

**Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia
Universidad Nacional de Tucumán**

**GUÍA DE TRABAJOS PRÁCTICOS
Nº 7 y 8**

Citoquímica hematológica

CITOQUÍMICA-GENERALIDADES

La **citoquímica hemática** contribuye a la identificación de las células de la sangre y de los órganos hematológicos. Se considera como un nexo de unión entre la morfología y la bioquímica. Ayuda a confirmar el tipo celular que puede estar sospechándose en un frotis.

Reacción citoquímica es la reacción que por el empleo de uno o más reactivos químicos aplicados a la célula, en condiciones definidas, determina la formación de productos coloreados, insolubles, no difusibles; que permiten el reconocimiento microscópico de sustancias o grupos químicamente definidos en su real ubicación citológica, por lo que no deben destruir la célula, o si lo hacen deben reemplazar la sustancia identificada en su topografía.

Las finalidades primordiales de la citoquímica son:

- a) El reconocimiento y diagnóstico celular
- b) El estudio de la fisiología y fisiopatología celulares
- c) El diagnóstico de la patología

Las reacciones histoquímicas son de gran utilidad para la correcta identificación de las células de la sangre y de los órganos hematopoyéticos, es decir que se aplica para el **diagnóstico diferencial celular**.

En la actualidad existe una gran cantidad de técnicas citoquímicas, algunas relacionadas con procedimientos especiales como marcación con anticuerpos fluorescentes o con isótopos, etc., pero nosotros nos referiremos a aquellas que tienen importancia diagnóstica general.

En casos especiales, cuando la microscopía común es insuficiente para demostrar la localización del producto de reacción, es necesario aplicar métodos de citoquímica ultraestructural.

Se pueden clasificar aunque en forma algo arbitraria en 7 grandes grupos:

- **Reacciones citoquímicas enzimáticas**: de las peroxidases, de la fosfatasa alcalina leucocitaria, fosfatasa ácida leucocitaria y esterasas inespecíficas y específicas
- **Reacciones citoquímicas para ácidos nucleicos**: ADN: reacción de Feulgen; ARN: método de extinción del azul de metileno; ADN y ARN: método combinado de Brachet y de Kurnick.
- **Reacciones citoquímicas para polisacáridos**: en especial glucógeno y mucopolisacáridos: reacción de PAS o del ácido periódico de Schiff.
- **Reacciones citoquímicas para proteínas**
- **Reacciones citoquímicas para lípidos**: método del Negro Sudán B.
- **Reacciones citoquímicas para reconocer hemoglobina fetal**: método de Kleinhauer y Betke.
- **Reacciones citoquímicas para la determinación de metales**: reacción de Perls para hierro no hemínico.

Para realizar una reacción citoquímica es importante tener en cuenta:

- Usar siempre un frotis control, extraído y conservado en las mismas condiciones que el frotis a investigar. El frotis control nos permite controlar si se realizó correctamente la reacción (detección de fallas en reactivos, temperatura, conservación de la muestra, etc).
- Conservación de los frotis. Lo ideal es someter la muestra a la reacción citoquímica inmediatamente después de su extracción, si esto no es posible,

los frotis deben conservarse envueltos en papel absorbente, y en algunos casos refrigerados a 4°C.

- Reactivo a emplear para la fijación: no debe extraer ni inhibir la sustancia a detectar.
- Tiempo de fijación: algunos fijadores pueden dañar las enzimas, por lo que es importante respetar el tiempo de fijación, que por lo general es de segundos.
- Tiempo y temperatura de incubación.
- Recordar que si la reacción es citoplasmática, se debe contracolorar el núcleo para identificar las células. Si la reacción es nuclear se debe contracolorar el citoplasma.

Muestras posibles de estudiar:

Frotis de:

- sangre periférica,
- médula ósea,
- improntas de tejidos (reacción histoquímica),
- células (procedentes de diversos líquidos biológicos) impactadas mediante citocentrifugación.

Se describirán algunas de las determinaciones más utilizadas.

CITOQUÍMICA DE LAS ENZIMAS

a)- MIELOPEROXIDASAS

Son específicas de la serie mielóide. La mieloperoxidasa (MPO) es una enzima lisosómica localizada en los gránulos azurófilos de los neutrófilos y monocitos. En la serie granulocítica dichos gránulos corresponden a los gránulos primarios. En la serie monocítica son más pequeños y no son los primeros en aparecer durante la maduración en estas células, por lo que la denominación de primarios es inapropiada. La MPO también puede ser demostrada en los gránulos específicos de los eosinófilos y basófilos. En el eosinófilo los gránulos específicos derivan de los gránulos primarios, los cuales son MPO positivos, y esta enzima es química e inmunológicamente distinta de la neutrófila.

Las peroxidasas granulocíticas comprenden 2 enzimas:

a) la neutrófila: se encuentra en estos elementos y en los monocitos y basófilos positivos, y se caracteriza por ser *sensible al cianuro de potasio*.

b) la eosinófila: es exclusiva de los eosinófilos y se caracteriza por ser *resistente al cianuro de potasio*.

Ambas son inactivadas por el alcohol metílico.

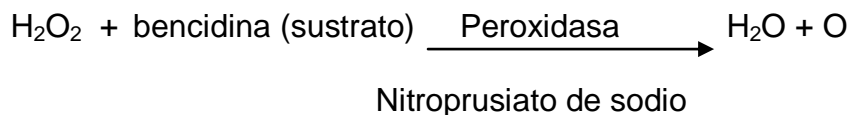
Para diferenciarlas: se toman 2 preparados, uno de ellos se fija con etanol absoluto y se cubre con CNK 0,04 g/dL → dejar 15 min → lavar con agua destilada y luego ambos preparados se someten a la reacción de peroxidasas:

En el 1^{er} preparado: neutrófilos negativos y eosinófilos positivos.

En el 2^o preparado: neutrófilos y eosinófilos positivos.

Fundamento de la Peroxidasa leucocitaria (Método de Washburn)

Las peroxidasas son enzimas de óxido-reducción. Su mecanismo de acción consiste en liberar oxígeno naciente del agua oxigenada:



El oxígeno que se libera oxida la bencidina dando un compuesto azul oscuro que luego vira a negro, apareciendo un precipitado (no difusible) en el lugar del citoplasma en donde se ha producido la reacción.

Para la demostración de la MPO leucocitaria es imprescindible un catalizador metálico. En este caso se usa el Nitroprusiato de sodio.

Hay peroxidasas leucocitarias y eritrocitarias que se pueden diferenciar por una pequeña variación en la técnica, ya que esta última es resistente a la acción del alcohol metílico.

