



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

## CITOQUIMICA LEUCOCITARIA

TRABAJO ESCRITO  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :  
EVA ENRIQUEZ OLIVARES

MEXICO, D. F.

1989

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

Todo el material contenido en esta tesis 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.

# I N D I C E

Capítulo	Página
I.- INTRODUCCION . . . . .	1
OBJETIVOS . . . . .	2
II.- GENERALIDADES . . . . .	3
2.1 Aspectos históricos . . . . .	3
2.2 Principios generales . . . . .	7
2.3 Composición Bioquímica . . . . .	10
2.4 Citoquímica . . . . .	19
Carbohidratos . . . . .	20
Lípidos . . . . .	30
Fosfatasa . . . . .	41
Peroxidasa . . . . .	61
Esterasas . . . . .	62
III.- METODOS . . . . .	65
Tinción de PAS . . . . .	65
Tinción de Sudán Negro B . . . . .	67
Fosfatasa Alcalina Leucocitaria . . . . .	69
Fosfatasa Acida leucocitaria . . . . .	72
Peroxidasa leucocitaria . . . . .	74
Esterasas leucocitarias . . . . .	77
IV.- CONCLUSIONES . . . . .	82
V.- BIBLIOGRAFIA . . . . .	85.

CAPITULO I  
INTRODUCCION

La histoquímica es la aplicación de procesos químicos a preparaciones microscópicas para la demostración de componentes celulares; el hecho de que el depósito de colorantes específicos en determinadas regiones del tejido sea el resultado de propiedades químicas o físicas de este, constituye la base de la histoquímica. Esta es un campo de investigación que se ha extendido rápidamente, su objetivo es la localización de áreas específicas o componentes celulares cuyos componentes químicos ya conocidos se pongan de manifiesto por medio de análisis bioquímico.(9)

Por otra parte, cuando estas técnicas son aplicadas específicamente a muestras de sangre periférica o médula ósea la palabra correcta a utilizar es CITOQUIMICA, aunque en la práctica pueden ser empleadas ambas indistintamente.

La citoquímica de las células hematopoyéticas blásticas ha demostrado su uso indispensable en el diagnóstico y diferenciación de Leucemias agudas.(13)

## O B J E T I V O S

1.- El presente trabajo tiene como objeto, hacer una recopilación de los métodos citoquímicos más utilizados en la actualidad para poner de manifiesto de manera específica los diferentes componentes estructurales y enzimáticos que se encuentran presentes en los leucocitos .

2.- Evaluar las técnicas citoquímicas como auxiliares en el diagnóstico de los cambios citopatológicos y valorar su ayuda al tratar de clasificar ciertas células no diferenciadas morfológicamente y que están presentes principalmente en las leucemias agudas.

## C A P I T U L O   I I

### G E N E R A L I D A D E S

#### 2.1 Aspectos Históricos.

Por el año de 1825, se reconoce la histoquímica como ciencia, aunque las investigaciones se enfocan preferentemente a los tejidos vegetales.

En 1905, Opie observa por primera vez la presencia de una enzima proteolítica en los neutrófilos de un exudado.

Newkler en 1907, describe enzimas proteolíticas en los gránulos de los leucocitos.

En 1912, Grafe, Levene y Meyer, demuestran un incremento en el metabolismo celular en los leucocitos leucémicos.

En 1923, Fiessinger, publica sus investigaciones relacionadas con el metabolismo de los leucocitos, demostrando la presencia de enzimas tales como: lípasas, amilasas y proteasas.

En 1927, Sehrt, emplea por primera vez en frotis san

guíneos técnicas citoquímicas tales como: Sudán III y el Sulfato de azul de Nilo, para observar leucocitos.

En 1929, Duetsch y Kosler, identificaron una nucleotidasa leucocitaria en exudados purulentos. (14)

Algunos reportes tempranos de estudios citoquímicos - en la clasificación de tipos celulares en leucémias fueron - hechos mediante reacciones de oxidasa y peroxidasa en célu-- las granulocíticas.

Antes y durante los años 20's los detalles citomorfológicos eran puestos de manifiesto para su observación mi--- croscópica mediante la tinción de Romanowsky aplicadas a ex- tensiones de sangre periférica o de médula ósea; esto era -- considerado suficiente para el criterio diagnóstico. (15)

Soffer y Wintrobe en 1932, realizaron investigacio-- nes sobre el metabolismo de los leucocitos normales y leucé- micos mediante métodos citoquímicos, encontrando que la actidad metabólica de los granulocitos era similar a la de las células malignas.

En este mismo año Stern, detectó la existencia de --

una catalasa en los leucocitos polimorfonucleares de exudados de conejos.

En 1940 Bornes, demostró una gran variedad de enzimas en los leucocitos de conejo tales como: catepsina, nucleasas, amilasas, lipasas y adenosilasas.

Menken, en 1940, estudia la bioquímica de la migración de los leucocitos en procesos inflamatorios y demuestra que dicho proceso se relaciona con una sustancia llamada leucotaxina que se produce en los tejidos dañados.

En 1951, Storti y Perugini, usaron la tinción de Sudán Negro B en preparaciones de células blásticas de 16 casos de leucemia aguda, de los cuales 9 resultaron positivos.

En 1953 Storti y colaboradores, utilizaron la reacción del Acido Peryódico de Schiff (PAS) para demostrar tres diferentes tipos de positividad en las células leucémicas semejante a la que se observa en los mielocitos, monocitos y en los linfocitos normales.

Fue en 1964, cuando Hayhoe, Quaglino y Doll, publicaron una monografía en la cual ellos concluyen a partir de es



tudios realizados en 140 casos de leucémias agudas, que la combinación de estructuras citomorfológicas y reacciones tincionales usando la reacción de peroxidasa, Sudán Negro, PAS y Fosfatasa Alcalina Leucocitaria, producen un método adecuado para llegar al diagnóstico del tipo celular en la mayoría de los casos de leucémia aguda. De ahí en adelante muchas diferentes tinciones se han agregado a esta lista, por varios investigadores, algunas se han usado, otras, se han deshecho por carecer de valor diagnóstico. (1)

En 1979, Glick y colaboradores, publican un estudio comparativo entre los métodos citoquímicos, ultraestructural e histológicos para el diagnóstico verdadero en 100 casos de leucémias agudas, llegando a la conclusión de que el 90% de las leucémias clasificadas por métodos citoquímicos se demuestran que son ciertos por medio del estudio ultraestructural en microscopio electrónico y este porcentaje a su vez -- fué variable de acuerdo a los diferentes tipos de patologías diagnosticadas.(5)

En el presente trabajo se revisarán las técnicas citoquímicas más útiles para el diagnóstico diferencial de leucémias agudas.

## 2.2 Principios Generales.

El procedimiento general a seguir, será diferente de acuerdo a la técnica que se desee realizar, pero en general se debe considerar lo siguiente:

- Obtención de la muestra.
- Preparación de los extendidos.
- Fijación de los extendidos.
- Incubación y/o tinción de los extendidos.
- Interpretación microscópica.

Obtención de la muestra.-La citoquímica puede emplearse en muestras de sangre periférica o de médula ósea.

Las muestras deben obtenerse de tal forma que las células no sufran traumatismos, para que las observaciones que se realicen , reflejen la estructura real de las mismas.

Preparación de extendidos.-Las mejores muestras de médula ósea o de sangre periférica para el estudio citoquímico, son las que se obtienen sin el uso de anticoagulantes; cuando esto no es posible y aunque no son aconsejables, los anticoagulantes más comunmente usados son: el oxalato, el citrato, la heparina y el etilen-diamino-tetra-acético(EDTA) - el cual tiene un efecto muy débil sobre las tinciones cito--

químicas. En un portaobjetos limpio, seco y de preferencia nuevo, se hacen extendidos delgados y uniformes; estos se dejan secar de 2 a 4 horas en posición vertical antes de la fijación, para evitar la tendencia que tienen los extendidos de mostrar arrugas y de desprenderse durante la fijación e incubación.

Fijación de los extendidos.-Los procesos de fijación usados en citoquímica hematológica, cubren un intervalo bastante grande, muchos de ellos se han establecido empíricamente buscando un mecanismo efectivo para la preservación de una buena morfología; lo que se logra mejor con fijadores fuertes, especialmente con alcoholes para la optimización de la conservación "in situ" de enzimas u otras sustancias que se estén estudiando. En general las hidrolasas, incluyendo muchas de las fosfatasas y esteratasas son fácilmente demostrables en extensiones fijadas con vapores de formaldehído. Los fijadores alternativos, incluyendo las exposiciones cortas a las mezclas de alcohol-formol, pueden en algunas circunstancias dar una mejor conservación celular y reducir la tendencia para que algunas partes de la película no se "laven" especialmente cuando se requiere de una incubación prolongada. Las deshidrogenasas y otras enzimas oxidativas son más sensibles que las hidrolasas y aún con una corta exposición a fi-

jadores fuertes se inactivan.

Algunos investigadores hacen uso de la acetona a diferentes concentraciones como un fijador suave.

Interpretación Microscópica.- El último paso del proceso de muestras hematológicas para estudios citoquímicos es la observación microscópica, durante las mismas, es muy común aplicar calificativos como por ejemplo: débil, fuerte, - intenso, disperso, granular difuso, etc. cuando se habla de positividad a las reacciones citoquímicas. Por muchas razones prácticas en el diagnóstico hematológico estos calificativos son suficientes cuando las interpretaciones son simplemente cualitativas.

Además existen métodos semicuantitativos que se han empleado para medir los niveles de la fosfatasa alcalina leucocitaria (FAL), métodos semejantes se han usado para las peroxidasa, Sudán Negro y tinción de PAS; pero excepto la --- reacción de FAL, los demás métodos no tienen utilidad práctica en el laboratorio hematológico.

Sin embargo se han encontrado métodos cuantitativos precisos que han reemplazado a los métodos cualitativos.

La ayuda que han proporcionado los estudios citológicos es enorme y de gran importancia práctica para entender las cualidades tintoriales de las células en el diagnóstico del laboratorio de hematología. (3)

### 2.3 Composición Bioquímica de los Leucocitos.

Composición bioquímica de los granulocitos.--En los últimos años las técnicas para el aislamiento de los leucocitos de la sangre, relativamente desprovistos de eritrocitos y plaquetas y en un estado metabólico aceptable, han facilitado los estudios bioquímicos de estas células. El uso de columnas con perlas de vidrio ha permitido además de la separación de los polimorfonucleares de los mononucleares de la sangre periférica. Sin embargo, la mayoría de los estudios bioquímicos de los leucocitos normales se ha desarrollado sobre la población celular heterogénea. La separación de los Eosinófilos y de los Basófilos de los Polimorfonucleares Neutrófilos ha sido mucho menos satisfactoria, mientras que la separación de las formas granulocíticas en desarrollo de las formas eritrocíticas aún no se ha podido conseguir. Por ello la información que poseemos sobre la composición de los granulocitos en desarrollo en la médula ósea, de los Eosinófilos y basófilos de la sangre periférica procede del estudio mediante métodos histoquímicos, autorradiográficos y ultraes-

estructurales, gracias a los cuales pueden identificarse formas celulares aisladas e individuales.

El Polimorfonuclear Neutrófilo maduro examinado con microscópio óptico mediante tinciones citoquímicas y con el microscópio electrónico , revelan dos tipos de gránulos que son: gránulos azurófilos y gránulos específicos. Los gránulos azurófilos o primarios son lisosomas, partículas que almacenan hidrolasas ácidas en forma latente similares en estructura y contenido a los que se encuentran en muchas células de los vertebrados superiores. Los gránulos azurófilos primeramente se observan en el estadio de Promielocito; desde este estadio en adelante ya no se producen, así que estos gránulos van disminuyendo con las subsecuentes divisiones y modifican sus características tintoriales. Desde el estadio de Mielocito - una segunda población de gránulos aparece y se les denomina Específicos o secundarios. El contenido de enzimas y otras sustancias de los gránulos de los neutrófilos está dado en la tabla 2.3.1. Muchas de estas sustancias enlistadas en dicha tabla tienen actividad antibacteriana y juegan un papel importante en el proceso de fagocitosis. Los estudios de estas enzimas durante los estadios de maduración de los granulocitos indican que la mieloperoxidasa, hidrolasas ácidas, proteasas neutras incluyendo una colagenasa no específica y

proteínas catiónicas bactericidas aparecen en etapas tempranas de maduración. En contraste con la aparición de lisozima, una colagenasa específica, vitamina B<sub>12</sub> unida a proteína y  $\alpha$ -lactoferrina que se encuentra en los estadios de granulocitos maduros y esto concuerda con la aparición de los gránulos específicos en esta etapa de maduración.

