

21/ 78



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

T E S I S

**"ESTUDIO CITOQUIMICO DEL CONCENTRADO LEUCOCITARIO
DE PACIENTES CON DIAGNOSTICO DE ANEMIA APLASTICA"**



**EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA**

ALEJANDRO MARCHE COVA

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

MEXICO, D. F.

1987



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 está 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.

C O N T E N I D O

	PAGINAS
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
OBJETIVOS	4
GENERALIDADES	5
MATERIAL Y METODOS	21
RESULTADOS	34
DISCUSION	48
CONCLUSIONES	51
BIBLIOGRAFIA	52

R E S U M E N

EL principal objetivo del presente trabajo es mostrar la utilidad e importancia del estudio citoquímico del concentrado leucocitario en el diagnóstico diferencial entre la anemia aplásica y los síndromes mielodisplásticos.

Se investigaron 36 pacientes con diagnóstico de anemia aplásica, utilizando el método del concentrado leucocitario y dos tinciones citoquímicas: la peroxidasa y el azul de Prusia.

El diagnóstico se confirmó tan sólo en la mitad de los pacientes, mientras que la otra mitad mostró características de síndromes mielodisplásticos.

La correlación encontrada entre el concentrado leucocitario y el estudio citoquímico favorece el empleo de ambos métodos en el diagnóstico diferencial entre la anemia aplásica y los síndromes mielodisplásticos.

I N T R O D U C C I O N

Existe un grupo de padecimientos que en algún momento cursan con un 'período' de aplasia medular, por lo que las manifestaciones clínicas, el número de células así como sus características morfológicas en sangre periférica y médula ósea, pueden confundirse con las características de una verdadera anemia aplástica. Esto ocasiona que el diagnóstico inicial sea erróneo, ya que, conforme transcurre la enfermedad, se observa una evolución hacia leucemia ó hacia anemia refractaria, que son los trastornos reales. Dichos padecimientos se engloban con el nombre de síndromes mielodisplásticos ó síndromes preleucémicos (1-8).

El diagnóstico diferencial en ese 'período' se dificulta, debido a que los métodos usuales clínicos y de laboratorio no arrojan datos precisos que permitan concluir con seguridad que se trata de una anemia - aplástica ó de un síndrome mielodisplástico; inclusive el análisis de médula ósea que es lo que se recomienda en estos casos no es del todo confiable, porque existen en la anemia aplástica focos hematopoyéticos que condicionan una posible médula ósea normo ó hiper celular. Lo que finalmente repercute en un tratamiento inadecuado, ya que en este aspecto difieren totalmente (9).

Para poder establecer el diagnóstico diferencial y por ende el definitivo entre la anemia aplástica y los síndromes mielodisplásticos, se seleccionó el método del concentrado leucocitario seguido por el uso de dos tinciones citoquímicas: la peroxidasa y el azul de Prusia. Esto es válido, si se considera que desde 1949 se ha utilizado el concentrado leucocitario para investigar la morfología de las células de la sangre periférica en enfermedades que cursan con leucopenia (10). Además, mediante la aplicación de procedimientos citoquímicos, es posible establecer el diagnóstico diferencial en trastornos de tipo mieloprolifera

tivo y linfoproliferativo y en algunos casos, estas técnicas son aplicadas para el seguimiento terapéutico ó de pronóstico (11).

O B J E T I V O S

- 1) Mostrar la utilidad e importancia del estudio citoquímico del concentrado leucocitario en el diagnóstico diferencial entre la anemia aplástica y los síndromes mielodisplásticos.
- 2) Confirmar el diagnóstico de anemia aplástica de los pacientes investigados, por medio del estudio citoquímico del concentrado leucocitario de su sangre periférica.
- 3) Interrelacionar el estudio citoquímico con el concentrado leucocitario mediante un análisis de correlación.

GENERALIDADES

ANEMIA APLASTICA

La anemia aplástica es una enfermedad que resulta de un defecto -
 cuantitativo de la célula pluripotencial (stem cell) en su capacidad -
 de autorreplicación y de diferenciación. El mecanismo por el cual se -
 produce este daño a las células primitivas no se conoce con precisión,
 y se sugieren como posibles los siguientes (12,13):

- Disminución de su número
- Disminución de su capacidad de diferenciación
- Falta de capacidad de replicación
 - = Agentes químicos
 - = Agentes físicos
- Falta de capacidad de diferenciación
 - = Anomalia intrínseca en la célula precursora
 - = Incapacidad de respuesta al estímulo de acondicionamiento
- Balance anormal de replicación y de diferenciación
- Microambiente inadecuado en el interior de la médula ósea
 - = Factores humorales
 - = Factores celulares
 - = Ambos
- Microambiente inadecuado en el interior de la célula primitiva
- Factores inhibidores de la célula primitiva

<ul style="list-style-type: none"> = Humorales = Celulares = Ambos 	}	Aumentados, disminuidos ó carentes
-----------------------------------------------------------------------------------------------------	---	------------------------------------
- Carencia de cofactores hematopoyéticos
 - = Humorales
 - = Celulares

El daño a la célula pluripotencial se refleja en la médula ósea como una substitución del tejido noble hematopoyético por médula amarilla, con zonas aisladas normo e inclusive hipercelulares. Mientras que en sangre periférica se manifiesta como una anemia normocítica normocrómica con ligera macrocitosis y anisocitosis, acompañada de pancitopenia de grado variable de las líneas celulares existentes, siendo poco común la citopenia pura de la serie roja (14-16).

CLASIFICACION. -

No obstante que aún no es posible una clasificación plenamente satisfactoria, la siguiente resulta útil (17):

I. Hereditaria (congénita)

A) Anemia hipoplásica (Blackfan y Diamond)

B) Pancitopenia

1. Con deformidades congénitas (Fanconi)

2. Sin deformidades congénitas (Estren y Dameshek)

II. Adquiridas (químicas, físicas, infecciosas ó idiopáticas)

A) Hipoplasia eritrocítica

B) Pancitopenia

1. Con médula hipocelular

2. Con médula celular

a) Eritropoyesis inactiva

b) Eritropoyesis ineficaz

AGENTES ETIOLÓGICOS. -

Los agentes etiológicos más comunes de la anemia aplásica adquirida se enlistan a continuación (18,19), la frecuencia con la que producen esta enfermedad se ilustra como: +++ = regularmente, ++ = frecuentemente, + = ocasionalmente.

I. QUIMICOS

A) Farmacológicos

a) Antibióticos (+++)

1. Daunorubicin
2. Adriamicin

b) Antimicrobiales

1. Cloranfenicol (+++)
2. Arsenicales orgánicos (++)
3. Quinacrina (++)
4. Estreptomicina (+)
5. Penicilina (+)
6. Meticiclina (+)
7. Oxitetraciclina (+)
8. Clortetraciclina (+)
9. Sulfonamidas (+)

c) Anticonvulsivos

1. Metilfeniletilhidantoína (++)
2. Trimetadiona (++)
3. Metilfenilhidantofna (+)
4. Fenacimida (+)
5. Dilantin (+)
6. Etosuximida (+)

d) Hipoglucemiantes (+)

1. Tolbutamida
2. Clorpropamida
3. Carbutamida

e) Antihistaminicos (+)

1. Piribenzamida

- f) Tranquilizantes y sedantes (+)
 - 1. Meprobamato
 - 2. Clorpromacina
 - 3. Promacina
 - 4. Clordiazepoxido
 - 5. Mezapina
- g) Analgésicos
 - 1. Fenilbutazona (++)
 - 2. Acido acetil salicflico (+)
 - 3. Indometacin (+)
 - 4. Carbamazepina (+)
- B) No farmacológicos
 - a) Solventes
 - 1. Benceno y sus derivados (+++)
 - 2. Tetracloruro de carbono (+)
 - b) Gas mostaza y sus derivados (+++)
 - 1. Sulfuro
 - 2. Nitrógeno
 - c) Antimitóticos (+++)
 - 1. Colchicina
 - 2. Alcaloides de la vincapervinca
 - d) Antimetabolitos (+++)
 - 1. Compuestos antifólicos
 - 2. 6-mercaptipurina
 - 3. Tioguanina
 - e) Metales
 - 1. Arsénico (+++)
 - 2. Oro y sus derivados (++)
 - 3. Bismuto (+)
 - 4. Plata coloidal (+)

5. Mercurio (+)

f) Insecticidas

1. DDT (++)

2. Paratión (+)

3. Clordano (+)

4. Pentaclorofenol (+)

II. FISICOS (+++)

A) Radiaciones ionizantes

a) Rayos roentgen

b) Isótopos radioactivos

c) Bombas atómicas

III. INFECCIOSOS

A) Virales

a) Virus de la hepatitis (+++)

1. No A

2. No B

b) Parvovirus humano B-19 (+++)

c) Virus de la mononucleosis infecciosa (+)

d) Virus de la influenza (+)

e) Virus del dengue (+)

B) Bacterianos (+)

a) Mycobacterium

1. M. tuberculosis

2. M. atípicas

b) Brucella

1. Br. abortus

2. Br. melitensis

3. Br. suis

Sin embargo, se debe resaltar el hecho de que aproximadamente el 50% de los casos de anemia aplástica adquirida son considerados como idiopáticos.

DIAGNOSTICO.-

I. CLINICO (20):

La anemia aplástica congénita tiene un inicio gradual, por lo que los síntomas clínicos dependen de la intensidad de la pancitopenia. Análogamente, la anemia aplástica adquirida por causas químicas, comienza de manera gradual e insidiosa, en la mayoría de los casos, siendo las primeras manifestaciones clínicas: debilidad progresiva, fatiga y púrpura. Mientras que la anemia aplástica adquirida por causas físicas - así como la idiopática, tiene un inicio brusco y repentino, predominando el fenómeno hemorrágico y las infecciones.

II. DE LABORATORIO (21):

A) Hematológico

Frotis de sangre periférica.-

Anemia normocítica-normocrómica con ligera macrocitosis y anisocitosis; linfocitosis aparente del 90%, leucocitos polimorfonucleares deficientes en gránulos y eventualmente la presencia de formas inmaduras trombocitopenia con algunas plaquetas gigantes.

Frotis de médula ósea.-

Aspecto hipoplásico, normal ó hiperplásico, siendo la megacariocitopenia la alteración constante en los tres casos, coincidente con la presencia de grupos de fibroblastos, incremento de basófilos hísticos, linfocitos y células plasmáticas, así como tejido graso.