Reactivos

➤ Solución A :

Bencidina base30 mg
 Sol. Saturada de Nitroprusiato de Na0,1 mL
 Alcohol etílico absoluto o de 96°9,9 mL

➤ Solución B (solución preparada en el momento):

H₂O₂ 20-30 vol.....1 gota
 H₂O destilada.....10 mL

No debe usarse una concentración mayor de agua oxigenada porque en ese caso se produce la rápida oxidación de la bencidina y precipita como agujas el derivado azul.

Técnica

-Verter sobre el preparado 10 gotas de la solución A y dejar actuar entre 3 y 5 minutos.

Este paso tiene como finalidad fijar los elementos e impregnar con bencidina la totalidad de las células.

-Sin volcar agregar 10 gotas de la solución B, homogeneizar suavemente y dejar actuar de 3 a 5 minutos.

En el segundo paso, en los lugares donde hay peroxidasa, la bencidina es oxidada por el O₂ liberado del H₂O₂, en presencia de Nitroprusiato de Na.

-Controlar, al microscopio con mínimo aumento y con objetivo a seco, el preparado húmedo y sin lavar, para observar el desarrollo de la reacción. Si la reacción es débil, se procede a efectuar nuevamente la reacción en el mismo frotis.

-Lavar el portaobjetos con agua corriente y dejar secar.

-Contracolorar (realizar la coloración de fondo) con May Grünwald-Giemsa o Giemsa diluido 1/10. Se debe dejar que el colorante actúe un tiempo más prolongado que lo habitual porque las soluciones anteriores hacen más resistentes a las células a tomar los colorantes.

Resultados

Se observa *un patrón granular negro-parduzco citoplasmático* en las células positivas.

Los elementos de la progenie granulocítica (desde promielocito hasta neutrófilo) muestran un patrón de MPO granular intensamente positivos, siendo la positividad del neutrófilo del 100%. El eosinófilo también es positivo pero de

color pardo amarillento. Los basófilos, en un 50%, muestran una positividad semejante al neutrófilo.

Los monocitos pueden ser positivos (patrón de escasos gránulos o disperso) o negativos.

Las series eritroide, linfoide y plaquetaria dan siempre reacción negativa.

Interpretación

El valor principal de la reacción de MPO es la diferenciación entre una leucemia mieloblástica aguda (LMA) de una leucemia linfoblástica aguda (LLA). Con fines prácticos se puede decir que sólo las células blásticas que muestran **positividad** a la reacción de MPO pueden ser referidas como mieloblastos. Pero si la reacción es **negativa** no excluye la leucemia mieloblástica, pues un mieloblasto temprano con MPO negativa por microscopía óptica, puede expresar MPO o antígenos mieloides que son detectados por citometría de flujo usando anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromos.

Si la reacción es **positiva** con un **patrón granular polar (casquete o copete)**, en un mínimo de 3% de blastos en médula ósea, la leucemia es mieloblástica (Figura 1).

Los *bastones de Auer* son índice de una diferenciación mieloblástica y reaccionan positivamente a la MPO.

La delección parcial o total de peroxidasa en los neutrófilos también es indicativa de leucemia de estirpe mieloide.

En las leucemias monocíticas la reacción de las peroxidadas suele mostrar un **patrón granular positivo débil de tipo disperso**.

La enzima MPO puede ser demostrada también por citoquímica ultraestructural (microscopía electrónica) y usando anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromos (citometría de flujo), que tienen mayor sensibilidad que los métodos citoquímicos convencionales (microscopía óptica).

FIGURA 1: Blastos mieloides con reacción positiva de mieloperoxidasa en copete y granular disperso



b)- ESTERASAS

Son enzimas encargadas de catalizar la hidrólisis de ésteres alifáticos u aromáticos en sus componentes ácidos y alcoholes.

Para demostrar su actividad el Comité Internacional de Estandarización en Hematología recomienda usar fundamentalmente los siguientes sustratos:

- El **cloroacetato de naftol AS-D**
- El **alfa naftil acetato (pH 6)**
- El **alfa naftil butirato**
- El **naftol acetato AS-D**

Dichos sustratos reconocen los tres tipos de esterasas mieloides: la *esterasa específica de los granulocitos* demostrada usando CAE; la *esterasa específica de los monocitos*, y un grupo de esterasas que son expresadas por muchas células hematopoyéticas llamadas “*esterasas comunes*”.

Según el Comité de hematología, las esterasas monocíticas y comunes son consideradas esterasas inespecíficas, ya que ambas pueden reaccionar con un mismo sustrato. Solo la granulocítica es específica.

- La **Cloroacetoesferasa (CAE)**: es **específica de la serie granulocítica neutrófila**. Su sustrato es el Naftol AS-D Cloroacetato. Esta reacción si bien en especificidad corre paralela a la reacción de la mieloperoxidasa y de Sudán black B, es menos sensible que ambas, porque ontogénicamente es posterior a la MPO. Por lo tanto es: siempre **Negativa** en **Leucemias linfoblásticas** y puede ser **Positiva o Negativa** en **Leucemias mieloblásticas**, dependiendo del grado de maduración de los mieloblastos.

Los bastones de Auer reaccionan positivamente.

La CAE es negativa en los eosinófilos en condiciones normales y en las reacciones leucemoides eosinófilas; en cambio, en la rara leucemia LMA-M4 eosinófila, éstos serían fuertemente positivos.

La línea monocítica es negativa.

- La **α -naftil acetatoesterasa (ANAE)**: detecta las esterasas monocito específica (EME) y esterasas comunes (ECOM); pues el α -naftil acetato es sustrato de ambas esterasas, pero no lo es de la granulocítica. Una reacción positiva refleja la presencia de una o de ambas esterasas.

La ANAE da distintos patrones de reacción:

---En los **monocitos**, la reacción es **positiva intensa** con **patrón difuso** y es inhibida con NaF (reacción floruro sensible).

---En los **linfocitos T cooperadores** la reacción es **positiva** con **patrón de punto focal** en la zona del Golgi y puede o no ser inhibida por NaF (tienen diferente grado de resistencia).