La actividad de la peroxidasa de las células inmaduras se ha utilizado para el diagnóstico y clasificación de leucemias agudas no diferenciadas. Si esta actividad está presente indica que las células provienen de las series granulocíticas o monocíticas. La diferenciación más amplia entre estas dos series se realiza auxiliándose de la reacción citoquímica de las esterases. Los Promielocitos y otros granulocitos tienen un alto contenido de naftol-AS-d-cloroacetato-esterasa, la cual no se encuentra en los Monocitos, ya que en los Monocitos, se encuentra un gran contenido de alfa-naftil-acetato-esterasa y naftol-AS-d-acetato-esterasa sensible a fluoruros. El color amarillo que presentan los granulocitos no teñidos deriva de la mieloperoxidasa.

-Contenido de DNA.- Tal como es de esperarse, el contenido de DNA de los granulocitos maduros normales es idéntico al que existe en los leucocitos inmaduros de médula ósea,  $0,7 \times 10^{-12}$  g de fós

foro de DNA por célula. La determinación cuantitativa de DNA se ha utilizado en algunas ocasiones para determinar el número total de células. El contenido de DNA en células leucémicas ha demostrado gran variabilidad, ya que dicho contenido en células de leucemias agudas supera al DNA medio de los leucocitos normales. Esto se debe con toda seguridad, al número anormal de cromosomas encontrado en las células de dicha enfermedad donde el hiperdiploidismo se observa con relativa frecuencia.

-Contenido de RNA.- La maduración de los granulocitos va unida a una disminución de la basofilia del citoplasma siendo un fiel reflejo del menor contenido de RNA de los estadios maduros de los granulocitos. De acuerdo con estos hallazgos, las células blásticas de los pacientes con leucemia aguda tienen una proporción de RNA/DNA superior a la de los granulocitos normales.

-Contenido de Aminoácidos.- Los leucocitos incorporan y concentran aminoácidos con gran facilidad; por ello el granulocito contiene concentraciones de aminoácidos que superan las del plasma y las de los eritrocitos, la única excepción corre a cargo de la Arginina que se encuentra en menor concentración en los granulocitos. En general, la captación de ami



noácidos es mayor en las células de las leucémias agudas que en los granulocitos maduros. En las células leucémicas se encuentran altas concentraciones de : 0-fosfoetanolamina, ácido glutámico y prolina. El glutatión y otros compuestos no - protéicos también se han demostrado en el interior de los -- leucocitos.

-Contenido de Glucógeno.- Se ha demostrado que el glucógeno sanguíneo procede fundamentalmente de los granulocitos.

Las células mieloblásticas tienen una cantidad de -- glucógeno mínima o no mesurable; este aparece en el Mielocito y aumenta durante la ulterior diferenciación. En los pacientes con leucémia granulocítica crónica se ha demostrado un descenso en la cantidad de glucógeno leucocitario, en comparación con la normalidad mientras que estos niveles se han encontrado aumentados en pacientes con Metaplasia Mieloide, Policitemia Vera y leucocitosis. Los Linfoblastos, por el -- contrario de las células mieloblásticas, contienen material PAS ( ácido peryódico de Schiff) positivo en su citoplasma.- esta diferencia resulta útil para la clasificación de leucé mias agudas.

-Contenido de Lípidos.- Cerca de un 5% del peso en seco de

los granulocitos humanos son lípidos. Aproximadamente 35% de los lípidos totales son fosfolípidos, una tercera parte son lípidos neutros, 20% triglicéridos y 10% de colesterol libre. Los principales fosfolípidos identificados fueron la fosfatidil colina, el glicerofosfato de etanolamina, esfingomiolina, fosfatidilserina y fosfatidil inositol.

- Contenido de otras sustancias. -

Piridin dinucleótidos. - Los niveles de piridin dinucleótidos oxidados y reducidos se han medido fluorométricamente en las células normales y leucémicas, encontrándose resultados semejantes, exceptuando los de NAD que resultaron mucho más elevados en las células de leucemia mieloblástica aguda y leucemia granulocítica crónica que en las normales.

Vitaminas y Coenzimas. - Se encuentran el Acido Fólico vitamina B<sub>12</sub>, Rivo flavina, Tiamina y concentraciones bajas de vitamina C y piridoxal fosfato.

Heparina e Histamina. - Se ha demostrado que el basófilo contiene gran cantidad de histamina y que la gran cantidad de la histamina circulante en la sangre procede de los basófilos, un tercio de la misma procede de los eosinófilos y el sexto restante de los elementos diversos. (20)

TABLA 2.3.1  
 CONSTITUYENTES DE LOS GRANULOS DE LOS NEUTROFILOS

	AZUROFILOS	ESPECIFICOS
Fosfatasa ácida	+	-
Aminopeptidasa	+	-
alfa-Amilasa	+	-
Catepsina D	+	-
Catepsina G	+	-
Proteínas catiónicas		-
Colagenasas:		
Específicas	-	+
No-específicas	+	-
Dextranasa	+	-
Elastasa	+	-
alfa-Fucosidasa	+	-
alfa y beta-galactosidasa	+	-
N-Acetil-beta-galactosaminidasa	+	-
alfa y beta-Glucosidasa	+	-
N-Acetil-Glucosaminidasa	+	-
beta-Glucoronidasa	+	-
Glucosil aminoglicanos	+	-
Lactoferrina	-	+
Laminaranasa	+	-
Lisozima	+	-
alfa-Manosidasa	+	-
Mieloperoxidasa	+	-
Proteína de permeabilidad aumentada	+	-
Vitamina B <sub>12</sub> unida a proteína	-	+

Tomado de Hematology-Williams J. W. (20)

Composición bioquímica de los Monocitos.-La primera célula morfológicamente identificable de la serie monocítica y macrófagos es el Monoblasto, el cual contiene un complejo de Golgi poco desarrollado y contiene escasos gránulos peroxidasa positivos. Conforme esta célula madura se incrementa de cambios en su contenido bioquímico, así que en el Monocito maduro se encuentran: enzimas lisosomales, incluyendo beta glucuronidasa, fosfatasa ácida, catepsinas, lisozimas, sulfatasas, lipasas, elastasas, colagenasas, desoxirribonucleasas y arginasa.

Composición bioquímica de los Linfocitos.

- Contenido de Lípidos.- La importancia de la separación de los linfocitos de los polimorfonucleares previa a estudios de composición y metabolismo, ha sido bien establecida por análisis del contenido lipídico en ambos tipos celulares. Los Linfocitos humanos normales contienen aproximadamente 11 picogramos de lípidos por célula, la mitad del contenido lipídico total en el polimorfonuclear. En ambos tipos celulares el lípido predominante son los fosfolípidos y el linfocito es particularmente rico en lecitinas. Los linfocitos maduros tienen el doble de lípidos totales que los linfocitos de la leucemia linfocítica crónica y que los linfoblastos de la --

leucemia linfoblástica. El aumento de lípidos en la célula madura se debe fundamentalmente a ésteres de colesterol; el contenido de fosfolípidos de la célula madura e inmadura es similar, aunque los linfoblastos contienen cantidades mayores de lecitina y menores de esfingomiolina.

- Contenido de Carbohidratos.-El linfocito humano tiene sólo pequeñas cantidades de glucógeno.

- Contenido de Enzimas.- El pequeño número de lisosomas de los linfocitos de la sangre periférica contienen diferentes hidrolasas ácidas incluyendo fosfatasa ácida, beta-glucuronidasa, beta-galactosidasa, alfa-manosidasa, beta-hexomanidasa, alfa-arabinosidasa, alfa glucosidasa y beta-glucosidasa; si se mide citoquímicamente la actividad de hidrolasas ácidas es generalmente más alta en Linfocitos T que en los Linfocitos no-T. La esterasa ácida lisosomal probada citoquímicamente con alfa-naftil-acetato como sustrato presenta un punteado característico en los Linfocitos T maduros.

La membrana plasmática del Linfocito está compuesta de partes iguales de proteínas y lípidos y un 6% de carbohidratos.

Las enzimas localizadas en la superficie exterior -

del Linfocito incluyen a la 5'-nucleotidasa, ATP-asa potásica y sódica y fosfatasa alcalina. Los niveles de 5'-nucleotidasa son tres o cuatro veces más altos en Linfocitos B que en Linfocitos T y se van incrementando con la maduración de ambas células. Los niveles variablemente bajos de 5'-nucleotidasa reportados en pacientes con hipogamaglobulinemia reflejan el estado inmaduro de los linfocitos en circulación en sangre periférica. Los niveles de nucleotidasa pueden ayudar a distinguir subclases de leucemia linfocítica crónica proveniente de linfocitos T o linfocitos B. (20)

#### 2.4 Citoquímica.

Las reacciones tintoriales que con más frecuencia se usan para identificar células leucémicas son esencialmente de dos tipos: para identificar sustancias estructurales y --enzimas, las cuales se describen a continuación:

##### Sustancias estructurales:

-Carbohidratos.

-Lípidos.

##### Enzimas :

-Peroxidasa.

-Fosfatasa alcalina

-Fosfatasa ácida

-Esterasas.

-Desoxinucleotidil transferasa  
terminal.

Carbohidratos.

Los carbohidratos contenidos en los leucocitos se -- han estudiado mediante métodos microquímicos e histoquímicos. Por medio de estos se estableció que el contenido de glucó-- geno en los gránulos es de 4,23 microgramos por  $10^6$  leuco-- citos granulocitos. El glucógeno de los neutrófilos asocia-- dos a infecciones es significativamente superior al observa-- do en leucocitos de personas normales. Los leucocitos de su-- jetos con Policitemia Vera, leucocitosis o con cuadros leuce-- moides, poseen un alto contenido de glucógeno. En contraste con los valores bajos que se han observado en las leucémias granulocíticas crónicas. (18)

El primer intento para demostrar glucógeno histoquí-- micamente fué hecho por Neukirch en 1910, en los neutrófilos humanos aplicando el método de Carmin de Best a las células polimorfonucleares presentes en la sangre y en exudados in-- flamatorios.

Más tarde se demostró la presencia de carbohidratos mediante colorantes como yodo. Por ambos métodos se demostró

la presencia de gránulos con glucógeno en el citoplasma de los neutrófilos, de tal manera que cuando se estableció que estos gránulos eran degradados por la amilasa salival, Neukirch concluyó que ellos contenían glucógeno o carbohidrato semejante. Por otra parte, estructuras yodófilas y carminófilas fueron también observadas en las plaquetas sanguíneas humanas pero estas no fueron degradadas por la amilasa salival.

Sin embargo, las tinciones con yodo se basan en reacciones químicas poco comprendidas y la presencia de glucógeno por este método sólo se hace presente cuando hay cantidades considerables de éste, por ejemplo, en granulocitos maduros, pero falla al detectar pequeñas cantidades de glucógeno en las células inmaduras.

Wislocki y Dempsey, utilizando el método de Faelgen-Bauer en las células sanguíneas de mono Rhesus, demostraron glucógeno en el citoplasma de los neutrófilos y en los mielocitos de la médula ósea, pero nunca en ningún otro tipo de célula.

Gibb y Stowel aplicaron tres métodos histoquímicos diferentes para el estudio del glucógeno en sangre periférica normal, anormal y en extendidos de médula ósea; las técnicas



cas empleadas fueron: el método de Gomori del ácido crómico-metamina de plata, la técnica de Hotchkiss del ácido peryódico fucsina ácido sulfuroso, modificada del método de Magmanus y la tinción de Fielgen-Bauer ; con estos métodos Gibb y Stowel establecen que los resultados más confiables se obtienen con los dos primeros y que la técnica de Fielgen-Bauer da resultados poco satisfactorios.

