



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
LICENCIATURA: QUÍMICO FARMACOBIOLOGO



ÁREA ESPECÍFICA DE: ANÁLISIS CLÍNICOS

MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO

ASIGNATURA DE: HEMATOLOGÍA II

CÓDIGO: LQF 408 L

FECHA DE ELABORACIÓ: MARZO 2007

NIVEL EN EL MAPA CURRICULAR: FORMATIVO

TIPO DE ASIGNATURA: CP

PROFESORES QUE PARTICIPARON EN SU ELABORACIÓN:

M.C. SILVIA GARCÍA GONZÁLEZ
M.C. MIGUEL ANGEL VILLEGAS GONZÁLEZ
Q. F. B.LUCILA JUAREZ PEREZ
M.C. GONZALO GARZON GARCIA

HORAS PRÁCTICA. 2

TOTAL DE CRÉDITOS: 0

- 1 Tinción de frotis sanguíneo y recuento diferencial
- 2 Observación de frotis con médula ósea normal
- 3 Observación de frotis con leucemia mieloide aguda M0, M1, M2, M3
- 4 Tinción de sudán negro y peroxidasa para M0, M1, M2, M3
- 5 Observación de frotis con sangre y médula ósea con leucemia mieloide aguda: M4, M5, M6, M7
- 6 Tinción de PAS y esterasas para M4, M5, M6, M7
- 7 Observación de frotis de sangre y médula ósea con leucemia limfoide aguda: L1,L2,L3
- 8 Observación de frotis de sangre y médula ósea: leucemias crónicas LGC, LLC, Prolinfocítica
- 9 Tinción de fosfatasa alcalina a frotis de sangre con LGC
- 10 Tinción de fosfatasa ácida en frotis de sangre con LLA, Mieloma Múltiple y Linfomas de Hogdkin y no Hogdkin.
- 11 Conteo de plaquetas y observación de frotis con trombocitopenia
- 12 Observación de frotis con trombocitosis

PRÁCTICA No. 1

TINCIÓN DE FROTIS Y RECUENTO DIFERENCIAL

Los colorantes de Romanowsky (Wright, Giemsa, May Grünwald) son mezclas de dos colorantes primarios, el azul de metileno y la eosina.

El azul de metileno (color azul), es un colorante básico, en las células se une a los componentes ácidos que se tiñen de color azul (basófilos) Para fines prácticos el único ácido que se encuentra en suficiente cantidad para ser identificado por medio de la tinción, es el ácido ribonucleico ribosomal. El ácido desoxirribonucleico, también abundante, tiene otras características tintoriales.

La eosina (color naranja) es un colorante ácido; en las células se une a la base que se observa de dicho color (eosinófilas) Dos ejemplos muy claros de sustancias básicas son la hemoglobina y la proteína básica de los eosinófilos, (esta última se encuentra en los gránulos maduros de dichas células) Mediante este tipo de colorantes pueden distinguirse los aspectos morfológicos de las células:

1. Forma, dimensiones y contorno de las células sanguíneas.
2. Núcleo celular y restos de cromatina: color púrpura.
3. Citoplasma de linfocitos: color azul.
4. Citoplasma de monocitos: color grisáceo.
5. Granulaciones polinucleares:
 - a. Eosinófilos: color naranja.
 - b. Basófilos: color azul oscuro.
 - c. Neutrófilos: color pardo.
6. Hematíes: color rosa pálido.
7. Reticulocitos: color azulado.

Preparación de colorantes

1. Colorante de Giemsa
 - a. Giemsa seco (polvo) 1g.
 - b. Glicerina 66ml.
 - c. Calentar a 50°C durante 2 horas.
 - d. Alcohol metílico absoluto y totalmente libre de acetona 66 ml
 - e. Dejar a temperatura ambiente de 7 a 14 días (maduración)
 - f. Filtrar antes de su empleo.
2. Colorante de May Grünwald
 - a. May Grünwald seco (polvo) 0.3 g
 - b. Alcohol metílico absoluto y libre de acetona 600ml.
 - c. Calentar la mezcla a 56°C hasta la disolución completa del colorante.
 - d. Dejar enfriar en nevera a 4°C durante 24 horas agitando de vez en cuando.
 - e. Filtrar antes de su empleo.
3. Colorante de Wright
 - a. Wright seco (polvo) 1g.
 - b. Alcohol metílico absoluto y libre de acetona 600ml.
 - c. Calentar a 56°C hasta la disolución completa del colorante.
 - d. Dejar enfriar, filtrar y guardar en envase bien tapado (evitar el contacto con la acetona o ácidos en general)