Eritrocitos.- 500,000 — 3,500,000 / mm³

Leucocitos .- 2,000 — 3,000 / mm³

Plaquetas .- 25,000 — 75,000 / mm³

Reticulocitos.- Descenso del número absoluto con algunos episodios-
de reticulocitosis relativa del 2-4%.

Pruebas de función plaquetaria:

Retracción del coagulo.- Aumentada

Fragilidad capilar .- Aumentada

Tiempo de sangrado .- Aumentado

B) Químico

Pruebas funcionales hepáticas.- Normales

Capacidad de secreción de HCl.- Normal

Capacidad de captación del Fe.- Disminuida a 150 ó 250 $\mu\text{g}/\text{dl}$

Fe. sérico .- Elevado

Bilirrubina en suero .- Normal

Urobilinógeno fecal .- Normal ó aumentado en algunos casos

TRATAMIENTO.-

Hasta ahora no existe el tratamiento ideal para la anemia aplástica es más, la respuesta que se obtiene con los tratamientos de mayor aplicación en la actualidad es cercana al 50-60%; esto es lógico, si se toma en consideración que no se conoce el mecanismo por el que se produce el daño a la célula pluripotencial, por consiguiente, no es posible conocer aún la cura adecuada para dicha enfermedad. Además el tratamiento de elección está supeditado, por lo menos, a los siguientes factores: a) Clase de anemia aplástica, b) grado de avance de la enfermedad, c) disponibilidad del tratamiento. Y aún tomando el mejor de los casos, que haya respondido el paciente de manera 'adecuada' al tratamiento, siempre queda la incertidumbre de una posible recaída.

No obstante, se acepta como norma general, que el tratamiento para la anemia aplástica tendrá mayor éxito mientras más pronto se detecte la enfermedad.

Dentro de los tratamientos de mayor aplicación en la actualidad es-
tán los siguientes (12-14,22,23):

I. Sosten ó soporte.-

Recomendado para cualquier clase de anemia aplástica y en cualquier grado de avance, incluye:

- 1) Identificación y prohibición del factor o los factores que causa
ron la enfermedad (difícil tanto en el caso de anemia aplástica-
idiopática como de la congénita).
- 2) Mantenimiento de los niveles normales de hemoglobina así como de
los elementos formes de la sangre, mediante transfusiones ó fére-
sis.
- 3) Prevención ó control de hemorragias e infecciones.
- 4) Cuidados generales: higiene adecuada, dieta equilibrada, etc.

II. Hormonal y/ó sus intermediarios metabólicos.-

- 1) Anabólicos androgénicos
 - 1.1) 5-B-etiocolanólona
 - 1.2) Cetropregnenólona
 - 1.3) Decanoato de nandrolona
 - 1.4) Oximetalona

Recomendados principalmente para la anemia aplástica no grave y del
tipo adquirido, y en menor proporción para la congénita.

2) Testosterona

Recomendada para la anemia aplástica congénita de tipo Fanconi.

3) Cortisona \

Recomendada tanto para la anemia aplástica congénita como para la
adquirida por causas químicas.

III. Inmunosupresores.-

Recomendados para la anemia aplástica con factores inhibidores de -

la hematopoyésis en el cultivo de médula ósea, así como para la con
génita, incluyen:

- 1) Ciclofosfamida
- 2) Azathioprina
- 3) Prednisona
- 4) Metilprednisona

IV. Serológico.-

Recomendado para la anemia aplástica con factores inhibidores de la hematopoyésis, así como en combinación con el trasplante de médula ósea, incluye:

- 1) Globulina antilinfocítica (GAL)
- 2) Globulina antitimocítica (GAT)

V. Trasplante de médula ósea (TMO).-

Recomendado para todas las clases de anemia aplástica y sobre todo para las más graves. Sin embargo su disponibilidad está sujeta a - que el paciente tenga un hermano gemelo idéntico o cuando menos com
patible.

VI. Esplenectomía:-

Recomendado solamente en la anemia aplástica con presencia de un - componente hemolítico y/o cuando exista una producción de autoanti-
cuerpos.

SINDROMES MIELODISPLASTICOS

Bajo el nombre de síndromes mielodisplásticos, síndromes preleucémicos ó síndromes dishematopoyéticos se agrupan aquellos padecimientos -

que son el resultado de un desorden clonal de la célula pluripotencial y que se caracterizan por la presencia de citopenias en sangre periférica que afectan por lo menos dos de las tres series producidas por la médula ósea, la cual se observa por lo general hipercelular, con anomalías prominentes en serie roja y cambios menos acentuados en la serie blanca y en la megacariocítica (1,24).

Al igual que en la anemia aplástica, tampoco se conoce el mecanismo por el cual se produce ese desorden clonal de la célula pluripotencial en los síndromes mielodisplásticos, los más aceptados son los siguientes (25):

- Eventos mutagénicos en la célula pluripotencial
 - = Radiaciones
 - = Virus
 - = Químicos
- Error o fallas en el desarrollo normal de la célula primitiva
 - = Morfológico
 - = Funcional
 - = Anormalidades cromosómicas

CLASIFICACION.-

La clasificación de los síndromes mielodisplásticos ha sido objeto de continuas modificaciones debido a que algunas leucemias tienden a presentarse como síndromes mielodisplásticos (26,27), lo cual crea confusiones. Sin embargo, los trabajos realizados por J.M.Bennett y colaboradores (28-32) han resuelto los problemas surgidos por estas confusiones y de esta manera se ha logrado llegar a la siguiente clasificación, que es la más utilizada en la actualidad:

- 1) Anemia refractaria
- 2) Anemia refractaria con sideroblastos en anillo

- 3) Anemia refractaria con exceso de blastos
- 4) Leucemia mielomonocítica crónica
- 5) Anemia refractaria con exceso de blastos en transformación

AGENTES ETIOLOGICOS.-

No obstante que cada síndrome mielodisplásico tiene sus propios agentes etiológicos, se ha encontrado un grupo de agentes que son comunes a los 5 tipos de síndromes antes mencionados y no solo eso, la frecuencia con la que los producen es mayor que la de sus agentes particulares (33,34). Estos son:

- A) Radiaciones ionizantes
- B) Venenos ambientales
 - a) Plomo
 - b) Gases de combustión de automoviles
 - c) Humos industriales
- C) Agentes quimoterapéuticos anticáncer
 - a) Drogas alquilantes

DIAGNOSTICO.-

I. CLINICO (35):

Las manifestaciones clínicas características de los síndromes mielodisplásicos son: Debilidad, fatiga, falta de aliento, tendencia a contusiones, pérdida de peso, jaquecas, infecciones recurrentes y anorexia. En aproximadamente un tercio de los pacientes suele presentarse también hepatomegalia y/6 esplenomegalia.

II. DE LABORATORIO (36,37):

- 1) Anemia refractaria
Frotis de sangre periférica.-

Anemia normocítica-normocrómica con ligera macrocitosis; reticuloci

topenia, diseritropoyesis de grado variable. Los blastos no se observan frecuentemente, y cuando se observan no exceden el 1%. También se observa neutropenia y trombocitopenia.

Frotis de médula ósea.-

Aspecto normo o hiperclular con hiperplasia eritroide y 6/6 diseritropoyesis. La serie granulocítica y la megacariocítica casi siempre aparecen normales y con un 5% de blastos.

2) Anemia refractaria con sideroblastos en anillo

Frotis de sangre periférica.-

Se observan los mismos hallazgos que en la anemia refractaria.

Frotis de médula ósea.-

Se observan los mismos hallazgos que en la anemia refractaria, a excepción del porcentaje de blastos, que es alrededor del 15% de todas las células nucleadas y además poseen gránulos sideróticos que se depositan alrededor del núcleo dando la apariencia de un 'anillo' de ahí el nombre de sideroblastos en anillo.

3) Anemia refractaria con exceso de blastos

Frotis de sangre periférica.-

Anemia normocítica-normocrómica con ligera macrocitosis y poiquilocitosis (células en lagrima); neutropenia, marcada disgranulopoyesis. Los blastos, cuando se llegan a observar, son alrededor del 5%.

Frotis de médula ósea.-

Aspecto hiperclular, con grado variable de hiperplasia eritroide y 6 granulocítica. Existe siempre evidencia de disgranulopoyesis, diseritropoyesis y 6 dismegacariocitopoyesis. El porcentaje de blastos observados es de 5-20% y algunas veces se pueden encontrar sideroblastos en anillo.

4) Leucemia mielomonocítica crónica

Frotis de sangre periférica.-

Anemia normocítica-normocrómica; monocitosis absoluta o bien asociada con un incremento de los granulocitos maduros, con o sin disgranulopoyesis. El porcentaje de blastos es menor del 5%.

Frotis de médula ósea.-

Aspecto hipercelular debido en gran parte a la serie monocítica; con o sin disgranulopoyesis. El porcentaje de blastos es similar al de la anemia refractaria con exceso de blastos, pero se distingue de ésta por el incremento de casi el 5% de promonocitos.

5) Anemia refractaria con exceso de blastos en transformación

Frotis de sangre periférica.-

Se observan los mismos hallazgos que en la anemia refractaria con exceso de blastos, pero se encuentran más del 5% de blastos y la presencia de bastones de Auer en los precursores granulocíticos.

Frotis de médula ósea.-

Se observan los mismos hallazgos que en la anemia refractaria con exceso de blastos, solo que el porcentaje de blastos es de 20-30% y además los precursores granulocíticos presentan bastones de Auer.

TRATAMIENTO. -

Al igual que en la anemia aplásica, tampoco se ha encontrado el tratamiento ideal para los síndromes mielodisplásicos. Inclusive, las respuestas obtenidas con los tratamientos de uso actual no son satisfactorias, porque son incompletas, de corta duración y frecuentemente se asocian con una considerable toxicidad.

Para la elección del tratamiento se toman en cuenta tanto la edad del paciente como los factores pronóstico obtenidos en el diagnóstico, además se tiene como regla que: "La agresividad del tratamiento debe ser proporcional a la agresividad de la enfermedad".

Los tratamientos de uso actual son (38):

I. Piridoxina.-

Recomendada para pacientes con anemia refractaria con sideroblastos en anillo, en dosis de 200 mg diarios durante dos meses por vía oral. La respuesta obtenida es del 38%.

II. Acido 13-cis-retinoico.-

Recomendado para pacientes con anemia refractaria con sideroblastos en anillo y con leucemia mielomonocítica crónica; se han probado diferentes dosis, siendo la de 20-125 mg/m² diaria, con la que se ha obtenido una 'mejor' respuesta: 33%.

