el citoplasma de tonalidad débilmente basófila, a veces no se ve con claridad aunque sea abundante. (1000X)

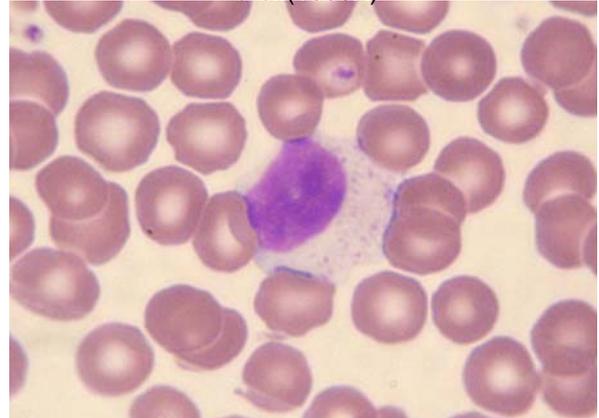


Fig.5-55. Este mononuclear puede contener algunos gránulos azurófilos, negativos a la peroxidasa. (1000X)

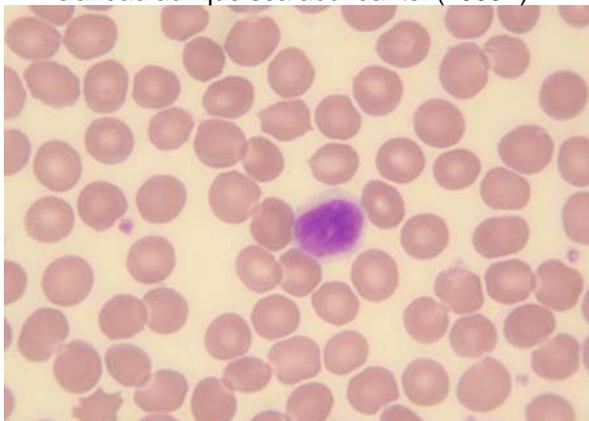


Fig.5-56. Estos linfocitos miden de 11 a 16 μ m. (1000X)

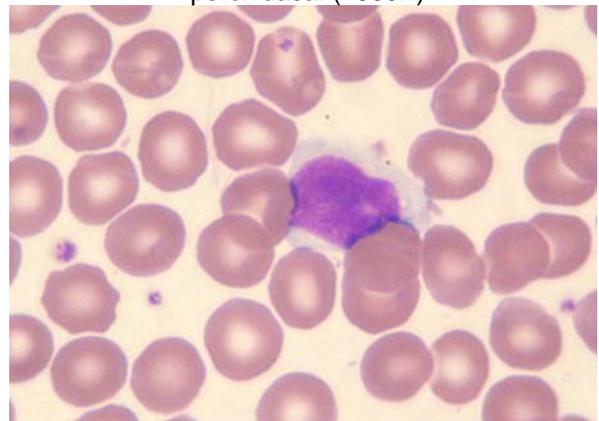


Fig.5-57. A menudo son profundamente deformados por células vecinas y tienen prolongaciones agudas. (1000X)

5.1.5 PLAQUETAS DE SANGRE PERIFÉRICA, TEÑIDOS CON WRIGHT.

Tienen forma de disco biconvexo de aproximadamente (2 a 3 μ m) de diámetro, desprovistas de núcleo, se llegan a observar aglomeradas por su gran capacidad de agregación. Presentan dos zonas, una central donde se disponen las granulaciones azurófilas, teñidas en púrpura, denominada cromómero y otra periférica hialina e incolora denominada hialómero, que se observa al microscopio en color azul claro.

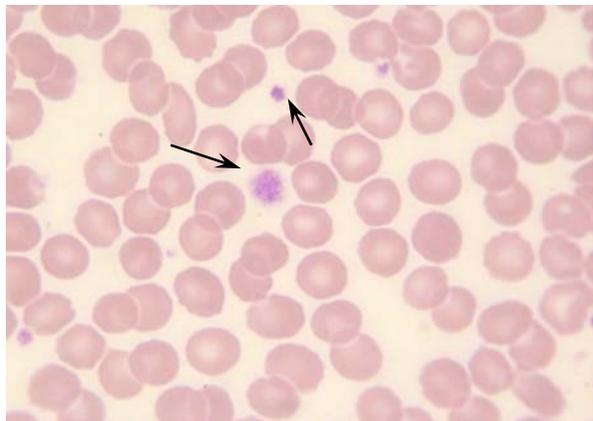


Fig.5-58. Se observa claramente que están desprovistas de núcleo. (1000X)

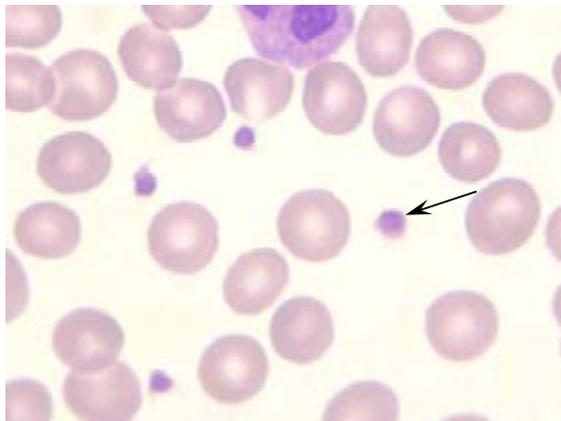


Fig.5-59. Se ven como discos biconvexos de aproximadamente 2 a 3 μ m de diámetro. (1000X)

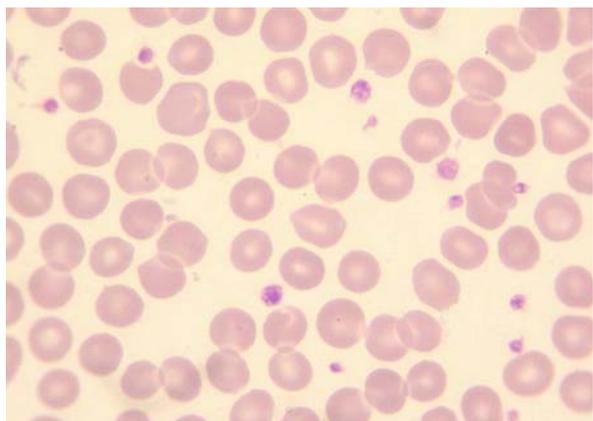


Fig.5-60. Se nota la proporción de las plaquetas comparadas con los eritrocitos. (1000X)



Fig.5-61. Se hace evidente la zona clara y la zona central de gránulos teñidos en púrpura.

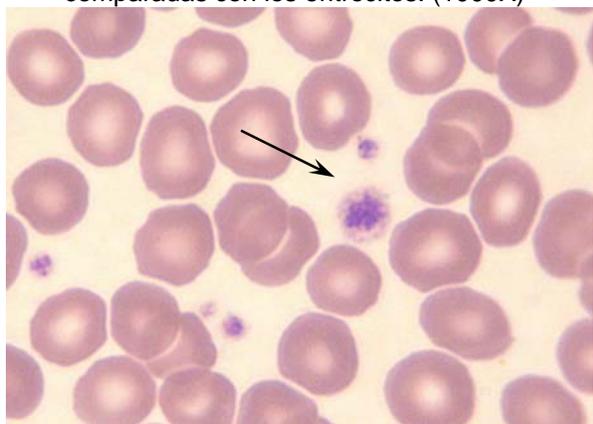


Fig.5-62. Se ven las dos zonas bien delimitadas, el cromómero y el hialómero. (1000X)

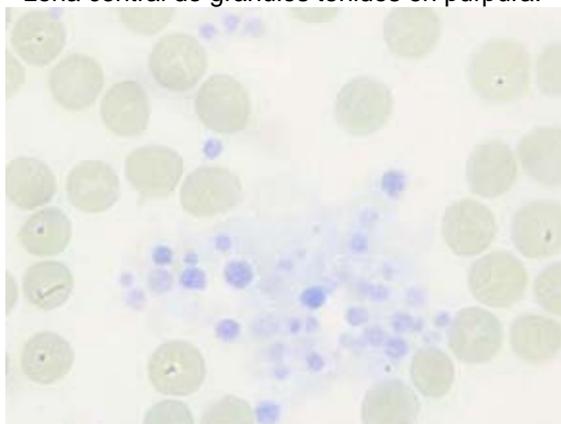


Fig.5-63. Aglomerado de plaquetas debido a su gran capacidad de agregación. (1000X tinción supravital)

5.1.6 FOTOMICROGRAFIAS DEL HEMOCITÓMETRO.

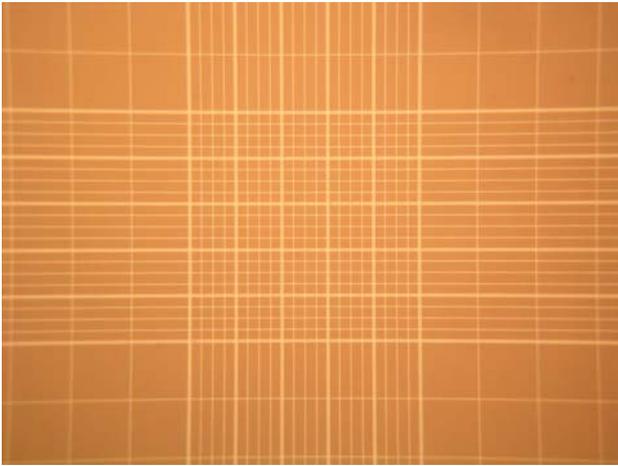


Fig.5-64. Red de conteo, se ve el cuadrado primario central y parte de los cuadrados primarios periféricos. (40X)

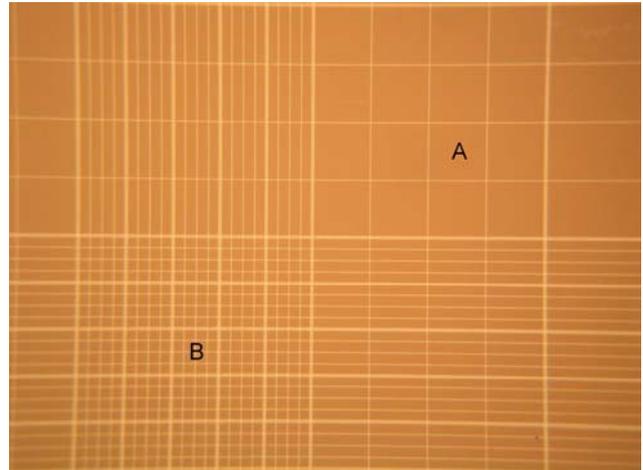


Fig.5-65. A) Cuadrado primario periférico superior derecho B) Cuadrado primario central. (40X).