TINCIÓN GIEMSA

Material

1. Frotis sanguíneo.
2. Colorante de Giemsa constituido por una mezcla de azul de metileno, eosina y varios azules en solución acuosa.
3. Alcohol metílico absoluto (libre de acetona)
4. Microscopio con objetivo de inmersión.
5. Aceite de inmersión.

Método

1. Fijar el frotis con alcohol metílico absoluto durante 3 minutos. (Las extensiones de médula ósea precisan unos 15 minutos)
2. Sumergirlo verticalmente en una solución de giemsa preparada extemporalmente a partir de 1 volumen e solución colorante y 9 volúmenes de solución tampón PBS (pH 6.8)
3. Esperar durante 10 minutos.
4. Lavar el frotis con abundante agua destilada y dejarlo secar al aire libre. Una vez seco, está listo para ser observado al microscopio.

TINCIÓN DE MAY GRÜNWALD- GIEMSA

Es el resultado de combinar la tinción de Giemsa con la de May Grünwald y se conoce con el nombre de tinción panóptica. Esta tinción resalta de manera especial las granulaciones leucocitarias y mejora la coloración de los hematíes.

Material

1. Frotis sanguíneo seco.
2. Colorante de Giemsa.
3. Colorante de May Grünwald. Está constituido por una solución alcohólica de azul de metileno y eosina. Al igual que el colorante de Giemsa puede adquirirse en solución preparada comercialmente.

Método

1. Fijar el frotis sobre el portaobjetos, sumergiéndolo en solución de May Grünwald durante 2 minutos.
2. Transferirlo a una solución de May Grünwald diluida en agua o con PBS (1 vol/ 1 vol) preparada extemporalmente y dejarlo durante 2 a 3 minutos.
3. Sin lavar, sumergir el frotis en la solución de Giemsa, preparada extemporalmente según lo especificado en el apartado anterior durante 20 minutos.
4. Lavar el frotis con abundante agua destilada y sumergirlo en tampón PBS, de pH 6.8 durante 2 a 5 minutos.
5. Secar el frotis al aire. Una vez fresco, esta listo para su observación mediante el microscopio.

TINCIÓN DE WRIGHT

La tinción de wright es una modificación de la de Leishman (especialmente indicada para la visualización de parásitos del paludismo) y sus características son similares a las de la tinción de May Grünwald- Giemsa.

Método

1. Fijar las extensiones de sangre añadiendo sobre las mismas un volumen de colorante sin diluir durante 1 minuto.
2. Añadir al colorante 2 o 3 volúmenes de agua destilada- tampón o PBS (pH 6.8), procurando no desparramar la mezcla por fuera del portaobjetos.
3. Mezclar bien la solución colorante con el diluyente y esperar 10 minutos.
4. Lavar bien el frotis con abundante agua destilada y finalmente dejarlo secar al aire. Una vez seco la preparación está lista para observarla al microscopio.

Cusas de error en la tinción del frotis sanguíneo

Una extensión de sangre bien teñida debe caracterizarse por una buena diferenciación de las estructuras subcelulares en los leucocitos, una coloración rosada de los hematíes y la ausencia de precipitados. Los defectos más frecuentes observados en la tinción del frotis sanguíneo son:

1. Una coloración excesivamente azul. Ello puede obedecer a varias causas:
 - a. Frotis excesivamente grueso.
 - b. Lavado insuficiente.
 - c. Tinción excesivamente prolongada.
 - d. Empleo de colorante excesivamente alcalino.
2. Una coloración excesivamente rosada. En este caso, el colorante, el tampón o el agua de lavado tiene un carácter demasiado ácido.
3. Presencia de precipitados. Puede evitarse mediante filtración de colorantes antes de su empleo.
4. Apreciación de artefactos morfológicos debidos al anticoagulante. Cuando el frotis se realiza con sangre tratada con EDTA, es muy importante no esperar más de 2 horas de la extracción, ya que pueden aparecer alteraciones morfológicas imprevisibles de las células sanguíneas.
5. Aparición de artefactos debidos a suciedad, deterioro o presencia de grasa en el portaobjetos.
6. Hidratación de los hematíes. Ello obedece a una fijación inadecuada del frotis por empleo de alcohol metílico o por hidratación ulterior de alcohol metílico absoluto en presencia de un ambiente excesivamente húmedo.

RECUESTO DIERENCIAL DE LEUCOCITOS

La fórmula leucocitaria es el recuento diferencial de cada uno de los leucocitos presentes en la sangre periférica. Estos se clasifican en dos grandes grupos: polinucleares (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y mononucleares (linfocitos y monocitos).

A pesar del enorme progreso de los métodos diagnósticos en hematología, la fórmula leucocitaria, junto con la determinación de los restantes parámetros hematológicos básicos, continúa siendo un procedimiento diagnóstico de gran valor. Ello es así porque la fórmula leucocitaria suministra al clínico información sobre el estado de las células de la sangre, así como la eventual presencia en la misma de las células que, en condiciones normales, no deben estar (blastos, mielocitos, células plasmáticas, linfocitos reactivos, eritroblastos y otros).

Desde que se fueron convenientemente perfeccionando los procedimientos de tinción del frotis sanguíneo, la fórmula leucocitaria se ha venido realizando mediante observación microscópica del mismo y análisis de 100 o 200 células por cada recuento diferencial. No obstante, el progreso tecnológico alcanzado en los últimos años ha permitido la fabricación

de instrumentos automáticos capaces de realizar el recuento diferencial leucocitario de manera mucho más rápida y precisa que con el procedimiento convencional.

MÉTODO CONVENCIONAL

Se basa en la observación mediante el microscopio de 100 o 200 leucocitos extendidos en un frotis sanguíneo teñido. Una vez que se dispone del frotis teñido, debe realizarse una primera observación del mismo mediante un objetivo de poco aumento al objeto de apreciar la calidad de la tinción y características de la distribución general de las células. Con este aumento puede apreciarse también la eventual presencia en la sangre periférica de elementos atípicos, tales como blastos, elementos inmaduros de la serie mieloide, eritroblastos o linfocitos reactivos. Asimismo puede apreciarse muy bien la morfología eritrocitaria al objeto de seleccionar la zona mejor para un examen más cuidadoso y realizar una estimación aproximada del número de plaquetas.

La realización de la fórmula leucocitaria propiamente dicha exige el empleo de un objetivo de mayor aumento (generalmente de inmersión).

Para la obtención de la fórmula leucocitaria exige, en primer lugar, la realización de un buen frotis de sangre, es decir, que no sea excesivamente grueso ni delgado. Así si el frotis es muy grueso, además de dificultar la observación de la morfología eritrocitaria, resultará más difícil distinguir los linfocitos de los monocitos. Por el contrario, si es muy delgado, la mayoría de polinucleares y también monocitos se hallarán localizados en las áreas periféricas. Lo que hará difícil no solo realizar el recuento diferencial, sino también obtener una relación correcta entre las células observadas (falsos aumentos de linfocitos o de monocitos).

El principal defecto del frotis obtenido mediante la extensión manual de la gota de sangre sobre el portaobjetos reside en la irregular distribución de los leucocitos, lo cual junto al escaso número de células normalmente analizadas y otros factores diversos constituyen causas de error que hay que tener siempre en cuenta al realizar el recuento diferencial leucocitario.

La distribución irregular de los leucocitos obedece al diferente tamaño de las células, de forma que las pequeñas (linfocitos) tienen tendencia a situarse hacia el centro de la extensión, y las de mayor tamaño (monocitos), en las regiones más periféricas. En la actualidad, el empleo de extensores de sangre automáticos puede disminuir el factor de error, al permitir una distribución más homogénea de las células sobre el portaobjetos.