III. Quimioterapia combinada.-

Recomendada para todos los síndromes mielodisplásticos, principalmente aquellos regímenes que contienen arabinosido-citosina y una antraciclina, obteniéndose hasta 50% de respuesta.

IV. Arabinosido-citosina en dosis bajas.-

Recomendada para todos los síndromes mielodisplásticos, siempre y cuando hallan fallado otros tratamientos.

V. Trasplante de médula ósea.-

Recomendado para todos los síndromes mielodisplásticos, siempre y cuando se cuente con el donador adecuado (alogeneico), lo cual hace que sea una limitante para emplearlo como terapia de primera línea.

ESTUDIO CITOQUIMICO

El empleo de tinciones citoquímicas surge de la necesidad de obtener una mayor precisión en el diagnóstico morfológico de ciertos trastornos sanguíneos, en los que las tinciones de Romanowsky no proporcionan una definición adecuada de las células sanguíneas o de médula

ósea, que permita identificarlas con seguridad. Lo que al final lleva a un diagnóstico diferencial erróneo (39).

La gran precisión del estudio citoquímico en el diagnóstico morfológico se ha podido comprobar mediante estudios simultáneos de microscopía electrónica en pacientes con leucemia aguda. En quienes los hallazgos citoquímicos fueron confirmados en el 90% de los casos con el análisis ultraestructural (40).

La elección de un estudio citoquímico determinado está supeditada, principalmente, a las características morfológicas de la enfermedad a estudiar y a la disponibilidad que se tenga de los reactivos. Tomando esto como base, para establecer el diagnóstico diferencial entre la anemia aplásica y los síndromes mielodisplásicos bastará con realizar dos tinciones citoquímicas: la peroxidasa y el azul de Prusia (25)

CONCENTRADO LEUCOCITARIO

Cuando se realiza un hematocrito en tubo de Wintrobe se puede apreciar claramente que por encima de la capa roja de hematies sedimentados se encuentra una capa gris-rojiza que está formada de plaquetas y leucocitos, a esta capa se le conoce como concentrado leucocitario (buffy-coat). El espesor de esta capa depende del número y clase de leucocitos así como de la cantidad de plaquetas.

Por consiguiente, en el caso de leucopenia y particularmente cuando está acompañada de trombocitopenia, la capa es apenas perceptible. También se conoce que cuando existe linfocitosis relativa, la capa es más estrecha que cuando predominan los leucocitos mieloides, considerando el mismo número de leucocitos en ambos casos.

En la sangre normal el concentrado leucocitario mide de 0.5 a 1 mm-

de espesor, y cada 0.1 mm corresponde aproximadamente a 1000 leucocitos/mm³. Esto puede servir, a groso modo, para evaluar algún padecimiento, midiendo la disminución o el aumento del concentrado leucocitario (41).

El uso de este concentrado ha sido principalmente el de investigar en ciertas enfermedades la morfología de las células de la sangre periférica (10), recientemente se ha empleado también como método de apoyo en el seguimiento de pacientes con leucemia aguda durante su remisión (42). Hasta ahora no se ha empleado como método de diagnóstico de alguna enfermedad.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

Se estudiaron 36 pacientes, 16 mujeres y 20 hombres, de 17 a 77 años de edad que acudieron al Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional del Instituto Mexicano del Seguro Social, de Enero de 1986 a Enero de 1987, en el servicio de Hematología se les estableció el diagnóstico definitivo de Anemia Aplástica en base a los criterios: Anemia normocítica-normocrómica con ligera macrocitosis y anisocitosis acompañada de pancitopenia en sangre periférica y con médula ósea hipocelular o celular. Los pacientes no tenían antecedentes de trastorno hematológico alguno ni habían recibido tratamiento previo contra la anemia aplástica.

Una vez que en el laboratorio del hospital se realizaron la biometría hemática (Tabla I) y otros estudios de rutina (grupo sanguíneo, factor Rh, etc.) en la sangre de los pacientes, se procedió a obtener el concentrado leucocitario y posteriormente a realizar, en los frotis provenientes de dicho concentrado, la tinción de Wright así como las dos tinciones citoquímicas: La peroxidasa y el azul de Prusia. Finalmente, se efectuó un análisis de correlación entre el % de Neutrófilos contados en el frotis teñido con Wright, y el % de células que dieron positiva la tinción para la Peroxidasa, contadas en el frotis destinado a dicha tinción. Esto fué con el objeto de interrelacionar el estudio del concentrado leucocitario con el estudio citoquímico y de esta manera, apoyar el empleo de ambos métodos para establecer el diagnóstico diferencial entre la anemia aplástica y los síndromes mielodisplásicos.

CONCENTRADO LEUCOCITARIO (43).

MATERIAL Y APARATOS:

- Tubos de Wintrobe
- Pipetas Pasteur
- Bulbo succionador
- Tubos de ensayo de 12 X 75 mm
- Portaobjetos
- Centrifuga de 5000 rpm (SOL-BAT)

PROCEDIMIENTO:

La muestra de sangre con anticoagulante (EDTA al 10%) se homogeneizó perfectamente, se depositó con la pipeta Pasteur en el tubo de Wintrobe, se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos. Posteriormente el plasma sobrenadante se retiró con sumo cuidado utilizando otra pipeta Pasteur, misma con la que se tomó el concentrado leucocitario y se depositó en un tubo de ensayo, en donde se suspendió con una gota de plasma. Apartir de esta suspensión se realizaron tres frotis (uno para cada tinción).

TINCION DE WRIGHT (18,44).

INTRODUCCION:

Los colorantes de Romanowsky: eosina (ácido) y azul de metileno (básico), tienen la propiedad de lograr sutiles diferencias de tonos en las estructuras celulares, gracias a las características ácido-base de ambos.

FUNDAMENTO:

Los grupos ácidos de las estructuras celulares son afines al azul -

de metileno mientras que los básicos a la eosina. Por consiguiente las diferencias de tinción observadas son producto del grado de acidez o basicidad de dichas estructuras a pH fisiológico, así como del tiempo de tinción.

REACTIVOS:

- Eosina-azul de metileno, según Wright (TECNICA QUIMICA)
- Glicerina (MERCK)
- Metanol R.A. (MERCK)
- Fosfato dibásico de sodio (J.T. BAKER)
- Fosfato monobásico de potasio (J.T. BAKER)
- Agua destilada (IMSS)
- Amortiguador de referencia pH = 7 (MERCK)

PREPARACION DE REACTIVOS:

Colorante de Wright.-

Eosina-azul de metileno,

según Wright 0.24 g

Glicerina 3.00 ml

Metanol R.A. 97.00 ml

Se disuelve el colorante con un poco de metanol, se agrega la glicerina y una vez disuelto se adiciona el metanol restante. Se agita durante una hora, se filtra y se guarda en frasco ambar.

Amortiguador de fosfatos pH = 7.2 .-

Fosfato dibásico de sodio 1.14 g

Fosfato monobásico de potasio 0.49 g

Agua destilada 900.00 ml

Ajustar el pH a 7.2

Agua destilada c.b.p. 1000.00 ml

Una vez preparado se guarda en frasco ambar, en refrigeración.

MATERIAL Y APARATOS:

- Material de vidrio de uso común en el laboratorio
- Potenciómetro
- Electrodo combinado
- Reloj de intervalos

PROCEDIMIENTO:

La extensión se cubrió con la solución de Wright, se dejó actuar 5 minutos. Pasado este tiempo se adicionó el amortiguador de fosfatos - pH = 7.2 y después de 7 minutos se lavó con agua y se dejó secar al - aire.

INTERPRETACION:

- Núcleos de leucocitos: violeta rojizo.
- Núcleos de eritroblastos: violeta rojizo.
- Gránulos neutrófilos: violeta claro.
- Gránulos eosinófilos: rojo brillante a rojo pardusco.
- Gránulos basófilos: violeta obscuro.
- Citoplasma de los linfocitos: azul.
- Citoplasma de los monocitos: azul grisáceo.
- Eritrocitos: rojo pálido.

TINCION DE LA PEROXIDASA (45-48).

INTRODUCCION:

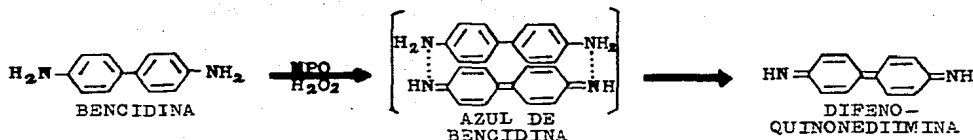
La peroxidasa ó mieloperoxidasa (MPO) es una enzima a base de porfi rina de hierro, que se localiza en los gránulos primarios (azurofilos) de las células mieloides y de los monocitos, formando parte del siste ma oxígeno-dependiente antimicrobial. De ésto se deduce: 1) la concen tración de mieloperoxidasa es proporcional a la cantidad de gránulos -

primarios que posee la célula y 2) Al ser oxígeno dependiente implica que participa en reacciones de oxidación-reducción, en donde el agua oxigenada es su sustrato. Si se toma en cuenta lo anterior, al colocar reactivos indicadores como la Bencidina capaces de teñir los gránulos primarios únicamente, se podrá poner de manifiesto la enzima mediante una tinción citoquímica.

FUNDAMENTO:

La peroxidasa reduce al agua oxigenada con la subsecuente oxidación de la Bencidina, dando lugar a un complejo colorido, de azul hasta café, en el sitio de reacción (gránulos primarios).

REACCION:



REACTIVOS:

- Formaldehido al 3% (IMSS)
- Etanol absoluto (IMSS)
- Agua oxigenada al 3% (MERCK)
- Agua destilada (IMSS)
- Sulfato de cinc hepta hidratado (J.T. BAKER)
- Diclorohidrato de Bencidina (MERCK)
- Acetato de sodio (SIGMA)
- Hidroxido de sodio (SIGMA)

- Safranina O (TECNICA QUIMICA)

PREPARACION DE REACTIVOS:

Solución fijadora.-

Formaldehido al 37% 10.0 ml

Etanol absoluto 90.0 ml

Solución de sulfato de cinc 0.132 M.-

Sulfato de cinc hepta hidratado 3.8 g

Agua destilada c.b.p. 100.0 ml

Solución de hidroxido de sodio 1 N.-

Hidroxido de sodio 4.0 g

Agua destilada c.b.p. 100.0 ml

Mezcla de incubación.-

Etanol absoluto 100.0 ml

Diclorohidrato de Bencidina 0.3 g

Solución de sulfato de cinc 0.132 M 1.0 ml

Acetato de sodio 1.0 g

Agua oxigenada al 3% 0.7 ml

Solución de hidroxido de sodio 1 N 1.5 ml

Safranina O 0.2 g

Los reactivos deben adicionarse en el orden listado, mezclando después de cada adición. Una vez preparada, se guarda en frasco ambar - siendo estable por 6 meses.