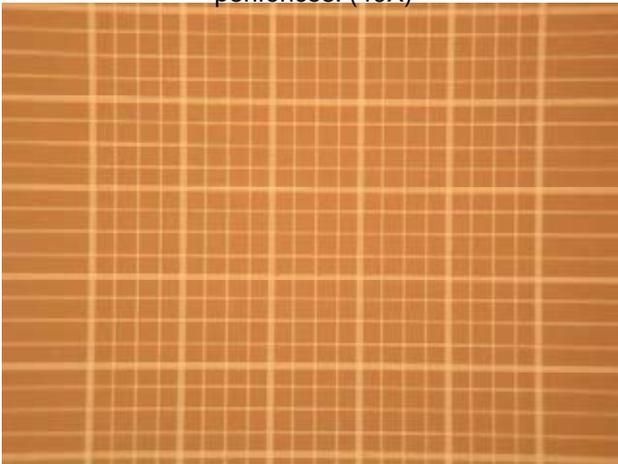


Fig.5-66. Cuadrado primario central, se ven los 5 grupos de 5 cuadrados secundarios. (100X)



Fig.5-67. Cuadrado primario periférico inferior derecho, uno de los 4 cuadros donde se cuentan leucocitos, a este aumento. (100X)

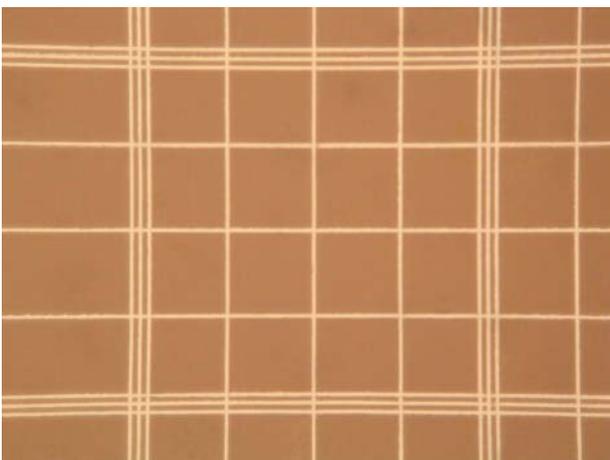


Fig.5-68. Uno de los cuadrados secundarios dentro del cuadrado primario central. (400X)

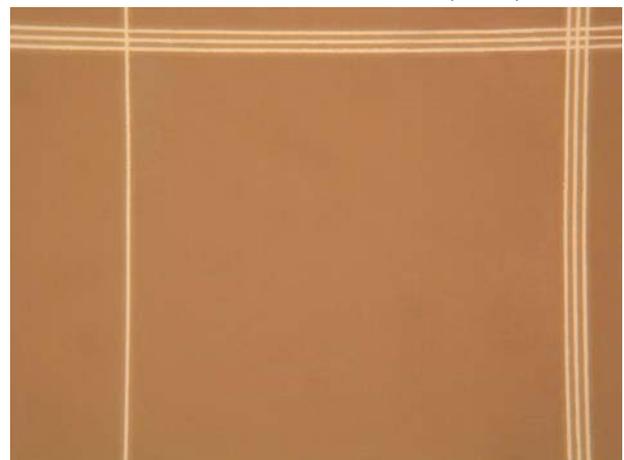


Fig.5-69. Uno de los cuadros secundarios, dentro de un cuadrado primario periférico, el cual no es comúnmente utilizado. (400X)

5.1.7 FOTOMICROGRAFIA DE LAS CÉLULAS SANGUINEAS EN EL HEMOCITOMETRO.

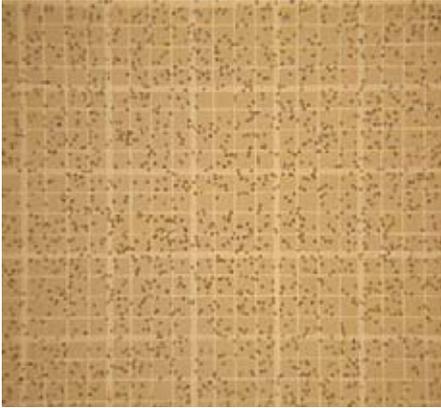


Fig.5-70. Eritrocitos vistos en el cuadrado central primario en aumento de 100X.

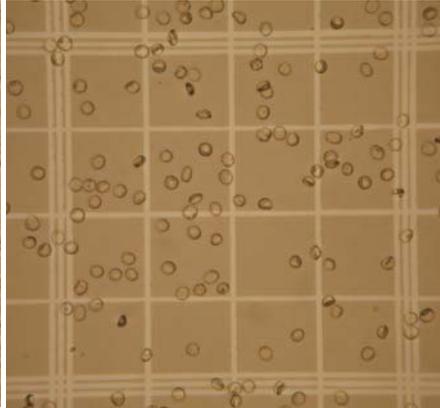


Fig.5-71. Eritrocitos observados en un cuadrado secundario en aumento de 400X.

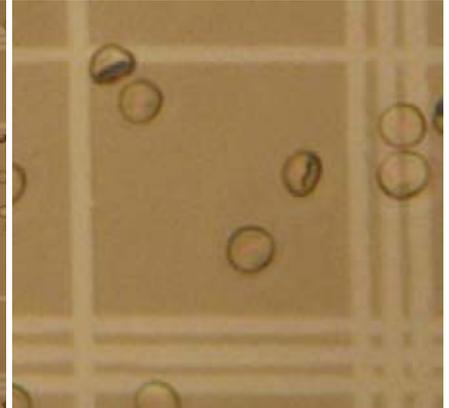


Fig.5-72. Corte amplificado de un cuadrado pequeño en el cual hay 4 eritrocitos.



Fig.5-73. Leucocitos vistos en el cuadro periférico primario en aumento de 100X.

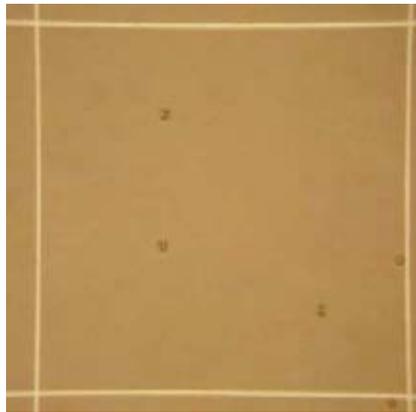


Fig.5-74. Leucocitos en un cuadrado secundario (400X) (no se acostumbra contarlos en este aumento).



Fig.5-75. Corte amplificado de un leucocito en el cual se observa que es un segmentado.

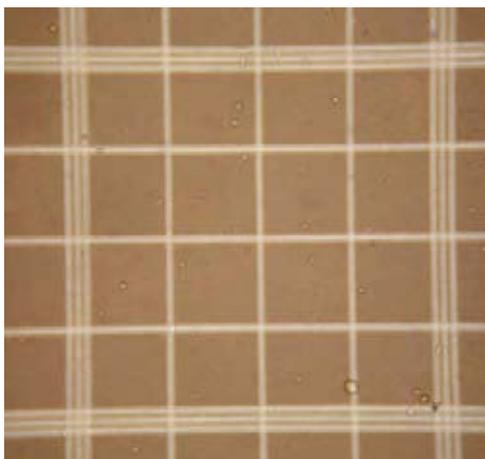


Fig.5-76. Plaquetas vistas a 400X recuerde que se debe mover continuamente el tornillo micrométrico para el conteo de estas.

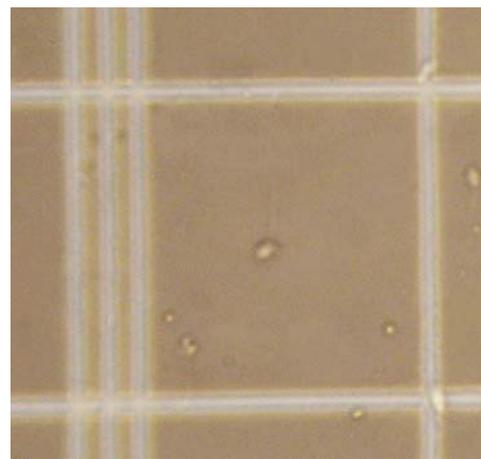


Fig.5-77. Corte amplificado de un cuadrado terciario en el cual se observan 4 plaquetas con apariencia luminosa.

6.0 DISCUSIÓN.

Un extendido de sangre bien hecho, bien teñido y examinado cuidadosamente brinda información muy valiosa respecto al estado de salud de un paciente: el valor relativo de cada leucocito, el cálculo aproximado de leucocitos y plaquetas que corrobora los datos de conteo proporcionados por el equipo automatizado o realizados de forma manual y sobre todo la evaluación morfológica de las tres estirpes celulares, del mismo modo las técnicas de conteo celular aportan datos útiles para diagnosticar problemas asociados a la participación de las diferentes células de la sangre y es esencial reconocer acertadamente cada estirpe celular en la cámara de Neubauer para evitar conteos falsamente elevados o disminuidos, todo esto con el fin de dar datos mas confiables al médico para un diagnóstico certero, este trabajo ofrece al consultante una idea clara de la normalidad de las células sanguíneas tanto morfológicamente como en su distribución, facilitando así la identificación de cualquier anomalía cuantitativa y/ o cualitativa.

Aunque la mayoría de los procedimientos de rutina en el laboratorio están automatizados, puede ser necesario utilizar los métodos manuales para muestras que exceden la linealidad de un instrumento o incluso cuando se presenta un desperfecto y no hay manera de solucionarlo de inmediato.

Es de suma importancia la revisión de los frotis sanguíneos principalmente en casos donde ya se sospecha de anomalía en un diagnóstico presuntivo por signos y síntomas o cuando los datos del equipo automatizado nos indican un aumento o disminución en el conteo celular, ya que una de las limitantes de éstos es su incapacidad para distinguir, de manera cien por ciento confiable, las células de otras partículas o fragmentos celulares del mismo tamaño, deben descartarse errores posibles como la presencia de aglomerados de plaquetas que disminuirían el número de estas y podrían aumentar el número de leucocitos por ejemplo, o contarse fragmentos celulares como plaquetas en las muestras de pacientes tratados con quimioterapia, los cuales tienen un aumento en la fragilidad de leucocitos. No cabe duda que la evaluación apropiada de los extendidos de sangre periférica en el microscopio óptico seguirá siendo necesaria como herramienta básica de trabajo diagnóstico aún con la existencia del equipo automatizado.

Para facilitar estas tareas es esencial saber la manera correcta de usar, cuidar y dar mantenimiento al microscopio, así como conocer la utilidad de cada uno de sus objetivos.