En los eritrocitos y sus precursores no se puede detectar glucógeno, mientras que en todas las células de la serie mieloide contienen cantidades significativas de éste; -- las tinciones más intensas se encontraron en los leucocitos segmentados, sin embargo fué negativa para los gránulos eosinófilos en tanto que el citoplasma que rodea estos gránulos, contienen gran cantidad de este carbohidrato. Los linfocitos y monocitos contienen pequeñas cantidades de glucógeno en su citoplasma, así como también los megacariocitos y las plaquetas. (2)

En la actualidad sabemos que los resultados más seguros y reproducibles se obtienen con la reacción del ácido peryódico de Schiff (PAS) y cuyos patrones de coloración son sustancialmente similares a los descritos por Gibb y Stowel. Todas las observaciones subsecuentes en relación a la distribución

bucción del glucógeno en células normales y leucémicas fueron obtenidas principalmente en esta reacción, es por esto que parece apropiado discutir sus bases químicas y su especificidad.

El ácido peryódico ( $\text{HIO}_4$ ) oxida el enlace C-C cuando ambos átomos poseen grupos hidroxilo (  $-\text{CHOH}-\text{CHOH}-$  ) o sus derivados amino o alquil-amino hasta producir un dialdehído. La reacción de oxidación no continúa y los aldehídos producidos al reaccionar con el reactivo de Schiff dan una coloración magenta. De acuerdo con Hotchkiss (1948), una reacción positiva puede ser dada por diversas clases de carbohidratos, incluyendo a los monosacáridos, polisacáridos, glucoproteínas y mucoproteínas conjugadas, azúcares fosforilados, derivados inositol y cerebrósidos. Compuestos tales como la ribosa, el ácido desoxirribonucléico y los residuos del ácido desoxiamino de proteínas, no dan reacción positiva por no presentar grupos glicol libres. Reacción 2.4.0.1.

Leucocitos normales PAS positivos.- Los neutrófilos contienen material PAS positivo, generalmente en forma de gránulos moderadamente finos tan juntos unos de otros que el fondo del citoplasma no se distingue. Los Metamielocitos y Mielocitos contienen abundantes vacuolas con glucógeno, sin em-

bargo, menos abundantes que en las células polimorfonucleares maduras. Los gránulos muestran variación en su tamaño, - siendo algunas veces relativamente escasos y gruesos y otras numerosos y finos. Los Eosinófilos muestran un aspecto característico en las preparaciones con PAS; los gránulos específicos de los Eosinófilos permanecen sin teñir y contrastan fuertemente con el fondo del citoplasma que es difusamente positivo. Este aspecto también se encuentra en los precursores de los Eosinófilos. Con respecto a los Basófilos, hay resultados contradictorios en lo que respecta a la localización de las estructuras PAS positivas lábiles a la diastasa.

El trabajo de Inagaki (1968), cita depósitos PAS positivos en el espacio intergranular de los Basófilos que son lisados por el tratamiento con diastasa, mientras que el trabajo de Kaung (1969), demuestra que los gránulos específicos de los Basófilos siempre dan una reacción PAS negativa. Estos resultados fueron obtenidos tanto con microscopía óptica como con microscopía electrónica. Algunos trabajos que mencionan la presencia de glucógeno en los Basófilos sanguíneos se debe principalmente al hecho de que el contenido de glucógeno depende de las condiciones metabólicas transitorias de las células y por lo tanto esta sujeto a grandes variaciones.

( 14; 18 )

Los gránulos metacromáticos de los Basófilos no contienen glucógeno, la reacción PAS positiva ocasionalmente observada en dichos gránulos específicos se debe esencialmente a la presencia de mucopolisacáridos ácidos y fosfolípidos. - Los precursores tempranos de los granulocitos, los mieloblastos y promielocitos, muestran una coloración citoplásmica difusa, generalmente tenue, pero algunas veces más intensa con una tendencia a demarcar los gránulos como lo que se observa en los Mielocitos.

Los Linfocitos tienen un menor contenido de glucógeno que los granulocitos, pero con frecuencia pueden demostrarse gránulos PAS positivos en el citoplasma ya sean finos o gruesos, entre un 10% y un 40% de los Linfocitos de la sangre periférica muestran positividad con uno o dos gránulos perinucleares, pero del 1 al 2% de los Linfocitos dan una reacción más intensa con tres o más gránulos conteniendo material PAS positivo. Parece no haber diferencia en la positividad al PAS entre células T ó B. Los Monocitos contienen normalmente pequeñas cantidades de gránulos de glucógeno.

Células leucémicas PAS positivas.-Los patrones de positividad al PAS en la serie eritroide y leucocítica en los trastornos hematopoyéticos son con frecuencia de un valor importan-

te en el diagnóstico diferencial.

Es importante recapitular las variaciones esenciales que se presentan en algunos estados patológicos, en donde la reacción de PAS esta sujeta de una manera acentuada a alteraciones. Entre estas se incluyen las principales variedades - de leucémias agudas, trastornos del sistema megacariocito--plaqueta, talasemias, en algunos padecimientos linfoproliferativos y de los granulocitos. (18)

La reacción de PAS es de suma importancia en el diagnóstico diferencial de varias formas de leucémias agudas. -- Las características primordiales de positividad al PAS de -- los diferentes tipos de células blásticas puede resumirse como sigue: Los Promielocitos y Mieloblastos de leucémias agudas son generalmente PAS negativos, dando al citoplasma un aspecto difuso , mientras que los lifoblastos de las leucémias linfoblásticas muestran una positividad muy intensa al PAS en forma de varios anillos concéntricos de gránulos gruesos o bloques densos de glucógeno que contrastan con un fondo negativo.

Los monoblastos de leucémias agudas teñidas con PAS muestran un patron mixto, algunos dan una reacción completa.

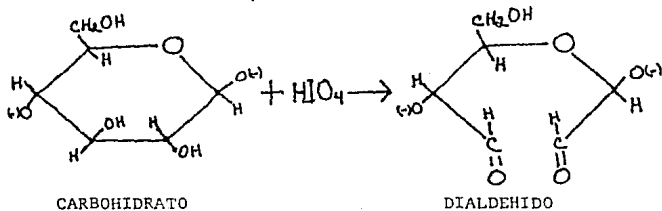
mente negativa, otros dan una positividad intensa ya sea en forma de un fondo rojo difuso o con gránulos gruesos o moderadamente gruesos. (13)

**Trastornos Linfoproliferativos.**- Muchos estudios citoquímicos establecen que una proporción variable de Linfocitos normales contienen gránulos citoplásmicos de glucógeno. De acuerdo a Gibb y Stowel, no hay diferencias significativas entre los Linfocitos leucémicos y normales.(2) Mientras que en investigaciones posteriores se indica que en la leucemia linfocítica crónica aumenta la proporción de Linfocitos que contienen gránulos PAS positivos en el citoplasma. Sin embargo dichos cambios en el contenido de glucógeno en los Linfocitos no son específicos de leucemias, ya que una gran variedad de trastornos linfoproliferativos tales como los Linfomas, presentan altos niveles de glucógeno en los Linfocitos.

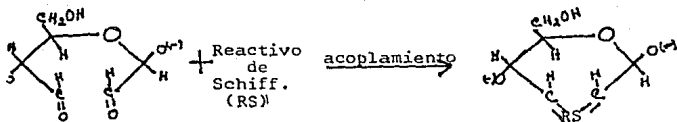
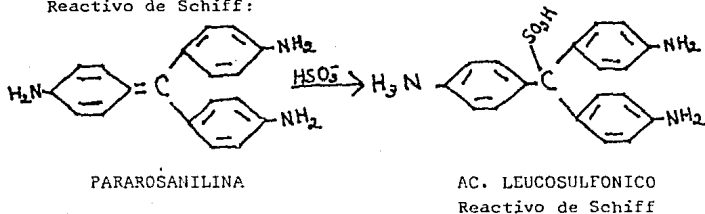
**Trastornos de los Granulocitos.**- La mayoría de los estudios citoquímicos se basan en métodos semicuantitativos del glucógeno en diferentes tipos de células hemáticas. Ya que la positividad citoplásmica difusa presente en ciertos tipos celulares, tales como en los neutrófilos, impiden una valoración cuantitativa de los cambios en el contenido de glucógeno que ocurren en los padecimientos, por lo que el análisis cuanti-

tativo sólo se puede lograr con técnicas microespectrofotométricas. La utilización de dicho método fué realizada por Gahrton (1966), en neutrófilos de 20 sujetos normales y en pacientes con leucemia granulocítica crónica, encontrando que la cantidad media de material PAS positivo en los neutrófilos de personas con leucemia granulocítica crónica fué 43% menos que el de neutrófilos normales. En los cuadros de remisión los neutrófilos contenían cantidades normales de material PAS positivo. No se piensa que la disminución en el contenido de glucógeno de los leucocitos leucémicos se deba a algún defecto de alguna enzima involucrada en la síntesis de glucógeno, ya que se puede incrementar de tres a diez veces la capacidad de incorporación de glucosa a glucógeno en las células mieloides de la leucemia granulocítica crónica. De acuerdo con Pederson y Hayhoe (1971), la disminución en el contenido de glucógeno de los polimorfonucleares de leucemia granulocítica crónica, es compatible con la relativa inmadurez citoplásmica como lo indican también los resultados de estudios ultraestructurales. El cambio de cantidades bajas a normales de glucógeno después del tratamiento está relacionado probablemente con el surgimiento de una población predominantemente normal de neutrófilos, apoyándose esa hipótesis en la reacción de la fosfatasa alcalina, que tiende a alcanzar valores normales durante la remisión. (8)

Reacción 2.4.0.1.- Principio de la reacción de PAS.



Reactivo de Schiff:





### Lípidos.

Los lípidos desde el punto de vista químico son heterogéneos y una amplia variedad de sustancias comparten con ellos propiedades tales como: ser insolubles en agua y ser solubles en solventes orgánicos. Los lípidos han sido clasificados en tres grandes grupos; lípidos simples, compuestos y derivados lipídicos.

Citoquímicamente los lípidos pueden aparecer como gotitas microscópicas, en células grasas, células hepáticas anóxicas y macrófagos, pero esta apariencia no es común en la mayoría de las células hematopoyéticas. En estas los lípidos se dispersan finalmente en gotitas muy pequeñas que son reconocidas bajo la observación en microscópio óptico sin el uso de un colorante selectivo o bien en las membranas por combinación con proteínas. Citoquímicamente los métodos utilizados para demostrar la presencia de lípidos se basa en la propiedad lipofílica de algunos colorantes que dejan su solvente y se concentran preferentemente en los lípidos intracelulares.

Chayé, ha señalado que los lípidos pueden estar unidos a sustancias que los enmascaran en forma variable y dependiente de circunstancias fisiológicas y patológicas y que

pueden estar influenciadas por drogas, hormonas y otros agentes, de modo que los resultados obtenidos con un método de tinción dado, pueden demostrar una variabilidad independiente de la inherente al método.

Los lípidos se pueden demostrar con colorantes de Sudán, Rojo Oleoso, Escarlata R, Sulfato de azul de Nilo y colorantes fluorescentes como en 3,4-benzopireno y Rodamina B.

La tinción con Rojo Oleoso se basa en que es un colorante diazo neutro y se emplea en la tinción de grasas neutras específicamente. (15)

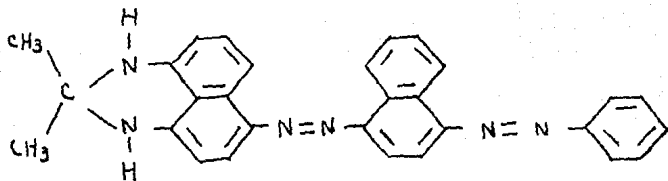
Tinción de leucocitos con Sudán Negro.- Los primeros estudios de leucocitos teñidos con Sudán III, Escarlata R y Sulfato de azul de Nilo, dieron reacción positiva en los neutrófilos, pero los resultados dieron muy variables, no fué hasta años después de haber introducido el Sudán Negro B por List (1934-1936), que se describieron algunas pruebas confiables, Sheehan (1939), usó primero el Sudán Negro B para teñir placas de sangre secadas y fijadas con alcohol metílico durante 30 minutos; utilizó colorantes de Eosina-Azul de metileno para contrastar y para ayudar en la identificación de las células, concluyendo que los neutrófilos estaban llenos de gránulos intensamente teñidos. Los gránulos de los eosinó

filos aparentemente tienen sólo una capa superficial sudanofílica, las células en transición mostraron un contenido granular variable, mientras que los Linfocitos grandes y pequeños estuvieron siempre exentos de este material. Los Mielocitos presentan abundantes gránulos evidentes y otros escasos gránulos poco teñidos, los Linfoblastos no presentan gránulos. Hallazgos similares fueron reportados por Mc Manus, Wiglocki y por Dempsey, quienes estudiaron las células sanguíneas de monos y observaron que los Monocitos contienen escasos gránulos y además una muy fina positividad pudo ser detectada en Megacariocitos y Plaquetas. (14)

Sheehan y Storey describieron un método modificado de tinción de leucocitos con Sudán Negro B en el cual la fijación usual con alcohol metílico fué reemplazada con vapores de formalina y la solución de Sudán Negro fué mantenida a un pH neutro o ligeramente alcalino usando una pequeña cantidad de fenol como mordente. Fórmula 2.4.0.2.