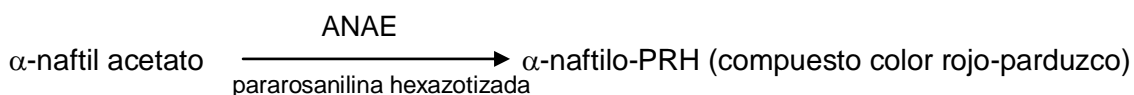
La EME es muy sensible a la presencia de NaF y por ello se inhibe. Las ECOM muestran grados variables de resistencia. Por lo tanto, si un blasto muestra reacción de ANAE (+) y es NaF resistente, se podría concluir que se trata de ECOM. En cambio si un blasto muestra reacción de ANAE (+) y es NaF sensible, puede ser EME o ECOM. Estos casos problemáticos se deberían resolver usando ANBE. Pero no olvidar que el “patrón” de la reacción positiva es fundamental para interpretar los resultados. Si un blasto es ANAE (+) con patrón difuso y además es sensible al NaF, estamos en presencia de un monoblasto.

- La **α -naftil butiratoesterasa (ANBE)**: es fuertemente positiva y NaF sensible en los monocitos (patrón difuso), y débil o negativa en los granulocitos. El α -Naftil butirato es el sustrato específico para las esterases monocítica. Al igual que ANAE, es también positiva en los linfocitos T cooperadores (patrón de punto focal). No es recomendada por el Comité Internacional de Estandarización en Hematología por la forma líquida del sustrato (fácilmente evaporable, lo que dificulta la realización de la reacción) y por su alto costo.

- La **naftol AS-D acetoesterasa (NASDA)**: utiliza naftol AS-D acetato como sustrato. Ya no se recomienda realizarla, pues el inconveniente que presenta es que detecta las 3 esterases (granulocítica, EME y ECOM) y se debe hacer una inhibición con NaF para darle especificidad: la esterase monocítica es fluoruro sensible, la granulocítica es en general resistente y las comunes tienen un comportamiento variable frente al NaF (pueden o no ser inhibidas).

Alfa-naftol acetato esterasa (ANAE) a pH ácido

Fundamento



La hidrólisis en medio ácido del alfa naftil acetato produce dos productos de reacción: un grupo alfa naftilo no difusible en el citoplasma celular y un grupo fosfato difusible. El producto no difusible es conjugado con un azo colorante (pararosanilina hexazotizada) dando una reacción de color rojo-parduzco en el interior de la célula, proporcional al contenido enzimático.

Reactivos

a) Fijador

- 1-Acetona purísima al 60% en agua enfriada a una temperatura de 0-5°C.
- 2-Vapores de formol (optativos)

b) Sustrato revelador

- 1-Clorhidrato de pararosanilina al 4% en HCl 2N
- 2-Nitrito de sodio al 4% en agua destilada (de reciente preparación)
- 3-Etilenglicol monometiléter
- 4-Buffer de fosfatos M/15 a pH 7,6

Reactivo de trabajo

Solución A:	Etilenglicol monometiléter.....	0,5 mL
	Alfa naftil acetato.....	4 mg
Solución B:	Clorhidrato de pararosanilina al 4% en HCl 2N.....	0,3 mL
	Nitrito de sodio al 4%.....	0,3 mL

Esperar 1 minuto y agregar:

Buffer de fosfatos pH 7,6.....8,9 mL

Mezclar las soluciones A y B y filtrar. Ajustar a pH 6 con NaOH 0,1 N.

Técnica

-Fijar los preparados durante 30 segundos con acetona 60% enfriada a 0-5°C ó 5 minutos en vapores de formol.

- Lavar rápido y dejar secar.
- Incubar 45 minutos con el sustrato revelador a 37°C, en cámara húmeda.
- Lavar y secar.
- Contracolorar con verde de metilo o hemalumbre de Mayer durante 10 minutos.
- Lavar y secar en posición vertical. Observar con inmersión.

Resultados

Reacción positiva: se observa un *patrón citoplasmático granular o difuso rojo-parduzco* en las células positivas y los núcleos teñidos de color verde.

La reacción es **positiva** en los **linfocitos T cooperadores (patrón granular o punto focal)** y en los **monocitos (patrón difuso)**.

Inhibición con Fluoruro de Sodio

Luego de la fijación se tratan los preparados con **Fluoruro de Sodio** disuelto en Buffer Fosfatos pH 6,4 en la proporción 1,5 mg/mL. Incubar a 37°C durante 30 minutos. Luego se procede con la técnica anterior.

Resultados: La reacción se inhibe en los monocitos. En los linfocitos la reacción puede o no inhibirse.

Interpretación

La ANAE es empleada frecuentemente para el estudio de células leucémicas. En las muestras normales ayuda a distinguir los linfocitos T y los monocitos, debido al diferente patrón de reacción y a la diferente sensibilidad al NaF.

En las leucemias y síndromes linfoproliferativos tiene 3 aplicaciones principales:

1- En las LMA facilita el diagnóstico de la leucemia monocítica (**LMA-M5**), cuyas células dan una **fuerte reacción positiva difusa sensible al NaF**. En la eritroleucemia (**LMA-M6**) y en la leucemia megacarioblástica (**LMA-M7**), los blastos dan una **reacción positiva con patrón de punto focal** en la zona del Golgi y sensible al NaF. Si se realiza ANBE, la reacción en M6 y M7 es negativa o positiva muy débil, mientras que en M5 es positiva intensa difusa.

2- En las LLA, junto a la fosfatasa ácida, ayuda a identificar las LLA-T.

3- En las leucemias linfoides crónicas, ayuda a distinguir la leucemia prolinfocítica T (LLP-T, reacción positiva fuerte) de la LLP-B (reacción negativa). Sin embargo, **el típico patrón de punto focal no es observado en las leucemias de linfocitos granulares grandes de células T (LGL)**. Este hallazgo se verifica también en los linfocitos grandes granulares normales (linfocitos T citotóxicos/supresores CD8 +).

Nota: normalmente los eritroblastos son ANAE negativos. Sin embargo, ellos pueden reaccionar en la anemia megaloblástica, y también se han descrito reacciones débiles en talasemias y anemia sideroblástica.

c)- FOSFATASA ALCALINA LEUCOCITARIA O GRANULOCÍTICA

La fosfatasa alcalina (FA) es una fosfomonoesterasa que es activa a pH francamente alcalino. Actúa sobre ésteres fosforados liberando el ión fosfato como **ión específico**. Como este ión es muy difusible, no conserva su ubicación citoplasmática y difunde hacia el núcleo, razón por la cual se deben emplear sustratos como el alfa-naftil fosfato ácido de sodio, cuyo **ión**

inespecífico, liberado por escisión de la molécula por acción de la fosfatasa, **no es difusible** y puede ser revelado in situ. La actividad de la FA granulocítica es marcadora de la granulación específica de los neutrófilos.