Las variaciones en la tinción de las células depende del tipo y características del colorante empleado, así como de la sistemática empleada para realizar la tinción. La calidad y garantía de los colorantes es fundamental para obtener una tinción reproducible. Asimismo, el procedimiento de la tinción es de gran importancia, debiendo representarse tanto el tiempo requerido para la fijación de las células como el necesario para la acción del colorante. La temperatura constituye también otro factor importante que hay que tener en cuenta, de tal forma que variaciones de la misma pueden influir en mayor o menor grado en el resultado de la tinción.

Hasta este momento se ha de admitirse la fórmula leucocitaria como una técnica con escasa exactitud y precisión, no obstante, la apreciación que se consigue con una fórmula a 100 elementos, si bien con escaso valor estadístico, si posee un indudable valor clínico, porque permite afirmar que en la sangre del paciente la proporción de leucocitos es normal y no se observan elementos atípicos, lo cual en realidad ya es mucho.

MÉTODO AUTOMÁTICO

En la actualidad existen instrumentos automáticos capaces de realizar la fórmula leucocitaria con la suficiente precisión y rapidez. Tales instrumentos son de gran utilidad cuando diariamente debe realizarse un elevado número de fórmulas leucocitarias, ya que aumenta la rapidez y la calidad de las mismas. Debe tenerse en cuenta que, aunque los automatizadores son en general instrumentos muy útiles para el escrutinio de patología, evitando así la pérdida de tiempo que representa la realización de las fórmulas normales, carecen de la garantía suficiente para la interpretación de diversas alteraciones patológicas, por lo que en tales casos la alarma que suministra el instrumento es la señal para que la fórmula sea realizada mediante el procedimiento óptico convencional.

De acuerdo con el método empleado para el análisis de las células sanguíneas, existen dos sistemas para la automatización de la fórmula leucocitaria:

1. Sistemas morfológicos.
2. Sistemas citoquímicos.

Los sistemas morfológicos se basan en el reconocimiento de las células mediante análisis computarizado de las imágenes suministradas por el microscopio convencional a partir de frotis teñidos mediante tinción panóptica. Estos instrumentos actualizan automáticamente el tamaño celular, el contorno nuclear y la coloración o presencia de granulaciones citoplasmáticas, clasificando los leucocitos en cinco categorías: polinucleares, neutrófilos (segmentados y no segmentados), linfocitos, monocitos, polinucleares eosinófilos y polinucleares basófilos. Algunos de estos sistemas son capaces, de además de identificar otras células distintas a las citadas y que eventualmente pueden aparecer en sangre periférica: mielocitos, metamielocitos, promielocitos, células plasmáticas, células plasmáticas, linfocitos atípicos o incluso blastos. En otros casos, estas células son ofrecidas por el instrumento como elementos atípicos sin clasificar.

Junto a la fórmula leucocitaria, la mayoría de ellos suministran también información sobre la morfología eritrocitaria y una apreciación semicuantitativa o cuantitativa aproximada del número de plaquetas.

El análisis del frotis por parte del instrumento se realiza en base a una sistemática de rastreo similar a la empleada manualmente. Así la platina se desplaza bajo el objetivo de forma automática y con una rapidez superior a la manual toda la superficie de la extensión hasta que se han analizado 100 o más células.

Una vez que termina de analizar el número de células prefijado (50, 100, 200 o 500) el instrumento suministra el resultado de la fórmula en tantos por ciento. En caso de que las características de las células sanguíneas no permitan la identificación de las mismas como elementos normales (de acuerdo con la programación del automatizador), el instrumento suministra una alarma o señal al final de la operación, indicando la necesidad de revisar manualmente la fórmula.

Los sistemas citoquímicos tienen un fundamento distinto, ya que analizan poblaciones de células en suspensión de acuerdo con su tamaño y su comportamiento citoquímico. Estos sistemas emplean sangre total, evitando con ello la necesidad y los inconvenientes que supone la realización del frotis, y suelen analizar entre 24 000 y 30 000 células. A diferencia de los sistemas basados en el análisis computarizado de imágenes, los métodos citoquímicos no distinguen entre neutrófilos segmentados y no segmentados, pero como contrapartida tienen la ventaja de suministrar una imagen de puntos que corresponde a la distribución según tamaño e intensidad de reacción peroxidástica de diferentes poblaciones leucocitarias.

