



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

DELEGACIÓN SUR DEL DISTRITO FEDERAL

UMAE HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CMN SIGLO XXI

TÍTULO

ESTUDIO SISTEMÁTICO DE LAS CÉLULAS ESTROMALES  
MESENQUIMALES EN BIOPSIAS DE MÉDULA ÓSEA DE PACIENTES CON  
SÍNDROME MIELODISPLÁSICO Y LEUCEMIAS AGUDAS.

TESIS QUE PRESENTA

DRA. FANY GABRIELA JUÁREZ AGUILAR

PARA OBTENER EL DIPLOMA

EN LA ESPECIALIDAD EN

ANATOMÍA PATOLÓGICA

ASESOR: DRA. ROCÍO LORENA ARREOLA ROSALES

ASESOR METODOLOGICO: DRA. EUGENIA FLORES FIGUEROA



MEXICO, DF.

---

FEBRERO 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

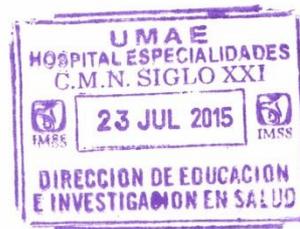
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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



DOCTORA

DIANA G. MÉNEZ DÍAZ



JEFE DE LA DIVISIÓN DE EDUCACIÓN EN SALUD  
UMA E HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CMN SIGLO XXI



DOCTORA

ROCÍO L. ARREOLA ROSALES

PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE ESPECIALIZACIÓN EN ANATOMÍA  
PATOLÓGICA

UMA E HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CMN SIGLO XXI



DOCTORA

ROCÍO L. ARREOLA ROSALES

ESPECIALISTA EN ANATOMÍA PATOLÓGICA

UMA E HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CMN SIGLO XXI



**Dirección de Prestaciones Médicas**  
Unidad de Educación, Investigación y Políticas de Salud  
Coordinación de Investigación en Salud



"2014, Año de Octavio Paz".

**Dictamen de Autorizado**

Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud 3601  
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES DR. BERNARDO SEPULVEDA GUTIERREZ, CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI,  
D.F. SUR

FECHA **19/12/2014**

**DRA. ROCÍO LORENA ARREOLA ROSALES**

**P R E S E N T E**

Tengo el agrado de notificarle, que el protocolo de investigación con título:

**Estudio sistemático de las células estromales mesenquimales en biopsias de médula ósea de pacientes con síndrome mielodisplásico y leucemias agudas.**

que sometió a consideración de este Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud, de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores, cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de Ética y de investigación, por lo que el dictamen es **A U T O R I Z A D O**, con el número de registro institucional:

Núm. de Registro
R-2014-3601-214

ATENTAMENTE

**DR. (A) CARLOS FREDY CUEVAS GARCÍA**  
Presidente del Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud No. 3601

**IMSS**  
SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres y hermanos por todo el cariño que siempre me han mostrado y que es bien correspondido, que me brindaron todo su apoyo para que estos años en el hospital fueran posibles y siempre me alentaron a seguir adelante.

A mi hijo tan importante en mi vida y que tanto amo, por aguantar mis ausencias y aun así recibirme siempre con mucho gusto y cariño.

A la Dra. Rocío Arreola a quien de verdad aprecio mucho, que siempre ha sido un apoyo para mí, no solo como maestra, también como consejera, por su comprensión cada vez que puede ayudarme en mis problemas y por su enseñanza en mi carrera.

A la Dra. Eugenia Flores por sus enseñanzas, su tiempo y apoyo para la realización de este proyecto, a ella le debo la idea de este trabajo.

Al biólogo Damián Sánchez Ramírez por su tiempo y ayuda.

A mi compañera de generación y amiga Jennifer Anda por darme ánimos, por su compañía y apoyo incondicional.

Al histotecnólogo Juan Contreras que me apoyo con todos los cortes y tinciones necesarias para poder realizar este trabajo.

A Dios, por la vida, mi familia, mi trabajo y todo lo que ha permitido tener y hacer.

## ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	7
OBJETIVOS	8
MATERIALES Y MÉTODOS	9
VARIABLES	10
ESTRATEGIA DEL ESTUDIO	13
RESULTADOS	22
DISCUSIÓN	36
CONCLUSIONES	41
BIBLIOGRAFÍA	42
ANEXOS	45

## RESUMEN

**Introducción:** La médula ósea es un tejido complejo conformado por células hematopoyéticas en sus distintos estados de maduración; y el estroma medular, que tiene su origen en una célula troncal/estromal mesenquimal (MSC; por sus siglas en inglés). Las MSC son capaces de mantener la hematopoyesis y se pueden diferenciar en tejido adiposo, cartílago, hueso, tejido fibroso y estroma de mielosoporte. Se ha demostrado que las células progenitoras, tienen distintos requerimientos del estroma en Síndrome Mielodisplásico y Leucemias Agudas, sin embargo, la evaluación de médula ósea se enfoca al compartimento hematológico, del estroma medular la fibrosis es la única. **Objetivos:** Establecer un método sistemático para el estudio de las células estromales mesenquimales en biopsia de médula ósea de pacientes con síndrome mielodisplásico y leucemias. **Materiales y Métodos:** Biopsias de médula ósea del archivo de patología en el hospital de Especialidades Centro Médico Nacional siglo XXI cuyo estudio histopatológico tenga el diagnóstico de Síndrome Mielodisplásico, Leucemia Mieloide Aguda y Leucemia Linfoblástica Aguda, en el periodo de marzo del 2013 a marzo del 2015. **Resultados.** Se seleccionaron 133 casos, 50 de SMD, 47 de LLA y 36 de LMA. Se comparó la decalcificación con ácido y con EDTA, teniendo el segundo calidad superior del 5%. Del total de casos se seleccionaron 70 para realizar inmunohistoquímica para células estromales mesenquimales con el marcador NGFR, valoramos la densidad de células estromales, el patrón de tinción y la localización. Evaluamos el grado de fibrosis reticulínica con la escala de Bauermeister y analizamos su relación con la densidad de células estromales. **Discusión.** Demostramos que el grado de fibrosis no se asocia a la densidad de células estromales ni a su localización en las biopsias. Encontramos un método para valorar las células estromales mesenquimales con un marcador de inmunohistoquímica, con lo que, podrían cuantificarse en todas las biopsias y valorarse su patrón de distribución, localización y su asociación a los distintos componentes de la médula ósea, y poder comprobar si son un factor pronóstico en la sobrevida y tratamiento de los pacientes al darles seguimiento. **Conclusiones.** Es necesario mejorar la toma de la muestra y utilizar EDTA como decalcificador de rutina. Establecimos un método sistemático para el estudio de las células estromales mesenquimales en biopsias de médula ósea, integrando un sistema de evaluación.

1. Datos del alumno	1. Datos del alumno
(Autor)	
Apellido paterno	Juárez
Apellido materno	Aguilar
Nombre (s)	Fany Gabriela
Teléfono	55 64 16 23 79
Universidad	Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad o escuela	Facultad de medicina
Carrera	Médico cirujano especialista en Anatomía Patológica
No. De cuenta	303144926
2. Datos de asesor	2. Datos de asesor
Apellido paterno	Arreola
Apellido materno	Rosales
Nombre (s)	Rocío Arreola
Datos del asesor metodológico.	Datos del asesor metodológico.
Apellido paterno	Flores
Apellido materno	Figueroa
Nombre	Eugenia
3. Datos de la tesis	3. Datos de la tesis
Título	Estudio sistemático de las células estromales mesenquimales en biopsias de médula ósea de pacientes con Síndrome Mielodisplásico y Leucemias agudas.
No. De páginas	52
Año	2016
NUMERO DE REGISTRO	R-2014-3601-214

## INTRODUCCIÓN

La generación de las células sanguíneas (hematopoyesis) se lleva a cabo en la médula ósea; un tejido complejo, compuesto por parénquima (células hematopoyéticas), su vasculatura -que consiste en capilares, sinusoides y arteriolas- y por tejido adiposo, hueso trabecular y células reticulares (1). El parénquima está conformado por células hematopoyéticas en sus distintos estados de maduración, desde la célula troncal hematopoyética, células progenitoras, precursores reconocibles por su morfología (como eritroblastos) y células maduras de todos los linajes (eritroide, mieloide y linfoide). Por otra parte, el tejido adiposo, el hueso trabecular y las células reticulares, forman parte del estroma medular, que tienen su origen en una célula troncal/estromal mesenquimal (MSC; por sus siglas en inglés, mesenchymal stem/stromal cell) (2).

Las MSC de la médula fueron conocidas en 1968 por Friedenstein y sus colaboradores (3), quienes dejaron evidencia de que, en adición a los progenitores hematopoyéticos, existe una población de células reticulares, capaces de formar colonias en cultivo, que semejan pequeños depósitos de hueso o cartílago y tienen gran capacidad para su autorenovación y multipotencialidad. Al principio fueron descritas con morfología fusiforme por lo que les nombraron fibroblásticas (4), sin embargo en estudios recientes se han encontrado tres distintas formas: células elongadas (similares a fibroblastos), células más largas y adelgazadas, y células estelares (5).

Las células estromales se encuentran principalmente perivasculares y delineando las trabéculas óseas, también se han descrito en asociación a megacariocitos (1) (2).

En estudios posteriores, fue demostrado, que las MSC eran capaces de mantener la hematopoyesis, tanto in vitro, como en modelos in vivo. Las MSC se pueden diferenciar en tejido adiposo, cartílago, hueso, tejido fibroso, estroma de mielosoporte (1).

Las MSC fabrican el tejido conectivo y producen varios factores -como interleucinas (IL) 6, 7, 8, 11, 12, 14, 15, IL-1a, CXCL12, citocinas, quimiocinas, fibronectina, colágenas y proteínas de la matriz extracelular- que regulan la

producción de células hematopoyéticas;(6). Las MSC forman parte del estroma, el cual participa en la formación de microambientes medulares, que regulan la producción de los diferentes linajes hematopoyéticos. Ensayos in vitro han demostrado que dependiendo del linaje de las células progenitoras, estas tienen distintos requerimientos del estroma. Los progenitores linfoides B, dependen de una subpoblación de MSC, la cual expresa CD10 y requieren adicionalmente, de los osteoblastos (7), mientras que los progenitores mieloides, tienen estrecha relación con otros grupos de MSC que no expresan CD10. Estos hallazgos evidencian la presencia de distintos microambientes en la médula ósea, compuestos por MSC de morfología similar, pero con funciones e inmunofenotipo diferente. Al parecer, son las células inmaduras y progenitoras las que requieren de las MSC, ya que se ha demostrado que los agregados linfoides benignos y malignos no son dependientes del estroma (7,8).

Evidencia reciente, ha demostrado el papel de las MSC, no solo en la hematopoyesis normal, sino también como parte de la fisiopatología de diversas enfermedades hematológicas, particularmente en los síndromes mielodisplásicos (SMD) y leucemias agudas.

Los SMD representan una variedad de neoplasias en médula ósea, que se caracterizan por hematopoyesis ineficaz y tienen un pronóstico variable. La clasificación de la OMS distingue diferentes subgrupos basados en las características morfológicas y citogenéticas. Su morbilidad es variable debido a las citopenias y riesgo de transformación a Leucemia mieloide aguda (1).

Las leucemias agudas son el resultado de una mutación somática en una única célula madre (troncal) hematopoyética, que desencadena una proliferación clonal de células leucémicas inmaduras. La célula en la que se produce la transformación leucémica es un precursor que pierde la capacidad de seguir su proceso normal de maduración. Cuando este precursor es de origen mieloide, se desarrolla una leucemia mieloide aguda (LMA), si el precursor es de origen linfóide, se desarrolla Leucemia linfoblástica aguda (LLA).

En estudios in vitro, se ha demostrado que las MSC son capaces de ayudar a la proliferación y renovación de células CD34+ subpoblación de células troncales y progenitoras hematopoyéticas (9); las células CD34+ se encuentran en estrecha asociación con las MSC y se localizan en zonas perivasculares,

tanto en médula ósea normal como en SMD y LMA (1). En modelos experimentales de ratón, se demostró que la perturbación en la población de MSC, es suficiente para inducir mielodisplasia. Adicionalmente, se ha demostrado que las MSC (en aproximadamente el 50%) de pacientes con SMD, LMA y LLA son citogenéticamente y funcionalmente anormales (9,10,11,12), lo cual se correlaciona con un peor curso clínico, en el caso de los SMD (13). Otra población de células estromales mesenquimales que expresaron CD271 se encontraron aumentadas en síndrome mielodisplásico, por lo que este marcador podría usarse como herramienta diagnóstica de utilidad en las médulas óseas. (13)

Las MSC tienen un papel importante en la hematopoyesis normal y cada vez se cuenta con mayor evidencia que sustenta su participación en la fisiopatología de los SMD y leucemias agudas, sin embargo, hasta el momento no se valoran rutinariamente y por lo tanto, no son consideradas en las clasificaciones clínicas.

Actualmente, el estudio de las biopsias de médula ósea es esencial para el diagnóstico de los SMD y leucemias, debido a que este material permite observar médula ósea displásica con infiltración por células blásticas, megacariocitos con displasia y otras anomalías (14).

En SMD, el análisis de las biopsias de médula ósea permiten observar algunos cambios como la diseritropoyesis, cariorrexis, multinucleación y cambios megacarioblasticos, vacuolización del citoplasma y con tinción de PAS gránulos positivos. La displasia en megacariocitos se caracteriza por micromegacariocitos hipolobulados, núcleos no lobulados en megacariocitos de varios tamaños, la médula está hiper celular usualmente o normocelular, una minoría de casos puede mostrar hipocelularidad, también hay pequeños grupos de mieloblastos en la porción de las trabéculas lo que se define como localización anormal de precursores inmaduros. (15,16)

En las LA, el estudio de las biopsias de médula ósea permitan valorar la celularidad, ya que las células blásticas, proliferan en la médula ósea, lo que provoca una disminución de las 3 series hematopoyéticas. En LMA puede observarse que los mieloblastos varían en tamaño, son más grandes que un linfocito maduro, con abundante citoplasma basófilo, los núcleos son redondos a ovalados, con cromatina finamente granular y nucléolo; por su parte, en LLA,

pueden hacerse evidentes células de mediano tamaño que corresponden a blastos, de redondas a ovaladas con escaso citoplasma, núcleos hipercromáticos y a veces con muescas e irregularidades en su membrana, la médula ósea se observa con una población uniforme de estos blastos, a veces las mitosis atípicas son numerosas. (15)

La evaluación de las biopsias de médula ósea, aporta datos importantes para el diagnóstico de los SMD y leucemias agudas, sin embargo, se enfoca –como mencionamos- principalmente a las alteraciones que ocurren en el compartimento hematológico. Del estroma medular, a pesar de su importancia, no se valoran todos sus componentes; dentro de ellos, la fibrosis –que únicamente valora la cantidad de reticulina- es la única que ofrece un valor pronóstico dentro de las clasificaciones clínicas.