Inicialmente se pensó que la FA estaba localizada en los gránulos específicos (secundarios), pero se demostró que está asociada con un componente membranoso del citoplasma identificado como una estructura tubular de forma irregular distinta de los gránulos primarios o secundarios y otras organelas citoplasmáticas.

Fundamento del método de Menten-Kaplow

La fosfatasa de los granulocitos en medio alcalino desdobla el alfa-naftil fosfato ácido de sodio en dos iones: naftilo (ión inespecífico) y fosfato (ión específico). El grupo naftilo liberado se copula con un colorante diazoico, el azul rápido RR, formando un compuesto diazotado que precipita en el sitio de acción de la enzima.

Reactivos

➤ Solución fijadora:

Formol al 40%.....10 mL

Metanol absoluto.....90 mL

Conservar a 0°C.

➤ Solución de veronal:

Veronal sódico 6%. Controlar el pH que debe ser entre 9 y 10.

➤ Solución sustrato:

Alfa-naftil fosfato ácido de Na.....5 mg

Fast Blue5 mg

Solución de veronal sódico pH 9.....6 mL

Filtrar y usar inmediatamente.

El alfa-naftil fosfato ácido de sodio debe ser de color blanco, cuando se oxida toma color rosado y debe purificarse.

➤ Solución acuosa de verde de metilo:

Verde de metilo 2,5 % (purificado)

Purificación: el verde de metilo se oxida rápidamente al aire a violeta de metilo perdiendo su especificidad por el núcleo. Por este motivo es necesario purificarlo. La purificación se basa en que el verde de metilo es hidrosoluble y el violeta de metilo no, siendo en cambio soluble en cloroformo.

Disolviendo verde de metilo en agua destilada y agregando igual volumen de cloroformo, al agitar este último extrae el violeta de metilo y al decantar lo arrastra al fondo del frasco. El cloroformo sedimenta en el fondo y la solución acuosa sobrenadante está constituida por verde de metilo purificado.

Muestra

Efectuar la reacción en frotis de no más de 24 horas de obtenidos. Se pueden conservar los preparados secos y envueltos en papel absorbente (de filtro o higiénico) hasta un mes en heladera con un desecador. Siempre se debe procesar en paralelo un frotis control conservado en idénticas condiciones al frotis problema.

Técnica

-Colocar un borrel con la solución fijadora en la heladera hasta temperatura entre 0° y 5° C.

-Sumergir los extendidos de sangre en la solución fijadora durante 30 segundos.

-Lavar con agua destilada.

-Incubar en la solución sustrato durante 15 minutos **exactos** a 37° C.

-Lavar con agua destilada y efectuar una coloración nuclear de fondo con verde de metilo durante 5 minutos.

Nota: El precipitado es liposoluble por lo que cuando se lo observa con aceite éste quita algo de la intensidad de la coloración

Resultados

Se observa un *patrón citoplasmático difuso o granular* que varía desde el *grisáceo al negro-parduzco intenso* en las células positivas y los núcleos teñidos de color verde (Figura 2).

La reacción es positiva únicamente en los granulocitos neutrófilos en cayado y segmentados; y excepcionalmente en metamielocitos.

No todos los neutrófilos presentan el mismo grado de positividad, por ello, para evaluar los resultados se practica una scorificación o puntaje de acuerdo con el siguiente criterio:

Grado 0: Sin reacción. Citoplasma amarillento (igual que los hematíes).

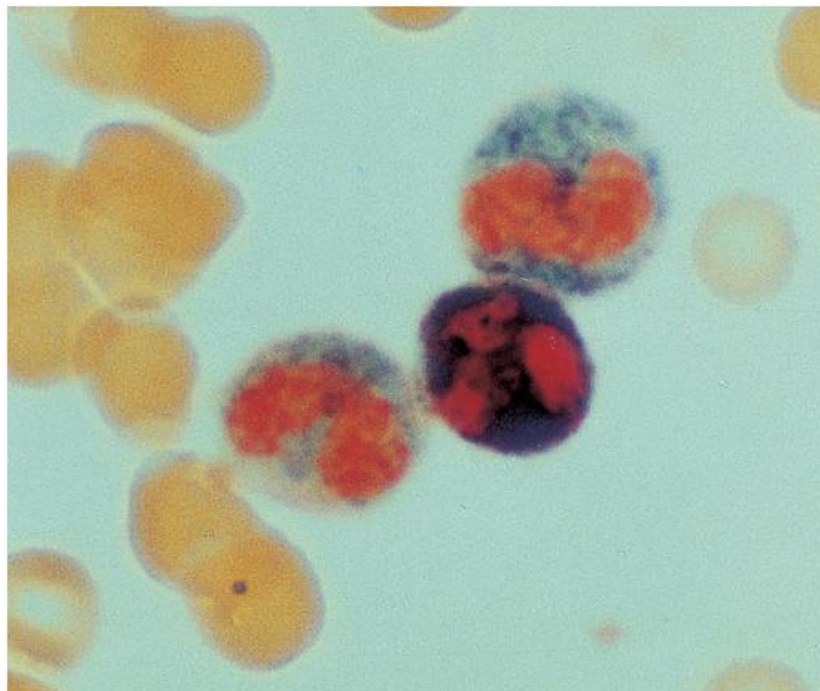
Grado I: Citoplasma grisáceo difuso (homogéneo sin gránulos).

Grado II: Citoplasma grisáceo más oscuro, a veces con escasos gránulos

Grado III: Precipitado granuloso negro, dejando ver zonas grisáceas entre él.

Grado IV: Citoplasma totalmente cubierto de gránulos negros.

FIGURA 2: Resultado de la reacción fosfatasa alcalina leucocitaria



Fosfatasa alcalina granulocitaria. Se muestran intensidades de reacción fuertemente positiva (4+) y moderadamente positiva (3+ y 2+).

Score o índice de actividad del frotis: es la suma de los grados de positividad de 100 neutrófilos. Para determinarlo debe observarse 100 neutrófilos en un frotis y establecer el grado de positividad de cada uno de ellos. El número de neutrófilos correspondiente a cada grado se multiplica por el coeficiente respectivo, por ejemplo:

Grado	Neutrófilos contados		Coeficiente		
0	30	X	0	=	0
I	25	X	1	=	25
II	30	X	2	=	60
III	10	X	3	=	30
IV	5	X	4	=	20
Total: 100					Score: 135

Valores de referencia

Score: 95 ± 20 (límites extremos normales: 26 a 169).

Los recién nacidos, los niños y las mujeres embarazadas tienen valores elevados y las mujeres premenopáusicas tienen valores que son un tercio superiores a los de los hombres. En el recién nacido el rango es de 150-300.

