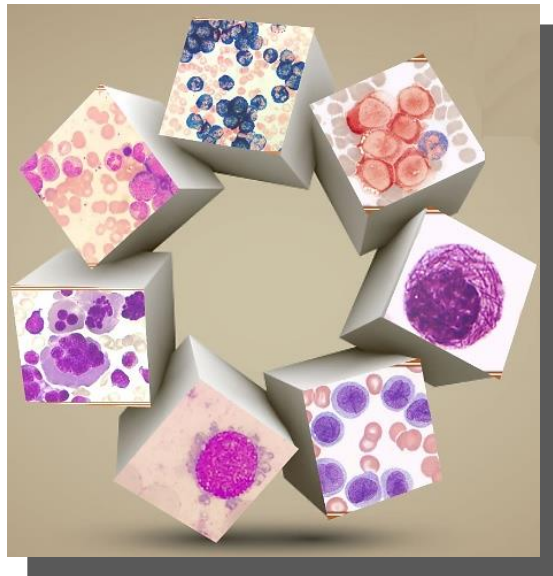




CENTRO ESTATAL DE CANCEROLOGÍA “DR. MIGUEL DORANTES MESA”

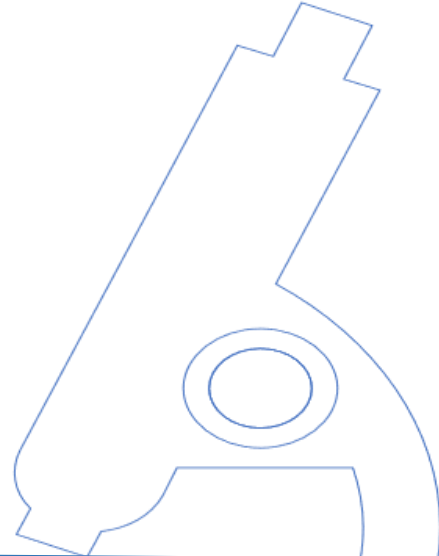
MANUAL DE TINCIONES CITOQUÍMICAS ESPECIALES

EN HEMATOLOGÍA



XALAPA, VERACRUZ, AGOSTO 2019.

MANUAL DE TINCIONES CITOQUÍMICAS ESPECIALES
EN HEMATOLOGÍA



“Lo más importante en la hematología es la morfología celular ya que de ella dependerá la orientación diagnóstica y los estudios de extensión que se deben realizar para definir una línea celular o una patología en particular.”

“Hacer una tinción es hacer Arte.”

M. en H. Enrique de Jesús González Cruz

AUTORES

M. en H. Enrique de Jesús González Cruz ¹

Q.F.B. Alicia Díaz Contreras²

Q.C. Diego Hazel Gómez Aburto ³

Q.C. Fabiola Elizabeth Rivera Rosado ³

Q.C. Miguel Ángel de la Cruz Nicolás ³

1. Responsable del Departamento de Hematología Diagnóstica y Jefatura del Laboratorio Clínico del Centro Estatal de Cancerología “Dr. Miguel Dorantes Mesa”. Calle Aguascalientes No. 100, Col. Aguacatal, Xalapa, Veracruz México. Tel: 012288433596-99, ext. 5170. Catedrático de la Facultad de Bioanálisis de la Universidad Veracruzana; Xalapa, Veracruz, México.

2. Responsable de Tinciones en el Área de hematología, Laboratorio Clínico del Centro Estatal de Cancerología “Dr. Miguel Dorantes Mesa”.

3. Egresados de la Licenciatura en Química Clínica de la Universidad Veracruzana; Xalapa, Veracruz, México.

ACERCA DE ESTE MANUAL

El presente manual pretende ser una guía clara y específica para orientar a todos los profesionales involucrados en procedimientos especializados en el área de hematología diagnóstica. Se expone un método para cada determinación el cual se detalla de manera sistemática y ordenada para que pueda seguirse paso a paso. Es importante señalar que este manual está sujeto a actualizaciones en la medida que se presenten variaciones en la ejecución de los procedimientos, normatividades establecidas y avances científicos, solo con el fin de cuidar que su operatividad sea vigente.

Para una mejor comprensión es necesario que se conozcan algunos conceptos básicos referentes a las tinciones y otros conceptos de hematología en general, por lo que, al inicio se incluye una sección de generalidades.

Cada tinción contiene una breve descripción teórica, el procedimiento a emplear y un apartado de interpretación. Se presentan también una serie de microfotografías de extendidos sanguíneos y de médula ósea de autoría propia, salvo aquellas imágenes que se encuentren referenciadas.

Al final del texto podrás encontrar un glosario muy completo que te servirá de consulta en caso de que se presente cualquier duda.

El desarrollo de esta manual se justifica en el diseño de un instrumento de aprendizaje estandarizado, que sirva como una forma de estímulo para todas aquellas personas que lo consulten y tengan la oportunidad de llevarlo a la práctica y sientan la necesidad de actualizarse continuamente en el campo de la hematología diagnóstica.

ÍNDICE

• INTRODUCCIÓN	7
• GENERALIDADES	8
○ Colorantes	8
▪ Ácidos	
▪ Básicos	
▪ Neutros	
▪ Indiferentes o hidrofóbicos	
○ Tinción.....	9
▪ Clasificación	
• Simples	
• Diferenciales	
• Específicas	
▪ Tinciones de Romanowsky	9
▪ Metacromasia.....	10
○ Microscopia	10
▪ Microscopio óptico de campo claro.....	11
• Componentes	
○ Mecánicos	11
○ Ópticos	12
○ Iluminación	16
○ El extendido sanguíneo.....	17
○ Médula ósea.....	19
○ Citoquímica en hematología.....	22
• TINCIÓN DE WRIGHT	24
○ Fundamento	
○ Interpretación	
• TINCIÓN AZUL DE CRESIL BRILLANTE	49
○ Fundamento	
○ Interpretación	
• TINCIÓN DE MIELOPEROXIDASA	61
○ Fundamento	
○ Interpretación	
• TINCIÓN DE PASchiff	67
○ Fundamento	
○ Interpretación	
• TINCIÓN DE ESTERASAS	75
○ Fundamento	
○ Interpretación	
• TINCIÓN DE PERLS	85
○ Fundamento	
○ Interpretación	
• TABLA: IDENTIFICACIÓN DE TINCIONES CITOQUÍMICAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIAS MIELOIDES Y LINFOIDES	94
• GLOSARIO	95
• BIBLIOGRAFÍA	98

INTRODUCCIÓN

La hematología diagnóstica es una especialidad médica auxiliar en el diagnóstico por el laboratorio estudiando a la sangre desde una óptica diferencial anatómica, fisiológica y patológica; teniendo como apoyo métodos de diagnóstico genéticos (biología molecular), inmunológicos (marcadores) y citoquímicos (tinciones citoquímicas especiales).

La hematología diagnóstica cobra su importancia a través de los diferentes tipos de análisis en donde es posible conocer y valorar el estado de salud de un paciente con una enfermedad de origen hematológico.

Sabemos que los avances tecnológicos son un reto que nos obligan a los profesionales involucrados en el diagnóstico hematológico a prepararnos y actualizarnos en conocimientos y procedimientos que pueden tener un gran impacto en las alteraciones fisiopatológicas, en enfermedades crónicas o agudas, déficit de algún componente o neoplasias que se encuentran en un estudio de diagnóstico diferencial.

La práctica y el estudio diario en el compromiso del diagnóstico diferencial, constituye una parte indispensable en la labor diaria del profesional en los laboratorios de diagnóstico hematológico. Contar con una guía objetiva, práctica y educativa nos permite una adecuada interpretación en el desarrollo de diagnósticos diferenciales hematológicos.

Los estudios citoquímicos ya nos permiten estudiar la composición química de la célula, logrando detectar topográficamente algunos de sus componentes que se ponen de manifiesto al teñirse y poder visualizarlos a través del microscopio óptico como el glucógeno, lípidos y enzimas.

Las tinciones citoquímicas específicas son consideradas como la relación entre la morfología y la bioquímica; características únicas de los diferentes tipos de linajes celulares eritroide, mieloide y linfoide que pueden ser detectadas en muestras de extendidos sanguíneos y de médula ósea, teniendo como resultados un informe interpretativo, expresado en porcentaje de una positividad o negatividad a través de métodos de laboratorio hematológico de bajo costo y de respuesta diagnóstica a corto plazo; logrando así el fácil manejo del diagnóstico hematológico diferencial de los pacientes con patologías hematológicas.

Así como facilita la práctica, también refuerza el compromiso profesional, permitiendo asegurar resultados precisos, específicos y oportunos que garanticen el diagnóstico y tratamiento eficaz en los pacientes con este tipo de padecimientos.

COLORANTES

Los colorantes, también denominados anilinas, amino-benceno o fenilamina, son sustancias que tienen la capacidad de conferir color a otros compuestos, son solubles en agua o disolventes orgánicos y tienen grupos reactivos capaces de fijarse a los substratos mediante absorción, retención mecánica o por enlaces iónicos y covalentes.

Los colorantes son moléculas orgánicas que contienen anillos aromáticos y que absorben luz visible o ultravioleta por efecto de grupos llamados *cromóforos*, los anillos aromáticos que adquieren un grupo cromóforo son denominados *cromógenos*, a medida que aumenta la complejidad de la molécula el color se vuelve más oscuro. Existe en los colorantes un grupo denominado *auxocromo*, y es este el que les confiere la capacidad de unirse a los componentes celulares, su función es aumentar el grado de absorción de los cromóforos y desplazarlos hacia otras longitudes de onda que aumenten su intensidad.

Es posible clasificar a los colorantes en ácidos, básicos, neutros e indiferentes de acuerdo con el tipo de radical auxocromo que contengan.

- ▶ **Colorantes ácidos:** Poseen un anión (coloreado), que le da la carga negativa, constituidos por sales y una base incolora. Derivan de grupos sulfónicos, hidroxilo fenólicos, y carboxilo. Se unen a estructuras celulares básicas (con carga positiva).
- ▶ **Colorantes básicos:** Conocidos también como colorantes catiónicos, poseen un catión que les confiere la carga positiva. Este catión o base es el que aporta el color, generalmente se trata de una amina. Son afines estructuras ácidas, principalmente núcleos y carbohidratos ácidos.
- ▶ **Colorantes neutros:** Son sales constituidas por un colorante aniónico y un catiónico, ambos confieren color a los componentes celulares.
- ▶ **Colorantes indiferentes o hidrofóbicos:** Este tipo de colorante, a diferencia de los colorantes ácidos, básicos y neutros no se une a estructuras celulares por afinidad química, sino que se disuelven en los elementos que conforman la célula. Además, presentan insolubilidad al agua.

Los colorantes tienen las siguientes funciones:

1. Le permite al analista observar mejor la celularidad y sus componentes.
2. Observar estructuras que sin el colorante son transparentes.
3. Permite observar la forma y tamaño de las células o microorganismos observados.
4. Evidencia la conformación celular (estructuras tanto internas como externas).
5. Debido a la afinidad que poseen, genera reacciones químicas específicas.

TINCIÓN

Para los fines de este manual, una tinción se puede definir como un proceso mediante el cual tanto las células como el entorno que las rodea son coloreados, de esta forma se incrementa el contraste permitiendo así visualizar mejor las células al microscopio.

Las tinciones se pueden clasificar como:

- ▶ **Simples:** La muestra resulta teñida de un solo color ya que la tinción consiste en la utilización de un solo colorante.
- ▶ **Diferenciales:** Las tinciones diferenciales están basadas en el uso de dos o más colorantes, aunque también pueden utilizarse reactivos complementarios. Permiten la diferenciación entre células o estructuras de ésta.

- ▶ **Específicas:** Utilizan anticuerpos fluorescentes para identificar estructuras celulares específicas (inmunocitoquímico).

Tinciones de Romanowsky

Las tinciones de Romanowsky se fundamentan en el uso de colorantes constituidos por eosinas y derivados de tiazinas. El método de Romanowsky aplica dos principios básicos de tinción: a) la fijación de la sangre extendida sobre el portaobjetos, y b) el uso, junto a los colorantes clásicos (eosina y azul de metileno), de metiltioninas (derivados por oxidación del azul de metileno), conocidos como azules (A, B y C). Estas sustancias metacromáticas son las que producen la coloración púrpura o roja de la cromatina nuclear y de algunos gránulos citoplasmáticos que, por este motivo, son denominados azurófilos.

Una de las características que poseen los colorantes utilizados en las tinciones de Romanowsky, es su sensibilidad ante cambios de pH, de forma que existe afinidad entre estos y las estructuras celulares, aquellas de carácter básico fijan los colorantes ácidos (eosina) y las de carácter ácido fijan los colorantes básicos (azul de metileno). Esto explica que ciertas estructuras basófilas presentes en el núcleo o en el citoplasma se colorean de azul, mientras que otros componentes acidófilos, adquieran un color rosado.

Metacromasia

A diferencia de los colorantes ortocromáticos que colorean el tejido con su propio color, existen otros colorantes que al teñir estructuras celulares generan una coloración diferente a la de su color original, a este fenómeno se le conoce como metacromasia.

La metacromasia se fundamenta en las reacciones que ocurren entre el colorante con determinadas estructuras de la célula, depende tanto del colorante como de las propiedades que tienen las estructuras celulares que tiñe, ocurre porque los iones del colorante que están unidos al sustrato forman aglomeraciones diméricas o poliméricas entre las moléculas del colorante (anilinas) debido a la aproximación que estas tienen entre sí, se modifica su longitud de onda o rango de absorción lumínica y, como consecuencia, surgen variaciones de color entre las estructuras del objeto teñido, generando un color diferente al del colorante libre.

Los sustratos que se tiñen de modo metacromático se llaman *cromotrópicos*. El mecanismo básico de la metacromasia es la presencia de polianiones en el tejido. El color metacromático posee una longitud de onda mayor que el del colorante. Los colorantes metacromáticos son catiónicos y tienen afinidad por estructuras ácidas, especialmente las sulfatadas.

Los colorantes metacromáticos se encuentran entre las tiacinas, las oxacinas, las acinas y los xantenos.

Los elementos que conforman algunos tejidos y estructuras celulares poseen una alta concentración de grupos sulfato y fosfato ionizados, responsables de la metacromasia, ejemplo de esto son el retículo endoplásmico rugoso de las células plasmáticas y los gránulos de heparina de los mastocitos.

MICROSCOPIA

La microscopía consiste en la observación de lo infinitamente pequeño mediante el uso de microscopios (desde el simple o lupa hasta el microscopio electrónico) que, gracias al aumento que ofrecen, permiten la observación de células, microorganismos y sus estructuras, que no son reconocibles a simple vista.

Tipos de microscopios

- ▶ De campo claro
- ▶ De campo oscuro
- ▶ De contraste de fases
- ▶ De luz ultravioleta
- ▶ De fluorescencia
- ▶ Electrónico
- ▶ Electrónico de barrido

Microscopio óptico de campo claro

La principal característica del microscopio de campo claro es el tipo de iluminación que posee, utilizando la luz artificial como energía luminosa, constituida por una lámpara halógena, aunque recientemente se ha sustituido por la tecnología LED. En la imagen se observan áreas iluminadas, generalmente coloreadas (mediante tinciones), sobre un fondo claro o transparente.

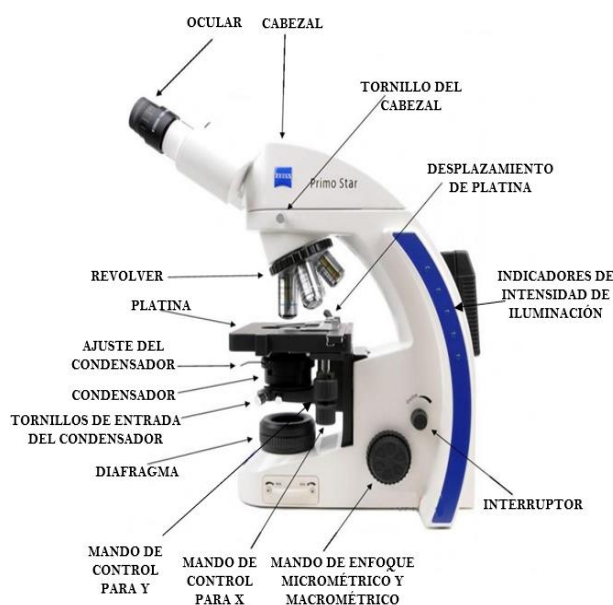


Figura 1 Principales componentes de un microscopio óptico compuesto.

Para lograr una mejor visualización de la imagen, es necesario que se lleve a cabo una tinción, obteniendo un contraste entre los componentes celulares y tisulares, mediante el uso de colorantes específicos que permitan que se absorba o transmitan determinadas longitudes de onda del espectro visibles.

Las longitudes de onda que no se absorban son transmitidas al ojo humano o a un material fotográfico sensible dando como resultado que la

estructura teñida aparece de un determinado color.

El campo microscópico es claro o transparente debido a que los rayos luminosos directos provenientes del condensador no encuentran a su paso ninguna estructura coloreada, por lo tanto, inciden como rayos de luz blanca hacia el objetivo. Si la muestra observada no está teñida, lo observado ofrecerá detalles poco contrastados, casi transparentes.

Componentes del microscopio óptico

El microscopio óptico compuesto está integrado por tres tipos de componentes:

Sistema mecánico:

Está constituido por estructuras que sirven de sostén, movimiento y sujeción de los demás sistemas (óptico y el de iluminación), como también de los objetos que se van a observar.

- ▶ **Base o pie:** Es un soporte metálico, amplio y sólido en donde se apoyan y sostienen los otros componentes del microscopio.
- ▶ **Brazo, estativo o columna:** Permite el traslado y la sujeción del microscopio. Soporta al tubo óptico, a la platina y el revolver.
- ▶ **Platina:** Superficie plana posicionada horizontalmente, tiene una perforación circular central que permite la incidencia de los rayos luminosos hacia la muestra a analizar. Sobre esta se coloca la preparación

(portaobjetos que contiene la muestra que se va a observar) sujeta por la pinza o con un carrito o charriot que, mediante mandos especiales permiten el movimiento de la preparación de delante hacia atrás y de izquierda a derecha.

- **Tubo óptico:** Cilindro metálico que se conecta en un extremo al revólver y en el otro extremo a los oculares.
- **Revólver o portaobjetivos:** Estructura giratoria en el que se atornillan los objetivos, realiza movimientos rotatorios con la finalidad de que estos coincidan perpendicularmente con la perforación central de la platina.
- **Tornillos macrométrico y micrométrico:** Ubicados en la parte inferior de la columna o brazo. En los microscopios actuales el tornillo micrométrico está incorporado en la circunferencia del tornillo macrométrico. Su función es permitir el desplazamiento de la platina hacia arriba y hacia abajo, permitiendo que se acerque o se aleje la preparación hacia los objetivos y poder lograr la visualización óptima de la imagen. El tornillo macrométrico genera desplazamientos rápidos y evidentes de la platina, sin embargo, los movimientos que produce el micrométrico son imperceptibles, sirve para efectuar el enfoque fino de la imagen. Algunos microscopios

poseen topes de seguridad en los mecanismos de desplazamiento de la platina, que impiden que esta siga descendiendo y así se evita la ruptura o daños al portaobjetos que contiene la preparación y a los lentes de los objetivos.

- **Cabezal:** Situado en la parte posterior de la columna del microscopio, constituido en su interior por prismas o espejos que sirven para acondicionar en él uno o dos oculares.

Sistema óptico:

El sistema óptico, está constituido por estructuras (objetivos, oculares, condensador y prismas) que permiten la visualización de la imagen de la preparación que se está analizando.

- **Condensador.** Su función es regular y concentrar los rayos de luz que provienen de la fuente luminosa. Lo conforman una o dos lentes convergentes que se ocupan de reunir los rayos luminosos y orientarlos hacia la abertura central de la platina. Mediante un tornillo ubicado a un costado del condensador, se acerca o aleja a la platina. Tiene incorporado un diafragma de iris, cuya función es regular el paso de luz, que permite centrar la mayor cantidad de rayos luminosos en el plano donde se sitúa el objeto a observar.

Los microscopios actuales tienen condensadores que poseen una apertura numérica que indica la cantidad de luz que puede captar y luego enviarla hacia la preparación.

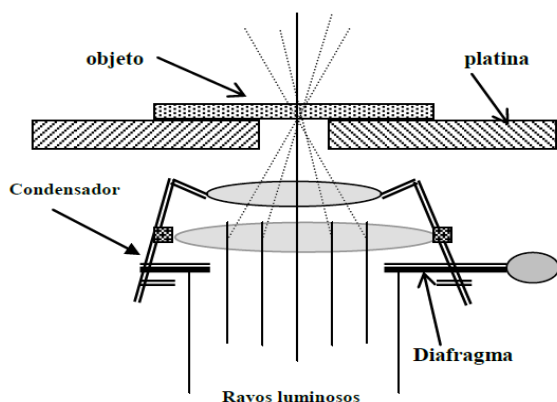


Figura 2 Diagrama de los principales componentes de un condensador y recorrido de los rayos luminosos.

► **Objetivo.** Sistemas de lentes que permiten establecer la calidad de la imagen (nitidez y poder de resolución). Constituidos por un par de lentes, convergente y divergente, que eliminan algunas aberraciones que podrían afectar la calidad de las imágenes formadas.

Las lentes se encuentran dentro de un soporte de metal, en forma de cilindro, el cual en su exterior tiene anotaciones numéricas:

- Aumento propio del objetivo.
- Apertura numérica.
- Tipo de material con que están talladas las lentes (flúorita o semiapocromáticos).
- Sustancia de inmersión (en caso de que la requiera).

Los objetivos tienen distintos aumentos que permiten ampliar las imágenes de la preparación que se está observando, los aumentos van de 3.5x, 4x, 10x, 25x, 40x, 65x y 100x, en algunos microscopios los objetivos tienen alrededor una línea con color característico que indica el aumento propio.

Otra clasificación de los objetivos son el medio que existe entre la lente frontal de este y la preparación examinada. Existen, por lo tanto, los objetivos secos, en los que entre el objeto observado y el objetivo sólo hay aire; por otro lado, están los objetivos de inmersión y son aquellos que para una óptima visualización de la imagen se requiere que se coloque una sustancia líquida (agua, glicerina o "aceite de inmersión") entre la preparación y la lente frontal del objetivo.

La calidad de las imágenes observadas estará dada por ciertos factores que poseen los objetivos, los cuales se mencionan a continuación:

- **Índice de refracción:** relación que existe entre la velocidad de la luz en el aire (entre el objeto y la lente frontal del objetivo) y la velocidad cuando entre estos hay una sustancia utilizada.
- **Angulo de apertura:** Los rayos de luz al atravesar un medio transparente son refractados a un ángulo específico, la capacidad que tiene el objeto de captar los

rayos luminosos se conoce como ángulo de apertura.

El ángulo formado es proporcional a la cantidad de rayos que captará la lente frontal del objetivo. Esta capacidad de captación está dada fundamentalmente por la distancia que existe entre el objeto y el objetivo.

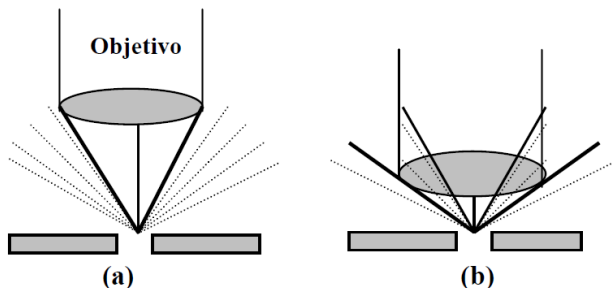


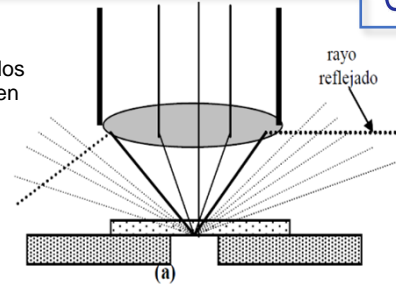
Figura 3 Rayos luminosos que forman el ángulo de apertura.

En función del índice de refracción del material del que está hecho la lente del condensador, o la sustancia de inmersión o aire entre el objeto y la lente del objetivo, el ángulo de apertura varía (mayor o menor).

- **Captación de rayos luminosos a través de objetivos secos y objetivos de inmersión:** Cuando entre la lente frontal del objetivo y el objeto solo hay aire, los rayos luminosos que atraviesan a este, se refractan más, y como consecuencia su desviación es mayor.

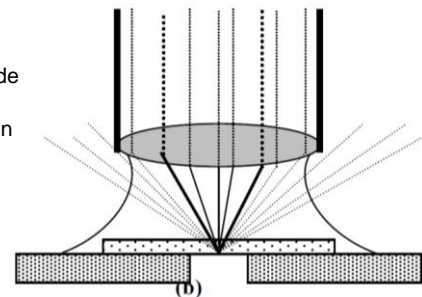
Los rayos que surgen del objeto, al llegar a la interfase de aire se refractan creando un ángulo de inclinación mayor, que impedirá sean captados por la lente frontal del objetivo, debido a que se reflejan en la superficie.

Figura 5
a) Trayectoria de los haces luminosos en un objetivo seco.



El aceite de inmersión posee un índice de refracción similar al del vidrio, por tanto, la trayectoria de los rayos luminosos que emergen del objeto no se desvían y son captados por el objetivo, logrando que se incremente la cantidad de rayos que penetran al microscopio.

Figura 4
b) Trayectoria de los haces luminosos en un objetivo de inmersión.



- **Apertura numérica.** Indica la capacidad que tiene el objetivo de captar los rayos refractados por las finas estructuras que constituyen el objeto observado. A mayor apertura numérica, el objetivo tendrá mayor capacidad de mostrar detalles finos de la imagen formada.
- **Aumento de un objetivo.** Capacidad de ampliación que posee un objetivo, dada por la relación entre el tamaño de la imagen y el objeto, en valores lineales (largo y ancho).
- **Poder de resolución.** Se define como la capacidad que posee un objetivo de lograr distinguir la distancia mínima entre dos puntos

adyacentes, para que puedan ser observados como puntos separados. De este factor depende la calidad de la imagen (nitidez, claridad y riqueza de detalles finos).

► **Ocular.** Forma la segunda imagen a partir de la imagen primaria que forma el objetivo y la amplía un número determinado de veces (5x, 8x, 10x, 12x) no añade ningún detalle a los generados por el objetivo. Los oculares están conformados por dos lentes convergentes (planos convexos). La primera se denomina "de campo o frontal" y se sitúa en la parte anterior del ocular, además es la encargada de recoger y ampliar la imagen que generó el sistema de lentes del objetivo. La otra lente denominada "ocular", ubicada en la parte posterior del ocular está en contacto directo con el ojo del observador, esta se encarga de aumentar de nuevo la imagen y la orienta hacia el ojo de quien observa al microscopio.

La clasificación de los oculares está dada por la disposición de las lentes y del diafragma, dentro de la camiseta metálica que los contienen, en:

- **Oculares negativos de Hüygens.** Constituidos por un par de lentes plano-convexas, con la superficie curva orientada hacia abajo. Entre las dos lentes se localiza el diafragma y en él se adhiere un señalador o puntero elaborado generalmente por una porción de pestaña o pelo.

- **Oculares positivos o de Ramsden.** El par de lentes plano-convexas se localizan con la superficie convexa dispuesta hacia adentro. El diafragma está situado por debajo de la lente de campo o frontal; en el plano donde se forma la imagen desde objetivo.

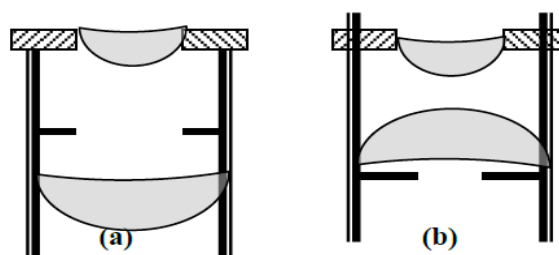
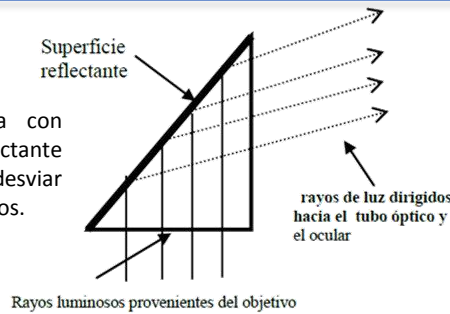


Figura 5 Diagrama de la posición de las lentes en: a) un ocular negativo de un objetivo, éste tendrá una mayor capacidad de mostrar detalles finos en la imagen que; b) en un ocular positivo.

► **Prismas:** Estructuras transparentes que se encargan de dirigir los rayos de luz que provienen del condensador y viajan a través del eje óptico de los objetivos, después hacia el tubo óptico que se encuentra ligeramente inclinado y llegar finalmente a los oculares.

Su función varía de acuerdo con la cantidad de oculares que posee el microscopio, para el microscopio monocular desvía los rayos luminosos de la trayectoria rectilínea para luego dirigirlos al ocular; en los microscopios binoculares, los rayos luminosos son separados en dos haces de luz por los prismas y posteriormente son dirigidos a cada ocular. Para ambos casos siempre debe estar una superficie reflectante para evitar que la luz se descomponga.

Figura 6 Prisma con superficie reflectante que sirve para desviar los rayos luminosos.



Sistema de iluminación:

Son aquellos componentes que proveen de energía lumínica al microscopio:

- ▶ **Luz artificial.** Se genera por una lámpara de bajo voltaje (6 voltios) insertada en la base o pie del microscopio. La emisión e intensidad de la luz está regulada por un reóstato.
- ▶ **Filtros.** Su función es modificar la longitud de onda de la luz que ilumina el objeto a observar.

Los filtros varían de acuerdo con los modelos de microscopios, son colocados en anillos o "portafiltros" que, en el caso de microscopios ópticos de campo claro, se colocan sobre la fuente luminosa o abajo de la lente frontal del condensador.

Aumento del microscopio óptico compuesto

- ▶ **Aumento total del microscopio óptico compuesto** Indica en qué medida se aumenta la imagen observada de la preparación, se produce en dos etapas, la primera se genera por las lentes que conforman al objetivo y la segunda por las lentes que constituyen al ocular.

AT= aumento del objetivo x aumento del ocular.

- ▶ **Aumento útil y aumento vacío del microscopio.** La imagen que forma el microscopio óptico compuesto posee características que permiten ver menor o mayor cantidad de detalles de ésta.

La resolución de la imagen del objetivo depende de la apertura numérica de éste y del tipo de luz que se utiliza. A mayor poder de resolución del objetivo utilizado, se observarán más detalles.

El **aumento útil** de un microscopio surge al ampliar la imagen de la preparación (con el uso de un juego de objetivo + ocular) y permite que se aprecien mejor los detalles.

El **aumento vacío** de la imagen de la preparación es aquel que, aunque se busque ampliar la imagen, empleando oculares de mayores aumentos, se llega a un punto en que ya no se logrará distinguir más detalles.

EL EXTENDIDO SANGUÍNEO

El nombre correcto de la técnica empleada para extender una gota de sangre sobre una laminilla de vidrio o portaobjetos se denomina "**extendido sanguíneo**" y **no frotis** ya que de acuerdo con la entidad RAE (Real Academia Española) indica que, etimológicamente, frotis proviene del francés frottis, la cual deriva de la palabra francesa froter que significa frotar y esto no hace alusión a lo propio de la técnica empleada en hematología, por tanto, extendido sanguíneo será el término que encontrará durante la lectura de este manual.

Un extendido sanguíneo nos proporciona aspectos morfológicos de las células hematopoyéticas tanto en condiciones normales como patológicas. La realización de un buen extendido sanguíneo es un arte y junto con una buena tinción se convierten en una excelente herramienta diagnóstica.

El extendido sanguíneo es un estudio que brinda información precisa acerca de la distribución, morfología normal y patológica de leucocitos, eritrocitos, y plaquetas. Así como la apreciación de la concentración y distribución de la hemoglobina, recuento diferencial porcentual de células blancas, además de artificios, número de trombocitos y su granulación. El extendido sanguíneo es realizado mediante un procedimiento técnico en el que una pequeña gota de sangre es colocada en una laminilla de cristal y es arrastrada de manera inmediata con

una con una segunda laminilla para obtener un barrido de esta, que se caracteriza por ser fino, sin burbujas y homogéneo.

La técnica corresponde a un extendido sanguíneo transversal, a continuación, se presentan algunas de las ventajas que nos ofrece el uso de este método:

- ▶ Es un procedimiento rápido que no demanda un exceso de muestra.
- ▶ Permite una mejor distribución celular de muestras provenientes de pacientes con leucopenias importantes.
- ▶ Tiene dos formas de lectura, que nos permiten apreciar de manera rápida y crítica las alteraciones morfológicas de todas las líneas celulares, determinando anomalías en forma, tamaño, color e inclusiones citoplasmáticas, dando una medida cuantitativa y cualitativa de los elementos que lo conforman.

La importancia de un buen extendido y su correcta tinción son fundamentales, ya que una técnica mal realizada produce poca información que además de ser inadecuada, no permite obtener resultados de calidad en el diagnóstico.

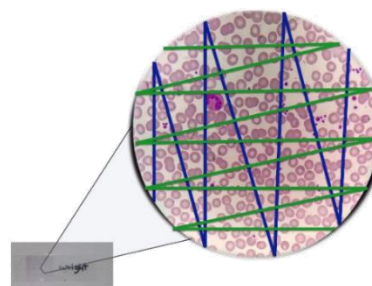
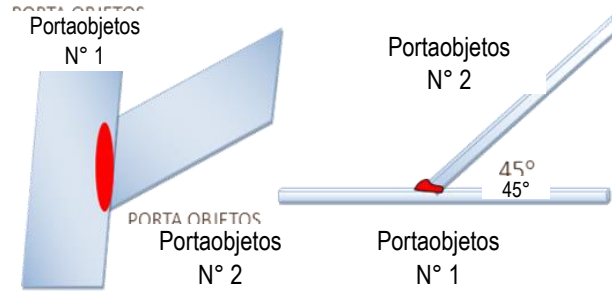


Fig. 1 Lectura de un extendido sanguíneo.
 — Horizontal
 — Vertical

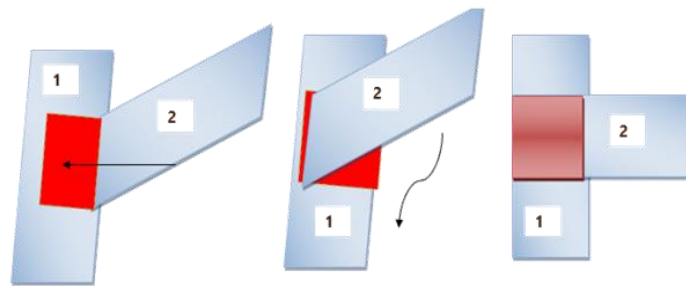
Procedimiento



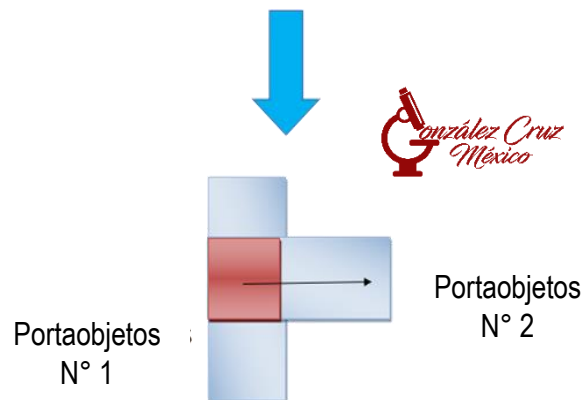
1. Depositar una gota de sangre justo a la mitad de un portaobjetos (5 μ L aprox.) (N° 1)



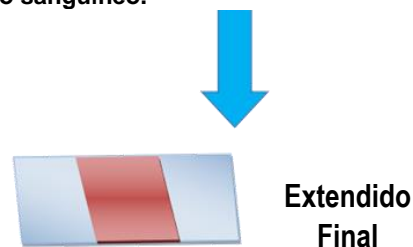
2. Colocar en segundo portaobjetos (N° 2) por delante de la gota, formando un ángulo de 45°, se debe esperar a que la sangre se distribuya uniformemente en el portaobjetos. (N° 1)



3. Deslizar el portaobjetos N° 2 hacia adelante; dejar caer suavemente el portaobjetos N° 2 sobre el portaobjetos N° 1; el extendido debe ser delgado.



4. Una vez que se ha extendido por capilaridad la sangre sobre los portaobjetos 1 y 2. Arrastre vigorosamente el portaobjetos N° 2 sin levantarlo, hacia el lado contrario al que fue realizado el extendido sanguíneo.



5. El extendido deberá quedar delgado, sin burbujas y homogéneo.

MÉDULA ÓSEA

La médula ósea es el tejido que se localiza en la cavidad medular de los huesos largos, los espacios intertrabeculares del hueso esponjoso y los conductos centrales largos. Existen dos tipos de médula: roja y amarilla. La diferencia entre ambas consiste en las células que las conforman y la función que desempeñan durante la vida de una persona.

La médula ósea amarilla casi no tiene actividad hematopoyética, aunque en caso de anemia grave o crónica puede transformarse de nuevo en médula roja. Las células que predominan en este tipo de médula son los adipocitos, mismos que le confieren la tonalidad amarilla.

La médula ósea roja es un tejido suave, de organización laxa, muy vascular, el endostio del hueso separa a la médula roja del tejido óseo. Produce todas las clases de elementos que conforman la sangre; su color se debe al contenido de eritrocitos y sus precursores con hemoglobina abundante.

La médula ósea contiene células, una matriz extracelular y vasos sanguíneos. Estos vasos forman un compartimiento vascular conformado por un sistema de sinusoides y separado de un compartimiento hematopoyético que forma columnas o cuñas irregulares entre los vasos.

Los sinusoides están cubiertos por células endoteliales, como otros vasos sanguíneos, y rodeados por células y fibras reticulares. Las células reticulares inducen la formación de diversos tipos de leucocitos debido a que secretan ciertos factores estimulantes de colonias. En los huesos largos de las extremidades, las células reticulares envejecidas acumulan grasa y se transforman en adipocitos que reemplazan a la médula roja con amarilla.

Los espacios entre los sinusoides están ocupados por islas (cordones) de células hematopoyéticas, compuestas por macrófagos y glóbulos sanguíneos en todas las etapas de desarrollo. A medida que los glóbulos sanguíneos maduran, se abren paso por las células reticulares y endoteliales para entrar en el seno y alejarse en la circulación sanguínea.

La médula consta de un microambiente hematopoyético que provee a esta de nutrientes y un entorno propicio para las células que se estarán generando, contiene células del estroma que de acuerdo con su origen puede ser mesenquimal (células endoteliales, fibroblastos, adipocitos y osteoclastos) y puede ser hematopoyético no mesenquimal (macrófagos y células dendríticas).

Las células del estroma pueden producir y depositar elementos en la matriz extracelular (MEC), asimismo, tienen la capacidad de producir y concentrar citoquinas locales hematopoyéticas que inducirán o inhibirán la proliferación y diferenciación celular de las células progenitoras, formando así el "nicho de la célula madre/progenitora".

Bone Anatomy (the femur)

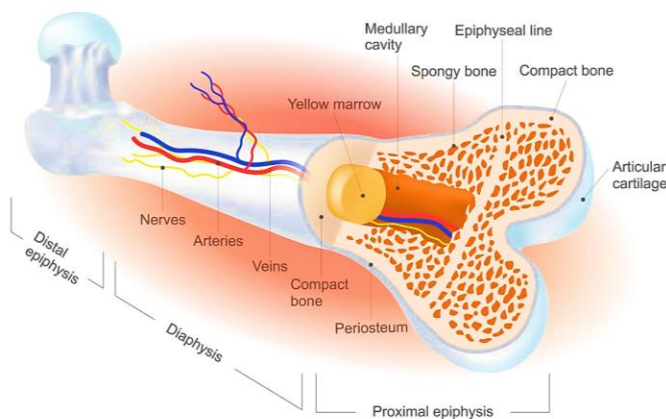


Figura 7 Anatomía del hueso (fémur). Médula ósea.

El diagnóstico hematológico depende del conocimiento, lo más exacto posible, de tres procesos: producción, liberación y supervivencia celulares. Dado que los mecanismos de la liberación celular son muy poco conocidos, el diagnóstico se suele basar en la determinación del equilibrio entre velocidad y calidad de la actividad hematopoyética y tiempo de supervivencia celular. Los datos cualitativos y cuantitativos acerca de la hematopoyesis medular se obtienen mediante el examen del tejido medular.

En condiciones normales, casi toda la hematopoyesis se desarrolla en la médula ósea. Los trastornos hematológicos debidos a producción anormal de células suelen tener su origen en una hematopoyesis anormal. Por esta razón, el estudio de la médula ósea es el método más usado en el diagnosticar trastornos sanguíneos.

En algunos pacientes es posible emitir el diagnóstico a partir del examen microscópico de sólo la médula; en otros, la información obtenida confirmará otros datos o excluirá ciertas enfermedades susceptibles de considerarse en el diagnóstico diferencial.

Con el aspirado medular se puede analizar la morfología y visualizar posibles displasias o aberraciones celulares. La biopsia permite estudiar la arquitectura medular, y el grado de celularidad. La biopsia debe preceder a la aspiración para evitar un artefacto (sobre todo hemorragia) en la muestra.

Indicaciones

Aspiración

Anemia hipoproliferativa o sin explicación, leucopenia o trombocitopenia; sospecha de leucemia, mieloma o defecto medular; evaluación de las reservas de hierro; y, estudio de algunos casos de fiebre de origen desconocido.

Biopsia

Se realiza además de la aspiración en casos de pancitopenia (anemia aplásica), tumor metastásico, infección granulomatosa (micobacterias, brucelosis, histoplasmosis); mielofibrosis, enfermedad por acumulación de lípido (enfermedad de Gaucher, de Niemann-Pick); cualquier causa de “punción seca” en la aspiración; valoración de la celularidad medular. Cuando se plantea realizar biopsia y aspiración, la biopsia debe realizarse primero por el riesgo de artefacto por hemorragia al realizar la biopsia en el lugar de la aspiración.