Las fotomicrografías mostradas en la página 113 son de muestras de sangre con EDTA, pertenecientes a personas sanas, dichas muestras teñidas con el colorante Wright, una vez hecho el frotis. La fotomicrografía 5-1 es un campo microscópico observado con el objetivo de 10X que nos da un aumento total de 100X, el uso de este objetivo aporta información elemental de la preparación que se aprecia en la imagen, como la presencia de muestra sanguínea, la calidad de la tinción, el color y la distribución de las diferentes células, así mismo permite detectar la presencia de células anormales grandes como blastos, o incluso parásitos si existieran. En la imagen 5-2 se aprecia un campo a 400X, aumento que nos sirve para seleccionar la zona correcta de lectura para la realización de un conteo diferencial, en ocasiones este aumento permite diferenciar a la célula leucocitaria, que en este caso es un basófilo, sin ser el objetivo mas conveniente para llevar acabo la identificación celular necesaria para el conteo diferencial, sobre todo por que hay células de difícil identificación como los monocitos que requieren una observación mas a detalle. Y por último en la imagen 5-3 observamos un campo con el objetivo de 100X (aceite de inmersión) en el cual el aumento equivale a 1000X, en ella se pueden detallar las características morfológicas celulares y por ello este objetivo ha sido el más utilizado a lo largo del presente trabajo para obtener la mayoría de las fotomicrografías. En esta imagen podemos ver detalles muy característicos de las cuatro diferentes células presentes, así el núcleo segmentado del neutrófilo y su citoplasma lleno de gránulos color marrón, a diferencia del citoplasma ligeramente basófilo del linfocito que no presenta gránulos, pero si un núcleo mayormente condensado que ocupa aproximadamente el 90 % de la célula e incluso la presencia de un nucleolo dentro de este y por otro lado los eritrocitos con su palidez central característica y las pequeñas plaquetas una con varios gránulos y otras con pocos.

Reticulocitos

La presencia de RNA en los reticulocitos asociada a la capacidad de síntesis proteica explica la red que se observa en ellos al ser teñidos. *Antes de salir a circulación, aun en MO, los reticulocitos poseen abundantes ribosomas y aun contienen RNAm suficiente para*

algunos días de actividad sintética principalmente de Hb, equivalente al 20% de la contenida en el eritrocito.^{16,32}

*El nombre de estas células proviene de que al examinarse con una tinción supravital con colorantes como el nuevo azul de metileno o el azul de cresil brillante, precipita el RNA y se produce una red de material basófilo visible con claridad.*¹⁴

Para la búsqueda de reticulocitos se resolvió realizar los frotis con azul de cresil brillante como tinción supravital, el precipitado de RNA observado claramente en las fotomicrografías de la 5-4 a la 5-9 presentes en la página 114 nos da información sobre el grado de madurez de la serie eritroide, recordemos que *la maduración del reticulocito por pérdida de la sustancia reticular basófila da origen al eritrocito maduro intensamente acidófilo*¹⁴, pero no solo se hace evidente esto entre un eritrocito que ya no contiene ese RNA y un reticulocito que aun lo presenta, sino incluso entre un reticulocito y otro, como se observa en la figura 5-4 ya que la cantidad de este precipitado nos indica que un reticulocito esta en una etapa mayor de madurez que el otro, como es el caso de B comparado con A.

Cuando la red basófila ya es tan escasa, como en la tercer célula de la figura 5-8 puede dificultarse la observación de esta, debe entonces tenerse en cuenta el constante movimiento del tornillo micrométrico del microscopio para no pasarla desapercibida, puede ocurrir en ocasiones que los eritrocitos adopten una posición en la que se llegan a unir zonas de la membrana de un lado y otro, debido a que tienen una mayor superficie que volumen y son altamente flexibles, entonces al observarlos al microscopio puede dar un efecto óptico de partículas dentro de la célula, como se observa en la figura 5-5-B lo que podría ser motivo

de confusión para una persona sin experiencia, pero una vez que se aprende a identificar la red basófila se notará que es muy diferente, lo mismo puede ocurrir cuando se llegan a encontrar detritos o precipitados del colorante por si mismo en el exterior de las células o sobre ellas.

En la tinción supravital no solo observamos a los eritrocitos y a los reticulocitos, también es común ver leucocitos como en la figuras 5-8 y 5-9, que no se tiñen de una manera completa por solo contar con el colorante básico, faltando el colorante ácido para contrastar, lo que impide hacer un conteo diferencial en este tipo de tinción. Por otro lado se pueden observar también las plaquetas, como se aprecia en la figura 5-9, pudiendo dar

información aproximada de exceso o disminución de las mismas, sin determinar su concentración real por este método.

Otra característica fácilmente apreciada en la figura 5-7 es la diferencia de tamaño entre un eritrocito y un reticulocito, este último ligeramente mas grande por pertenecer a una etapa previa de maduración.

Con respecto a los frotis sanguíneos teñidos con Wright se probó realizar la tinción con diferentes tiempos llegando a una tinción de 15 minutos de colorante y 30 min. de buffer de fosfatos, recordemos que estas condiciones pueden variar dependiendo de la maduración del colorante y del pH de ambos y que el lavado también es un factor que influye para que estos tengan una apariencia correcta. El colorante utilizado era nuevo, y esto puede ser la causa de que se haya requerido de tiempos prolongados.

Eritrocitos

En las fotomicrografías 5-10 a la 5-15 de la página 115, es importante observar las características de las células eritroides normales, a veces tan obvias como la ausencia de núcleo en los eritrocitos, ya que una célula inmadura de estirpe eritroide la cual es nucleada, podría llegar a confundirse con un leucocito si el observador carece de la experiencia necesaria para diferenciarlos.

Otras características morfológicas muy importantes son el tamaño, la forma y el color que presentan, *los eritrocitos son células anucleadas, con un diámetro de 6.5-8.5 μm , de forma redondeada u oval, con una depresión o zona mas clara en el centro, se dice que tienen forma de disco bicóncavo, esto les permite tener más superficie que volumen y es lo que les da la propiedad de deformabilidad y facilita el intercambio de gases,^{7,12} estas propiedades pueden informarnos de inicio sobre la realización correcta de la tinción, dado que, los eritrocitos son eosinófilos debido a la hemoglobina que es una proteína acidófila que se tiñe por la eosina de las soluciones tipo Romanowsky observándose normalmente de color rosado¹², como se aprecia claramente en la figura 5-11, algunas veces no se aprecian así, por ejemplo eritrocitos grises pueden ser causados por colorantes o por el buffer demasiado alcalinos o por una tinción prolongada, el caso contrario eritrocitos pálidos o de color rosa intenso pueden ser por colorantes o buffer demasiado ácidos, por poco tiempo con el buffer o por un lavado excesivo. Cambios en las características nos pueden revelar alguna anomalía en las células mismas, como es el caso de anemias hipocrómicas, o si nos*

referimos a la forma una de las posibles causas de un cambio en esta, sería el tiempo que le queda de vida a la célula, puesto que *un eritrocito viejo que implica alrededor de 120 días en circulación⁷ tiene menores cantidades de colesterol y fosfolípidos, lo que produce la pérdida de la permeabilidad selectiva, con aumento de Na⁺ y pérdida de K⁺, que a su vez produce una disminución gradual de la relación entre superficie y volumen, en términos morfológicos el disco eritrocitario se hace esférico,²³ como se observa la presencia de algunos esferocitos en las figuras 5-11 y 5-14 siendo este hallazgo de alrededor del 1% de la población eritroide en sangre periférica normal. Alteraciones en las interacciones de proteínas de la membrana de tipo horizontal conducen a eliptocitosis hereditaria y piropoiquilocitosis hereditaria, mientras que los defectos en las interacciones de tipo vertical resultan en esferocitosis hereditaria y ovalocitosis hereditaria.²⁷*

Habitualmente al microscopio los eritrocitos normales se observan como en la figura 5-13 ovales o redondeados por la gran flexibilidad de estos, lo único que indica su forma bicóncava característica es la palidez central, visible casi siempre, como se aprecia en la figura 5-15.

La concentración normal de eritrocitos en la sangre es de 4.0 a 5.4 x 10¹²/L en mujeres y de 4.6 a 6.0 x 10¹²/L en hombres adultos.²³ Esta alta concentración en relación a las otras estirpes celulares se evidencia en el frotis sanguíneo al ser la célula predominante, como se observa en la figura 5-12 del presente trabajo, en la que además de abundantes eritrocitos se observan escasas plaquetas y la ausencia de leucocitos.

Si el extendido está hecho correctamente y la zona de revisión es la adecuada y aun así encontramos formas anormales o tamaños variados en un número significativo de eritrocitos, entonces podemos sospechar de alguna alteración como pueden ser las anemias, macrocítica, microcítica o normocítica, que se pueden caracterizar por el tamaño de las células presentes.

Leucocitos

Los leucocitos son células fácilmente identificables como familia pues son los únicos de las 3 estirpes celulares encontradas en sangre periférica que tienen núcleo y en base a la forma de este, y a las características tintoriales de la célula, así como la presencia de gránulos en casi todos ellos es que se les identifica.

En las figuras de la 5-16 a la 5-21 mostradas en la página 116, podemos ver neutrófilos en banda o en cayado, la forma de granulocito mas joven en sangre periférica; se consideran así cuando la escotadura del núcleo es mas grande que la mitad del diámetro del núcleo redondo hipotético,¹⁵ esto se observa claramente en la figura 5-20, aunque los núcleos de estas células presentan escotaduras pronunciadas aún no se dividen en segmentos, como se aprecia en la figura 5-19, en donde a pesar de tener un grado de maduración mayor el núcleo no presenta lóbulos bien definidos como para considerarse segmentado, en las diferentes etapas de maduración la formación de lóbulos en el núcleo se van incrementando, se inicia por dos lóbulos por eso en esta etapa de maduración se dice que los núcleos de estas células tienen forma de herradura o de C,²³ apreciamos esta característica claramente en las figuras 5-16 y 5-18.

En la imagen 5-21 podemos ver dos neutrófilos en banda con un diferente grado de maduración, *se observa la cromatina irregular densa y ya no presentan nucléolos puesto que son células en las que ya no se realizará mitosis,*¹⁵ pero la cromatina aún no es tan densa como en los neutrófilos segmentados, y se ve también la presencia de granulaciones finas neutras, *estas granulaciones son poco afines a los colorantes, se tiñen de color marrón con las coloraciones panópticas habituales, son finas y se distribuyen uniformemente,*²⁸ la presencia de ellas es una característica que permanece en la siguiente etapa de la célula y que es la causa de que sean llamados neutrófilos.

Es probable que se aprecie similitud entre un neutrófilo en cayado con un monocito, pero observando cuidadosamente la cromatina de ambas células, la del monocito es laxa, muy diferente a la mayor condensación que presenta el neutrófilo y este último no presenta el núcleo replegado, característica principal para el monocito. Además de la diferencia de tamaño que hay entre los dos siendo el monocito generalmente mayor.

El neutrófilo en banda como se observa en la figura 5-17 comparado con el tamaño de los eritrocitos es de alrededor de 9 a 15 μm como hace mención McKenzie.

Lo que diferencia a los neutrófilos segmentados de los neutrófilos en banda morfológicamente y los clasifica de este modo, es que la separación del núcleo en lóbulos es evidente, la membrana de un lado y otro están prácticamente unidas dejando visible solo unos delgados puentes de cromatina como se observa en las figuras 5-22 a la 5-27 del apartado 5.1.4.2, el número de lóbulos que presenten, que pueden ser desde 2 hasta 5

considerándose estos últimos no tan comunes, es un indicativo de madurez dentro de los PMN segmentados como podemos verlo en las figuras 5-24 y 5-25.