Interpretación

Se encuentran **puntajes altos** en las neutrofilias secundarias a infecciones o neoplasias, en las reacciones leucemoides, cirrosis hepática y síndrome de Down. La enzima parece ser influenciada por los estrógenos y corticoesteroides, los cuales podrían explicar el gradual aumento que sufre el score durante el embarazo. También está aumentada en la policitemia vera (pero normal en poliglobulias secundarias no complicadas), en enfermedad de Hodgkin, crisis blásticas terminales de la leucemia granulocítica crónica, infarto de miocardio, síndrome de Cushing.

Se encuentran **puntajes disminuidos** en el síndrome de Addison, lupus eritematoso diseminado (LES), a veces en la Hemoglobinuria Paroxística Nocturna (HPN), leucemias mieloblásticas, en algunas anemias sideroblásticas y en eritroleucemias.

Esta reacción presenta el máximo interés para diferenciar:

Leucemias Mieloides Crónicas (LMC) → valores bajos o nulos, de
Reacciones Leucemoides → valores aumentados

Con el uso de las técnicas citogenéticas y de biología molecular para confirmar el diagnóstico de la LMC, la valoración de la FA es mucho menos necesaria.

d)- FOSFATASA ÁCIDA LEUCOCITARIA

Se trata también de una fosfomonoesterasa con un pH óptimo de acción que oscila entre 4,7 y 5,0. Se utiliza el método de Loeffler modificado. La actividad de fosfatasa ácida está presente en los lisosomas de muchos tipos de células hemopoyéticas, como los mielocitos, polimorfonucleares neutrófilos, linfocitos,

células plasmáticas, megacariocitos, plaquetas y todas las células del sistema mononuclear fagocítico (monoblastos, promonocitos, monocitos y macrófagos).

Método de Loeffler modificado:

Fundamento

Es el mismo que para la alcalina, pero a pH ácido. Emplea como sustrato el alfa naftil fosfato ácido de sodio disuelto en un tampón de citrato a pH 4,9 y como colorante diazoico se usa el Fast Garnett GBC o granate fijo, ya que el Fast Blue RR da un tipo de gránulos excesivamente groseros a pH ácido.

Resultados

La reacción positiva se revela por la presencia de granulaciones de color rojo-parduzco esparcidos en todo el citoplasma.

La reacción es positiva en todos los elementos figurados de la sangre, incluidas las plaquetas, con excepción de los eritrocitos. De los granulocitos, el eosinófilo es el más intensamente positivo.

Los linfocitos T revelan una elevada positividad; en cambio en los linfocitos B la reacción está francamente disminuida o es negativa. Los monocitos muestran la positividad intensa.

En los linfocitos vellosos la fosfatasa ácida es intensamente positiva (++++ y es tartrato resistente. Estos linfocitos se observan en la leucemia a linfocitos vellosos o tricoleucemia.

Interpretación

La reacción de la fosfatasa ácida es de alto valor para diferenciar una población linfocítica T en la cual la positividad está aumentada, de una B en la cual está francamente disminuida. Así, la mayoría de los linfoproliferativos de origen T agudos y crónicos se caracterizan por una fuerte reacción de la fosfatasa ácida. En los desórdenes de origen B, la reacción es frecuentemente débil o negativa con excepción de la tricoleucemia, cuyas células son fuertemente positivas y resistentes a la inhibición por tartrato. Esta enzima corresponde a la isoenzima 5 encontrada en los tricoleucocitos.

Las células de Baccareda-Sézary dan una reacción intensamente positiva.

FOSFATASA ÁCIDA TARTRATO RESISTENTE.

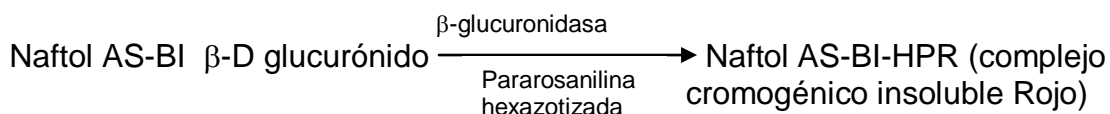
Consiste en agregar a la solución de sustrato revelador ácido-l-tartárico en la proporción de 5 mg/mL. La reacción en este caso es inhibida en todos los elementos menos en los tricoleucocitos.

e)-β-GLUCURONIDASA

Es una enzima lisosómica que forma parte de la granulación A de Bagglioni cuando los lisosomas confluyen para formarla. En caso contrario permanece distribuida en el citoplasma con los lisosomas. Ha sido observada en paralelo con la fosfatasa ácida, con excepción de los tricoleucocitos en los que la fosfatasa ácida está aumentada y la β-glucuronidasa disminuida.

La enzima está presente en todos los tipos leucocitarios y en la serie roja salvo los eritrocitos.

Fundamento



Resultados

Una reacción positiva se observa como un patrón focal o granular difuso de color rojo.

La **coloración positiva** se asocia a **timocitos maduros**, **linfocitos T circulantes** y una **subpoblación de linfocitos B inmaduros**.

Los **monocitos** y **granulocitos** usualmente son **negativos**.

CITOQUÍMICA PARA HIDRATOS DE CARBONO

a)- REACCION DE P.A.S. (Ácido Periódico de Schiff)

Fundamento

Por oxidación con ácido periódico, el glucógeno y la porción hidrocarbonada de los mucopolisacáridos liberan **grupos aldehídos que reaccionan con el reactivo de Schiff o fucsina decolorada** formando un compuesto de color rojo magenta. La estructura atacada es el grupo 1-2 glicol y derivados. En el ADN el glicol está unido al diéster fosfórico, unión que resiste la acción del ácido periódico, por lo que hay que usar HCl a 60°C para exponer los grupos aldehídos.

Reactivos

- Alcohol metílico absoluto
- Solución de ácido periódico

Ácido periódico.....	800 mg
Acetato de sodio (3 H ₂ O) al 2,7 %.....	10 mL
Agua destilada.....	90 mL
- Solución reductora

Hiposulfito de sodio.....	3 g
Ioduro de potasio.....	3 g
Agua destilada.....	60 mL
Agregar alcohol de 96°.....	90 mL
Acido clorhídrico N.....	3 mL
- Reactivo de Schiff
 - Disolver en caliente (100°C durante 5 minutos) 1 g de fucsina básica (puede usarse fucsina diamante, Merck, magenta, de Grüber y parafucsina) en 200 mL de agua destilada. Tener en cuenta que la reacción puede producir bastante espuma y proyectarse, por lo que se aconseja trabajar con matraz de mayor volumen.
 - Agregar 5 g de carbón activado en caliente.
 - Agitar y filtrar.
 - Enfriar a 50°C y agregar 20 mL de ácido clorhídrico N.