La reticulina puede ser evidenciada mediante tinciones histoquímicas, y está compuesta principalmente de fibras individuales o pequeños haces de fibras de colágeno tipo III, rodeados por fibras de colágeno tipo I en una matriz de glucoproteínas. La producción de colágeno y/o reticulina es realizada por las MSC de la médula ósea, sin embargo en un estudio reciente, el grupo de la Dra. Gratzinger, de Patología de la Universidad de Stanford, (13) encontraron que el grado de fibrosis, no correlaciona con la cantidad de MSC en las biopsias de medula ósea, lo que evidencia la importancia de evaluar ambos parámetros y sugiere que pudieran ser factores clínicos independientes.

La incidencia reportada de fibrosis en pacientes con síndrome mielodisplásico de novo varía del 2% al 50% y en el secundario hasta del 80%. Un análisis mostró que el grado de fibrosis es un factor adverso en el pronóstico, ya que los pacientes que mostraron fibrosis en la médula ósea tuvieron una supervivencia de la mitad del tiempo de los pacientes sin fibrosis. (17)

Un incremento de fibrosis en la médula ósea se relaciona a Leucemia Linfoblástica Aguda y Leucemia Mieloide Aguda (aproximadamente en 33% y 9% respectivamente); aunque su patogénesis no es clara (18); un tratamiento adecuado puede llevar a la resolución del aumento de reticulina en la médula y ayuda a la regeneración de las células hematopoyéticas. (13)

Clínicamente la fibrosis sin tratamiento se asocia con displasia en varias líneas celulares, citopenias y dependencia de transfusiones, así como alta probabilidad de progresión a Leucemia Mieloide Aguda, sin embargo, en

pacientes con tratamiento la fibrosis no se asocia a dependencia de transfusiones ni a transformación a Leucemia o peor pronóstico. (19)

#### Planteamiento del problema

Estudios tanto in vitro como in vivo, muestran la participación de las MSC en la hematopoyesis normal y en diversas enfermedades hematológicas. En SMD y LMA, la abundancia de MSC se asocia con progresión de la enfermedad y con sobrevida –en donde el número de MSC se incrementa en SMD y se asocia a una menor sobrevida-. Sin embargo, a la fecha en la práctica clínica, no se cuantifica la abundancia de MSC de manera rutinaria; esto debido a que no se cuenta con un método estandarizado y sistemático para hacerlo. Hasta ahora, los factores pronósticos para SMD, LMA y LLA, no incluyen el estroma, únicamente fibrosis. Por lo que el objetivo del presente proyecto, es desarrollar un método sistemático para cuantificar la cantidad de MSC presentes en las biopsias de médula ósea, para que sea implementado en el servicio de patología.

El contar con un método sistemático para evaluar la cantidad de MSC en biopsias de médula ósea permitirá, realizar estudios clínicos que evalúen el valor diagnóstico y/o pronóstico en enfermedades hematológicas como los SMD y leucemias agudas.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general.**

Establecer un método sistemático para el estudio de las células estromales mesenquimales en biopsia de médula ósea de pacientes con síndrome mielodisplásico y leucemias.

### **Objetivos particulares.**

1. Optimizar el proceso de obtención y decalcificación del hueso, para su evaluación en inmunohistoquímica.
2. Optimizar la detección por Inmunohistoquímica de marcadores de células estromales mesenquimales.
3. Establecer un método de cuantificación sistemático del estudio por Inmunohistoquímica de los marcadores de las células estromales mesenquimales.
4. Comparar la abundancia de células estromales mesenquimales por diagnóstico utilizando la cuantificación sistemática.
5. Correlacionar la abundancia de marcadores de células estromales mesenquimales, mediante su cuantificación sistemática con fibrosis y positividad a CD34.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **DISEÑO DEL ESTUDIO**

Se trata de un estudio retrospectivo de cohorte, observacional y analítico

### **POBLACIÓN DE ESTUDIO**

Biopsias de médula ósea del archivo de patología en el hospital de Especialidades Centro Médico Nacional siglo XXI cuyo estudio histopatológico tenga el diagnóstico de Síndrome Mielodisplásico, Leucemia Mieloide Aguda y Leucemia Linfoblástica Aguda, en el periodo de marzo del 2013 a marzo del 2015.

### **CRITERIOS DE SELECCIÓN**

1. Criterios de Inclusión
  - a. Biopsias de médula ósea con diagnóstico histopatológico de Síndrome Mielodisplásico, Leucemia Mieloide Aguda y Leucemia Linfoblástica Aguda.
  
2. Criterios de Exclusión
  - a. Biopsias de médula ósea con diagnóstico descriptivo en los reportes histopatológicos.
  
3. Criterios de Eliminación
  - a. Insuficiente material biológico para la realización del análisis por inmunohistoquímica.
  - b. Casos en los que no se encuentren disponibles en el archivo de bloques y laminillas para su revisión.

## Definición de variables

<b>VARIABLE</b>	<b>TIPO</b>	<b>ESCALA MEDICIÓN</b>	<b>DEFINICIÓN OPERACIONAL</b>
Numero de celdillas	numérico	1 a 25	Se define como el espacio entre dos trabéculas óseas.
Integridad de las trabéculas	Cualitativa-dicotómica	0 ó 1	1 integra; cuando se encuentra la trabéculas óseas completas en todo el cilindro; 0 no integra; cuando por lo menos una trabécula no está completa en el cilindro.
Detalle celular	Cualitativa-Dicotómica	Buena/mala	Buena; cuando se puede observar detalle nuclear y citoplasmática, y mala; cuando el detalle nuclear y citoplasmático no es valorable
Tinción para inmunohistoquímica	Cualitativo	Específica/inespecífica/negativa	Tinción específica, cuando sea evidente una tinción fuerte de los elementos hematopoyéticos y negativa en megacariocitos;

			inespecífica, tinción leve de los elementos siendo o no específica con tinción de megacariocitos: negativa, cuando no exista tinción positiva en ningún elemento celular
Fibrosis	Cualitativa-Dicotómica	0 a 4	<p>Sin fibras de reticulina demostrables (0)</p> <p>Fibras finas individuales ocasionales o focos pequeños de fibras finas (1)</p> <p>Fibras finas formando una red en la mayor parte del tejido (2)</p> <p>Red difusa con fibras gruesas dispersas, sin colágena madura (3)</p> <p>Red difusa con fibras gruesas abundantes, con áreas de colagenización (4)</p>

Cantidad de CD34	Cuantitativa	Porcentaje	Porcentaje de células positivas en 100 células
------------------	--------------	------------	--

## **ESTRATEGIA DEL ESTUDIO**

Se buscaron las biopsias de médula ósea del archivo de estudios de piezas quirúrgicas y biopsias realizadas en el servicio de anatomía patológica del Hospital de Especialidades de Centro Médico Nacional Siglo XXI

Se seleccionaron aquellos estudios con diagnóstico de Síndrome Mielodisplásico, Leucemia Mieloide Aguda y Leucemia Linfoblástica Aguda. Se llevó a cabo la recolección de datos en una computadora portátil, se anotó el año, folio, edad, género, y el diagnóstico completo para cada estudio encontrado. Se revisaron las laminillas de cada estudio y se recabaron los bloques de parafina para la realización de inmunohistoquímica e histoquímica. Se analizaron las características histopatológicas del cilindro de médula ósea así como grado de fibrosis, cuantificación de células estromales mesenquimales (NGFR, CD10) y células hematopoyéticas primitivas CD34 positivas.

## **INTERVENCIÓN**

No hay intervención

## **PROCEDIMIENTO METODOLÓGICO**

Se realizó la comparación de la calidad de las biopsias de medula ósea decalcificadas con decalcificador ácido o con decalcificador PBS-EDTA. Para ello se revisaron las libretas de patología y se eligieron todas las biopsias que cumplieron con los criterios de inclusión dentro del periodo de estudio, que hayan sido decalcificadas con alguno de los dos métodos mencionados. A partir de bloques de parafina de biopsias de médula ósea, se realizaron cortes histológicos de 4µm y se realizó tinción con hematoxilina y eosina y para reticulina (por la técnica de Gordon Sweet), para la revisión de la calidad de las biospias. Posteriormente se realizaron cortes histológicos a 4µm, se montaron en laminillas electrocargadas (VWR). Para la detección por inmunohistoquímica de los marcadores de MSC (NGFR y CD10) y de células hematopoyéticas (CD45) y progenitoras (CD34), se realizaron reacciones con anticuerpos monoclonales y mediante el sistema Impress de Vector, de acuerdo a las

especificaciones del proveedor. Las diluciones de trabajo fueron tituladas en tejidos control propio de cada anticuerpo.

La calidad de las biopsias fueron analizadas mediante las siguientes variables: número de celdillas, integridad de las trabéculas, detalle celular y reacción para inmunohistoquímica con el antígeno CD45.

Posteriormente, se optimizó la concentración, tiempo de incubación y química para detectar los antígenos en las biopsias de médula ósea, utilizando los siguientes anticuerpos: NGFR, CD10, CD34. Una vez que se contó con el método de tinción óptimo, se realizó la inmunohistoquímica en cortes de 4 a 5  $\mu$ m de las biopsias de médula ósea, evaluando la reacción de acuerdo a: el tipo celular (estromal: cuando la reacción fue en una célula de morfología reticular o hematopoyético: cuando la reacción fue en una célula redonda; o endotelial, cuando se asociaron a los vasos); especificidad, (inespecífico; cuando la reacción se encontró en otra célula que no sea reticular, específico; cuando la reacción fue exclusiva en células reticulares) e intensidad de marcaje (positividad por cruces, +++ intenso, ++ moderado + leve y 0 ausente). La cuantificación de fibrosis, se realizó con escala de Bauermeister modificada 0-4 y de células CD34, se obtuvo el porcentaje de células positivas al marcador por 100 núcleos.

## **ERROR DE MEDICIÓN**

No todos los pacientes que acuden al hospital son sometidos a intervención quirúrgica o a toma de biopsia, por no ser candidatos a este tipo de tratamiento, por lo que no se pudo contar con tejido para estudio de todos los casos, sin embargo, como medida para conocer el número de casos que acuden al hospital, se realizó la base de datos clínica con los casos que acudan durante el periodo establecido, sin importar si se cuenta con muestra de tejido.

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El análisis bivariado se realizó utilizando Chi cuadrada, prueba exacta de Fisher y T student. Se consideró una  $P < 0.05$  como estadísticamente

significativa. Se utilizó el paquete estadístico SPSS v21 para el análisis de datos.

## **ASPECTOS ÉTICOS**

Este estudio se ajusta a las normas éticas institucionales y a la Ley General de Salud en materia de experimentación en seres humanos, y así como a la declaración de Helsinki, con modificación en el congreso de Tokio, Japón en 1983. De acuerdo al artículo 17 del reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación para la Salud, es un estudio sin riesgo ya que no involucra toma de muestra o un manejo distinto al habitual.

No se incluyeron nombres ni trabajé con pacientes en este estudio, solo se utilizaron biopsias de una base de datos ya existente en el archivo del servicio de patología, identificadas con números de folio para cuidar la confidencialidad de los pacientes.

## **RECURSOS, FINANCIAMIENTO Y FACTIBILIDAD**

Recursos humanos: Residente de patología, un médico anatomopatólogo de base, asesor metodológico y un histotecnólogo.

Recursos materiales: Computadora, laminillas y bloques de los casos seleccionados, reactivos para tinción de inmunohistoquímica e histoquímica.

Recursos financieros: No aplica

## RESULTADOS

### Descripción de los casos.

Se revisaron las libretas del archivo del servicio de Patología del Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI del periodo de enero del 2013 a marzo del 2015. Se seleccionaron en total 133 casos, 50 correspondieron a SMD (25 mujeres, 25 hombres) 47 a LLA (25 mujeres, 22 hombres) y 36 a LMA (24 mujeres, 12 hombres) (Figura 1).

Las laminillas fueron evaluadas mediante la tinción de H&E, y se corroboró que fueran compatibles con el diagnóstico en expediente. En las biopsias de pacientes con Síndrome Mielodisplásico (SMD), se puede observar displasia en megacariocitos (micromegacariocitos hipolobulados), megacariocitos de varios tamaños, médula ósea hipercelular y en una minoría hipocelularidad, con pequeños grupos de mieloblastos en localización anormal (Imagen 1), en los casos de Leucemia Mieloide Aguda (LMA), observamos disminución de las 3 series hematopoyéticas, hipercelularidad de la médula ósea a expensas de mieloblastos que varían en tamaño, son más grandes que un linfocito maduro, con abundante citoplasma basófilo, los núcleos son redondos a ovalados, con cromatina finamente granular y nucléolo (Imagen 2) y las biopsias de pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), usualmente son hipercelulares con sustitución de las tres series hematopoyéticas por una población uniforme de células de mediano tamaño que corresponden a blastos, de redondas a ovaladas con escaso citoplasma, núcleos hipercromáticos, a veces con muescas e irregularidades en su membrana (Imagen 3).

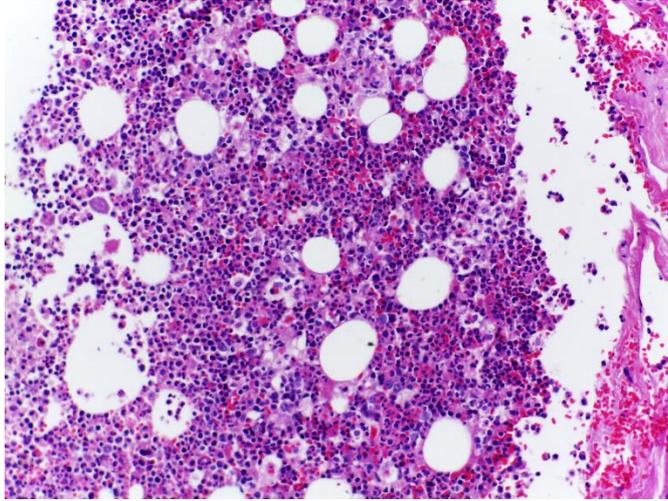


Imagen 1. Microfotografía representativa de un corte histológico de biopsia de médula ósea de un paciente con Síndrome mielodisplásico. H&E 10x.

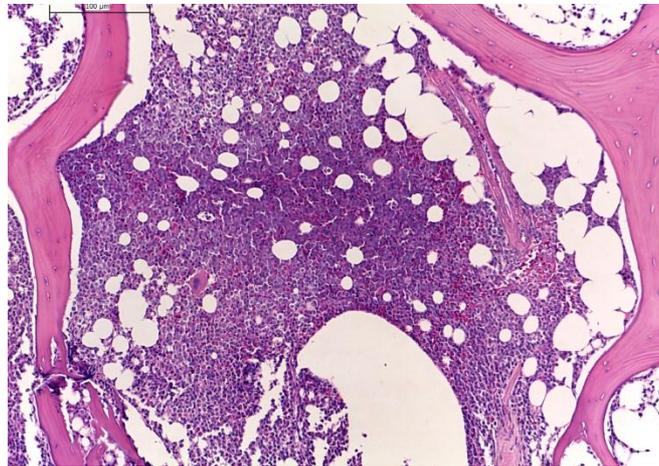


Imagen 2. Microfotografía representativa de un corte histológico de biopsia de médula ósea de un paciente con Leucemia Mieloide Aguda. H&E 10x.