Pruebas especiales

Tinción histoquímica (leucemias) (fosfatasa ácida para carcinoma prostático metastásico); tinción de inmunoperoxidasa (detección de inmunoglobulina o marcador superficial celular en el mieloma múltiple, leucemia o linfoma; detección de lisozima en la leucemia monocítica), tinción con azul de Prusia (hierro) (valoración de las reservas de hierro, diagnóstico de las anemias sideroblásticas), estudios citogenéticos (leucemias, linfomas) tinción de reticulina (aumentada en la mielofibrosis), tinción microbiológica (cultivos bacterianos, micobacterianos, micóticos) (tinción acidorresistente para micobacterias).

CITOQUÍMICA EN HEMATOLOGÍA

Estudia la composición química de la célula hematopoyética, permitiendo detectar y precisar la localización topográfica de los elementos químicos de las células, éstos pueden ser enzimáticos (p. ej. oxidasa) o no enzimáticos (p. ej., lípidos y glucógeno), la detección de estos elementos se realiza por medio de métodos de coloración que permiten la formación de productos coloreados visibles al microscopio óptico.

Con estas técnicas se mejora la diferenciación celular, ya que es posible establecer con mayor exactitud el grado de maduración y funcionalidad de las células.

El uso de uno o más reactivos permite que haya reacciones entre los componentes de éstos y las estructuras celulares, logrando ubicar ciertas sustancias o grupos químicos presentes en las células, los cuales se visualizan como productos coloreados, insolubles, no difusibles. Es importante mantener la vitalidad de la célula o si no lo hacen, deben reemplazar la sustancia identificada en su topografía.

Generalidades

- ▶ Son técnicas que derivadas de modificaciones de técnicas histoquímicas.
- ▶ Nexo entre morfología y bioquímica.
- ▶ Genera una relación entre la función y forma de las estructuras.
- ▶ Ofrece resultados cualitativos o semicuantitativos.

- ▶ Apoyo para el diagnóstico de las distintas hemopatías.

Compuestos a estudiar

- ▶ **Carbohidratos.** Mediante la reacción de PAS-Shiff (ácido peryódico de Schiff) es posible detectarlos.
- ▶ **Enzimas oxidantes.** Existe una reacción con peroxidasas, y así se evidencia la presencia de estas en la muestra.
- ▶ **Enzimas hidrolíticas.** Como la fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, beta glucoronidasa, esterasas, etc.
- ▶ **Lípidos.** Se utiliza el Sudan Negro para detectarlos.
- ▶ **Componentes inorgánicos.** Generalmente es el hierro el compuesto inorgánico que se quiere detectar y se logra mediante la reacción azul de Prusia o de Perls.

Pasos fundamentales

- a) **Fijación de la extensión.** Su finalidad es conservar las estructuras y funcionalidad celular, evita el posible daño que pudieran tener por fenómenos nocivos e impide que ciertas sustancias se difundan entre los distintos compartimientos celulares, así como al medio extracelular. Existen diversos fijadores: metanol, etanol, acetona, glutaraldehído, formaldehído, etcétera.

- b) **Incubación en el medio de reacción**, como consecuencia se liberan productos que por sí mismos o al combinarse con otras sustancias presentes, dan lugar a un precipitado visible en el lugar de la reacción.
- c) **Contraste**. Resalta el producto obtenido de la reacción y logra una visualización óptima del núcleo o citoplasma.

Finalidad

- ▶ Reconocimiento y diagnóstico celular.
- ▶ Estudio de la fisiología y fisiopatología celulares.
- ▶ Diagnóstico de la patología.

Tinción de Wright

Para teñir los extendidos de sangre periférica y médula ósea se utiliza principalmente la tinción de Wright.

El azul de metileno policromo y la eosina son las tinciones derivadas del método original de Romanowsky. Las reacciones en la tinción dependen del pH. El azul de metileno (colorante básico) tiñe los componentes celulares ácidos, mientras que la eosina (colorante ácido) tiñe componentes básicos. También se forma un complejo tiazina eosinato (azul de metileno oxidado y eosina) que se encarga de teñir los componentes neutros de la célula. Esta es la razón por la que estructuras ácidas presentes en el núcleo (nucléolo) o en el citoplasma (ribosomas) se colorean de azul, mientras que otros componentes como la hemoglobina adquieran un color rosado.

Los componentes básicos de la tiazina consisten en el azul de metileno (trimetiltionina) y, en proporción variable, sus análogos producidos por metilación oxidativa: azur B (tetrametiltionina); azur A (dimetiltionina asimétrica); dimetiltionina simétrica y azur C (monometiltionina). El componente ácido, eosina, se deriva de un esqueleto de xanteno.

La mayoría de las tinciones de Romanowsky son capaces de combinar la fijación con la tinción al disolverse en alcohol metílico.

El colorante Wright consiste en una solución de metanol (alcohol metílico), eosina y una mezcla compleja de tiazinas, que incluyen azul de metileno, azur B y otros derivados. La solución tampón (pH 6,4) contiene fosfato potásico primario (monobásico) (KH_2PO_4) anhidrido, fosfato sódico secundario (dibásico) (Na_2HPO_4) anhidro y agua destilada.

INTERPRETACIÓN

- **CELULARIDAD MIELOIDE**

Serie granulocítica

El núcleo de estos precursores es grande con uno o múltiples nucléolos, los cuales contienen ribosomas, compuestos por proteínas y ARNr, confiriendo a estos orgánulos el carácter ácido, que al entrar en contacto con el azul de metileno se evidencia de color púrpura. La cromatina es finamente reticulada debido a la gran actividad mitótica de proliferación, maduración y diferenciación en los distintos tipos de leucocitos granulocitos a los que dará origen. Posee escaso citoplasma que contiene retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi en desarrollo, en esta etapa de maduración aún no posee gránulos primarios, por lo que el citoplasma es basófilo.

A medida que ocurre maduración celular, se hacen evidentes los gránulos azurófilos, que definen la transformación del mieloblasto, en promielocito, precursor mieloide con

mayor grado de maduración y diferenciación, el cuál es rico en gránulos azurófilos, que tienen afinidad por los colorantes ácidos, visiblemente al microscopio se observan de color rojo-violeta. Posteriormente al promielocito aparecerán gránulos específicos (granulación secundaria) que definirán la progresión hacia mielocitos neutrófilos segmentados, eosinófilos y basófilos.

De acuerdo con el grado de afinidad de las granulaciones citoplasmáticas específicas en los polimorfonucleares podemos clasificarlos en tres grandes grupos:

1. **Granulocitos neutrófilos:**

Estos gránulos, generalmente secundarios y terciarios, contienen compuestos neutros (lisozima, colagenasa, fosfatasa alcalina, lactoferrina, entre otros) que fijan los colorantes. El color resultante es un color púrpura claro y a las granulaciones se les denomina azurófilas.

2. **Granulocitos eosinófilos:**

Tienen forma esférica y cubren el citoplasma, la granulación específica de eosinófilos contiene sustancias básicas (proteína básica mayor, citoquinas, proteína catiónica eosinófila, peroxidasa eosinófila, neutroxina, citoquinas) que son fijadas por los colorantes ácidos (eosina) en la tinción de Wright, el resultado es un color rojo-naranja, característico de los eosinófilos.

3. **Granulocitos basófilos:**

Estos gránulos contienen sustancias muy ácidas que se fijan a los colorantes básicos (azul de metileno), el resultado es un color azul intenso.

El azul B tiñe de púrpura la granulación primaria de los neutrófilos segmentados, la fina granulación de los monocitos y la que puede observarse en ciertos linfocitos de gran tamaño y abundante citoplasma (linfocitos grandes granulados). Asimismo, dicho colorante tiñe ciertas inclusiones eritrocitarias derivadas de la cariorrexis.

Serie monocítica

Al igual que el mieloblasto, el monoblasto evidencia un núcleo grande excéntrico que contiene una fina cromatina y nucléolos en su interior, poseen ADN y ARN que le confieren a estas estructuras el carácter ácido, por lo tanto, son teñidos por colorantes básicos (azul de metileno), adquiriendo un color violeta. A diferencia del mieloblasto, el citoplasma basófilo agranular es más claro observándose una variación de color violeta a grisáceos teñidos así por la presencia de polirribosomas.

Después de que ocurre la mitosis y la maduración, este precursor se convierte en promonocito, aunque el tamaño es similar al de los monoblastos, la diferencia está en la aparición de granulación azurófila y la disposición que adquiere el núcleo (doblado, torcido o con muescas), su cromatina es más condensada que la

de su precursor, a pesar de lo cual se logran observar uno o dos nucléolos, el color de este es púrpura, de tonalidad más intensa que monoblasto.

El citoplasma adquiere una coloración basófila muy intensa, por la cantidad de ribosomas presente en él.

El monocito maduro posee un núcleo que ocupa cerca de la mitad del área celular, ubicado en una posición excéntrica y es de forma irregular (herradura, muesca o doblado), su cromatina es condensada y teñida con Wright es de color violeta intenso. El citoplasma se colorea de azul grisáceo contiene un número variable de gránulos y vacuolas, los gránulos citoplasmáticos son similares a los observados en los granulocitos, densos, homogéneos y que contienen fosfatasa ácida y arilsulfatasa (lisosomas primarios) teñidos con el azul B del colorante de Wright resulta un color púrpura.

Serie eritroide

El eritroblasto tiene un gran núcleo redondo en el que se evidencian uno o dos nucléolos, posee cromatina fina, debido a la gran actividad mitótica, se visualiza en color púrpura. Su citoplasma adquiere un color azul intenso y cerca del núcleo se logra observar el aparato de Golgi. El contenido elevado de RNA enmascara cualquier cambio de color en la hemoglobina.

La cromatina del núcleo del eritroblasto basófilo comienza a condensarse, y forma grumos en toda la periferia de la

membrana nuclear. La coloración obtenida de la tinción es púrpura-rojo oscuro. El citoplasma presenta un color azul más intenso que el del eritroblasto. Aumenta la síntesis de hemoglobina, aunque las grandes cantidades de RNA no permiten la visibilidad de la pigmentación de la hemoglobina.

La forma de la cromatina en la etapa de eritroblasto policromático es variable. Al condensarse reduce considerablemente el tamaño de la célula. Las coloraciones obtenidas de esta tinción son muy variables, esto es, por la relación que existe entre la producción de la hemoglobina (va en aumento) y la disminución de la cantidad de RNA. El color generado es un gris-azul oscuro.

El núcleo del eritroblasto ortocromático es casi o completamente picnótico, ha perdido su capacidad de sintetizar DNA y en esta etapa es eliminado. El citoplasma adquiere un color rosa-anaranjado, debido a la presencia de hemoglobina (producida casi por completo). Los organelos residuales (mitocondrias, retículo endoplásmico rugoso, polirribosomas) reaccionan con el componente básico de la tinción y le otorgan a la célula un matiz azulado leve.

El reticulocito ya no posee núcleo, y su citoplasma posee una pigmentación predominante por la hemoglobina, aunque posee pequeñas cantidades de RNA residual logrando observarse una policromatofilia difusa o RNA agregado que tiene aspecto de punteado basófilo.

El eritrocito circulante maduro está provisto por hemoglobina, la cual es de carácter básico, teñida con la eosina, adquiriendo un color rosa-anaranjado.

Serie megacariocítica

El precursor de la secuencia de maduración megacariocítica es el megacarioblasto. Poseen un núcleo ovalado con dos seis nucléolos con coloración púrpura, debido a la división mitótica nuclear, aumentando el volumen del citoplasma el cual adquiere un color azul y no contiene gránulos.

El promegacariocito es de mayor tamaño que el megacarioblasto, su citoplasma puede tener un aspecto finamente granular y tiene una reacción tintorial basófila, tres tipos de gránulos (alfa, denso y lisosómico) formados en el aparato de Golgi, están presentes en éste. El núcleo es grande, generalmente multilobulado y su cromatina es densa y sin nucléolos.

El megacariocito es la célula más grande de la médula ósea, su citoplasma es voluminoso, se distinguen dos tipos de megacariocitos: el granular, que tiene un núcleo multilobulado y su citoplasma de color rosado. Por otro lado, los megacariocitos maduros (liberadores de plaquetas), poseen un núcleo multilobulado con cromatina condensada sin nucléolos y un citoplasma abundante que ha perdido la basofilia y se ha cubierto por gránulos azurófila, los cuales están dispuestos en cúmulos, rodeados por

una zona hialina citoplasmática correspondiente a las membranas de demarcación, claramente visibles en la estructura y que delimitarán las plaquetas que saldrán a circulación.

Las plaquetas son células sin núcleo, pequeños fragmentos de citoplasma que se han desprendido de la periferia del megacariocito, contienen gránulos azurófilos y un citoplasma basófilo poco visible.

- *CELULARIDAD LINFOIDE*

El linfoblasto posee de uno a dos nucléolos (diferencia entre el mieloblasto), su membrana nuclear es densa y la zona perinuclear clara, contiene cromatina laxa, con un intenso color violeta. El citoplasma es basófilo y la intensidad del color violeta es proporcional a la cantidad de RNA presente, además esta desprovisto de gránulos.

El prolinfocito difícilmente se distingue del blasto, los cambios son poco visibles, como la cromatina que presenta (levemente más condensada), una reducción de la prominencia nuclear y un cambio en el grosor de la membrana nuclear. El citoplasma pierde la intensa basofilia que presentaba su precursor.

La distinción morfológica de los leucocitos es el tamaño, y esto puede deberse a su actividad celular o a la localización en el extendido en la que se encuentra. El citoplasma de los linfocitos pequeños es basófilo y posee pocos gránulos azurófilos. La forma del núcleo es ovalada o redondo con

cromatina intensamente condensada y adquiere un color morado oscuro intenso.

El linfocito de tamaño medio posee un citoplasma más abundante, razón por la cual se distinguen con mayor claridad los gránulos azurófilos inmersos en él.

El linfocito de tamaño grande tiene un citoplasma más grande que adquiere un color morado más intenso cuando se tiñe. La cromatina es laxa. Puede considerarse que la célula está en transformación dada la presencia de proliferación celular activa. Si contiene granulación adecuada, podría tratarse de linfocitos natural killer (NK).

La célula plasmática, secreta inmunoglobulinas (estadio final del linfocito B) fácilmente detectadas en su citoplasma. El núcleo es excéntrico, con cromatina condensada, morfológicamente su disposición adopta la forma “en rueda de carro”. El citoplasma es abundante y adquiere una coloración basófila muy intensa en aproximadamente toda su extensión, a excepción de la zona centrosómica de la célula que adquiere una tonalidad blanquecina, correspondiente al aparato de Golgi.

REACTIVOS

1. Amortiguador de fosfatos pH 6.4

KH ₂ PO ₄ anhidro	3.31 g
Na ₂ HPO ₄ anhidro	1.28 g
Agua destilada C.B.P.	500 ml

2. Colorante de Wright

Colorante de Wright en polvo	0.3 g
Metano	150 ml

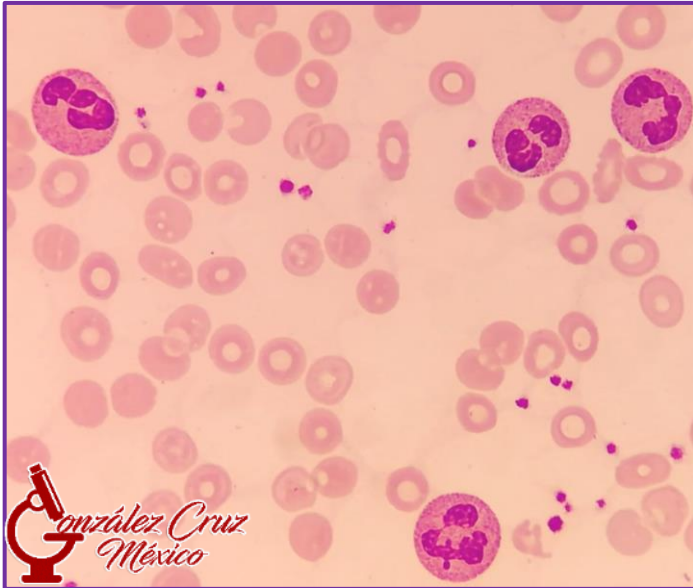
TÉCNICA

1. Colocar el extendido sanguíneo en el puente de tinción y cubrirlo con una capa gruesa de colorante.
2. Teñir durante 2 minutos.
3. Sin retirar el colorante de la preparación agregar el amortiguador de fosfatos pH 6.4 desde un extremo del portaobjetos (en un sentido) hasta que se forme un menisco (capa tornasol) durante 2 minutos.
4. Lavar con agua corriente.
5. Limpiar el excedente del colorante de la parte posterior del portaobjetos y secar al aire o presionando la laminilla por ambas caras sobre una toalla interdoblada de papel.
6. Observar al microscopio en objetivo de inmersión.

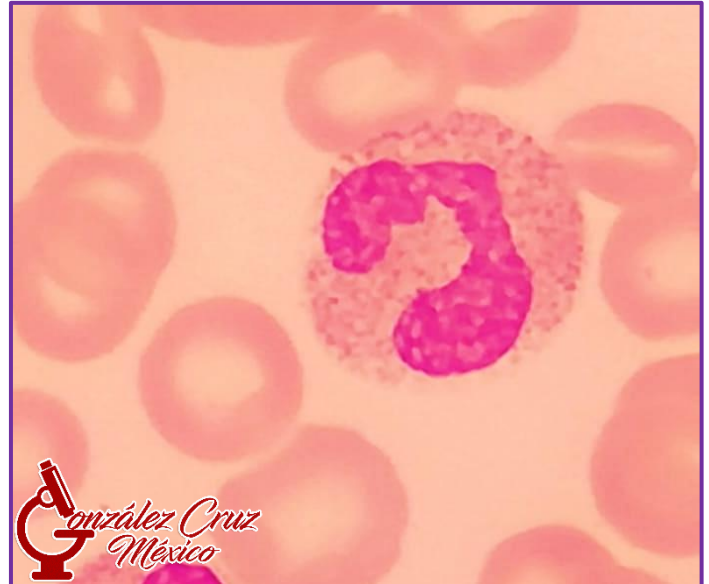
Nota: Debido a las características fisicoquímicas con respecto a la calidad del agua corriente en la ciudad de Xalapa Veracruz, se encuentra en condiciones para sustituir a la solución buffer por lo que también puede utilizarse generando resultados óptimos.

Celularidad mieloide normal

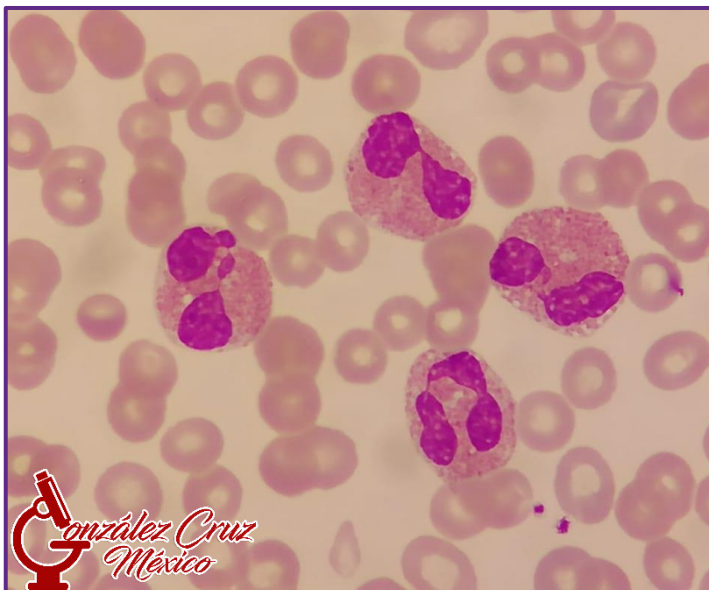
Granulocitos



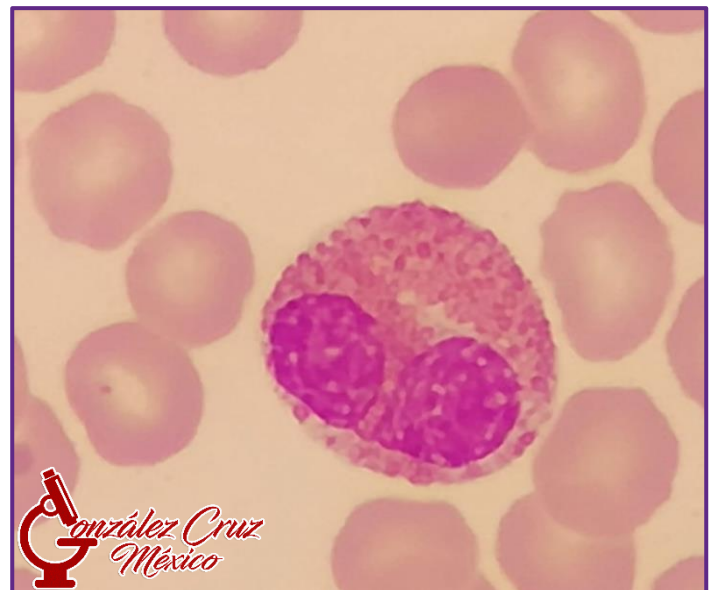
Neutrófilos segmentados. Extendido sanguíneo. Tinción de Wright.



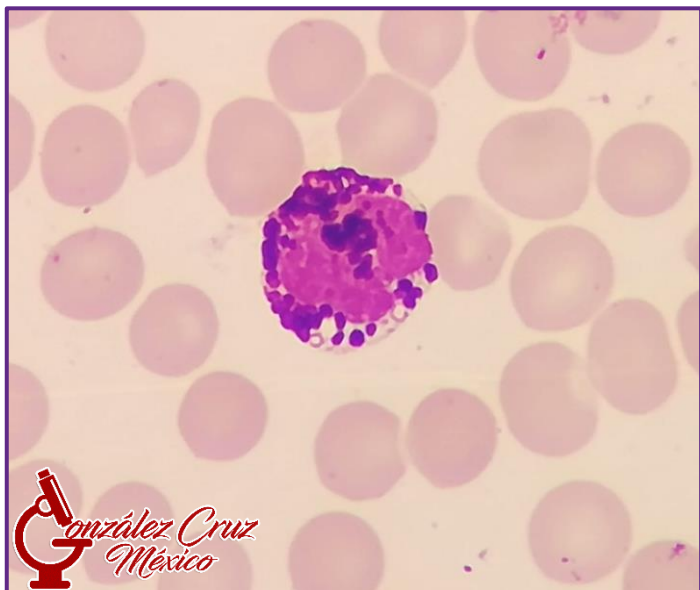
Neutrófilo segmentado. Extendido sanguíneo. Tinción de Wright.



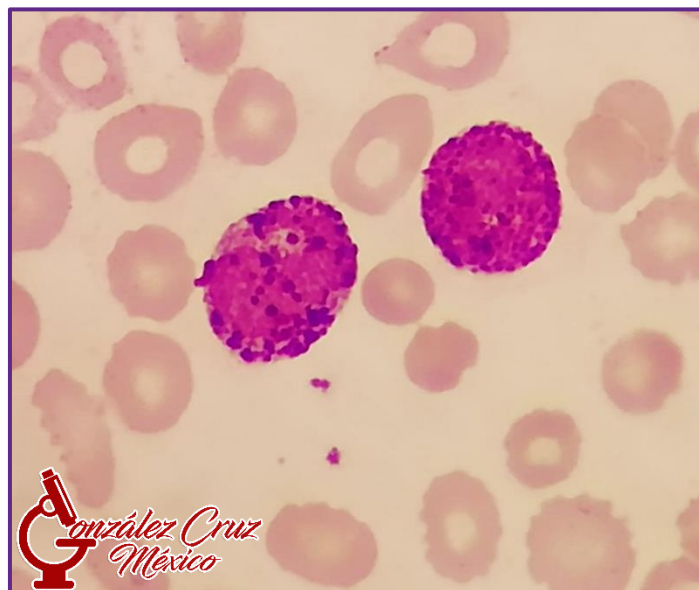
Eosinófilos normales. Extendido sanguíneo. Tinción de Wright.



Eosinófilo. Extendido sanguíneo. Tinción de Wright.

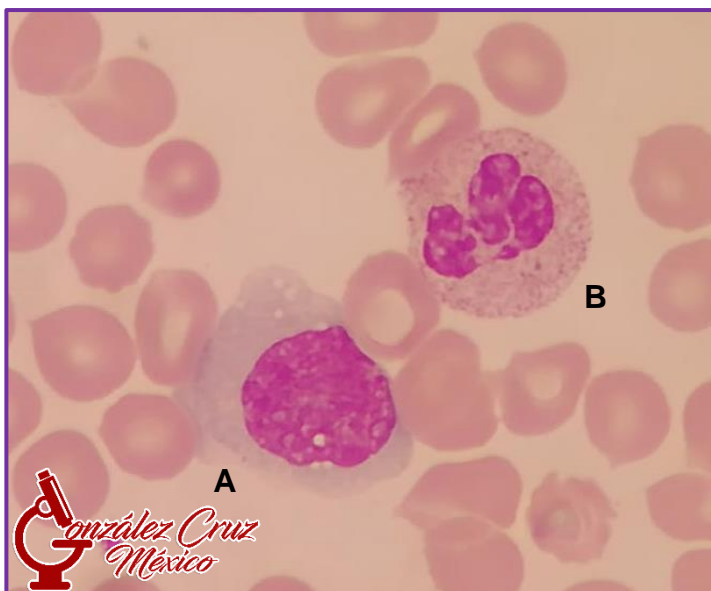


Basófilo. Extendido sanguíneo. Tinción de Wright.

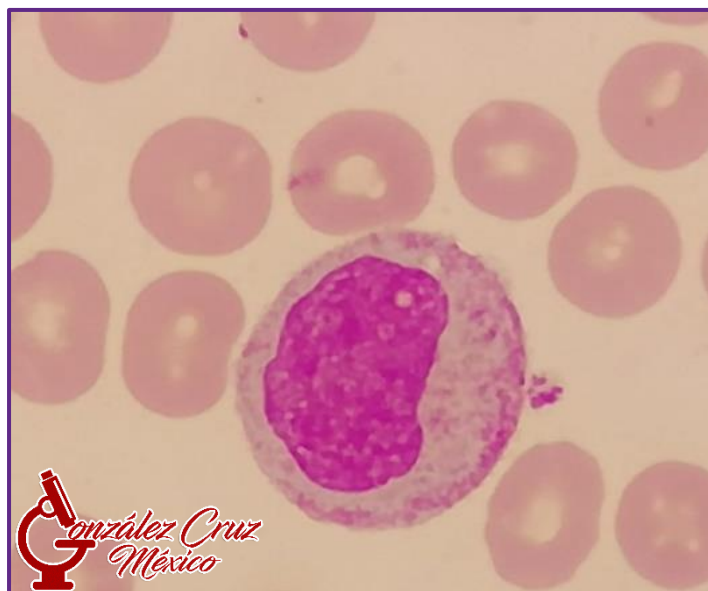


Basófilos. Extendido sanguíneo. Tinción de Wright.

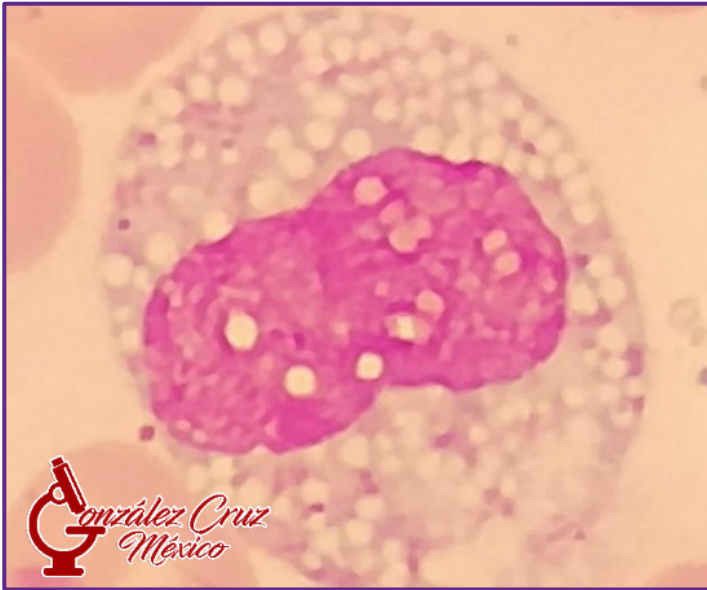
Monocitos



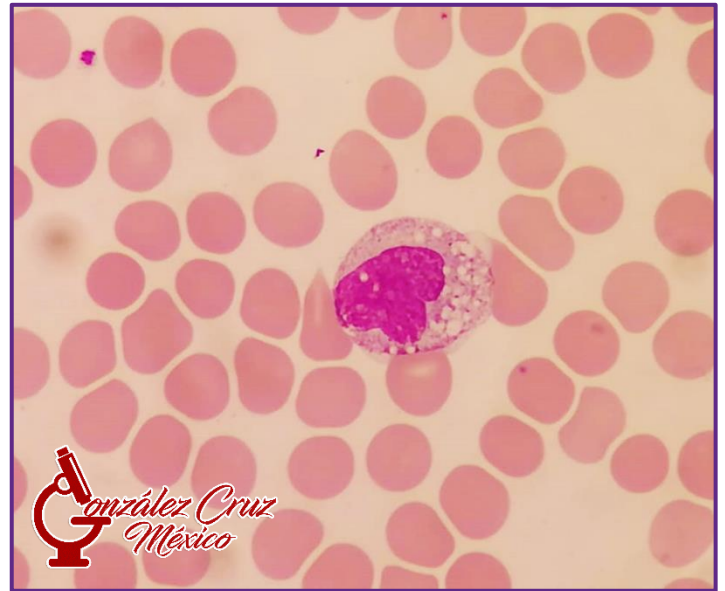
A. Monocito. B. Neutrófilo segmentado. Extendido sanguíneo. Tinción de Wright.



Monocito. Extendido sanguíneo. Tinción de Wright.

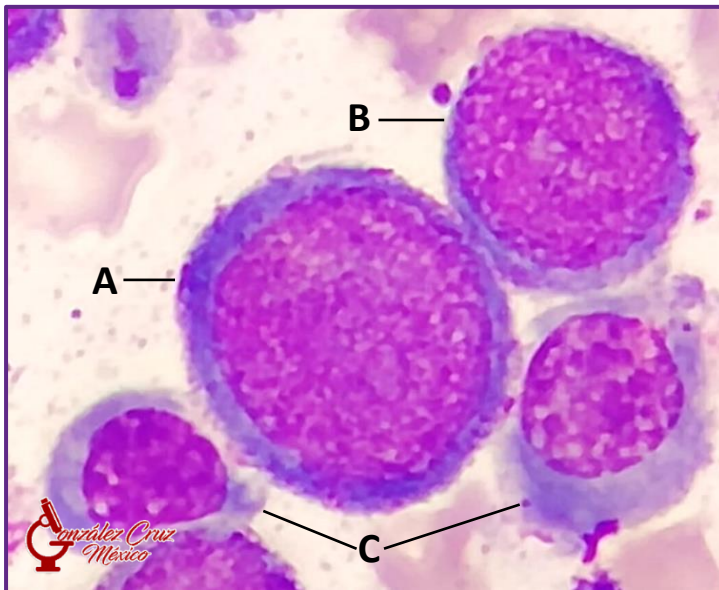


Macrófago. Extendido sanguíneo. Tinción de Wright.

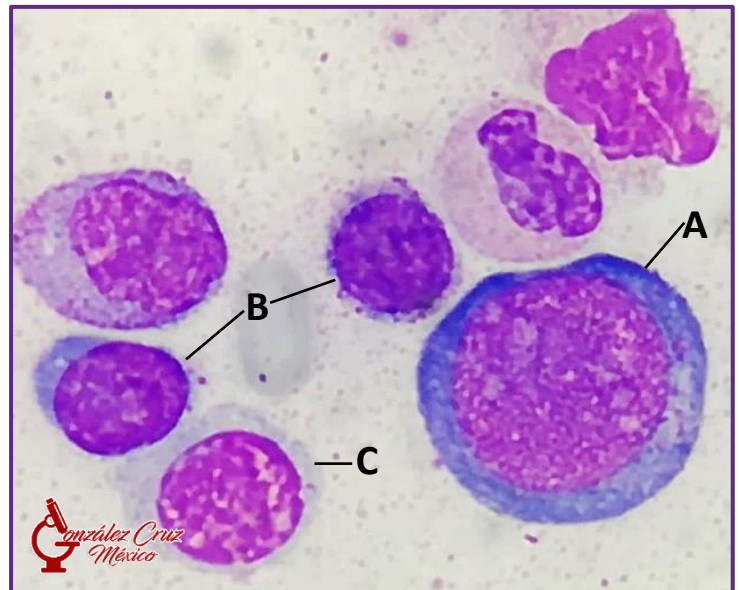


Monocito con presencia de vacuolización citoplásmica. Extendido sanguíneo. Tinción de Wright.

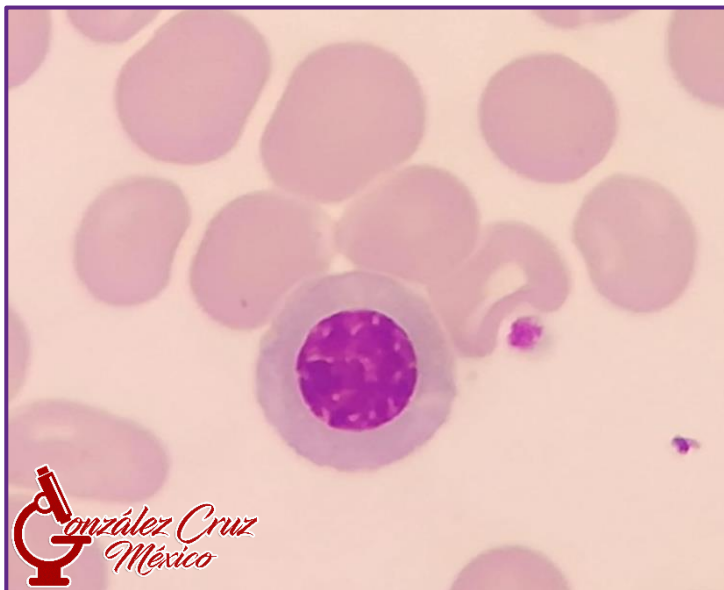
Precursores eritroides



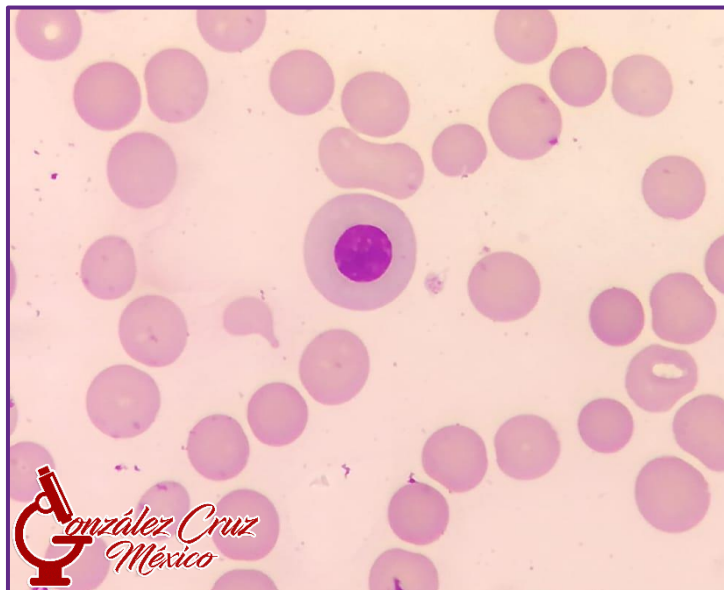
A. Proeritroblasto. B. Eritroblasto basófilo. C. Eritroblastos policromatófilos. Médula ósea. Tinción de Wright.



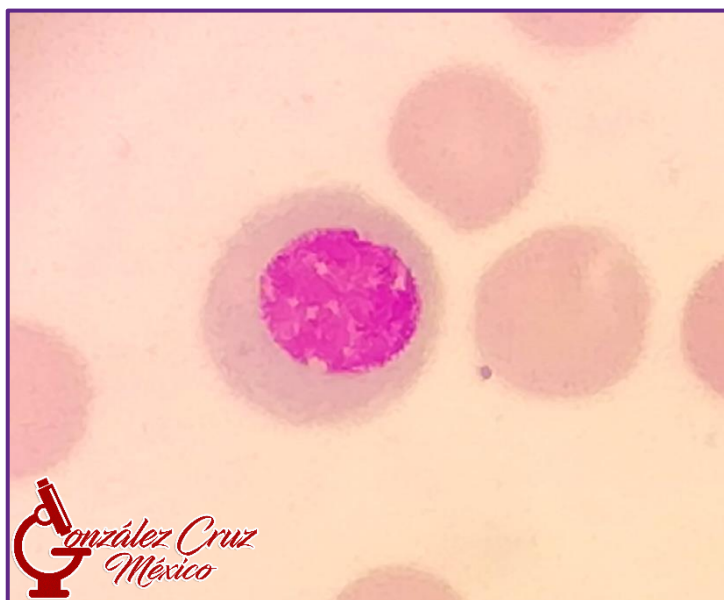
A. Proeritroblasto. B. Eritroblasto basófilo. C. Eritroblastos policromatófilos. Médula ósea. Tinción de Wright.



Eritroblasto policromatófilo. Extendido sanguíneo. Tinción de Wright.



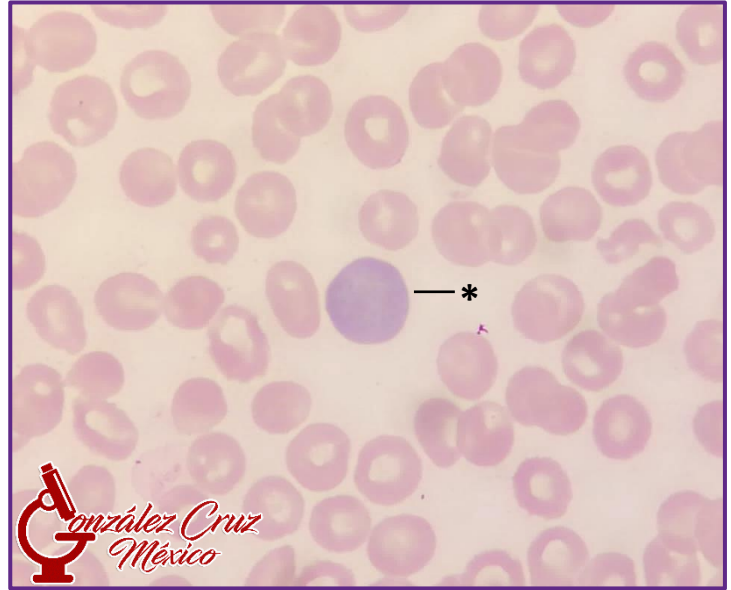
Eritroblasto policromatófilo. Extendido sanguíneo. Tinción de Wright.



Eritroblasto ortocromático. Extendido sanguíneo. Tinción de Wright.

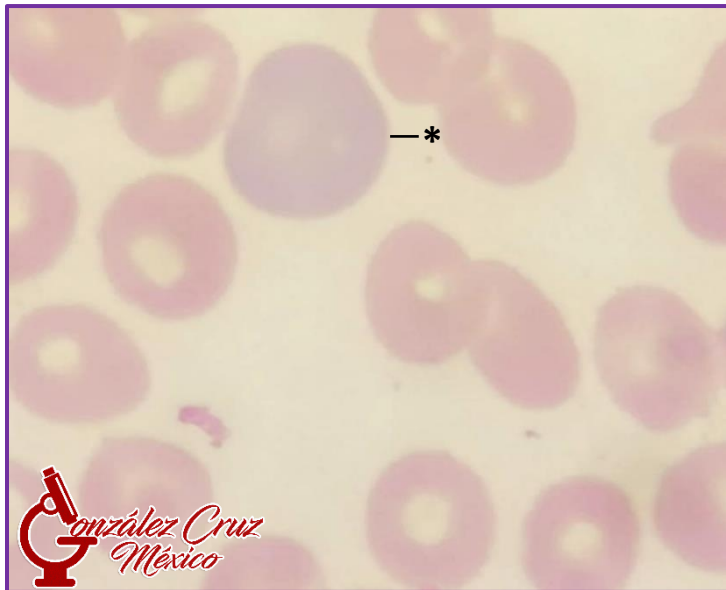
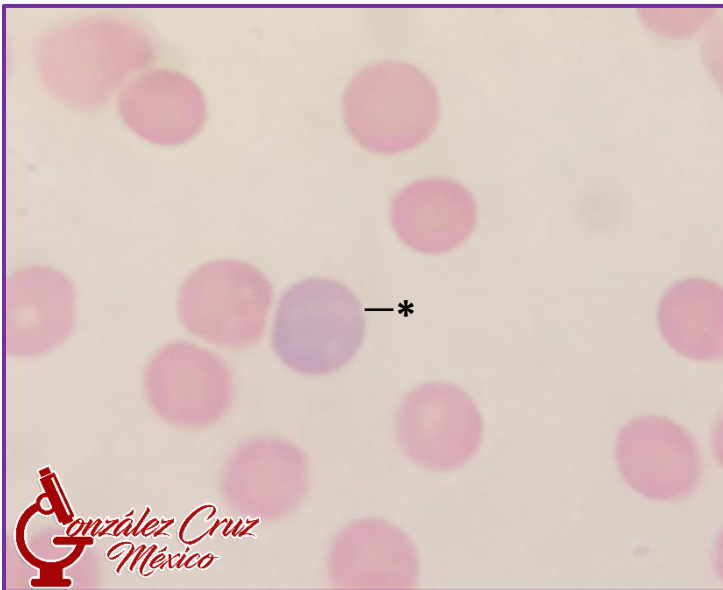


Eritroblasto en mitosis. Médula ósea. Tinción de Wright.