- Enfriar a 25°C y agregar 1 g de metabisulfito de sodio seco p.a.
- Trasvasar a un frasco color caramelo y conservar en heladera en la oscuridad. El reactivo tarda 24-48 horas para decolorarse. Debe resultar incoloro o ligeramente amarillo pero no rosado.

➤ Solución sulfurosa

Metabisulfito de sodio al 10 %.....	5 mL
Ácido clorhídrico N.....	5 mL
Agua destilada.....	100 mL

➤ Solución de Verde de Metilo al 2,5 %

Técnica

-Fijar los extendidos con alcohol metílico absoluto durante 3 a 5 minutos (No se pueden usar fijadores hídricos porque extraen las sustancias a demostrar). También se puede usar una doble fijación: 3 minutos en alcohol metílico absoluto y luego con vapores de formol 10 minutos. Para este último paso se debe colocar en un recipiente con tapa, un trozo de algodón al que se le agrega formol. Se coloca a 37°C para desprender los vapores. Recién entonces colocar verticalmente los preparados. Conservarlo tapado.

-Lavar con agua destilada.

-Colocarlos en la solución de ácido periódico durante 5 minutos exactos, superado este tiempo se destruyen los aldehídos liberados.

-Lavar con agua destilada.

-Volcar y cubrir con el reductor exactamente 1 minuto.

-Lavar con agua destilada, escurrir y secar el dorso.

-Sumergir el preparado en el reactivo de Schiff durante 1 hora en la oscuridad.

-Ecurrir y pasar a la solución sulfurosa durante 3 a 5 minutos cambiando la solución 2 ó 3 veces hasta que del preparado no ceda más color.

-Enjuagar con agua destilada.

-Efectuar coloración de contraste con solución de Verde de Metilo al 2,5 % durante 5-10 minutos.

-Lavar muy rápido con agua corriente, (el verde de metilo es hidrosoluble) dejar secar y observar con inmersión.

Resultados

Células positivas con patrón citoplasmático difuso, granular o en bloque de acuerdo a la progenie, de color fucsia intenso.

- La serie granulocítica normal es positiva con patrón difuso, intensificándose la reacción con la madurez celular (Figura 3). El eosinófilo presenta una positividad intergranular intensa por su abundante contenido de glucógeno. El basófilo es PAS positivo en gránulos gruesos o negativo dependiendo del grado de sulfatación (heparina mono o polisulfatada). La heparina monosulfatada le confiere la positividad en forma de gránulos groseros; la heparina polisulfatada es PAS negativa.

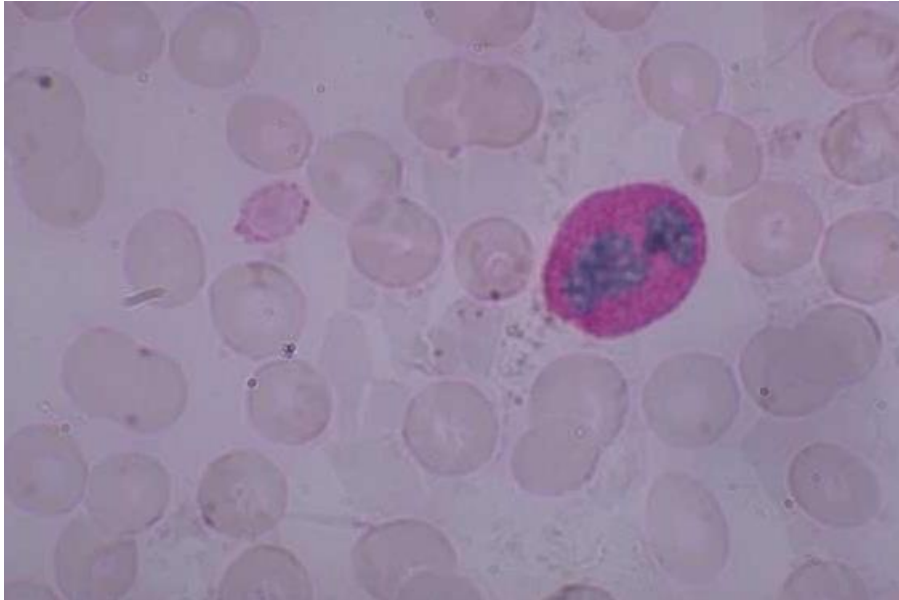
- La progenie eritroide normal es negativa.

- La progenie monocítica es positiva con patrón en gránulos sobre un fondo difuso.

- La progenie linfocítica normal es negativa en sus formas inmaduras. El linfocito en un 70% aproximadamente es negativo y el resto tiene diferentes grados de positividad con patrón granular (coronas de gránulos) y excepcionalmente con patrón difuso.

- Los megacariocitos presentan una PAS positividad en bloques o granular, siendo más intensa en el área perinuclear. Las plaquetas son intensamente positivas con patrón en gránulos sobre un fondo difuso. Existe un paralelismo entre la actividad funcional de los megacariocitos y el contenido de glucógeno.

FIGURA 3: Reacción de PAS positiva en un polimorfonuclear neutrófilo y en una macroplaqueta



Interpretación

Según Dacie, los linfoblastos pueden dar una reacción PAS positiva en **bloques o mazacotes**. Esta reacción es típica de la LLA tipo común de la infancia. Sin embargo la reacción de PAS no es recomendada para la clasificación de leucemias agudas ya que las leucemias monocíticas dan algunas veces PAS positividad en bloque en algunos monoblastos.

En algunas patologías la progenie eritroide se torna PAS-glucógeno-dependiente positiva, como en los eritroblastos de la Eritroleucemia (LMA-M6) que presentan una coloración PAS difusa intensa o en bloques; y también en las talasemias mayor y menor. Excepcionalmente los eritroblastos en las anemias ferropénica, megaloblástica y sideroblástica pueden presentar una reacción PAS positiva difusa débil.

NOTA:

Para la identificación de la naturaleza de la PAS positividad se pueden emplear técnicas de inhibición:

- Considerando que la amilasa salival degrada el glucógeno, se puede usar saliva como fuente enzimática para la inhibición.
- Los mucopolisacáridos PAS positivos pueden ser degradados con hialuronidasa.

b)- METACROMASIA

La coloración metacromática es aquella que tiñe selectivamente determinadas estructuras de un color distinto al del colorante.