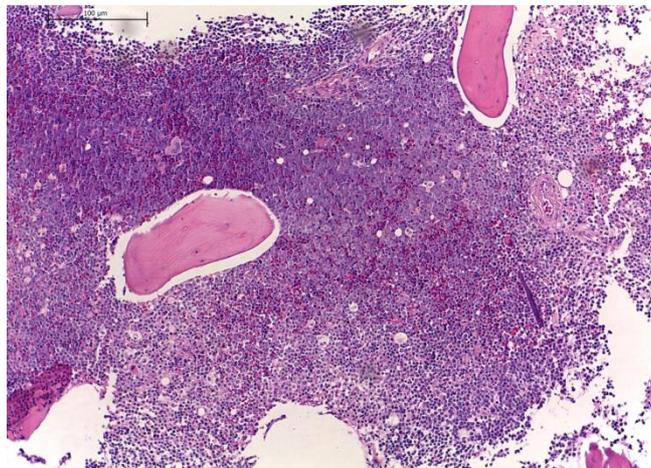


Imagen 3. Microfotografía representativa de un corte histológico de biopsia de médula ósea de un paciente con Leucemia Linfoblástica Aguda. H&E 10x.

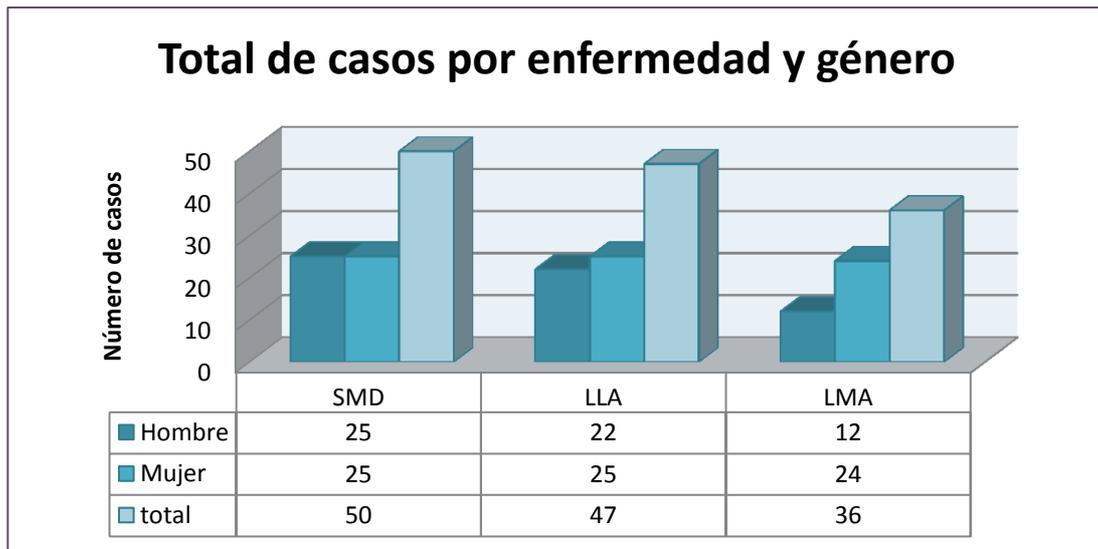


Figura 1. Representación del número de casos del 2013 a marzo de 2015 de acuerdo al sexo.

En cuanto a la distribución de casos por edad, se observó que la mayoría de los pacientes con diagnóstico de LLA se encontraron en el grupo de edad menor a 30 años, la mayoría de los pacientes con SMD están dentro de los grupos de 61 a 80 años de edad y los pacientes con diagnóstico de LMA se encuentran la mayoría en el grupo de 41 a 50 años de edad con un segundo pico en el grupo de 71 a 80 años, que probablemente corresponden a los casos de LMA secundaria al progreso de SMD (Figura 2). En tres casos de Síndrome Mielodisplásico no fue posible obtener la edad del paciente, por lo que se colocó en una columna aparte.

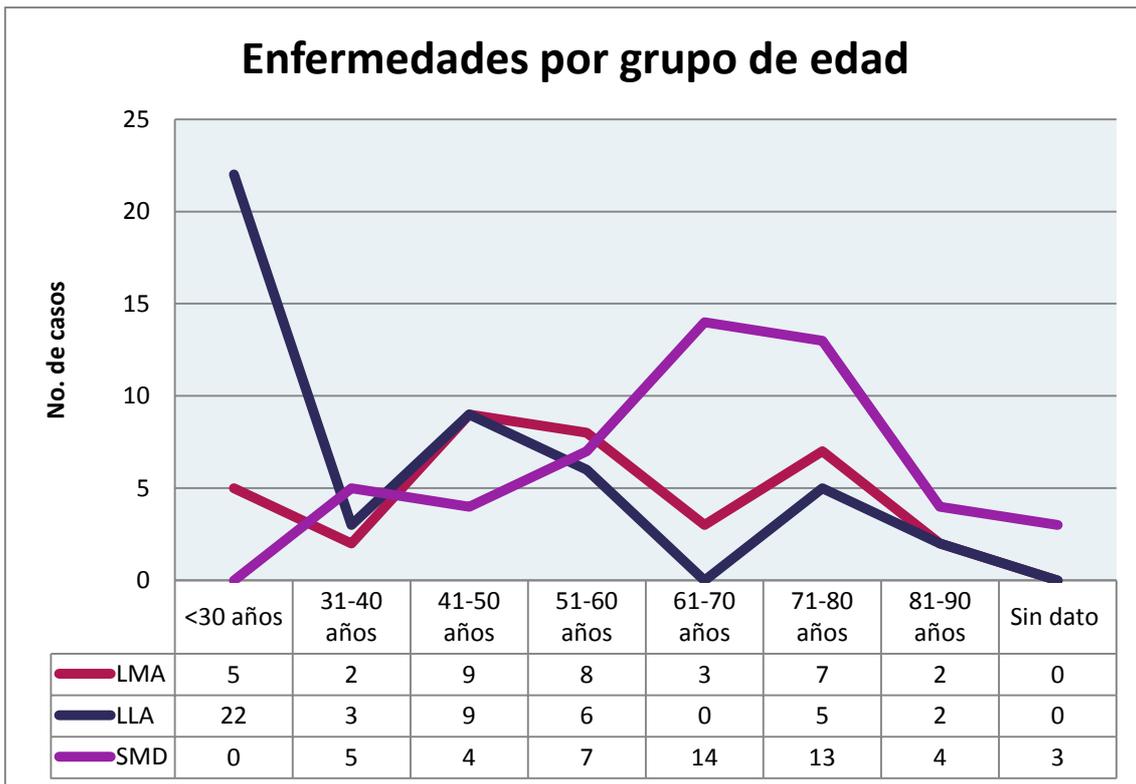


Figura 2. Número de casos de Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), Leucemia Mieloide Aguda (LMA) y Síndrome Mielodisplásico (SMD), por grupo de edad.

#### Decalcificación y Calidad de la muestra.

Para optimizar el procesamiento de las biopsias de médula ósea, realizamos una comparación de la calidad (detalle celular e integridad) de las biopsias decalcificadas con ácido nítrico, y con EDTA (anexo 1). Del total de biopsias analizadas, el 76% correspondieron al decalcificador ácido, debido a que es el decalcificador utilizado de rutina en el servicio. (Figura 3). La integridad fue evaluada mediante tinción en H&E como trabéculas no íntegras (Imagen 4) y en trabéculas íntegras (Imagen 5); en ambos grupos las trabéculas fueron íntegras en más del 50% de los casos, sin embargo, las biopsias decalcificadas con EDTA fueron superiores en integridad en un 5% sobre las decalcificadas con ácido (Figura 4). La integridad de las trabéculas se vio comprometida por la presencia de artificios (65.5% del total de los casos), de los cuales el 77% se debieron a fragmentación y el resto a compresión, ambos asociados a la toma de la muestra.

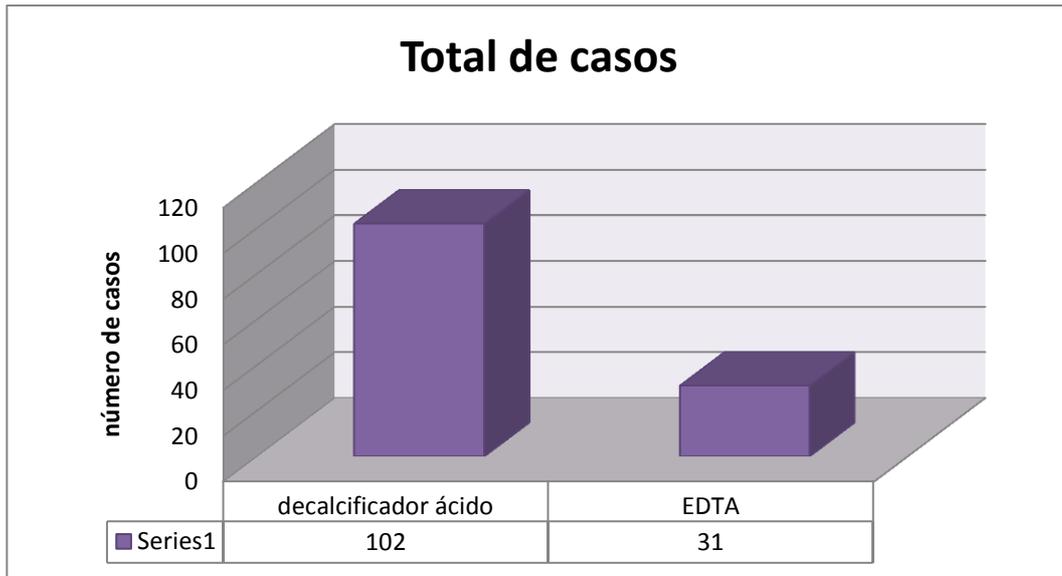


Figura 3. Número de casos por tipo de decalcificador

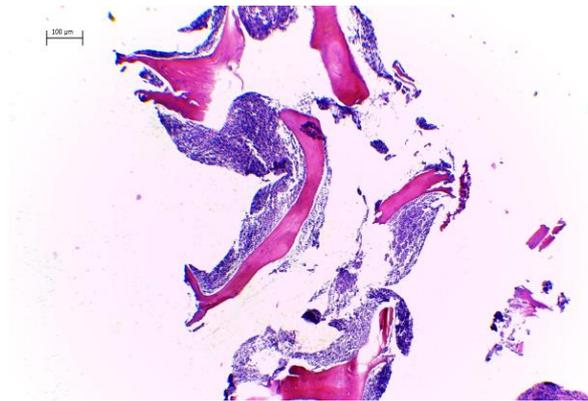


Imagen 4. Microfotografía de un corte histológico de biopsia de médula ósea con artificio por fragmentación de las trabéculas óseas. H&E 4x

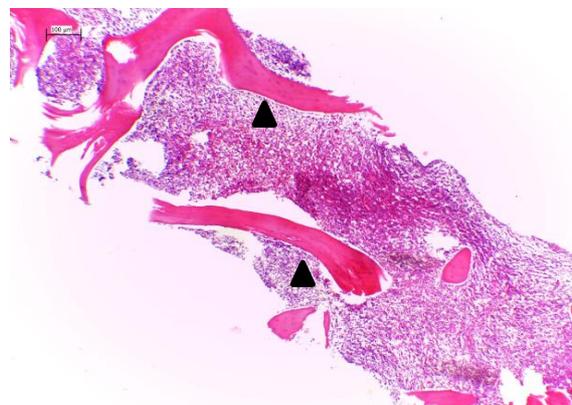


Imagen 5. Microfotografía de un corte histológico de biopsia de médula ósea con trabéculas íntegras (puntas de flecha), celdillas y celularidad valorables. H&E 4x

En cuanto a la valoración del detalle celular (núcleo y citoplasma de las células hematopoyéticas) en todas las biopsias de médula ósea, con ambos decalcificadores fue superior al 80% un buen detalle, sin embargo, con EDTA fue 5% superior el buen detalle celular (mejor visualización de la cromatina nuclear, membrana nuclear y citoplasmática mejor definida y delimitada) sobre aquellas biopsias decalcificadas con ácido (Imágenes 6 y 7) (Figura 5)

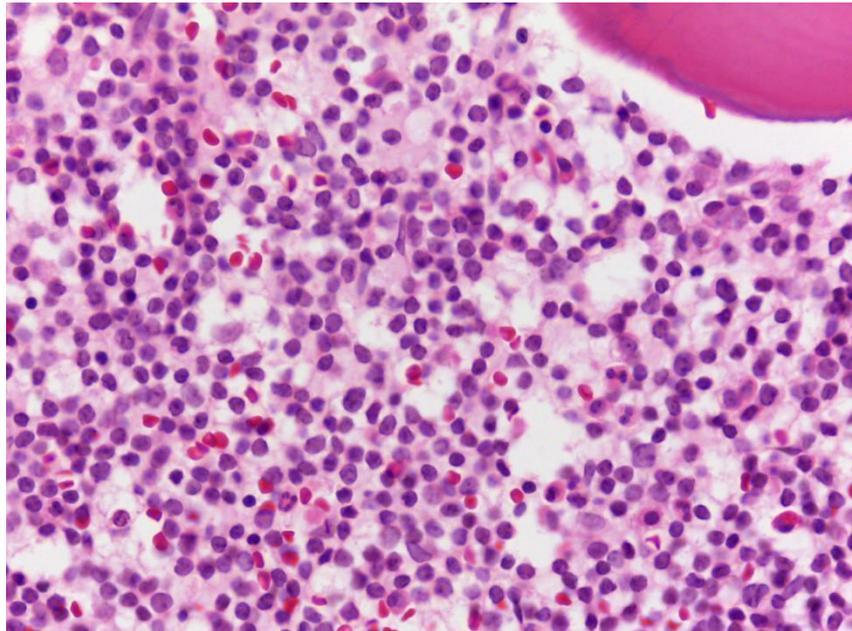


Imagen 6. Microfotografía de corte histológico de biopsia de médula ósea decalcificada con ácido, con acercamiento a las células para valorar a detalle núcleo y citoplasma. H&E 40x