Estas células pertenecen al grupo de los polimorfonucleares debido a las diversas formas que adoptan sus núcleos, característica visible claramente en la figura 5-26.

Este tipo de célula puede tener una característica bastante peculiar y exclusiva de ellos, y es *la presencia de un pequeño apéndice mucho menor que un lóbulo llamado cuerpo de Barr que logra identificarse en 1 a 5% de los neutrófilos circulantes. Este apéndice contiene la cromatina sexual, constituida normalmente por un cromosoma X heterocromático*^{10,12,15} capturado con claridad en la fotomicrografía 5-23, conocido también como palillo de tambor, es indicativo del género femenino, es decir se presenta solamente en neutrófilos pertenecientes a mujeres, pero no es una regla encontrarlos.

Morfológicamente es común observarlos sin seudópodos en frotis de sangre periférica, *teniendo aquí una tendencia a ser esféricos y no fagocitar*,¹² esto puede observarse en las figuras 5-22 y 5-24, *se convierten fagocíticos cuando tocan un sustrato sólido sobre el cual puedan emitir sus seudópodos, el movimiento ameboide se inicia una vez detectado el gradiente quimiotáctico*, que puede ser tan bajo como 1%, *con un cambio de forma esférica a una forma polarizada y elongada con movimiento*.^{12,16}

Los gránulos neutrófilos pueden observarse en las figuras 5-22 y 5-27 si los comparamos con los eritrocitos eosinófilos y con el núcleo que al ser ácido se comporta como basófilo vemos que estos *se ven de un color marrón o pardo, debido a que estos contienen tanto proteínas catiónicas como aniónicas* y esto no permite que la tinción se defina como acidófila o basófila, siendo la causa de que se les llame neutrófilos.²⁸

Los gránulos azurófilos tienen alto contenido en hidrolasas ácidas especialmente la fosfatasa ácida, así que pueden considerarse lisosomas que contienen diversas enzimas como: la mieloperoxidasa, proteínas catiónicas como la lisozima, proteasas como la proteinasa 3, y contienen mucopolisacáridos sulfatados, los cuales contribuyen al carácter azurófilo.^{4,12,16}

Con la maduración del neutrófilo los gránulos azurófilos aparentemente desaparecen, pero las enzimas como la mieloperoxidasa y la fosfatasa ácida se pueden demostrar aún; lo que sucede entonces es que la azurofilia de los gránulos se ha perdido, pues durante la

*maduración llegan a los gránulos vesículas con mucopolisacaridasas que degradan a estos carbohidratos dejando visibles casi únicamente a los gránulos específicos.*⁴

*En el proceso de fagocitosis se produce la liberación de los gránulos hacia el fagosoma, disuelven su contenido en el interior de la vacuola digestiva y forman el fagolisosoma.*¹⁶ *La lactoferrina es una de las sustancias mas importantes para la acción bactericida, solo se encuentra en gránulos secundarios.*²⁸ *Algunas moléculas contenidas en los gránulos están dotadas de poder bactericida y otras bacteriostático,*¹² *pero el efecto directo del contenido granular es la digestión del microorganismo ya muerto.*

Como se observa en la figura 5-27 el tamaño de los neutrófilos segmentados suele ser entre 9-15 μm .¹⁵

De los PMN podemos ver en las fotomicrografías de la 5-28 a la 5-33 en la página 118, los llamados eosinófilos, debido a la acidofilia o eosinofilia característica de sus gránulos, por la presencia de proteínas catiónicas contenidas en ellos, aunque el tamaño, la uniformidad, el aspecto e incluso el número de estos, debería ser suficiente para detectarlos, el color rojizo-naranja o rosa salmón intenso que ellos adquieren con las tinciones de Romanowsky nos permite clasificarlos con certeza; nótese en la figura 5-31 la coincidencia en la coloración de los gránulos del eosinófilo y de los eritrocitos.

En el centro de cada gránulo hay un cuerpo cristaloides electrodenso, paralelo al eje mayor, también llamado internum, es una estructura cristalina alrededor de la que se encuentran las diferentes enzimas hidrolíticas y otras.^{28,29} *El principal componente del internum es la proteína básica principal (PBP) rica en arginina, que constituye el 50% de las proteínas del gránulo y es responsable de su acidofilia.*¹²

Este PMN tiene capacidad antihelmíntica, donde la agregación de eosinófilos alrededor del parásito tiende a su eliminación por desgranulación externa. Se liberan los gránulos y de esta manera mediante la proteína básica principal (PBP) se produce el ataque al helminto, causándole lisis, ya que esta es citotóxica para protozoarios y helmintos además de que estimula la liberación de histamina de los basófilos y células cebadas lo cual atrae a más eosinófilos.^{12,15}

La zona que rodea al internum es menos densa a los electrones, es rica en fosfatasa ácida, y se denomina externum o matriz; en esta zona se encuentran: la proteína catiónica eosinófila (PCE) que es capaz de matar células de mamíferos y no mamíferos, además

estimula la liberación de histamina en basófilos y células cebadas, la peroxidasa eosinófila (PE), es citotóxica para células tumorales y del huésped, también estimula la liberación de histamina por las células correspondientes y la desgranulación de la mayor parte de las células y también inactiva leucotrienos y la neurotoxina derivada de eosinófilo (NDE), conocida también como proteína X tiene la capacidad de provocar disfunción cerebral y cerebelar en animales e inhibir las respuestas de la célula T aunque de esta se conoce muy poco,^{12,15} todas estas proteínas son responsables de que los gránulos presenten esa característica acidófila que se aprecia en la figura 5-30.

Se observa claramente la diferencia de tamaño respecto a los eritrocitos, esta célula se caracteriza por medir de 12 a 17 μm , como se aprecia en la figura 5-28.

El núcleo llega a verse bilobulado y simétrico como se ve en la figura 5-29, aunque se llega a ver sin simetría, o incluso trilobulado.

Los gránulos presentes son muy abundantes, ocupan todo el citoplasma y eso es también característico de estas células, aunque no tapan ni dificultan la observación del núcleo como podemos percatarnos en las figuras 5-32 y 5-33 en donde además se observan diferentes formas del núcleo constatando que no siempre se encontrara en forma de dos lóbulos perfectamente definidos y simétricos.

Los PMN menos abundantes en frotis de sangre periférica son los basófilos, presentes en las fotomicrografías 5-34 a 5-39 presentadas en la página 119, *solo representan de 0 a 1% de los leucocitos totales.¹² Es común no encontrar basófilos en un recuento diferencial de 100 células, sin embargo el hallazgo de una basofilia es muy importante, ya que con frecuencia indica la presencia de malignidad hemática.¹⁵*

Aunque es mínima la diferencia de tamaño, son los PMN más pequeños, *oscilando entre los 10 y 14 μm ,¹⁵* podemos ver la comparación de tamaño con los eritrocitos como referencia en la figura 5-35.

Una característica mostrada en la figura 5-34 en la que podemos ver a los eritrocitos evidentemente acidófilos y al núcleo del granulocito claramente basófilo, es la metacromasia inconfundible de *los gránulos de estos PMN, se ven de color morado o rojizo violeta oscuros al teñirse con colorantes azules (azul de metileno, azul de toluidina)^{11,28}* los gránulos no coinciden con acidofilia ni con basofilia, son metacromáticos.

Los componentes tisulares capaces de ser teñidos metacromáticamente poseen polianiones de alto peso molecular y agregan las moléculas del colorante en consecuencia el colorante vira. Estos compuestos son en su mayor parte los muy ácidos glucosaminoglucanos sulfatados y la heparina polianiónica.¹¹

Los gránulos basófilos contienen, proteoglicanos sulfatados: condroitín-4-sulfato y heparina (mucopolisacárido ácido) responsables directos de la metacromasia.^{23,28,29}

En la desgranulación, se libera histamina y citocinas (moléculas proinflamatorias), enzimas vasoactivas, broncoconstrictoras y quimioatrayentes (especialmente para eosinófilos). Dicha liberación de mediadores inicia los signos clínicos típicos de la hipersensibilidad inmediata.¹⁵

Debido a una mala fijación en la tinción, los gránulos basófilos llegan a verse escasos puesto que algunos de sus componentes son hidrosolubles, es por eso que pueden estar desteñidos en parte o por completo y aparecer como vacuolas vacías en el citoplasma,²³ como se ve en las figuras 5-36 y 5-38, cuando los portaobjetos se fijan correctamente, pueden verse tan abundantes que se colocan incluso por encima del núcleo voluminoso e irregular.

El núcleo posee generalmente 2 o 3 lóbulos unidos por puentes de cromatina, en ocasiones difíciles de visualizar, dada la presencia de las numerosas granulaciones basófilas que lo cubren²⁸ como se aprecia en la figura 5-39 en donde apenas logran percibirse los delgados puentes de cromatina.

El tamaño de las granulaciones varía entre 0.2 y 1 μ m,²⁸ esto puede notarse al compararlas con las plaquetas presentes también en la figura 5-37, las cuales miden de 2 a 3 μ m.³³ En esta imagen también logra verse la densa cromatina nuclear.

Los leucocitos mononucleares (MN) así llamados por que su núcleo generalmente no se divide en lóbulos, sino que presenta una forma mas regular comparado con el de los polimorfonucleares y el citoplasma no posee granulaciones específicas, pudiendo sin embargo presentar gránulos azurófilos inespecíficos, presentes también en otros tipos celulares; hay dos tipos de células mononucleares: los monocitos y los linfocitos, los primeros los vemos en la página 120 en las fotomicrografías de la 5-40 a la 5-45 en las cuales podemos ver que el núcleo presenta diversas formas, con un aspecto replegado que le es

característico y una cromatina laxa, así como las granulaciones azurófilas de diámetro aprox. a 0.4µm antes mencionadas que se ven claramente en la figura 5-40.

*Esta célula tiene la capacidad de adherirse al vidrio y se expande o envía múltiples pseudópodos lo que da como resultado una amplia variación de tamaño y forma en los frotis de sangre, características que también dependen de su actividad.*¹⁵

Los monocitos carecen de muchos de los potentes sistemas bactericidas del neutrófilo, tienen relativamente poca capacidad fagocítica en circulación hasta que se diferencian como macrófagos a nivel de tejido donde tienen gran importancia como tal en infecciones crónicas, también actúan como depuradores al fagocitar detritos celulares, células propias deterioradas, envejecidas o muertas con el objetivo de mantener la homeostasis del organismo y además se fijan a células tumorales matándolas por efecto citolítico directo.^{22,29}

Observamos en las fotomicrografías 5-41 y 5-45 como una característica normal, la presencia ocasional de vacuolas en el citoplasma que están asociadas a su próxima transformación en macrófago. Así como también los pseudópodos que presenta la membrana celular, visibles en la imagen 5-43 que evidencian su capacidad fagocítica.