Rheingold y Wislocki, hicieron observaciones detalladas de la sudanofilia de células de sangre periférica humana y en las células de médula ósea, ellos confirmaron las observaciones anteriores hechas en neutrófilos y Eosinófilos, pero además observaron que los granulocitos basófilos eran po-

SUDAN NEGRO B



sitivos aunque se teñían de gris pálido a negro intenso.

Desde trabajos previos sobre la sudanofilia de los Monocitos, Rheingold y Wislocki utilizaron sangre de pacientes con gran contenido de Monocitos, encontrando una sudanofilia variable que iba de una coloración débil a una coloración intensa del citoplasma.

Los Linfocitos no contienen material sudanófilo, tampoco fué observada positividad granular en los Megacariocitos y en las plaquetas de la médula ósea y sangre humana.

Bloom y Wislocki, estudiaron las reacciones de las células sanguíneas y de la médula ósea con el método de hematina ácida de Baker, y compararon los resultados con los obtenidos después de la coloración con Sudán Negro B. Ellos concluyeron, que el método de Baker daba una tinción más satisfactoria para las partículas finas, probablemente fosfolípidos mitocondriales, y presentes en Mieloblastos, Linfoblastos, Megacariocitos y Monocitos, pero notaron que estas partículas pudieron ser vistas, aunque menos claramente con Sudán Negro B. Este incremento en la sensibilidad del método de Baker comparado con los resultados con Sudán Negro fué explicado como debido al uso de formalina- calcio como fija--

dor en lugar de alcohol metílico y la eliminación de colorante de contraste. (8)

Storti y Perugini, enfocaron su atención al valor -- que tiene la tinción de Sudán Negro en la diferenciación de células primitivas hemáticas en estados normales y patológicos. Utilizaron como contraste Giemsa, para ayudar a la identificación de las células. En el material normal hallaron todas las células eritrocíticas, linfocíticas, células plasmáticas, megacariocitos y plaquetas, el mayor número de basófilos y mayor parte de los macrófagos medulares o células reticuloendoteliales con sudanofilia completa. La positividad de los gránulos de los neutrófilos y eosinófilos desde el estadio de promielocito en adelante fué confirmada, así como también los gránulos finos regulares característicos de los monocitos. Las células primitivas poco diferenciadas con la -- técnica de Romanowsky de médulas normales y de leucémias agudas, fueron fácilmente diferenciadas por la tinción de Sudán Negro B debido al patrón de positividad característico de monocitos y granulocitos. (14)

La tinción de Sudán Negro fué atribuida a la existencia de lípidos libres o combinados, pero esta creencia fué -- cambiada por Lillie y Burtner, quienes hallaron que los grá-

nulos de los polimorfonucleares teñidos con Sudán resistían la decoloración no sólo con alcohol y xileno, sino también con acetona, cloroformo, tetracloruro de carbono, aceite mineral y otros solventes.

Si la sudanofilia depende de una simple disolución física del colorante en lípidos, entonces el colorante podía ser extraído por un exceso de solvente, pero esto no ocurrió así. Lille y Burtner también reportaron que al esterificar el naftol del colorante Sudán, se bloqueaba la tinción de los leucocitos, mientras que otros lípidos ordinarios tales como ceras, melanina, lipofucsina caridiaca, lípidos de la retina y grasas suprarrenales persistían teñidos, por lo que argumentaron que la sudanofilia de los leucocitos resultaba de una combinación química del colorante con un componente citoplásmico no lipídico.

Lillie y Burtner, establecieron que el término "sudanofilia estable" diferenciaba la reacción de los gránulos de los leucocitos de otros que son inestables ya que la positividad es reversible.

Turner, sin embargo, sostiene que la tinción de Sudán Negro B para los gránulos de los polimorfonucleares es -

un proceso enzimático relacionado con la actividad de la peroxidasa y que la positividad de Sudán Negro B en leucocitos resulta de la afinidad de los dos grupos amino del colorante por grupos ácidos probablemente unidos a los fosfolípidos, - desde su punto de vista ninguna reacción fué específica para los lípidos. (14)

Hayhoe, establece que aproximadamente en 5% del peso de los polimorfonucleares normales son lípidos: de este una tercera parte son fosfolípidos y otra tercera parte son lípidos neutros.

Las células leucémicas y los leucocitos cultivados - tienen cerca de un 40% menos de lípidos, siendo esta disminución de lípidos neutros con la correlación de colesterol a - fosfatidilcolina de 1.0 ó menor, hasta 0.5-0.7 en los blastos de leucemias agudas, aunque hay diferencias en el contenido de lípidos entre linfocitos y polimorfonucleares, en ambos tipos de células, las moléculas de lípidos juegan de modo general un papel importante en la constitución de membranas. (9)

La distribución de la sudanofilia en las células normales de sangre o de médula ósea y en estados patológicos



está bien establecida. Normalmente las células de la serie - granulocítica muestran mayor positividad con la maduración - progresiva, los micloblastos pueden ser negativos o poseer - pequeños gránulos localizados cerca del núcleo, probablemente en la región de aparato de Golgi. Esta forma de positividad viene a ser más acentuada en los mielocitos y metamielocitos de la serie neutrófila que tiene mayor número de gránulos sudanofílicos. Aparentemente esto corresponde con los gránulos específicos celulares que se observan normalmente - con la tinción de Romanowsky aunque más grandes de diámetro. Los neutrófilos muestran una gran positividad, los gránulos llenan el citoplasma y frecuentemente obscurecen parte del - núcleo, las células eosinófilas en todos los estadios de maduración muestran una fuerte positividad en los gránulos pe riféricos específicos con una reacción negativa en la parte central. La reacción en los basófilos es variable, algunos - son negativos y otros tienen una relativa positividad en los gránulos específicos.

La positividad en la serie basófila tiende a decre-- cer conforme aumenta la maduración celular. Los precursores de los basófilos son fuertemente positivos, la reacción granular puede ser de un color metacromático rojizo a negro, es pecialmente en estados patológicos con mayor basofilia, en -

donde los gránulos sudanofílicos son idénticos a los gránulos específicos.

Los linfocitos y sus precursores son invariablemente negativos excepto algunos con puntos perinucleares finos o los bastoncillos visibles en los linfoblastos en preparaciones no contrastadas y probablemente representan fosfolípidos mitocondriales, una positividad similar puede ser vista en células más primitivas de otras series, pero se enmascara con los colorantes de contraste usados en las preparaciones.

Los Monocitos y sus precursores pueden algunas veces ser completamente negativos, pero frecuentemente muestran un número variable de gránulos finos o moderadamente gruesos y dispersos sobre la célula, con una ligera tendencia a concentrarse en la zona perinuclear o en el borde citoplasmático como ocurre en los mielocitos tempranos. Este modelo de gránulos discretamente dispersos es característico de células de la serie monocítica y no se contraponen con la distribución de peroxidasa en las series celulares. (14)

Reacciones con Sudán Negro B en trastornos Leucocitarios.- En estados patológicos la reacción de Sudán Negro B tiene un valor especial en la diferenciación de células inma

duras de leucémias agudas. Storti y Perugini, señalaron que las células más indiferenciadas en los frotis teñidos con -- los métodos de Romanowsky y que tienen reacción de peroxidasa negativa algunas veces muestran un patrón de sudanofilia similar a la que se observa en los promielocitos, mielocitos y monocitos normales.

La tinción de Sudán Negro fué usada por Hayhoe Quaglini y Doll, como un auxiliar en la clasificación de las -- leucémias agudas. La sudanofilia proporciona generalmente -- una ayuda muy importante en las variedades de esta enfermedad.

Se ha observado una reducción en la sudanofilia en -- polimorfonucleares, ocasionalmente negativos o con áreas negativas en el citoplasma, en las leucémias granulocíticas -- crónicas. De manera similar se ha visto polimorfonucleares -- negativos, algunas veces con ausencia de gránulos específicos, reacción de peroxidasa negativa y reacción de fosfatasa alcalina negativa en una minoría de casos de leucémias mieloblásticas agudas, existe la posibilidad sin duda, de que estos polimorfonucleares anormales podrían derivar de precursores leucémicos, aún cuando la mayoría de los polimorfonucleares maduros en las leucémias agudas es más probable que pro-

venga de los precursores normales sobrevivientes. (8)

### Enzimas.

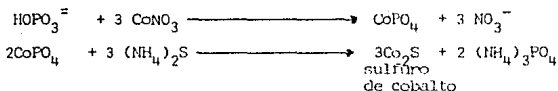
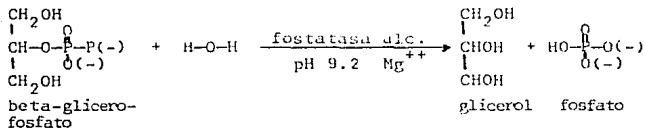
Fosfatasas.- Las fosfatasas ácida y alcalina incluyen una gran variedad de isoenzimas con la capacidad de liberar fosfato a partir de muchos fosfomonoésteres alcohólicos o fenólicos a pH ácido y alcalino respectivamente.

Estas enzimas están ampliamente distribuidas tanto en las células como en los tejidos y son de gran interés e incalculable valor para la hematología. La demostración citológica de las fosfatasas con el microscopio óptico depende de la formación de un precipitado insoluble colorido en los sitios de hidrólisis del sustrato y de los métodos utilizados que inciden en dos amplias categorías:

- Métodos de Gomori-Takamatsu
- Métodos de colorante Azo.

En los primeros, las preparaciones celulares se dejan actuar sobre un fosfomonoéster adecuado en presencia de iones capaces de formar un compuesto insoluble con el fosfato liberado a un pH seleccionado. Gomori y Takamatsu, en forma independiente mostraron una técnica para lograr esto con la enzima alcalina y esta técnica con modificaciones mínimas ha sido utilizada ampliamente. El fundamento consiste en el uso

de un glicerofosfato u otro fosfomonoéster como sustrato a un pH alcalino en presencia de iones calcio y magnesio activados. El fosfato que se libera es atrapado como un fosfato de calcio insoluble, que se convierte primero en fosfato de cobalto y posteriormente en sulfuro de cobalto negro, la reacción es como sigue:(10, 12, 17)



Con ambas enzimas, estas técnicas inicialmente dieron algunos resultados erróneos. En las células sanguíneas y de la médula ósea por ejemplo, el uso del procedimiento de Gomori y Takamatsu para la fosfatasa alcalina llevó a discrepancias sobre las células que daban reacción positiva y también sobre la localización de la reacción dentro de las células.