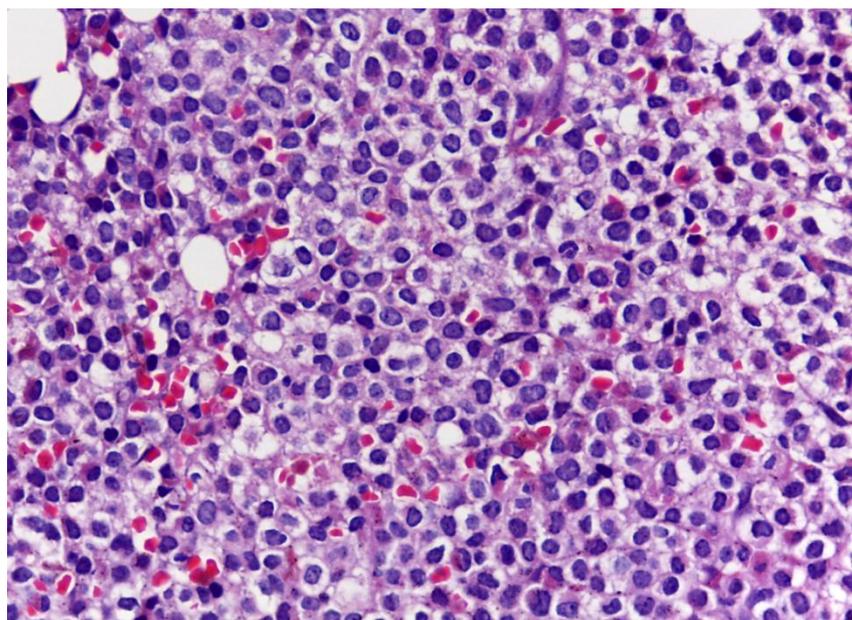


Imagen 7. Microfotografía de corte histológico de biopsia de médula ósea decalcificada con EDTA, con acercamiento a las células para valorar a detalle núcleo y citoplasma. H&E 40x

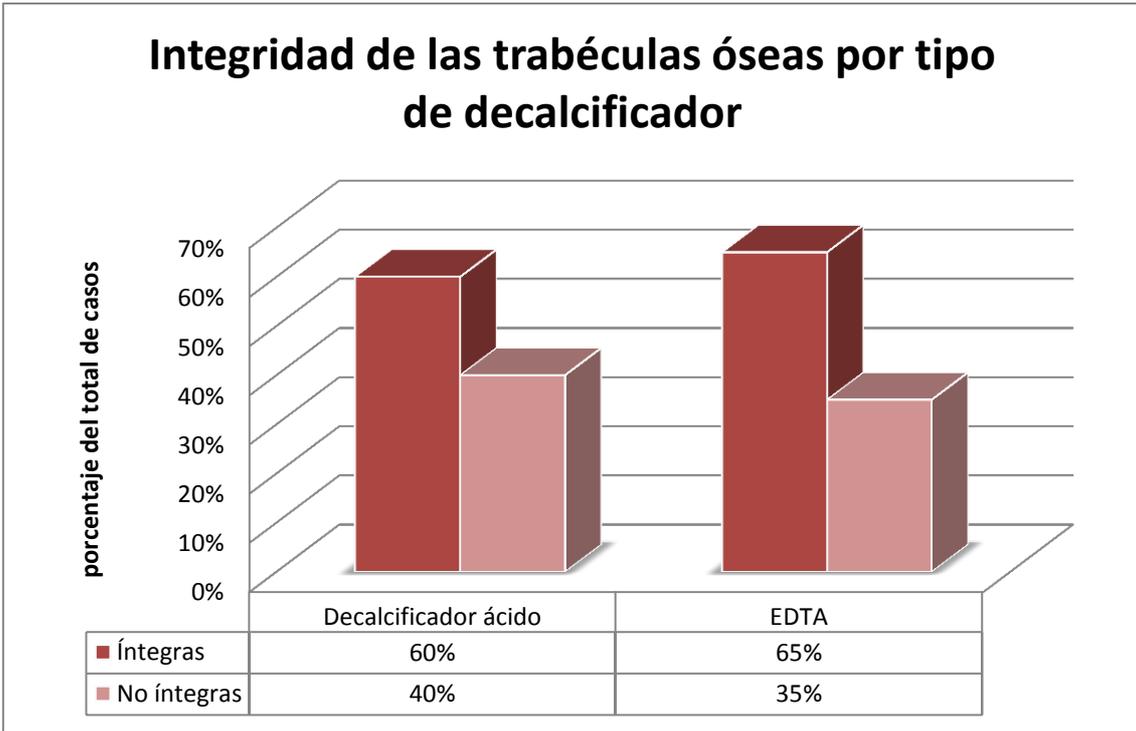


Figura 4. Comparación de la integridad de las trabéculas óseas

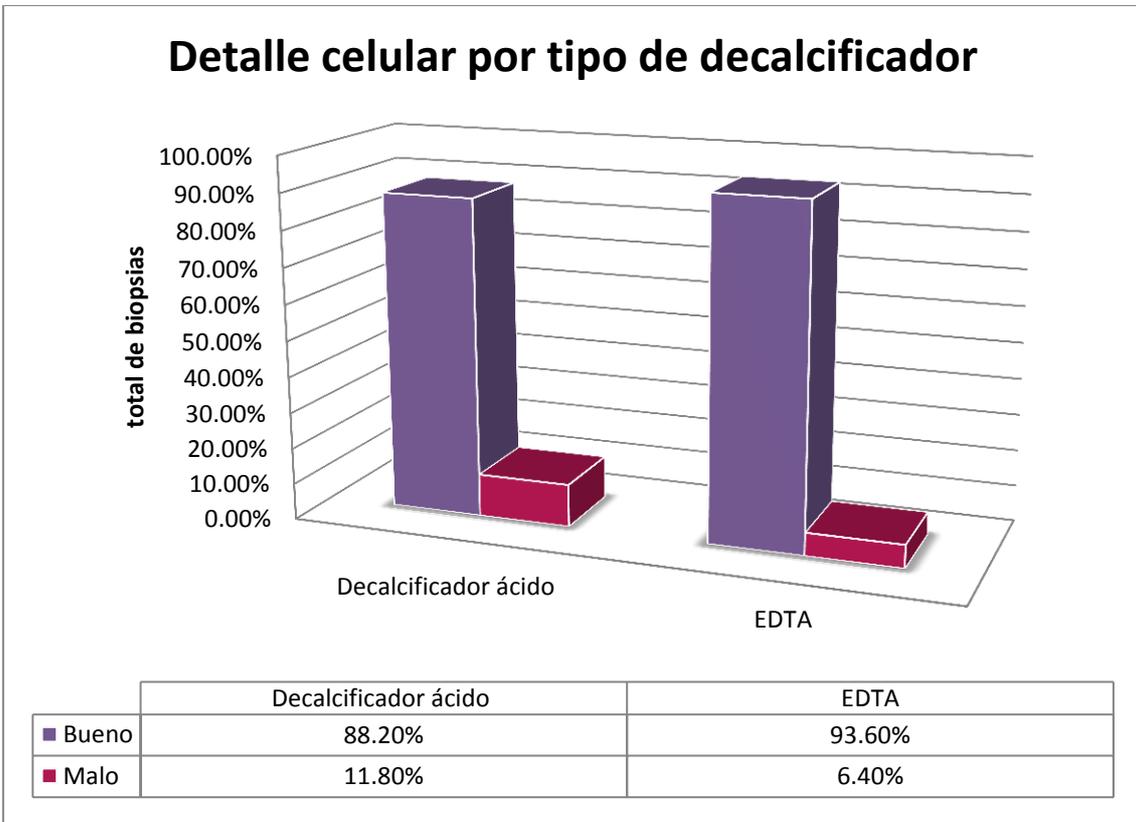


Figura 5. Comparación del detalle celular entre decalcificador ácido y EDTA.

## Inmunohistoquímica

La presencia de artificios en la biopsia dificultó la valoración de la celularidad en las celdillas por lo que algunas de éstas no pudieron seleccionarse para la realización de inmunohistoquímica, a pesar de ser diagnósticas (Imagen 4).

Del total de casos se seleccionaron 70 biopsias para la realización de inmunohistoquímica, incluyendo todas las biopsias sin artificios (trabéculas íntegras, celdillas y celularidad valorable) (Imagen 5) y algunas con fragmentación de las trabéculas en las que el artificio no involucró toda la muestra y pudo valorarse la celularidad en por lo menos dos celdillas.

Se realizó una prueba inicial con CD45 (marcador de células hematopoyéticas) en una muestra decalcificada con ácido y en otra con EDTA, con lo que se comprobó la utilidad de las biopsias para inmunohistoquímica ya que en ambas la reacción fue positiva (Imagen 8), se decidió probar la realización de inmunohistoquímica para células estromales mesenquimales con los marcadores NGFR y CD10, sin embargo, la técnica de la tinción con CD10 no logró optimizarse y no fue valorable ni específica para células estromales (Imagen 9), debido a esto, realizamos únicamente tinción con marcador NGFR en el 100% de las biopsias seleccionadas, la cual fue adecuada y específica para células estromales en el total de las muestras. (anexo 2)

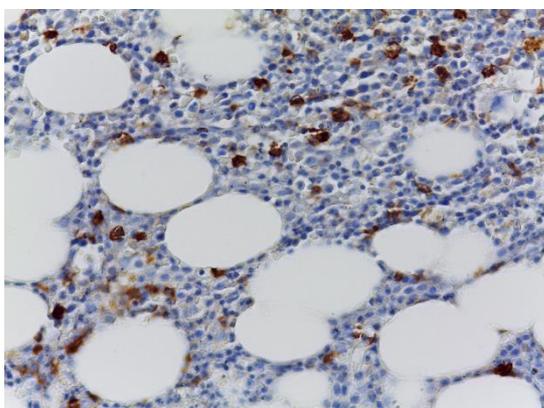


Imagen 8. Microfotografía de inmunohistoquímica de biopsia de médula ósea con células hematopoyéticas positivas a CD45. 40x

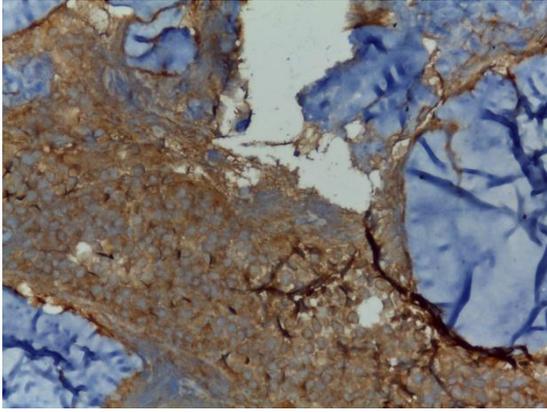


Imagen 9. Microfotografía de inmunohistoquímica con tinción CD10, de biopsia de médula ósea, se observan componentes hematopoyéticos y estromales positivos por lo que no es valorable ni específica para la valoración de células estromales mesenquimales. 10x.

### **Densidad, distribución y localización de células estromales mesenquimales NGFR +.**

La evaluación de inmunohistoquímica fue realizada por 3 observadores independientes.

En todos los casos valoramos la densidad (cantidad) de células estromales mesenquimales dando un puntaje en cruces (+/++/+++) en cada uno (Imágenes 10, 11, 12) y calculamos el porcentaje en cada enfermedad.

Con esto observamos que la densidad de células estromales (+) predominó en los pacientes con diagnóstico de LLA, la densidad (++) se presentó con mayor frecuencia en pacientes con SMD y la densidad (+++) fue superior en los casos de pacientes con LMA. (Figura 6).

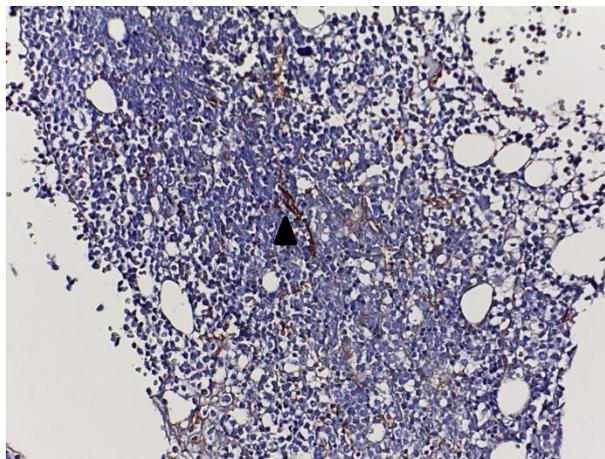


Imagen 10. Microfotografía de inmunohistoquímica de biopsia de médula ósea con Densidad de células estromales NGFR positivas (+) (punta de flecha)

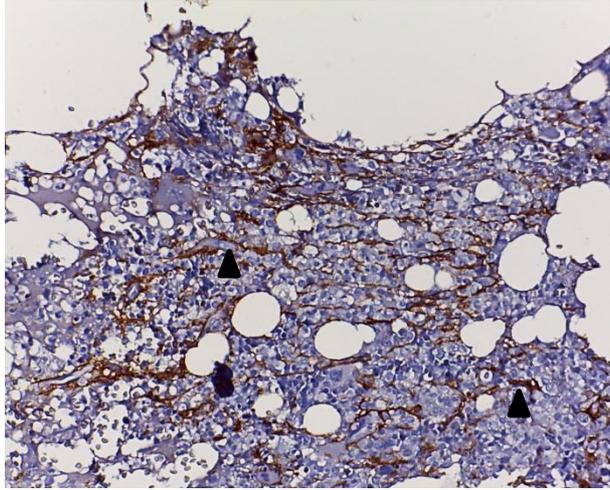


Imagen 11. Microfotografía de inmunohistoquímica de biopsia de médula ósea con Densidad de células estromales NGFR positivas (++) (puntas de flecha)

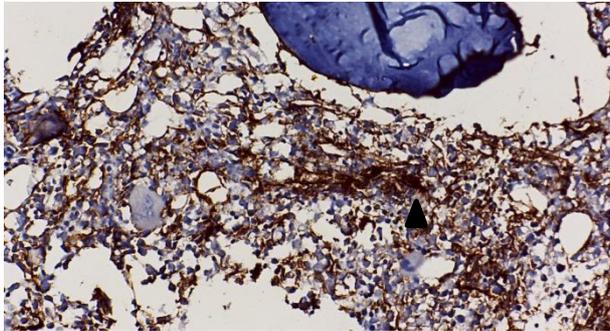


Imagen 12. Microfotografía de inmunohistoquímica de biopsia de médula ósea con Densidad de células estromales NGFR positivas (+++) (punta de flecha).