Eritrocitos normales. Basofilia difusa (Reticulocitos de stress) * . Extendido sanguíneo. Tinción de Wright.

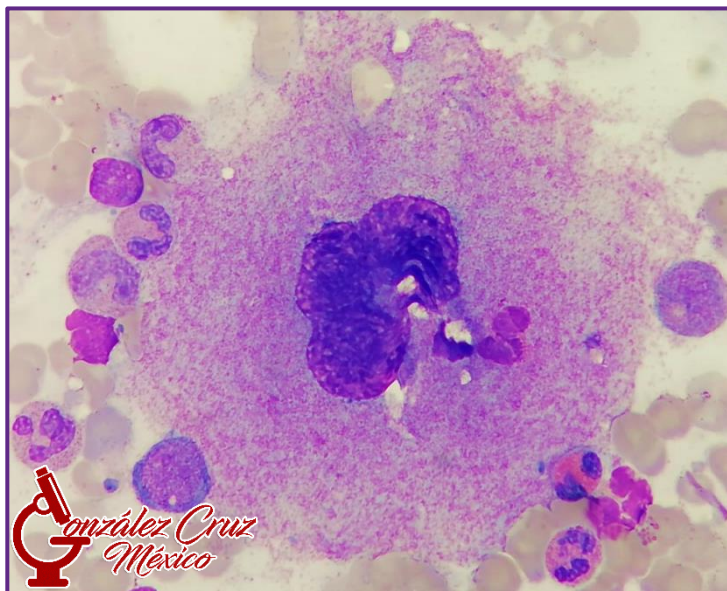
Eritrocitos normales. Basofilia difusa (Reticulocitos de stress) * . Extendido sanguíneo. Tinción de Wright.



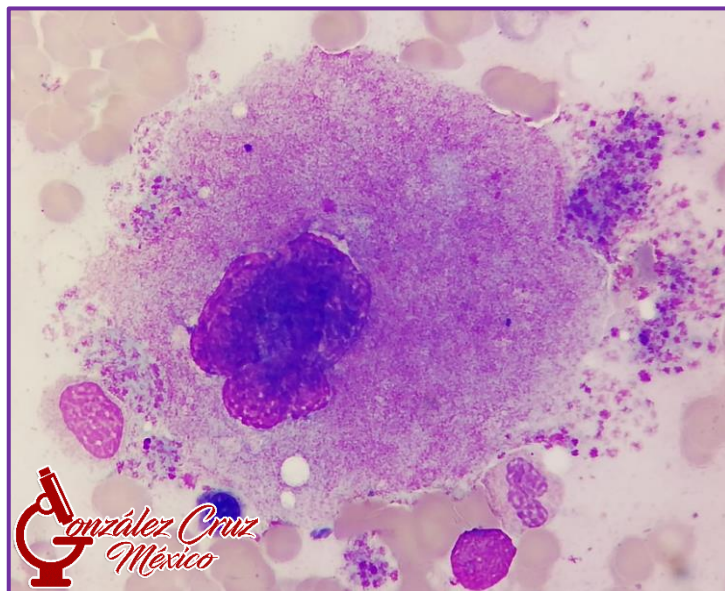
Eritrocitos normales. Basofilia difusa (Reticulocitos de stress) * . Extendido sanguíneo. Tinción de Wright.

Eritrocitos normales. Basofilia difusa (Reticulocitos de stress) * . Extendido sanguíneo. Tinción de Wright.

Megacariocito



Megacariocito. Médula ósea. Tinción de Wright.



Megacariocito. Médula ósea. Tinción de Wright.

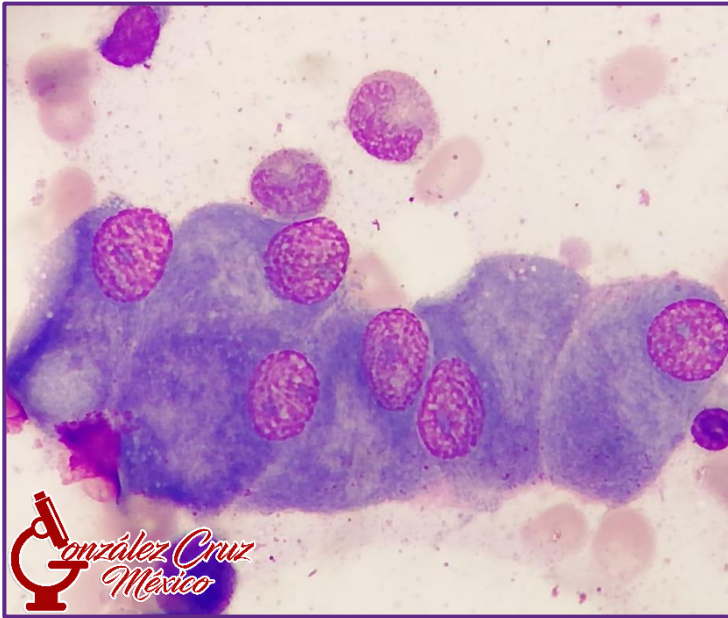
Plaquetas



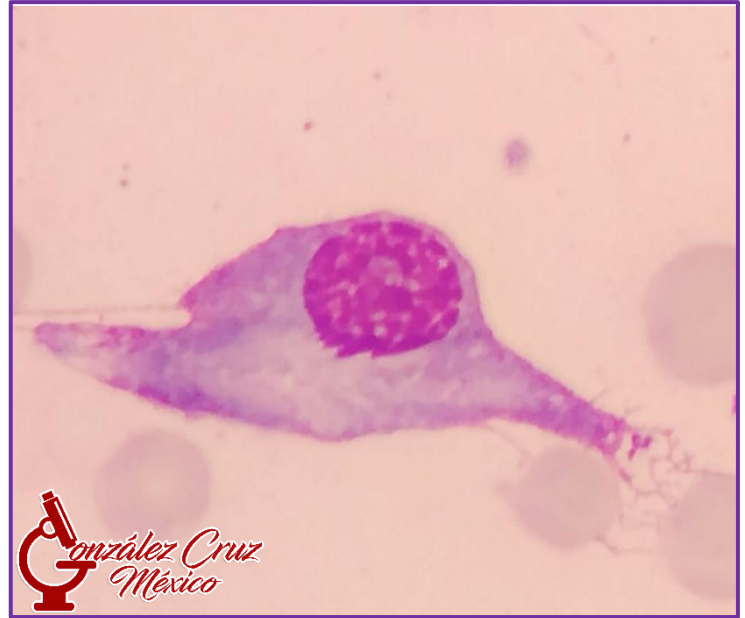
Eritrocitos normales. Plaquetas normales*. Extendido sanguíneo. Tinción de Wright.



Plaquetas normales. Extendido sanguíneo. Tinción de Wright.

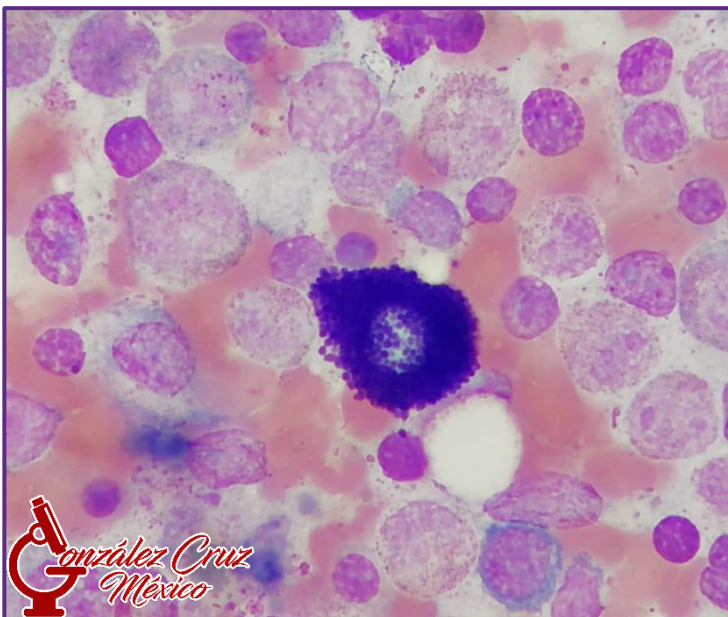


Osteoblasto. Médula ósea. Tinción de Wright.

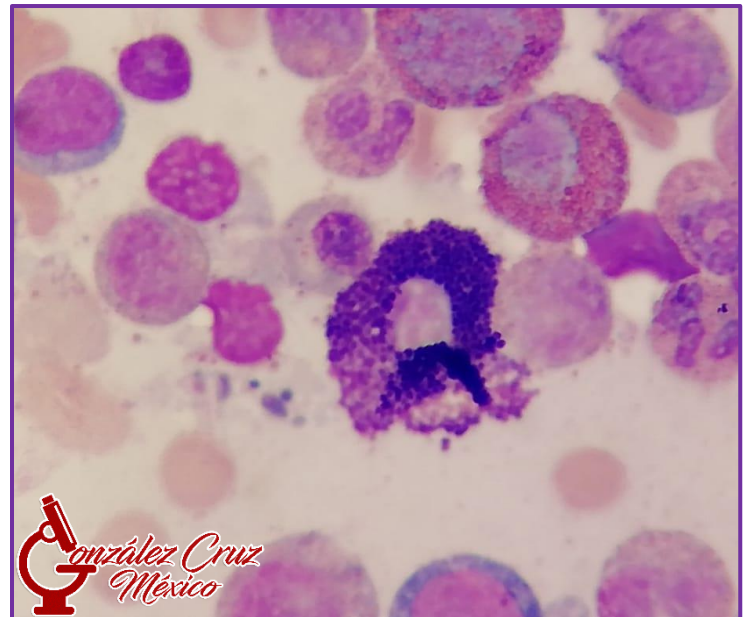


Osteocito Médula ósea. Tinción de Wright.

Mastocito

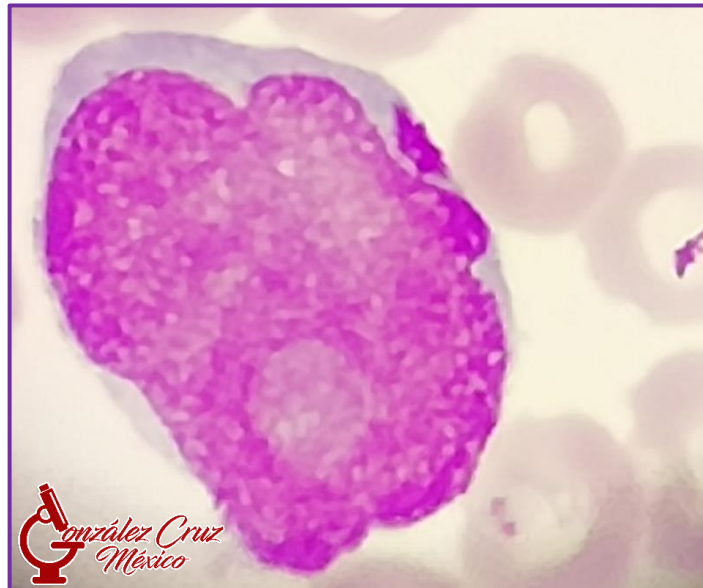
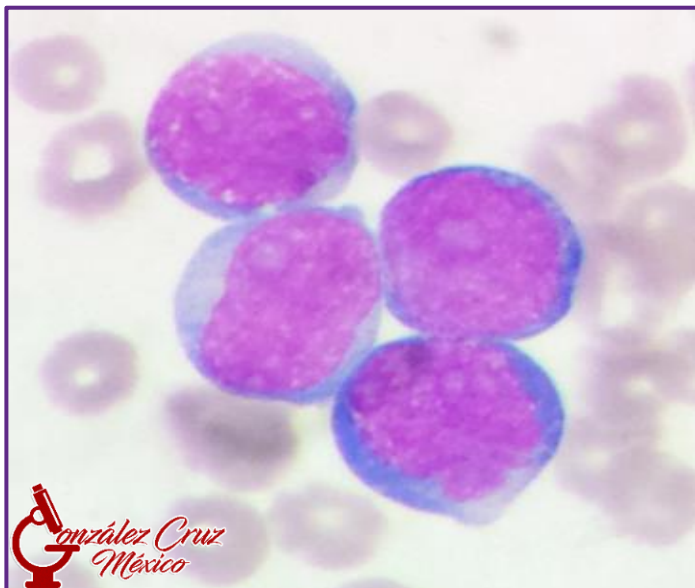


Mastocito. Médula ósea. Tinción de Wright.



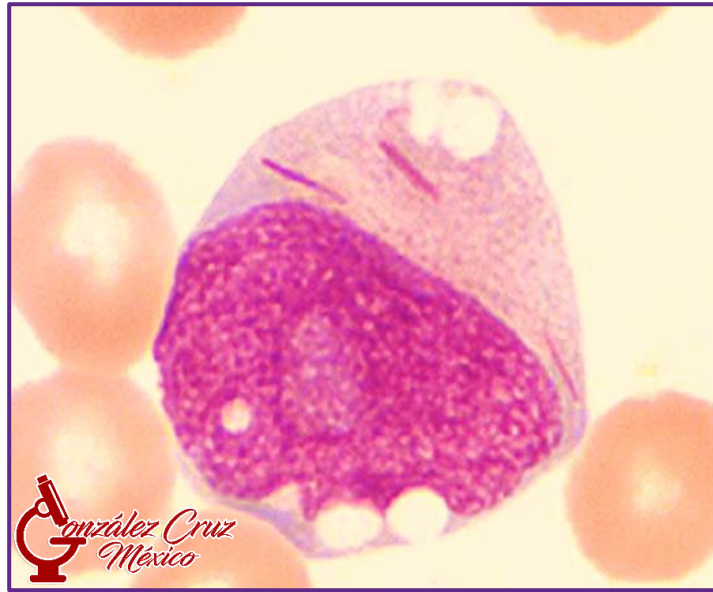
Mastocito. Médula ósea. Tinción de Wright.

Blastos



**Mieloblastos tipo I. Extendido sanguíneo.
Tinción de Wright.**

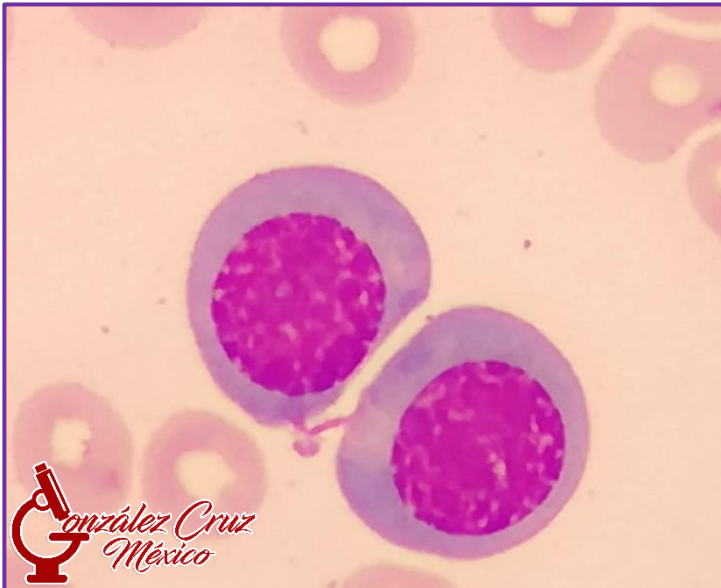
**Mieloblasto tipo II. Extendido sanguíneo.
Tinción de Wright.**



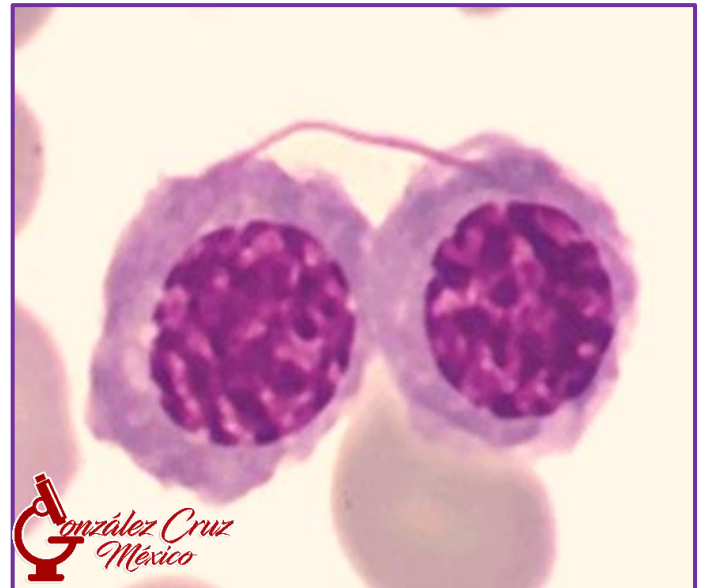
**Mieloblasto tipo II con presencia de bastones
de Auer y vacuolización citoplásmica.
Extendido sanguíneo. Tinción de Wright.**

**Mieloblasto tipo II con presencia de bastones
de Auer y vacuolización citoplásmica.
Extendido sanguíneo. Tinción de Wright.**

Precursores eritroides



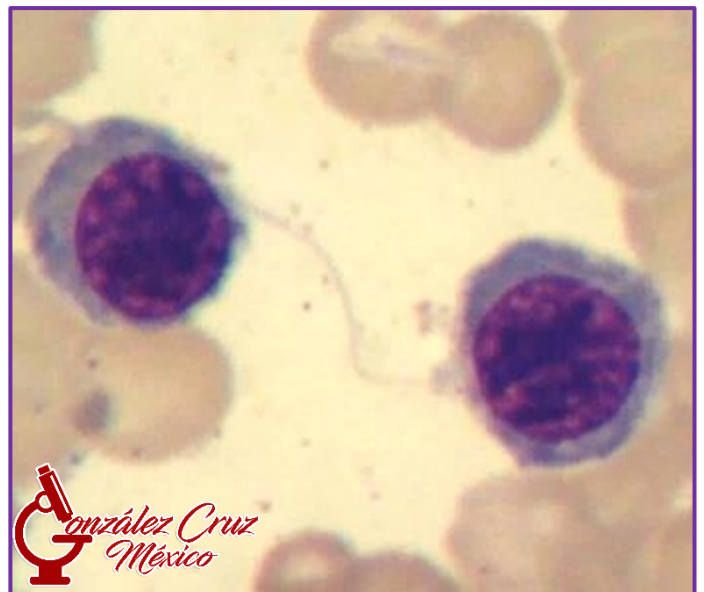
Eritroblastos ortocromáticos haciendo formación de anillo de Cabot. Extendido sanguíneo. Tinción de Wright.



Eritroblastos ortocromáticos haciendo formación de anillo de Cabot. Extendido sanguíneo. Tinción de Wright.

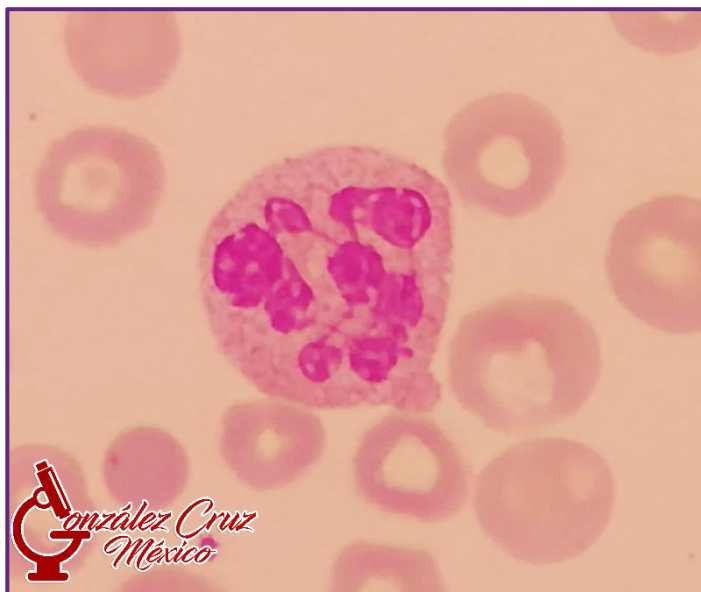


Eritroblastos ortocromáticos haciendo formación de anillo de Cabot. Extendido sanguíneo. Tinción de Wright.

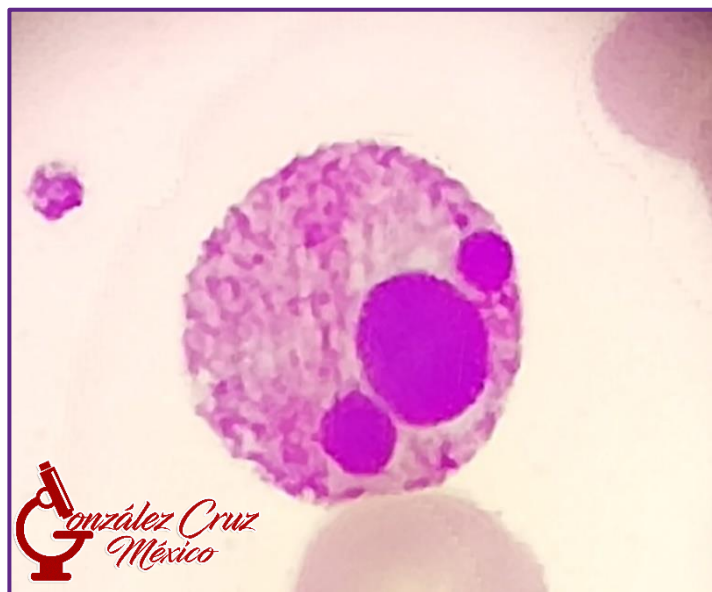


Eritroblastos ortocromáticos haciendo formación de anillo de Cabot. Extendido sanguíneo. Tinción de Wright.

Neutrófilos

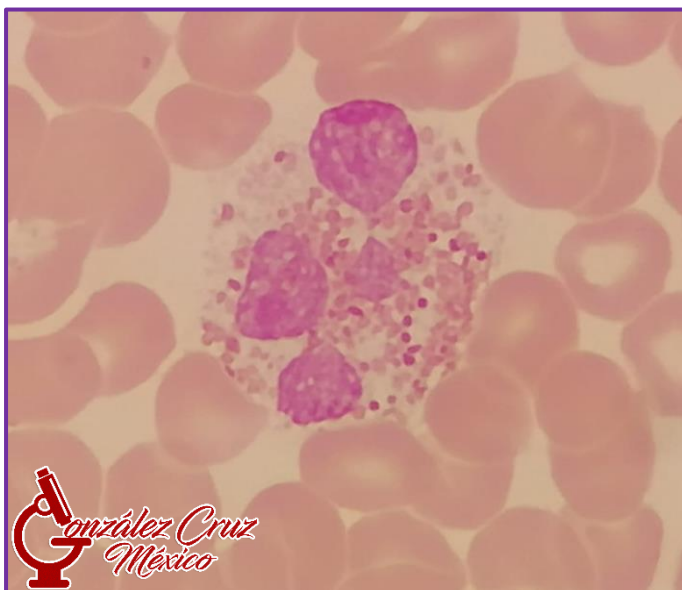


**Neutrófilo segmentado multilobulado.
Extendido sanguíneo. Tinción de Wright.**

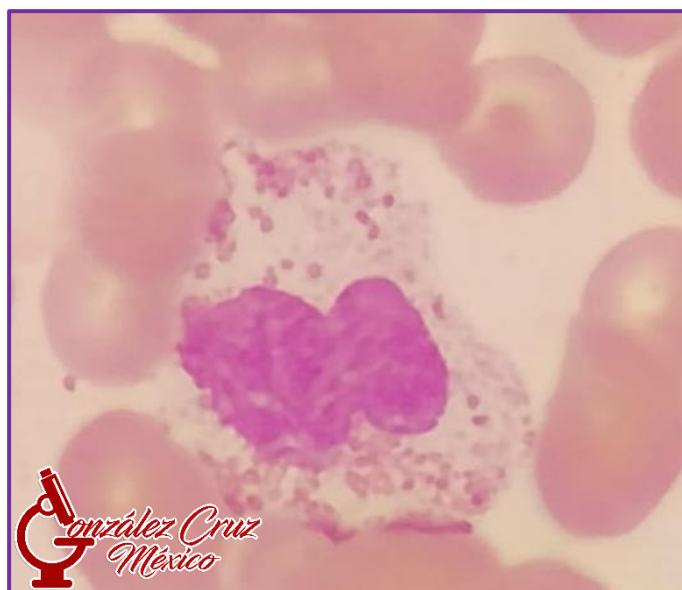


**Núcleo picnótico. Extendido sanguíneo.
Tinción de Wright.**

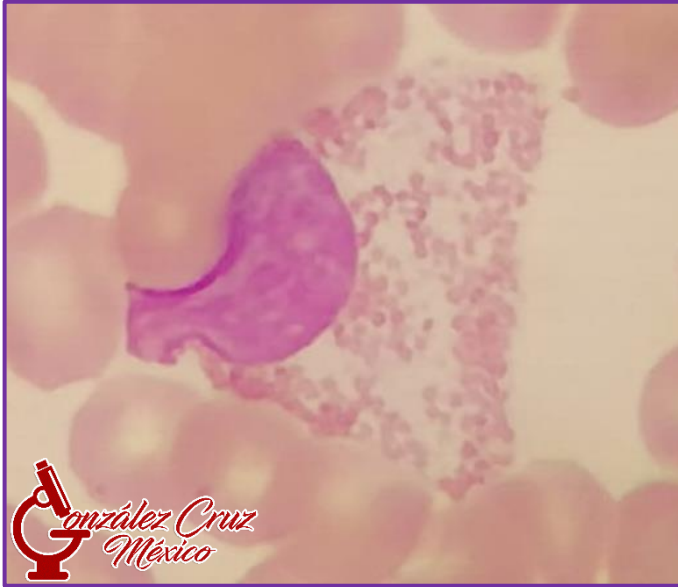
Eosinófilos



**Eosinófilo displásico hipogranular.
Extendido sanguíneo. Tinción de Wright.**



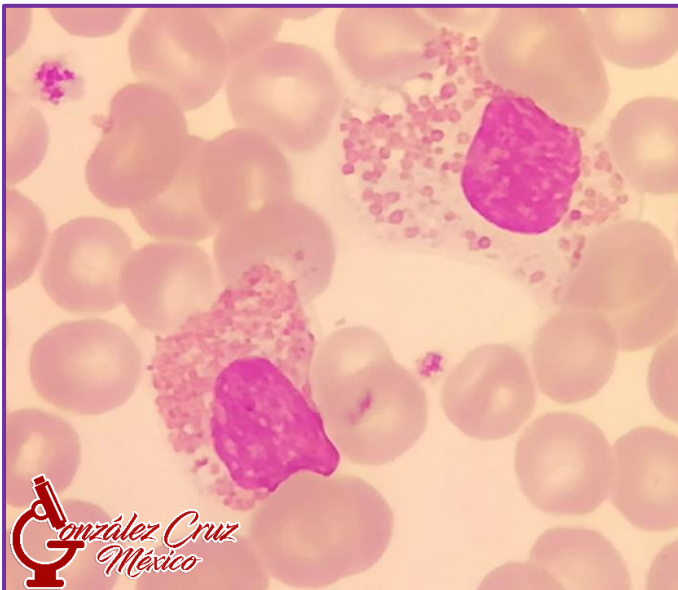
**Eosinófilo displásico hipogranular.
Extendido sanguíneo. Tinción de Wright.**



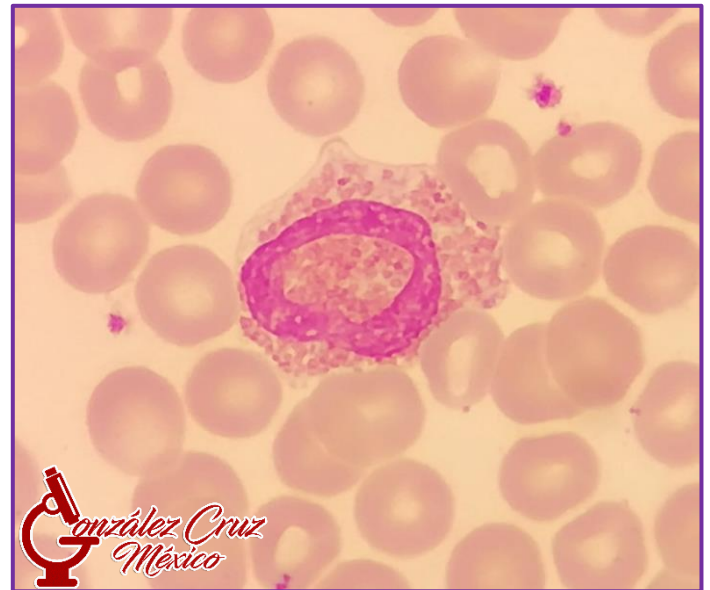
**Eosinófilo displásico hipogranular.
Extendido sanguíneo. Tinción de Wright.**



**Eosinófilo displásico hipogranular.
Extendido sanguíneo. Tinción de Wright.**

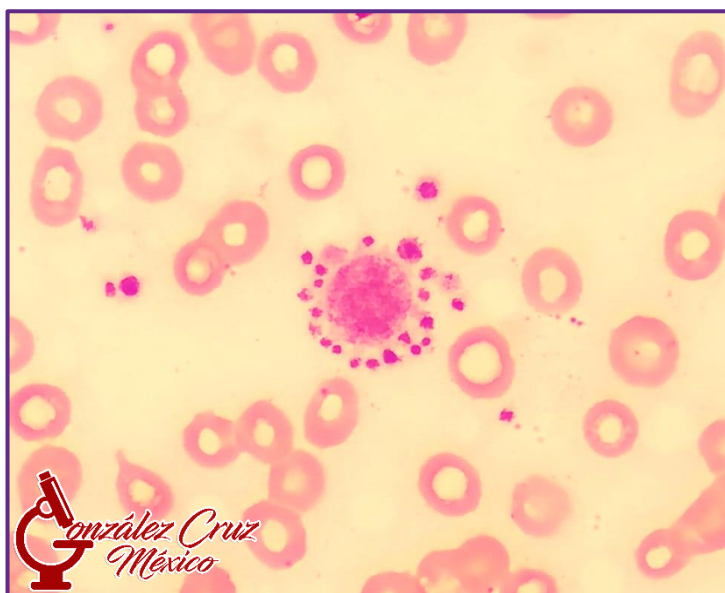


**Eosinófilos displásicos. Extendido
sanguíneo. Tinción de Wright.**

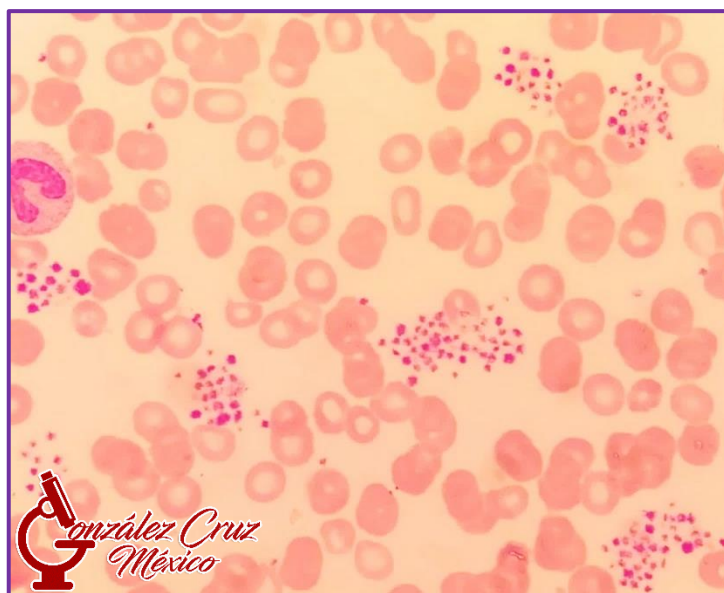


**Eosinófilo displásico en forma de dona.
Síndrome hipereosinofílico. Extendido
sanguíneo. Tinción de Wright.**

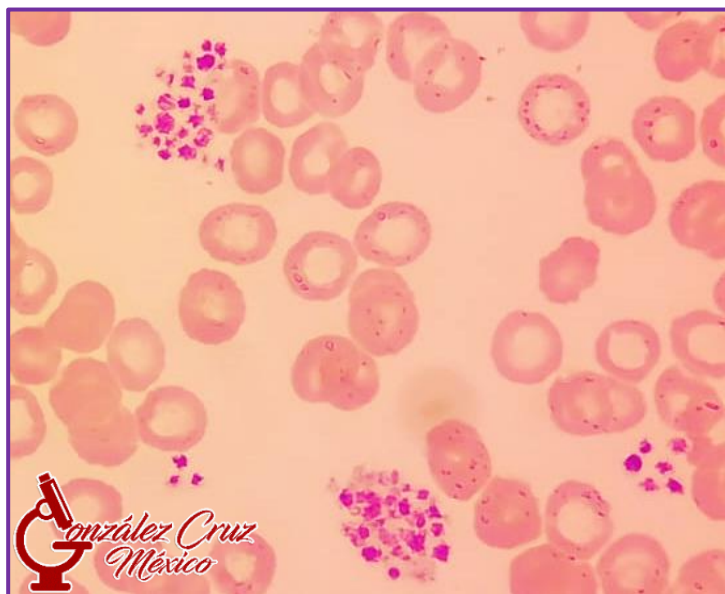
Plaquetas



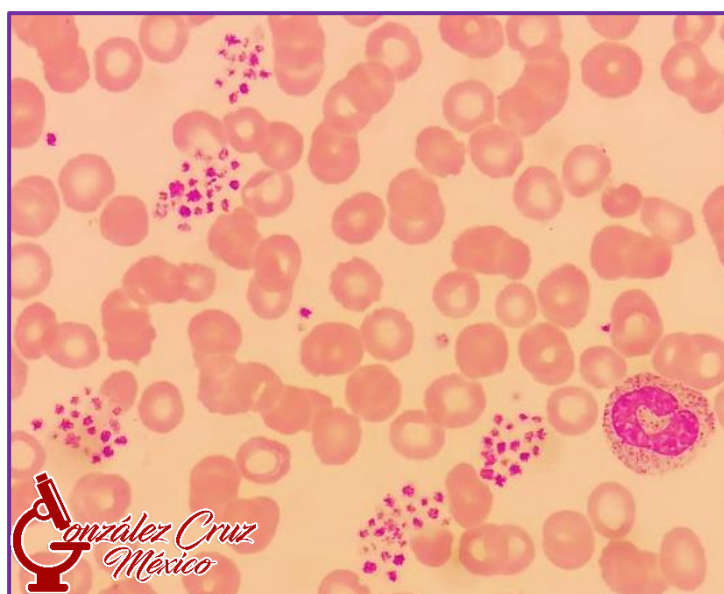
Satelitismo plaquetario. Extendido sanguíneo. Tinción de Wright.



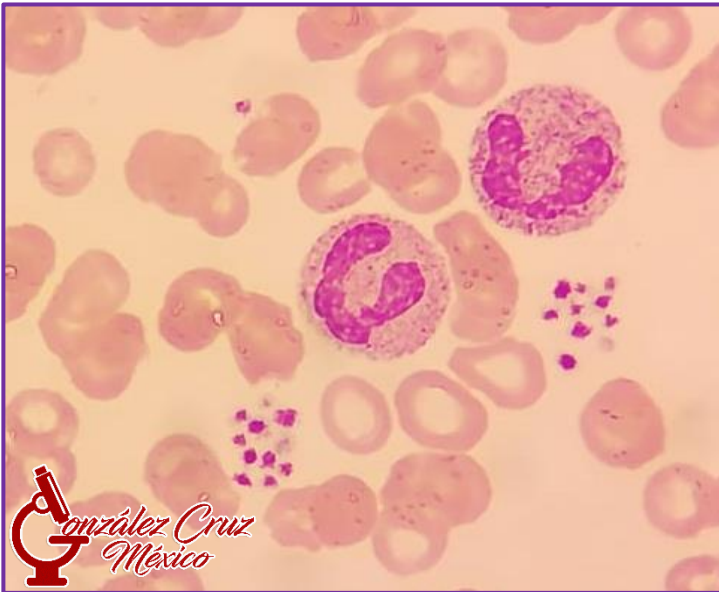
Agregados plaquetarios. Extendido sanguíneo. Tinción de Wright.



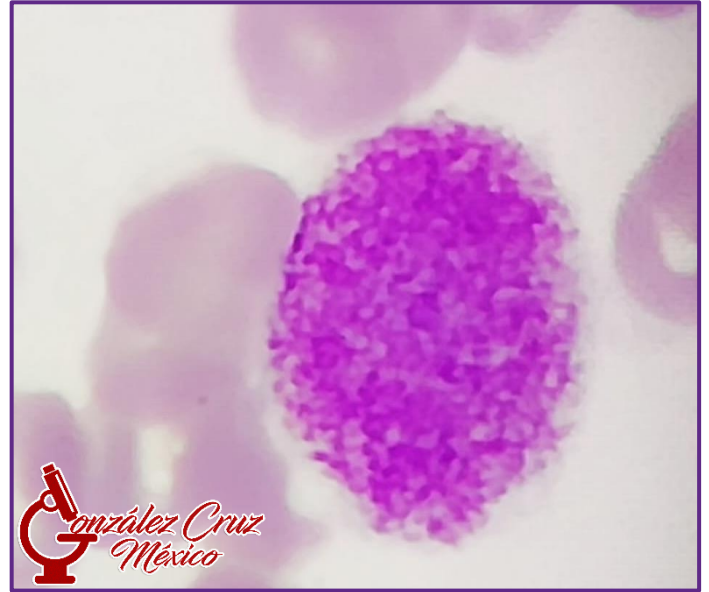
Agregados plaquetarios. Extendido sanguíneo. Tinción de Wright.



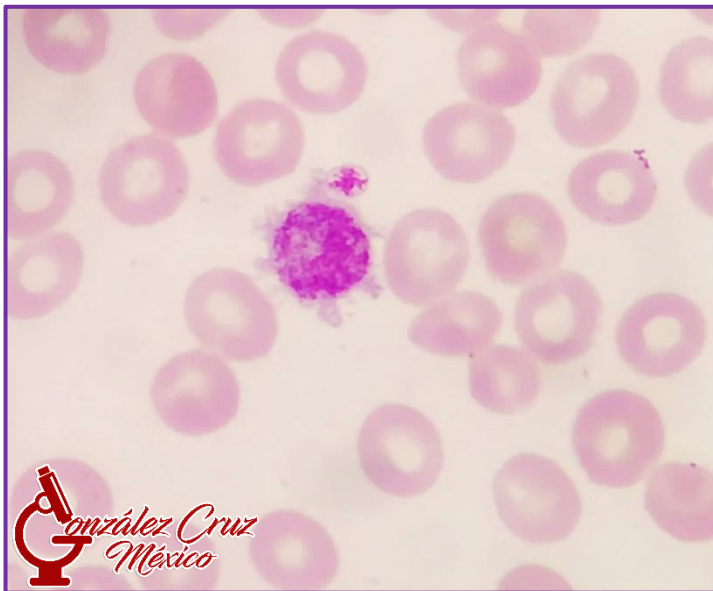
Agregados plaquetarios. Extendido sanguíneo. Tinción de Wright.



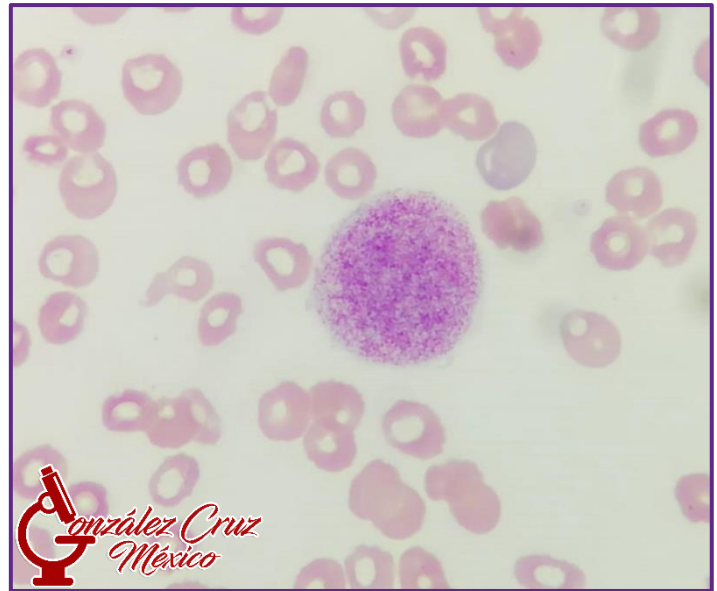
Agregados plaquetarios. Extendido sanguíneo. Tinción de Wright.



Plaqueta gigante. Extendido sanguíneo. Tinción de Wright.

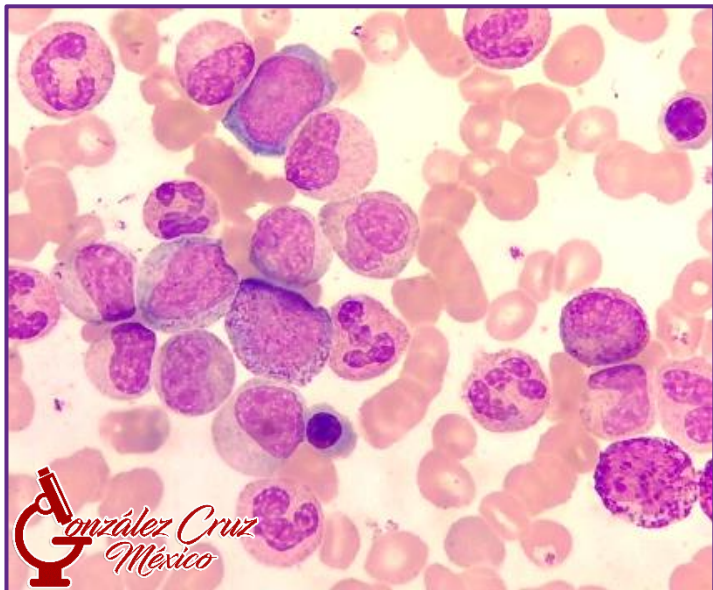


Plaqueta gigante. Extendido sanguíneo. Tinción de Wright.