La metacromasia se produce utilizando colorantes básicos derivados de las tiazinas como ser azul de metileno, tionina y azul de toluidina. El más usado para su reconocimiento es el azul de toluidina.

Este fenómeno se produce en las sustancias que contienen en su superficie cargas electronegativas ácidas en una concentración mínima que atraigan a los grupos polares de las moléculas del colorante, las cuales quedan próximas entre sí, polimerizándose.

Las verdaderas metacromasias son las designadas β -metacromasia (violácea) alcohol lábil y la γ -metacromasia (roja) alcohol resistente.

La llamada metacromasia α no es tal porque es un monómero del colorante.

Los mucopolisacáridos ácidos sulfatados son los únicos que dan la metacromasia fuertemente alcohol resistente, de modo que es prácticamente diagnóstica granulaciones de los basófilos y mastocitos.

Reconocimiento de la Metacromasia con Azul de Toluidina

Reactivos

- Solución fijadora (fijador de Motta)
 - Subacetato de plomo.....1 g
 - Alcohol etílico 96°.....50 mL
 - Agua destilada.....50 mL
 - Ácido acético glacial.....0,5 mL
- Solución acuosa de azul de toluidina al 0,5 %

Técnica

- Fijar las extensiones de sangre o de médula ósea con el líquido de Motta durante 30 minutos.
- Lavar con agua destilada.
- Colorear con la solución de azul de toluidina durante 1 hora.
- Ecurrir y lavar con agua destilada.
- Secar y observar.

Resultados

Los **núcleos** se tiñen de **azul**.

Las **granulaciones de los basófilos** y de los **mastocitos** se tiñen de **rojo**.

Las **granulaciones de los neutrófilos** se tiñen de **violeta**.

Las **granulaciones eosinófilas** no se colorean.

CITOQUÍMICA PARA LÍPIDOS

MÉTODO DEL NEGRO SUDÁN B

Se basa en el empleo de un colorante liposoluble, el Negro Sudán B, en solución hidroalcohólica. Este colorante, al ponerse en contacto con los lípidos de las células, por su mayor afinidad, abandona la solución pasando a aquellos, que se ponen en evidencia como granulaciones sudanófilas.

La tinción de las grasas comunes obedece simplemente al fenómeno físico de difusión en un mejor solvente mientras que para las grasas leucocitarias se

necesitaría además el blanco de la peroxidasa sobre el que actuaría el Sudán Black por mecanismo químico.

Toda la serie granulocítica es profundamente sudanófila y peroxidasa positivas, mientras que los linfocitos son por completo negativos para ambas reacciones, a pesar de que contienen lípidos similares. Parecería que al estar ausente la peroxidasa en la serie linfocítica le faltaría el blanco para revelarse a la sudanofilia.

Resultados

Las granulaciones sudanófilas se tiñen de color **negro intenso**.

Hay una estrecha relación con la **reacción de peroxidasa**.

Serie granulocítica (neutrófilos y eosinófilos): **positiva (citoplasma totalmente cubierto de gránulos)**

Monocitos: **positiva débil en gránulos dispersos**

Basófilos y mieloblastos: **positiva en un 40%**

Serie linfocítica: **negativa**

HIERRO NO HEMÍNICO: Método de Perls

Esta reacción se emplea para la determinación de hierro hemosiderínico (no hemínico).

Los siderocitos son eritrocitos que contienen gránulos de hierro no hemínico, los cuales están formados por un complejo de hierro férrico, lípido, proteína y carbohidrato llamado **hemosiderina** que es insoluble en agua. Por el contrario, la **ferritina**, es un compuesto no hemínico hidrosoluble formado por hierro y apoferritina (proteína), que no es detectable por la reacción de Perls. Normalmente la ferritina está presente en todas las células del cuerpo mientras que la hemosiderina se encuentra principalmente en las células monocito-macrófago de la médula ósea, hígado (células de Kupffer) y bazo.

El hierro es transportado en el plasma unido a una beta globulina, la transferrina, y pasa selectivamente a la médula ósea donde, en la superficie del eritroblasto, es liberado y entra a la célula. Allí la mayoría del hierro es convertido en hem en la mitocondria, y el residuo no hemínico queda en la forma de ferritina. Algo de ferritina es degradada y se transforma en hemosiderina que puede ser coloreada por la reacción de Perls.

Fundamento

El Fe^{+++} no hemínico reacciona con ferrocianuro de potasio en solución clorhídrica, dando ferrocianuro férrico o Azul de Prusia.

Reactivos

- * Alcohol metílico absoluto
- * Ferrocianuro de potasio al 2 %
- * Ácido clorhídrico al 2 % (Exento de hierro)
- * Agua bicarbonatada
 - Solución de bicarbonato de sodio pH 7,5 - 8
- * Safranina al 0,5 %
 - Safranina.....0,5 g
 - Agua bicarbonatada.....100 mL

El pH debe oscilar entre 7,5 y 8 para evitar que se disuelva el precipitado de azul de Prusia.

Técnica

- Los portaobjetos y todo el material a emplear deben ser lavados con HCl al 10%, durante un mínimo de 6 hs, para eliminar toda traza de hierro y quedar reservados para efectuar esta reacción.
- Fijar los extendidos con alcohol metílico durante 3 minutos.
- Lavar con agua destilada 2 ó 3 veces.
- Cubrir con una mezcla en partes iguales de ferrocianuro de potasio y ácido clorhídrico al 5 % durante 30 minutos, cambiando el reactivo y volviéndolo a dejar otros 30 minutos. Puede colocarse a 37°C.
- Variante: preparar una solución de ferrocianuro de potasio al 2% en ácido clorhídrico directamente y dejar actuar durante 2 horas sin cambiar la solución.
- Lavar los extendidos con agua bicarbonatada, cubrirlos y dejarlos unos minutos.
- Escurrirlos y sin lavar agregar solución de safranina como colorante de fondo. Dejar actuar durante 3 a 5 minutos.
- Lavar y secar.

Resultados

Se observan *gránulos azules de hierro no hemínico en eritroblastos* (si rodean al núcleo se denomina “en anillo”).

Los siderocitos contienen 1 ó 2 (raramente muchos) gránulos pequeños. En sangre periférica se observa normalmente hasta un 0,5 % de siderocitos, o sea que normalmente no son vistos en la misma.

En condiciones normales, en la médula ósea puede haber hasta un 30-40 % de sideroblastos (eritroblastos con 1 a 4 gránulos muy pequeños).

El porcentaje de sideroblastos está aumentado en las anemias hemolíticas y megaloblásticas, en la hemocromatosis y hemosiderosis, proporcionalmente al grado de saturación de la transferrina, es decir del hierro disponible.