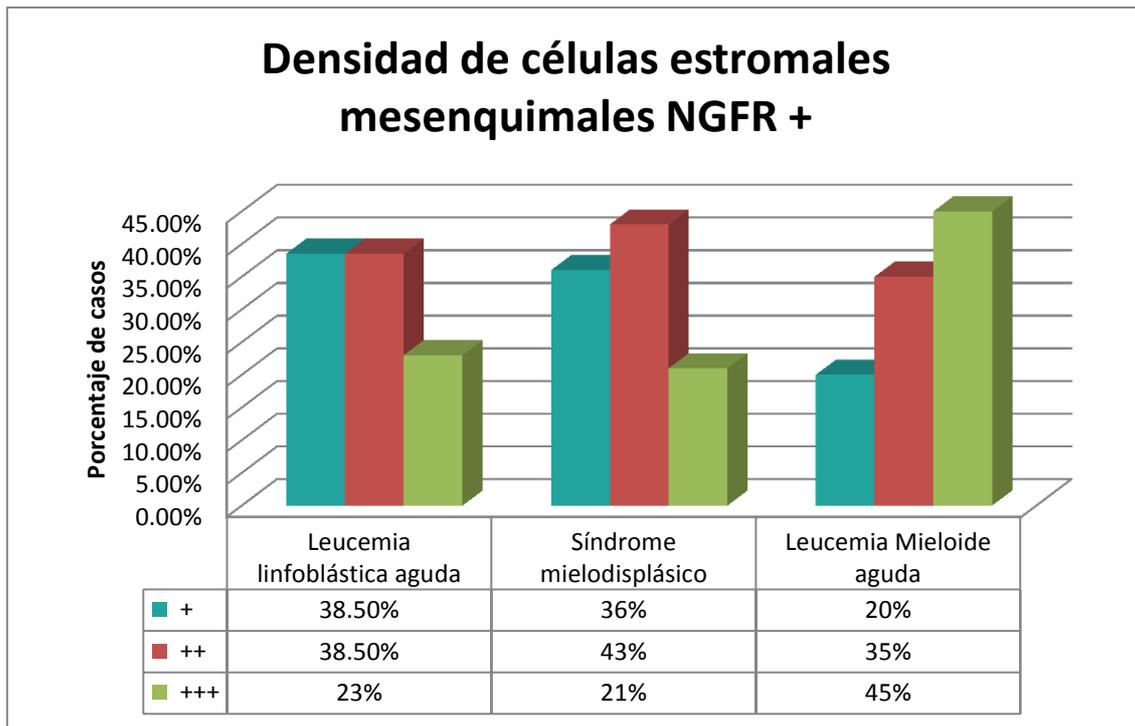


Figura 6. Porcentaje de células estromales mesenquimales presentes en cada enfermedad.

También valoramos en todos los casos el patrón de tinción de las células estromales mesenquimales NGFR positivas, como difuso o en parches (Figura 7).

En todos los casos de LLA y SMD, la distribución fue difusa, es decir se distribuye por igual en todo el espacio de las celdillas (Imagen 13), en el caso de LMA, más de la mitad (55%) tuvo un patrón de reacción en “parches”, lo cual significa que dentro de las celdillas hubo zonas donde el marcaje de células estromales fue intensamente positivo sin dejar más allá de 2 hileras de células leucémicas de espacio entre ellas, que alternan con zonas donde no hay células estromales en un espacio de por lo menos 10 hileras de células leucémicas (Imagen 14).

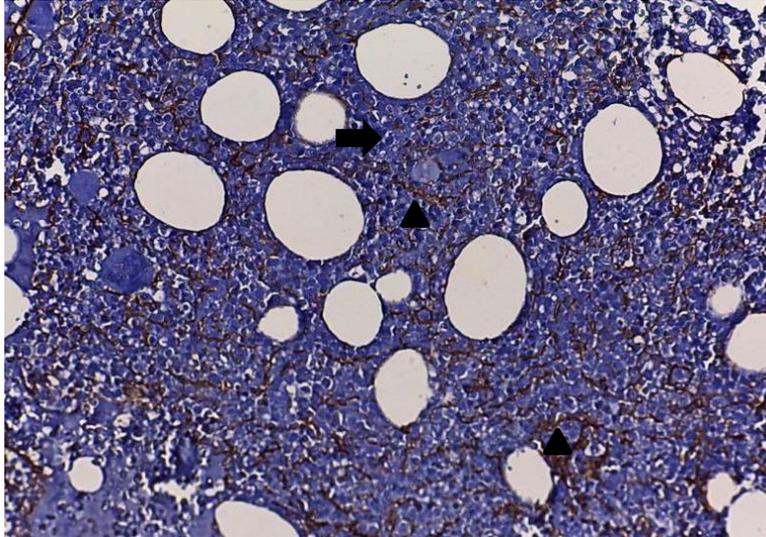


Imagen 13. Microfotografía de inmunohistoquímica de biopsia de médula ósea con patrón de tinción difusa de células estromales NGFR positivas (puntas de flecha), la distribución es equitativa en toda la celdilla sin espacios mayores a dos hileras de células leucémicas (flecha) entre ellas. 20x.

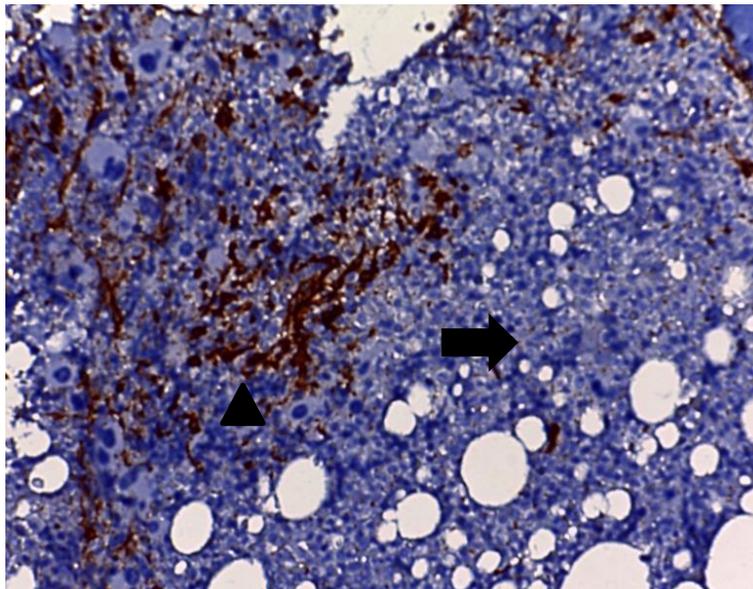


Imagen 14. Microfotografía de inmunohistoquímica de biopsia de médula ósea con patrón de tinción en parches de células estromales NGFR positivas, se observan zonas con abundantes células estromales sin espacios mayores a dos hileras de células leucémicas entre ellas (punta de flecha) y zonas mayores a 10 hileras de células leucémicas sin células estromales entre ellas (flecha). 20x.

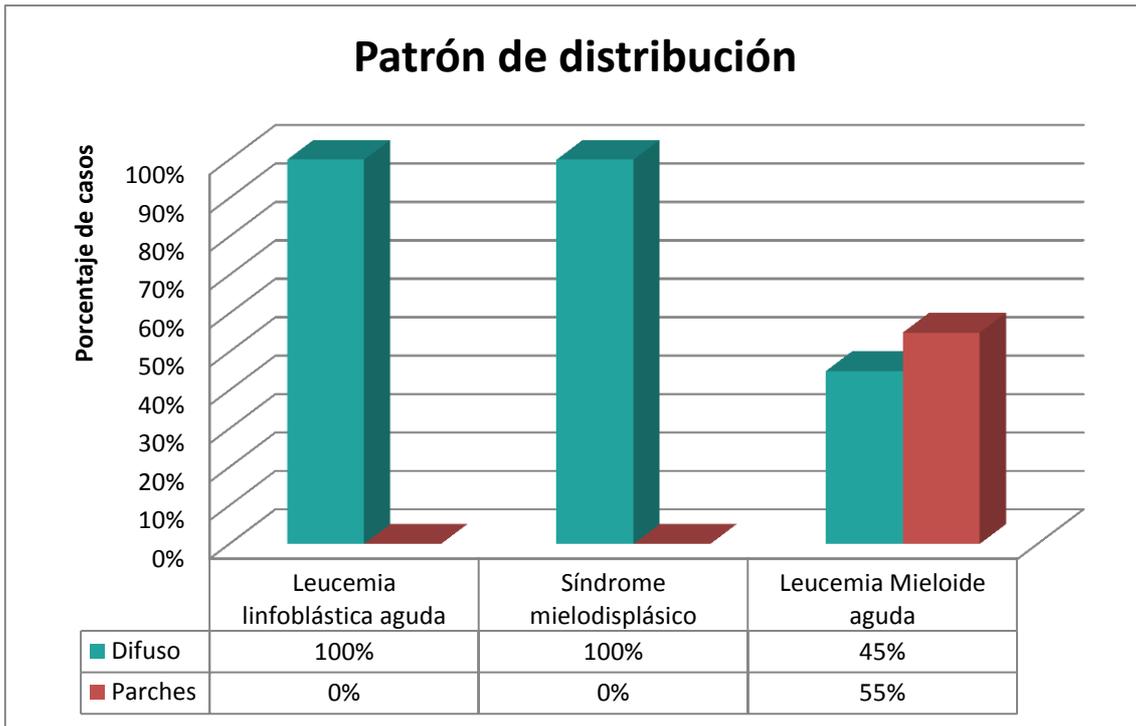


Figura 7. Porcentaje en cada enfermedad del patrón de distribución de células estromales mesenquimales NGFR+

Evaluamos igualmente en todas las biopsias de médula ósea, la localización de las células estromales mesenquimales NGFR+, encontrándose perivasculares (Imagen 15), paratrabeculares (Imagen 16), en el parénquima (Imagen 17) y perimegacariocitos (Imagen 18).

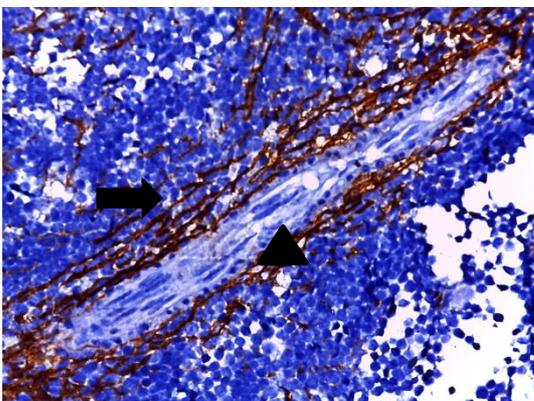


Imagen 15. Microfotografía de inmunohistoquímica de biopsia de médula ósea con células estromales perivasculares - se observan hasta tres capas de células estromales NGFR positivas (flecha) alrededor de un vaso sanguíneo (punta de flecha) - 40x.

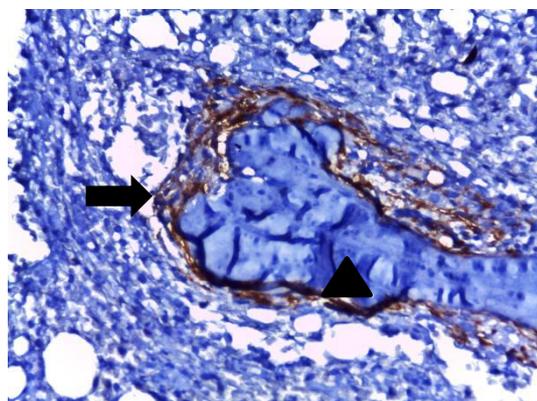


Imagen 16. Microfotografía de inmunohistoquímica de biopsia de médula ósea con células estromales paratrabeculares - se observan células estromales NGFR positivas (flecha) alrededor de una trabécula ósea (punta de flecha) - 40x.

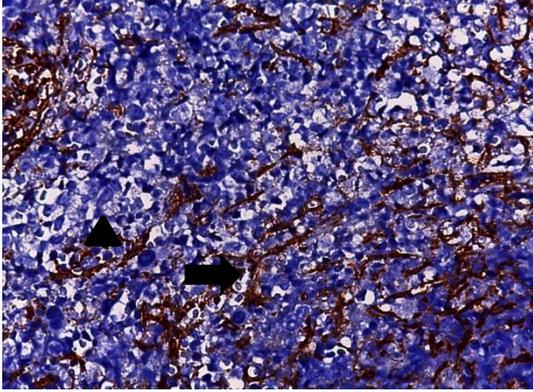


Imagen 17. Microfotografía de inmunohistoquímica de biopsia de médula ósea con células estromales en el parénquima - se observan células estromales NGFR positivas (flecha) distribuidas en todo el parénquima entre las células leucémicas (punta de flecha) - 40x

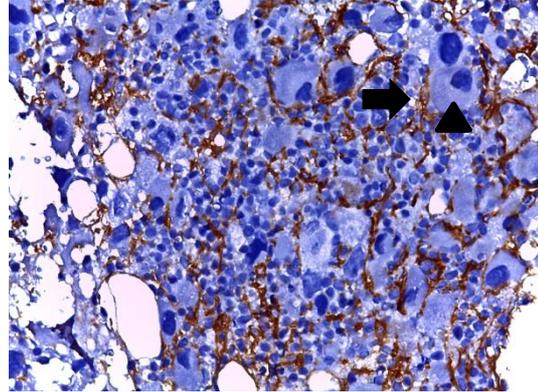


Imagen 18. Microfotografía de inmunohistoquímica de biopsia de médula ósea con células estromales perimegacariocitos - se observan células estromales NGFR positivas (flecha) alrededor de los megacariocitos (punta de flecha) - 40x

Se calculó el porcentaje de predominio de la localización de células estromales mesenquimales en estas 4 regiones por cada enfermedad.

En todos los casos de LLA, se encontraron células estromales mesenquimales NGFR positivas, localizadas en el parénquima y perivasculares, sin embargo, solo en 85% de los casos se encontraron peritrabeculares y en 31% rodeando a los megacariocitos. Igualmente todos los casos de SMD, mostraron células estromales mesenquimales perivasculares y distribuidas en el parénquima, en el 79% de los casos se encontraron peritrabeculares y en el 86% alrededor de megacariocitos (ésta fue la enfermedad con que tuvieron mayor asociación las células estromales a los megacariocitos), y en LMA la localización más frecuente de células estromales fue en el parénquima (90%), seguida por la zona perivascular en el 85% de los casos y paratrabeculares en 75%, la localización menos frecuente fue con los megacariocitos en solo el 25%. (Figura 8).