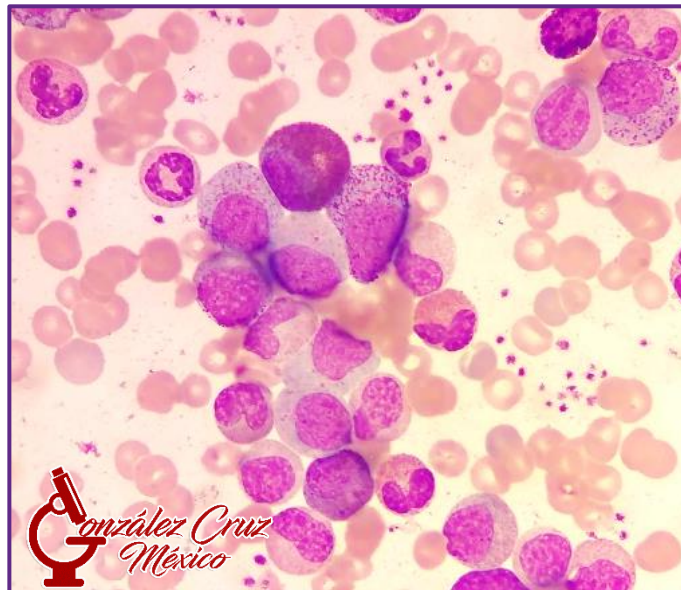


Plaqueta gigante. Extendido sanguíneo. Tinción de Wright.

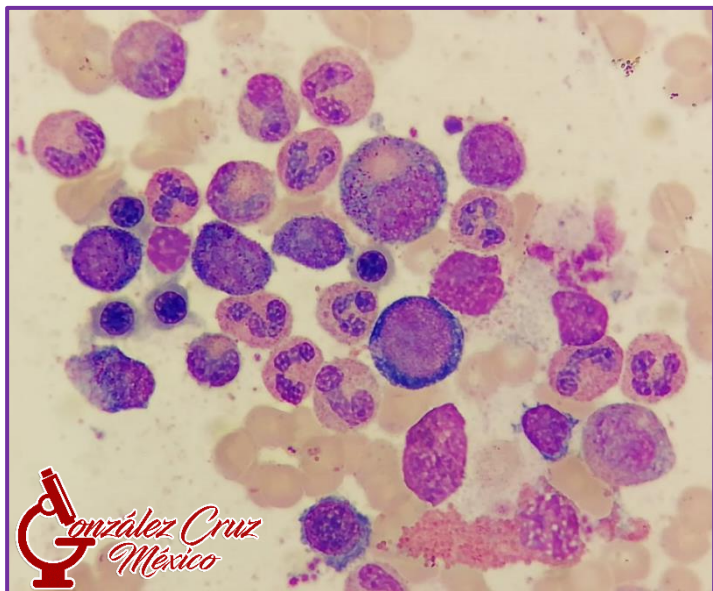
Leucemias



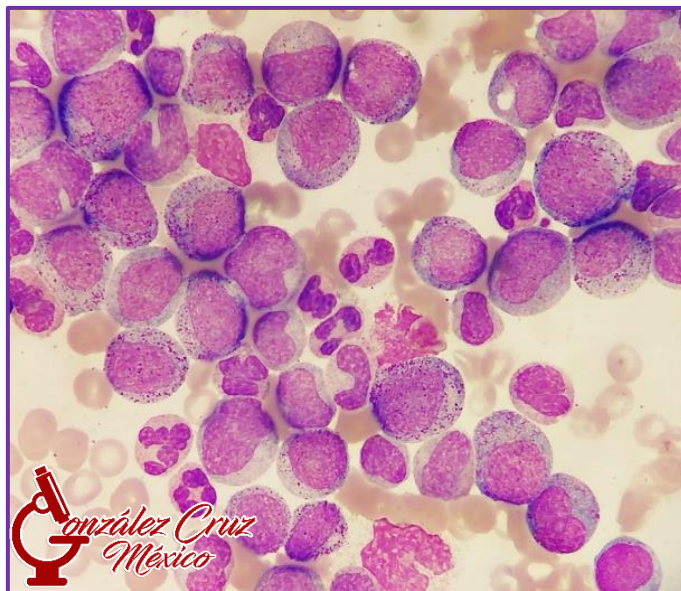
Leucemia granulocítica crónica. Médula ósea. Tinción de Wright.



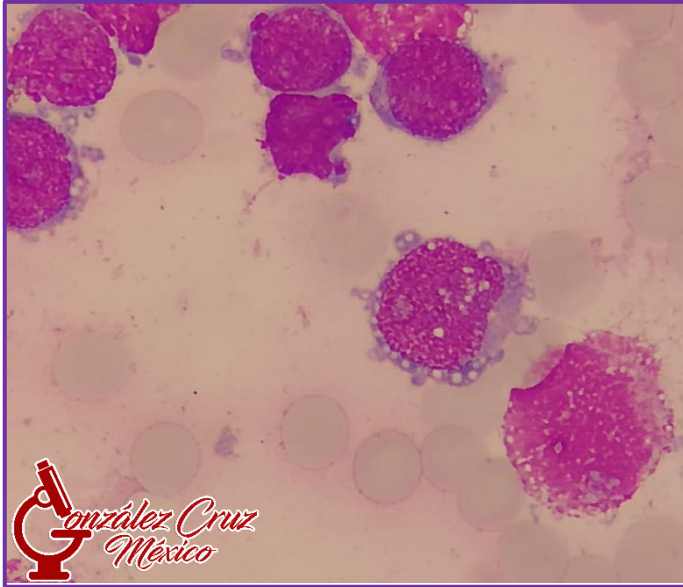
Leucemia granulocítica crónica. Médula ósea. Tinción de Wright.



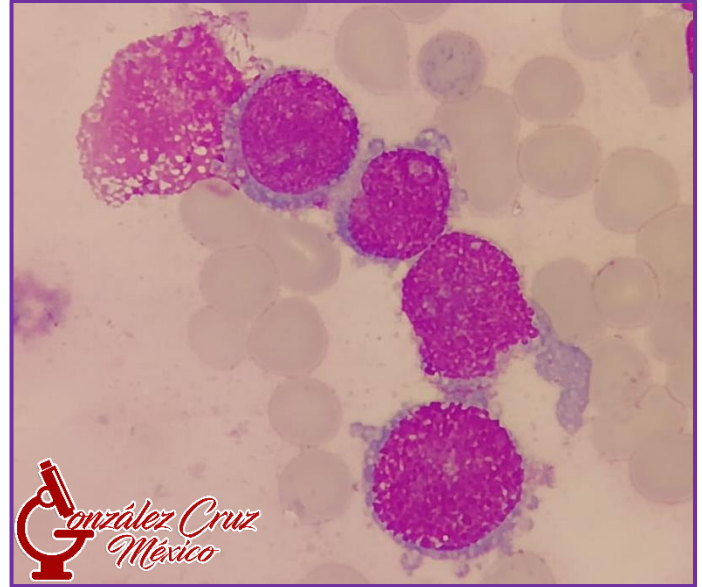
Leucemia granulocítica crónica. Médula ósea. Tinción de Wright.



Leucemia promielocítica (M3). Médula ósea. Tinción de Wright.

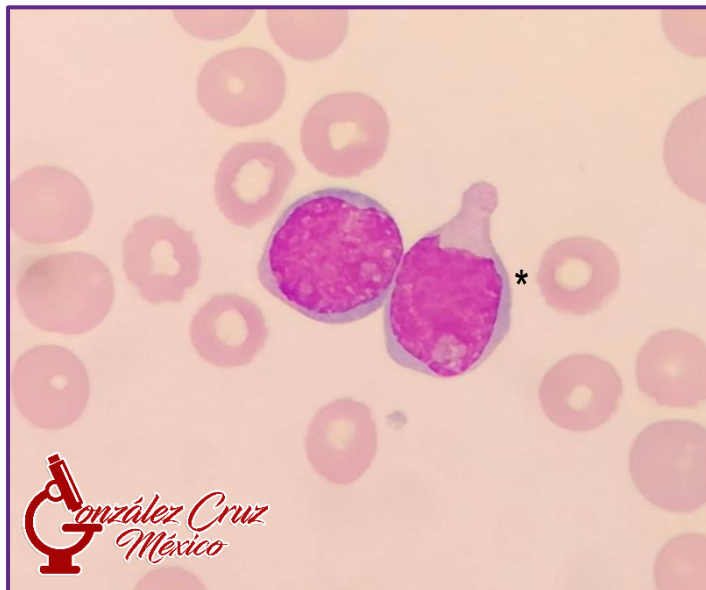


Leucemia megacarioblástica (M7). Médula ósea. Tinción de Wright.

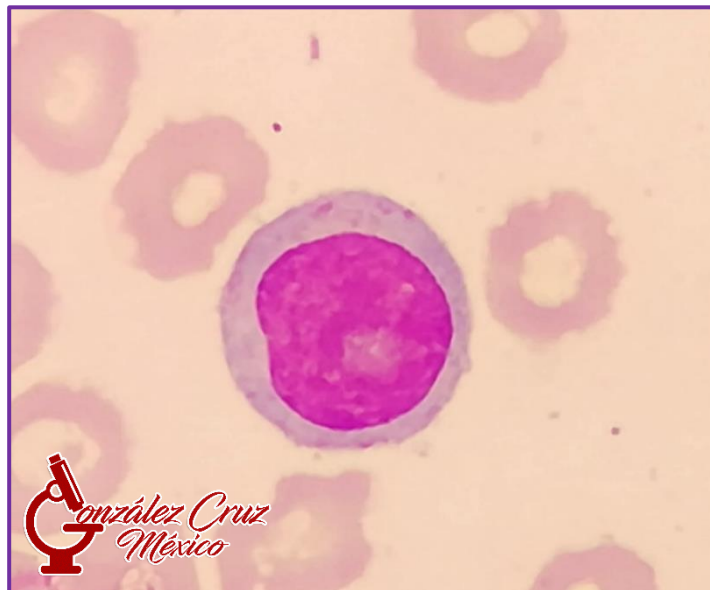


Leucemia megacarioblástica (M7). Médula ósea. Tinción de Wright.

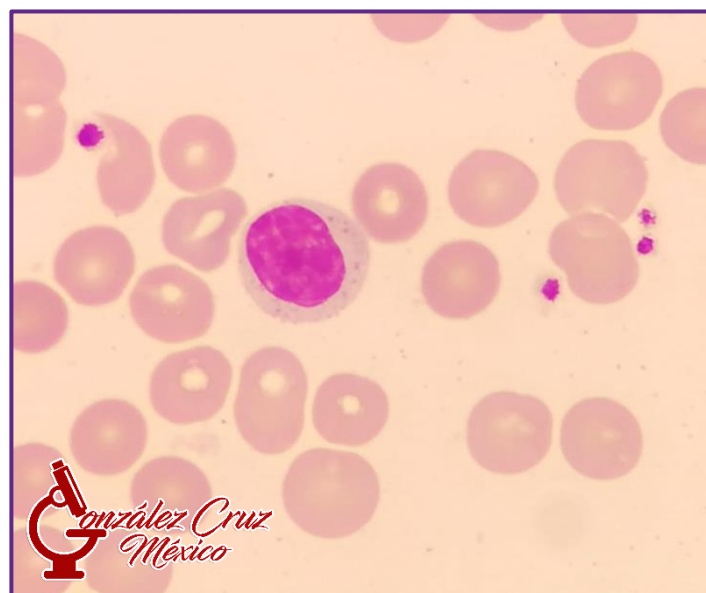
Celularidad linfoide



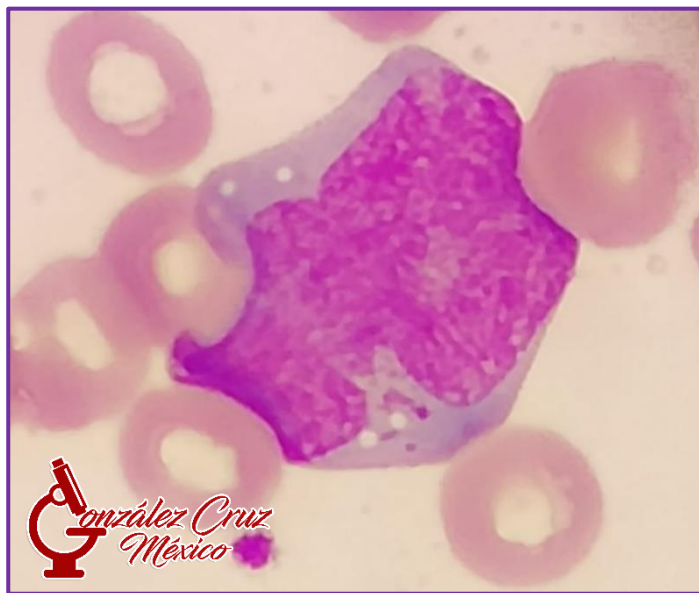
Linfoblastos, forma de raqueta*. Extendido sanguíneo. Tinción de Wright.



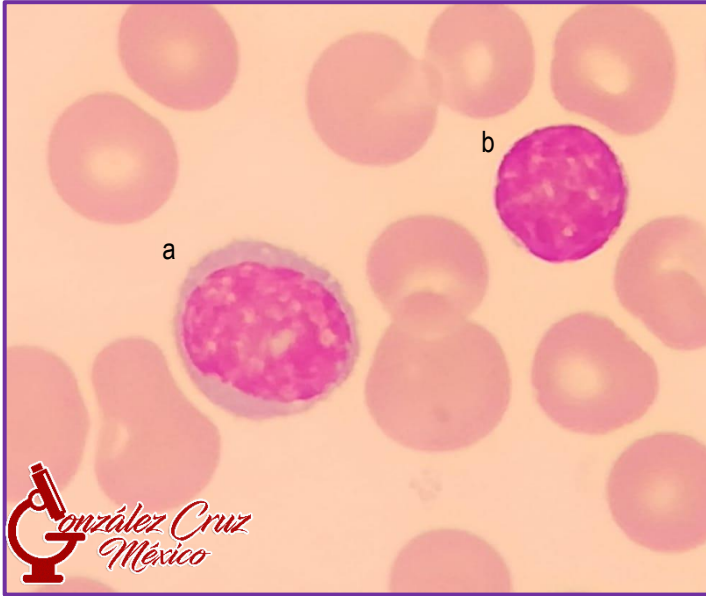
Prolinfocito. Extendido sanguíneo. Tinción de Wright.



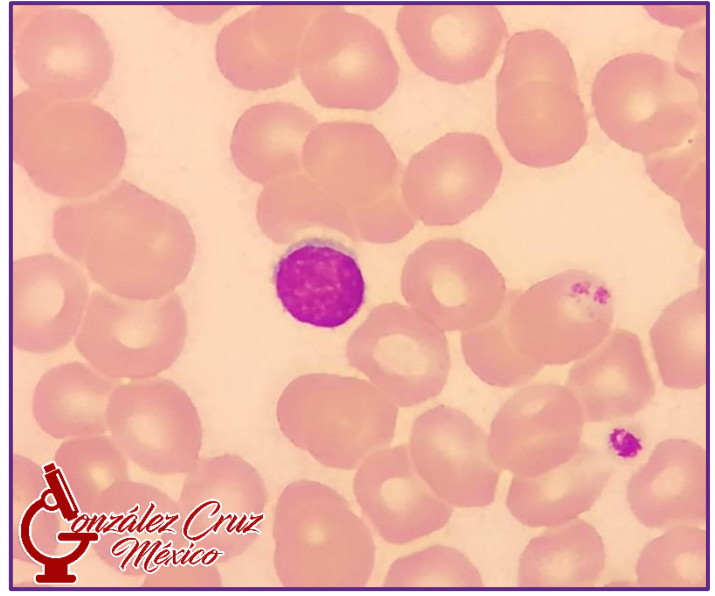
Linfocito tamaño medio. Extendido sanguíneo. Tinción de Wright.



Linfocito T activado. Extendido sanguíneo. Tinción de Wright.

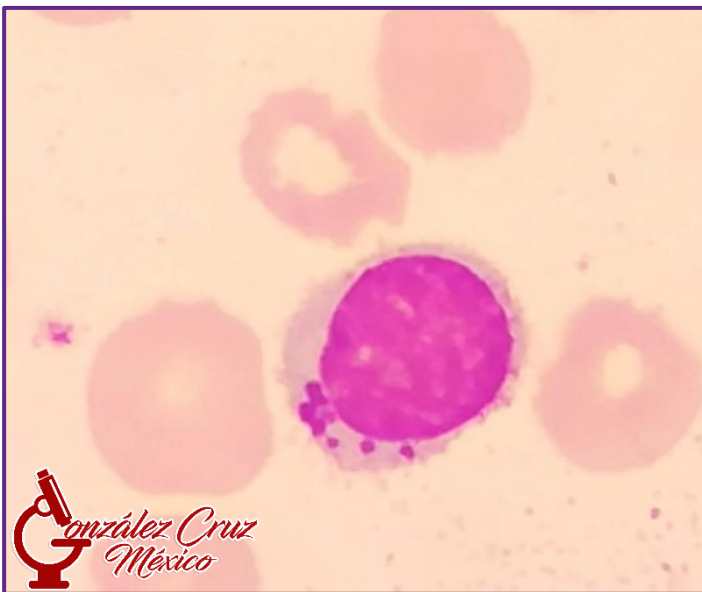


Linfocitos de tamaño medio (a) y pequeño (b).
Extendido sanguíneo. Tinción de Wright.

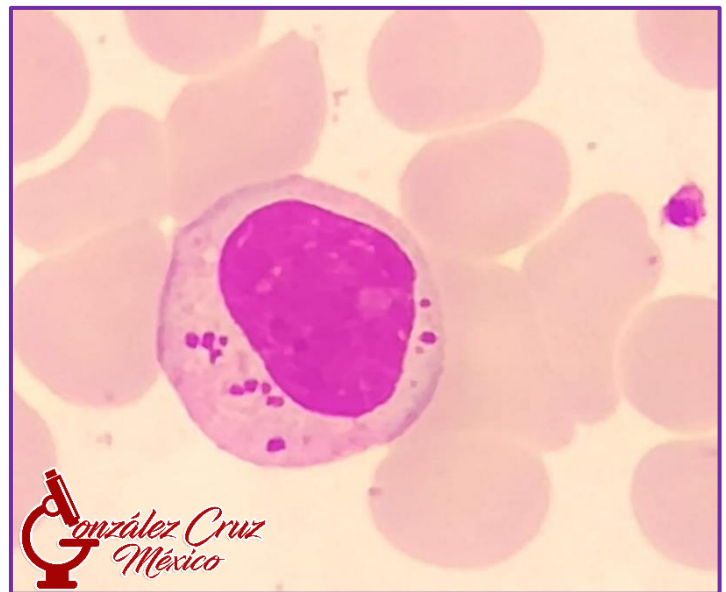


Linfocito pequeño. Extendido sanguíneo.
Tinción de Wright.

Linfocito NK

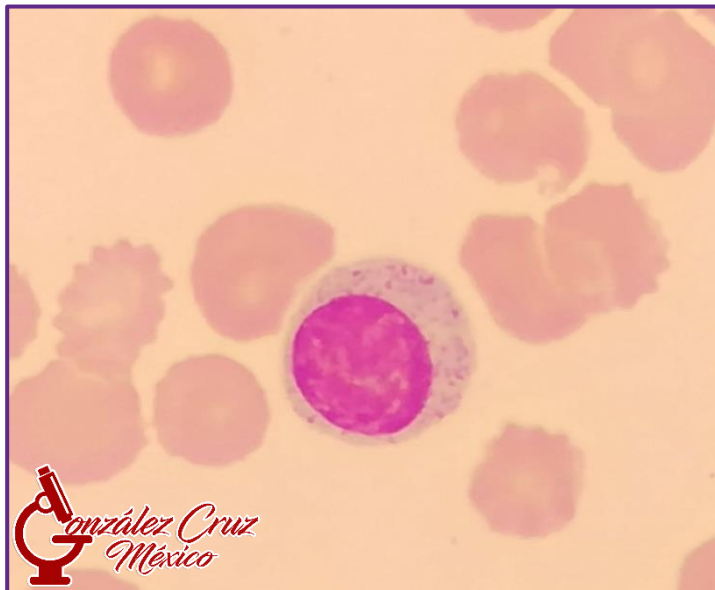


Linfocito medio granular NK. Extendido
sanguíneo. Tinción de Wright.



Linfocito medio granular NK. Extendido
sanguíneo. Tinción de Wright.

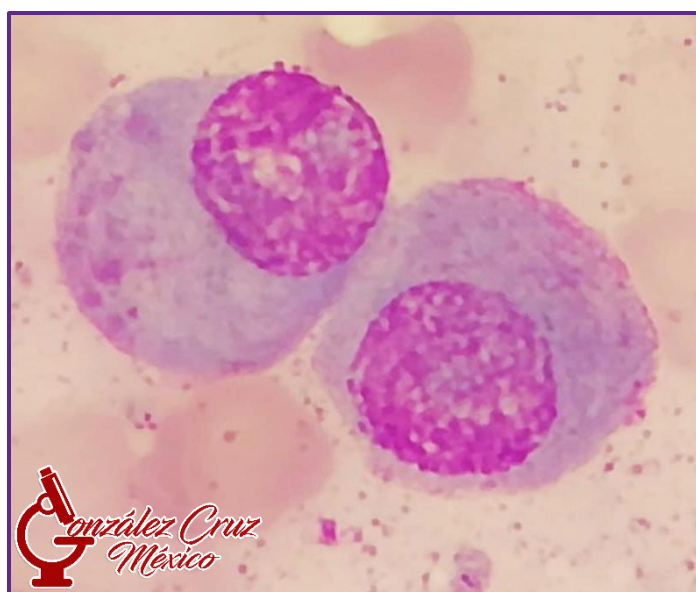
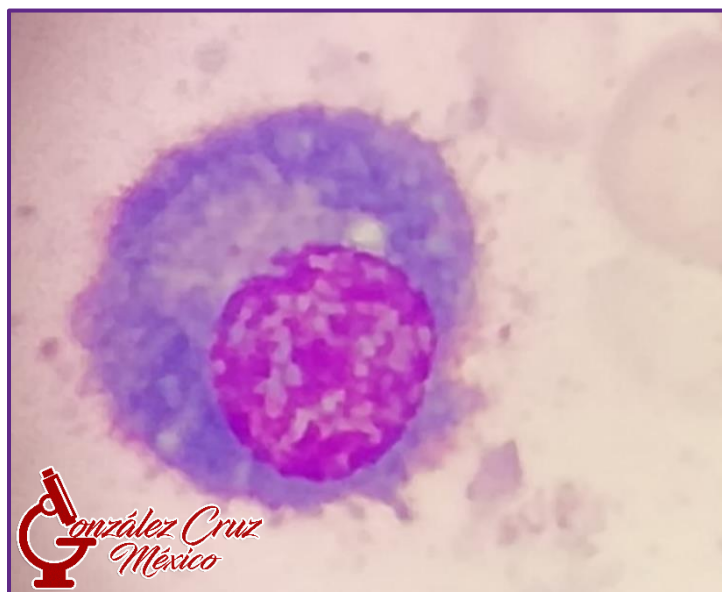
Linfocito de aspecto plasmocitoide



Linfocito de aspecto plasmocitoide.
Extendido sanguíneo. Tinción de Wright.

Linfocito de aspecto plasmocitoide.
Extendido sanguíneo. Tinción de Wright.

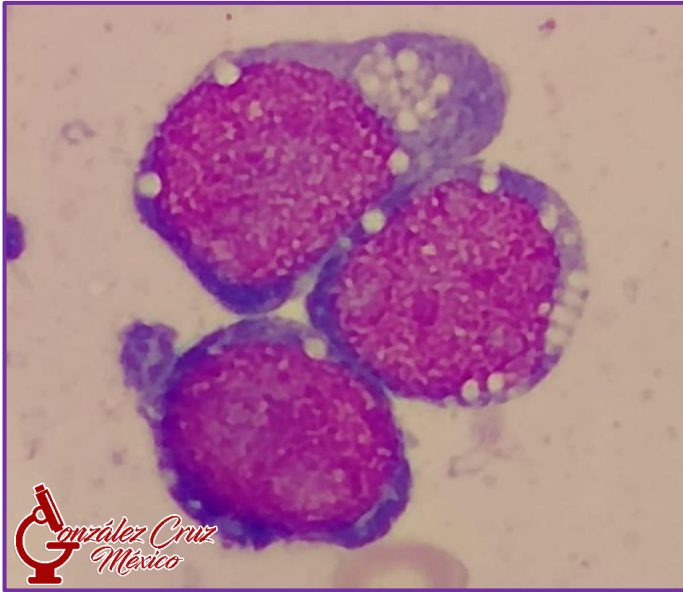
Célula plasmática



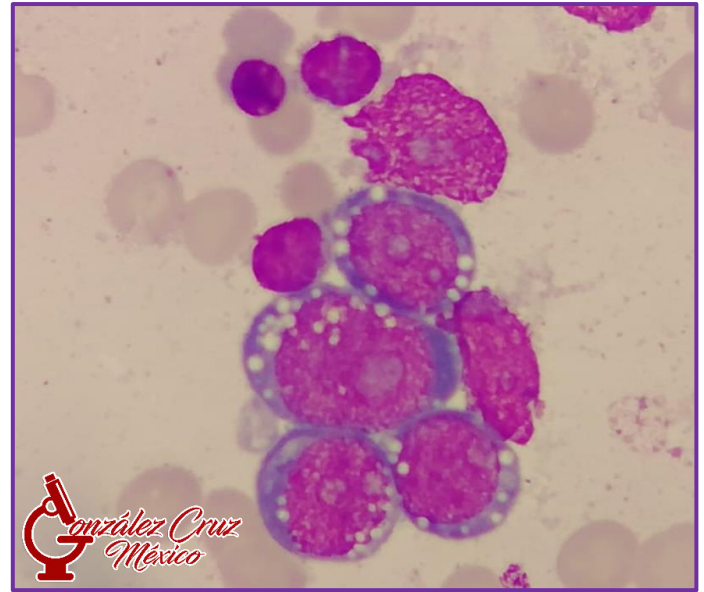
Célula plasmática. Médula ósea. Tinción de
Wright.

Célula plasmática. Médula ósea. Tinción de
Wright.

Linfoma de Burkitt

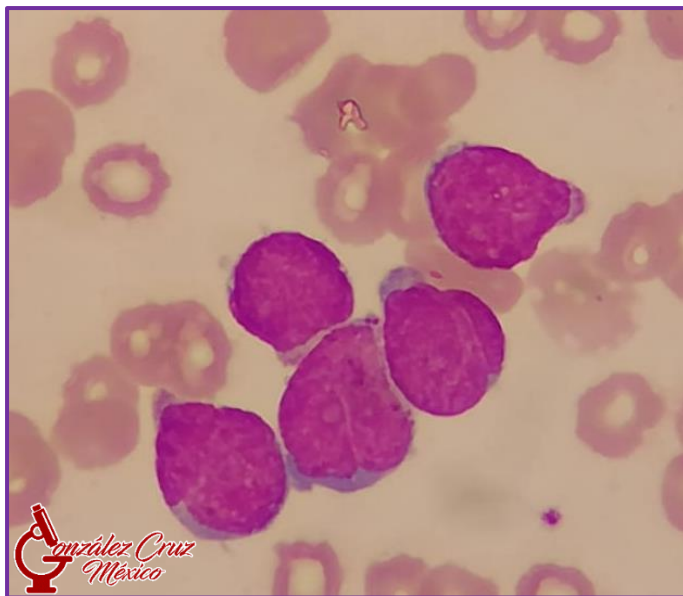


Células de tipo cielo estrellado, citoplasma turquesa, vacuolización abundante. Linfoma de Burkitt. Extendido sanguíneo. Tinción de Wright.

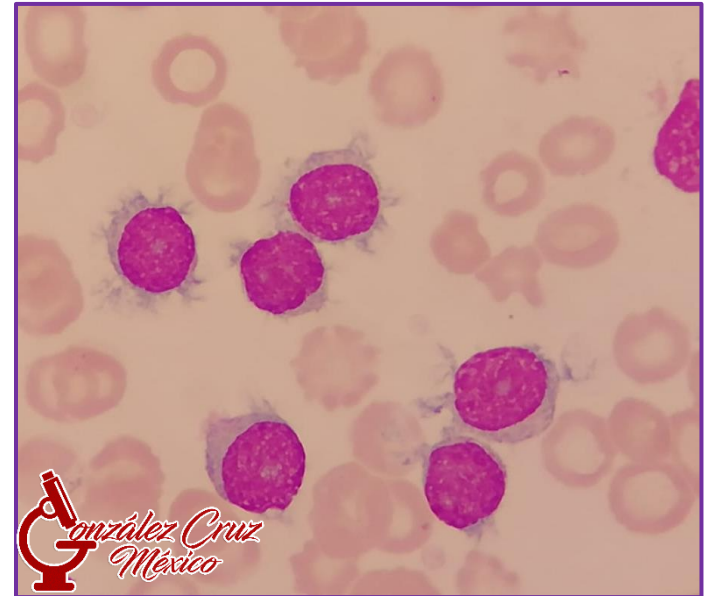


Células de tipo cielo estrellado, citoplasma turquesa, vacuolización abundante. Linfoma de Burkitt. Extendido sanguíneo. Tinción de Wright.

Leucemias



Leucemia linfoblástica. Extendido sanguíneo. Tinción de Wright.



Células peludas. Tricoleucemia. Extendido sanguíneo. Tinción de Wright

Tinción Azul de Cresil Brillante

Una coloración supravital colorea a las células antes del cese de las actividades celulares, después de la muerte somática pero antes de que ocurra una muerte molecular, justo después de que estas han sido extraídas del organismo.

La capacidad o grado de regeneración de eritrocitos en médula ósea se puede determinar con el recuento de reticulocitos en sangre periférica, por lo que tiene importancia clínica en la orientación diagnóstica y de pronóstico terapéutico. Los reticulocitos son eritrocitos inmaduros, que contienen remanentes citoplasmáticos de ácido ribonucleico y organelos como mitocondrias y ribosomas, los cuales les permiten continuar con la síntesis de hemoglobina a pesar de que en este precursor ya no hay núcleo celular. Se han identificado cuatro formas de maduración en el reticulocito de acuerdo con la cantidad de ribonucleoproteínas que presenten, forma de ovillo (I), reticular incompleta (II), reticular completa (III) y granular (IV), generalmente en sangre periférica se logran observar los grados III y IV.



Figura 1. Formas de presentación en la visualización de los reticulocitos

FUNDAMENTO

Cuando la sangre se incuba brevemente en la solución de azul cresil brillante, el ARN se precipita como un complejo colorante-ribonucleoproteína.

Azul de cresil brillante para Cuerpos de Döhle

En una maduración granulocítica acelerada, la célula granulocítica contiene en su interior restos del retículo endoplásmico rugoso que contiene ribosomas y también RNA ribosomal que precipita con el colorante por la carga negativa del mismo, virando a una tonalidad azul-gris pálida como se muestra en los cuerpos de Döhle.

Azul de cresil brillante para blastos

La tinción azul de cresil brillante, al precipitar ribonucleoproteínas, también permite teñir nucleolos (organelos característicos de células inmaduras) debido a los miles de ribosomas que estos contienen. El uso de este colorante permite evidenciar con más facilidad los nucleolos que probablemente, para el ojo no experto, no sería posible visualizar en los extendidos sanguíneos tratados con alguna tinción de Romanowsky.

INTERPRETACIÓN

Para la identificación de reticulocitos

Microscópicamente, los reticulocitos son de un color azul y el complejo aparece como una fina malla (retículo o trenza filamentosa) de color morado-azul intenso o al menos dos pequeños gránulos de color azul que permiten que los reticulocitos sean identificados. Los remanentes de ARN en un reticulocito no son refringentes.

Los resultados se informan tanto en porcentaje y en cifras absolutas (importante en caso de bajo número de eritrocitos) reticulocitos/ μl (mm^3). Se dice que la médula ósea no responde cuando existen números bajos de reticulocitos, como en una médula ósea hipoproliferativa (anemias aplásicas e hipoplásicas) o en una eritropoyesis ineficaz (anemias megaloblásticas), en cambio, números altos indican una respuesta por parte de la médula ósea a la anemia producida por hemólisis, pérdida sanguínea o tratamiento.

Para la identificación de blastos

Morfológicamente se observan como células claras, grumosas y dependiendo de la cantidad de nucleolos presentes en la célula (en el núcleo), estos se observan como estructuras circulares pequeñas, medianas y grandes, de color azul intenso bien definido, que corresponden a los nucleolos propios de la célula blástica.

Para la identificación de Cuerpos de Döhle

Estas estructuras se localizan en el citoplasma de la célula, morfológicamente se observan como cuerpos débilmente basófilos a extremadamente basófilos (de color azul intenso) se pueden presentar de forma única o de en cantidad variable. Entre más cuerpos de Döhle se presenten es indicativo de que la célula salió a circulación de forma más prematura.

REACTIVOS

1. Solución de citrato salino al 0.4 %

Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂	00.1 g
NaCl	0.225 g
Agua destilada	25.0 ml

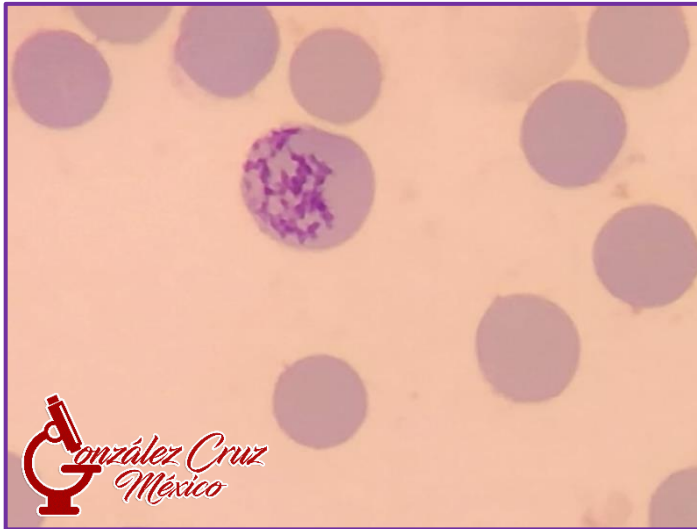
2. Solución colorante de azul de cresil brillante al 1%

Azul de cresil brillante	0.25 g
Solución de citrato salino al 0.4%	25.0 ml

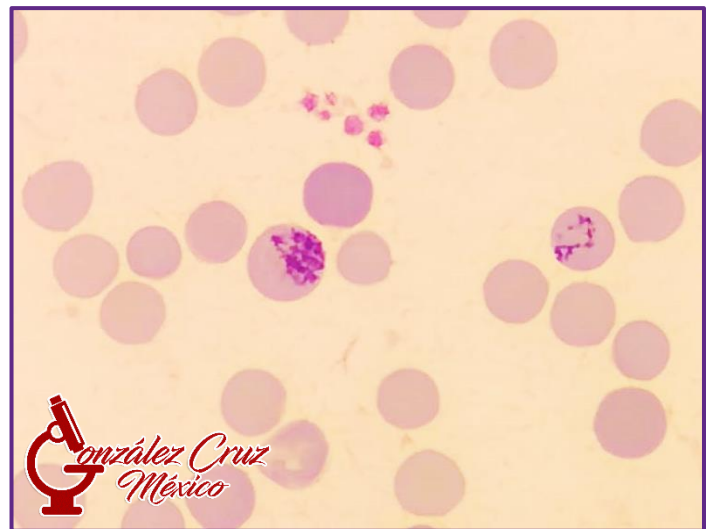
TÉCNICA

1. En un tubo de ensaye de 12 x 75 mm colocar 3 gotas de sangre y agregar 3 gotas de azul de cresil brillante; tapar el tubo y mezclar.
2. Incubar a 37 °C manteniendo tapado el tubo para evitar la evaporación.
3. Preparar el extendido de la mezcla a los 10 minutos y secarlo al aire.
4. Observar al microscopio en objetivo de inmersión.

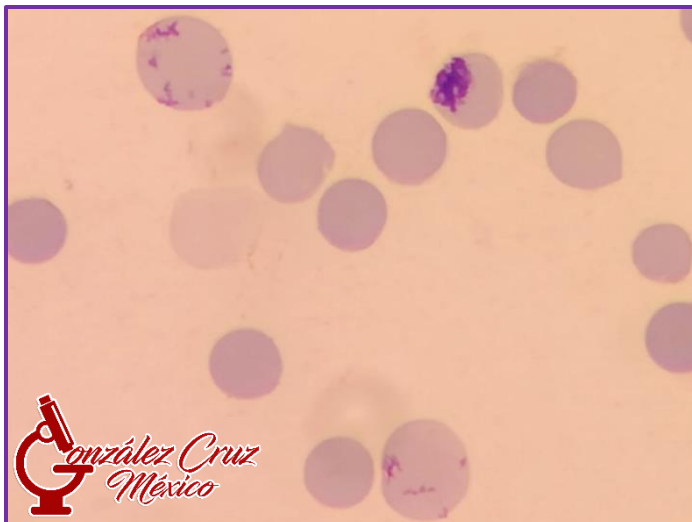
Reticulocitos



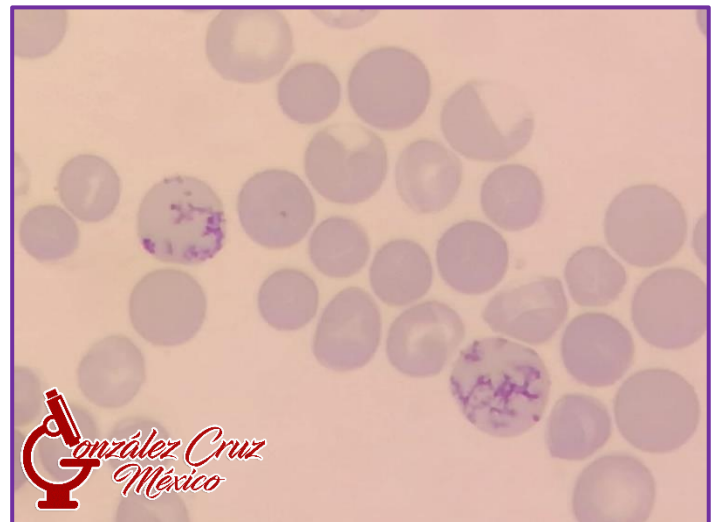
Reticulocitos. Sangre periférica. Tinción azul de cresil brillante.



Reticulocitos. Sangre periférica. Tinción azul de cresil brillante.

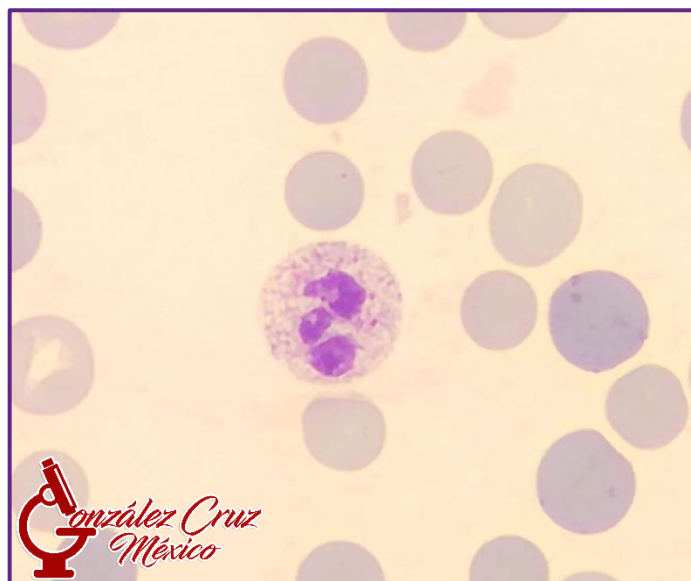


Reticulocitos. Sangre periférica. Tinción azul de cresil brillante.

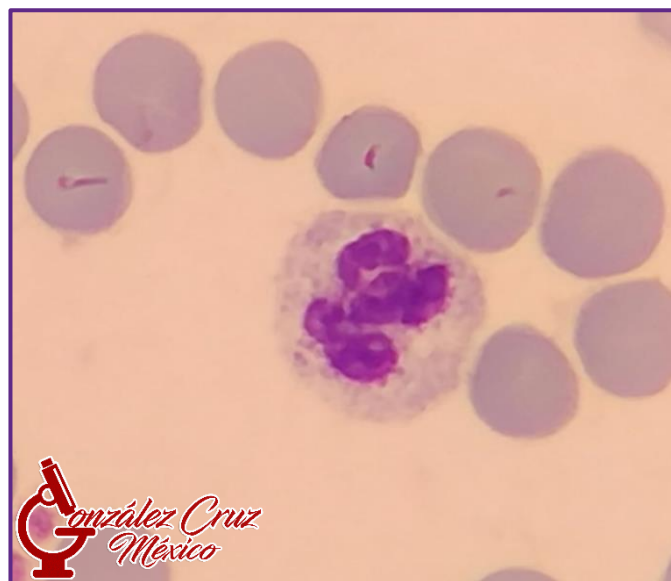


Reticulocitos. Sangre periférica. Tinción azul de cresil brillante.