MATERIAL Y APARATOS:

- Material de vidrio de uso común en el laboratorio
- Reloj de intervalos
- Agitador magnético

PROCEDIMIENTO:

La extensión se cubrió con la solución fijadora durante 60 segundos se lavó con agua corriente 30 segundos y se dejó secar, una vez seco - el frotis, se le adicionó la mezcla de incubación y al final de 30 segundos se lavó con agua corriente 10 segundos y se dejó secar al aire.

Cada cuatro meses, durante el tiempo que duró el estudio; se prepararon de nuevo los reactivos, con el objeto de asegurar resultados óptimos en la tinción. Así mismo, las tres veces que se prepararon los reactivos se tiñó un frotis control peroxidasa positivo, para asegurar que éstos estaban bien preparados.

INTERPRETACION:

La presencia de actividad de peroxidasa en las células se representa como: (+) y la carencia como: (-).

- Gránulos de los neutrófilos (en cualquier estadio de desarrollo): azul intenso (+).
- Gránulos de los eosinófilos: café ó verde a negro (+).
- Gránulos de los basófilos: azul intenso a negro (+).
- Gránulos de los monocitos: azul pálido (+).
- Citoplasmas y núcleos de los granulocitos y monocitos: rojo pálido.
- Linfocitos, eritrocitos, plaquetas y blastos: rojo pálido (-).

TINCION DEL AZUL DE PRUSIA (41,43,49,50).

INTRODUCCION:

Los gránulos sideróticos son gránulos de hierro que pueden ser de ferritina y/ó hemosiderina, dependiendo de las condiciones en que se encuentre la célula. En condiciones normales, se localizan depositados en el citoplasma de aquellos eritrocitos y eritroblastos de médula

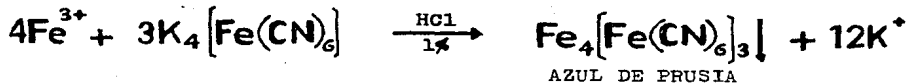
Ósea cuya síntesis de hemoglobina se está llevando a cabo, por lo que estas células reciben el nombre de siderocitos y sideroblastos respectivamente; en sangre periférica no se observan siderocitos, si acaso uno.

El número normal de gránulos en los siderocitos y sideroblastos es de 1 a 2 por célula, sin embargo, existen enfermedades en las que hay una síntesis alterada de la hemoglobina (como en los síndromes mielodisplásicos), por lo que los gránulos son más numerosos en los sideroblastos y, por lo general, de mayor tamaño que los normales. Por lo que es conveniente ponerlos de manifiesto mediante una tinción citológica diferencial, que permita evaluar tanto sus características morfológicas como la proporción en que se encuentran en la sangre periférica. Para lo cual se aprovecha la capacidad que tiene el hierro de formar complejos coloridos, en especial el azul de Prusia.

FUNDAMENTO:

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

REACCION:



REACTIVOS:

- Metanol absoluto R.A. (MERCK)

- Acido clorhídrico R.A. (TECNICA QUIMICA)
- Agua desionizada (IMSS)
- Ferrocianuro de potasio R.A. (MERCK)
- Safranina O (TECNICA QUIMICA)

PREPARACION DE REACTIVOS:

Solución de ácido clorhídrico al 1%.-

Acido clorhídrico 1.0 ml

Agua desionizada c.b.p. 100.0 ml

Solución de ferrocianuro de potasio al 2%.-

Ferrocianuro de potasio 2.0 g

Agua desionizada c.b.p. 100.0 ml

Solución de safranina O al 0.5%.-

Safranina O 0.5 g

Agua desionizada c.b.p. 100.0 ml

Mezcla de incubación.-

Acido clorhídrico al 1% 3 volúmenes

Ferrocianuro de potasio al 2% 1 volumen

Se prepara al momento de usarse.

MATERIAL Y APARATOS:

- Material de vidrio de uso común en el laboratorio
- Reloj de intervalos

PROCEDIMIENTO:

Se fijó el frotis con metanol 10 minutos, se lavó con agua desionizada y se dejó secar al aire, posteriormente se le adicionó la mezcla de incubación dejandola actuar 30 minutos, luego se lavó durante 4 minutos con agua corriente y finalmente se contrastó con safranina O al

0.5% durante 1 minuto, se lavó con agua corriente y se dejó secar al aire.

La correcta preparación de los reactivos se aseguró tificando dos frotis control, uno positivo y el otro negativo para el azul de Prusia, - simultaneamente a la tinción del frotis problema.

INTERPRETACION:

- Gránulos sideróticos debidos a ferritina: azul claro a verde claro.
- Gránulos sideróticos debidos a hemosiderina: azul intenso a negro.
- Todo lo que no sea gránulos sideróticos: rojo pálido.

ANALISIS DE CORRELACION (51).

Con frecuencia, el análisis estadístico debe aplicarse para determinar la fuerza de la relación entre las variables que se están estudiando. La medida de este grado de asociación entre Y y X (variables) que se emplea con mayor frecuencia está dada por 'r', que es el coeficiente de correlación. La fórmula para r es:

$$r = \frac{\sum XY}{\sqrt{\sum X^2 \sum Y^2}}$$

En donde:

$$\sum X^2 = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}$$

$$\sum Y^2 = \sum Y^2 - \frac{(\sum Y)^2}{n}$$

$$\sum xy = \sum XY - \frac{(\sum X)(\sum Y)}{n}$$

$$\bar{X} = \frac{N_A}{N} + \frac{N_B}{N}$$

$$\bar{N}_s = \frac{N_{sA} + N_{sB}}{2}$$

$$\bar{N}_B = \frac{N_{bA} + N_{bB}}{2}$$

Ns = Neutrófilos segmentados Nb = Neutrófilos en banda

$Y = \overline{MPO}$

$$\overline{MPO} = \frac{MPO A + MPO B}{2}$$

MPO = Mieloperoxidasa

Un valor de $r = 1$ ó muy cercano, indicará que existe una fuerte relación entre X y Y.

TABLA I

BIOMETRIA HEMATICA DE LOS 36 PACIENTES ESTUDIADOS

Caso	Sexo	Edad (años)	Glóbulos blancos X 10 ³	Glóbulos rojos X 10 ⁶	Hb (g/dl)	Ht (%)	VGM (μ)	HCM (μ g)	CMHG (%)	Elaquetas
1. AEBL	F	37	2.9	3.45	11.6	38	110	33.6	31	↓↓↓↓
2. RML	F	68	3.0	2.67	8.9	28	105	33.3	32	↓↓↓
3. JTT	F	42	3.8	3.14	10.8	35	111	34.4	31	↓↓↓
4. RRA	M	38	1.0	3.12	11.9	35	112	38	34	↓↓↓↓
5. GGG	M	29	3.4	3.12	11.5	35	112	36.8	33	↓↓↓
6. OLM	M	17	0.8	1.55	4.2	16	103	27.1	26.2	↓↓↓↓
7. OLM	M	17	1.4	2.00	4.3	14	70	21.5	30.7	↓↓↓↓
8. EAG	F	59	1.5	2.50	9.4	30	120	37.6	31	↓↓↓↓
9. MMT	F	61	3.8	3.21	10.5	33	103	32.7	32	↓↓↓↓
10. JSS	M	48	3.2	3.25	10.2	33	101	31.3	32.3	↓↓↓↓
11. OLM	M	17	1.5	2.00	5	16	80	25	32	↓↓↓↓
12. GSM	F	77	2.7	2.69	8.5	27	100	31.5	31.7	↓↓↓↓
13. RSC	F	60	4.3	3.88	14.3	43	111	36.8	33	↓↓↓↓
14. GSD	M	35	2.0	2.89	11.7	36	124	40.4	32.5	↓↓↓↓
15. CHO	M	29	2.7	3.30	11.3	36	110	34.2	31.3	↓↓↓
16. MSM	F	31	3.9	3.57	12.5	39	109	35	32	↓
17. ALC	F	70	3.9	4.21	15.5	46	109	36.2	33.7	N
18. MVH	F	40	4.1	3.87	15.6	49	127	40	31.8	↓↓↓

† Los datos de la cuenta diferencial se localizan en la Tabla II (Pag. 35.).

TABLA I (CONTINUACION)

Caso	Sexo	Edad años	Globulos blancos X 10 ⁶	Globulos rojos X 10 ⁶	Hb (g/dl)	Ht (%)	VGM (μ ³)	HCM (%)	CMHG (%)	Plaquetas
19. PML	M	36	6.0	2.59	8.3	24	93	32	34.5	llll
20. BGC	M	32	2.8	2.46	8.3	26	105	34	32	llll
21. MML	M	24	4.7	4.36	15.5	46	105	35	33.6	8
22. JCV	M	53	4.3	1.77	5.4	17	96	30	31.7	lll
23. FRG	M	63	3.0	2.52	9.9	31	123	39	32	lllll
24. RPA	F	68	2.8	2.51	9.5	30	119	37.8	31.6	lllll
25. JVS	M	42	3.5	3.50	13.6	42	120	38.8	32.3	lll
26. GSM	F	38	3.8	3.19	10.6	32	100	33.2	33	lllll
27. JGL	M	59	4.0	2.94	11	34	116	37.4	32.3	lllll
28. ARD	M	70	3.1	2.71	8.3	24	88	30.6	34.5	lllll
29. AMT	F	50	2.0	2.35	10.4	33	140	44	31.5	ll
30. LSR	F	36	2.0	3.25	11.6	39	120	35.6	29.7	l
31. RJC	M	46	0.95	2.50	8.4	26	104	33.6	32.3	lll
32. MLJ	M	28	3.6	2.51	7.8	23	91.6	31	34	lll
33. LHP	F	37	3.2	2.55	8.2	26	102	32	31.5	ll
34. ROA	F	55	4.8	2.68	8.1	23	85.8	30	35.2	lllll
35. LTH	M	24	1.9	2.36	8.7	25	106	36.8	34.8	lll
36. RA	M	39	3.8	2.19	6	19.8	90	27.3	30.3	lll

R E S U L T A D O S

En la Tabla II se muestran los resultados obtenidos en la tinción de Wright y en la de la Peroxidasa. No se incluyen los resultados de la tinción del azul de Prusia debido a que fueron negativos en todos los casos.