Otra característica de los monocitos es que *tienen el citoplasma ligeramente basófilo con aspecto de vidrio esmerilado debido a las finas granulaciones,*¹² como se ve en la figura 5-45, estas granulaciones son ricas en fosfatasa ácida, lisozima, β-glucuronidasa, catepsina y arilsulfatasa, la actividad de la peroxidasa es débil pero existe, lo que significa que estos gránulos son parecidos a los lisosomas de los neutrófilos (gránulos azurófilos) y se sabe que a diferencia de los gránulos específicos de los neutrófilos no contienen fosfatasa alcalina ni lactoferrina.^{15,28} No poseen las proteínas catiónicas bactericidas de los neutrófilos; ni tienen lactoferrina, sin embargo, el sistema mieloperoxidasa-H₂O₂⁻-haluro opera al parecer.²⁹

Es el leucocito de mayor tamaño y esto es notorio en la fotomicrografía 5-44 donde se aprecia la diferencia de tamaño al lado de los eritrocitos. Es también el más difícil de identificar y distinguir de otras células, en ocasiones pueden tener núcleos aparentemente lobulados lo que ocasionaría una posible confusión con un neutrófilo,⁶ sin embargo características de tamaño celular y de condensación nuclear no lo permiten, como podemos ver en la figura 5-42 donde la condensación de la cromatina en este MN es laxa a diferencia

de un neutrófilo que es mayormente condensada y el citoplasma se ve gris azulado opaco, sin presentar los gránulos secundarios color marrón característicos del neutrófilo.

Puede confundirse también con un linfocito grande por que su citoplasma es basófilo, a veces no son claramente visibles sus pequeños gránulos y el núcleo este poco hendido, además de no presentar los pseudópodos o las vacuolas que ayudarían a distinguirlos.⁶ No es una regla que los monocitos tengan todas estas características juntas en una célula aunque si se llegan a presentar, sin embargo se recomienda una observación detallada y tener presentes las características de cada célula para evitar confusiones.

Las 3 especificaciones mas típicas y de mayor utilidad para su identificación que se reúnen en la figura 5-43 son el color gris azulado opaco del citoplasma, los pseudópodos obtusos y los repliegues del núcleo.⁶ Es menos común encontrar monocitos en frotis de sangre periférica, su concentración es de 2 a 11 por cada 100 leucocitos, mientras que el linfocito, se encuentra en una concentración de 18 a 42%.²³ Existen dos tipos de linfocitos maduros morfológicamente idénticos, pero inmunitaria y funcionalmente diferentes, dependiendo de las moléculas localizadas en su membrana, los linfocitos T y los linfocitos B con diversos subtipos, además de los linfocitos T y B existe una tercera variedad, las células NK (natural killer o asesinas naturales), cuando es necesario diferenciar la especificidad T o B de estas células suelen utilizarse anticuerpos monoclonales,^{15,28} ya que es una característica imposible de detectar solo con el microscopio óptico.

Entre estos MN existen algunas diferencias morfológicas la mas notoria es que pueden presentar solo una delgada franja de citoplasma alrededor del núcleo o una mayor cantidad y de esto depende principalmente que se les conozca como linfocitos pequeños o grandes, pero la diferencia morfológica no los agrupa en uno u otro grupo o subtipo, podemos verlos desde la fotomicrografía 5-46 a la 5-57 de los apartados 5.1.4.6 y 5.1.4.7.

Cerca del 60 a 80% del total de linfocitos de la sangre periférica son linfocitos T, los precursores de linfocitos T medulares llegan al timo y sufren un proceso de maduración y adquieren inmunocompetencia, estos se diversifican tardíamente como: T cooperador (T_H) o T citotóxico /supresor (T_C / T_S), posteriormente abandonan el timo y pasan a la sangre periférica y a los órganos linfáticos secundarios transformándose en linfocitos T funcionalmente maduros, los linfocitos B constituyen del 15 al 30% de linfocitos en sangre periférica estos sufren proliferación y diferenciación a célula plasmática secretoras de

inmunoglobulinas en los centros germinales de los tejidos linfoides secundarios y por último la tercera población de células linfoides corresponde al restante 5 a 10% formado por las células NK llamadas comúnmente linfocitos grandes granulares (LGG).^{10,15,28}

Los llamados linfocitos pequeños varían en tamaño entre 7 a 10µm como se aprecia en la figura 5-48 y son los mas comúnmente encontrados, su núcleo tiene el tamaño aproximado de un eritrocito y ocupa cerca del 90% del área celular,¹⁵ observe la figura 5-51, en donde el eritrocito del lado superior derecho es prácticamente del mismo tamaño del núcleo del linfocito, este es esférico y relativamente voluminoso, la cromatina es condensada se dispone en grumos gruesos de modo que el núcleo aparece de un color morado oscuro intenso en las preparaciones, característica que favorece su identificación, como podemos verlo en la figura 5-50 en donde además el citoplasma casi no se ve.

No es común apreciar nucléolos a nivel óptico aunque si pueden estar presentes y se llegan a observar como pequeñas áreas claras,¹⁵ como se pueden ver en las figuras 5-47 y 5-49, debido a que siguen siendo células en proceso de maduración y por lo tanto se espera que sigan llevando acabo la mitosis hasta alcanzar su madurez en los diferentes sitios que le corresponde a cada linfocito, así sea en el timo o en órganos linfáticos secundarios para linfocitos T o en los centros germinales de los tejidos linfoides secundarios en el caso de las células B que se convierten en células plasmáticas, las cuales no es común verlas en sangre periférica.^{15,28}

El citoplasma en esta célula es escaso y se dispone en forma de una estrecha franja perinuclear, es débilmente basófilo tiñéndose en azul claro en los frotis, como se ve en la figura 5-46, a veces no es visible y llegan a estar presentes unos cuantos gránulos azurófilos aunque no es lo común.¹²

Los linfocitos grandes poseen un diámetro aproximado de 11 a 16µm,¹⁵ en ocasiones debido al núcleo que es ligeramente mayor al de los linfocitos pequeños tal como se aprecia en la figura 5-56, siendo además de cromatina menos condensada como se ve en la imagen 5-52, este se sitúa en posición central o algo excéntrica y generalmente la diferencia de tamaño realmente es por una mayor cantidad de citoplasma, nótese estas dos características en la figura 5-53 donde a pesar de ser un poco mayor el núcleo excéntrico lo que realmente lo hace mayor es el citoplasma esto según la descripción de Mc Kenzie.

El citoplasma es de tonalidad débilmente basófila y puede llegar a presentar vacuolas¹⁵ pero esto no es lo común, a veces a pesar de ser abundante es poco visible y se requiere del uso constante del tornillo micrométrico del microscopio, podemos observar esto en la fotomicrografía 5-54 donde se ve con dificultad.

Anteriormente los mononucleares se clasificaban también como agranulocitos, clasificación ya poco usada, debido a que *los monocitos e incluso algunos linfocitos, conocidos como linfocitos grandes granulares pueden presentar gránulos azurófilos los cuales no son exclusivos de estos como podemos ver en la figura 5-55 solo que estos se diferencian de los de las células precursoras de granulocitos por ser negativos a la peroxidasa.*¹²

Los linfocitos alcanzan la madurez con la expresión de receptores, en su membrana, entre un 70% y un 75% expresa la molécula CD4 que constituye la población linfoide que induce o ayuda en la respuesta inmune, conocida como linfocitos T cooperadores estos facilitan la diferenciación de linfocitos B, el 25% a 30% posee el antígeno CD8 que constituye a la población T citotóxica.

La mayoría de los linfocitos CD4 positivos y una proporción de CD8 positivos son de tamaño pequeño y agranulares. El 50% de linfocitos CD8 positivos y una minoría de CD4 positivos presentan la morfología de linfocito grande granular. Los linfocitos grandes granulares de sangre periférica constan de dos poblaciones celulares distintas una CD3 positiva que expresa además el receptor de linfocito T y reordenamiento de los receptores T, y la otra CD3 negativa que son las auténticas células NK que no expresan receptor de célula T ni reordenamiento de los receptores T.²⁸ Por eso se dice que la morfología no es suficiente para clasificarlos y solo se toma en cuenta el porcentaje de linfocitos en general para un conteo diferencial, en un estudio que requiera de mayor detalle son otros los métodos que se utilizan.

Si llega a haber dificultad para identificar a un linfocito grande pensando que podría ser un monocito, otro dato valioso que puede orientar es que los monocitos tienen tendencia a deformar y comprimir células adyacentes, mas que ser deformados por ellas y los linfocitos si pueden ser deformados por estas células vecinas y presentar incluso puntas salientes y prolongaciones agudas como puede observarse en la imagen 4-57.

Plaquetas

El tercer elemento a analizar en un frotis sanguíneo aunque no por eso menos importante, son las plaquetas, se observan en las figuras 5-58 a la 5-63 de la página 123.

Circulan en sangre midiendo aproximadamente 2 a 3 μm de diámetro, tienen forma de disco biconvexo²³ gracias a que contiene varios sistemas de fibras en distintos estados de polimerización (microtúbulos y microfilamentos) que mantiene la forma discoide de las plaquetas y representa el sistema contráctil que participa en el cambio de forma, emisión de pseudópodos, contracción interna y secreción.¹⁶ Son células muy pequeñas en relación a las demás células presentes en sangre periférica, comparamos su tamaño con los eritrocitos en la figura 5-59 donde es evidente la diferencia, además están desprovistas de núcleo³³ característica que comparten con los eritrocitos y que podemos notar en la figura 5-58, se llegan a encontrar solas o en aglomerados debido a su capacidad de agregación¹² apreciable en la figura 5-63, en esta ocasión por medio de la tinción supravital con azul de cresil brillante técnica con que se logran ver plaquetas y leucocitos aunque no sea el método usual para su estudio.

Una persona tiene normalmente de 150 a 450 $\times 10^9/\text{L}$ plaquetas en circulación.³¹ La proporción que se guarda entre los eritrocitos y las plaquetas se observa claramente en la figura 5-60 debiendo observarse de 3 a 10 plaquetas aproximadamente por 100 glóbulos rojos o varias plaquetas y grupos ocasionales por campo, siendo que los eritrocitos se localizan en millones, de 4.0 a 5.4 $\times 10^{12}/\text{L}$ en mujeres y de 4.6 a 6.0 $\times 10^{12}/\text{L}$ en hombre, visto con objetivo de 100X no debe existir menos de una plaqueta por campo,^{2,23,39} en la figura mencionada se observan 16 plaquetas.

La manera de recolectar la muestra con la que se realizó la extensión es un dato importante ya que en frotis realizados a partir de sangre obtenida por punción cutánea es más común encontrar aglomerados debido a la adhesión plaquetaria.