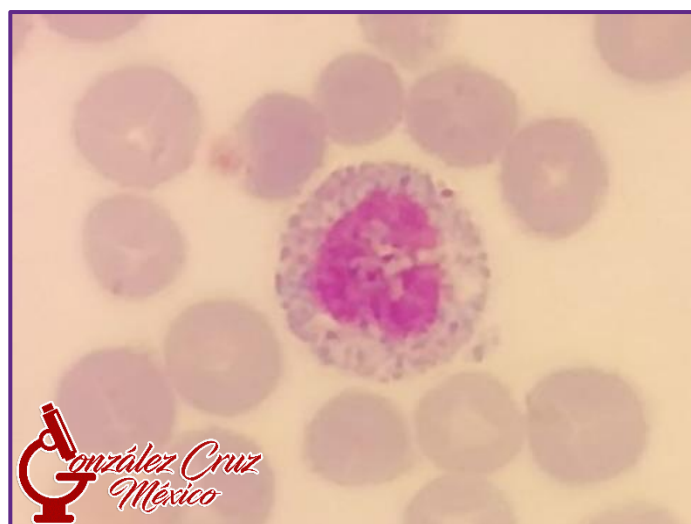
Neutrófilos



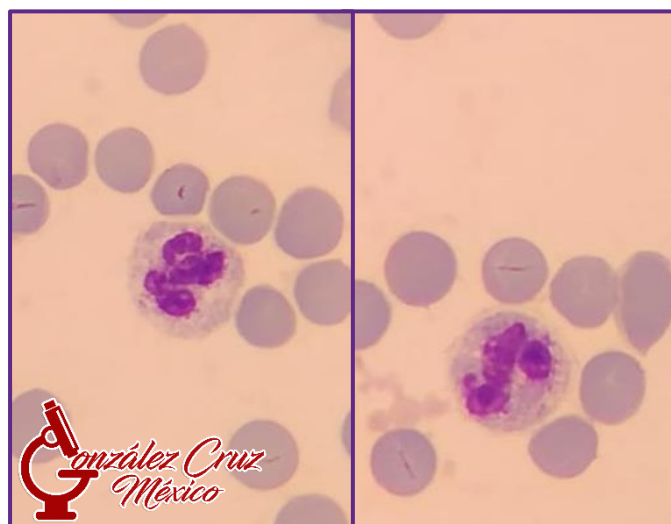
**Neutrófilo segmentado. Sangre periférica.
Tinción azul de cresil brillante.**



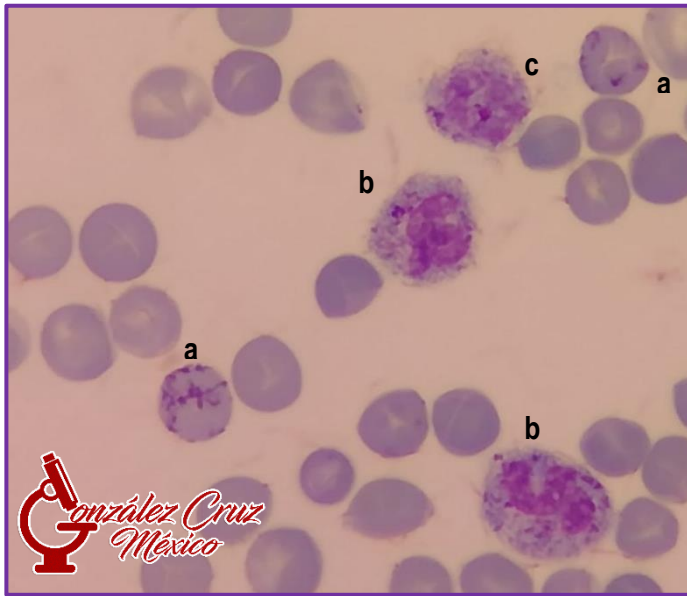
**Neutrófilo segmentado. Sangre periférica.
Tinción azul de cresil brillante.**



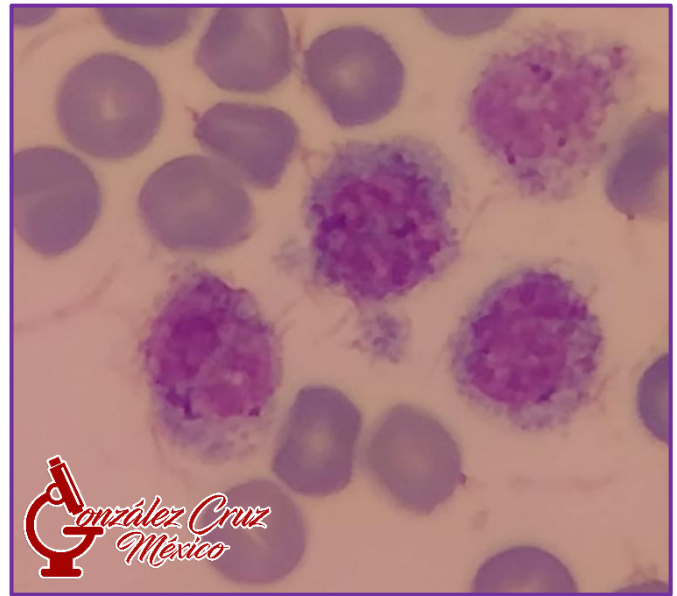
**Neutrófilo segmentado. Sangre periférica.
Tinción azul de cresil brillante.**



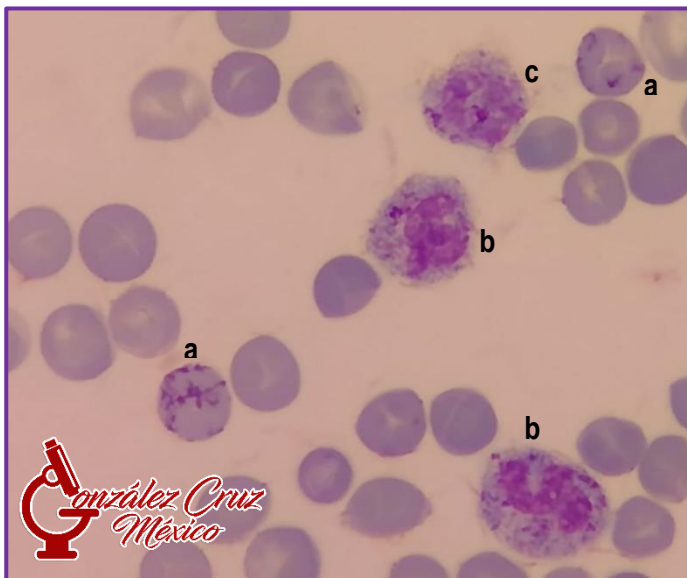
**Neutrófilos segmentados. Sangre periférica.
Tinción azul de cresil brillante.**



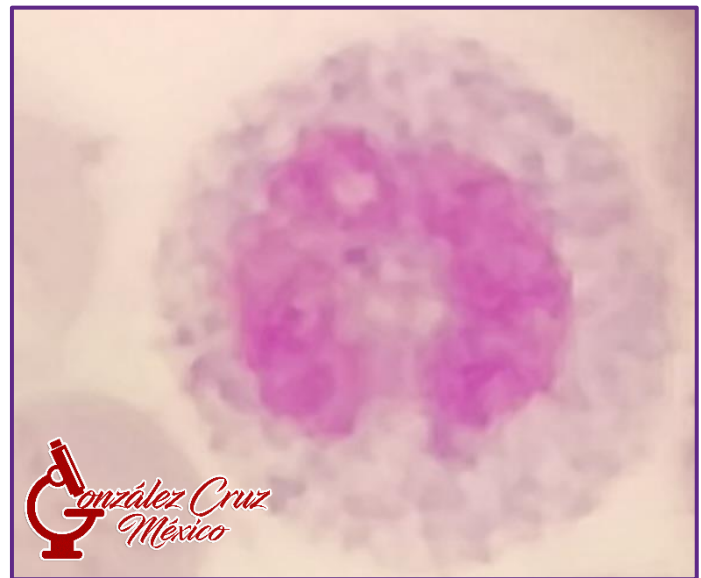
**a) Reticulocito b) Neutrófilo
c) Linfocito. Sangre periférica.**



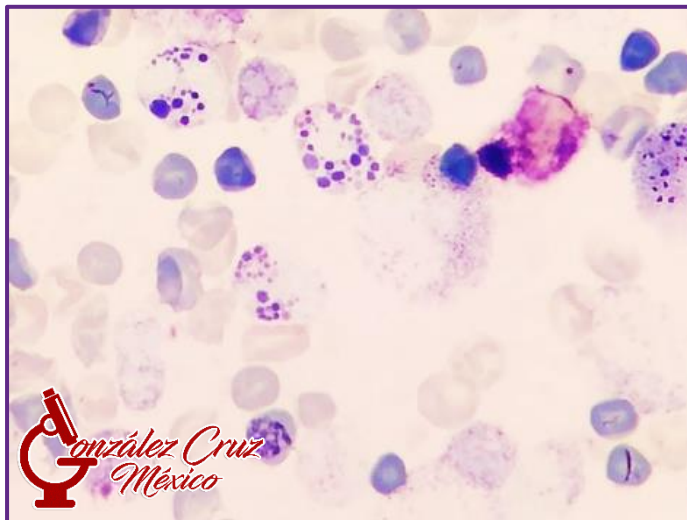
Linfocitos. Sangre periférica. Tinción azul de cresil brillante.



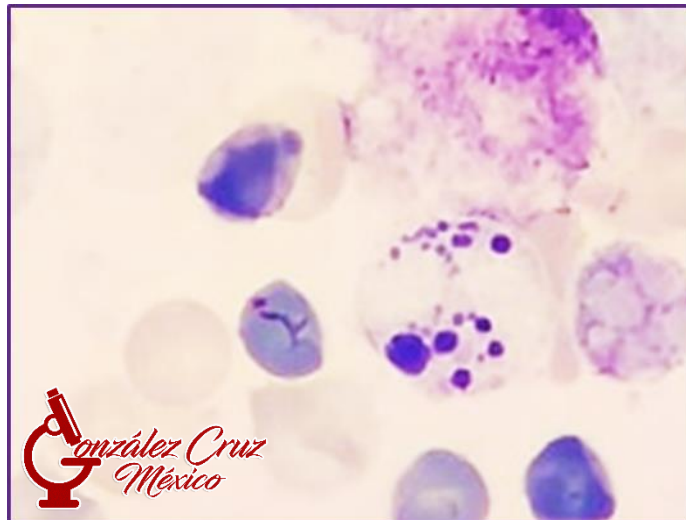
**a) Reticulocito b) Neutrófilo
c) Linfocito. Sangre periférica.**



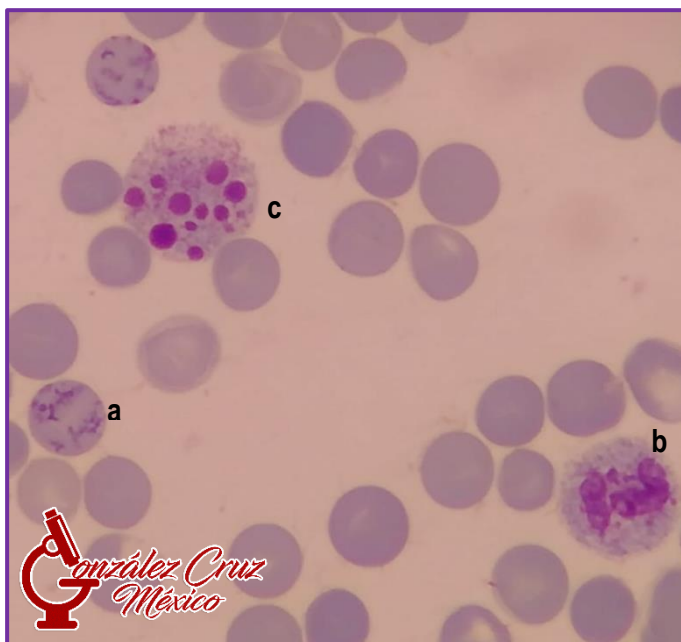
**Neutrófilo segmentado. Sangre periférica.
Tinción azul de cresil brillante.**



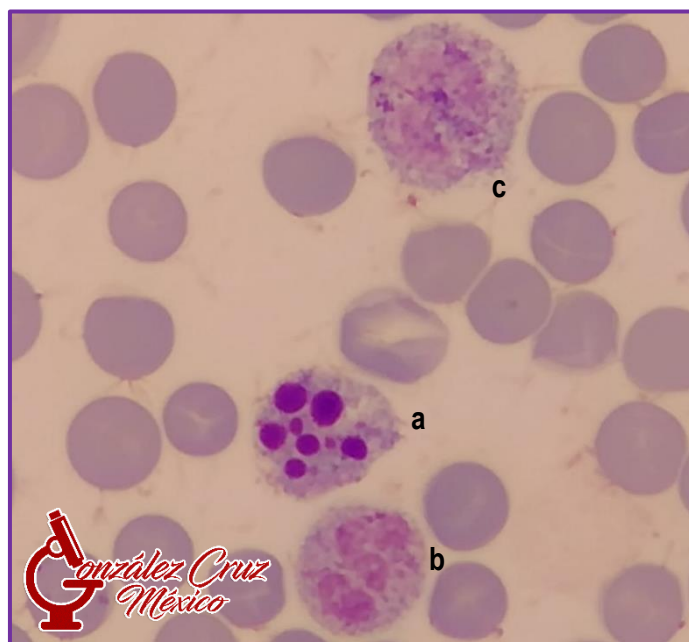
**Cuerpos de Döhle. Sangre periférica.
Tinción azul de cresil brillante.**



**Cuerpo de Döhle. Sangre periférica.
Tinción azul de cresil brillante.**

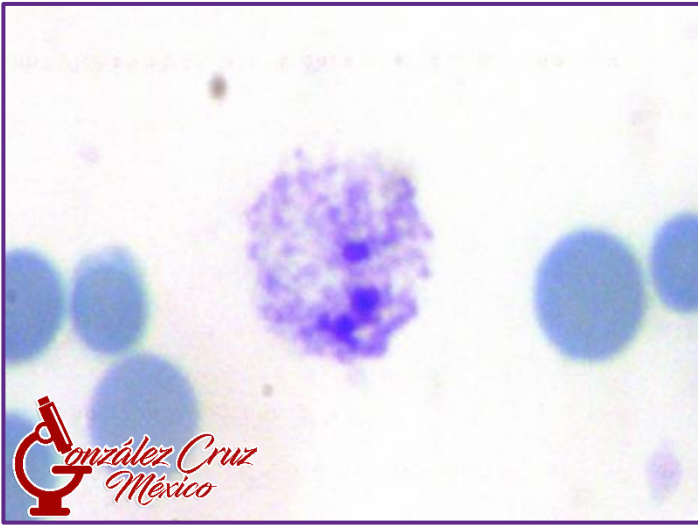


**a) Reticulocito b) Neutrófilo c)
Cuerpos de Döhle. Sangre
periférica. Tinción azul de cresil
brillante.**

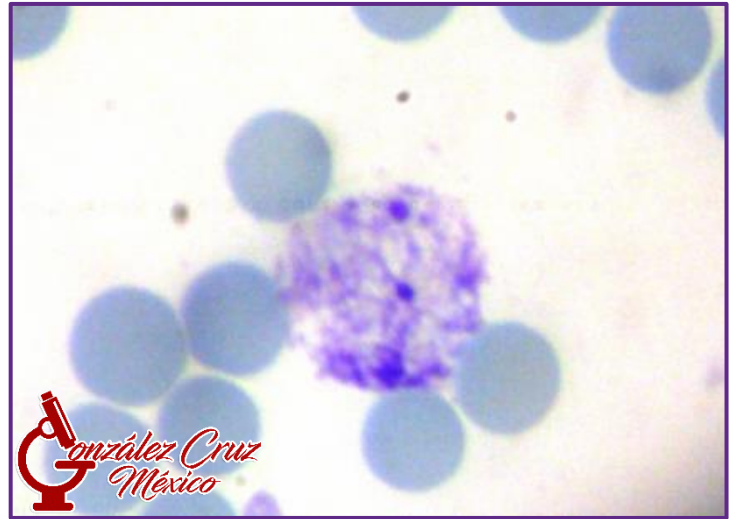


**a) Cuerpo de Döhle. b) Neutrófilo c)
Monocito. Sangre periférica. Tinción
azul de cresil brillante.**

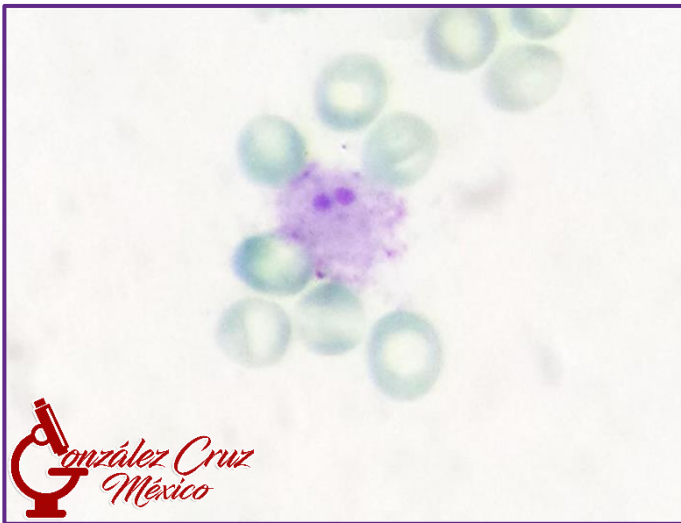
Blastos



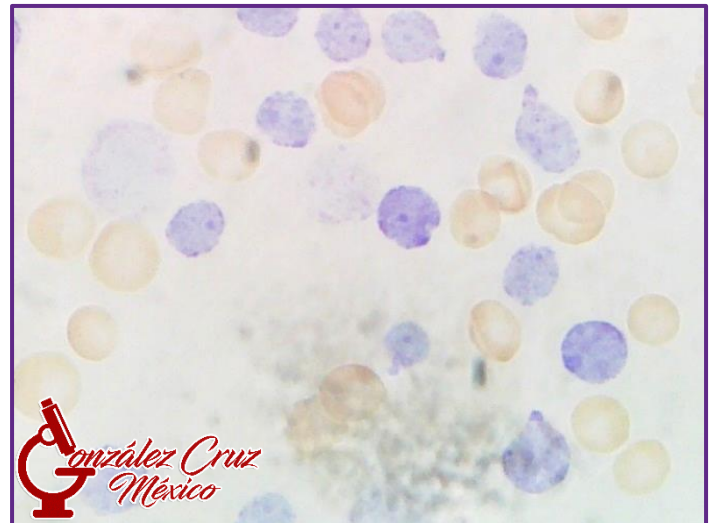
Blastos. Sangre periférica. Tinción azul de cresil brillante.



Blastos. Sangre periférica. Tinción azul de cresil brillante.

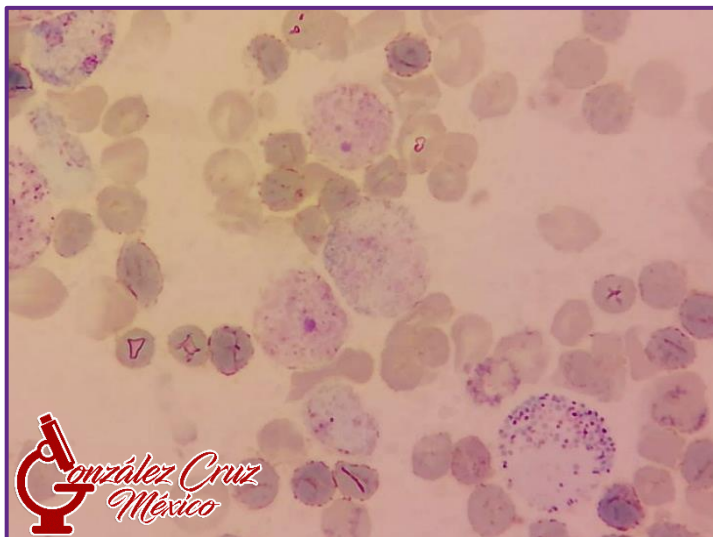


Blastos. Sangre periférica. Tinción azul de cresil brillante.

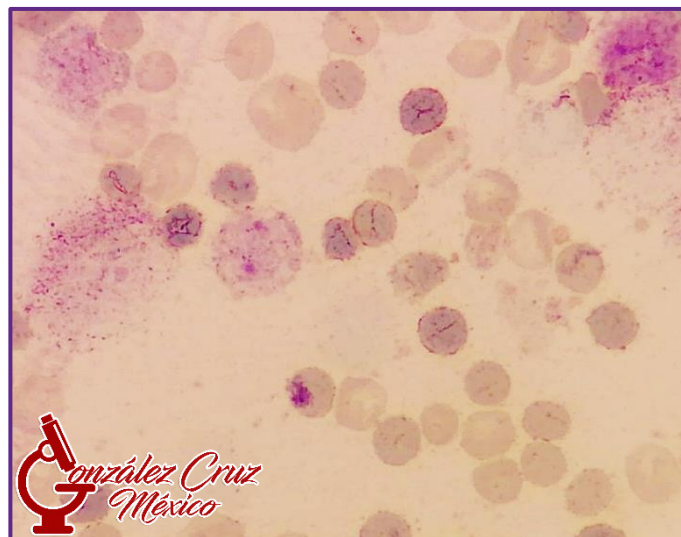


Blastos. Sangre periférica. Tinción azul de cresil brillante.

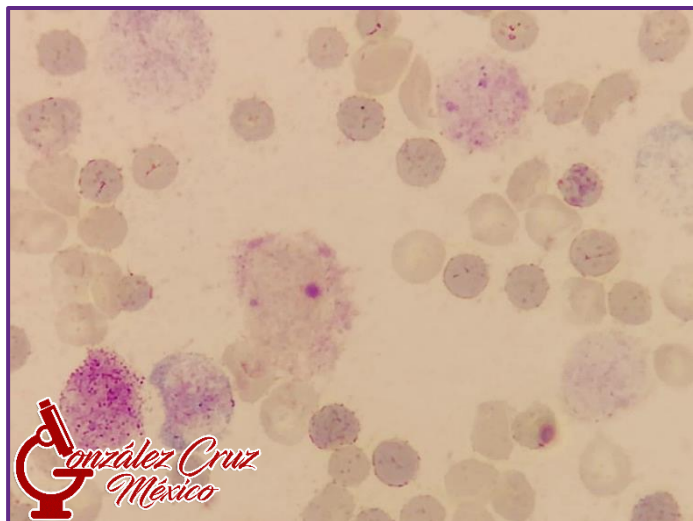
Mieloblastos



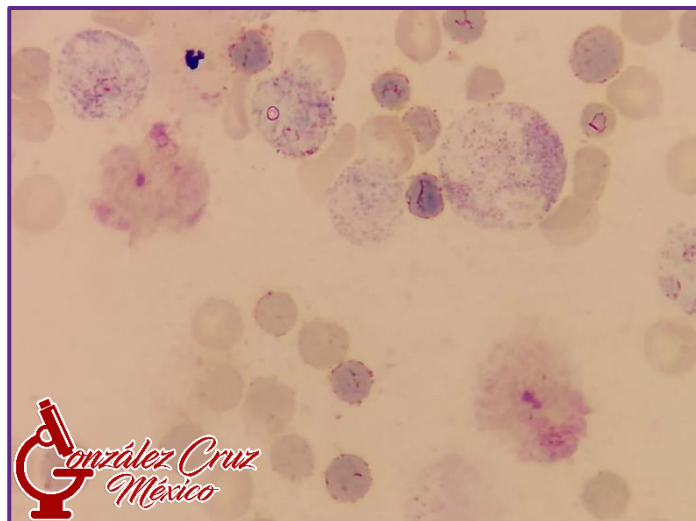
**Blastos de precursores mieloides.
Leucemia granulocítica crónica. Sangre
periférica. Tinción azul de cresil brillante.**



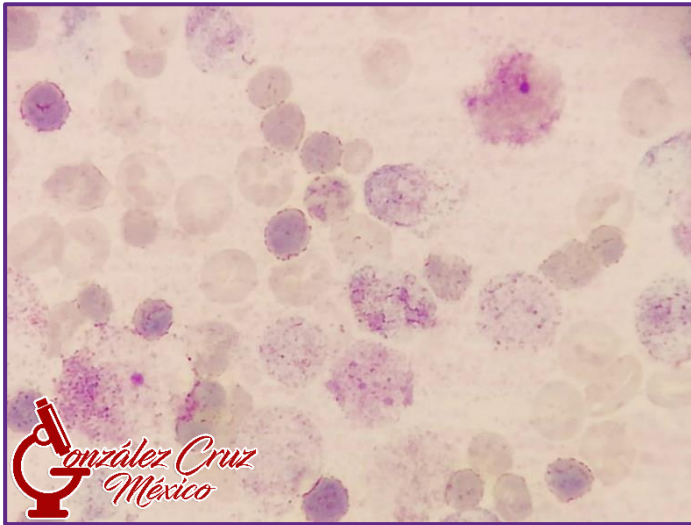
**Blastos de precursores mieloides.
Leucemia granulocítica crónica. Sangre
periférica. Tinción azul de cresil brillante.**



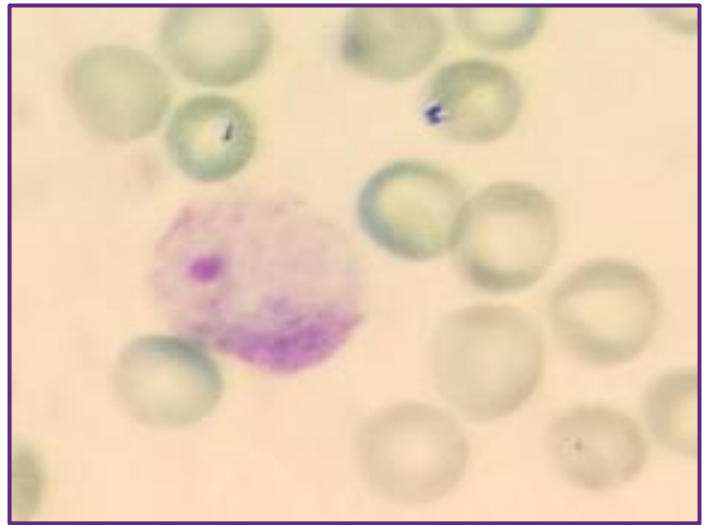
**Blastos de precursores mieloides.
Leucemia granulocítica crónica. Sangre
periférica. Tinción azul de cresil brillante.**



**Blastos de precursores mieloides.
Leucemia granulocítica crónica. Sangre
periférica. Tinción azul de cresil brillante.**

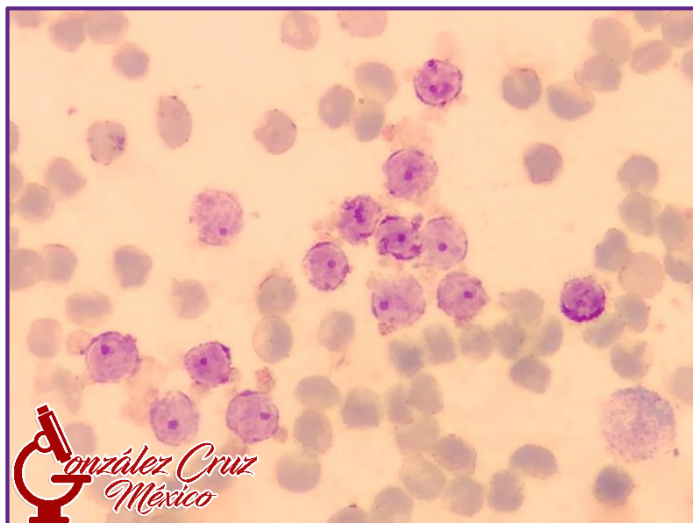


Blastos de precursores mieloides. Leucemia granulocítica crónica. Sangre periférica. Tinción azul de cresil brillante.

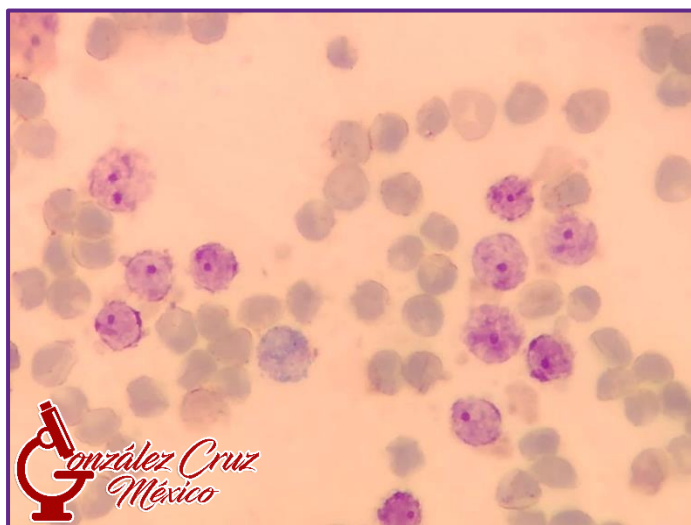


Blasto. Tinción Azul Del Cresil Brillante.

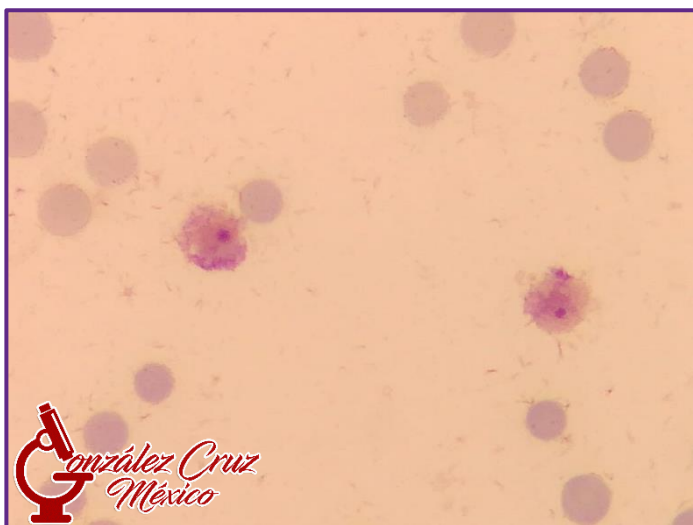
Linfoblastos



Linfoblastos. Sangre periférica. Tinción azul de cresil brillante.



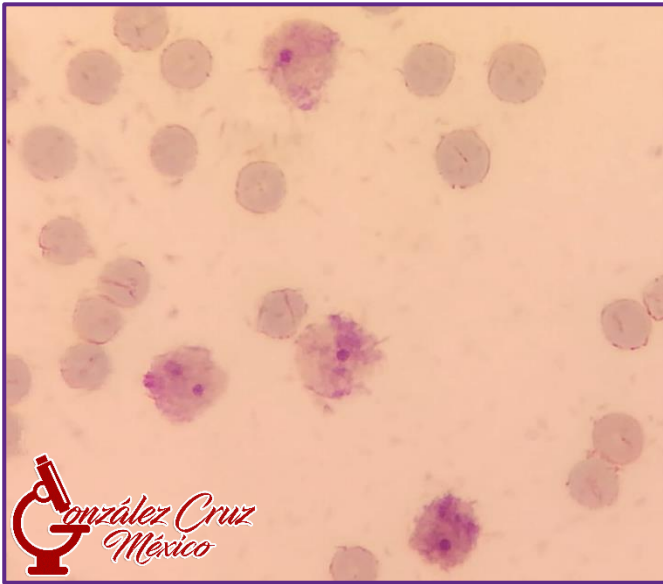
Linfoblastos. Sangre periférica. Tinción azul de cresil brillante.



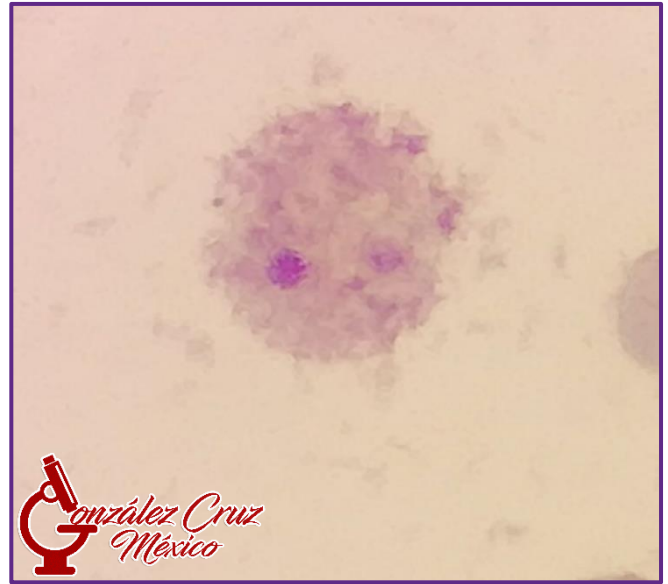
Linfoblastos. Sangre periférica. Tinción azul de cresil brillante.



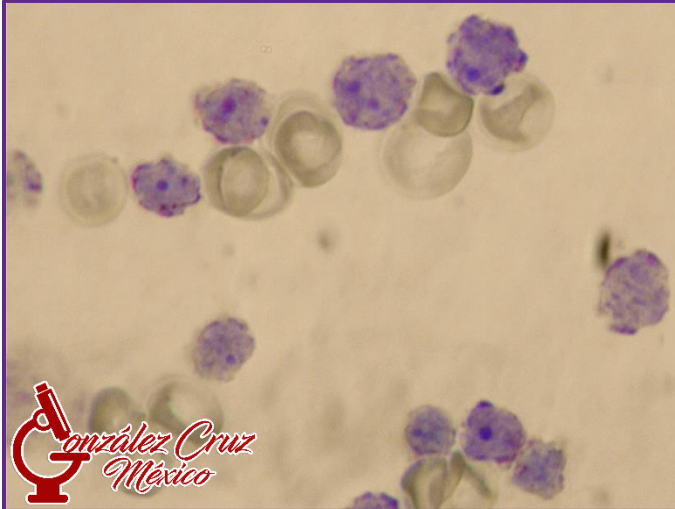
Linfoblastos. Sangre periférica. Tinción azul de cresil brillante.



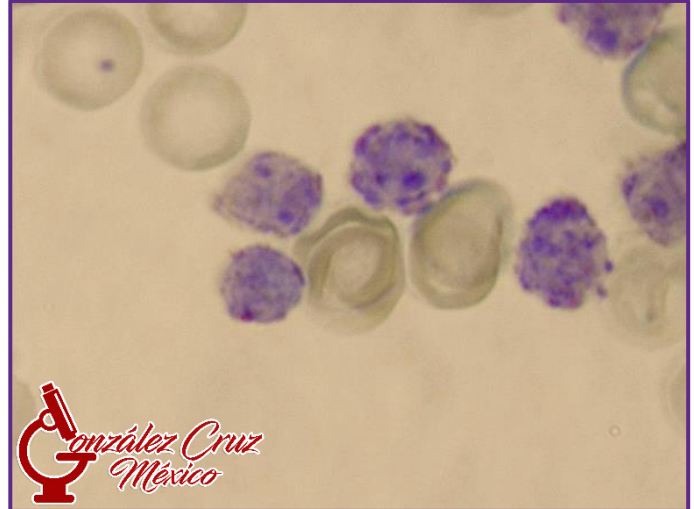
Linfoblastos. Sangre periférica. Tinción azul de cresil brillante.



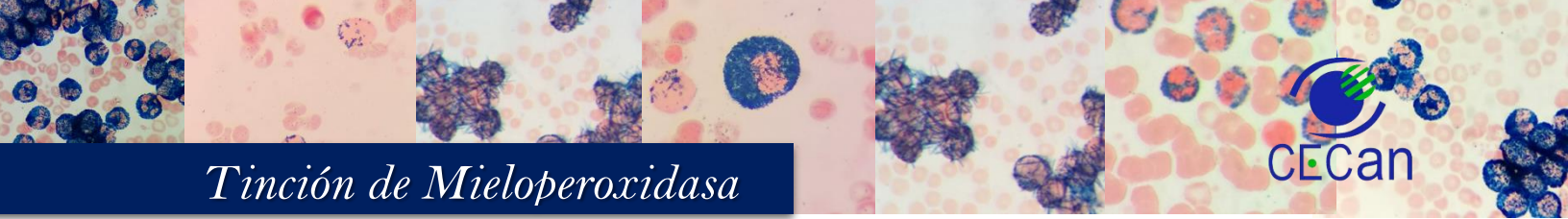
Precursor linfoide. Sangre periférica. Tinción azul de cresil brillante.



Linfoblastos. Tinción Azul Del Cresil Brillante.



Linfoblastos. Tinción Azul Del Cresil Brillante.



Tinción de Mieloperoxidasa

La mieloperoxidasa es una enzima con la capacidad de catalizar la oxidación de sustancias mediante peróxido de hidrogeno, es un potente agente bactericida, fungicida y viricida que se encuentra en los gránulos primarios de las células mieloides desde el estadio de promielocito y las posteriores etapas de maduración. Es sintetizada en el retículo endoplásmico rugoso, en donde pasa a las cisternas de Golgi en el aparato de Golgi, quedando localizada fundamentalmente en la granulación 1ª o azurófila.

FUNDAMENTO

La actividad de la mieloperoxidasa se detecta al incubar la muestra fijada en una solución de peróxido de hidrogeno, bencidina (o p-fenilendiamina y catecol), la mieloperoxidasa oxida los sustratos de la tinción generando una coloración azul marino-oscura en el sitio del citoplasma donde se ha efectuado la reacción.

INTERPRETACIÓN

Los neutrófilos segmentados, eosinófilos y sus precursores exhiben granulación intracelular de color azul turquesa y los monocitos se tiñen con menos intensidad que estos; los linfocitos y basófilos no presentan actividad de mieloperoxidasa.

La tinción de mieloperoxidasa es útil en para diferenciar entre leucemias mieloblásticas agudas y leucemias linfoblásticas agudas. Permite la diferenciación blástica mieloides (+) y linfoides (-).

También son positivos a la mieloperoxidasa los bastones de Auer, estos pueden presentarse en blastos y promielocitos (fuertemente positivos). Al igual que pasa con los nucléolos en la tinción azul de cresil brillante, aquellos bastones de Auer que no son visibles en las tinciones de Romanowsky si pueden serlo con mieloperoxidasa.

Células positivas a MPO	
1 (+)	Serie granulocítica neutrófila en todos sus estadios de desarrollo.
2 (+)	Eosinófilos.
+/d+/-	Serie monocítica.
-	Linfocitos y eritrocitos.
-	Basófilos maduros de individuos normales.
-	Megacariocitos y plaquetas (demostrable solo por citoquímica ultraestructural).

APLICACIÓN

Como ya se ha mencionado en la interpretación, la importancia de esta tinción consiste en la diferenciación blástica entre celularidad mieloides y linfoides, la celularidad blástica mieloides más inmadura (mieloblastos tipo I) ya puede ser positiva a mieloperoxidasa.

Existen situaciones en las que se puede presentar una disminución de la actividad para la mieloperoxidasa, en los neutrófilos segmentados esto sucede en síndromes mielodisplásicos, infecciones que cursan con leucocitosis, y leucemias mieloides (agudas y crónicas), una causa más rara es la deficiencia congénita de mieloperoxidasa.

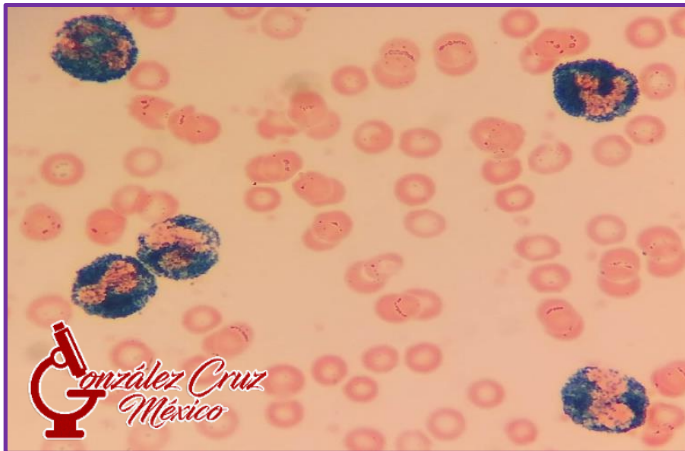
Leucemias mieloides	Blastos (~85% +) y promielocitos positivos.
Leucemias monocíticas	Blastos y precursores de linaje monocítico débilmente positivos.
Eritroleucemias	Negativos.
Leucemia megacariocítica	No apreciable por microscopía óptica (solo por microscopia electrónica).

REACTIVOS

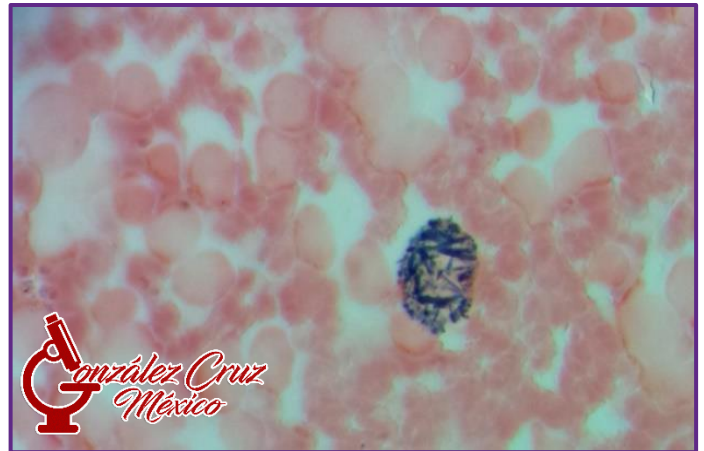
1. Solución fijadora	
Formol al 37%	10 ml
Etanol absoluto	90 ml
2. Solución colorante	
● Etanol al 30% (v/v en agua)	100 ml
-Dihidrocloreuro de bencidina*	0.3 g
-ZnSO ₄ .7H ₂ O al 3.8 %	1 ml
● Acetato de sodio 3H ₂ O	1 g
● H ₂ O ₂ al 3%	0.7 ml
● NaOH 1.0 N	1.5 ml
● Safranina	0.2 g

TÉCNICA

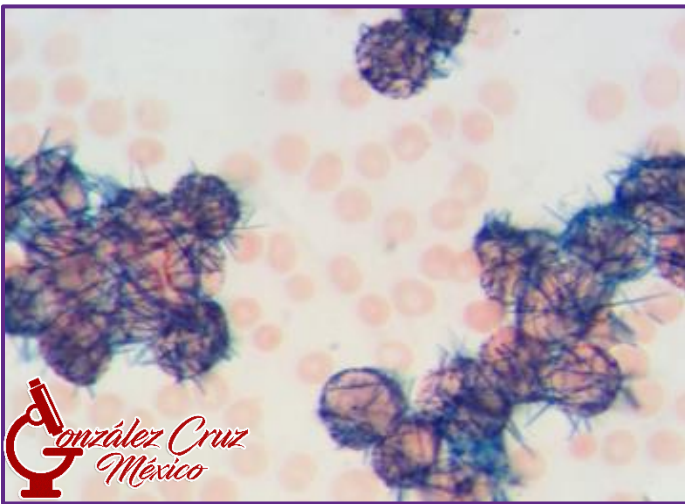
1. Los extendidos sanguíneos se colocan en la solución fijadora por 1 minuto.
2. Colocar sobre chorro delgado o fino de agua durante 1 a 3 segundos, únicamente para retirar el excedente de solución fijadora.
3. Secar al aire o presionando la laminilla por ambas caras sobre una toalla interdoblada de papel. Es importante que el extendido se encuentre perfectamente libre de humedad (seco) para que no se contamine el colorante utilizado en el siguiente paso.
4. Sumergir en la solución colorante por 30 segundos.
5. Lavar con agua corriente a chorro fino.
6. Secar al aire o presionando la laminilla por ambas caras sobre una toalla interdoblada de papel.
7. Observar al microscopio en objetivo de inmersión.