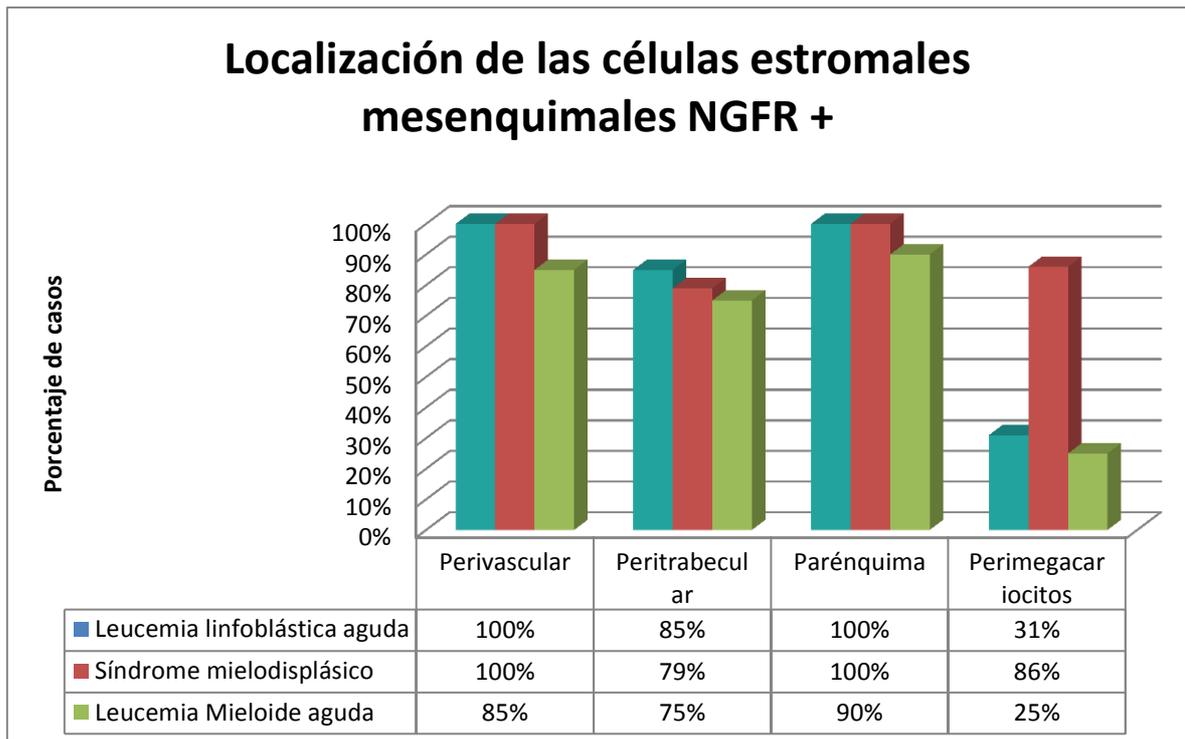


Figura 8. Localización de células estromales mesenquimales por enfermedad.

### Fibrosis

Evaluamos el grado de fibrosis reticulínica en todos los casos con la escala de Bauermeister (grado 0 a 4), de las laminillas con tinción de retículo. En 5 casos la tinción no fue valorable.

Encontramos que en las tres enfermedades (LLA, SMD y LMA) predominó el grado 1 de fibrosis, seguido por el grado 0, (Imágenes 19 y 20) en menor cantidad grado 2 (Imagen 21) y solo 2 casos tuvieron grado 3 (Imagen 22) ambos fueron pacientes con LLA. (Figura 9).

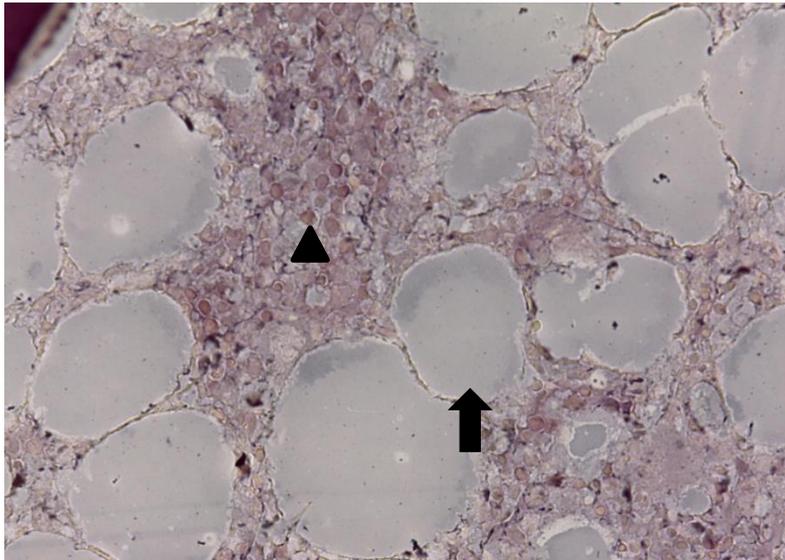


Imagen 19. Microfotografía de biopsia de médula ósea con tinción de retículo (tinción de plata), representativa de caso sin fibrosis (Grado 0 de Bauermeister) - se observan en el parénquima células hematopoyéticas (punta de flecha) y adipocitos (flecha) sin fibras de retículo entre ellas - 40x

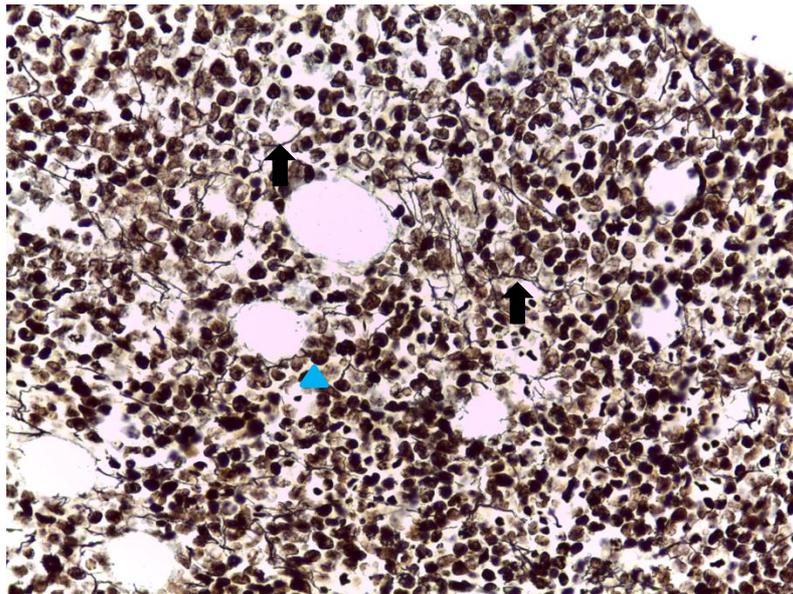


Imagen 20. Microfotografía de biopsia de médula ósea con tinción de retículo (tinción de plata), representativa de caso con fibrosis Grado 1 de Bauermeister - se observan en el parénquima células hematopoyéticas (punta de flecha) y escasas fibras delgadas aisladas de retículo (flechas) entre ellas - 40x

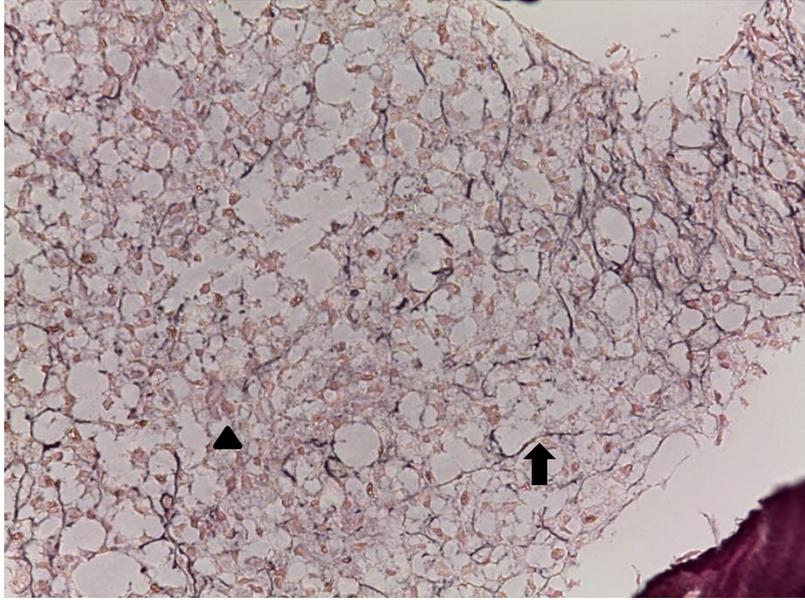


Imagen 20. Microfotografía de biopsia de médula ósea con tinción de retículo (tinción de plata), representativa de caso con fibrosis Grado 2 de Bauermeister - se observan en el parénquima células hematopoyéticas (punta de flecha) y moderada cantidad de fibras delgadas de retículo (flecha) entre ellas, en todas las celdillas - 40x

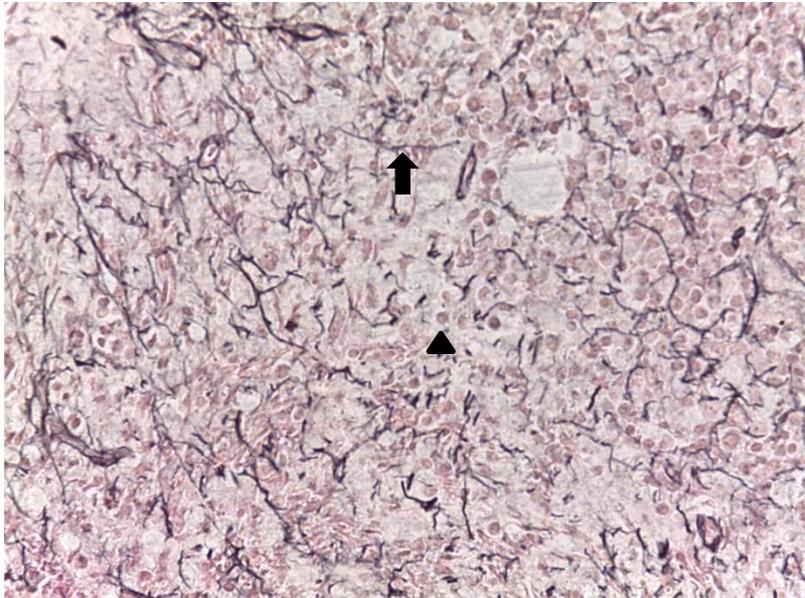


Imagen 20. Microfotografía de biopsia de médula ósea con tinción de retículo (tinción de plata), representativa de caso con fibrosis Grado 3 de Bauermeister - se observan en el parénquima células hematopoyéticas (punta de flecha) y abundantes fibras de retículo (flecha) entre ellas, en todas las celdillas - 40x

## Fibrosis reticulínica

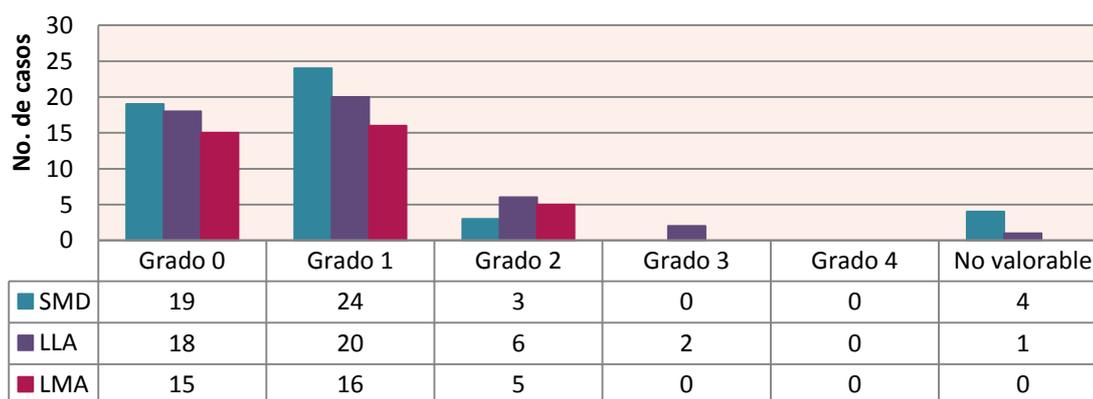


Figura 9. Grado de fibrosis por enfermedad

### Análisis estadístico

Analizamos la relación del grado de fibrosis reticulínica con la densidad de células estromales mesenquimales NGFR positivas en SMD, LLA y LMA (Tabla 1).

		NGFR DENSIDAD			Total		
		UNA CRUZ	DOS CRUCES	TRES CRUCES			
FIBROSIS	GRADO 0	Recuento	4	5	7	16	
		% dentro de FIBROSIS	25.0%	31.3%	43.8%	100.0%	
	GRADO 1	Recuento	6	10	8	24	
		% dentro de FIBROSIS	25.0%	41.7%	33.3%	100.0%	
	GRADO 2	Recuento	3	0	2	5	
		% dentro de FIBROSIS	60.0%	0.0%	40.0%	100.0%	
	GRADO 3	Recuento	0	1	0	1	
		% dentro de FIBROSIS	0.0%	100.0%	0.0%	100.0%	
	Total		Recuento	13	16	17	46
			% dentro de FIBROSIS	28.3%	34.8%	37.0%	100.0%

Para este análisis utilizamos Chi-cuadrado de Pearson, el resultado no fue significativo (p.405), es decir, el grado de fibrosis de la médula ósea no se asocia con la densidad de células estromales mesenquimales presentes, pues hay mucha variación en la cantidad de fibras de retículo y de células estromales en la misma biopsia, solo se relacionó al diagnóstico del paciente.

Igualmente realizamos tinción de inmunohistoquímica para CD34, para ver la relación que hay entre células estromales mesenquimales y células hematopoyéticas CD34 positivas, sin embargo no se logró optimizar la tinción y no fue valorable en ninguno de los casos de prueba (Imagen 21).

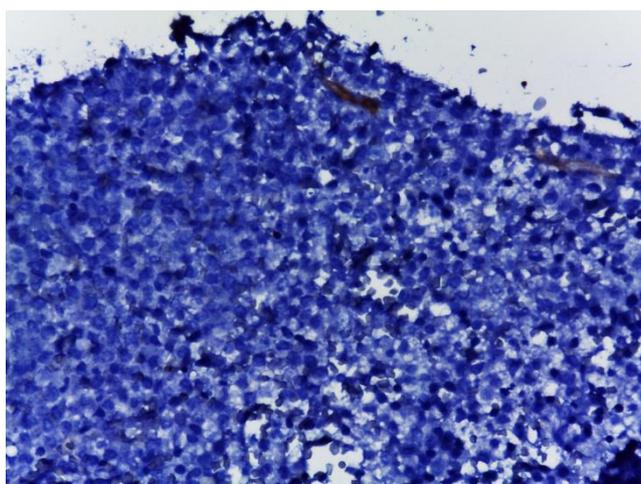


Imagen 21. Microfotografía de inmunohistoquímica con CD34 de biopsia de médula ósea –no fue valorable en células hematopoyéticas- 40x

También utilizamos Chi-cuadrado de Pearson en los siguientes análisis.

El patrón de distribución de las células estromales NGFR positivas, fue significativo (p.000222) en relación con que LMA si tiene una mayor asociación al patrón de distribución en parches en comparación con LLA y SMD.

En cuanto a la asociación de la densidad de células estromales mesenquimales con LLA, SMD y LMA, el resultado no fue significativo (p.451).

En el análisis de asociación de la localización de células estromales mesenquimales en LLA, SMD y LMA, el resultado fue significativo solo en relación con aumento en el predominio de células estromales que se disponen alrededor de los megacariocitos en SMD (p.001) en comparación con LLA y LMA. No fue significativo en las localizaciones perivascular (p.816), peritrabecular (p.874) y parénquima (p.1).

Analizamos la asociación de la densidad de células estromales mesenquimales con su localización. El resultado fue significativo únicamente en su relación con la región peritrabecular (p.026), es decir, a mayor cantidad de células estromales mesenquimales NGFR positivas, mayor disposición peritrabecular se observa en ellas.