El hecho de que se encuentre tinción nuclear intensa y granularidad en el citoplasma, lleva a dudar si la positividad nuclear es un artefacto debido a la difusión de la enzima o de los iones fosfato liberados. Este problema se reduce parcialmente con el uso de altas concentraciones de iones -- calcio lo que hace que la enzima se inmovilice por el incremento en la concentración de estos iones. (8)

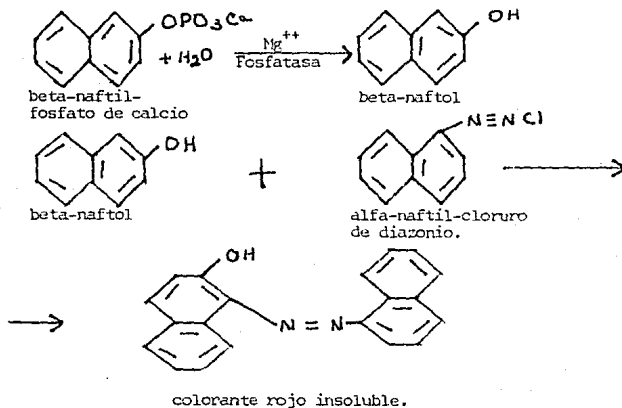
Algunos estudios sobre la positividad citoplásmica -- de estas enzimas en los granulocitos, ponen de manifiesto variaciones importantes en algunas enfermedades, por ejemplo: una disminución en las leucémias granulocíticas crónicas y una elevación marcada en la metaplasia mieloide e infecciones piógenas. (21)

Los trabajos de Holt (1959), condujeron a determinar la localización nuclear de la enzima. La enzima ácida a diferencia de la alcalina se puede localizar exclusivamente en -- los lisosomas y puede por lo tanto ser inaccesible al sustrato a menos que la membrana lisosomal se haga permeable por -- la fijación a un pH bajo. (14)

Aunque los métodos de Gomori para fosfatasas sean -- muy utilizados para el diagnóstico hematológico, los métodos

del colorante Azo poseen ciertas ventajas ultraestructurales que han conducido a imponerse a los primeros. (22)

Método del colorante Azo.-El segundo grupo de métodos para demostrar las fosfatasa citoquímicamente, implican el uso de sustratos que contienen el fosfato de naftol o un derivado de naftol. A medida que ocurre una hidrólisis enzimática en presencia de iones magnesio activadores, el naftol liberado más que el fosfato es capturado por una amina diazoada, el resultado de la unión, es un precipitado colorido brillante de colorante Azo. Los pasos de la reacción se sintetizan a continuación: (14, 17)



### Fosfatasa alcalina

El primero en introducir un método para la demostración de la fosfatasa alcalina fué Menten. Los diferentes métodos usados en hematología difieren en el tipo de fijación con el derivado de naftol que se emplea, ya sea como naftol o como sal de diazonio, pero dan generalmente los mismos resultados. Una técnica citoquímica para la demostración de -- fosfatasa ácida fué descrita por Selegman y Manheur la cual consiste en utilizar alfa-naftil-fosfato de calcio como sustrato a un pH de 5.0 y cloruro de antraquinona diazonio como agente acoplante, se requiere de periodos de incubación prolongados y la mayoría de los investigadores consideran que este método es poco satisfactorio; aunque haciendo algunas modificaciones en el sustrato como el uso de diferentes naftoles tales como: naftol-AS, naftol AS-B con varias sales de diazonio y para-rosa-anilina hexazoada se ha mejorado la reacción.

Tal vez el mejor método desarrollado ha sido el de - Rutenburg y Selegman quienes emplearon 6-benzoil-2-naftol -- fosfato de sodio a pH 5.0 como sustrato e incubación para el acoplamiento con azul rápido a pH entre 7.0 y 8.0. (20)

El método que se describe en el siguiente capítulo -

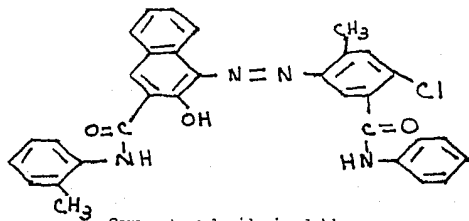
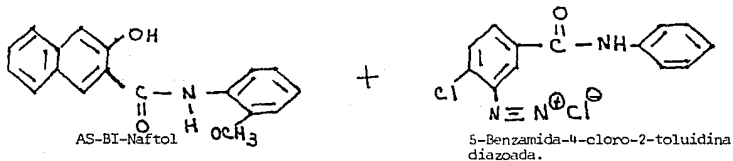
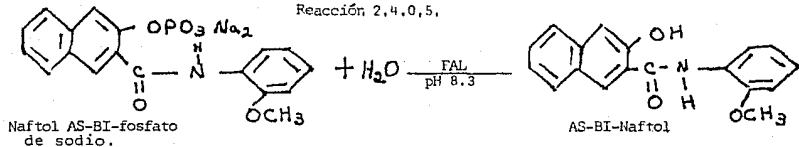


para la identificación de fosfatasa alcalina leucocitaria - es el descrito por Ernest Beutler. La determinación se usa - para diferenciar la leucemia granulocítica crónica de las -- reacciones leucemoides que se ven en infecciones agudas, la Policitemia Vera y la Mielofibrosis con metaplasia mieloide.

El sustrato naftol-AS-BI-fosfato, se hidroliza a fosfato y una naftol amida aríllica que se une a una sal de diazonio rojo violeta LB (5-benzamida-4-cloro-2-toluidina dia--zoada) formando una coloración insoluble. (12,17) Reacc. 2.4.0.9.

Reacciones citoquímicas para la demostración de Fosfatasa leucocitaria.- Los primeros estudios empleando la técnica de Gomori sugieren que la actividad de la fosfatasa alcalina de las células sanguíneas se restringe a las células maduras de la serie granulocítica y que el contenido celular enzimático es mucho más reducido en las leucemias granulocíticas crónicas, pero elevado en las leucocitosis inflamatorias, en cuadros leucemoides y en la mielofibrosis. La positividad se restringe al citoplasma de los neutrófilos. Los eosinófilos algunas veces muestran una tinción positiva en el fondo de su citoplasma con sus gránulos específicos negativos, pero los basófilos normalmente son negativos y se man tienen así aún en estados patológicos, aunque Perwaresh ha -

Reacción 2,4,0,5.



reportado una reacción positiva a los basófilos además de - una mayor acentuación de la actividad en los neutrófilos, en un sólo caso de basofilia asociada con osteomielifibrosis, - sin metaplasia mieloide. Otras células sanguíneas incluyendo monocitos, linfocitos, eritrocitos y plaquetas, son generalmente negativas, aunque una tinción tenue se llega a observar ocasionalmente en plaquetas y pocos linfocitos normales, menos de 1% pueden mostrar reacción citoplásmica débil o moderada. Las extensiones de la médula ósea sólo presentan células hemáticas que normalmente dan reacción positiva y estas son los granulocitos tardíos, empezando en el estadio de metamielocito donde muy ocasionalmente las células dan positividad, hasta los neutrófilos segmentados que muestran variación en la intensidad de la reacción. Las células retículo-endoteliales de la médula, generalmente presentan fuerte actividad enzimática al igual que los osteoblastos, pero otras células de la médula ósea incluyendo los precursores de los granulocitos, eritroblastos, megacariocitos, casi todos los linfocitos y los monocitos, normalmente no reaccionan. (21)

Generalmente en las leucemias de células inmaduras - son negativas a la fosfatasa alcalina, sin embargo, Schubert y Martin reportaron una intensa positividad en el 19% de los mieloblastos de la sangre de un paciente con crisis blástica

de leucémia granulocítica crónica, también se ha visto positividad en los blastos de la leucémia mieloblástica aguda. - La positividad de la fosfatasa alcalina ha sido observada -- también en muchos prolinfocitos de improntas de ganglios, ob- tenidos en pacientes con leucémia prolinfocítica, pero las - células neoplásicas circulantes en este caso no daban positi- vidad, por lo consiguiente la enzima puede ser más fácilmen- te demostrable en células de ganglios linfáticos que en los linfocitos de sangre periférica o de médula ósea. La activi- dad de la fosfatasa alcalina en la membrana de los linfocí- - tos en ciertos casos de Linfomas no-Hodgkin, han sido tam- bién estudiados tanto en frotis como en biopsias. Las enfer- medades linfocíticas malignas bien diferenciadas incluyendo la leucémia linfocítica crónica y los linfomas linfocíticos, fueron negativos también como lo fueron otros 8 tumores difu- sos de células B, 8 linfomas linfoblásticos y las células en cuatro casos de síndrome de Sezary. En los ganglios linfáti- cos normales o testigos, los linfocitos fosfatasa alcalina - positivos, se restringieron a los nódulos primarios y a las zonas del manto de los nódulos de los folículos secundarios; lo que sugiere que las neoplásias linfoides que reaccionan - positivamente se derivan de estos sitios. (14)

Se ha trabajado con neutrófilos no fijados de sangre

periférica y se ha pensado que la reactividad enzimática se localiza en los gránulos secundarios, pero la conservación de las células fué pobre y el producto de la reacción apareció sólo en pocas estructuras vacuolares de tamaño muy variable. Baiton y colaboradores en 1971, también concluyeron que la actividad de la fosfatasa alcalina se localiza estructuralmente en las cisternas del aparato de Golgi y en los gránulos secundarios pequeños de forma alargada o irregular. Esto sólo ocurrió en una proporción de granulocitos que se encontraban en un estado avanzado de desarrollo (metamielocitos en adelante). La confirmación de que la enzima está presente en los gránulos pequeños proviene de estudios bioquímicos con fracciones subcelulares. (14)

Un logro importante es la determinación semicuantitativa de la positividad en los neutrófilos circulantes, lo cual se logra correlacionando la intensidad de la tinción -- con el número de gránulos en 100 neutrófilos consecutivos en la forma descrita por Kaplow. La suma de las puntuaciones obtenidas en las 100 células nos da un valor con un límite entre 0 a 400, dicho valor es conocido como el índice de positividad de la fosfatasa alcalina leucocitaria en neutrófilos.

Los índices de fosfatasa alcalina leucocitaria de -- neutrófilos varía en sus límites normales de acuerdo con el

método empleado; según Quaglino y Hayhoe obtubieron los límites de 50 sujetos normales con valores entre 14 y 100 con una media de 46, mientras que Kaplow, encontró un intervalo de 37 a 98 con una media de 68. Las diferencias tienen poca importancia puesto que cada laboratorio utiliza un método diferente y establece sus propios intervalos normales. (8)

Se han observado incrementos en la actividad de la fosfatasa alcalina en cuadros de Policitemia Vera, Mielofibrosis y leucocitosis inflamatoria; contrastando con la disminución en dicha actividad en la leucémia granulocítica crónica, lo que se confirmó con los métodos del colorante Azo. Se han encontrado valores normales de la enzima en todas las variedades de linfomas no-Hodgkin, en la leucémia granulocítica crónica y en la mayoría de las anemias debidas a deficiencia en algunos factores. Puntuaciones bajas se obtienen invariablemente en las leucémias granulocíticas crónicas con Cromosoma Philadelphia positivo. En las leucémias mieloblásticas agudas, las puntuaciones para la fosfatasa alcalina son bajas cuando los Mieloblastos o Promielocitos predominan, pero generalmente son normales o altos cuando predominan los precursores monocíticos. De una manera semejante, en las eritroleucémias el patrón es el eritroblasto con puntuaciones bajas. Otros trastornos hematológicos con puntuaciones bajas

son la hemoglobinuria paroxística nocturna y la mononucleo--  
sis infecciosa. (2)

La mayoría de los tejidos que poseen contenido sufi-  
ciente de fosfatasa alcalina para ser demostrada citoquímica-  
mente contienen isoenzimas específicas, separables por sus -  
propiedades bioquímicas, inmunológicas y electroforéticas. -  
Se han identificado isoenzimas de fosfatasa alcalina en híga-  
do, hueso, intestino, placenta, células HELA y en ciertos tu-  
mores. También se sugiere que la fosfatasa alcalina leucoci-  
taria representa una isoenzima separable, que se inactiva po-  
co con el calor con respecto a las isoenzimas de hígado y --  
hueso, pero también menos resistente al calor que la isoenzi-  
ma placentaria y se inhibe menos con la fenilalanina que las  
isoenzimas de placenta o intestino. Tanaka en 1970, encontró  
tres isoenzimas mayores de la fosfatasa alcalina: F (rápida),  
I (intermedia) y S (lenta), en los extractos de leucocitos -  
normales. Los patrones fueron iguales en los mongoles en don-  
de la actividad de la fosfatasa alcalina es alta, pero la --  
forma F estuvo ausente en la leucémia granulocítica crónica.