Las grandes ventajas de los sistemas citoquímicos sobre los morfológicos son la mayor rapidez de trabajo (aproximadamente 90 fórmulas / Hr.) y la mayor fiabilidad que viene dada

por el número mucho más alto de células analizadas (2 400 aproximadamente) El inconveniente de estos sistemas es su costo, que resulta relativamente elevado, debido a que al funcionar mediante el principio de flujo continuo quedan expuestos a un consumo casi siempre excesivo de reactivos.

VALORES DE REFERENCIA DE LA FÓRMULA LEUCOCITARIA

Los valores de referencia de la fórmula leucocitaria según sexo y edad se representan en la tabla. Estos valores han sido obtenidos a partir de fórmulas realizadas con el método convencional.

La fórmula leucocitaria no sólo tiene como objetivo fundamental analizar los aspectos cuantitativos de las células que forman cada subpoblación de leucocitos (neutrófilos, linfocitos, monocitos y basófilos), sino también señalar eventuales alteraciones morfológicas o de coloración e las mismas, así como la existencia en la sangre periférica de células no presentes normalmente en ella (blastos, mielocitos, eritroblastos, y otras) Por ello las alteraciones de la fórmula leucocitaria pueden clasificarse en dos grandes tipos:

- a) Alteraciones cuantitativas que se refieren exclusivamente a variaciones en el número normal de células presentes en cada subpoblación.
- b) Alteraciones cualitativas asociadas o no a variaciones en el número de las células normalmente en la sangre.

ALTERACIONES CUANTITATIVAS

Pueden subclasificarse en tres grandes grupos:

1. Aumento de un determinado tipo de leucocitos.
2. Disminución de un determinado tipo de leucocitos.
3. Presencia de células inmaduras en la sangre periférica.

LEUCOCITOS (X10 ⁹ /l)					
Niños					Adultos
Recién nacido	1 semana	1 mes-2 años	4 años	10 años	13-70 años
9-30	5-21	6-18	6-16	5-14	5-11

NEUTRÓFILOS						
NIÑOS						ADULTOS
	Recién nacido	1 semana	1 mes 2 años	4 Años	10 Años	13-70 Años
Relativo(%)	50	39	28	40	51	55-75
Absoluto (X10 ⁹ /l)	9.0	4.7	3.1	3.6	4.1	2.5-7.5

EOSINÓFILOS						
NIÑOS						ADULTOS
	Recién nacido	1 semana	1 mes 2 años	4 Años	10 Años	13-70 Años
Relativo(%)	2	3	3	3	3	1-4
Absoluto (X10 ⁹ /l)	0.36	0.36	0.33	0.27	0.24	0.05-0.5

BASÓFILOS						
NIÑOS						ADULTOS
	Recién nacido	1 semana	1 mes 2 años	4 Años	10 Años	13-70 Años
Relativo(%)	0.6	0.4	0.4	0.6	0.5	0.2-1.2
Absoluto (X10 ⁹ /l)	0.108	0.050	0.044	0.054	0.040	0.01-0.150

LINFOCITOS						
NIÑOS						ADULTOS
	Recién nacido	1 semana	1 mes 2 años	4 Años	10 Años	13-70 Años
Relativo(%)	31	41	6	50	38	17-45
Absoluto (X10 ⁹ /l)	5.6	4.92	6.6	4.5	3.04	1.5-4.5

MONOCITOS						
NIÑOS						ADULTOS
	Recién nacido	1 semana	1 mes 2 años	4 Años	10 Años	13-70 Años
Relativo(%)	6	9	5	5	4	2-8
Absoluto (X10 ⁹ /l)	1.1	1.1	0.55	0.45	0.32	0.20-0.80

PRESENCIA DE CÉLULAS INMADURAS

El paso de células inmaduras (normalmente presente sólo en la médula ósea) a la sangre periférica es siempre patológico y puede hacerse de tres formas diferentes.