En el resto de localizaciones el resultado no fue significativo (perivascular p.827, parénquima p.075, perimegacariocitos p.255) por lo que no se asocia el aumento en la densidad de células estromales mesenquimales de la médula ósea con mayor disposición en estas tres localizaciones.

El análisis de la integridad de las trabéculas óseas de las biopsias de médula ósea en relación con el tipo de decalcificador (ácido y EDTA), no fue significativo (p.214)

## DISCUSIÓN

Para establecer un método sistemático para el estudio de las MSC en biopsias de médula ósea, el primer paso fue optimizar el procesamiento histológico de las mismas (usualmente consiste en decalcificación y cortes en el micrótopo en los laboratorios de patología), mediante la comparación de dos agentes decalcificantes.

La decalcificación de tejidos mineralizados se entiende como la disolución de los complejos de hidroxiapatita y representa uno de los pasos más importantes e indispensables de la histotecnología. El grado de decalcificación es un factor determinante para la preservación de la estructura celular y sus componentes. Las soluciones desmineralizantes pueden clasificarse en ácidos orgánicos (por ejemplo: ácido acético, fórmico o cítrico), ácidos inorgánicos (por ejemplo: HCl, ácido nítrico o sulfúrico), quelantes del calcio como ácido diaminoetilen tetraacético (EDTA por sus siglas en inglés). (23)

Los ácidos inorgánicos como ácido nítrico o HCl son de los más usados en la decalcificación debido a que proveen una rápida decalcificación (23), sin embargo debido al daño que provocan en el ADN y ARN de las células, se han buscado nuevos agentes para la decalcificación que preserve estos elementos de la célula, principalmente por la necesidad de realizar técnicas de estudios moleculares útiles en el diagnóstico de neoplasias malignas hematológicas. Igualmente estudios de inmunohistoquímica pueden requerirse para diferenciar lesiones hematolinfoides, así como las características histomorfológicas de las estructuras de la médula ósea, el HCl degrada la calidad y cantidad de proteínas, resultando en tinciones de inmunohistoquímica inadecuadas para el diagnóstico. (20) Igualmente puede inhibirla utilidad de técnicas de inmunofluorescencia. (23)

La velocidad del proceso de decalcificación y las características en la tinción son parámetros importantes que influyen la selección de la solución decalcificadora. Los ácidos que proveen una rápida decalcificación, cuando son usados por un largo periodo de tiempo, inducen deterioro en la célula,

particularmente en la cromatina, además de la hidrólisis del ADN ya comentado previamente (23)

La decalcificación con soluciones ácidas disuelven los cristales de hidroxiapatita y remueven el calcio de una manera muy rápida.

El uso de agentes quelantes del calcio (EDTA) puede evitar esos problemas pero tiene la desventaja de requerir tiempos más largos para alcanzar el proceso completo de decalcificación, dependiendo del tamaño de la muestra y del grado de mineralización que puede ir de días a semanas, esto debido a que como agente quelante este se une al calcio en la capa más externa de los cristales de hidroxiapatita, reduciendo el tamaño del cristal durante el proceso de decalcificación hasta que estos son removidos, lo cual es muy lento comparado al decalcificador ácido. Sin embargo con estos agentes, se observa una completa preservación del material genético y estructura celular. (23)

El uso de EDTA al 10% muestra una gran preservación de la arquitectura en las tinciones de rutina y en la inmunohistoquímica, así como para la realización de FISH y citometría de flujo, por lo que es altamente preferible su uso de rutina en la decalcificación de médula ósea. (21)

En un estudio realizado donde compararon el uso de HCl y EDTA, tuvieron casi la misma calidad en la preservación de las características histomorfológicas en las muestras, sin embargo las biopsias decalcificadas con EDTA fueron superiores en preservar ADN y ARN para la realización de estudios genéticos así como PCR e hibridación in situ, a diferencia de las muestras decalcificadas con HCl donde los estudios genéticos resultaron inapropiados por daño severo del material. Igualmente en la realización de Inmunohistoquímica, las biopsias en que se usó EDTA fueron de calidad superior que las decalcificadas con el ácido por una mejor preservación de las proteínas celulares, así que, se concluyó que el uso de EDTA en las biopsias de médula ósea donde es probable el uso de estos estudios es más apropiado y sugieren que es el mejor método aplicado para la decalcificación de las muestras. (20)

En otro estudio probaron una combinación de agentes decalcificantes quelantes y ácidos, compuesto por HCl al 12%, EDTA 0.07%, tartrato de sodio 0.014%, tartrato de sodio y potasio al 0.8% y agua (1,000mL) , en un periodo de tiempo de decalcificación de 6-24 hrs, contra solo EDTA de 6-24 días, resultando en que la mezcla que los autores sugieren, requirió un tiempo mucho más corto para una apropiada decalcificación que el uso sólo de EDTA para obtener el mismo resultado, demostrando que el mismo grado de desmineralización fue alcanzado por muestras similares, a las 6hrs con la combinación de soluciones que a los 6 días con EDTA. El análisis histológico con H&E mostró eficacia similar con ambos métodos, con la ventaja de que la combinación requiere un periodo más corto de decalcificación sin ocasionar daño celular y preservando las proteínas celulares. (23)

También se ha probado el uso de EDTA 14% o de ácido fórmico, solos o en combinación, encontrando que combinados optimizan el proceso minimizando el tiempo requerido para la decalcificación de hasta 2 hrs en biopsias de 1cm aproximadamente, con una adecuada preservación de los ácidos nucleicos y no hay diferencia apreciable entre su uso sólo o combinado en los cortes histológicos. Debido a esto, los autores en esta referencia proponen estandarizar el uso de éstos agentes decalcificantes como rutina para las biopsias de médula ósea, en donde se debe valorar, la integridad de la muestra en el proceso histológico, la estructura celular y de los ácidos nucleicos, así como la optimización de la calidad de la muestra. (22)

En nuestro estudio demostramos que las biopsias decalcificadas con EDTA aunque no fue significativo, tuvieron en general un mayor porcentaje de buen detalle celular en la tinción de histoquímica H&E sobre aquellas biopsias decalcificadas con ácido (93.60% vs 88.20% respectivamente) y también mayor porcentaje de integridad de las trabéculas (65% con EDTA y 60% con ácido).

Debido a la importancia de preservar las proteínas celulares y ADN nuclear para poder realizar otro tipo de estudios en las biopsias de médula ósea en caso de necesitarse, así como reacciones de inmunohistoquímica e histoquímica de buena calidad donde se conserve la arquitectura de las

trabéculas y un buen detalle celular, recomendamos en este estudio el uso de EDTA como decalcificador de rutina en todas las biopsias de médula ósea.

Evidencia reciente, ha demostrado el papel de las MSC, no solo en la hematopoyesis normal, sino también como parte de la fisiopatología de diversas enfermedades hematológicas, particularmente en los síndromes mielodisplásicos (SMD) y leucemias agudas. (1) En un estudio reciente, se comprobó que la densidad de células estromales mesenquimales -donde usaron CD271 como marcador de inmunohistoquímica- fue significativamente mayor en Síndrome mielodisplásico conforme aumentaban de grado (13). Esto también se observó en el estudio que realizamos, sin embargo proponemos el marcador NGFR para cuantificar células estromales mesenquimales en biopsias de médula ósea debido a que es el que nosotros utilizamos y mostró ser específico en el 100% de las muestras usadas en este estudio, y para valorar su densidad utilizamos su evaluación en cruces (+++ abundante cantidad, ++ moderada cantidad, + escasas), encontrando mayor densidad de células estromales mesenquimales en SMD (mayor porcentaje de densidad ++ con el 43%) y LMA (con mayor porcentaje de densidad +++ con el 45% y sobre todo en aquellas que probablemente son secundarias a SMD).

Estudios tanto in vitro como in vivo, muestran la participación de las MSC en la hematopoyesis normal y en diversas enfermedades hematológicas. En SMD y LMA, la abundancia de MSC se asocia con progresión de la enfermedad y con sobrevida. A la fecha en la práctica clínica, no se cuantifica la abundancia de MSC de rutina; esto debido a que no se cuenta con un método estandarizado y sistemático para hacerlo.

En artículos antes citados, solo se evaluó la densidad de células estromales mesenquimales, sin embargo, nosotros evaluamos también el patrón de distribución (difuso o parches) y la localización, encontramos que LMA es la única de las tres enfermedades que presenta positividad en parches en algunas biopsias de médula ósea, lo cual se propone que puede corresponder a diferentes clones de células leucémicas y que de ellas dependa la localización de las células estromales. En cuanto a su localización observamos

que si hay una relación significativa de células estromales y megacariocitos en SMD, y que dependiendo de la enfermedad si cambia la localización normal reportada en algunas bibliografías de las células estromales en asociación a vasos sanguíneos, trabéculas, parénquima y megacariocitos. Por lo que creemos que esto puede ser de importancia para la evolución clínica y pronóstico del paciente, pero para comprobar esto se necesita dar seguimiento al curso clínico de los casos ya con tratamiento y ver si hay alguna relación con densidad, distribución y localización de células estromales en cada enfermedad.

Del estroma medular, no se valoran todos sus componentes; dentro de ellos, la fibrosis -que únicamente valora la cantidad de reticulina- es la única que ofrece un valor pronóstico dentro de las clasificaciones clínicas. La producción de colágeno y/o reticulina es realizada por las MSC de la médula ósea, sin embargo en un estudio reciente, el grupo de la Dra. Gratzinger, de Patología de la Universidad de Stanford, (13) encontraron que el grado de fibrosis, no correlaciona con la cantidad de MSC en las biopsias de médula ósea, en lo cual obtuvimos los mismos resultados en nuestro estudio, ya que demostramos que el grado de fibrosis fue independiente de la densidad de células estromales mesenquimales en todos los casos y no se asocia su localización a la de las células estromales mesenquimales en las biopsias.

En este estudio encontramos un método para valorar las células estromales mesenquimales con un marcador de inmunohistoquímica, con lo que, en adelante podrían cuantificarse en todas las biopsias de médula ósea e igualmente valorarse su patrón de distribución, localización y asociación a los distintos componentes de la médula ósea, para así, poder comprobar si son un factor pronóstico en la sobrevida y tratamiento de los pacientes al darles seguimiento.

## CONCLUSIONES

El 50% de las biopsias que son procesadas por el servicio de patología, no cuentan con la integridad óptima para su evaluación.

Es necesario mejorar la toma de la muestra para evitar que se fragmente o compacte.

Utilizar EDTA como decalcificador de rutina.

En este estudio logramos establecer, en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI, un método sistemático para el estudio de las células estromales mesenquimales en biopsias de médula ósea, integrando un sistema de evaluación de la densidad, patrón de distribución y localización de las células estromales mesenquimales.

### Perspectivas

Es necesario realizar un estudio prospectivo para conocer el desenlace clínico de los pacientes, cuyas biopsias fueron incluidas en este estudio.

Establecer si la cuantificación sistemática de las células estromales mesenquimales es un factor pronóstico en Leucemia Mieloide Aguda y Leucemia Linfoblástica Aguda, así como corroborarlo en Síndrome Mielodisplásico.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Flores-Figueroa E, Varma S, Montgomery K, Greenberg PL, Gratzinger D. Distinctive contact between CD34+ hematopoietic progenitors and CXCL12 CD271+ mesenchymal stromal cells in benign and myelodysplastic bone marrow. *Lab Invest.* 2012;92:1330-1341.
2. Krebsbach PH, Kuznetsov SA, Bianco P, Gehron P, Bone marrow stromal cells: characterization and clinical application. *CROBM* 1999;10,165-181.
3. Bianco P, Gehron P, Marrow stromal stem cells, the *Journal of Clinical Investigation*, 2000;12, 1663-1668.
4. Minguell JJ, Conget P, Erices A, Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells, *Braz J. Med Biol Res*, 2000; 33, 881-887.
5. Muraglia A, Cancedda R, Quarto R, Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model, *JCS*, 2000;113, 1161-1166.
6. Koc ON, Lazarus HM, Mesenchymal stem cells: heading into the clinic, *Bone Marrow Transplantation* 2001;27, 235-239.
7. Torlakovic E, Tenstad E, Funderud S, Rian E, CD10+ stromal cells form B-lymphocyte maturation niches in the human bone marrow, *J Pathol* 2005; 205,311-317.
8. Omatsu Y, Seike M, Sugiyama T, Kume T, Nagasawa T, Foxc1 is a critical regulator of haematopoietic stem/progenitor cell niche formation, *Letter Research* 2014; 508: 536-541.
9. Flores-Figueroa E, Arana-Trejo RM, Gutierrez-Espindola G, Perez-Carrera A, Mayani H. Mesenchymal stem cells in myelodysplastic síndromes: phenotypic and cytogenetic characterization. *Leuk Res* 2005;29:215-224.

10. Blau O, Hofman WK, Baldus F, Thiel V, Serbent E, Schuman E, et al. Chromosomal aberrations in bone marrow mesenchymal stromal cells from patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloblastic leukemia. *Exp. Hematol.* 2007; 35:221-229.
11. Campioni D, Bardi MA, Cavazzini F, Tammiso E, Pezzolo E, Pregnolato E, et al. Cytogenetic and molecular cytogenetic profile of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in chronic and acute lymphoproliferative disorders. *Ann Hematol.* 2012;91:1563-1577.
12. Lopez-Villar O, Garcia JL, Sanchez-Guijo FM, Robledo EM, Villaron P, Hernandez-Campo N, et al. Both expanded and uncultured mesenchymal stem cells from MDS patients are genomically abnormal, showing a specific genetic profile for the 5q- syndrome. *Leukemia.* 2009;23:664-672.
13. Johnson RC, Kurzer JH, Greenberg P, Gratzinger D, Mesenchymal stromal cell density is increased in higher grade myelodysplastic syndromes and independently predicts survival, *AJCP* 2014;1-34.
14. Machherndl-Spandl S, Segal W, Bosmuller H, Germing U, Gruber Ch, Nachtkamp K, et al, Prognostic impact of blast cell counts in dysplastic bone marrow disorders (MDS and CMML I) with concomitant fibrosis, *Ann Hematol* 2014; 93:57-64.
15. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. (Eds): World Health Organization Classification of Tumours, Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, IARC Press: Lyon 2001; 61-63, 75-77, 111-115.
16. Merino A, Clasificación de las Leucemias agudas mieloides, *Rev Lab Clin.* 2010;3:139–147
17. Scott BL, Storer BE, Greene JE, Hackman RC, Appelbaum F, Deeg HJ, Marrow fibrosis as a risk factor for posttransplantation outcome in patients with advanced Myelodysplastic Syndrome or Acute Myeloid

- Leukemia with multilineage dysplasia, *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2007;13:345-354.
18. Kuter D, Bain B, Mufti G, Bagg A, Hasserjian RP, Bone marrow fibrosis: pathophysiology and clinical significance of increased bone marrow stromal fibres, *bjh* 2007; 139: 351-362.
  19. Fu B, Young Ch, Goswami M, Xei W, Jaso JM, et al, The clinical importance of moderate/severe bone marrow fibrosis in patients with therapy-related myelodysplastic syndromes, *Ann Hematol* 2013;92:1335-1343.
  20. Sung-Eun Ch, Proposal of an Appropriate Decalcification Method of Bone Marrow Biopsy specimens in the era of expanding Genetic Molecular Study, *jptm* 2015; 49:236-242.
  21. Brown R, Edwards J, Bartlett J, Routine Acid Decalcification of Bone Marrow Samples can preserve DNA for FISH and CGH studies in metastatic Prostate Cancer, *jhc*, 2002;50:113-115.
  22. Veena M, Singh MD, Analysis of the effect of various decalcification agents on the quantity and quality of nucleic acid (DNA and RNA) recovered from bone biopsies, *anndiagpath* 2013; 322-326.
  23. Aparecido V, Walter J, Issy A, Advantages of a Combined Method of Decalcification Compared to EDTA, *Microsc. Res. Tech.* 2015; 78: 111-118.