En algunas muestras se llega a presentar un fenómeno llamado satelitis plaquetaria que se refiere a un cúmulo de plaquetas alrededor de los neutrófilos formando un anillo o efecto satélite y es corregible cambiando de anticoagulante al obtener la muestra,²³ este fenómeno llega a ser problema y debe notificarse sobre todo en casos donde el conteo plaquetario se realiza de forma automatizada.

En algunas plaquetas se hacen evidentes dos zonas bien delimitadas, la de las granulaciones azurófilas, localizada mas o menos en el centro llamada cromómero,¹² dentro de la cual encontramos gránulos alfa, densos y lisosomas, esta se ve teñida en púrpura debido a las características ácidas del contenido de estos gránulos y la incolora o clara denominada hialómero, que se observa al microscopio en color azul claro¹² como se observa claramente en las figuras 5-61 y 5-62.

Los gránulos alfa son ricos en macromoléculas con una porción de alta densidad en electrones, la cantidad de gránulos α , determina el valor funcional de la célula.³³ Estos participan en la interacción con otras células a través de la liberación de su contenido, el cual se puede dividir en dos grandes grupos:

a) Proteínas específicas plaquetarias ausentes en el plasma: Factor 4 plaquetario (F4P) conocido también como factor neutralizante de heparina, β -tromboglobulina b) Proteínas idénticas a las del plasma, algunas sintetizadas por el megacariocito: FvW, FV, TSP, entre otras y aquellas no sintetizadas por el megacariocito e incorporadas desde el plasma: fibrinógeno, albúmina. Como proteínas adhesivas además se encuentra: la fibronectina, la P-selectina y la vitronectina.

Como proteínas del sistema hemostático que contienen los gránulos alfa están además del Factor V, el FVIII, FIX, proteína S, cininógeno de alto peso molecular, plasminógeno, PAI-1, α -2-antiplasmina, α -2-macroglobulina, α -1-antitripsina.

Contienen también Factores de crecimiento: PGDF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformador (TGF β) y por último otros componentes como: IgA, IgG, osteonectina, colagenasa, elastasa e inhibidores de proteasas.^{16,31,33,40}

Por otro lado los gránulos densos, se caracterizan por su alta densidad electrónica que le confiere el elevado contenido en calcio y fósforo inorgánico, magnesio, almacenan alrededor de los 2/3 del contenido total de nucleótidos de las plaquetas ATP y ADP, contienen también: serotonina, adrenalina, epinefrina, norepinefrina y dopamina.^{7,16,33,40}

Después de un estímulo fuerte los gránulos alfa y densos se alargan se aproximan a la membrana plasmática, se funden con esta, aumentan de volumen debido a la entrada de agua y esto propicia la liberación de su contenido al medio exterior, ejerciendo su función.

Algunos componentes de los gránulos plaquetarios, influyen sobre otras células, uno de ellos es el PDGF, que estimula la proliferación celular y juega un papel importante en la

cicatrización de heridas, el TXA₂ y la serotonina, son potentes vasoconstrictores, que facilitan todavía más el complejo proceso de hemostasia y el inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1), que tiene acción antifibrinolítica.^{7,33}

Por último *los lisosomas. almacenan enzimas hidrolasas, estos son ricos en fosfatasa ácida, arilsulfatasa, β-glucuronidasa, entre otras, a diferencia de lo que ocurre en otras células no se ha encontrado la función de digestión en su interior, por lo que constituirían lisosomas primarios que secretan su contenido durante la activación de la plaqueta.*^{16,40}

Las tres familias celulares en sangre observadas al microscopio en el hemocitómetro.

Para la identificación de las imágenes celulares obtenidas del hemocitómetro, se requiere de mayor experiencia, debido a que se observan en 400X o 100X y se dificulta un poco, debe tenerse mucho cuidado en la observación de detalles que nos aseguren que estamos contando las células que corresponden en cada caso y no contar detritos u otro tipo de célula. Observamos en la página 124 las figuras 5-64 y 5-65 vistas en el menor aumento del microscopio óptico utilizado (40X), que se ve claramente la red de conteo, cuadrados primarios, central y parte de los periféricos aunque este aumento no es conveniente para contar células ya que no se verían claramente.

En la figura 5-66 con el objetivo de 10X (aumento 100X) se distinguen bien los cuadrados medianos o secundarios del cuadrado grande central y en la 5-67 los 16 cuadrados secundarios de uno de los cuadrados primarios periféricos en los cuales se hace el conteo de leucocitos a este aumento, por último en la figura 5-68 con aumento de 400X que es el máximo que se utiliza al observar en el hemocitómetro, podemos ver uno de los cuadrados secundarios del cuadrado primario central que es uno de los que se utilizaría para conteo de eritrocitos y plaquetas. En tanto que en la figura 5-69 se aprecia un cuadrado secundario para el conteo de leucocitos.

Las fotomicrografías siguientes del hemocitómetro ya cargado con muestra sanguínea, nos permiten ver que el mejor aumento para contar los eritrocitos es el de 400X, como se puede apreciar al comparar la figura 5-70 en aumento de 100X, y la imagen 5-71 en aumento de 400X en la cual podemos contar sin dificultad 84 eritrocitos tomando en cuenta las reglas de conteo, es decir se cuentan todas las células dentro de una zona de medición definida (cuadrado secundario), también se cuentan las células, que se apoyan o tocan la línea central de 2 laterales, por ejemplo en la lateral izquierda y superior, pero no se cuentan las

células de los laterales derecho e inferior a pesar de que toquen la línea intermedia este conteo esta dentro de lo normal, ya que recordemos que este solo es un cuadrado y se leen 5 iguales. El procedimiento habitual utilizado anteriormente con el diluyente de Hayem no ofreció ninguna dificultad y nos permitió observar claramente las células. Lo que en el caso de los eritrocitos ha hecho que se evite el conteo de forma manual es que por la gran cantidad de estos, se llegan a cometer errores al cuantificar, además de que se cuenta con datos muy valiosos asociados a la estirpe eritroide como es el hematocrito (Hto) y la hemoglobina (Hb), que sirven de apoyo para el diagnóstico correspondiente. La imagen 5-72 es un corte amplificado de un cuadrado pequeño en el cual se cuentan 4 eritrocitos, esta se presenta con el único fin de permitir al consultante observar las células eritrocitarias con mayor detalle.

El aumento pertinente del microscopio para el conteo de leucocitos es a 100X, es decir con el objetivo de 10X, sin embargo, si se tiene duda es posible pasar momentáneamente al objetivo de 40X como en la figura 5-74, solo para verificar que lo que se observa no sea un detrito sino un leucocito ya que a ese aumento se llega a ver mejor la morfología, incluso los segmentos del núcleo, para verlo mas a detalle se presenta la figura 5-75 que es un corte amplificado de la imagen 5-74 en donde se nota perfectamente que el leucocito es un segmentado, el observarlo a 400X sería mucho mas tardado y no vale la pena, el aumento a 100X es suficiente. Nótese en la figura 5-73 obtenida a 100X, que en ese cuadrado primario se encuentran 55 leucocitos. El caso del conteo manual de leucocitos presentó mayor problema ya que el diluyente contenía demasiado colorante y con precipitado así que se optó por utilizar el ácido acético sin este y esto ayudó a disminuir la presencia de detritos, aunque las células no se tiñeron fue mejor para la observación.

En el caso de las plaquetas el conteo puede resultar mucho mas complicado ya que son células muy pequeñas *de aproximadamente 2 a 3 μ m de diámetro*,³³ cercanas al límite de resolución del microscopio, debido a que *los microscopios ópticos modernos tienen un límite de resolución de 0.2 a 0.4 μ m*^{5,12} y esto dificulta su observación sin embargo una característica muy útil es que son refringentes debiéndose utilizar continuamente el tornillo micrométrico al realizar el conteo. El diluyente no fue un problema, el único inconveniente es que se llegan a observar los “fantasmas de eritrocitos”, en la figura 5-77 es un corte con zoom de la figura 5-76 en la que no se observa con detalle las características de las

plaquetas, sin embargo es suficiente para su cuantificación, en tanto que para apreciar detalles morfológicos es adecuado el frotis sanguíneo teñido con Wright.

Sin duda el profesional que haga la revisión de extensiones sanguíneas y del hemocitómetro debe contar con la capacitación precisa para asegurar la certeza en la identificación celular, con los beneficios que implica esto para el paciente estudiado.

7.0 CONCLUSIONES.

-Las imágenes obtenidas y digitalizadas, que se presentan, son representativas de las características de cada estirpe celular, presentes de manera normal en un frotis sanguíneo incluyendo detalles morfológicos que se encuentran solo ocasionalmente.

-La composición química de las diferentes células sanguíneas esta claramente relacionada con las características morfológicas y tintoreales observadas en los frotis sanguíneos y a su vez con la funcionalidad de cada una de las células.

-La caracterización de las estirpes celulares por medio de las fotomicrografías en el hemocitómetro resulta de gran utilidad para evitar errores en los recuentos celulares.

-La realización correcta de las extensiones sanguíneas y su tinción adecuada es determinante para la evaluación celular microscópica de cada una de las muestras, obtenidas.

-La elección de los tiempos de tinción fueron las indicadas puesto que la coloración de las 3 estirpes permitió la observación de detalles celulares fácilmente.

-La conservación de un microscopio de campo claro en condiciones adecuadas y su uso correcto permite una mejor caracterización de las estirpes celulares.

-Es indispensable para la formación del químico clínico, conocer ampliamente la morfología, características tintoreales, composición química y funciones de las células sanguíneas normales para poder identificar cualquier anomalía presente en estas y ofrecer un apoyo al diagnóstico.

-A pesar de que los procedimientos de conteo celular usando el hemocitómetro, tienen poca aplicación actualmente, el conocimiento de estos métodos siempre será de utilidad para corroborar resultados dados por los equipos automatizados o cuando estos por cualquier circunstancia no funcionen y no se puedan reparar de inmediato.

APÉNDICE DE REACTIVOS.

Diluyente Turck para conteo de leucocitos.

Ácido acético glacial	2ml
Agua destilada c.s.p.....	100ml
Cristal violeta 1%	1ml

Si no es transparente la solución fíltrese, guárdese en frasco ámbar.

Diluyente Hayem para conteo de eritrocitos. (Z, z4)

Bicloruro de mercurio	0.5g
Sulfato de sodio	5.0g
Cloruro de sodio	1.0g
Agua destilada	200ml

Solución de oxalato de amonio al 1% para el conteo de plaquetas.

Oxalato de amonio	1.0 g
Agua destilada	100 ml

Se debe conservar en el refrigerador a 4°C y filtrarse con frecuencia y se deshecha cuando aparece turbidez.

Colorante cristal violeta.

Cristal violeta	10g
Alcohol al 95%	100ml

Solución Wright para tinción de frotis sanguíneo.

Colorante Wright certificado en polvo	0.3g
Metanol (libre de acetona).....	97.0ml
Glicerol	3.0 ml

Triturar el colorante en polvo certificado, con el glicerol agregando pequeñas cantidades de metanol absoluto (libre de acetona) hasta el total indicado guárdese en un frasco color caramelo.