Los hallazgos en todo el frotis (observaciones en el concentrado leucocitario), se observaron inicialmente con la tinción de Wright con firmandose después con la de la peroxidasa, obviamente, exceptuando aquellos que involucran diferencias tintoreales (basofilia difusa y el punteado basófilo).

Los hallazgos de los casos más representativos se ilustran en las Fig. 1-7.

De los 36 casos estudiados, se observaron:

- 8 con pseudo Pelger-Huët
- 3 con alteraciones en serie granulocítica diferentes a pseudo Pelger Huët
- 4 con alteraciones en serie roja
- 3 con células monocitoides

Si ésto lo expresamos en porcentaje tenemos:

- 30.6% con disgranulopoyesis
- 11.1% con diseritropoyesis
- 8.3% con promonocitos

Se puede ver entonces, que el 50% de los casos estudiados mostraron características de síndromes mielodisplásticos.

El coeficiente de correlación (r) entre el % de Neutrófilos y el % de células Peroxidasa + fué: 0.92 (Tabla III y Fig. 8).

TABLA II
ESTUDIO CITOQUIMICO DEL CONCENTRADO LEUCOCITARIO

C a s o	Cuenta								Diferencial				Perocidosis		Observacio- nes en el Concentrado Leucocitario
		L	M	E	B	Ns	Nb	Nb'	As	C.l. (%)		A	B		
										A	B				
1	S.p.	16	2	-	-	82	-	-	-	75	76	Pseudo Pelger Huët ++++			
	C. A	24	2	1	-	68	5	-	-						
	L. B	24	2	1	-	68	5	-	-						
2	S.p.	38	3	3	-	53	3	-	-	52	50				
	C. A	46	3	-	-	51	-	-	-						
	L. B	46	3	4	-	45	2	-	-						
3	S.p.	57	5	-	-	36	2	-	-	55	54				
	C. A	50	3	1	1	45	-	-	-						
	L. B	50	3	1	1	43	2	-	-						
4	S.p.	44	4	-	-	44	8	-	-	58	56	Pseudo Pelger Huët ++			
	C. A	44	3	-	-	53	-	4	-						
	L. B	46	3	-	-	46	5	4	-						
5	S.p.	22	3	-	-	66	9	-	-	75	76	Pseudo Pelger Huët ++++			
	C. A	22	6	-	-	64	8	-	-						
	L. B	22	6	-	-	56	15	-	-						
6	S.p.	94	-	-	-	6	-	-	-	15	15				
	C. A	90	-	-	-	10	-	-	-						
	L. B	92	-	-	-	8	-	-	-						
7	S.p.	90	-	-	-	10	-	-	-	14	13	Células plas- máticas ++ Linfocitos en transformación +++			
	C. A	89	-	-	-	10	1	2	+						
	L. B	85	-	-	-	15	-	2	+						
8	S.p.	95	2	-	-	3	-	-	-	1	1				
	C. A	97	-	-	-	3	-	-	-						
	L. B	93	4	-	-	3	-	-	-						
9	S.p.	45	1	-	-	51	3	-	-	56	56	Pseudo Pelger Huët ++++			
	C. A	47	1	-	-	50	2	-	-						
	L. B	45	1	-	-	54	-	-	-						

L= linfocitos, M= monocitos, E= eosinófilos, B= basófilos,
Ns= neutrófilos segmentados, Nb= neutrófilos en banda,
Nb'= normoblastos, As= anisocitosis.
S.p.= sangre periférica. (Datos obtenidos por el Hospital)
C.l.= concentrado leucocitario.

TABLA II (CONTINUACION)

C A S O	Cuenta Diferencial								Procidasa		Observaciones en el Concen- trado leucoci- tario	
		L	M	E	B	Nb	Nb'	As	C.l.(%)			
									A	B		
10	S.p.	54	8	1	-	37	-	-	-	27	30	Alteraciones en serie gra- nulocítica: Basofilia ++
	C. A	66	7	1	-	26	-	7	-			
	L. B	62	5	1	-	32	-	8	-			
11	S.p.	80	8	-	-	12	-	-	-	10	10	
	C. A	81	11	-	-	8	-	2	-			
	L. B	85	5	-	-	10	-	2	-			
12	S.p.	56	2	-	-	42	-	-	+	20	20	
	C. A	60	1	-	-	38	1	1	+			
	L. B	60	2	-	-	36	2	1	+			
13	S.p.	48	2	-	1	49	-	-	+	52	50	Pseudo Pelger Hušt ++
	C. A	50	2	-	1	40	7	-	+			
	L. B	54	4	-	1	36	4	-	+			
14	S.p.	66	14	2	-	18	-	-	+	10	10	Macrocitosis ++ Pseudo Pelger Hušt ++
	C. A	65	10	2	-	15	8	3	++			
	L. B	65	11	2	-	14	8	3	++			
15	S.p.	22	10	2	-	62	4	-	+	22	20	Células inma- duras con ca- racterísticas de serie gra- nulocítica ++
	C. A	43	5	3	-	45	4	4	-			
	L. B	44	7	3	-	42	4	4	-			
16	S.p.	33	10	-	-	57	-	-	+	12	12	Basofilia Di- fusa ++ Plaquetas Gi- gantes ++
	C. A	76	1	2	-	21	-	-	-			
	L. B	78	1	1	-	20	-	-	-			
17	S.p.	55	2	1	-	41	1	-	+	20	23	
	C. A	82	1	1	-	16	-	-	-			
	L. B	82	1	1	-	15	1	-	-			
18	S.p.	72	1	-	-	27	-	-	+	30	32	Células Mono- citoides ++ Megaloblastos de serie roja ++
	C. A	70	-	2	1	27	-	5	++			
	L. B	72	2	1	1	24	-	5	++			

- = Negativo

+ = Positivo

+ = Escasas (menos de 10)

++ = Abundantes (de 10 a 20)

+++ = Muy abundantes (más de 20)

TABLA II (CONTINUACION)

C a s o	Cuenta Diferencial								Peroxidasas G.L. (%+)		Observaciones en el Concen- trado Leucoci- tario	
		L	M	E	B	Ns	Nb	Nb'	As	A		B
	19	S.p.	82	4	-	-	14	-	-	+		10
	C. A	82	4	-	1	11	2	2	+			
	L. B	86	4	1	1	8	-	2	+			
20	S.p.	48	10	8	-	34	-	-	-	10	8	Alteraciones Megaloblasti- cas en serie- roja +++
	C. A	85	2	6	2	5	-	4	-			
	L. B	81	1	8	1	9	-	4	-			
21	S.p.	80	7	3	-	10	-	-	-	12	10	
	C. A	73	4	4	1	15	3	-	-			
	L. B	73	4	2	1	15	5	-	-			
22	S.p.	47	5	-	-	48	-	-	-	48	50	Células mono- citoides +++
	C. A	48	4	-	-	48	-	-	-			
	L. B	46	6	-	-	48	-	-	-			
23	S.p.	44	7	2	-	47	-	-	+	10	10	Células Mono- citoides ++++
	C. A	83	5	-	1	11	-	-	+			
	L. B	83	5	1	1	10	-	-	+			
24	S.p.	59	4	-	-	37	-	-	-	16	18	
	C. A	85	4	1	-	10	-	3	-			
	L. B	85	4	1	-	8	1	2	-			
25	S.p.	61	6	2	-	31	-	-	-	12	13	Linfocitos - en transfor- mación ++
	C. A	89	4	3	-	4	-	3	-			
	L. B	93	3	1	-	3	-	5	-			
26	S.p.	40	8	-	-	41	11	-	-	50	46	Punteado Ba- sófilo ++ Cuerpos de - Howell-Jolly ++
	C. A	44	6	-	-	45	5	12	-			
	L. B	58	8	-	-	30	4	12	-			
27	S.p.	51	11	-	-	38	-	-	-	25	29	Linfocitos - con caracte- rísticas blas- toides ++
	C. A	60	10	-	-	30	-	4	-			
	L. B	66	4	-	-	30	-	4	-			

TABLA II (CONTINUACION)

C a s o	Cuenta Diferencial									Peroxidasa		Observaciones en el Concen- trado Leuco- citario
		L	M	E	B	Wb	Nb	Nb'	As	G.L. (%+)		
										A	B	
28	S.p.	28	20	-	-	52	-	-	+	12	12	
	C.A	60	10	-	-	30	-	-	+			
	L.B	62	13	-	-	25	-	-	+			
29	S.p.	84	1	-	1	14	-	-	-	3	4	
	C.A	90	1	-	-	9	-	-	-			
	L.B	90	1	-	-	9	-	-	-			
30	S.p.	62	-	-	-	32	-	-	-	13	14	Células plasmocitoides ++ Linfocitos en transformación +++
	C.A	73	6	5	5	11	-	9	-			
	L.B	73	6	3	5	13	-	9	-			
31	S.p.	100	-	-	-	-	-	-	-	0	0	
	C.A	100	-	-	-	-	-	-	-			
	L.B	100	-	-	-	-	-	-	-			
32	S.p.	68	2	-	-	30	-	-	-	30	30	
	C.A	67	2	-	-	31	-	-	-			
	L.B	69	-	-	-	31	-	-	-			
33	S.p.	21	13	-	-	64	2	-	+	5	5	Pseudo Pelger Huët ++
	C.A	88	-	-	-	12	-	3	+			
	L.B	90	-	-	-	10	-	4	+			
34	S.p.	66	8	-	-	26	-	-	-	8	6	C.de Howell-Jolly ++ Cél. de Ryeder ++ Linfocitos plasmocitoides ++
	C.A	78	2	-	-	20	-	8	-			
	L.B	82	-	2	-	16	-	9	-			
35	S.p.	73	4	2	-	21	-	-	-	10	8	
	C.A	95	2	-	-	3	-	-	-			
	L.B	97	1	-	-	2	-	-	-			
36	S.p.	69	2	1	2	20	6	-	-	30	29	Elastos de es- tirpe mieloi- de 3% Pseudo Pelger Huët ++
	C.A	70	1	2	2	20	5	2	-			
	L.B	71	1	-	3	19	6	2	-			