## **ANEXO 1**

### **Procesamiento de las biopsias de médula ósea**

#### Solución fijadora

Formol 10%

#### Solución decalcificadora ÁCIDA

Una vez fijadas, las biopsias son sumergidas en una solución de Ácido nítrico al 10%, por 6-8 horas.

#### Solución

1.- Se mezclan 10 ml de ácido nítrico en 90 ml de agua destilada

#### Solución decalcificadora EDTA

Una vez fijadas, las biopsias son sumergidas en una solución de EDTA al 12% pH 8.0 en por lo menos 20 partes de solución por biopsia durante 3-5 días.

#### Solución

- 1.- Calentar 700ml de PBS a 55 grados
- 2.- Añadir 120gr de EDTA
- 3.- Añadir NA OH para ajustar el pH hasta 8.0
- 4.- Verificar pH y dejar enfriar.
- 5.- Aforar a 1000ml

## ANEXO 2

### TÉCNICA PARA INMUNOHISTOQUÍMICA MANUAL PARA KIT IMPRESS RABBIT/CONEJO

**IMPORTANTE: Antes de comenzar a utilizar este Kit se debe verificar en que especie está hecho el o los anticuerpos, para elegir correctamente el Kit que se va a usar**

#### 1. DISEÑO EXPERIMENTAL

- a) Realizar el diseño del experimento y tenerlo impreso
- b) De acuerdo al diseño del experimento elaborar etiqueta.

**DESCRIPCIÓN:** La etiqueta debe llevar No. de muestra, No. de experimento, No. de laminilla y fecha

#### 2. DESPARAFINACIÓN

- a) La muestra se pone a desparafinar toda la noche

**DESCRIPCIÓN:** Las laminillas se colocan dentro de la estufa a 60°C de forma horizontal y viendo hacia abajo para evitar que el tejido se desprenda

#### 3. HIDRATACIÓN

- a) Sumergir las laminillas en OTTIX PLUS durante 8 min dos veces y entre cada paso se sumergir las laminillas 5 veces gentilmente > Escurrir bien
- b) Sumergir las laminillas en OTTIX SHAPER durante 5 min dos veces y entre cada paso se sumergir las laminillas 5 veces gentilmente > Escurrir bien
- c) Sumergir las laminillas en H<sub>2</sub>O corriente durante 5 min

#### 4. RECUPERACIÓN DEL ANTÍGENO

- a) Se llena el GPR (olla) del KOS con 550 mL de la solución de recuperación antigénica
- b) Se colocan las laminillas dentro del GPR, se le coloca la tapa y se atornilla posteriormente el GPR se coloca dentro del KOS haciéndolo incidir de manera correcta a la ranura

**NOTA:** En el paso "b" si solo se ocupan menos 20 laminillas es necesario rellenar los espacios vacíos con laminillas blancas

- c) En el KOS se elige: Usuario > Contraseña (0039) > Recuperación antigénica > 110°C > 20 GPR > 5 minutos. Se espera a que el KOS termine el proceso, este funciona durante 30 minutos; siendo los últimos 5 minutos donde se alcanza el máximo de temperatura y presión.
- d) Se saca el GPR del KOS, se le conecta el tubo gris, se hace incidir el chorro de H<sub>2</sub>O en la abertura del tubo y se deja correr el chorro de H<sub>2</sub>O hasta que el GPR libere la presión

**NOTA:** El paso "d" paso puede variar de 5 a 10 min. Dependiendo del flujo de H<sub>2</sub>O que se deje correr

- e) Se destapa el GPR y se deja enfriar mínimo durante 30 min a temperatura ambiente **(ESTE PASO ES CRÍTICO)**
- f) Transcurrido ese tiempo sacar las laminillas > Sumergir en H<sub>2</sub>O destilada durante 10 min > Sumergir en PBS durante 5 min > Quitar exceso de PBS sacudiéndolo una vez > Marcar con plumón

**NOTA:** En el paso "f" al aplicar el plumón primero se debe probar para corroborar que no escurra y no vaya a manchar el tejido y al aplicarlo debe de ser alrededor del tejido sin tocarlo

## **5. INHIBICIÓN DE LA PEROXIDASA**

- a) Se inhibe la peroxidasa con Bloxall durante 20 min en la cámara húmeda > Decantar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> > Sumergir en PBS > Realizar un lavado con piceta > Sumergir en PBS durante 5 min. > Quitar exceso de PBS sacudiendo la laminilla una vez.
- b) Incubar por 20 minutos con el suero de bloqueo normal de caballo listo para usarse (2.5%) o la solución bloqueadora escogida en la cámara húmeda > Decantar el suero

**IMPORTANTE:** En el paso "b" NO se deben realizar lavados

**NOTA:** La cámara húmeda se realiza poniendo gasas y agua destilada

## **6. ANTICUERPO PRIMARIO**

- a) Incubar con el anticuerpo primario de conejo diluido en la solución diluyente del anticuerpo apropiado

- b) A las laminillas adicionar 100 mL (ajustar al tamaño del tejido) del anticuerpo primario a la concentración requerida, se coloca un cubreobjetos para mantener la humedad en el tejido, posteriormente la laminilla se introduce en la cámara húmeda y esta se envuelve en una bolsa ziplock, dejándose incubar toda la noche a 4°C.
- c) Al día siguiente sumergir las laminillas en PBS durante 1 min para que se desprenda el cubreobjetos.**
- d) Realizar un lavado con piceta > Sumergir las laminillas en PBS durante 5 min > Quitar el exceso de PBS sacudiendo la laminilla una vez.

**NOTA:** De ser necesario se debe reaplicar el plumón

## **7. ANTICUERPO 2°**

- a) A las laminillas colocar 3 gotas con el Reactivo ImmPRESSTM Anti-RabbitIG dentro de la cámara húmeda e incubar por 30 minutos>Posteriormente decantar el Reactivo Immpress > Sumergir en PBS > Lavar con piceta > Sumergir en PBS durante 5 min> Sacar y sumergir las laminillas gentilmente 5 veces > Sumergir en PBS durante 5 min> Quitar exceso de PBS sacudiendo la laminilla una vez

## **8. REVELADO**

- a) Se revelan los cortes con el Kit de DAB 1:1 colocar 100 µL (ajustar al tejido) en cada laminilla hasta observar bajo el microscopio la marca evidente.

**NOTA:** El DAB revela en color café y se debe observar la marca evidente

- b) Posteriormente inhibir la reacción de DAB realizándole un lavado con PBS
- c) Posteriormente realizar lavados en agua destilada durante 5 minutos.

## **9. CONTRATINCIÓN DE LAMINILLAS CON HEMATOXILINA**

- a) Cubrir el tejido con hematoxilina de Mayer's

**NOTA:** Solo se debe sumergir y sacar la laminilla ya que esta hematoxilina funciona muy bien y da una contratinción muy intensa

- b) Realizar baños con agua corriente, hasta quitar el exceso de colorante

- c) Sumergir y sacar las laminillas en Carbonato de Litio (solo es para que vire el colorante)
- d) Sumergir las laminillas en agua corriente
- e) Colocar las laminillas en Ottix SHAPER (deshidratar) por 30 segundos y dejar secar por completo
- f) Ottix PLUS (aclara) por 30 segundos, se deja secar por completo
- g) Las laminillas se montan con resina y se dejan secar hasta el día siguiente para su observación al microscopio

**NOTA:** En el paso "g" ser cuidadoso al aplicar la resina y si quedan burbujas quitarlas aplicando solo un poco de presión ya que de lo contrario podemos romper la laminilla

## **TÉCNICA PARA INMUNOHISTOQUÍMICA MANUAL PARA KIT IMPRESS MOUSE/RATÓN**

**IMPORTANTE: Antes de comenzar a utilizar este Kit se debe verificar en que especie está hecho el o los anticuerpos, para elegir correctamente el Kit que se va a usar**

### **10. DISEÑO EXPERIMENTAL**

- c) Realizar el diseño del experimento y tenerlo impreso
- d) De acuerdo al diseño del experimento elaborar etiqueta.

**DESCRIPCIÓN:** La etiqueta debe llevar No. de muestra, No. de experimento, No. de laminilla y fecha

### **11. DESPARAFINACIÓN**

- b) La muestra se pone a desparafinar toda la noche

**DESCRIPCIÓN:** Las laminillas se colocan dentro de la estufa a 60°C de forma horizontal y viendo hacia abajo para evitar que el tejido se desprenda

### **12. HIDRATACIÓN**

- d) Sumergir las laminillas en OTTIX PLUS durante 8 min dos veces y entre cada paso se sumergir las laminillas 5 veces gentilmente > Escurrir bien
- e) Sumergir las laminillas en OTTIX SHAPER durante 5 min dos veces y entre cada paso se sumergir las laminillas 5 veces gentilmente > Escurrir bien

- f) Sumergir las laminillas en H<sub>2</sub>O corriente durante 5 min

### 13. RECUPERACIÓN DEL ANTÍGENO

- g) Se llena el GPR (olla) del KOS con 550 mL de la solución de recuperación antigénica
- h) Se colocan las laminillas dentro del GPR, se le coloca la tapa y se atornilla posteriormente el GPR se coloca dentro del KOS haciéndolo incidir de manera correcta a la ranura

**NOTA:** En el paso "b" si solo se ocupan menos 20 laminillas es necesario rellenar los espacios vacíos con laminillas blancas

- i) En el KOS se elige: Usuario > Contraseña (0039) > Recuperación antigénica > 110°C > 20 GPR > 5 minutos. Se espera a que el KOS termine el proceso, este funciona durante 30 minutos; siendo los últimos 5 minutos donde se alcanza el máximo de temperatura y presión.
- j) Se saca el GPR del KOS, se le conecta el tubo gris, se hace incidir el chorro de H<sub>2</sub>O en la abertura del tubo y se deja correr el chorro de H<sub>2</sub>O hasta que el GPR libere la presión

**NOTA:** El paso "d" paso puede variar de 5 a 10 min. Dependiendo del flujo de H<sub>2</sub>O que se deje correr

- k) Se destapa el GPR y se deja enfriar mínimo durante 30 min a temperatura ambiente **(ESTE PASO ES CRÍTICO)**
- l) Transcurrido ese tiempo sacar las laminillas > Sumergir en H<sub>2</sub>O destilada durante 10 min > Sumergir en PBS durante 5 min > Quitar exceso de PBS sacudiéndolo una vez > Marcar con plumón

**NOTA:** En el paso "f" al aplicar el plumón primero se debe probar para corroborar que no escurra y no vaya a manchar el tejido y al aplicarlo debe de ser alrededor del tejido sin tocarlo

### 14. INHIBICIÓN DE LA PEROXIDASA

- c) Se inhibe la peroxidasa con Bloxall durante 20 min en la cámara húmeda > Decantar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> > Sumergir en PBS > Realizar un lavado con piceta > Sumergir en PBS durante 5 min. > Quitar exceso de PBS sacudiendo la laminilla una vez.

- d) Incubar por 20 minutos con el suero de bloqueo normal de caballo listo para usarse (2.5%) o la solución bloqueadora escogida en la cámara húmeda >Decantar el suero

**IMPORTANTE:** En el paso “b” NO se deben realizar lavados

**NOTA:** La cámara húmeda se realiza poniendo gasas y agua destilada

### **15.ANTICUERPO PRIMARIO**

- e) Incubar con el anticuerpo primario de ratón diluido en la solución diluyente del anticuerpo apropiado
- f) A las laminillas adicionar 100 mL (ajustar al tamaño del tejido) del anticuerpo primario a la concentración requerida, se coloca un cubreobjetos para mantener la humedad en el tejido, posteriormente la laminilla se introduce en la cámara húmeda y esta se envuelve en una bolsa ziplock, dejándose incubar toda la noche a 4°C.
- g) Al día siguiente sumergir las laminillas en PBS durante 1 min para que se desprenda el cubreobjetos.**
- h) Realizar un lavado con piceta > Sumergir las laminillas en PBS durante 5 min > Quitar el exceso de PBS sacudiendo la laminilla una vez.

**NOTA:** De ser necesario se debe reaplicar el pulmón

### **16.ANTICUERPO 2°**

- b) A las laminillas colocar 3 gotas con el Reactivo ImmPRESSTM Anti-MouseIG dentro de la cámara húmeda e incubar por 30 minutos>Posteriormente decantar el Reactivo Impress > Sumergir en PBS > Lavar con piceta > Sumergir en PBS durante 5 min> Sacar y sumergir las laminillas gentilmente 5 veces > Sumergir en PBS durante 5 min> Quitar exceso de PBS sacudiendo la laminilla una vez

### **17.REVELADO**

- d) Se revelan los cortes con el Kit de DAB 1:1 colocar 100 µL (ajustar al tejido) en cada laminilla hasta observar bajo el microscopio la marca evidente.

**NOTA:** El DAB revela en color café y se debe observar la marca evidente

- e) Posteriormente inhibir la reacción de DAB realizándole un lavado con PBS
- f) Posteriormente realizar lavados en agua destilada durante 5 minutos.

### **18. CONTRATINCIÓN DE LAMINILLAS CON HEMATOXILINA**

- h) Cubrir el tejido con hematoxilina de Mayer's

**NOTA:** Solo se debe sumergir y sacar la laminilla ya que esta hematoxilina funciona muy bien y da una contratinción muy intensa

- i) Realizar baños con agua corriente, hasta quitar el exceso de colorante
- j) Sumergir y sacar las laminillas en Carbonato de Litio (solo es para que vire el colorante)
- k) Sumergir las laminillas en agua corriente
- l) Colocar las laminillas en Ottix SHAPER (deshidratar) por 30 segundos y dejar secar por completo
- m) Ottix PLUS (aclarar) por 30 segundos, se deja secar por completo
- n) Las laminillas se montan con resina y se dejan secar hasta el día siguiente para su observación al microscopio

**NOTA:** En el paso "g" ser cuidadoso al aplicar la resina y si quedan burbujas quitarlas aplicando solo un poco de presión ya que de lo contrario podemos romper la laminilla