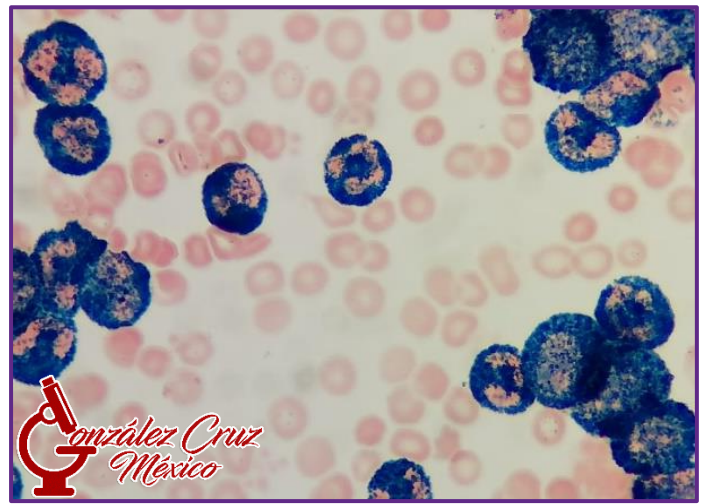
Control positivo para la tinción citoquímica enzimática para mieloperoxidasa. Paciente normal. Sangre periférica.



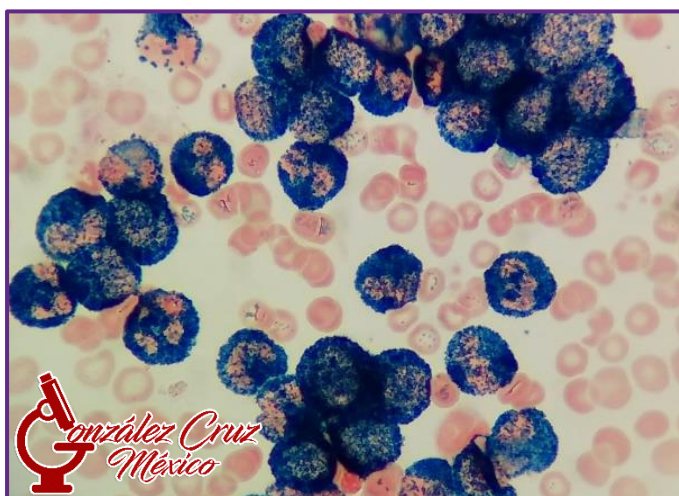
Médula ósea con actividad enzimática para la mieloperoxidasa, de 0-3% como máximo. Leucemia mieloblástica sin diferenciación (M0).



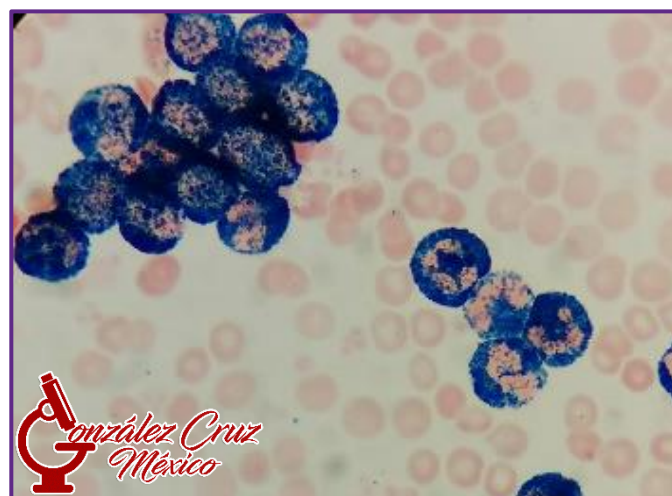
Actividad enzimática para la mieloperoxidasa positivo. Se observan bastones de Auer. Leucemia promielocítica (M3). Médula ósea. Tinción para mieloperoxidasa.



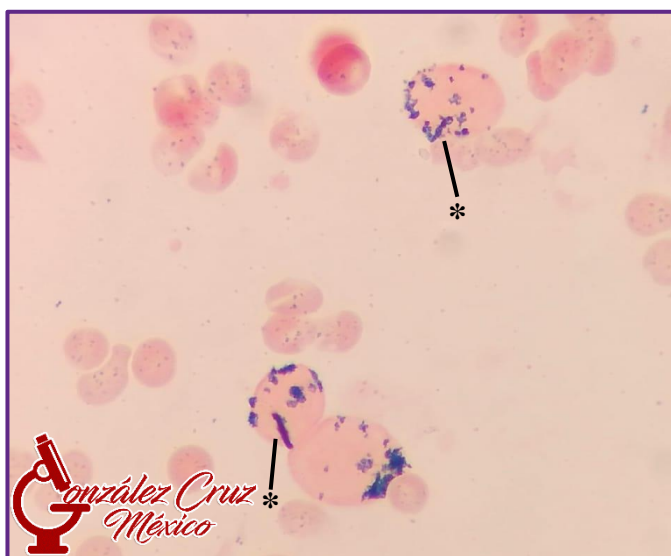
Actividad enzimática para la mieloperoxidasa positivo. Leucemia mieloide crónica. Médula ósea. Tinción para mieloperoxidasa.



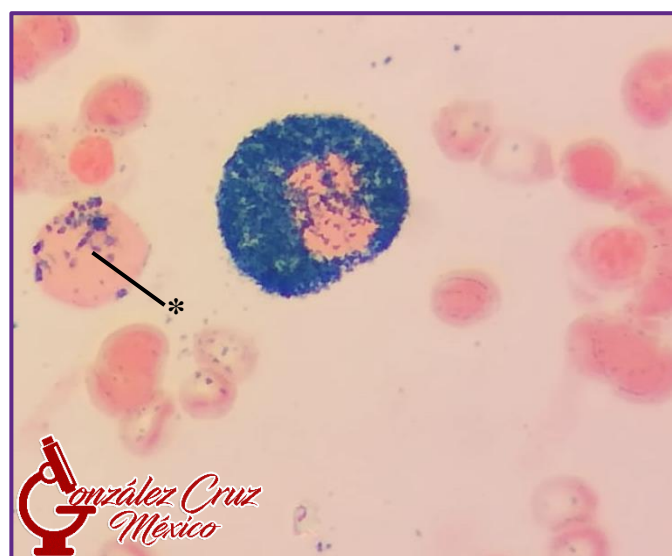
Actividad enzimática para la mieloperoxidasa positivo. Leucemia mieloide crónica. Médula ósea. Tinción para mieloperoxidasa.



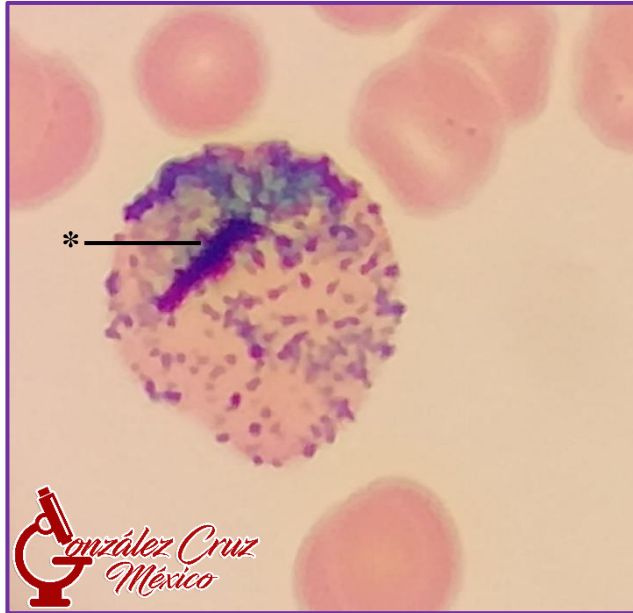
Actividad enzimática para la mieloperoxidasa positivo. Leucemia mieloide crónica. Médula ósea. Tinción para mieloperoxidasa.



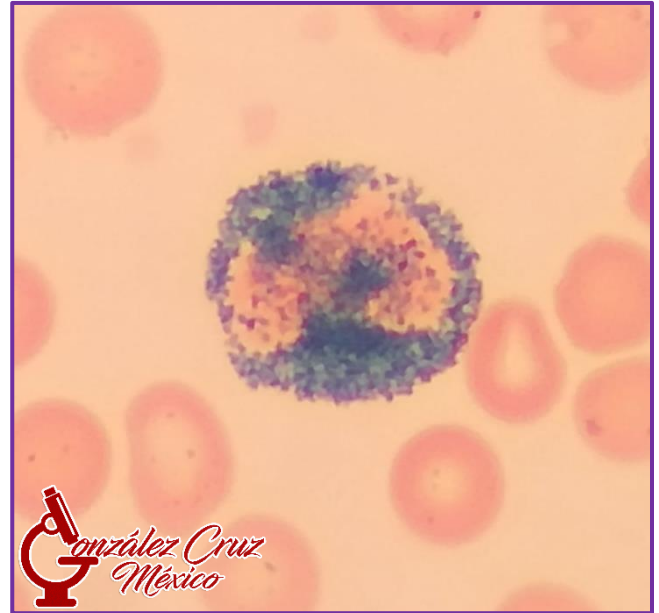
Actividad enzimática para la mieloperoxidasa positivo. Linaje mieloide. Presencia de bastones de Auer*. Médula ósea. Tinción para mieloperoxidasa.



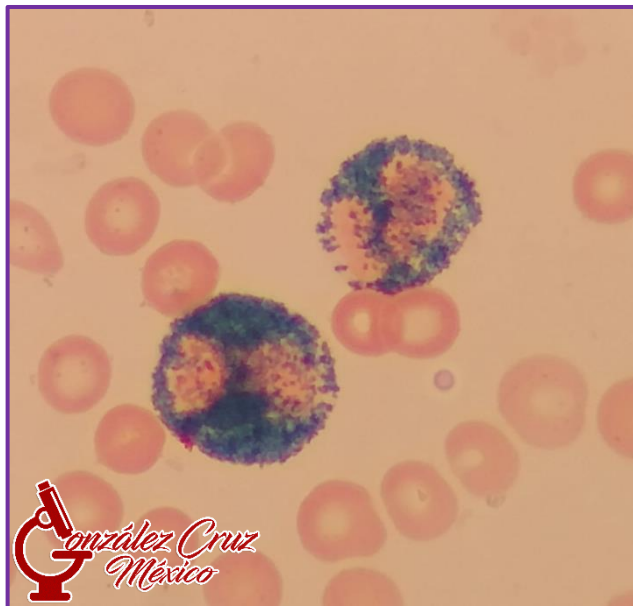
Actividad enzimática para la mieloperoxidasa positivo. Linaje mieloide. Presencia de bastones de Auer*. Médula ósea. Tinción para mieloperoxidasa.



Actividad enzimática para la mieloperoxidasa positivo. Presencia de bastones de Auer*. Sangre periférica. Tinción para mieloperoxidasa.



Actividad enzimática para la mieloperoxidasa positivo. Neutrófilo. Sangre periférica. Tinción para mieloperoxidasa.



Actividad enzimática para la mieloperoxidasa positivo. Neutrófilo. Sangre periférica. Tinción para mieloperoxidasa.



Actividad enzimática para la mieloperoxidasa positivo. Para serie monocítica. Presencia de bastones de Auer*. Sangre periférica. Tinción para mieloperoxidasa.

 González Cruz
México

 González Cruz
México

 González Cruz
México

 González Cruz
México

La tinción de PAS tiñe células con un alto contenido de glucógeno, mucoproteínas y algunos otros carbohidratos de alto peso molecular, la tinción se observa de un color rojo-rosa.

FUNDAMENTO

La reacción histoquímica de la tinción de PAS se fundamenta en la oxidación de macromoléculas ricas en carbohidratos por el ácido peryódico, la oxidación de los polisacáridos es de los grupos 1,2 glicol a aldehídos, de esta manera se rompen los enlaces covalentes carbono-carbono en donde existen hidroxilos adyacentes (para el caso de los anillos de hexosas) o grupos amino primarios y secundarios (para el caso de las hexosaminas en los glucosaminoglucanos), formándose así grupos aldehídos (dialdehídos).

El reactivo de Schiff es una fucsina básica que ha sido tratada con ácido sulfuroso para eliminar el doble enlace en el centro de la molécula, la eliminación de este doble enlace da como resultado una sustancia incolora, el ácido sulfocsinico (leucofucsina).

Cuando se adiciona el reactivo de Schiff, los dialdehídos reaccionan con este generando una reacción cromática (vuelve a aparecer el doble enlace comportándose como un cromóforo), se produce una coloración intensa purpura-roja.

INTERPRETACIÓN

Existen diferentes células sanguíneas que son positivas a la tinción de PASchiff.

La línea granulocítica es positiva y esta positividad aumenta con el grado de maduración, en la línea megacariocítica, los megacariocitos son ligeramente positivos mientras que en las plaquetas la tinción es intensamente positiva, por otro lado, la celularidad de la línea eritroide no se tiñe. El linaje linfoide también es positivo.

1 (+)	Toda la serie linfoide con un patrón de distribución intracitoplasmático de tipo granular fino, mediano o grueso.
1 (+)	Los neutrófilos segmentados y eosinófilos en todos sus estadios de desarrollo y con mayor intensidad en el estadio maduro, de distribución homogénea difusa.
1 (+)	Serie monocítica con patrón de distribución homogéneo o mixto.
1 (+)	Megacariocitos y plaquetas patrón granular difuso.
1 (-)	Serie eritroide.

APLICACIÓN

La importancia de la tinción es que esta es utilizada en la diferenciación de las leucemias linfoblásticas de acuerdo con la clasificación FAB.

Los precursores eritroides normales de la médula ósea no son positivos a PAS. En las leucemias mieloides, la eritroleucemia (M6) puede presentar eritroblastos positivos a PAS, en los eritroblastos se observan en forma granular y, a medida que avanza la maduración, difusamente positiva. Los eritrocitos anormales también son positivos

La eritroleucemia y los trastornos madurativos de serie eritroide presentan positividad a la tinción de PAS que, en condiciones normales, no debería presentarse.

Las leucemias linfoides agudas, crónicas y los linfomas no Hodgkin presentan una intensa positividad.

En las leucemias linfoides agudas (LLA) las formas en que se observa son variadas (granular, fina, difusa y empedrada), los linfoblastos pueden presentar una o más formas de positividad a PAS. Los linfoblastos también pueden ser negativos a PAS, principalmente para la L3 tipo Burkitt.

REACTIVOS

1. Solución fijadora

Formol al 37%	10 ml
Etanol	90 ml

2. Solución de ácido peryódico al 1%

Ácido peryódico	1 g
Agua destilada	100 ml

3. Reactivo de Schiff

Pararosanilina	1 g
Ácido Clorhídrico 1N	20 ml
NaHSO ₃ o Na ₂ S ₂ O ₅	1 g
Carbón activado*	0.5 g

4. Hematoxilina de Gill

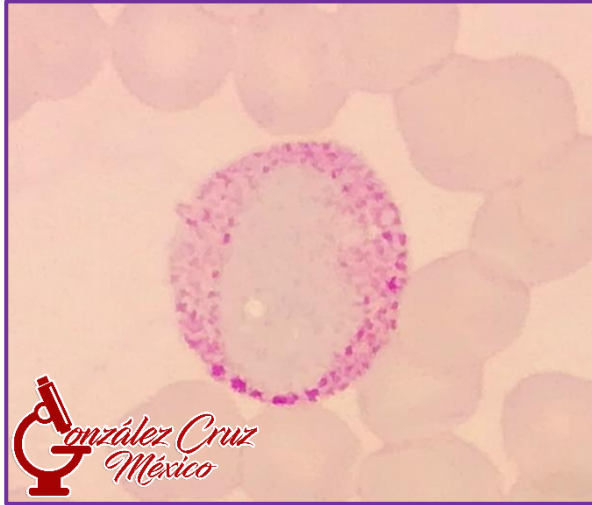
Etilén glicol	250 ml
Hematoxilina monohidratada	2 g
Yodato de sodio	0.2 g
Sulfato de aluminio	17.6 g
Ácido acético glacial	2 ml
Agua destilada	730 ml

5. Solución de Scott.

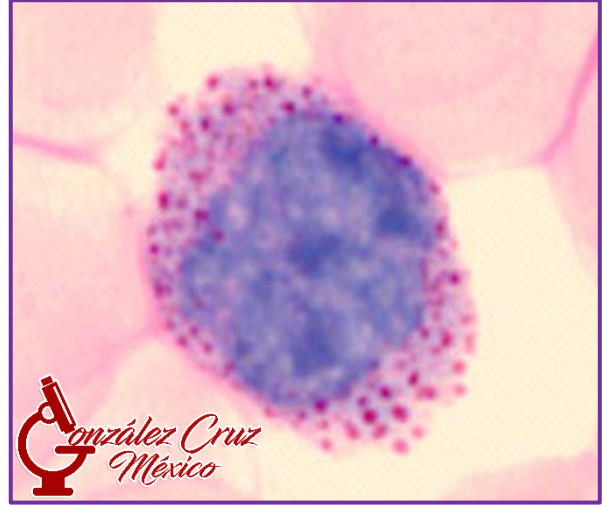
Agua corriente	1000 ml
Sulfato de magnesio anhidro (Si es hidratado 20 g)	10 g
Bicarbonato de sodio	2 g

TÉCNICA

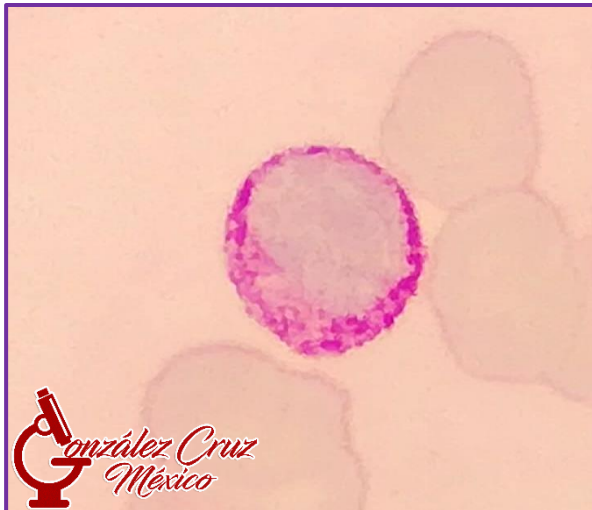
1. Los extendidos de sangre o médula son secados y fijados en la solución fijadora de formalina alcohólica (1) por 2 minutos.
2. Lavar con agua corriente a chorro fino durante 1 a 3 segundos.
3. Secar presionando la laminilla por ambas caras sobre una toalla interdoblada de papel. La laminilla debe estar completamente seca antes de colocarla en la siguiente solución.
4. Agregar ácido peryódico (2) a temperatura ambiente durante 10 minutos y lavar con agua corriente a chorro fino; secar perfectamente al aire o sobre una toalla interdoblada de papel.
5. Sumergir los extendidos en el reactivo de Schiff (3) durante 20 minutos. Lavar con agua corriente a chorro fino y secar perfectamente.
6. Los núcleos son teñidos por inmersión de las laminillas en hematoxilina de Gill (4) por 5 minutos, lavar con agua corriente a chorro fino y secar perfectamente.
7. Los extendidos se viran en solución de Scott (5) por 1 minuto.
8. Lavar con agua corriente a chorro fino y secar al aire o sobre una toalla interdoblada de papel.
9. Observar al microscopio en objetivo de inmersión.



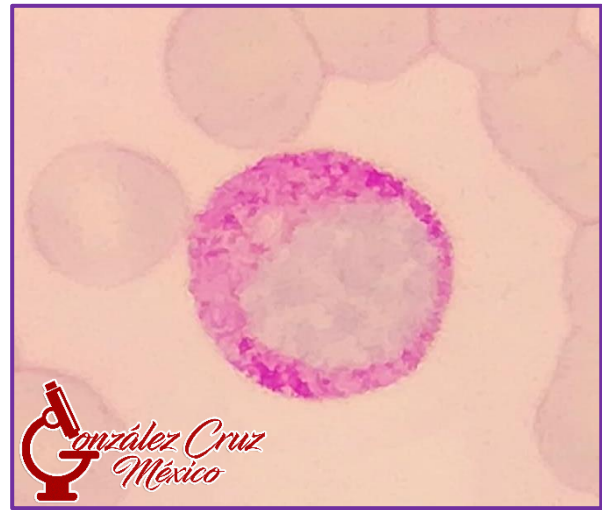
Linfocito normal. Sangre periférica.
Tinción PASchiff positiva.



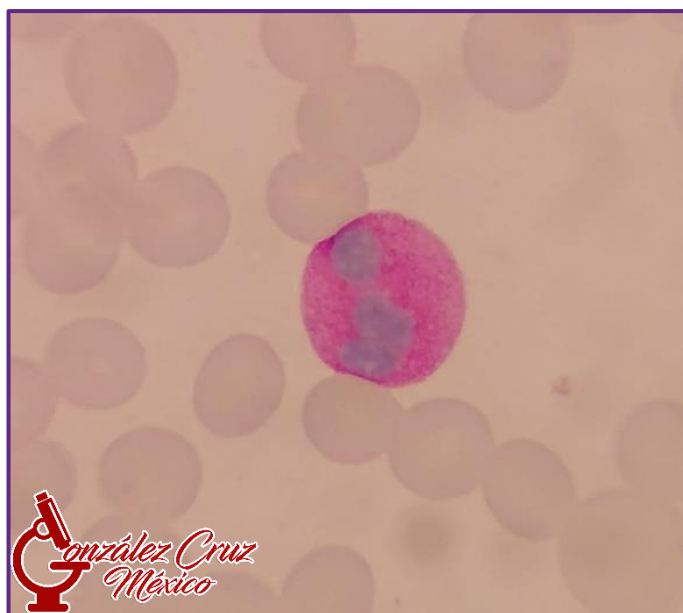
Linfocito normal. Sangre periférica.
Tinción PASchiff positiva.



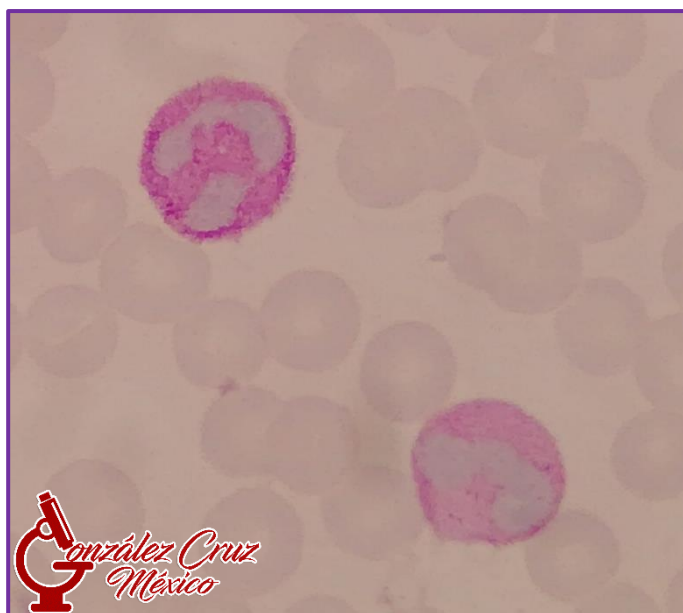
Linfocito normal. Sangre periférica.
Tinción PASchiff positiva.



Linfocito normal. Sangre periférica.
Tinción PASchiff positiva.



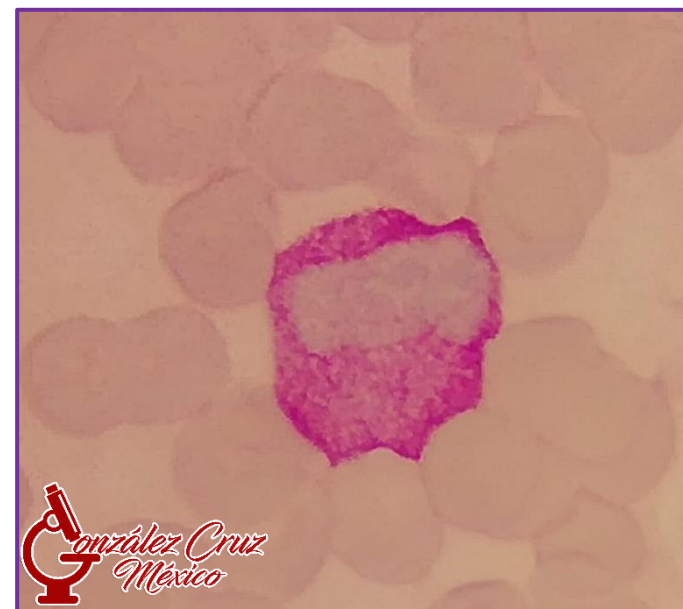
Neutrófilo. Sangre periférica. Tinción PASchiff intensamente positivo.



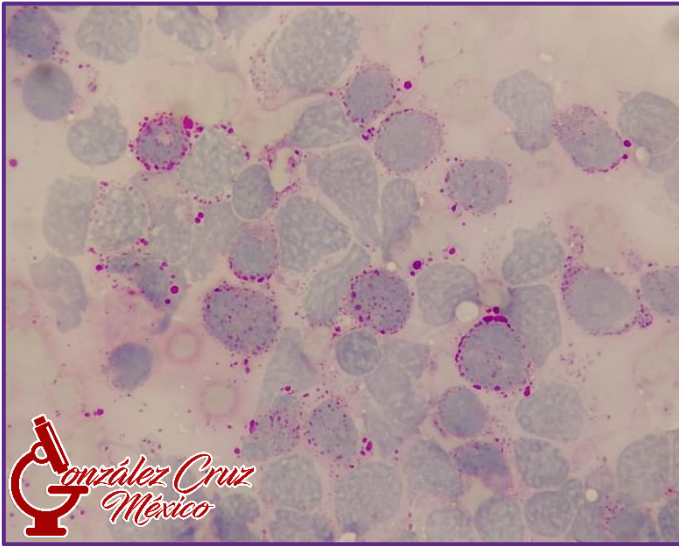
Neutrófilo. Sangre periférica. Tinción PASchiff intensamente positivo.



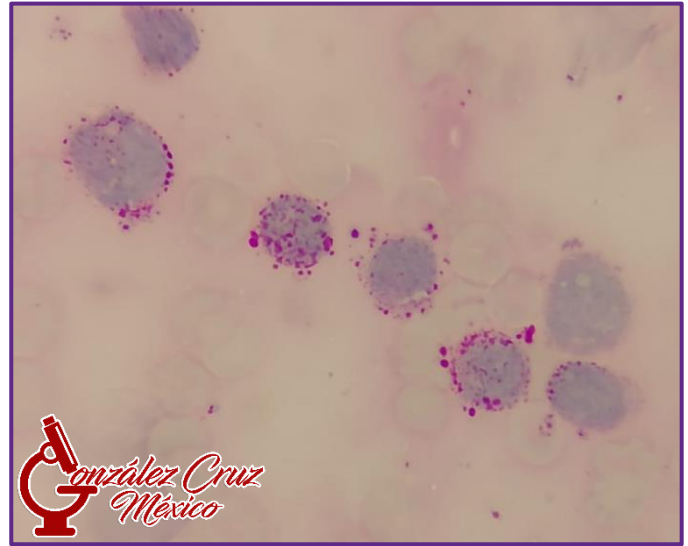
Neutrófilo. Sangre periférica. Tinción PASchiff intensamente positivo.



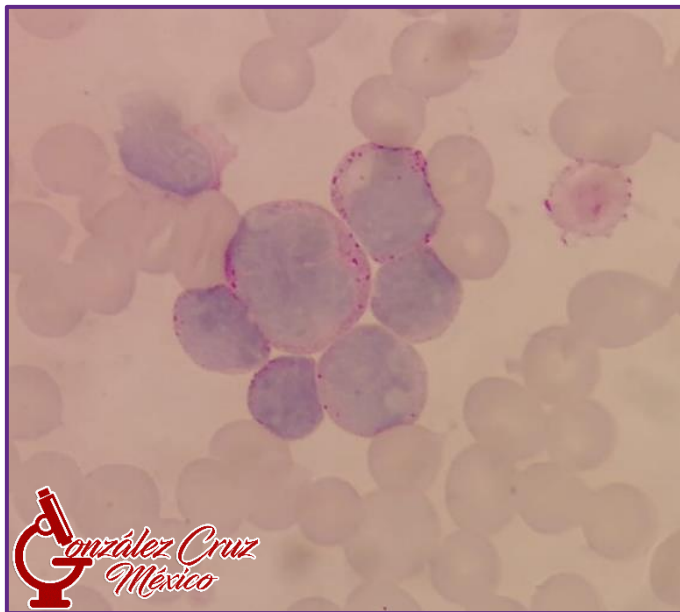
Linfocito T activado. Sangre periférica. Tinción PASchiff intensamente positivo.



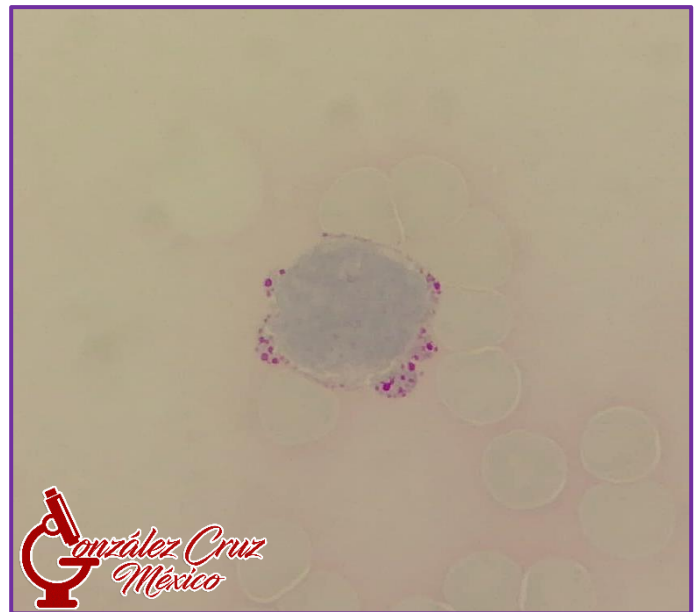
**Células blásticas de linaje linfoide.
Médula ósea. Tinción PASchiff positiva.**



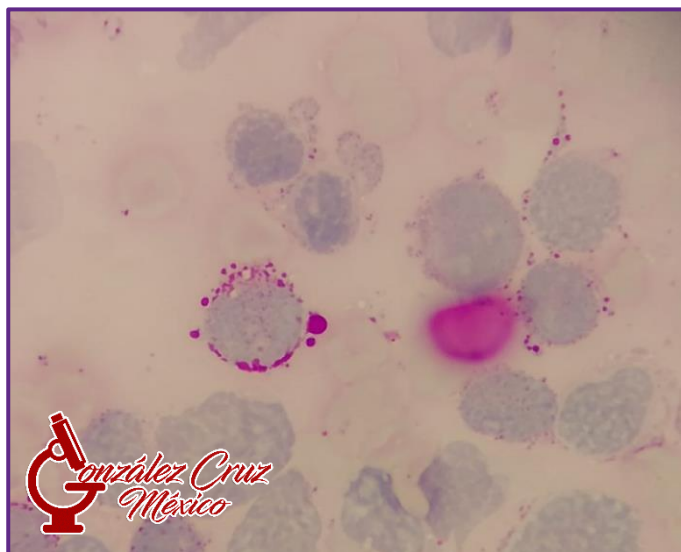
**Células blásticas de linaje linfoide.
Médula ósea. Tinción PASchiff positiva.**



**Células blásticas de linaje linfoide.
Médula ósea. Tinción PASchiff positiva.**



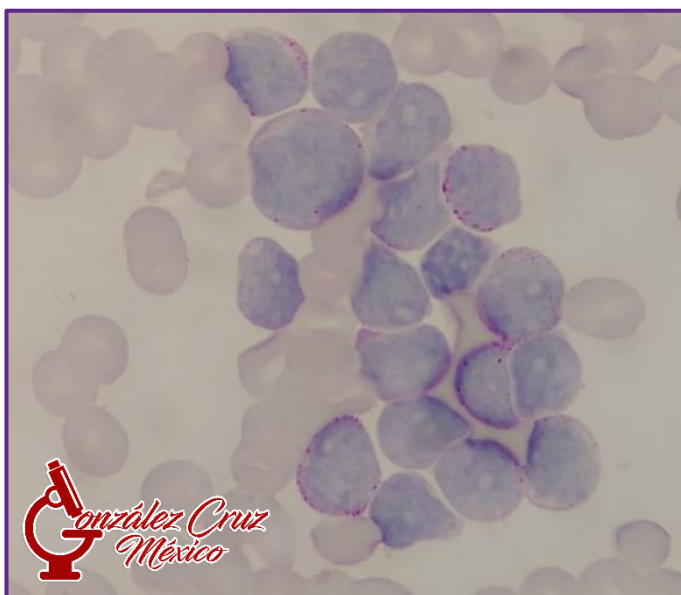
Célula blástica de linaje linfoide. Médula ósea. Tinción PASchiff positiva.



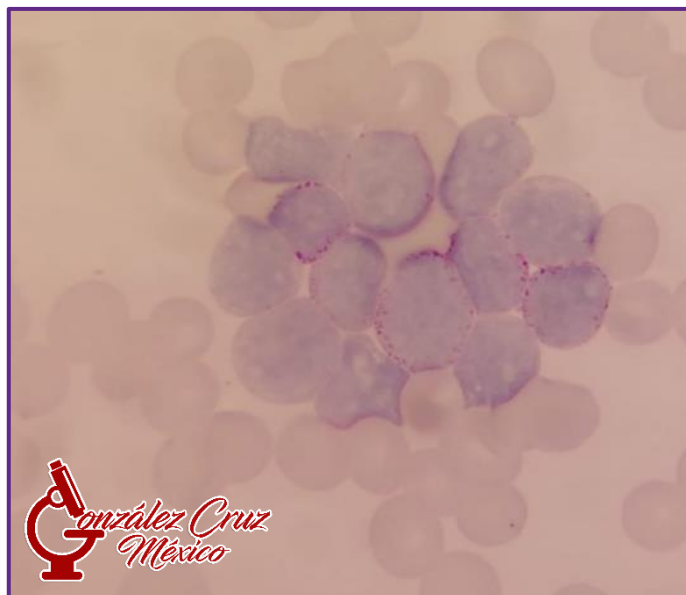
**Células blásticas de linaje linfoide.
Médula ósea. Tinción PASchiff positiva.**



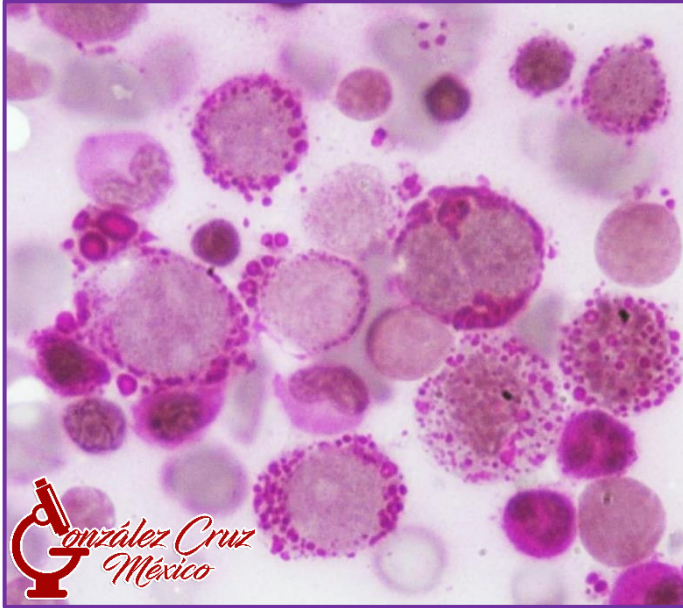
Célula blástica de linaje linfoide. Médula ósea. Tinción PASchiff positiva.



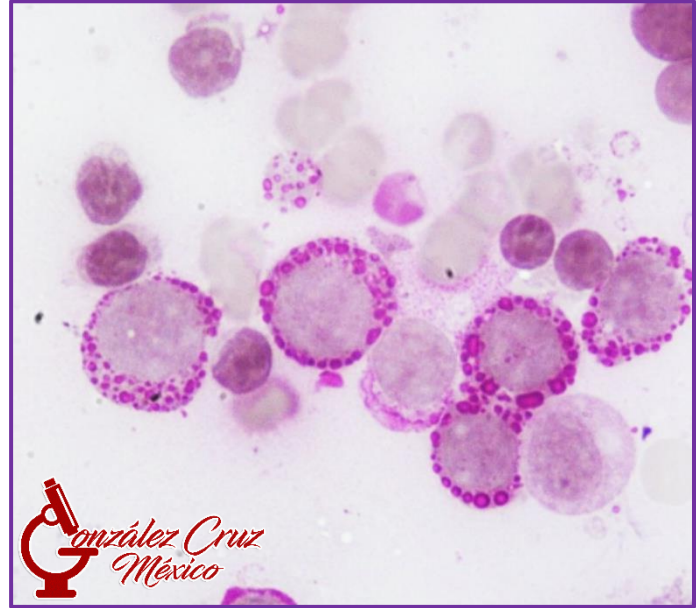
**Células blásticas de linaje linfoide.
Médula ósea. Tinción PASchiff positiva.**



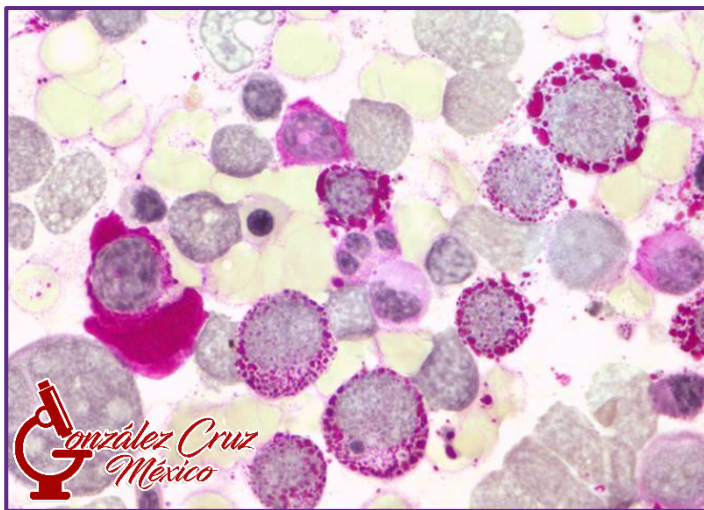
**Células blásticas de linaje linfoide.
Médula ósea. Tinción PASchiff positiva.**



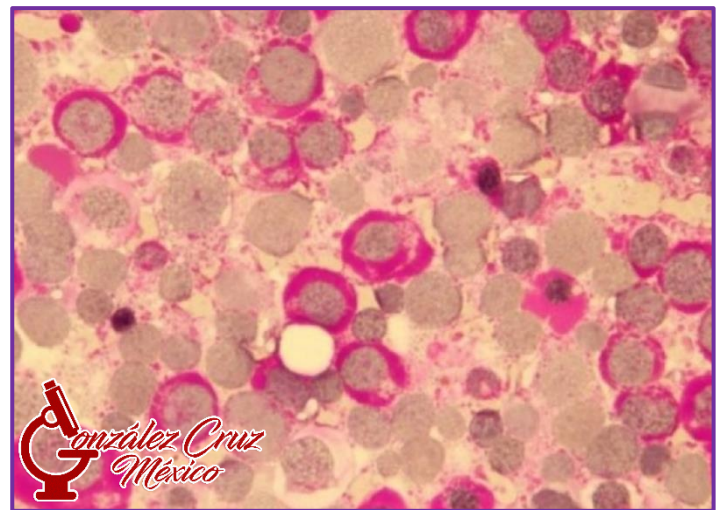
Precursores eritroides, proeritroblastos y eritroblastos basófilos con abundante vacuolización. Eritroleucemia. Médula ósea. Tinción PASchiff positiva.



Precursores eritroides, proeritroblastos y eritroblastos basófilos con abundante vacuolización. Eritroleucemia. Médula ósea. Tinción PASchiff positiva.



Precursores eritroides, proeritroblastos y eritroblastos basófilos con abundante vacuolización. Eritroleucemia. Médula ósea. Tinción PASchiff positiva.



Precursores eritroides, proeritroblastos y eritroblastos basófilos con abundante vacuolización. Eritroleucemia. Médula ósea. Tinción PASchiff positiva.

Las esterasas son enzimas hidrolasas, de localización lisosomal, que catalizan reacciones de hidrólisis de ésteres (alifáticos y aromáticos) en sus componentes ácidos y alcoholes.

Existen muchas clases de esterasas que se diferencian, fundamentalmente, por el sustrato sobre el que actúan y por los niveles de pH óptimos, en los leucocitos existen nueve isoenzimas de esterasas.

La tinción de esterasas detecta la presencia de esterasas en las células sanguíneas y se utiliza para diferenciar entre células del linaje monocítico y granulocítico.

La tinción de esterasas detecta la presencia de esterasas en las células sanguíneas y se utiliza para diferenciar entre células del linaje monocítico y granulocítico. Pueden ser esterasas no específicas, si el sustrato es un éster simple como el α -naftil-acetato o el α -naftil-butirato (ésteres inespecíficos), o esterasas específicas, si actúan sobre un sustrato éster específico, como el naftol AS-D cloroacetato para granulocitos o acetilcolina en donde actúa la esterasa acetilcolinesterasa de los megacariocitos. La especificidad que se menciona se refiere al grado en que se detecta solo un tipo de celularidad (granulocitos, monocitos, etc.).