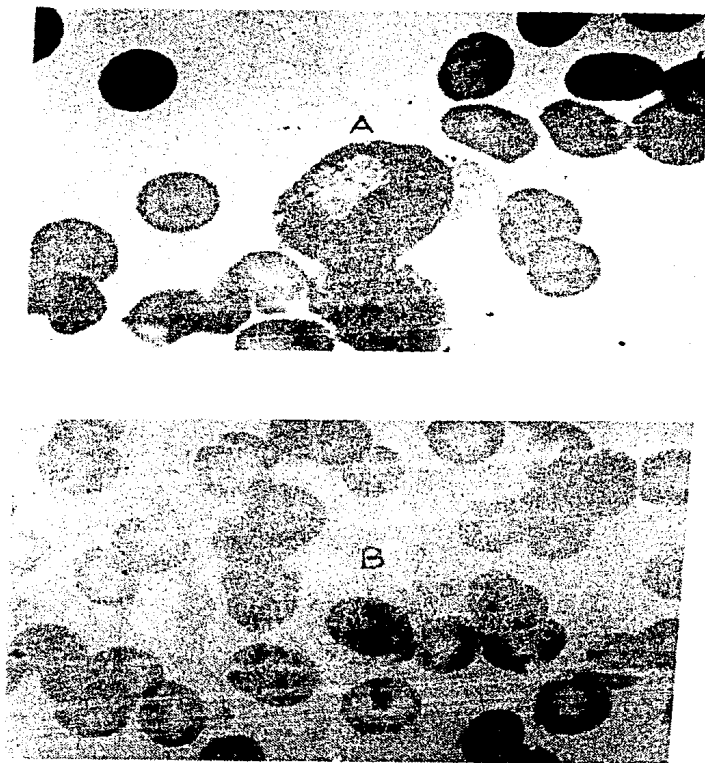


Fig. 1.- Caso 7. (A) Célula plasmática: Se caracteriza por su núcleo excéntrico con cromatina densa y aglutinada, su contorno ovalado, su citoplasma basófilo (oscuro) y las vacuolas citoplasmáticas. (B) Linfocito transformado o plasmocitoide: Se distingue de la célula plasmática principalmente por su citoplasma menos basófilo (claro) y la presencia de nucleolos.

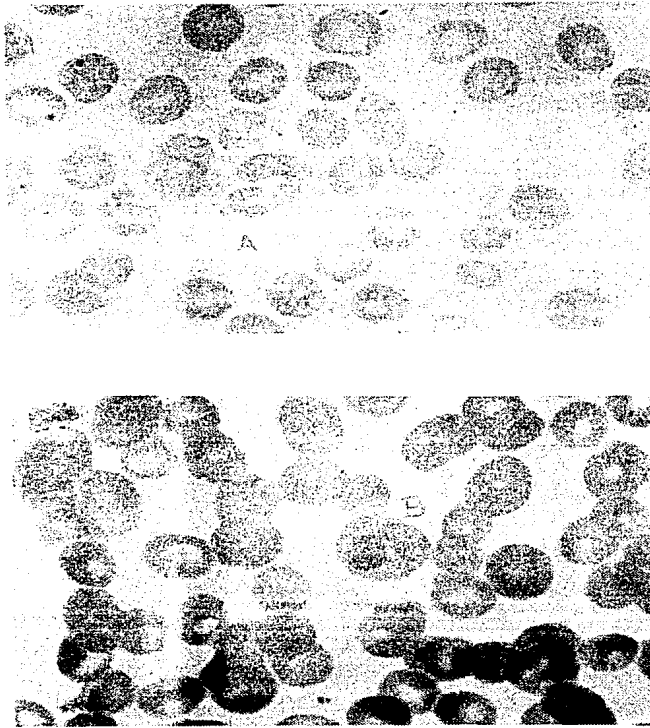


Fig. 2.- (A) Caso 13. Célula Pseudo Pelger-Huët hipogranular: Neutrófilo con incapacidad de segmentarse dando lugar a dos lóbulos unidos por un delgado puente de cromatina, lo que le dá una apariencia de 'anteojos', en este caso la carencia de gránulos le dá al citoplasma un caracter basófilo tenue. (B) Caso 14. - Célula Pseudo Pelger-Huët granular y Macroцитos.

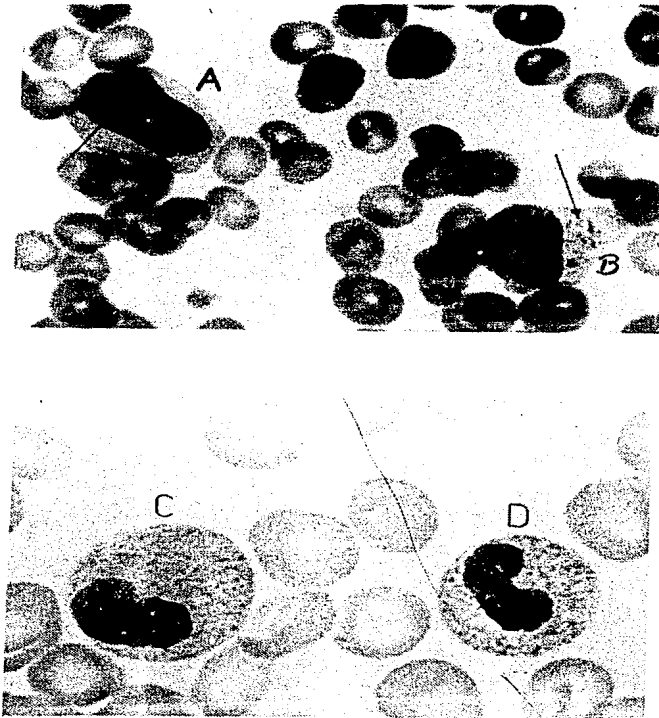


Fig. 3.- Caso 15. (A) Mieloblasto: Se caracteriza por su núcleo ovalado que ocupa la mayor parte de la célula, su cromatina fina y homogénea, la presencia de nucleolos (señalados) y su citoplasma agranular. (B) Promielocito: la presencia de gránulos citoplasmáticos (señalados) lo distingue del anterior. (C y D) Metamielocitos en diferentes estadios de desarrollo: Su núcleo dentado (arriñonado) es característico.

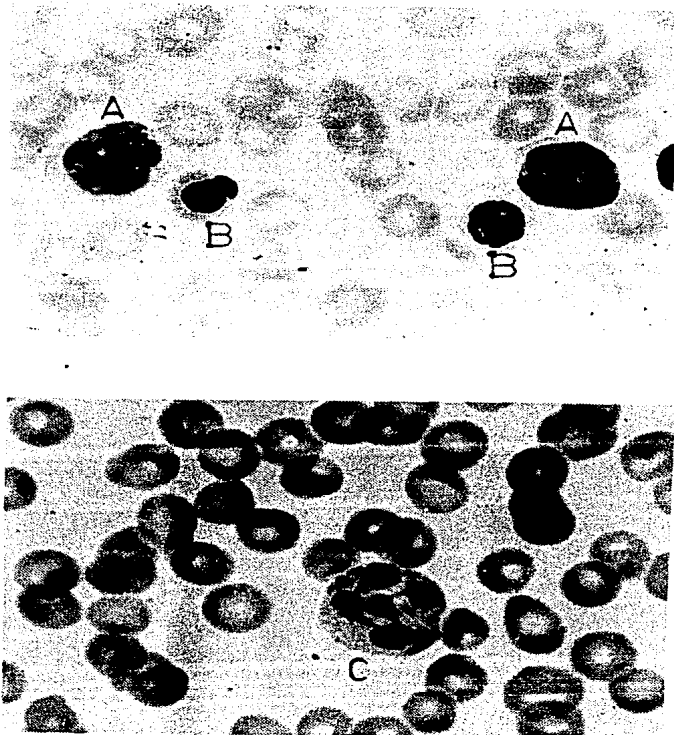


Fig. 4.- Caso 19. (A) Mieloblastos. (B) Eritroblastos bizarros: Se caracterizan por las lobulaciones de su núcleo. (C) Mielocitosis: Neutrófilos hipersegmentados que se caracterizan porque sus lóbulos están separados por filamentos muy delgados de cromatina. Se puede apreciar también, sobre todo en la fotografía superior, la esferocitosis y el punteado basófilo.

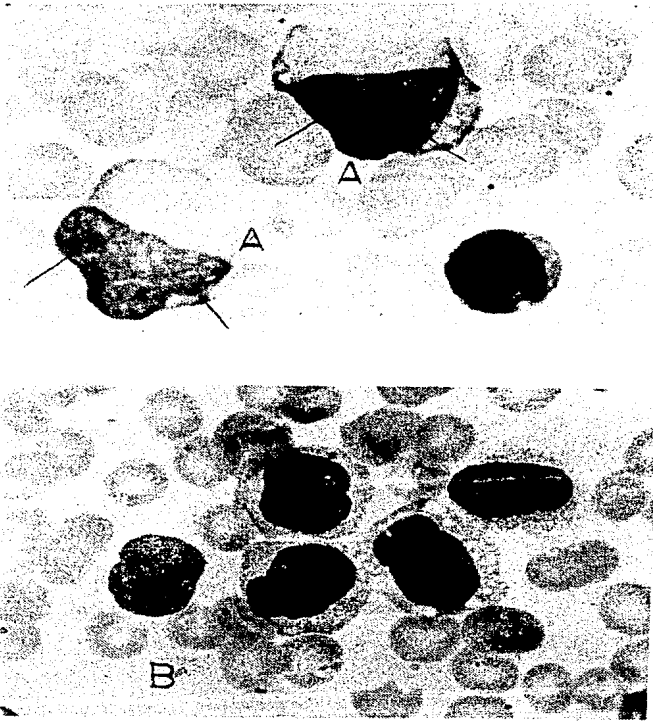


Fig. 5.- (A) Caso 22. Células monocitoides o promonocitos con desviación hacia monoblastos: Se caracterizan principalmente por la presencia de dos grandes nucleolos (señalados), que los distinguen de los monocitos, y la carencia de gránulos mayores en su citoplasma, que los diferencian de los monoblastos. (B) - Caso 23. Promonocitos de características intermedias entre monoblastos y monocitos.