Un aumento desproporcionado en el número de sideroblastos ocurre cuando está afectada la síntesis de hemoglobina, en cuyo caso los gránulos son más numerosos y más grandes que lo normal.

Cuando hay un defecto en la síntesis del hem, los gránulos se depositan en la mitocondria y frecuentemente se disponen como un collar alrededor del núcleo, dando los “**sideroblastos en anillo**” característicos de las anemias sideroblásticas y de los síndromes mielodisplásicos (anemia refractaria y citopenia refractaria con sideroblastos en anillo).

En contraste, la distribución de los gránulos dentro de la célula tiende a ser normal cuando está afectada sólo la síntesis de globina como en las talasemias o cuando hay una sobrecarga de hierro.

La cantidad de hemosiderina está aumentada en pacientes con grandes depósitos de hierro y reducida o ausente en las anemias ferropénicas. En las infecciones los depósitos de hierro podrían estar aumentados, con mucho material siderótico en los macrófagos pero poco o no visible en los eritroblastos (anemias de los trastornos crónicos).

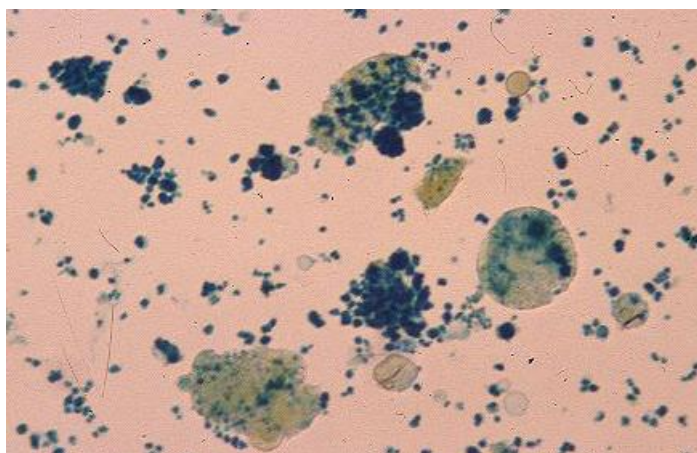
DEMOSTRACIÓN DE HEMOSIDERINA EN ORINA

Si la hemosiderina estuviera presente, aparece en la forma de gránulos de color azul aislados o agrupados, usualmente de un tamaño de 1-3 μm (Figura 4).

Interpretación

La hemosiderinuria es consecuencia de la presencia de hemoglobina en el filtrado glomerular. Es un valioso signo de **hemólisis intravascular crónica**, especialmente en los casos en que no hay hemoglobinuria simultáneamente. Sin embargo, la hemosiderinuria es negativa al comienzo del ataque hemolítico, aún si va acompañado de hemoglobinemia y hemoglobinuria, ya que la hemoglobina debe ser primero absorbida por las células de los túbulos renales. La ruptura intracelular de la hemoglobina libera hierro el cual es luego reexcretado. La hemosiderinuria podría persistir por varias semanas después del episodio hemolítico.

FIGURA 4: Reacción de Perls en orina intensamente positiva



CITOQUÍMICA PARA HEMOGLOBINA FETAL

Método de Kleinhauer y Betke:

Fundamento

La demostración citoquímica de la Hemoglobina fetal (HbF), se basa en que los eritrocitos que contienen HbF, sometidos a una solución tamponada ácida, resisten a este tratamiento y se tiñen posteriormente con eritrosina en forma intensa. En cambio, los glóbulos rojos que contienen HbA aparecen como sombras, muy levemente coloreados, puesto que esta Hb se eluye.

NOTA: es necesario procesar 2 frotis control: uno de sangre de cordón (control positivo) y otro de un adulto normal (control negativo).

Resultados

Se observan eritrocitos con HbF en los extendidos de sangre de mujeres embarazadas, a partir del 5° mes, aunque en muy pequeña cantidad. En la

sangre de cordón umbilical y en los recién nacidos se encuentra en proporción muy elevada (60-96%). Después del nacimiento desciende bruscamente y al cabo del 6° mes no alcanzan al 10%. Hasta los 10 años pueden encontrarse cifras inferiores al 2%, para desaparecer después o no sobrepasar dicho valor.

Interpretación

Patológicamente puede hallarse un porcentaje alto de eritrocitos con HbF en la **talasemia mayor (20-90%)**, mientras que en la **talasemia menor** sólo se tiñen del **2-5%**.

En la **anemia drepanocítica** los eritrocitos con HbF pueden variar del **1 al 30%**, según la gravedad de la enfermedad.

En la anemia perniciosa genuina sin tratamiento es variable y en la microesferocitosis hereditaria es de 0,5-7%.

En la **persistencia hereditaria de hemoglobina fetal (PHHF)**, de origen africano, hay una síntesis casi nula de cadenas β y los individuos afectados tienen una tasa muy elevada de HbF, alcanzando el 100% en los homocigotos y del 20-30% en los heterocigotos, siendo el resto HbA y HbA₂. No hay ningún trastorno clínico en estos individuos por lo general de raza negra.

El estudio citoquímico es útil para diferenciar una $\delta\beta$ -talasemia heterocigota de una PHHF, ya que en este último caso hay una distribución homogénea de la HbF en los eritrocitos (distribución pancelular); en cambio en la $\delta\beta$ -talasemia heterocigoto, la HbF se reparte muy irregularmente en los glóbulos rojos (distribución heterocelular).

Los aumentos adquiridos de HbF se pueden dividir en dos grupos:

1) Trastornos de la serie roja como la anemia megaloblástica, sideroblásticas adquiridas, hemolíticas y aplásicas.

2) Trastornos de la serie blanca como leucemias agudas, crónicas y eritroleucemia.

La causa en estas últimas es poco conocida pero se cree que se debe a una mutación neoplásica de los genes reguladores de la síntesis de hemoglobina.

BIBLIOGRAFÍA

- Bain Barbara. Leukaemia diagnosis. 4th edition. 2010.
- Dacie and Lewis Practical haematology. 11th edition. 2011.
- Vives Corrons Joan y Aguilar Bascompte Josep. Manual de técnicas de laboratorio en hematología. 3^a edición. Masson S.A. 2006.
- Grignaschi. Diagnóstico citológico de las hemopatías. Editorial Médica Panamericana, S.A. 1991.
- Osorio Solís Guido. Hematología. Técnicas y procedimientos de laboratorio. Publicaciones técnicas Mediterráneo Ltda. 1996.
- Iglesias Edgardo. Citoquímica hematológica. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. UNT. 1984.