Algunos investigadores han separado la fosfatasa al-  
calina de los leucocitos por cromatografía en columna, ultra-  
centrifugación en gradiente de sacarosa y electroforésis en

gel de almidón. Las enzimas purificadas por estos métodos para los leucocitos obtenidos en sangre normal, la leucemia -- granulocítica crónica y de la leucocitosis relativa fueron similares en sus características bioquímicas y biofísicas, con pesos moleculares entre 5 y 6 000 daltones. Inmunológicamente son idénticas, sin embargo, las actividades enzimáticas específicas son muy diferentes. (16)

Se han hecho estudios en neutrófilos de embriones humanos, encontrándose que los neutrófilos maduros de hígado y médula ósea fueron negativos a la fosfatasa alcalina durante el primer trimestre, ocasionalmente con fuerte positividad celular que aparece en la sangre y órganos hematopoyéticos en el segundo trimestre y una total y fuerte positividad celular que aparece en los neutrófilos de la sangre del tercer trimestre de gestación, donde los índices de fosfatasa alcalina fueron de 169, siendo el intervalo normal en el adulto de 14 a 100 puntuaciones. (22)

Se ha encontrado elevación en los niveles de fosfatasa alcalina en la neutropenia inducida por medicamentos y en algunos casos de anemia aplásica idiopática, lo que se atribuye a la liberación de neutrófilos recién formados en la médula ósea con una alta actividad de la enzima. Normalmente -



las Bandas son negativas y en raras ocasiones tienen actividad positiva mientras que los polimorfonucleares de la médula ósea son en su mayoría negativos.

Si tomamos en cuenta las diferencias significativas en los valores enzimáticos asociados a granulocitos en enfermedades tales como la diabetes y la enfermedad de Hodgkin -- con valores altos, con los valores bajos como en la hemoglobinuria paroxística nocturna o la hipofosfatemia hereditaria con fosfatasa alcalina negativa no habrá duda de que hay --- otros factores además de la edad de la célula que afectan a la síntesis o activación de la enzima. Los estímulos externos que conducen a la leucocitosis inflamatoria también activan la enzima, mientras que los defectos celulares internos de las clonas de la leucemia granulocítica que conducen a un desequilibrio en la producción y liberación de granulocitos también puede conducir a una producción o activación defec--tuosa de la fosfatasa alcalina leucocitaria. Hayhoe ha apoyado esta última hipótesis al comparar la actividad de la fosfatasa alcalina leucocitaria y a la capacidad fagocítica de los neutrófilos de pacientes con leucemia granulocítica crónica y encontró que las células con más enzima demostrable - son fagocitos más activos que aquellas células con la fosfatasa alcalina negativa, por lo que consideraron que la baja

actividad enzimática y la defectuosa actividad fagocítica - son manifestaciones de inmadurez citoplásmica en los neutrófilos segmentados de la leucémia granulocítica crónica. Mientras que la fosfatasa ácida es el principal constituyente de los gránulos neutrófilos primarios, la fosfatasa alcalina no se presenta en estos gránulos o es negativa como lo demuestra el examen ultraestructural de los leucocitos humanos.(8)

Chikkappa en 1973, encontró que los leucocitos de leucémias granulocíticas crónicas cultivados en cámaras de difusión presentaban capacidad de madurar a neutrófilos y si simultaneamente expresar actividad de fosfatasa alcalina leucocitaria.

También podemos decir que en la fase crónica de la leucémia granulocítica crónica se presentan niveles de fosfatasa alcalina leucocitaria bajos, lo cual se debe en parte a una insensibilidad intrínseca de los neutrófilos a factores que estimulan la enzima y en parte a una maduración defectuosa de las células circulantes.

Sobre el papel del Bazo en la fase crónica de la enfermedad se ha sugerido que los neutrófilos recién formados provienen de la médula ósea con una reacción de fosfatasa al

calina intensamente positiva, son atrapados en el bazo y retenidos ahí, hasta que su actividad desaparece y después son liberados a la sangre periférica. La esplenectomía produjo en 8 pacientes, leucocitosis neutrofilica e incremento en -- los niveles de fosfatasa alcalina leucocitaria.

También puede haber incremento en la actividad de esta enzima en la metamorfosis terminal en la crisis blástica de la leucemia granulocítica crónica. Hayhoe sugiere que este incremento se deba a que los neutrófilos maduros se originan en el bazo, ya que durante la crisis blástica la mayoría de los leucocitos circulantes se producen en este último órgano. (8)

#### Fosfatasa ácida

En los primeros intentos hechos sobre la demostración de fosfatasa ácida se observó que la distribución de esta en las células hemáticas era predominantemente nuclear, esto -- probablemente pudo deberse a un artefacto, ya que más tarde se observó que las células hemáticas nucleadas contenían gránulos positivos en su citoplasma. La positividad más intensa se presentó en los granulocitos y muy poco en los linfocitos, de tal manera que los eosinófilos, monocitos y plaquetas dieron una reacción intensamente positiva.

Sin embargo, en células de la médula ósea las reacciones más intensas fueron encontradas en las células reticulares, células plasmáticas, megacariocitos, plaquetas y células cebadas, mientras que los precursores de los granulocitos son más -- fuertemente positivos que los neutrófilos maduros. Esta última observación va de acuerdo con la demostración ultraestructural utilizada por Gomori, que permitió concluir que la -- fosfatasa ácida se localiza principalmente en los gránulos -- primarios de neutrófilos, pero está ausente en los gránulos secundarios, de tal forma que los promielocitos contienen só lo gránulos fosfatasa ácida positivos mientras que en los últimos estadios de los granulocitos su positividad es menor, esto se debe a que los gránulos azurófilos primarios se dividen durante la mitosis entre las células hijas, desarrollando al mismo tiempo numerosos gránulos secundarios negativos a la fosfatasa ácida.

La fosfatasa ácida se localiza alrededor de los lisosomas y no cabe duda que los gránulos primarios representan lisosomas primarios.

La fosfatasa ácida también se encuentra en los gránulos basófilos de algunas especies, en las cisternas de aparato de Golgi. (8)

Tanto los granulocitos como los monocitos por medio de métodos citoquímicos muestran positividad a esta enzima con un patrón difuso. (1)

Por otra parte, se sabe que las leucémias linfocíticas crónicas muestran disminución en la actividad de esta enzima, así como también las células de Linfoma no-Hodgkin, -- aunque contrariamente, se ha observado un incremento en la actividad en los linfocitos transformados por estimulación con la fitohemaglutinina.

En las células de 10 casos de leucemia de células peludas estudiadas por Li en 1970, se demostró una intensa positividad de fosfatasa ácida en los neutrófilos de leucemia granulocítica crónica, Policitemia Vera y en las infecciones.

En años recientes se ha identificado hasta 7 isoenzimas de fosfatasa ácida por medio de electroforesis, de las cuales las isoenzimas encontradas en células mieloides difieren de aquellas encontradas en células linfoides.

Li sugiere que las isoenzimas de la fosfatasa ácida se localizan en diferentes organelos celulares.

Mientras que en los granulocitos las isoenzimas 1, 2 y 4 se encuentran en los gránulos primarios, en los linfocitos ninguna de estas está presente, las isoenzimas 3 y 5 se encuentran en otros tipos de lisosomas, muy diferentes en estructura a los granulocitos y los monocitos. (4)

Los cambios que se presentan durante la maduración - de los monocitos a macrófagos incluyen un aumento en cuanto al tamaño y la complejidad del aparato de Golgi y un incremento en el número de lisosomas paralelamente con la actividad de fosfatasa ácida, lo que concuerda con lo que se observa en las células blásticas de leucemia monoblástica aguda. Posiblemente la enzima está constituida por isoenzimas 1 y 4 tal como en los monocitos normales. Por otra parte se ha visto que un estímulo en la producción de la fosfatasa ácida incluye una activación inmunológica y mitogénica, de tal forma que los linfocitos circulantes ya sean T ó B presentan sólo cantidades moderadas de fosfatasa ácida citoquímicamente demostrable, pero a medida que las células B son activadas por vía inmunológica hacia células plasmáticas se presenta un aumento en el contenido de fosfatasa ácida, muy similar al que se presenta durante la estimulación de las células T con la fitohemaglutinina. Las células de Reed-Sternberg de la enfermedad de Hodgkin, probablemente de origen B, generalmente

presentan positividad granular dispersa.

El método que desbribiremos en el capítulo siguiente para la demostración de fosfatasa ácida leucocitaria es el - descrito por Davey y Nelson; cuyo fundamento de la prueba es la demostración de fosfatasa ácida tartrato-resistente en células leucémicas y puede ser usada como un marcador enzimático en la confirmación del diagnóstico de la leucémia de células peludas. La fosfatasa ácida también puede ser usada en la identificación de subgrupos de células T de leucémias linfoblásticas agudas, particularmente cuando no se cuenta con otros métodos de identificación de células T.

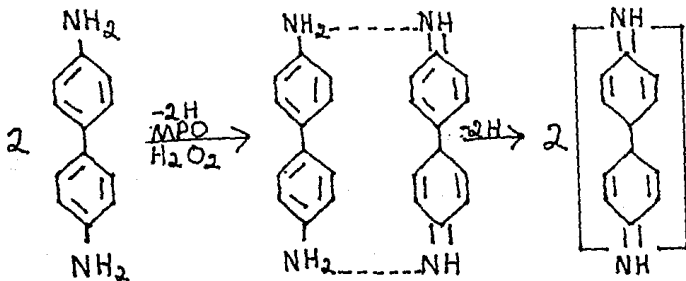
El principio de la prueba: se basa en que la fosfatasa ácida en células hematopoyéticas puede hidrolizar una variedad de anilidas hidroxinaftólicas, produciendo naftoles - insolubles acoplado a la eficiencia de sales de diazonio a - pH ácido, los productos resultantes forman un precipitado colorido y da una buena localización enzimática microscópica. El ácido L(+)-Tartárico inhibe las isoenzimas 1 a 4 de la -- fosfatasa ácida, pero la isoenzima 5 es resistente. (20)

La reacción es la misma que para fostatasa alcalina -  
página 47 reacc. 2,4,0.5 sólo que a pH 5.4.

Peroxidasa leucocitaria ( Mieloperoxidasa ).

La reacción de peroxidasa es positiva en células de la serie neutrofílica y eosinofílica, y débilmente positiva en monocitos y puede ser usada para diferenciar células de estos tipos de las células linfoides o eritroides, las cuales son peroxidasa negativas.

En el capítulo siguiente se describirá el método -- descrito por Williams J.W. y cuyo fundamento es el que sigue: la peroxidasa leucocitaria transforma el hidrógeno de la benidina u otros sustratos en peróxido de hidrógeno, dando lugar a un derivado de color azul o marrón, pudiéndose observar esta coloración en el lugar de la actividad enzimática.  
Reacción 2.4.0.6 ( 20,14)





Esterasas leucocitarias.

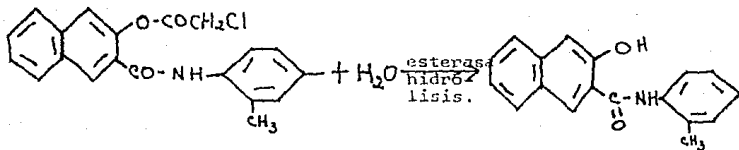
Las reacciones citoquímicas para la determinación de esterasas utilizando diferentes sustratos ayudan a distinguir entre células de la serie monocítica de células de la serie -- granulocítica. La reacción para las esterasas no específicas utilizando como sustratos alfa-naftil-acetato o alfa-naftil-butirato, es fuertemente positiva en los monocitos y débilmente positiva o negativa en los neutrófilos. La reacción utilizando AS-D-cloroacetato como sustrato es positiva en los neutrófilos y sus precursores y débilmente positiva o negativa en los monocitos y sus precursores.

El fundamento del método que se describe en el capítulo III para la identificación de esterasas leucocitarias - en general es el siguiente: las esterasas leucocitarias hidrolizan sustratos sintéticos monoésteres derivados de naftol como son: naftol AS-D-cloroacetato, alfa-naftil-acetato y alfa-naftil-butirato. Un compuesto naftol o naftil es liberado y rápidamente se une a una sal de diazonio presente en la -- mezcla de reacción, resultando un precipitado colorido en o cerca del sitio de la actividad enzimática. Reacc. 2.4.0.7(11.20)

La cloroacetato esterasa actúa a un pH óptimo entre 7.0 a 7.6 y no se inhibe con fluoruros; mientras que las esterasas no específicas reaccionan mejor a pH entre 6.0 a

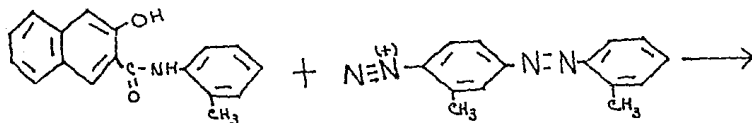
6.3 y son inhibidas por fluoruros.