La evaporación del alcohol producirá un precipitado en las laminillas, si esto ocurre agréguese 2 ml de metanol por 10 ml de la solución colorante.

El colorante comercial líquido ya preparado, puede dejarse “madurar “ para obtener un mejor resultado, esto es dejando evaporar un poco el alcohol del colorante.

Amortiguador para tinción de Wright.

Fosfato de potasio dihidrogenado (KH ₂ PO ₄).....	2.10g
Hidrofosfato disódico (Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O).....	3.76g
Agua destilada c.s.p.....	1000ml

Ajustar al pH indicado para tinciones de Wright.

Tinción supravital.

Nuevo azul de metileno.

nuevo azul de metileno	0.5g
agua destilada	100ml
oxalato de potasio	1.6g

Azul de cresil brillante.

Azul de cresil brillante	1g
solución salina al 0.9%	100ml
citrato sódico ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)	0.4g

Se filtra antes de su uso.

GLOSARIO.

Aberración cromática: Irisaciones que acompañan a las imágenes cuando se observan con luz blanca a través de medios refringentes, a causa de las diferencias de índice de refracción para las diversas radiaciones del espectro.

Aberración esférica: Aberración de esfericidad es la que ocurre en la refracción a una superficie esférica en la cual los rayos periféricos y paraxiales focalizan a lo largo del eje en puntos diferentes.

Acromático: Medio transparente que transmite la luz blanca sin descomponerla en sus radiaciones simples.

Aloinjerto: Transferencia de un tejido entre dos individuos de la misma especie pero genéticamente diferentes, como en los trasplantes realizados entre dos seres humanos que no son gemelos idénticos.

Anergia: Tolerancia inmunitaria específica que puede ser reversible en la que el linfocito pierde la capacidad de respuesta funcional.

Anérgico: Relativo a la anergia, o caracterizado por esta.

Anticuerpo: Molécula producida por los animales en respuesta a un antígeno la cual tiene la propiedad particular de combinarse específicamente con el Ag que ha inducido su formación.

Antigénica: Alergénico, inmunogénico; que posee las propiedades de un antígeno (alérgeno).

Antígeno: Cuerpos extraños (moléculas grandes, virus, etc.) que inyectados a un organismo dan origen a la formación de anticuerpos uniéndose a los cuales producen sustancias inocuas.

Apocromático: Dícese de un sistema óptico corregido de aberración cromática, disponiendo un solo foco para tres colores.

Apoptosis: Muerte celular programada que provoca fragmentación nuclear y condensación del citoplasma, membranas plasmáticas y organelas en los cuerpos apoptóticos.

Aterogénesis: Formación de ateromas (depósitos de lípidos en la capa intima de las arterias que produce una tumefacción amarillenta sobre la superficie endotelial), importante en la patogénesis de la aterosclerosis.

Bactericida: Destruye, aniquila bacterias.

Bacteriostático: Detención del desarrollo o impedimento de la multiplicación de las bacterias.

Coagulación: Precipitación de los coloides en forma de masas amorfas, producida por el calor, por agentes químicos o por agentes biológicos. Se aplica principalmente a las proteínas contenidas en líquidos orgánicos, como la sangre o la leche.

Coagulante: Agente que causa, estimula o acelera la coagulación, especialmente con referencia a la sangre.

Cromógena: (del griego chrôma, color y gennân, producir) Principio o sustancia que puede dar origen a una materia colorante, aunque el mismo sea incoloro.

Diapédesis: (forma prefija del griego dia, a través, y pédessis, salto) Paso de los elementos figurados de la sangre especialmente de los leucocitos, a través de las paredes integras de los vasos.

Eliptocitosis: Ovalocitosis, anomalía hereditaria relativamente rara de la hemopoyesis en la cual el 50 al 90% de los glóbulos rojos tienen forma bacilar y elíptica, asociada con frecuencia con anemia hemolítica.

Enucleación: Remoción o destrucción del núcleo de una célula.

Eritroblasto: Término genérico que incluye todos los tipos de eritrocitos nucleados, los cuales no se encuentran normalmente en sangre periférica.

Esferocitosis: Presencia de glóbulos rojos esféricos en la sangre, en la anemia hemolítica familiar.

Evaginación: Protrusión de alguna parte u órgano de su posición normal.

Factor activador de plaquetas (PAF): Factor liberado por los basófilos que provoca la agregación plaquetaria.

Factor de necrosis tumoral (TNF): Citosina liberada por macrófagos activados que esta estructuralmente relacionada a linfoquinas liberadas por linfocitos T activados.

Fagocito: Célula del organismo que tiene la propiedad de englobar microorganismos, células o cuerpos extraños.

Fagocitosis: Fenómeno que consiste en el englobamiento y destrucción de partículas sólidas, organizadas o inertes, por los fagocitos.

Granzimas: Esterasas de serina presentes en los gránulos de linfocitos T citotóxicos y células NK. Inducen apoptosis en la célula blanco a través de canales de perforinas insertados en la membrana de la célula blanco por el linfocito citotóxico.

Hemostasia: Hemostasis; Detención de una hemorragia ya sea por las propiedades fisiológicas de vasoconstricción y coagulación o por medios quirúrgicos.

Homeostasis: Tendencia de los sistemas biológicos a mantener condiciones relativamente constantes en su medio interno, se cumple mediante un sistema de mecanismos de control activados por retroalimentación negativa. Mediante estos mecanismos el organismo mantiene por ejemplo la temperatura corporal, el pH, la concentración hormonal y presión osmótica dentro de los límites fisiológicos y en consecuencia el medio celular se mantiene dentro del ambiente normal que permite la vida.

Hipotónico: Dícese de una disolución que tiene menor presión osmótica que otra.

ICAM-1 (ICAM-2, ICAM-3) Moléculas de adhesión intercelular: Moléculas encontradas en la superficies celulares de una variedad de linfocitos y células no hematopoyéticas que interactúan con LFA-1

Idiotipo: Determinante antigénico idiotípico; determinante que confiere a una molécula de inmunoglobulina una "individualidad" antigénica análoga a la "individualidad" de la actividad de anticuerpo de esa molécula. El idiotipo parece reflejar las propiedades antigénicas del receptor (sitio de combinación) que confiere especificidad de actividad de anticuerpo.

Interferón: Grupo de moléculas implicadas en señales entre las células del sistema inmune y en la protección contra infecciones virales.

Interleucinas (IL-1 – IL-22): Grupo de moléculas implicadas en señales entre las células del sistema inmune.

Ionóforo: Compuesto o sustancia que forma un complejo con un ión, generalmente un catión pequeño, como Na⁺ o Ca²⁺ y lo transporta a través de una membrana.

Isotipo: Determinante (marcador) antigénico que existe en todos los miembros de una subclase de una clase de inmunoglobulinas. Mientras que un marcador o determinante

alotípico dado existe en una sola subclase un marcador antigénico isotípico en una subclase puede existir también como marcador alotípico en otra subclase.

Isotónico: Solución que tiene la misma presión osmótica que otra solución por ejemplo la sangre humana y una solución salina fisiológica.

LFA (Leucocyte Functional Antigens): Un grupo de 3 moléculas que median la adhesión intercelular entre leucocitos y otras células de una manera no antígeno- específica.

Lisosoma: Organela citoplasmática que consiste en un saco de enzimas líticas limitado por membranas.

Metacromasia: (forma prefija del griego metá, más allá, junto a, entre, con y del griego chrôma, color) Fenómeno por el cual ciertas sustancias colorantes cambian su propio color en contacto con otras sustancias o elementos; inverso a la ortocromasia.

Mitógena: Dícese de la sustancia que estimula las células para que sufran mitosis.

Oponina: Anticuerpo u otro componente del suero que cuando se combina con un antígeno particulado (por ej. una bacteria) lo hace mas fácilmente fagocitable.

Opsonización: (opsonificación): Aumento artificial del índice opsónico; proceso por el que un antígeno particulado se combina con las opsoninas para hacerlo mas asequible a la fagocitosis.

Ortocromático: En histoquímica dícese de la tintura de un tejido con un colorante, que produce un complejo colorante-tejido con el mismo color y efecto de absorción que el colorante mismo.

Ovalocitosis: V. Eliptocitosis.

Panóptica: (forma prefija del griego pân, pân, todo y optikós de optós, visible) Propio para hacerlo todo visible se aplica a colorantes que diferencian todos los elementos de una preparación.

Perforinas: Moléculas contenidas en los gránulos de los linfocitos citotóxicos, homólogos a la molécula C₉ del complemento, actúa formando poros en la membrana de la molécula diana.

Peroxisoma: Vacuola citoplasmática pequeña, electrodensa, limitada por membrana, encontrada en la mayoría de las células. Contiene peroxidasa, catalasa y oxidasa y están implicadas en reacciones catabólicas que liberan peróxido de hidrógeno.

Pinocitosis: (del griego pínein, beber, Kytos, cavidad y osis producción o aumento) Fagocitosis de gotitas de líquido por parte de una célula.

Pirógeno: Agente que causa aumento de temperatura. Son producidos por bacterias, mohos, virus y levaduras y se encuentran generalmente en el agua destilada.

Piropoiquilocitosis: Trastorno congénito recesivo caracterizado por hemólisis grave, formas irregulares de los eritrocitos y sensibilidad de las células de la sangre a la fragmentación in vitro tras variaciones de temperatura menores.

Policrómatico: Multicolor; que muestra muchos colores.

Policromía: Aumento de la pigmentación de cualquier parte del cuerpo.

Poliploide: Relativo a un incremento en el número de cromosomas (y por extensión, al contenido de ADN nuclear) por múltiplos de valor en las células diploides posmitóticas.

Quelación: Proceso por el cual dos o mas grupos químicos pertenecientes a una misma molécula ceden un par de electrones cada uno a un ión metálico. El número de pares de electrones compartidos depende del denominado número de coordinación del ión, que es habitualmente de seis para los iones metálicos de importancia biológica (hierro, manganeso, etc.).

Quelar: Capacidad de fijar y retener iones de carácter metálico o semimetálico por quelación.

Quimiotaxis: Tendencia de las células a moverse en dirección determinada por la influencia de estímulos químicos, calificada de positiva o negativa, según si la sustancia que ejerce dicha influencia las atraiga o las rechace.

Senescencia: Acción y efecto de envejecer.

Seudópodo: Prolongación protoplásmica temporaria emitida por una fase ameboidea o protozoario amébico con fines de locomoción o de presión de los alimentos.

Sinérgica: Cooperación en el efecto; se puede aplicar a la acción conjunta de varios órganos o al efecto de un medicamento formado por la mezcla de varios productos.

REFERENCIAS.