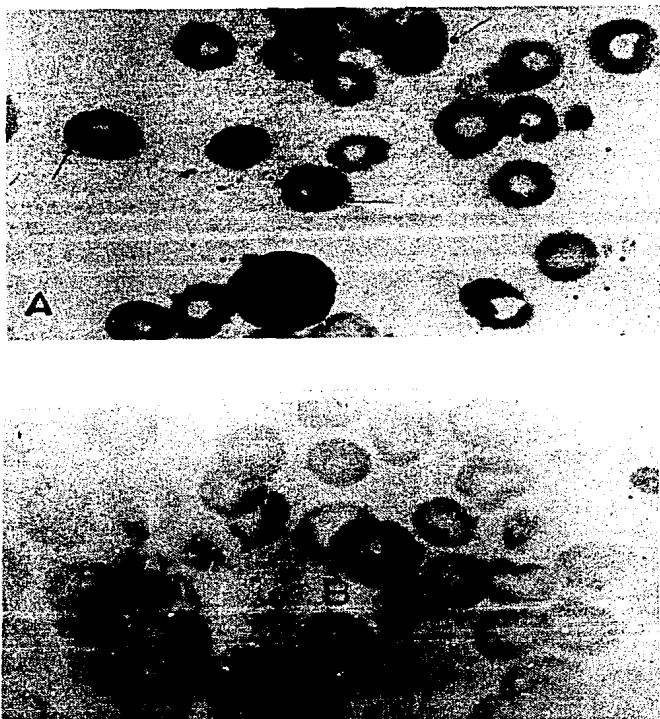


Fig. 6.- Caso 26. (A) Punteado basófilo: Gránulos basófilos irregulares dentro del eritrocito (señalados). (B) Cuerpo de Howell-Jolly: Se distingue del anterior, tanto por su mayor tamaño como por ser más denso (más obscuro).

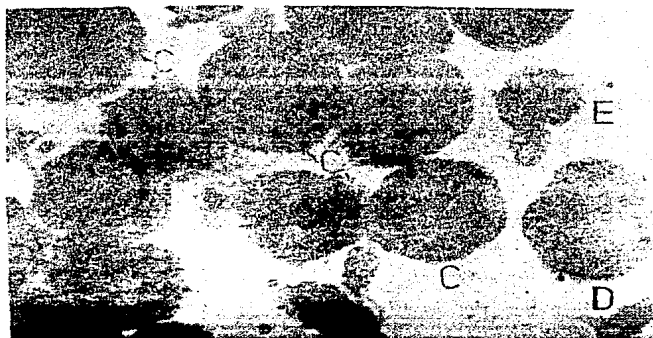


Fig. 7.- Caso 36. (A) Mieloblasto. (B) Célula Pseudo Pelger-Huët. (C) Promielocitos peroxidasa +: Se diferencian del resto de las células, tanto por su tamaño grande como por la presencia de algunos gránulos peroxidasa + (oscuros). (D) Mieloblasto peroxidasa - (E) Linfocito peroxidasa - .

TABLE III
ANALISIS DE CORRELACION

C a s o	X	Y	C a s o	X	Y	C a s o	X	Y	C a s o	X	Y	
1	73	75.5	10	29	28.5	19	10.5	10	28	27.5	12	$\Sigma X =$ 940
2	49	51	11	9	10	20	7	9	29	9	3.5	$\Sigma Y =$ 907
3	45	54.5	12	38.5	20	21	19	11	30	12	13.5	$\Sigma XY =$ 36918.25
4	52	57	13	43.5	51	22	48	49	31	0	0	$\Sigma X^2 =$ 37781
5	71.5	75.5	14	22.5	10	23	10.5	10	32	31	30	$\Sigma Y^2 =$ 38331.5
6	9	15	15	47.5	21	24	9.5	17	33	11	5	$\Sigma X^2 =$ 13236.56
7	13	13.5	16	20.5	12	25	7	12.5	34	18	7	$\Sigma Y^2 =$ 15480.14
8	3	1	17	16	21.5	26	42	48	35	2.5	9	$\Sigma xy =$ 13235.48
9	53	56	18	25.5	31	27	30	27	36	25	29.5	$r =$ 0.92

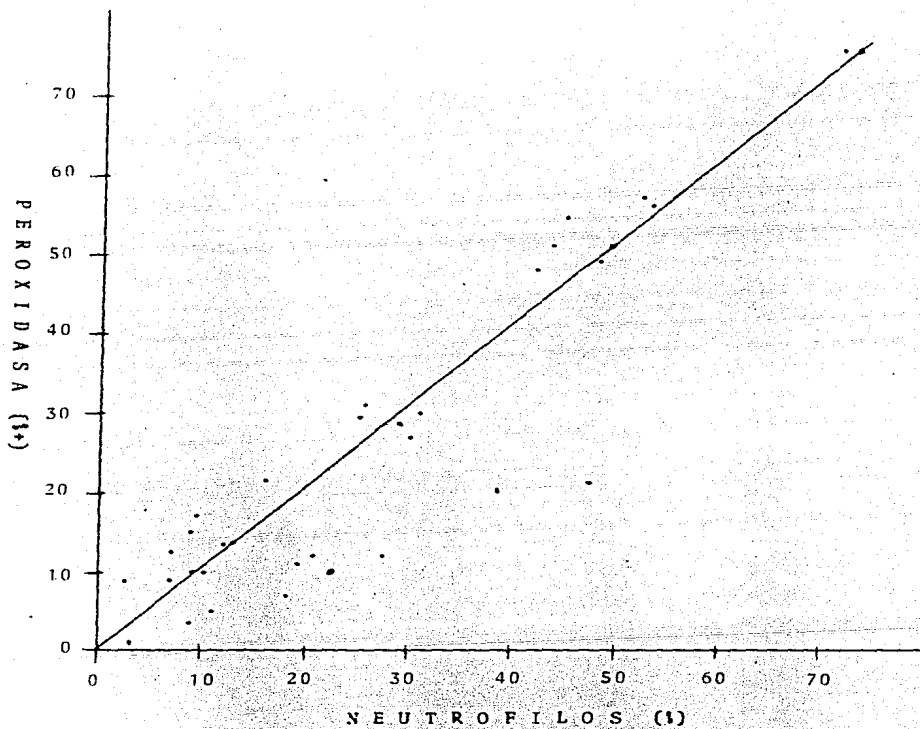


Fig. 8.- Diagrama de dispersión del % de Neutrófilos y del % de células Peroxidasa + .

D I S C U S I O N

La correlación encontrada entre el concentrado leucocitario y el estudio citoquímico, el hecho de que se confirmara el diagnóstico de anemia aplásica tan sólo en la mitad de los pacientes estudiados y que esto fuera posible gracias a las observaciones realizadas en el concentrado leucocitario, características de los síndromes mielodisplásticos, que no habían sido detectadas en un principio en la sangre periférica (Tablas II y III). Permiten demostrar que: Los actuales métodos clínicos y de laboratorio empleados en el diagnóstico de la anemia aplásica resultan, en varias ocasiones (50% de ellas), incapaces de diferenciar esta enfermedad de los síndromes mielodisplásticos; por lo que, es necesario el estudio citoquímico del concentrado leucocitario de la sangre periférica de los pacientes, para establecer el correcto diagnóstico diferencial y por ende definitivo entre estos padecimientos.

El diagnóstico definitivo del otro 50% de pacientes se puede afirmar que corresponde al de síndrome mielodisplástico, si se toma como base que: Kuriyama y col. (52) demostraron que el encontrar anomalías del tipo pseudo Pelger-Huët es de significado diagnóstico en los síndromes mielodisplásticos, además, Tinegate H.N. (53) concluyó que la presencia de basofilia en los granulocitos (neutrófilos hipogranulares) es característica de los síndromes mielodisplásticos. Y sobre todo, que J.M. Bennett y col. (28) propusieron que la disgranulopoyesis, la diseritropoyesis y la presencia de precursores monocíticos son características usadas para definir los síndromes mielodisplásticos.

Ahora bien, de acuerdo a la clasificación de los síndromes mielodisplásticos propuesta por J.M. Bennett y col. (28), los pacientes que presentaron diseritropoyesis y puesto que la tinción del azul de Prusia fué negativa en todos los casos, quedan comprendidos como anemia re -

fractaria; aquellos que presentaron disgranulopoyesis, se consideran - como anemia refractaria con exceso de blastos y a los que se les encontró precursores monocíticos se les clasifica como leucemia mielomonocí tica crónica.

Para entender el porque en ciertos pacientes no fué posible obser var algunos de los hallazgos morfológicos típicos del síndrome mielo displástico en el que fueron clasificados, es importante considerar el grado de avance de la enfermedad, esto es: Cuando el síndrome mielodis plástico se encuentra en su etapa inicial, la lesión medular es poco severa e inespecífica, por lo que el daño a las diferentes líneas celu lares no alcanza a manifestarse de manera clara y precisa en la sangre periférica; conforme avanza la enfermedad, la lesión de la médula ósea se va incrementando lo que ocasiona que se presenten en sangre perifé rica, con mayor frecuencia y de manera contundente, las consecuencias de este daño.

Con el razonamiento anterior, no sólo se apoya el planteamiento ini cial de que existe un período con características clínicas, cuantitati vas y morfológicas en los síndromes mielodisplásticos análogo a la ane mia aplástica, por lo que es necesario el estudio citoquímico del con centrado leucocitario para el diagnóstico diferencial entre ambos pad ecimientos; sino también, marca la pauta para utilizar el estudio cito químico del concentrado leucocitario como método de seguimiento y pro gnóstico de la anemia aplástica. Esto último, se puede comprobar en aquellos casos, que corresponden a pacientes con diagnóstico confirma do de anemia aplástica, en los que se observaron linfocitos en trans formación con ó sin células plasmáticas, ya que es indicativo de que la médula ósea está respondiendo, por lo tanto el pronóstico es bueno en estos pacientes.

Por otra parte, el empleo de frotis control además de asegurar re g

sultados óptimos en la preparación de los reactivos para las tinciones citoquímicas, permitió el control de calidad del presente estudio, puesto que estos frotis también se realizaron a partir del concentrado leucocitario, solo que de las muestras de sangre control. Ahora bien, si se toma en consideración que se confirmaron los hallazgos encontrados por Efrati y Rozensajn (10), en la sangre de sujetos normales a quienes se les practicó el concentrado leucocitario, así como, el hecho de que los resultados obtenidos en los frotis control fueron siempre los esperados (positivos ó negativos según el control) y además, el haber realizado por duplicado la observación de los frotis problema (A y B), obteniendo resultados muy semejantes entre ambas en la mayoría de los casos; se puede afirmar que el control de calidad del estudio realizado fué bastante satisfactorio.