Reacción 2.4.0.7



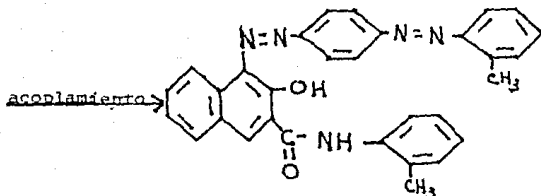
NAFTOL-AS-D-CLOROACETATO

NAFTOL-AS-D



NAFTOL-AS-D

SAL DE DIAZONIO



COMPLEJO COLORIDO ROJO.



## C A P I T U L O III,

### M E T O D O S .

#### Tinción de PAS (Acido peryódico de Schiff).

Frederick R. Davey;  
Douglas A Nelson.

#### Reactivos:

- 1.-Formalina alcohólica al 36%
- 2.-Amilasa. Saliva humana clarificada por centrifugación.
- 3.-Acido peryódico 0.69g/100 ml. agua/0.3 ml. HNO<sub>3</sub> conc.
- 4.-Reactivo de Schiff.
- 5.-Metasulfito de sodio 0.5% acuoso.
- 6.-Hematoxilina de Harris.

#### Técnica:

- 1.- Los frotis de sangre periférica o de médula ósea se secan al aire y después se fijan con formalina alcohólica durante 5 minutos.
- 2.- Los frotis se lavan al chorro de agua durante 15 min.
- 3.-Después del paso anterior, los frotis se cubren con salina durante 30 minutos a temperatura ambiente y después se lavan con agua corriente durante 10 minutos.
- 4.- Los frotis son tratados con ácido peryódico a temperatu-

ra ambiente durante 10' y después se lavan con agua durante 5 min. Los frotis previamente teñidos con Giemsa o Wright -- pueden ser teñidos con PAS empezando en este paso.

5.- Los frotis son sumergidos dentro del reactivo de Schiff durante 10', después se pasan a través de tres baños sucesivos de metasulfito de sodio, después de esto se lavan con agua durante 5'.

6.- Los núcleos se tiñen sumergiendo los frotis dentro de la solución de Hematoxilina de Harris durante 10'.

7.- Los frotis se lavan con agua durante 5'.

8.- Se secan al aire y se examinan microscópicamente. ( 20 )

#### Interpretación:

Estructuras y compuestos PAS (+)	: rosa
Núcleos	: morados
Citoplasma	: amarillo

En la sangre periférica, el citoplasma de los leucocitos polimorfonucleares se tiñe de un color rosa intenso o rojo con una apariencia granular en algunas células. El citoplasma de los monocitos aparece débilmente rosa y puede -- contener granulaciones finas o gruesas. Un pequeño número de linfocitos contiene escasas granulaciones pequeñas de color rojo o rosa. Los eritrocitos no se tiñen. Las plaquetas se -- tiñen intensamente. En la médula ósea normal, los precursores

tempranos de los granulocitos no se tiñen, pero aparece una tinción granular difusa que se va incrementando de acuerdo a los estadios de maduración de la serie mielóide. Los megacariocitos pueden aparecer difusa o intensamente teñidos de un color rosa o rojo. Los precursores de los eritrocitos no se tiñen. La digestión con amilasa, remueve el material tinte del citoplasma de todos los tipos de células sanguíneas. (20)

Tinción de Sudán Negro E.

Douglas A. Nelson;  
Frederick R. Davey.

Reactivos:

- 1.-Formalina al 37% en solución acuosa.
- 2.-Solución amortiguadora. 16g de fenol/30 ml alcohol absoluto/0.3g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ /100 ml. agua destilada.
- 3.-Solución colorante de trabajo. 60 ml. de sol. madre de Sudán Negro B/40 ml. sol. amortiguadora.
- 4.-Solución madre de colorante.0.3g de Sudán Negro B/100 ml. EtOH.
- 5.-Hematoxilina de Harris.

Técnica:

- 1.- Los frotis de sangre periférica o de médula ósea se dejan secar al -

aire y se fijan con vapores de formalina durante 10'. Se pueden teñir frotis recientes o viejos; los frotis que tienen muchos años se tiñen satisfactoriamente.

2.- Los frotis fijados se sumergen en la solución de colorante de Sudán Negro B en un recipiente de Coplin durante 30 a 60 minutos.

3.- Se lava con etanol al 70% 2 ó 3 minutos para eliminar el exceso de colorante.

4.- Lavar con agua.

5.- Se hace la coloración de contraste con hematoxilina 10'.

6.- Se lava con agua durante 5'.

7.- Se seca al aire y se observa microscópicamente.

#### Interpretación:

Los gránulos de los granulocitos: café o negros.

Los núcleos; azul o morados.

Citoplasma: incoloro. ( 7 )

Los linfocitos y los eritroblastos no se tiñen con e-Sudán Negro B. Los precursores de los granulocitos normales a partir de las células blásticas aumentan progresivamente - su sudanofilia, correspondiendo estrechamente con la presencia de los gránulos. Los promielocitos pocos gránulos sudanófilos, mientras que los polimorfonucleares neutrófilos maduros contienen gran número de gránulos sudanófilos. Los eosí-

nófilos también son intensamente sudanófilos; los monocitos no se tiñen o contienen pocos gránulos sudanófilos.

En general la tinción de Sudán Negro B es similar a la de la peroxidasa, sirve para distinguir entre leucemia -- linfoblástica aguda de la leucemia mieloblástica. Ambas tinciones son útiles cuando la tinción de Romanowsky no revela gránulos y por lo tanto, es más sensible para la detección de las células tempranas de los granulocitos. (20)

#### Fosfatasa alcalina leucocitaria.

Ernest beutler.

#### Reactivos:

- 1.-Solución fijadora: 100 ml. de formaldehído al 3% + 900 ml de agua destilada.
- 2.-Solución Stock de 2-amino-2-metil-1,3-propanediol 2.1% ac.
- 3.-Solución amortiguadora: 250 ml. de solución stock de propanediol + 50 ml. de HCl 0.1 M aforar a 1000 ml.
- 4.-Mezcla colorante: 5 mg de naftol-AS-BI-fostato + 0.3 ml de dimetil formamida + 60 ml. de solución amortiguadora + 40 mg de sal rojo violeta LB.
- 5.- Tinción de contraste: Hematoxilina 0.1% acuosa + 200 mg de yodato sódico + 50 mg de sulfato aluminico potásico.



Técnica:

- 1.- Fijación de los frotis.-Las preparaciones se deben fijar antes de 24 horas, se sumergen durante 30 segundos en la solución fijadora a temperatura ambiente.
- 2.- Lavarlos suavemente con agua y secarlos al aire.
- 3.- Teñir los frotis durante 10 minutos exactamente a temperatura ambiente con la mezcla de colorante-sustrato. Es preferible teñir los frotis inmediatamente; sin embargo las --- muestras fijadas se pueden mantener en el congelador durante 2 ó tres semanas con pérdida de su actividad sólo en un 10%.
- 4.- Lavarlos con agua durante 30 a 60 segundos.
- 5.- Se tiñen con solución de colorante de contraste durante 5 a 8 minutos.
- 6.- Lavarlos con agua durante 1 ó 2 minutos.
- 7.- Dejarlos secar al aire y observarlos microscópicamente.

Interpretación:

Cálculo de resultados: se clasifican 100 leucocitos neutrófilos de 0 a 4+ según la intensidad del precipitado en su citoplasma. Los criterios para la clasificación se resumen en la tabla 3.1. Es sumamente importante clasificar sólo los neutrófilos maduros; los linfocitos, los basófilos y los eosinófilos no se deben incluir.

Tabla 3.1

Criterios para la clasificación de los neutrófilos teñidos según la actividad de la fosfatasa alcalina.

Clasificación de las células *	Cantidad % **	Coloración del precipitado		Coloración del citoplasma
		Tamaño de los gránulos	Intensidad de la coloración	
1+	menor de 50	Pequeño	Débil o moderada	Incoloro a rosa muy pálido.
2+	50-80	Pequeño a mediano.	Moderada a fuerte.	Incoloro a rosa pálido.
3+	80-100	Mediano a grande.	Fuerte	Incoloro a rosa
4+	100	Mediano y grande	Brillante	No visible

\* Cuando no hay precipitado colorante en el citoplasma no se tiñe con coloración de fondo de las células se leen como "cero".

\*\*Porcentaje del citoplasma ocupado por el precipitado.

Tomado de HEMATOLOGY ; Williams, J.W. (20 )

Los adultos sanos generalmente tienen un índice de fosfatasa alcalina leucocitaria que oscila entre 13 y 130 -- puntuaciones aunque los rangos normales deben ser determinados por cada laboratorio dependiendo del colorante y el lote del colorante usado, la forma de obtener el índice de fosfatasa alcalina leucocitaria se describe en la página 50.

Los pacientes con leucemia granulocítica crónica no tratada presentan un índice inferior a 13 puntuaciones (entre 0 a 13).

Los pacientes con policitemia Vera o leucocitosis por infección, o con metaplasia mieloide presentan un índice en el límite superior de la normalidad o francamente elevado.

Los pacientes con hemoglobinuria paroxística nocturna, presentan constantemente un índice de fosfatasa alcalina leucocitaria disminuido. (20)

Fosfatasa ácida leucocitaria.

Frederick R. Davey;  
Douglas A. Nelson

Reactivos:

1.- Solución fijadora. 10 ml. de metanol + 90 ml. (mezclade

60 ml de acetona + 40 ml de ác. cítrico ajustando el pH 5.4 con Na OH 1 N.)

2.- Solución stock sustrato. 10 mg de ácido naftol-AS-D-fosfórico in 0.5 ml de N,N-dimetil formamida aforar a 100 ml --- con solución amortiguadora de acetato 0.1M a pH 5.0.

3.- Solución colorante-sustrato. 10 ml. de solución stock de sustrato + 5 mg de colorante rojo rápido GBC.

4.-Solución comercial de Hemalum de Mayer.

5.-Solución de ácido tartárico. 75 mg de ác. L(+)-tartárico en 10 ml. de solución amortiguadora de acetatos 0.1M a pH 5.0 conteniendo 1 mg de ác. naftol AS-D-naftol-fosfórico.

#### Técnica:

1.- Coloque los frotis frescos en la solución fijadora durante 30 segundos de 4 a 10°C.

2.- Lavar los frotis fijados tres veces con agua destilada.

3.- Secar los frotis a temperatura ambiente durante 10 a 30'

4.- Incubar los frotis en la solución de colorante-sustrato y ácido tartárico a 37°C durante 45 min.

5.- Lavar con agua de la llave.

6.- Teñir con el colorante de contraste Hemalum de Mayer de 1 a 3 min.

7.- Montar en glicerina gelificada.

#### Interpretación:

La actividad de la fosfatasa ácida está indicada por medio de un precipitado granular rojo y se puede observar en la mayoría de las células hematopoyéticas. Una coloración moderada se observa en células plasmáticas, megacariocitos y monocitos. Reacciones débiles se observan en neutrófilos, bandas, metamielocitos, mielocitos y promielocitos. Muy poca actividad está presente en linfocitos y eritrocitos normales.

Un incremento de la fosfatasa ácida leucocitaria se observa en las células mononucleares anormales de pacientes con leucemia de células peludas, linfocitos de pacientes con macroglobulinemias, linfocitos transformados de mononucleosis infecciosa, linfoblastos de pacientes con leucemias linfoblásticas de células T y secciones de tejido infiltrado por enfermedad de Hodgkin.

El descenso de la fosfatasa ácida se presenta en células neoplásicas de leucemia linfocítica crónica, linfosarcoma y linfomas linfocíticos no Hodgkin. (20)

Peroxidasa leucocitaria (Mieloperoxidasa)

William J. Williams.

Reactivos:

1.- Solución fijadora. 10 ml. de formalina al 40% + 90 ml de alcohol absoluto.