- 1.- Abul K. Abbas, et al. Inmunología celular y molecular. 5^a ed. Madrid, España: Ed. Mc GRAW-HILL Interamericana; 2004. p. 24, 288-293.
- 2.- Bick L R, et al. Hematology Clinical and Laboratory Practice vol. I y II. United States of America: Ed. Mosby; 1993. p. 9, 186, 187, 343.
- 3.- Brown A B, Hematology Principles And Procedures. 6^a ed. Estados Unidos de América: Ed. LEA & FEIGER; 1993. p. 63, 79-81, 89-96, 100-104.
- 4.- Carrillo-Farga J, Hematología casos clínicos. 2^a ed. México D.F: Ed. Interamericana Mc Graw _Hill; 1992. p. 9, 24-30.
- 5.- Casartelli, Microscopía teórico-práctica. España: URMO, S.A; 1974. p. 20-27, 65-89
- 6.- Diggs L W, Sturm D, Bell A, La morfología de las células de la sangre humana. North Chicago U.S.A: ABBOTT LABORATORIES; 1971. p. 6-8,11.
- 7.- Ganong W F, Fisiología Médica. 20^a ed. México D.F: Ed. El Manual moderno S.A. de C.V; 2006 p. 499-507, 558.
- 8.- García Conde J, et al. Hematología. Madrid España: Arán Ediciones S.L; 2003. p. 1217-1238.
- 9.- Garrido Fariña G I, Cornejo Cortés M A, Salinas Jiménez E, Manual de colorantes para laboratorio de ciencia básica. 1^a reimp. México D F: Universidad Nacional Autónoma de México (Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán); 2005. p. 31-35.
- 10.- Gartner P L, et al. Texto, atlas de histología. 2^a ed. México D.F: Ed. Mc Graw-Hill Interamericana; 2002. p. 213-229.
- 11.- Geneser F, Histología. 3^a ed. Buenos Aires Argentina: Ed. Médica Panamericana S.A; 2000. p. 40, 239-243
- 12.- Junqueira & Carneiro, Histología básica texto y atlas. 5^a ed. Barcelona España: Ed. Masson, S.A; 2000. p. 4, 221-225, 233-235, 242-246.
- 13.- Kurpp M A, et al. Diagnóstico clínico y de laboratorio. 8^a ed. México DF: Ed. El manual moderno; 1986. p. 140-156.
- 14.- Lynch J M, et al. Métodos de laboratorio Vol I y II. 2^a ed. México D.F: Ed interamericana; 1977. p. 696-702, 708-716, 721-728, 756-757.
- 15.- McKenzie, Shirlyn B, PHD, CLS, Hematología clínica. 2a ed. México D.F: Ed. El manual moderno; 2000. p. 3, 42, 43, 69-106.

- 16.- Mezzano-Abedrapo D, Pereira G J, et al. Fisiología de la sangre. 2ª ed. Chile: Ed. Ediciones Universidad Católica de Chile; 1997. p. 14, 15, 37, 38, 53, 58-60, 145-149.
- 17.- Miale John B, Hematología Medicina del laboratorio. 6ª ed. España. Ed. REVERTÉ S.A.; 1985. p. 887
- 18.- Nicoll D, et al. Manual de pruebas Diagnosticas. 4ª ed. México D.F: Ed. El Manual Moderno; 2004. p. 206.
- 19.- Olivares Gordillo D, Hematología: Patologías y Pruebas Diagnósticas. 8ª ed. España: Ed. Logoss, S.L; 2005. p. 263-268.
- 20.- Peñuela O A, "Hemoglobina: una molécula modelo para el investigador." (Corporación Editora Médica del Valle Colombia Médica), Colomb Med, vol.36 num. 3, Colombia, Julio–Septiembre 2005, p. 215-225.
- 21.- Rapaport I S, Introducción a la hematología. 2ªed. Barcelona España: Ed. SALVAT Editores S.A; 1988. p. 119-123, 440-456.
- 22.- Regueiro-González J, et al. Inmunología Biología y Patología del sistema inmune. 3ª ed. Madrid España: Ed. Médica Panamericana; 2002. p. 9-12, 31, 37-39, 121-125.
- 23.- Rodak Bernadette F, Hematología Fundamentos y aplicaciones clínicas. 2ª ed. Buenos Aires Argentina: Ed. Médica Panamericana; 2005. p. 110-112, 125-126, 131-133, 156-160, 174-184, 203.
- 24.- Roitt I M, Inmunología fundamentos. 10ª ed. Buenos Aires Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2003. p. 3, 167, 168
- 25.- Rubio F, et al. Fundamentos y técnicas de análisis hematológicos y citológicos. Madrid España: Ed. THOMSON PARA NINFO; 2004. p. 46, 58-59, 75, 269, 276-277, 280-281.
- 26.- Ruiz Reyes G, Fundamentos de interpretación clínica de los exámenes de laboratorio. México D.F: Ed. Panamericana; 2004. p. 82.
- 27.- Sánchez-López J Y, et al. "Fundamentos biológicos, bioquímicos y genéticos de la esferocitosis hereditaria." (División de genética, centro de investigación biomédica de occidente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México), Bol. Med. Hosp. Infant. México vol. 60, Guadalajara, Jal., México, julio-agosto 2003, p. 431-445.
- 28.- Sans-Sabrafen J, et al. Hematología clínica. 4ª ed. Madrid España: Ed. ELSEVIER SCIENCE; 1995. p. 12-33, 69, 72.
- 29.- Stites P D, Parslow-Tristram G, et al. Inmunología básica y clínica. 10ª. ed. México D.F: Ed. El Manual Moderno; 2002. p. 33-35, 45-49, 69–84, 103-119, 204-215, 407.

30.-Thompson A, Hillman R, Boggs D, Manual de Hematología. 2ª ed. México D.F: Ed. El manual moderno; 1998. p. 255.

31.- Turgeon M L, Hematología clínica. Teoría y procedimientos. México: Ed. Manual Moderno; 2006. p. 367.

32.- Williams J W, et al. Hematología Tomo I y II. Barcelona España: Ed. Salvat S.A; 1975. p. 62, 73-76, 1386, 1392-1393.

33.- García-Mesa M, Coma-Alfonso C, "Características estructurales y funcionales de las plaquetas." (Departamento de Bioquímica. Instituto Nacional de Angiología y Cirugía Vascular. Calzada del Cerro No. 1551 Ciudad de La Habana, Cuba.), Rev Cubana Angiol y Cir Vasc 2000;1(2):132-41

En línea: <http://bvs.sld.cu> o <http://www.bvscuba.sld.cu/html/es/home.html>
http://www.bvs.sld.cu/revistas/ang/vol1_2_00/ang08200.htm

34.- González Hernández A, Comité Editorial de Saludalia. Diciembre de 2000
En línea:http://www.saludalia.com/Saludalia/web_saludalia/pruebas_diagnostics/doc/a_sangre.htm

URL:<http://www.saludalia.com/Saludalia/web>

35.- Izaguirre-Avila R, "Historia de la Medicina. El descubrimiento de las plaquetas." (Departamento de Hematología, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"), México, D.F. Julio-Septiembre, Rev Biomed 1997;8(3):197-208.

En línea: <http://www.uady.mx/~biomedic/revbiomed/pdf/rb97837.pdf>
<http://www.imbiomed.com.mx/Uay/Yuv08n3/espanol/Wyu73-06.html>

36.- Izaguirre-Avila R, De Micheli A, "Evolución del conocimiento sobre la sangre y su movimiento parte II. El saber sobre su composición. Iatroquímica de la sangre." (Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez.), México, D.F. Enero – Febrero, Revista de investigación Clínica 2005;57(1):85-97.

En línea: www.lmbiomed.com.mx

<http://new.medigraphic.com/cgi-bin/contenido.cgi?IDREVISTA=77&IDPUBLICACION=742&NOMBRE=Revista%20de%20Investigaci3n%20Cl3nica>

37.- Maximo Giglio J, "La Formación de los glóbulos rojos." (Facultad de Odontología Universidad de Buenos Aires . (EPO)), Buenos Aires Argentina, Febrero- Marzo, Rev. de Divulgación Científica y Tecnológica de la Asociación Ciencia Hoy, feb/mar, 1989;1(2)

En línea: <http://www.ciencia-hoy.retina.ar/hoy02/globulosrojos.htm>

<http://www.cienciahoy.org.ar.htm>

38.- Peñafiel E C (Docente Encargado), "La Sangre". Histología general. Universidad de Chile Facultad de odontología; Apuntes de apoyo, trabajo teórico dirigido;2004

En línea: <http://odontologia.uchile.cl/departamentos/patologia/histologia/index.htm>

39.- Muñoz Zambrano M, Morón Cortijo C, Manual de procedimientos de laboratorio en técnicas básicas de hematología. Ministerio de salud. (Instituto Nacional de Salud) Lima Perú 2005 centro de producción editorial e imprenta de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos p. 41, 60, 61, 81-83.

En línea: www.ins.gob.pe

<http://www.scribd.com/doc/28283/manual-hematologia>

40.- Vizcargüénaga M I, "Síndrome de pool de depósito. Revisión. Presentación de estudios de laboratorio." Acta Bioquím Clín Latinoam., jul/sep. 2006;40(3):327-34. ISSN 0325-2957.

En línea: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325

<http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/src/inicio/IndArtRev.jsp?iCveNumRev=5991&iCveEntRev=535>

41.- Orozco M, Barragán V, Gallo D, Ortega C, "Propiedades químicas de la eosina y el azul de metileno en la tinción celular vegetal." VI FERIA DE LA QUÍMICA.

En línea: http://www.prof.uniandes.edu.co/~infquimi/VI_feria/id57.htm

42.- http://www.superior.de/pgr06_info_s.htm

43.- <http://es.wikipedia.org/wiki/Eritrocito>

44.-

<http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/contajecelular.htm#camara%20de%20Neubauer>

45.- <http://www.geocities.com/bio135a/microscop.htm>

Prof. Fidel Jaramillo Microscopía parte I y II

46.- <http://www.joseacortes.com/practicas/microscopio.htm>

47.- <http://www.monografias.com/trabajos5/microsc/microsc.shtml>

48.- <http://web.udl.es/dept/medicina/citoweb/hemato/tecnica/tinc.htm>

49.- <http://www.segulab.com>

50.- <http://www.ujcm.edu.pe/diccionario/buscar.php>

51.- Barcelo J R, Diccionario Terminológico de química. 2ª ed. Madrid España: Ed. Alhambra; 1982.

52.- Bennington J L, Diccionario enciclopédico de Laboratorio clínico. Buenos Aires Argentina: Ed. Médica Panamericana; 1991.

53.- Hawley G, Diccionario de Química y productos químicos. Barcelona España: Ed. Ediciones omega S.A; 1993.

54.- Navarro Beltrán E, et al. Diccionario terminológico de ciencias médicas. 13^a ed. México D.F: Ed. Salvat; 1994.

55.- Stedman T L, Diccionario de ciencias médicas I y II. 25^a ed. Buenos Aires Argentina: Ed. Médica Panamericana; 1993.