FUNDAMENTO

Los sustratos utilizados para la tinción de esterasas contienen naftol, este es liberado por hidrólisis enzimática para posteriormente unirse a una sal de diazonio del azocolorante, se genera una reacción cromática que da como resultado un color brillante en el sitio de actividad de la enzima.

Esterasas inespecíficas (α -naftil acetato esterasa y α -naftil butirato esterasa)

Los sustratos éster α -naftil acetato y α -naftil butirato al ser hidrolizados liberan un grupo alfa naftilo el cual se conjuga con un azocolorante, se genera un color pardo naranja como resultado de la reacción, la intensidad del color es proporcional a la cantidad de enzimas en la célula.

α -naftil acetato esterasa (ANAE)

La tinción α -naftil acetato esterasa es positiva para las isoenzimas 1, 4, 5 y 6, de tal forma que cuando la tinción es positiva puede deberse una o varias de estas enzimas.

ANAE es positiva para la línea monocítica observándose un patrón difuso fuertemente positivo en el citoplasma, los linfocitos Th y megacariocitos (incluyendo sus precursores) también son positivos (la positividad se observa de forma focal en el aparato de Golgi como gránulos densos), la línea granulocítica es generalmente negativa. La positividad de los monocitos puede inhibirse con

fluoruro de sodio (NaF) mientras que en los linfocitos Th y megacariocitos puede o no ser inhibida, si se inhibe se habla de una reacción fluoruro sensible.

Esta tinción permite diferenciar a los monoblastos y promonocitos de los mieloblastos y precursores de otras líneas celulares, especialmente de la línea granulocítica la cual no presenta positividad.

α-naftil butirato esterasa (ANBE)

La tinción α-naftil butirato esterasa es positiva para las esterases monocíticas (observándose un patrón difuso en el citoplasma), es menos sensible que ANAE, pero es más específica. Es positiva para la línea monocítica y para los linfocitos Th y negativa o débilmente positiva para la línea granulocítica. ANBE es fluoruro sensible para los monocitos. Al igual que ANAE esta tinción permite diferenciar a los monoblastos y promonocitos de mieloblastos y otros precursores mieloides como los promielocitos.

Esterasas específicas

Cloroacetatoesterasa (CAE)

El fundamento de esta tinción es similar a la descrita anteriormente, el sustrato naftol AS-D cloroacetato es hidrolizado, se libera un alcohol (naftol) el cual es conjugado con el azocolorante formándose un precipitado insoluble de color rojo naranja brillante en el sitio de reacción.

La tinción cloroacetato esterasa es positiva para las isoenzimas 1, 2, 7, 8 y 9, presentes en las células granulocíticas, principalmente en los gránulos primarios de los neutrófilos, y es negativa para el linaje monocítico, aunque en ocasiones puede ser débilmente positiva.

CAE es específica para granulocitos y, dado que la enzima cloroacetato esterasa se encuentra en los gránulos primarios, los mieloblastos displásicos (leucémicos) y los bastones de Aüer son positivos. A diferencia de la tinción de mieloperoxidasa (MPO), CAE es menos sensible para los mieloblastos por lo que estos pueden resultar negativos o débilmente positivos. Ayuda a diferenciar a los promielocitos.

Es negativa en Leucemias linfoblásticas y en las mieloblásticas puede o no ser positiva dependiendo del grado de madurez del mieloblasto.

En eosinófilos normales CAE es negativa, sin embargo, en la leucemia M4 eosinófila son positivos.

2 (+)	Casi exclusiva de toda la serie neutrofílica, células cebadas.
(-)	Eosinófilos, monocitos maduros.
1 (+)	Cuerpos de Aüer.

Esterasas dobles

La técnica de esterasas doble se utiliza para diferenciar morfológicamente a dos líneas celulares en un mismo extendido sanguíneo, las líneas granulocítica y monocítica, esta técnica combina dos tinciones esterasas, una específica (ANAE) y una inespecífica (CAE).

En la leucemia megacarioblástica (M7) los blastos pueden ser positivos observándose en forma de punto focal en el aparato de Golgi.

En las leucemias linfoides es positiva para los linfocitos T por lo que es de ayuda en el diagnóstico de neoplasias que involucren a estas células, como en los linfomas de células T.

APLICACIÓN

Las esterasas suelen usarse en el diagnóstico de las leucemias agudas, permiten diferenciar las células de origen monocítico de las demás células de origen mieloide, principalmente mieloblastos y promielocitos, de esta manera se logran distinguir las leucemias monocíticas (M5) de las leucemias mieloblástica aguda con maduración mínima (M1), mieloblástica aguda con maduración (M2) y promielocítica (M3).

La leucemia mielomonocítica (M4) también es positiva para la tinción de esterasas ya que en esta leucemia existen tanto mieloblastos de origen monocítico y granulocítico, permite diferenciar entre las leucemias M4 y M5.

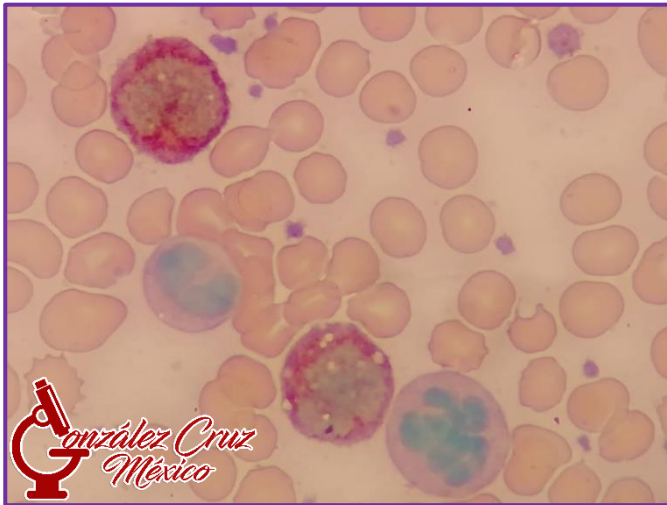
Los eritroblastos normales son negativos, pueden presentar positividad en anemias megaloblásticas, anemias sideroblásticas y eritroleucemias (M6), observándose en el aparato de Golgi.

TÉCNICA

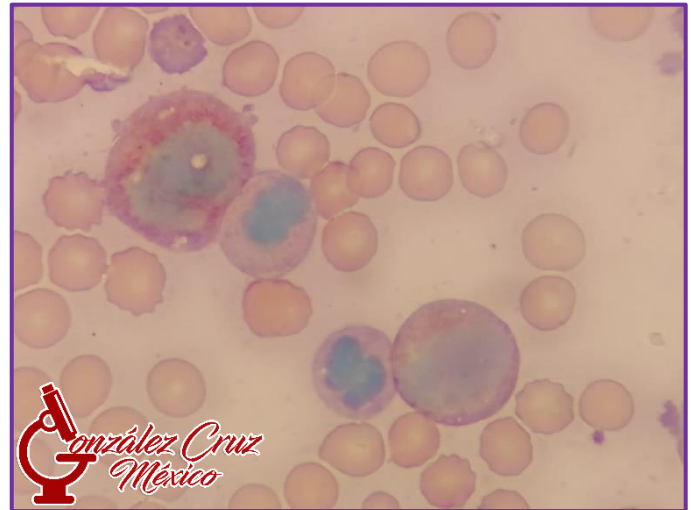
1. Los extendidos sanguíneos deben estar fijados y secos
2. En la cubeta de tinción (capacidad aproximada 60 mL) colocar 54 mL de agua destilada, adicionar 6 mL del buffer concentrado, mezclar, se puede preincubar a 37 °C si no es posible se puede realizar la tinción a temperatura ambiente con resultados similares.
3. Disolver el reactivo 4-cloro-1 naftol, en 5 mL de metanol directamente en el vial, adicionarlo a la cubeta de tinción mezclar.
4. Adicionar 0.2 mL de peróxido de hidrógeno 3 %, mezclar.
5. Sumergir el extendido sanguíneo o la muestra de tejido en la solución durante 15 minutos.
6. Retirar el extendido sanguíneo y enjuagar con agua destilada, absorber la mayor cantidad de agua antes de introducirlo al colorante de contratinción.
7. Contra teñir con la colorante safranina durante 5 minutos, sumergir directamente los extendidos al frasco.
8. Enjuagar con agua destilada, dejar secar los extendidos.
9. Observe al microscopio con objetivo de 100 X., muestras de tejido montar en resina sintética.

ANAE HYCEL®

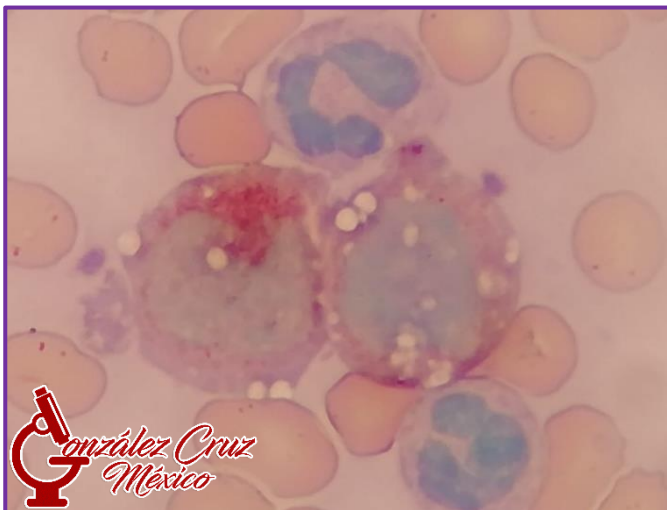
1. Utilizar los extendidos sanguíneos previamente fijados y secos.
2. En la cubeta de tinción, hacer una dilución 6 mL del buffer con 54 mL de agua destilada.
3. Adicionar el reactivo 1 alfa naftil acetato disuelto, mezclar.
4. En un tubo mezclar 75 µL de reactivo 3 pararosanilina y 75 µL de reactivo 4 nitrito de sodio dejar reaccionar 1 minuto y enseguida vaciarlo a la cubeta de tinción, mezclar perfectamente.
5. Sumergir el extendido en esta mezcla, desde los 30-60 minutos se observa actividad de la enzima, los extendidos toman una tonalidad ocre-marrón, si no percibe el cambio de color dejar reaccionar hasta 1 hora.
6. Enjuagar con agua destilada, absorber la mayor cantidad de agua del extendido antes de introducirlo al colorante de contratinción.
7. Contrateñir con verde metilo, sumerja la placa en el frasco durante 5 minutos.
8. Enjuague con agua destilada.
9. Dejar secar las placas.
10. Observe al microscopio con objetivo de 100 X, en muestras de tejido montar usando un medio acuoso.



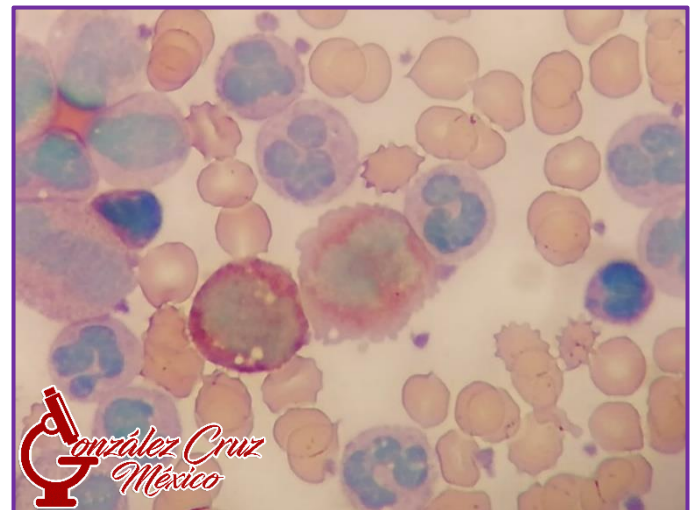
La celularidad teñida de color rojo-café corresponde a alfa-naftilacetatoesterasa y corresponde a linaje monocítico. Tinción de esterasa. Sangre periférica.



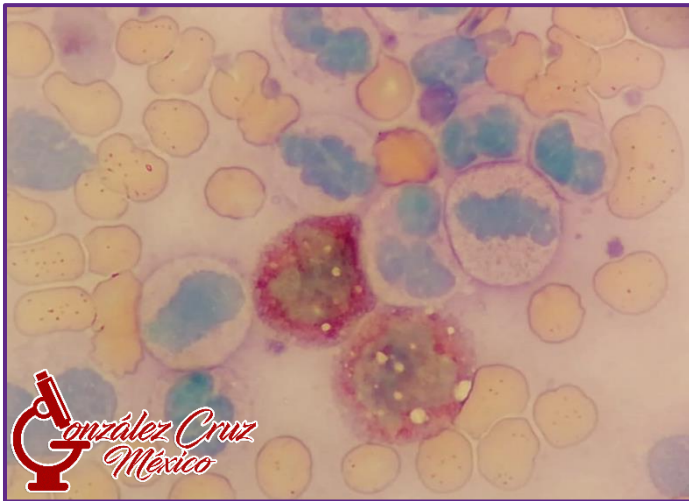
La celularidad teñida de color rojo-café corresponde a alfa-naftilacetatoesterasa y corresponde a linaje monocítico. Tinción de esterasa. Sangre periférica.



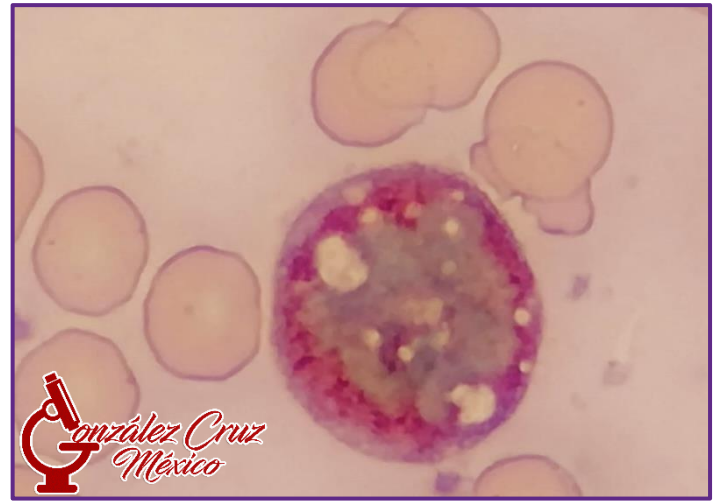
La celularidad teñida de color rojo-café corresponde a alfa-naftilacetatoesterasa y corresponde a linaje monocítico. Tinción de esterasa. Sangre periférica.



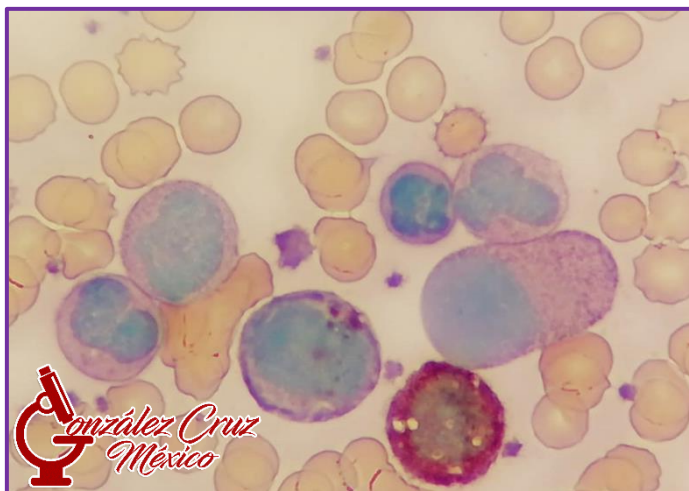
La celularidad teñida de color rojo-café corresponde a alfa-naftilacetatoesterasa y corresponde a linaje monocítico. Tinción de esterasa. Sangre periférica.



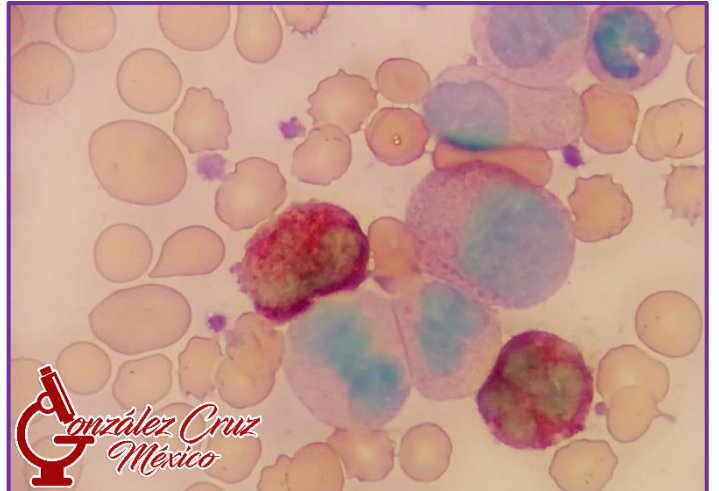
La celularidad teñida de color rojo-café corresponde a alfa-naftilacetatoesterasa y corresponde a linaje monocítico. Tinción de esterasa. Médula ósea.



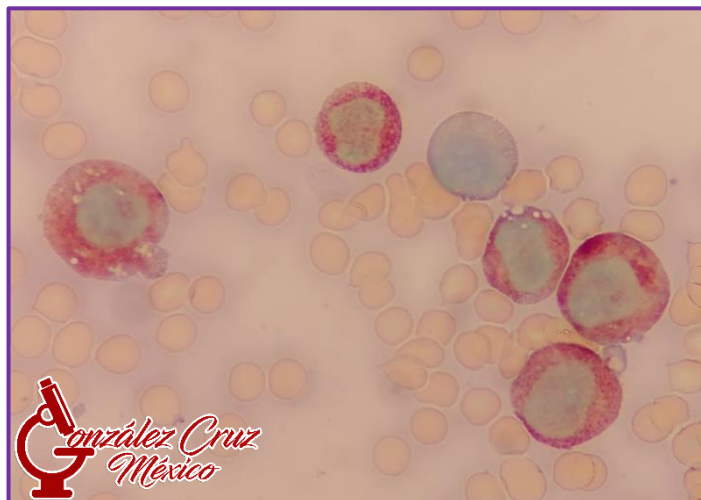
La celularidad teñida de color rojo-café corresponde a alfa-naftilacetatoesterasa y corresponde a linaje monocítico. Tinción de esterasa. Médula ósea.



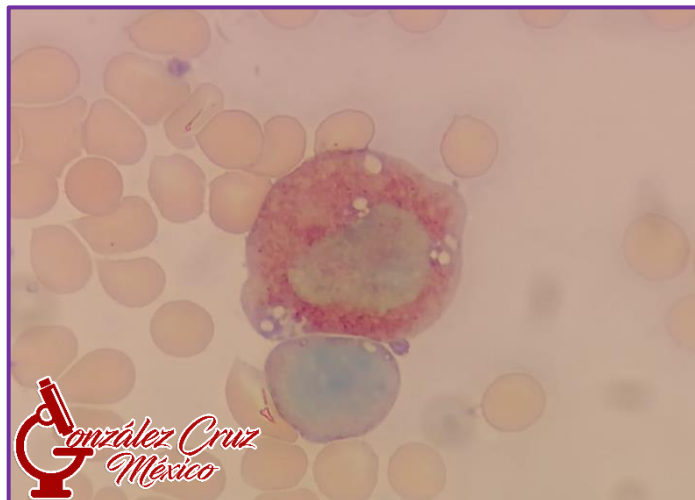
La celularidad teñida de color rojo-café corresponde a alfa-naftilacetatoesterasa y corresponde a linaje monocítico. Tinción de esterasa. Médula ósea.



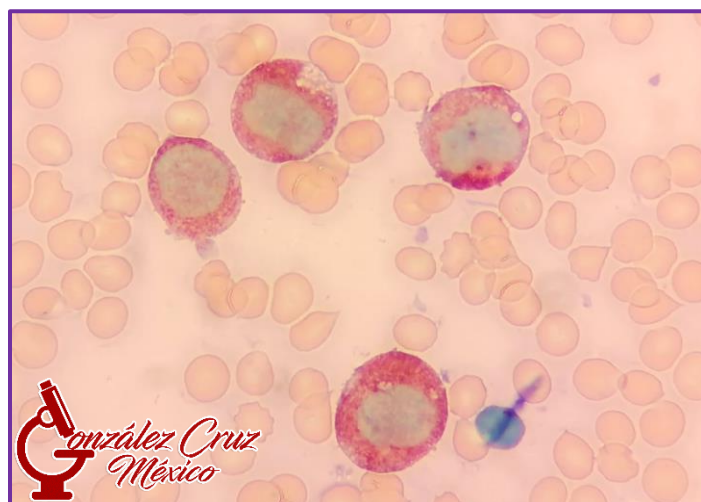
La celularidad teñida de color rojo-café corresponde a alfa-naftilacetatoesterasa y corresponde a linaje monocítico. Tinción de esterasa. Médula ósea.



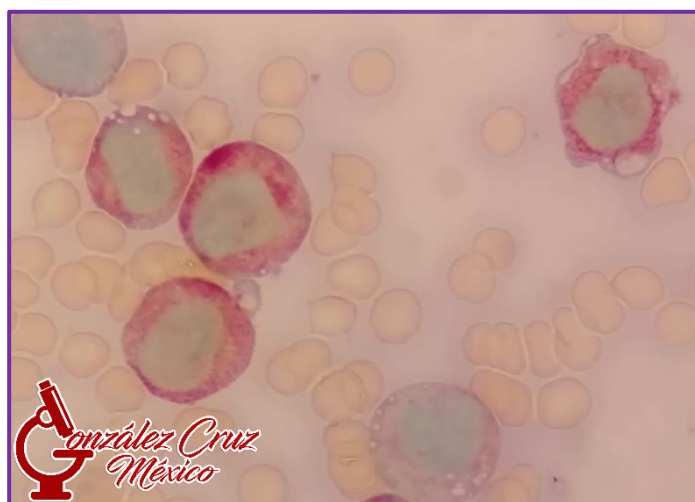
La celularidad teñida de color rojo-café corresponde a alfa-naftilacetatoesterasa y corresponde a linaje monocítico. Tinción de esterasa. Médula ósea.



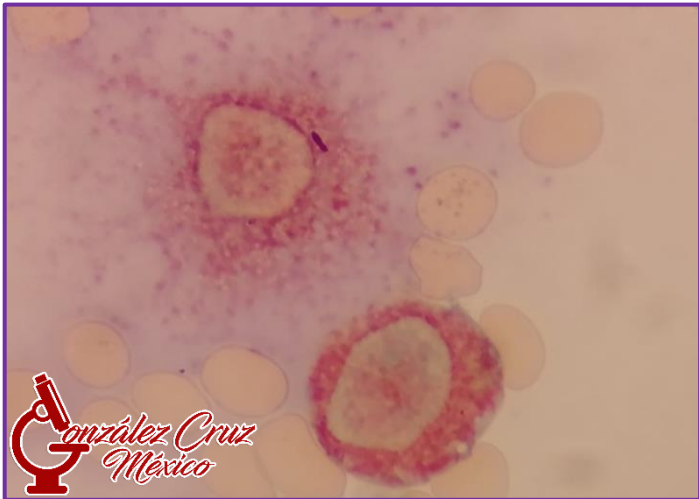
La celularidad teñida de color rojo-café corresponde a alfa-naftilacetatoesterasa y corresponde a linaje monocítico. Tinción de esterasa. Médula ósea.



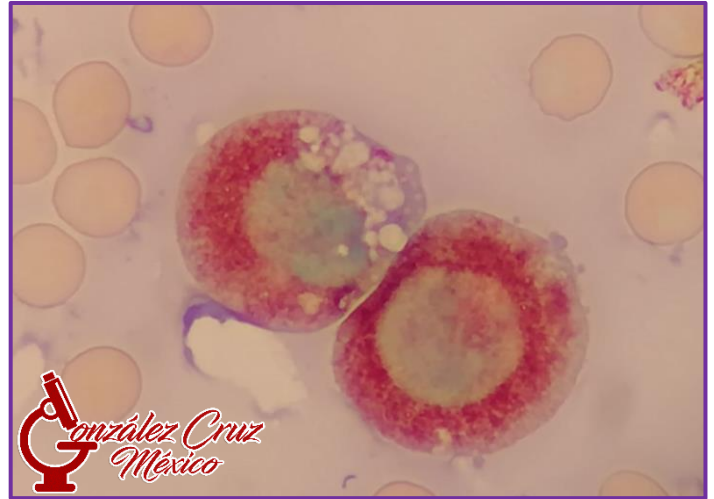
La celularidad teñida de color rojo-café corresponde a alfa-naftilacetatoesterasa y corresponde a linaje monocítico. Tinción de esterasa. Médula ósea.



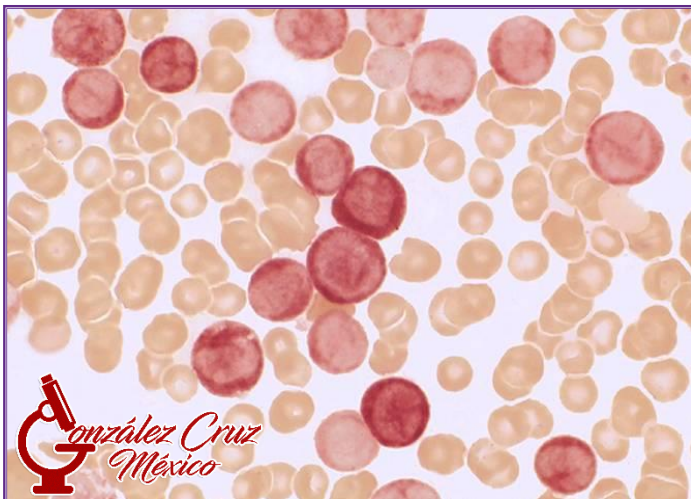
La celularidad teñida de color rojo-café corresponde a alfa-naftilacetatoesterasa y corresponde a linaje monocítico. Tinción de esterasa. Médula ósea.



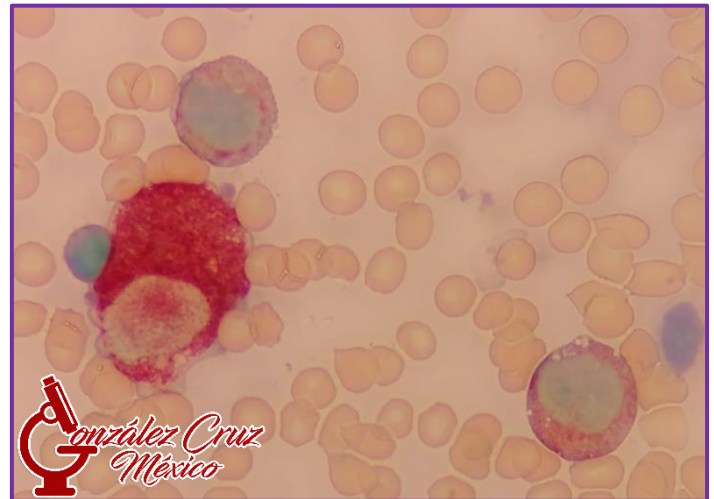
La celularidad teñida de color rojo-café corresponde a alfa-naftilacetatoesterasa y corresponde a linaje monocítico. Tinción de esterasa. Médula ósea.



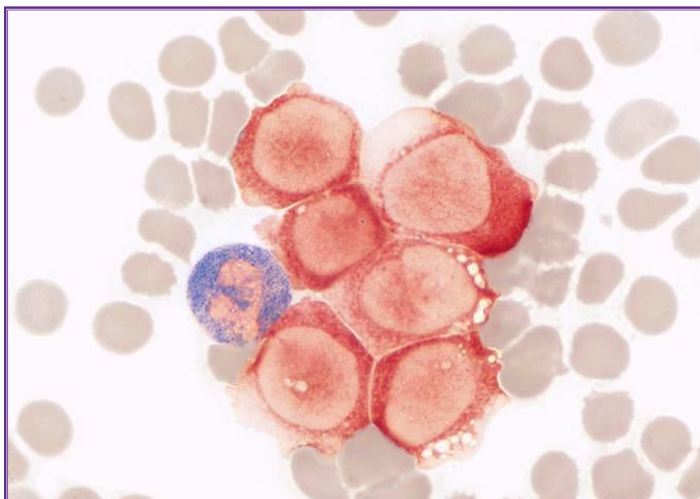
La celularidad teñida de color rojo-café corresponde a alfa-naftilacetatoesterasa y corresponde a linaje monocítico. Tinción de esterasa. Médula ósea.



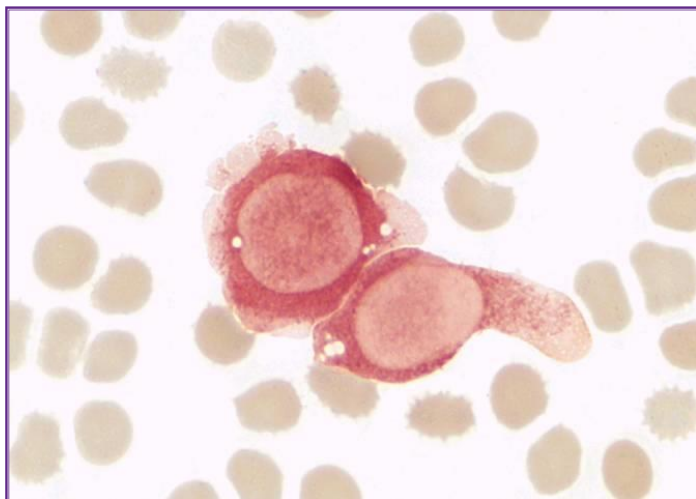
La celularidad teñida de color rojo corresponde a alfa-naftilacetatoesterasa y corresponde a linaje monocítico (promonocitos positivos para alfa-naftil) leucemia aguda monoblástica diferenciada M5b (monoblastos los que no tienen dobleces). Sangre periférica. Tinción de esteras dobles.



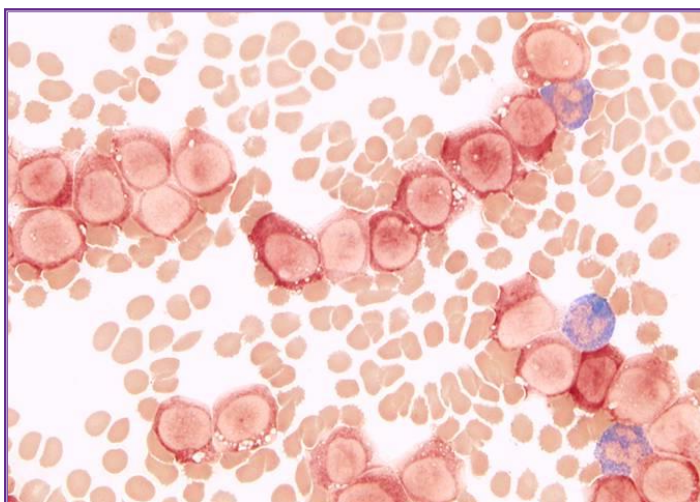
La celularidad teñida de color rojo corresponde a alfa-naftilacetatoesterasa y corresponde a linaje monocítico leucemia aguda monoblástica poco diferenciada M5a. Sangre periférica. Tinción de esteras dobles.



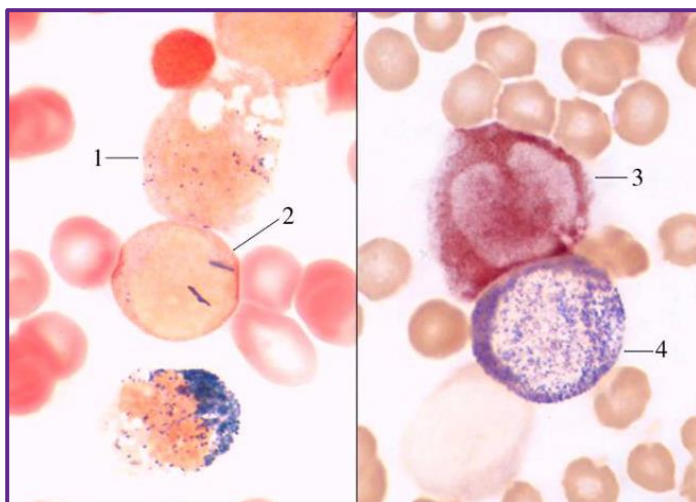
Celularidad teñida de color rojo corresponde a alfa-naftilacetatoesterasa y corresponde a linaje monocítico (monoblastos pos para alfa-naftil) leucemia aguda monoblástica poco diferenciada M5a y un neutrófilo teñido de color azul con cloroacetato. Sangre periférica. Tinción de esterasas dobles.
Dr. Joaquín Carrillo Farga.



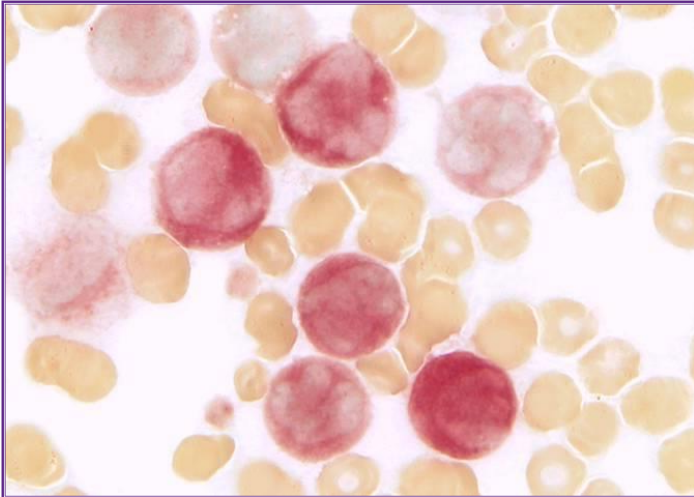
La celularidad teñida de color rojo corresponde a alfa-naftilacetatoesterasa y corresponde a linaje monocítico (monoblastos pos para alfa-naftil) leucemia aguda monoblástica poco diferenciada M5a. Sangre periférica. Tinción de esterasas dobles.
Dr. Joaquín Carrillo Farga.



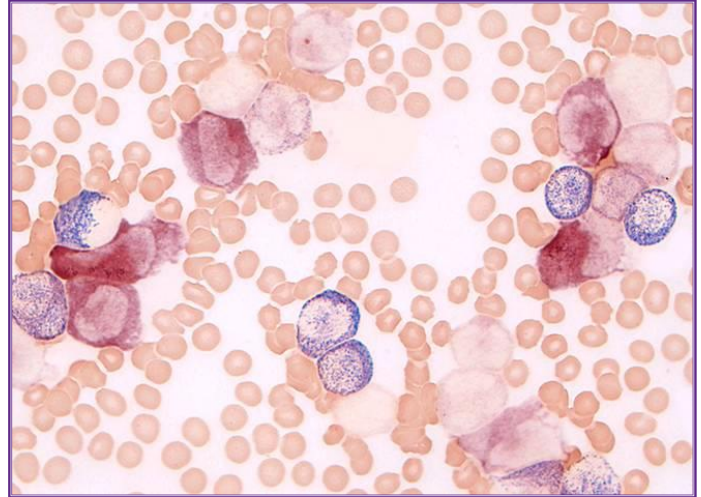
La celularidad teñida de color rojo corresponde a alfa-naftilacetatoesterasa y corresponde a linaje monocítico (monoblastos pos para alfa-naftil) leucemia aguda monoblástica poco diferenciada M5a y celularidad de color azul corresponde a neutrófilos por acción del alfa-naftil-butirato esterasa. Sangre periférica. Tinción de esterasas dobles.
Dr. Joaquín Carrillo Farga.



Leucemia aguda mielomonoblástica.
1. Tinción de para MPO, corresponde a estirpe monocítica con gránulos positivos pequeños y escasos denótese la vacuolización citoplásmica que presentan las células.
2. Mieloblasto el cual denota dos bastones de Auer positivos a la tinción para MPO.
3. Tinción para esteras dobles estirpe monocítica (rojo),
4. Tinción para esteras dobles estirpe neutrofílica (azul) Sangre periférica. Tinción de esterasas dobles.
Dr. Joaquín Carrillo Farga.



La celularidad teñida de color rojo corresponde a alfa-naftilacetatoesterasa y corresponde a linaje monocítico (promonocitos pos para alfa-naftil) leucemia aguda monoblástica diferenciada M5b. Tinción de esterasas dobles. Sangre periférica.
Dr. Joaquín Carrillo Farga.



La celularidad teñida de color rojo corresponde a alfa-naftilacetatoesterasa y corresponde a linaje monocítico y la de color azul a línea neutrofílica. Tinción de esterasas dobles. Médula ósea.
Dr. Joaquín Carrillo Farga.



Tinción de Perls

El hierro es un metal esencial que desempeña diversas funciones en el ser humano, se encuentra en ciertas proteínas al formar parte de sus grupos prostéticos como en la hemoglobina, transferrina, ferritina y hemosiderina.

En la hemoglobina se encuentra conformando el grupo hemo, de esta manera participa en la respiración celular. En la transferrina, el hierro es unido a esta para poder ser transportado ya sea desde los enterocitos en el duodeno, durante la digestión, o desde los depósitos de hierro del organismo, en el sistema monofagocítico. Los depósitos de hierro se almacenan como ferritina y en forma de gránulos de hemosiderina (agregados insolubles) en los macrófagos de la médula ósea, hígado y bazo. Cuando la hemoglobina es degradada el hierro es liberado, este puede ser usado para una nueva síntesis de hemoglobina u otras proteínas, o bien es almacenado en los depósitos de hierro del organismo.

La hemosiderina consiste en agregados insolubles de ferritina y componentes lisosomales, los agregados insolubles de ferritina forman micelas que, junto con los componentes lisosomales, se visualizan en forma de gránulos. Se encuentra en los macrófagos y constituye el hierro no hémico en los eritroblastos.

La tinción de Perls es una tinción citoquímica que permite la determinación de los niveles de hierro no hémico al evidenciar la presencia de hemosiderina en las células.

Su nombre se debe al patólogo alemán Max Perls, inventor del método de tinción.

Es una de las mejores formas de determinar los niveles de hierro en médula ósea y es importante para el diagnóstico de muchas condiciones asociadas con anemia.

Esta tinción puede aplicarse en extendidos sanguíneos y de médula ósea, utilizándose principalmente para esta última. Es recomendable hacer esta tinción en aspirados de médula ósea, ya que en los cortes histológicos de médula ósea el proceso de descalcificación altera el contenido de hemosiderina.

FUNDAMENTO

El colorante usado en esta tinción es el Azul de Prusia, una dilución de 1:1 de ácido clorhídrico y ferrocianuro potásico. El HCl actúa sobre la hemosiderina liberando iones férricos que reaccionan con el ferrocianuro potásico para dar lugar a ferricianuro férrico, otorgándole al gránulo siderótico un color azul verdoso/turquesa.

INTERPRETACIÓN

La hemosiderina teñida con la tinción de Perls se observa como gránulos de color azul-verdoso intenso (azul de Prusia).

En condiciones normales se observan los gránulos hemosiderínicos en los eritroblastos (sideroblastos).

Igualmente, en algunos eritrocitos (siderocitos) y macrófagos de la médula ósea, hígado y bazo.

En condiciones normales se ve un 30-60 % de sideroblastos con 1 a 4 gránulos en la superficie del citoplasma.

Un número mayor indica disfunción del metabolismo del hierro. Ello puede conducir al depósito de este en las mitocondrias, característico de una anemia refractaria sideroblástica.

Los depósitos de hemosiderina pueden informarse como (+), (-) o en porcentaje.

Aplicación

Sirve para diagnosticar anemias carenciales y síndromes mielodisplásicos.

REACTIVOS

1. **Solución A (Ferrocianuro al 4%)**
 Ferrocianuro de potasio 1.0 g
 Agua destilada 25 mL
2. **Solución B (HCl al 4%)**
 HCl concentrado (38%) 40 mL
 Agua destilada 340 mL
3. **Solución C (mezcla de incubación)**
 Solución A 25 mL
 Solución B 25 mL
4. **Fucsina básica**
 Fucsina Básica 1.0 g
 Etanol absoluto 10 mL
 Disolver y agregar:
 Solución acuosa de fenol al 5% 90mL
5. **Solución diluida para contratación**
 Solución stock de fucsina básica 3 mL
 Agua destilada 100 mL

TÉCNICA

1. Fijar los extendidos con vapores de formol por 3 minutos.
2. Colocar los extendidos fijados en un vaso de Coplin y vaciar en éste la mezcla de incubación (solución C) precalentada a 560 C.
3. Incubar por 30 minutos.
4. Lavar con agua corriente y secar perfectamente sobre una toalla interdoblada de papel.
5. Contrateñir con solución diluida de fucsina básica por 5 minutos
6. Lavar con agua corriente, etanol absoluto y nuevamente con agua corriente.
7. Secar sobre una toalla interdoblada de papel.

HYCEL ®

1. Fijar los extendidos en metanol.
2. En la cubeta de tinción, mezclar 30mL del reactivo 1 ferrocianuro de potasio y 30mL del reactivo 2 ácido clorhídrico. Opcional: en la caja portaobjetos incluida, mezclar 12.5mL de ferrocianuro de potasio con 12.5mL de ácido clorhídrico, dejar actuar 1 minuto.
3. sumergir el extendido en la mezcla durante 20 minutos.
4. Enjuagar con agua destilada, absorber toda la humedad posible del extendido antes de introducirlo al colorante de contratación.
5. Contrateñir con rojo nuclear rápido durante 5 minutos, sumergir el extendido en el frasco del colorante.
6. Enjuague con agua destilada, dejar secar el extendido.
7. Observe al microscopio con objetivo de 100 X.