2.- Colorante-sustrato:

Etanol al 30% (v/v) en agua	100 ml.
Dicloruro de bencidina	0.3g
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O, 0.132 M ( 3.8% p/v )	1 ml
Acetato sódico trihidratado	1 g
Peróxido de hidrógeno 3%	0.7 ml.
NaOH 1N	1.5 ml.
Safranina O	0.2 g

Técnica:

1.- Se deben de emplear extensiones frescas se sangre o de médula ósea. Como la actividad de la peroxidasa leucocitaria es inestable a la luz las preparaciones conservadas en la oscuridad hasta tres semanas también se pueden utilizar.

2.- Las extensiones se fijan por inmersión durante 60 segundos en la solución fijadora a temperatura ambiente.

3.- Las extensiones se lavan de 15 a 30 segundos en agua, se escurren y el exceso de agua se sacude. Entonces se sumergen en la solución colorante-sustrato durante 30 segundos a temperatura ambiente.

4.- Los frotis se vuelven a lavar durante unos pocos segundos en agua, y se dejan secar y se examinan microscópicamente.

**Interpretación:**

Todos los núcleos aparecen teñidos en rojo por la safranina al igual que el citoplasma de los eritrocitos. En la serie neutrofílica la actividad de la peroxidasa se indica - por gránulos azules en las células. La actividad de la peroxidasa existe en las células de la serie neutrofílica en todos los estadios del desarrollo, incluyendo las células blás ticas. Generalmente la peroxidasa se localiza en los gránulos citoplásmicos, pero puede ser fuertemente positiva en los ci toplosmas de células totalmente indiferenciadas. Los bastones de Auer también son peroxidasa-positivos. Los eosinófilos muestran intensa coloración peroxidásica de un color marrón-negro o verdi-negro. Los basófilos no se tiñen.

Los monocitos no se tiñen tan intensamente como los granulocitos y muestran discretos gránulos azules o coloración citoplásmica difusa y tenue.

Los linfocitos y los eritrocitos no presentan activi dad peroxidásica en ningún momento de su desarrollo.

La reacción de la peroxidasa puede ser negativa en algunos neutrófilos maduros de la leucemia aguda u en los -- neutrófilos que aparecen en respuesta a una infección grave y se caracterizan por grandes gránulos basófilos( es decir, granulaciones tóxicas).(20).

Esterasas leucocitarias.

Douglas A. Nelson; Frederick P. Davey.

Reactivos y técnica de incubación para ambas esterazas:

- 1.- Solución fijadora. Mezcla formalina-acetona amortiguada con fosfatos pH 6.6.
- 2.- Los frotis de sangre periférica o de médula ósea pueden ser recientes o preparaciones conservadas en la obscuridad a temperatura ambiente aunque no estén fijadas.
- 3.- Coloque los frotis dentro de una solución fijadora durante 30 segundos de 4 a 10°C.
- 4.- Lavar los frotis tres veces con agua destilada y después dejarlos secar al aire a temperatura ambiente durante 10 a 30 minutos.

Cloroacetato-esterasa.

Reactivos:



1.- Mezcla de incubación:

- a) Solución amortiguadora de fosfatos pH 7.6
- b) Nueva fuchsina hexazoadada al 4% en HCl 2N.
- c) Naftol-AS-D-cloroacetato 5mg en 2.5 ml de N,N-dimetil formamida.
- d) Mezcla final de incubación con un pH de 7.4.

2.- Hematoxilina de Harris como colorante de contraste.

3.- Solución lavadora de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (28%) 0.2 ml. aforar a 100 ml con agua.

Técnica;

1.- Sumerja los frotis fijados dentro de la mezcla de incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente.

2.- Lavarlos con agua de la llave.

3.- Teñirlos con colorante de contraste durante 10 minutos.

4.- Lavarlos con solución lavadora hasta que el color de los frotis cambie de rojo a azul.

5.- Lavarlos suavemente con agua, secarlos al aire y observarlos microscópicamente.

Esterasa no-específica: alfa-naftil-acetato.

Reactivos:

1.- Mezcla de incubación:

- a) Solución amortiguadora de fosfatos pH 7,6
- b) Pararosanilina hexasoda 1 g + 20 ml. de agua destilada + 5ml. de HCl conc.
- c) alfa-Naftil-acetato 50 mg en 2.5 de éter monometil etilén glicol.

2.- Hematoxilina de Harris como colorante de contraste.

3.- Solución lavadora de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (28%) 0.2 ml. aforar a 100 ml con agua destilada.

Técnica:

1.- Sumergir los frotis fijados dentro de la mezcla de incubación durante 45 min. a temperatura ambiente.

2.- Lavar con agua.

3.- Teñir con colorante de contraste durante 10 min.

4.- Lavar los frotis con solución lavadora hasta que el color de los frotis cambie de rojo a azul.

5.- Lavar con agua, secar al aire y montar sobre resina o bálsamo de Canada.

Esterasa no-específica alfa-naftil-butilato.

Reactivos:

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

1.-Mezcla de incubación;

- a) Solución amortiguadora de fosfatos pH 6.3.
- b) Parrarosa anilina hexazoada concentración igual a la utilizada en la técnica anterior.
- c) Solución de alfa-naftil-butirato 50 mg en 2.5 de éter monometil etilen-glicol.

Se utilizan los reactivos 2 y 3 de las técnicas anteriores.

Técnica:

- 1.-Sumergir los frotis fijados dentro de la mezcla de incubación durante 45 min. a temperatura ambiente.
- 2.- Lavar con agua.
- 3.- Teñir con colorante de contraste durante 10 min.
- 4.- Lavar los frotis con solución lavadora hasta que aparezca el color azul.
- 5.- Lavar con agua, secar al aire y montar sobre recina o bálsamo de Canada.

Interpretación:

Los estudios citoquímicos de los dos grupos de esterazas son indispensable en el diagnóstico diferencial entre la leucemia mieloblástica y la leucemia mielomonoblástica.

El producto de la reacción de la cloroacetato-estera

sa es de color rojo, mientras que para ambas esterases no-específicas es anaranjado-café.

La interpretación de las reacciones citoquímicas en las células de sangre normal y blastos en leucémias agudas se encuentran detalladamente descritas en la tabla que se encuentra en la página 64 del capítulo anterior.(20)

## C A P I T U L O   I V

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

El presente trabajo describe los métodos citoquímicos que actualmente con más frecuencia se usan en el laboratorio hematológico, así como su interpretación para establecer un diagnóstico verdadero en los diferentes tipos de leucemias -- agudas, eliminando la dificultad subjetiva de diagnóstico.

Existen varios métodos diferentes a los métodos citoquímicos tales como los ultraestructurales, autorradiográficos e inmunoquímicos; describirlos en este trabajo esta fuera de los objetivos que desde el principio de este se establecieron.

La tinción de PAS es de gran ayuda en el diagnóstico -- de algunos casos de eritroleucemia y leucemia linfoblástica.

La tinción de Sudán Negro B se usa para diferenciar -- la leucemia mieloblástica y la leucemia mielomonoblástica de -- la leucemia linfoblástica morfológicamente no diferenciadas.

La demostración de la actividad de la fosfatasa alca-

lina leucocitaria, es de gran ayuda en el diagnóstico de la - leucemia granulocítica crónica de las reacciones leucemoides, policitemia vera y metaplasia mioelode agnógena.

La demostración de la actividad de la fosfatasa ácida tartrato resistente, puede ser usada para el diagnóstico confirmativo de la leucemia de las células peludas.

La demostración de la actividad de la peroxidasa leucocitaria es utilizada para diferenciar las leucemias mieloblástica y la leucemia mielomonoblástica de la leucemia linfoblástica, principalmente cuando aparecen células blásticas morfológicamente no diferenciadas.

La demostración de la actividad de las estererasas leucocitarias utilizando diferentes sustratos, sirve para diferenciar células de la serie granulocítica de las de la serie monocítica y sus precursores tempranos que se encuentran en las leucemias mieloblásticas y mielomonoblásticas.

Las tinciones citoquímicas descritas en el presente trabajo muestran que la utilización combinada de cada una de estas técnicas, tales como la reacción de PAS, Sudán Negro B,

así como la demostración de la actividad de las enzimas leucocitarias, conducirán al diagnóstico adecuado, proporcionando la información necesaria en la mayoría de los casos.

## C A P I T U L O V

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

- 1.- BAITON, D.F.; Ulliot, J.L.- The development of Neutrophilic Polymorphonuclear Leukocytes in human bone marrow.- J. Exp. Med. .- 1971.- 134, 907.
- 2.- CISCAR, F.R.; Zacresas, P. .- Diagnóstico hematológico.- Editorial Gims.- Barcelona, España .- 1975.
- 3.- CLARK, J. .- Staining Procedures Used by the Biological Stain Comission.- 3rd. editon.- Edit. Williams & Willkins .- 1975.
- 4.- GAM, L.T. .- Tartrate resistant acid Phosphatase isoenzyme in Reticulum cells.- New Eng. J. Med. .- 1971. .- 9, 241.
- 5.- GLICK, A.D. ; Paniker, K. .- Acute Leukemia of Adults ( - Ultrastructural, Cytochemical and Histologic Observations in 100 cases).-Am. Sci. Cl. Path. .- june 1979 .- 459-478.
- 6.- GOTTFRIED. E.L. .- Lipid Paterns of Leukocytes en health and disease .- Seminars of Haemat. .- 1972.- 9.241.
- 7.- HAYHOE, F.G.; Flemans, R.J.- Atlas de Citología Hematológica.-



Primera edición .- Edit. Científico-Médica.-Barcelona, España.- 1976.- 6, 110.

- 8.- HAYHOE, F.G.; Quagline, D. .- Haematological Cytochemistry .- Edit. Churchill Livingstone.- Edimburg.- 1980.
- 9.- LEESON, C.R. ; Leeson T.S. .- Histología .- Novena edición .- Edit. Interamericana .- México D.F. .- 1981.
- 10.- LEHNINGER, A.L. .- Bioquímica.-Segunda edición.- Edit Omega S.A. .- Barcelona, España .- 1980.
- 11.- MOLONEY, W.C. ; Phederson K. .- Esterase Activity in Leucocytes demonstrated by the use of naphtol AS-D chloroacetate substrate.- J. Histochem. and Cytochem. .- 1960.- Vol. 8.- 200.
- 12.- MORRISON, L.T. ; Boyd, R.N.- Organic Chemistry.- 2nd. -- edition.- Edit. Allyn & Bacon Inc.-USA.- 1970.
- 13.- OCEGUERA, C.G. .- Algunos Aspectos Citoquímicos de Importancia Hematológica .- Tesis.- ENBC-IPN.- México D.F. .- 1987.
- 14.- PEARSE, F.A. .- Histochemistry, Theoretical and Applied- 4 th. edition.- Ed. Churchill Livingstone.- London and New York.- 1972.- Vol. I, II.
- 15.- SHAW, M.T. .- The Cytochemistry of Acute Leukemia: A diagnostic and Pronostic Evaluation.- Seminar in Oncology .- Vol III No. 3.- 1976 .- 219-224.

- 16.- SPANHOF, L. - Histoquímica práctica.- Primera edición.- Editorial Acribia.- España .- 1976.
- 17.- TIETZ, N.W. - Química Clínica Moderna .- Primera edición .- Editorial Interamericana S.A. .- México.- 1972.
- 18.- VALENTINE, W.N. ; Follete J.H. - The Glycogen content of Human Leukocytes in Health and in Various Diseases states .- J. Clin. Invest. .-1953.- 32, 251.
- 19.- WEGMANN, R. - Histochemistry and Cytochemistry.- Proceedings of the first International Congress.- The Mac Millan Co. New York .- 1963.- 354.
- 20.- WILLIAMS, J.W.; Beutler, B. - Hematology .- #rd. edition.- Edit Mc Graw Hill .- USA .- 1983.
- 21.- WILTSHAN, E. ; Moloney, W.C. - Histicchemical and Biochemical studies in Leukocyte phosphatase alkaline activity .- Blood .- 10, 1120 .- 1965.
- 22.- WINTROBE, M.M. - Clinical Hematology .- 8 th edition .- Ed. Lea & Febiger .- USA .- 1981.