Cabe señalar, que no por el hecho de haber demostrado que el estudio citoquímico del concentrado leucocitario es necesario para establecer el diagnóstico diferencial entre la anemia aplástica y los síndromes mielodisplásticos, se piense que se puede utilizar de manera exclusiva, ya que no se debe olvidar que un diagnóstico nunca se efectúa basándose en un solo método, puesto que ninguno es infalible. Con esto, no se busca desvirtuar ni el uso ni la importancia del estudio citoquímico del concentrado leucocitario; por el contrario, al comparar su accesibilidad, rapidez y sobre todo eficiencia con la de otros métodos se permitirá confirmar, cada vez más, la necesidad de su uso. Finalmente, lo que sí debe de pensarse, es el incluir el estudio citoquímico del concentrado leucocitario como método de rutina en el diagnóstico diferencial entre la anemia aplástica y los síndromes mielodisplásticos. Y muy probablemente, de otras enfermedades.

C O N C L U S I O N E S

- 1.- Se confirmó el diagnóstico de anemia aplástica en la mitad de los 36 pacientes estudiados.
- 2.- Se diagnosticó a la otra mitad de pacientes como síndromes mielodisplásicos, clasificándolos de la siguiente manera: 4 como anemia refractaria, 11 como anemia refractaria con exceso de blastos y 3 como leucemia mielomonocítica crónica.
- 3.- Se demostró que el estudio citoquímico del concentrado leucocitario es necesario para establecer el diagnóstico diferencial entre la anemia aplástica y los síndromes mielodisplásicos, por lo que se debe incluir como método de rutina.
- 4.- Se encontró una correlación importante ($r = 0.92$) entre el estudio citoquímico y el concentrado leucocitario, lo que apoya la conclusión anterior.
- 5.- Se propone que el estudio citoquímico del concentrado leucocitario puede servir también como método de seguimiento y pronóstico en la anemia aplástica.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Polmeister I, Fischer R, Mödder B, Rister M. Aplastic anaemia and the hypocellular myelodysplastic syndrome: histomorphological, -diagnostic, and prognostic features. J Clin Pathol 1985;38:1218 - 1224.
- 2.- Breatnach F, Chessells J M, Greaves M F. The aplastic presenta - tion of childhood leukaemia: a feature of common-ALL. Br J Haema - tol 1981;49:387-393.
- 3.- K David, Gross Samuel, J Newman A. Acute childhood leukemia pre - senting as aplastic anemia: The response to corticosteroids. J - Pediatrics 1970;77:647-652.
- 4.- Nakamori Y, Takahashi M, Moriyama C, Hittori A, Shibata A, Watana - be T, Oda Y. The aplastic presentation of adult acute lymphoblas - tic leukaemia. Br J Haematol 1986;62:782-783.
- 5.- Adams E B. Aplastic anaemia. Lancet 1951;1(657):657-660.
- 6.- Dorantes S, Vázquez J, Soto R, Toro H A, Arias J, Bello A, Arias - N, Alvarez C. El pronóstico de la anemia refractaria. Bol Med - Hosp Inf (Méx) 1965;22:491-498.
- 7.- Dorantes S, Alvarez C, Alferez G, Paredes R. Consideración de al - gunos problemas que plantea la anemia refractaria. Gac Méd Méx - 1970;100:1149-1159.
- 8.- Speck B, Gratwohl A. Refractory anaemia. Br Med J 1980;281:528.

- 9.- Reynoso R, Martínez R, Argáez M. Hipoplasia de la médula ósea. -
Revisión de 85 casos. Rev Med IMSS Méx 1968;7:190-204.
- 10.- Efrati P, Rozenszajn L. The morphology of buffy coat in normal -
human adults. Blood 1960;16:1012-1019.
- 11.- Bessis M. Cellules du Sang Normal et Pathologique. Masson et ci
Editeurs, 1972:126-130.
- 12.- Hurtado Monroy R, González Llaven J. Conceptos actuales sobre -
anemia aplástica. Rev Invest Clin (Méx) 1980;32:235-241.
- 13.- M Camitta B, Storb R, Donnall T. Aplastic anemia. N Engl J Med -
1982;306:645-652.
- 14.- N Mohler D, S Leavell B. Aplastic anemia: An analysis of 50 ca -
ses. Ann Int Med 1958;49:326-362.
- 15.- Bogs D R. The pathogenesis of aplastic anemia. Blood 1976;48 -
71-80.
- 16.- Krantz S B. Pure red cell aplasia. Br J Hematol 1973;25:1-10.
- 17.- S Leavell Byrd. Hematología Clínica. Interamericana: México, -
1978:151-174.
- 18.- M Wintrobe M, Richard L, R Boggs D, C Bithell, W Athens J, Ford.
Clinical Hematology. Lea & Febiger: Philadelphia, 1981:30-32, -
702-704.
- 19.- M Searinen Ulla, L Chorba T, Tattersall P, S Young, J Anderson, -
Palmer E. Human parvovirus B19 induced epidemic acute red cell -

aplasia in patients with hereditary hemolytic anemia. Blood 1986
67:1411-1417.

- 20.- Sánchez Medal L, Dorantes Meza S. Anemia aplástica. Hematología-
1974;1:474-478.
- 21.- William R. Atlas de Hematología. JIMS: Barcelona, 1972:133-136.
- 22.- Krantz S B. New therapies for aplastic anemia. Am J Med Sci 1986;
291:371-379.
- 23.- Sosa Sánchez R, Córdova C S, Labardini M J, Chavez Peon F. Trans-
plante de médula ósea en anemia aplástica: Reporte del primer -
transplante en México. Rev Invest Clin (Méx) 1980;32:49-55.
- 24.- Alejandro Bárcenas J, Dorantes Meza S, Alvarez Amaya C. Anemia -
aplastica y síndromes preleucémicos que evolucionaron a leucemia
Bol Méd Hosp Inf Méx 1983;40(Supl. 2):81-86.
- 25.- Dedman T, Weiselberg L, Schulman P, R Budman D. Dysmyelopoietic-
syndrome: Current concepts. Am J Med 1984;76:122-128.
- 26.- Yves S J, Imbert M, Crofts M, Jouault H, Vernant J, Sultan C. -
Myelodysplastic syndrome or acute myeloid leukemia?. A study of-
28 cases presenting with borderline features. Cancer 1985;55: -
2390-2394.
- 27.- Blank J, Lange B. Preleukemia in children. J Pediatrics 1981;98:
565-568.
- 28.- Bennett J M, Catovsky D, T Daniel, G Flandrin, Galton G, Sultan.
Proposals for the classification of the myelodysplastic syndro -

mes. Br J Hematol 1982;51:189-199.

- 29.- A Sanz, Garcia S, Amigo V, Lorenzo I. Prognostic factors in myelodysplastic syndromes. Lancet 1986;2(8514):1044.
- 30.- Bennett J M, Catvsky D, Therese D, G Flandrin, Galton G, H Gralnik, Sultan C. Proposals for the classification of the acute leukaemias. Br J Hematol 1976;33:451-458.
- 31.- Bennett J M, Catvsky D, Therese D, G Flandrin, Galton G, H Gralnik, Sultan C. The morphological classification of acute lymphoblastic leukaemia: Concordance among observers and clinical correlations. Br J Hematol 1981;47:553-561.
- 32.- Bennett J M, Catvsky D, Therese D, G Flandrin, Galton G, H Gralnik, Sultan C. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. Ann Int Med 1985;103:620-624.
- 33.- Hodgkin J D, Webster P D. Malignancies in blood forming organs following diagnostic and therapeutic procedures. South Med J 1976; 69:1363-1366.
- 34.- Foucor K, McKenna R W, Bloomfield C D, Bowers T K, Brunning R D. Therapy related leukemia, a panmyelosis. Cancer 1979;43:1285-1296.
- 35.- Weber R, Geraedts J P, Kerkhofs H, Leeksa C H, Rowald G. The preleukemic syndrome: Clinical and hematological findings. Acta Med Scand 1980;208:391-395.
- 36.- Geary C G, Koeffler R. Clinical annotation: The diagnosis of pre leukemia. Br J Hematol 1983;55:1-6.

- 37.- Juneja S K, Imbert M, Jovault H, Scoazec J Y, Siagux F, Sultan C. Haematological features of primary myelodysplastic syndromes at initial presentation: a study of 118 cases. *J Clin Pathol* 1983; 36:1129-1135.
- 38.- Buzaid C, S Garewal H, R Greenberg B. Management of myelodysplastic syndromes. *Am J Med* 1986;80:1149-1157.
- 39.- Yam L, Li C, Crosby W. Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. *Am J Clin Path* 1971;55:283-290.
- 40.- Glick A, Paniker K, Flexner J, Stanley B, Graber L, Collins D. - Acute leukemia of adults: Ultrastructural, cytochemical and histologic observations in 100 cases. *Am J Clin Path* 1980;73:459-470.
- 41.- Cartwright G E. El laboratorio en el diagnóstico hematológico. Editorial Científico Médica: Barcelona, 1973:111-112,178-182.
- 42.- Masaoka T, Takubo T, Kubota Y, Ogama S, Tanaka T, Ueda T, Nakamura H, Shibata H, Yoshiake J, Seda N. Differential count of 5,000 leukocytes for acute nonlymphocytic leukemia patients during remission. *Oncology* 1986;43:110-115.
- 43.- Dacie J V. Hematología práctica. Toray: Barcelona, 1973:81,93-96.
- 44.- Lynch J M. Métodos de Laboratorio. Interamericana: México, 1972: 721-722.
- 45.- Kaplow S L. Simplified myeloperoxidase stain using benzidine dihydrochloride. *Blood* 1965;26:215-219.
- 46.- Odajima T, Yamazaki I. Myeloperoxidase of the leukocyte of nor -

- mal blood. *Biochim Biophys Acta* 1972;284:360-367.
- 47.- Pryzwansky B K, Breton G J. Identification of subpopulation of - primary granules in human neutrophils based upon maturation and distribution. *Laboratory Investigation* 1985;53:664-671.
- 48.- Christensen D R, Rothstein G. Neutrophil myeloperoxidase concentration. *Pediatr Res* 1985;19:1278-1282.
- 49.- Sundberg D, Broman H. The application of the Prussian blue stain to previously stained films of blood and bone marrow. *Blood* 1955 10:160-166.
- 50.- Vogel I A. *Química analítica cualitativa*. Kapelusz: Argentina, - 1980:190.
- 51.- Duncan C R, Knapp G R, Clinton M M. *Bioestadística*. Interamericana: México, 1978:94-114.
- 52.- Kuriyama K, Tomonaga M, Matsuo T, Ginnai I. Diagnostic significance of detecting pseudo Pelger-Huët anomalies and micro-megakaryocytes in myelodysplastic syndrome. *Br J Hematol* 1986;63:665 - 669.
- 53.- Tinegate H N. Basophilia as a feature of the myelodysplastic syndrome. *Clin Lab Hematol* 1986;8:269-271.