ESTUDIOS DE HIERRO RELACIONADOS EN ANEMIAS HIPOCRÓMICAS

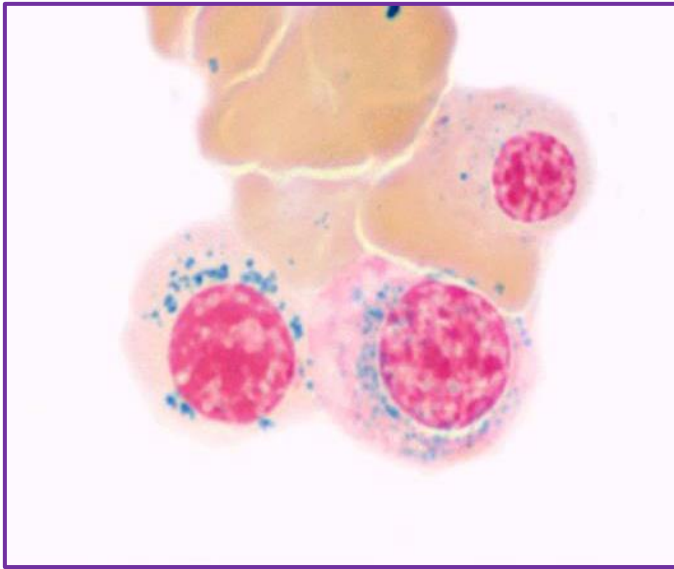
	A. SIDEROPÉNICA	A. PAD. CRÓNICOS	TALASEMIAS O SIDEROBLÁSTICAS
Hierro	(↓) Bajo	(↓) Bajo	Normal o Aumentado
CTFT	(↑) Alto	(↓) Bajo	Normal
IST	<10%	10-20%	>20%
Ferritina	<12	20-200	>20%
Hemosiderina	0	+ a ++++	Normal o Aumentado

VALORES NORMALES DE REFERENCIA

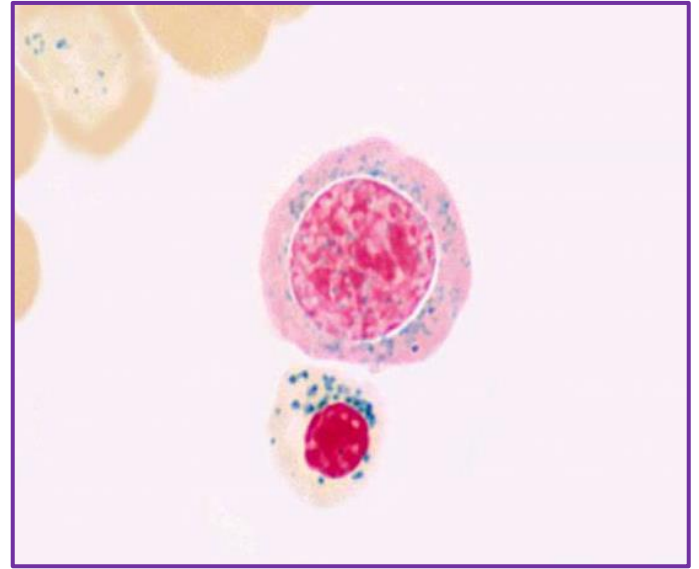
Determinación	Valores de Referencia
Hierro	50-150 µg/dl
CTFT	300-360 µg/dl
IST	20-50%
Ferritina	50-200 µg/L
Hemosiderina	+++ (apreciativo)

***La forma más directa de evaluar el hierro en los almacenes es realizando una tinción de azul de Prusia (técnica de PERLS) que tiñe hierro no hémico como lo es el hierro unido a ferritina, esta determinación es semicuantitativa y solo se realiza cuando en estudios anteriores existen dudas en el diagnóstico.**

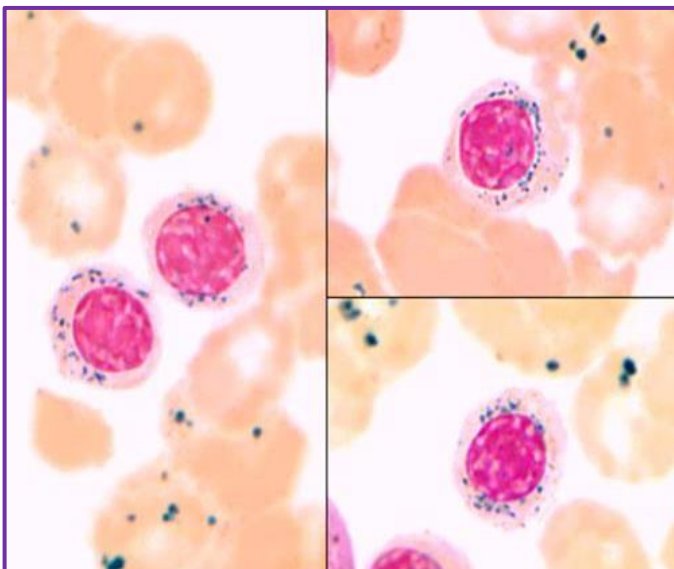
***Es muy importante realizar estas determinaciones en una anemia hipocrómica antes de iniciar el tratamiento, pues, aunque la deficiencia de hierro es la causa más frecuente, los pacientes con otras enfermedades no se benefician con la administración de hierro e incluso este puede causar problema; por ejemplo, en las talasemias y en las anemias sideroblásticas el hierro no utilizado aumenta en la circulación y se deposita en los tejidos causando daños que pueden ser muy severos.*



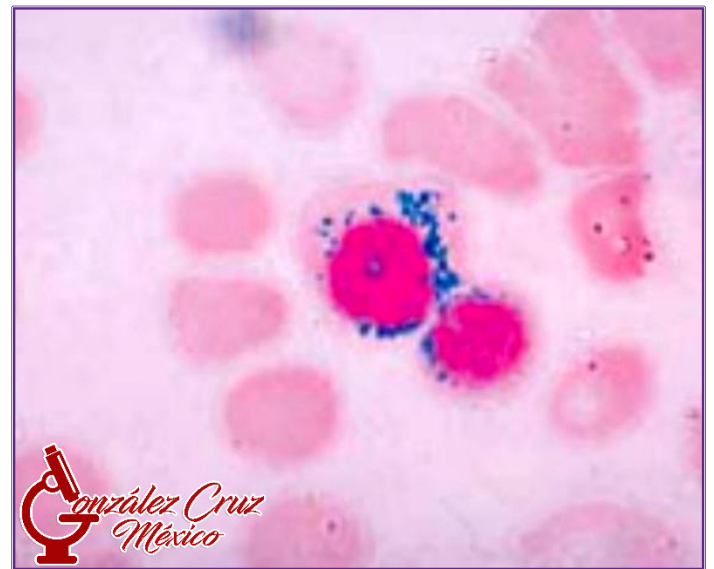
Sideroblastos patológicos (“en anillo”).
Médula ósea. Tinción de Perls.
Dr. Joaquín Carrillo Farga.



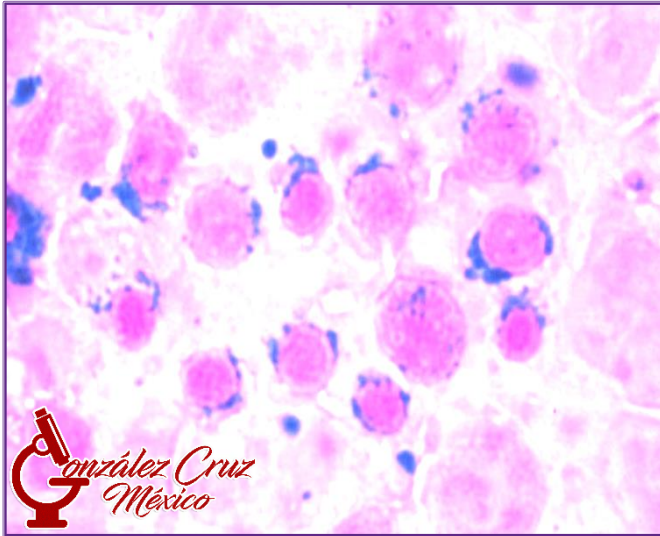
Sideroblastos patológicos positivos a
Perls. Médula ósea. Tinción de Perls.
Dr. Joaquín Carrillo Farga.



Sideroblastos patológicos positivos a
Perls. Médula ósea. Tinción de Perls.
Dr. Joaquín Carrillo Farga.

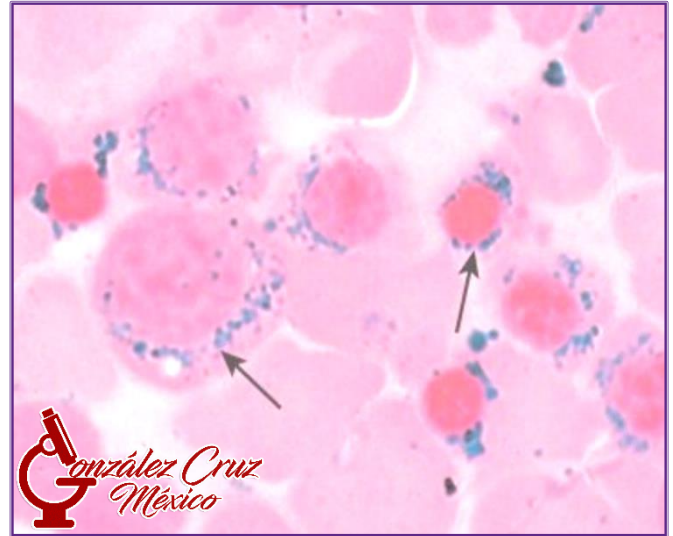


Sideroblastos positivos a Perls. Médula
ósea. Tinción de Perls.



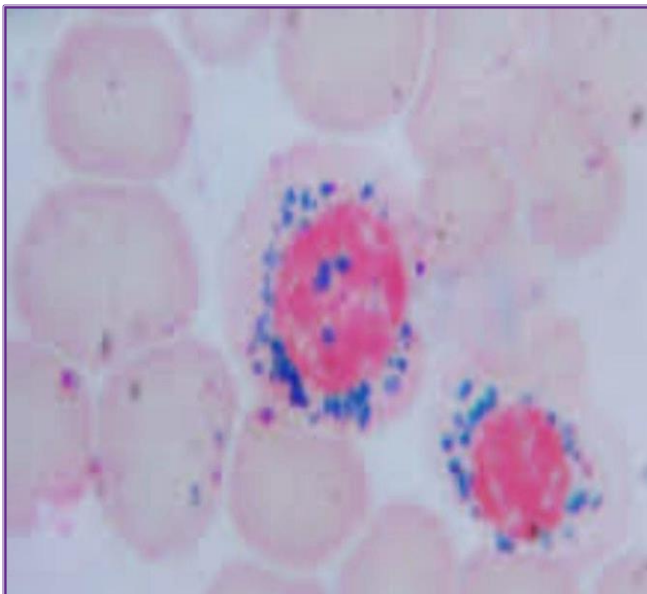
 González Cruz
México

Sideroblastos positivos a Perls. Médula ósea. Tinción de Perls.

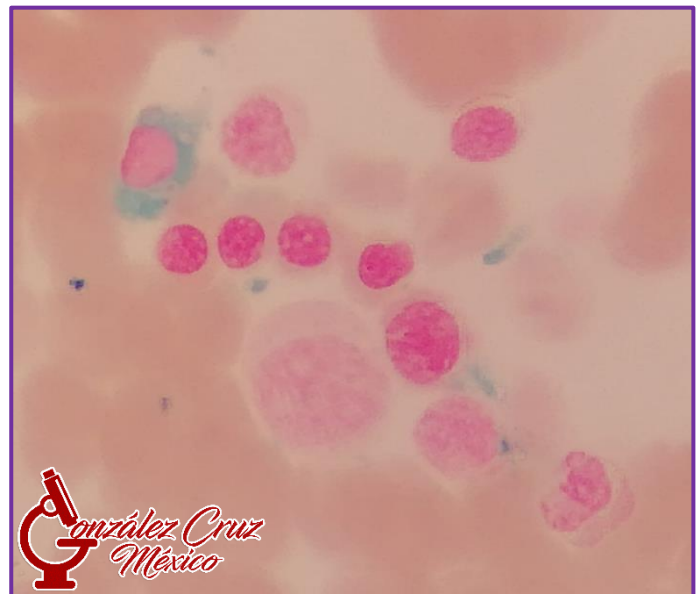


 González Cruz
México

Sideroblastos positivos a Perls. Médula ósea. Tinción de Perls.

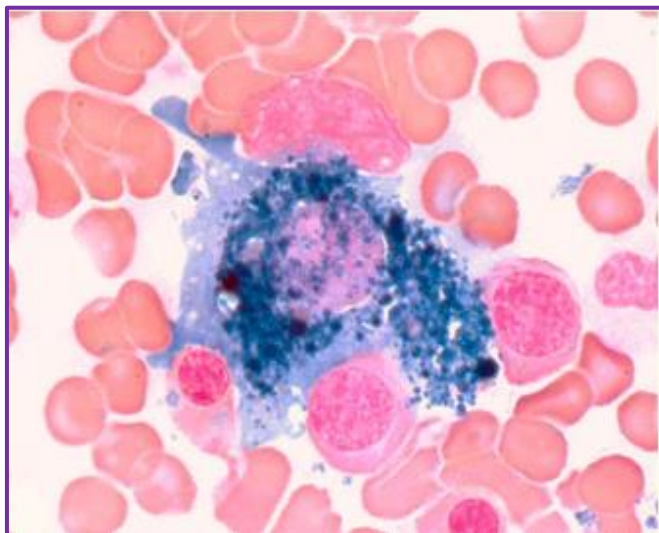


Sideroblastos positivos a Perls. Médula ósea. Tinción de Perls.

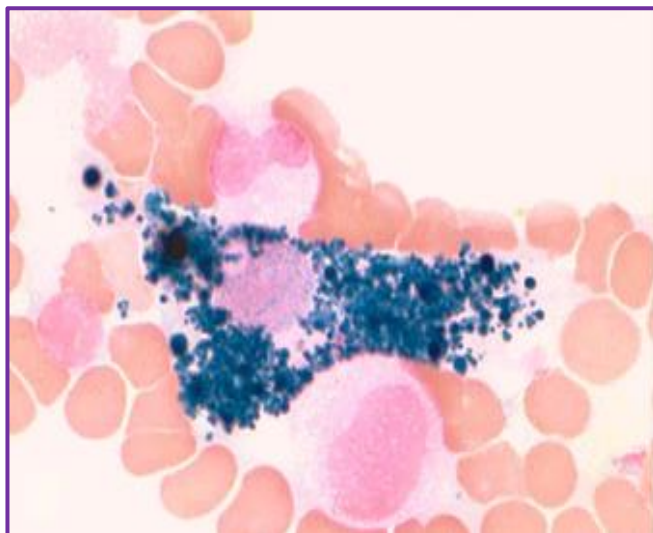


 González Cruz
México

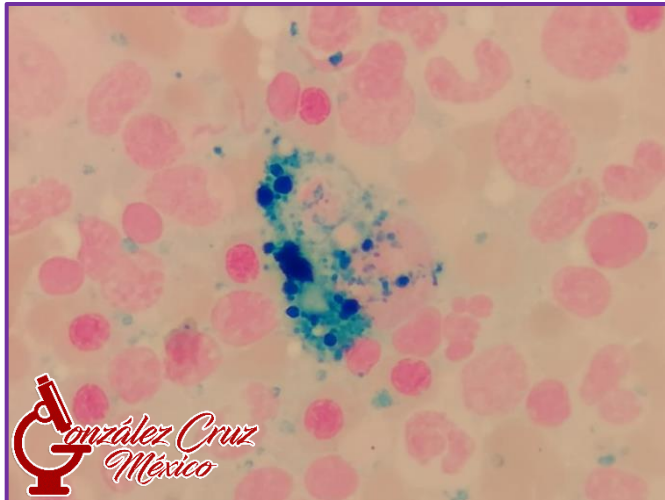
Tinción de Perls en la médula ósea. Anemia por deficiencia de hierro. Eritroblastos con poco hierro.



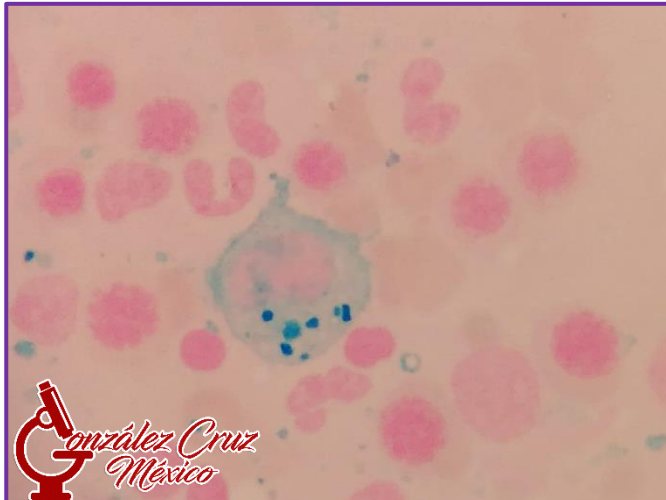
Tinción de Perls en la médula ósea. Anemia de los padecimientos crónicos. Macrófago con aumento de hierro citoplásmico. Dr. Joaquín Carrillo Farga.



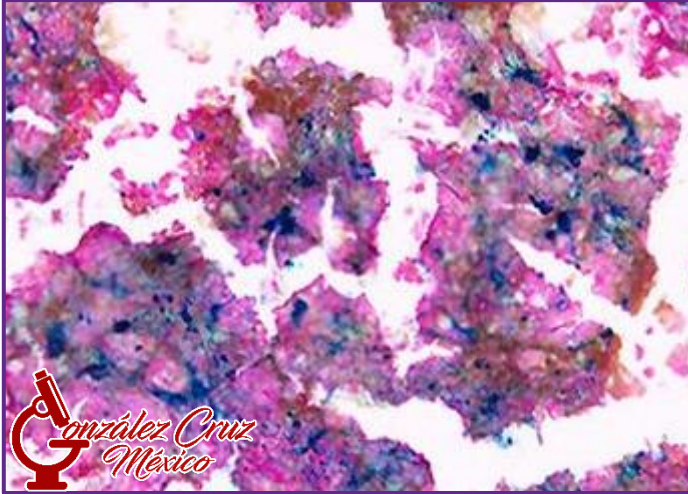
Tinción de Perls en la médula ósea. Macrófago con aumento de hierro no hémico. Dr. Joaquín Carrillo Farga.



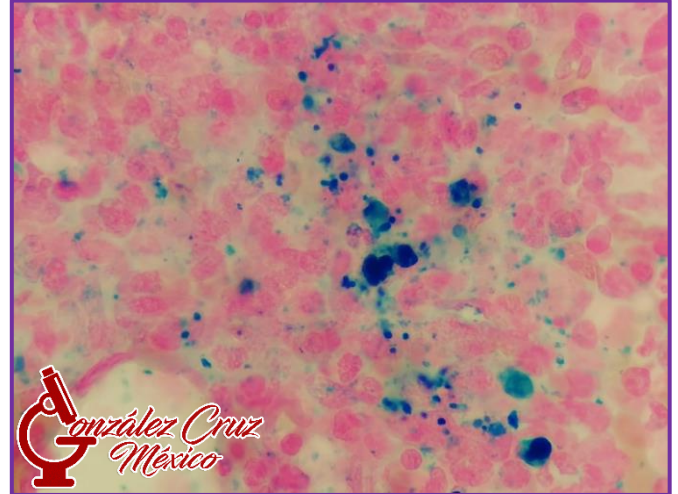
Tinción de Perls en la médula ósea. Macrófago con hierro citoplásmico.



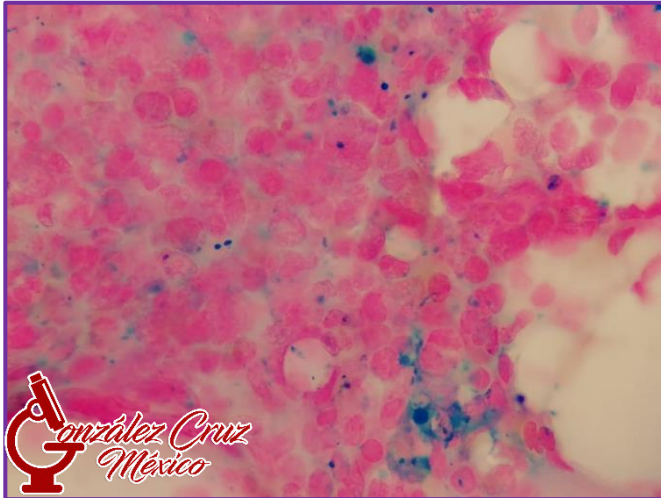
Tinción de Perls en la médula ósea. Macrófago con poco hierro citoplásmico.



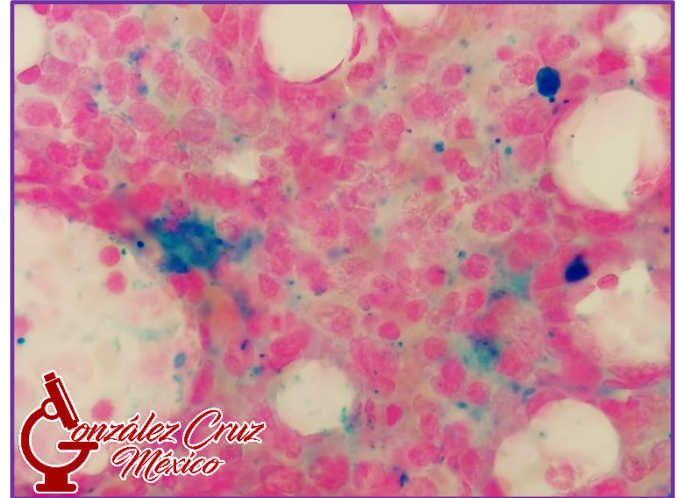
**Tinción de Perls en la médula ósea.
Anemia de los padecimientos crónicos.
Aumento de hierro en los macrófagos de
un cúmulo estromal.**



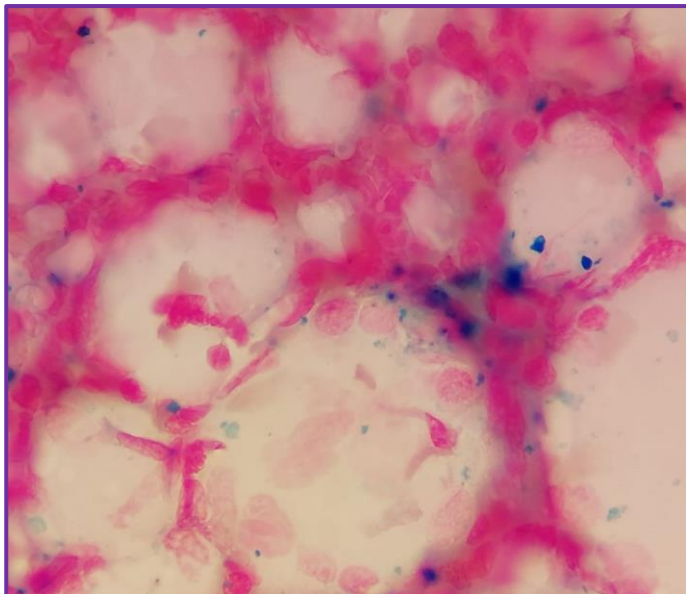
**Tinción de Perls en la médula ósea.
Cúmulos de hierro en los espacios
estromales.**



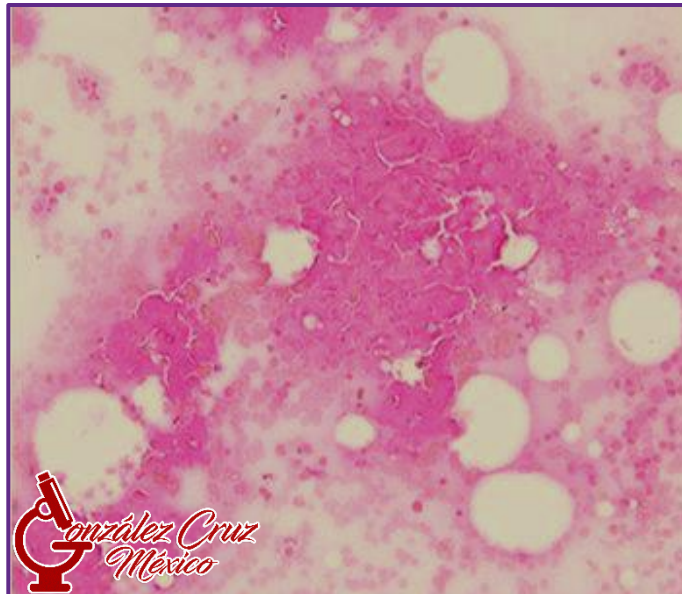
**Tinción de Perls en la médula ósea.
Cúmulos de hierro en los espacios
estromales.**



**Tinción de Perls en la médula ósea.
Cúmulos de hierro en los espacios
estromales.**



Tinción de Perls en la médula ósea. Cúmulo de hierro en los espacios estromales.



Tinción de Perls en la médula ósea. Anemia por deficiencia de hierro. No se observa hierro en los cúmulos estromales, sitios en los que normalmente se encuentran los macrófagos que contienen hierro de reserva.

TABLA. IDENTIFICACIÓN DE TINCCIONES CITOQUÍMICAS PARA EL DIAGNOSTICO DE LEUCEMIAS MIELOIDES Y LINFOIDES

TIPO	PEROXIDASA	ESTERASA	FOSFATASA ACIDA	PAShiff	AZUL DE CRESIL BRILLANTE
M0	1(+)	-	-	± [puede haber mínima positividad citoplásmica en forma difusa o de gránulos pequeños]	Auxiliar morfológico
M1	1(+)	-	-	± [puede haber mínima positividad citoplásmica en forma difusa o de gránulos pequeños]	Auxiliar morfológico
M2	2(+)		1(+) [gránulos pequeños de distribución difusa]	± [puede haber mínima positividad citoplásmica en forma difusa o de gránulos pequeños]	Auxiliar morfológico
M3	4(+)	1(+)	1(+) [gránulos pequeños de distribución difusa]	± [puede haber mínima positividad citoplásmica en forma difusa o de gránulos pequeños]	Auxiliar morfológico
M4	1(+) [Combinación de M5 con M0, M1, M2]	1(+) [Combinación de M5 con M0, M1, M2]	1(+) [Combinación de M5 con M0, M1, M2]	1(+) [Combinación de M5 con M0, M1, M2]	Auxiliar morfológico
M5	1(+)	3(+)	1(+) [gránulos pequeños de distribución difusa]	1(+)	Auxiliar morfológico
M6	-	-	-	3(+) [Positividad en el citoplasma de los eritroblastos neoplásicos en forma granular o difusa]	Auxiliar morfológico
M7	-	-	-	2(+)	Auxiliar morfológico
L1	-	[Positividad en forma de un gránulo único paranuclear]	[Grupo de gránulos de localización paranuclear]	4(+) [Gránulos citoplasmáticos finos y frecuentemente coalescentes, formando "bloques" gruesos]	Auxiliar morfológico
L2	-	[Ocasionalmente un gránulo aislado paranuclear]	2(+)	2(+) [Gránulos citoplasmáticos finos y frecuentemente coalescentes, formando "bloques" gruesos]	Auxiliar morfológico
L3	-	-	-	1(+)	Auxiliar morfológico
LCP	-	-	3(+)	-	Auxiliar morfológico

+ = positividad en la mayoría de los casos. - = negatividad en la mayoría de los casos. ± = reactividad variable. LCP: Leucemia de células peludas.

Aglomeración plaquetaria (agregado plaquetario). Se observa en extendidos sanguíneos, y consiste en la formación de conglomerados de plaquetas, debido a la presencia (en sangre periférica) de aglutininas dirigidas contra las plaquetas.

Anillos de Cabot. Restos de filamentos del huso acromático de la mitosis, en el extendido sanguíneo se observan como inclusiones en precursores eritroides, su disposición puede ser en forma de anillo o de ocho.

Aparato de Golgi. Orgánulo delimitado por una membrana, se localiza en el citoplasma. Su función es modificar y distribuir las proteínas y los lípidos elaborados en el retículo endoplásmico.

Basofilia difusa. Reacción de eritrocitos relativamente inmaduros a colorantes básicos; las células teñidas tienen un color azul, gris o azul grisáceo.

Bastones de Auer. Estructura en forma de varilla, presente en el citoplasma celular, corresponden a agregados de granulación primaria; son específicos de blastos de estirpe mieloide.

Blastos. Células hematopoyéticas inmaduras con poca diferenciación, proceden de las stem cells. Tienen un gran núcleo con cromatina laxa, en el que hay nucléolos (uno o más); tiene escaso citoplasma basófilo. Estas células poseen la capacidad de proliferar para formar linaje mieloide y linfoide, de acuerdo con los marcadores expresados en su superficie.

Capacidad total de fijación del hierro (CTFT). Cantidad total de hierro que puede captar la transferrina. Solo un tercio de la transferrina está saturada y prácticamente todo el hierro circulante en el plasma se encuentra unido a la transferrina.

Cariorexis. Fragmentación nuclear, aumento de la basofilia nuclear.

Cuerpos de Döhle. Formados por agregados de retículo endoplásmico rugoso, no muy visibles, encontradas en el citoplasma de los neutrófilos segmentados. Suelen observarse en procesos infecciosos o estados tóxicos.

Cuerpos de Howell-Jolly. Inclusiones puntiformes, densas y generalmente únicas, se deben a fragmentos de cromosomas provenientes de mitosis eritroblásticas anormales.

Estroma medular. Complejo variado de células y de sus respectivos productos, su función es mantener y regular el crecimiento de las Células Tronco Hematopoyéticas; conformado por una matriz celular (adipocitos, células endoteliales, células estromales, células reticulares adventicias, fibroblastos, macrófagos, osteoblastos y osteoclastos) y una matriz extracelular.

Ferritina. Complejo hierro-apoferritina, una de las formas principales en las que el hierro se almacena en el cuerpo. Existe una correlación directa entre la concentración sérica de ferritina y el hierro almacenado disponible en el organismo; por esta razón la determinación de la ferritina plasmática ha proporcionado al área clínica un medio apropiado de evaluar el balance férrico, siendo la prueba más fidedigna de ferropenia.

Glucógeno. Polisacárido formado por cadenas ramificadas de glucosa, cuya función es ser reserva energética.

Glucosaminoglicanos. Son largas cadenas de polisacáridos complejos, compuestos por unidades repetitivas de disacáridos, con una función de biomoléculas estructurales.

Granulación tóxica. Lisosomas de tamaño grande y activos de los neutrófilos segmentados que poseen mayor afinidad por los colorantes básicos, como consecuencia estos se aprecian como gránulos negruzcos purpúricos.

Hemosiderina. Pigmento amarillo oscuro que contiene hierro, producto de descomposición de la hemoglobina, que se encuentra en determinados estados patológicos; infiltra las vísceras, principalmente el hígado.

Hexosamina. Hexosa a la que se le adicionan grupos amino.

Hipersegmentación. Los núcleos de los neutrófilos segmentados contienen más de los 2-4 lóbulos habituales, se observa en pacientes con deficiencia de ácidos fólico o de vitamina B12.

Hiposegmentación. Los núcleos de los neutrófilos segmentados contienen menos lóbulos de lo normal, ya sean uno o dos; en la anomalía de Pelger-Hüet, pseudo-Pelger-Hüet o anomalía adquirida de Pelger-Hüet en la leucemia aguda.

Índice de Saturación de la Transferrina (IST). Relación entre las concentraciones de hierro y transferrina en suero y es expresada en porcentaje.

Leucemia. Proliferación anormal de un tipo de células hematopoyéticas esta proliferación se origina en la médula

ósea y puede infiltrarse hacia otros tejidos.

Leucopoyesis. Proceso de producción, maduración, desarrollo y especialización de los leucocitos a partir de célula troncal hematopoyética en médula ósea, mediante una estimulación hormonal específica.

Linfoma. Son trastornos malignos clonales que se derivan de células linfáticas, ya sea precursoras o linfocitos T o B maduros.

Linfoma/Leucemia de Burkitt. Es un linfoma de linfocitos B que proliferan con rapidez, con frecuencia se presenta con infiltración extranodal o leucemia aguda. Se conforma de células monomórficas de tamaño medio, poseen en su citoplasma abundantes vacuolas.

Linfoma no Hodgkin (LNH). Proliferación monoclonal anormal de las células linfoides, se localizan en ganglios linfáticos, médula ósea, hígado, tracto gastrointestinal y bazo.

Médula ósea amarilla. No posee actividad hematopoyética, se ubica en los canales medulares de los huesos largos y está constituida principalmente por tejido adiposo.

Médula ósea roja. Tejido esponjoso con función hematopoyética.

Médula ósea. Constituida por tejido conjuntivo reticular, vasos sanguíneos, fundamentalmente por capilares de luz amplia, llamados sinusoides. Posee nutrientes suficientes para proveer a las células madre y progenitoras un "microambiente" para su maduración y diferenciación. Se localiza en el interior de los huesos, entre las trabéculas

óseas de la sustancia esponjosa y el espacio tubular interno de los huesos largos de los miembros.

Metacromasia. Propiedad de algunos componentes químicos de las células y tejidos de cambiar el color del colorante empleado.

Mieloperoxidasa. Enzima presente en lisosomas que ayuda a la muerte intrafagocitaria.

Mieloproliferativo. Trastorno en el que hay proliferación medular y extramedular de los constituyentes de la médula ósea.

Naftol. Compuestos químicos en el que su grupo funcional es el hidroxilo, se utilizan en la producción de tintas en la síntesis orgánica.

Nucleolo. Compartimiento intranuclear que no posee membrana. Su función principal es la biosíntesis de ribosomas desde sus componentes de ADN para formar ARN ribosomal.

Plaquetas gigantes. Pueden indicar la presencia de plaquetas muy jóvenes, debido a la maduración anormal del megacariocito; si las plaquetas tienen un diámetro superior a 5 a 6 μm podrían no ser reconocidas como tales por los contadores electrónicos.

Reticulocitos. Son formas jóvenes de eritrocitos que conservan restos de ARN y tienen una vida media en sangre periférica de 24 h antes de convertirse en eritrocitos adultos.

Sal de diazonio. Las sales de diazonio son reactivos muy importantes, en síntesis, siendo el punto de partida en la preparación de diversos compuestos aromáticos, colorantes y drogas ya que las sales de diazonio pueden experimentar multitud de reacciones en

las que es posible introducir grupos funcionales, realizar copulaciones con fenoles, naftoles y aminas para dar compuestos coloreados.

Satelitismo plaquetario. Adherencia de plaquetas alrededor de neutrófilos segmentados.

Sideroblastos. Eritrocitos con el hierro dispuesto alrededor del núcleo debido a su situación intramitocondrial.

Síndrome hipereosinofílico. Trastorno hematológico poco frecuente que causa activación y degranulación de eosinófilos en diversos tejidos con el consecuente daño tisular y funcional.

Superficie reflectante. Superficie que no absorbe las ondas luminosas, sino que las refleja y cambia su dirección.

Tinción supravital. Tinción realizada en células vivas no fijadas.

Transferrina. Proteína plasmática que capta el hierro desde el lumen intestinal y de los lugares de degradación de la hemoglobina y lo transporta a los tejidos periféricos.

Tricoleucemia (leucemia de células peludas). Leucemia crónica causada por un cambio anormal en los linfocitos B. La enfermedad adquiere ese nombre porque los linfocitos leucémicos tienen pequeñas proyecciones delgadas en la superficie que parecen pelos cuando se ven en el microscopio.

BIBLIOGRAFÍA

1. Altamirano, C. & Rodríguez, D. (1999). Fracturas lumbares en un paciente con síndrome hipereosinofílico idiopático. *Revista Cirugía y Cirujanos*. 67. 108-111.
2. Bruce, A. & Dennis, B. (2006). Introducción a la biología celular. (Ed. 2). Médica Panamericana: Buenos Aires.
3. Brusco, H. A., López, J. J. & Loidl, C. F. (2014). Histología: médico-práctica. Técnica histológica.
4. Casamajó, M. T., Minchinela, J.M & Antoja F. (1987). Almacenamiento y movilización de las reservas de hierro. Significación e interés de la ferritina plasmática. *Química Clínica*. 6. (4). 213-216. Recuperado el 19 de agosto de 2019, de: [http://www.seqc.es/download/revista/644/1747/85694227/1024/cms/Quimica%20Clinica%201987;6%20\(4\)%20213-216.pdf/](http://www.seqc.es/download/revista/644/1747/85694227/1024/cms/Quimica%20Clinica%201987;6%20(4)%20213-216.pdf/)
5. Deschamps, E M^a, Miña, A, & Diéguez, MA. (2003). Isoformas de la transferrina: Utilidad clínica de su determinación. *Revista de Diagnóstico Biológico*, 52(1), 35-39. Recuperado en 19 de agosto de 2019, de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-79732003000100005&lng=es&tlng=es
6. Díaz, J., Fernández, M. T. & Parede, F. (1997). Aspectos básicos de Bioquímica Clínica. Editorial Díaz de Santos: Madrid.
7. Eandi Eberle, S. J., & Feliu Torres, A. S. (2017). Hemoglobinas inestables. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 51(3).
8. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Guías de trabajos prácticos. Citoquímica hematológica. Universidad Nacional de Tucumán: Argentina. Recuperado de: <http://www.qualitat.cc/sitebuildercontent/sitebuilderfiles/HEMATOLOGIA.pdf>
9. García, B., Rubio, F. & Crespo, M. R. (2015). Técnicas de análisis hematológico. Paraninfo: Madrid.
10. García del Moral R. (1993). Laboratorio de anatomía patológica. McGraw-Hill Interamericana: España.
11. Geneser, F., Brüel, A., Trantum-Jensen, J., Christensen, E. & Qvortrup, K. (2014). Histología. 4^a edición. Editorial Médica Panamericana: México.
12. González, E. J. & García, A. (2017). La tinción azul de cresil brillante como auxiliar morfológico de leucemias. *Diagnóstico in vitro*. (5). 22-32.
13. Henry JB. (2010). Laboratorio en el diagnóstico clínico. 20 ed. México: Marbán.
14. Kasper, D., & Arias Rebatel, G. (2017). Harrison Manual de Medicina (19th ed.). Mexico D.F.: McGraw-Hill Educación.
15. Kierszenbaum AL. (2008). Histología y Biología Celular: Introducción a la anatomía

- patológica. (Ed. 2ª). Elsevier Mosby: España.
16. LICHTMAN M.A. et al. Williams Hematology. 7th Edition. 2007
López-Jácome, L., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C., Ortega.
 17. Manascero, A. R. (2003). Atlas de morfología celular, alteraciones y enfermedades relacionadas. Centro Editorial Javeriano: Bogotá.
 18. McKenzie SB. Hematología Clínica; Ed. El Manual Moderno. 2ª. Edición 2009.
 19. Megías, M., Molist, P. & Pombal, M. A. (2018). Atlas de Histología Vegetal y Animal: Técnicas histológicas. Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Facultad de Biología. Recuperado de: <https://mmegias.webs.uvigo.es/descargas/tecnicas-tincion.pdf>
 20. Miale, J. B. (1985). Hematología: Medicina de Laboratorio. Editorial REVERTÉ: México.
 21. Mihael, H. & Wojciech, MD.
 22. Montalvo, C. E. (2010). Microscopía. Facultad de Medicina, UNAM. Recuperado de: http://www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/PDF/Portal%20de%20Recursos%20en%20Linea/Apuntes/2_microscopia.pdf
 23. Montoya, H. H. (2008). Microbiología básica para el área de la salud y afines. (Ed 2). Editorial Universidad de Antioquia: Colombia.
 24. Montuenga, B. L.; Esteban, R. F. J. & Calvo, G. A. Técnicas en histología y biología celular. Barcelona, Elsevier Masson, 2009.
 25. Mosby, S. (2003). Diccionario Mosby de medicina, enfermería y ciencias de la salud. (Ed. 6). ELSEVIER: España.
 26. Palomo, I. et al. (2009). Hematología: Fisiopatología y Diagnóstico. Editorial Universidad de Talca. Chile.
 27. Peña, S., Cerón-González, G., & Franco-Cendejas, R. (2015). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. Investigación en Discapacidad. 3. (1). 10-18.
 28. Pérez, D. (2005). Proteínas relacionadas con el metabolismo del hierro. Química Clínica. 24. (1). 5-40. Recuperado el 19 de agosto de 2019, de: http://www.seqc.es/download/revista/78/320/385271785/1024/cms/QC_2005_5-40.pdf/
 29. Reina, C. M., Lara, A. R., & Clavijo, S. R. (2007). Células madre hematopoyéticas, generalidades y vías implicadas en sus mecanismos de auto-renovación. Revista Ciencias de la Salud, 5(1).
 30. Rodak, F. B. (2004). Hematología: fundamentos y aplicaciones clínicas. 2ª edición. Médica Panamericana: Buenos Aires.
 31. Rodak, F. B. (2013). Clinical Hematology Atlas. 4ª ed. Elsevier. St. Louis.

32. Rodríguez, A. (1966). Guía de laboratorio de histología. Editorial de la Universidad de Costa Rica: San José.
33. Rosete M, Padros R, Oindrola O. (2007). El nucléolo como un regulador del envejecimiento celular. Medicina Buenos Aires. 67:183-94.
34. Rubio, F. et al. (2004). Fundamentos y técnicas de análisis hematológicos y citológicos. Paraninfo: Madrid.
35. Rubio, R. (2011). Tricoleucemia. Revista Médica MD. 2. (4). 228.
36. Ruiz, G.J. (2009). Fundamentos de hematología. (Ed. 4). Editorial Médica Panamericana: México.
37. Saladin, K. (2013). Anatomía y fisiología: la unidad entre forma y función. McGraw-Hill: México.
38. s/a. (1 abril 2016). Biblioteca de pruebas Laboratorios del Servicio de Hematología. Ed. 1. AGC – Laboratorio de Medicina. Recuperado de 19 de agosto de 2019, de:
<http://www.hca.es/huca/web/documentos/laboratoriomedicina/BibliotecaPruebas-Hematologia.pdf>
39. s/a. Citoquímica hematológica. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán: Argentina.
40. Vives, J. L. & Aguilar, J. L. (2014). Manual de técnicas de laboratorio en hematología. 4ª edición. ELSEVIER MASSON: México.