1. Salida de elementos celulares pertinentes a toda la línea madurativa granulopoyética (mielemia) Esta situación suele asociarse a una leucocitosis y a un aumento absoluto del número de neutrófilos (neutrofilia) Se caracteriza por la aparición en sangre periférica de mielocitos y metamielocitos, así como de algún promielocito (mielemia) y casi siempre también un elevado número de “bandas” (intensa desviación a la izquierda) Puede observarse en dos situaciones muy diferentes.
 - a. Como respuesta medular a un estímulo periférico (reacción leucemoide) en el curso de una infección, inflamación u otros trastornos situados en el aparato “aumento de un determinado tipo de leucocitos”.
 - b. Como manifestación periférica de un síndrome mieloproliferativo crónico(leucemia mieloide crónica, policitemia vera, mielofibrosis idiopática y trombocitemia esencial)

La leucemia mieloide crónica constituye una hemopatía en la que un mayor número de elementos inmaduros de la serie mieloide y ocasionalmente también de la eritroide y plaquetaria se observa en sangre periférica. En general, el número total de leucocitos es superior a $20 \times 10^9/l$, pudiendo llegar a más de $500 \times 10^9/l$, y prácticamente todos son mielocitos, metamielocitos y neutrófilos maduros.

2. Salida de elementos celulares pertenecientes a la línea madurativa eritroblástica (eritroblastosis) Al igual que en el caso de la mielemia, la eritroblastosis puede ser una respuesta a un estímulo extramedular (síndrome hemolítico intenso y crónicos, eritroblastosis fetal, anemias carenciales en tratamiento, principalmente) o tener un origen medular de diferente tipo (diseritropoyesis congénita o adquirida, y eritremias primarias asociadas a diferentes síndromes mieloproliferativos agudos o crónicos). La hemopatía en la que es característica la abundancia de elementos inmaduros de la serie eritroide circulante (esitroblastos y algún proeritroblasto) es la eritroleucemia o enfermedad de Di Guglielmo, que constituye una forma de leucemia mieloide en la que se afecta selectivamente la serie roja.
3. Salida de células muy inmaduras (blastos) de una o más series madurativas (leucemia aguda) o de células linfoides en diferentes estadios madurativos (linfoma leucemizado).

METODOLOGÍA

Se organizarán equipos de tres integrantes los cuales llevarán a cabo la metodología descrita anteriormente, cada equipo contará con un microscopio en el cual podrá hacer las observaciones pertinentes, por otro lado el maestro contará con un CIRCUITO CERRADO DE TELEVISIÓN por medio del cual expondrá a los alumnos de manera clara las observaciones pertinentes y de esta manera complementar la información obtenida en las clases teóricas, cumpliendo con el proceso de enseñanza.

NOTA: cabe hacer notar que anteriormente se trabajó con equipos de hasta 8 personas lo que entorpecía el proceso enseñanza aprendizaje lo que se ha subsanado con la adquisición de material nuevo como microscopios de buena calidad y circuitos cerrados de microscopía y video.

PRÁCTICA No. 2

OBSERVACIÓN DE FROTIS DE MÉDULA ÓSEA NORMAL

Solo por experiencia se consigue interpretar bien la citología de médula, que debe considerarse como un método. Por eso el examinador debe informarse con respecto a la naturaleza clínica de la enfermedad del paciente.

En general hay dos métodos de examinar una extensión de médula. El primero consistente en observar varios portaobjetos a poco aumento, luego a gran aumento en seco y, finalmente, con el objetivo de inmersión en aceite; y, a base de una experiencia previa, es posible lograr una impresión respecto al número y la distribución de las células, de modo muy similar a como el patólogo analiza sus cortes de tejido. El segundo consiste en efectuar un recuento diferencial de un gran número de células (300-1000) y calcular el porcentaje de cada tipo de célula. Finalmente se puede emplear una combinación de los dos métodos.

El segundo método, un laborioso recuento diferencial, constituye una parte esencial del adiestramiento en este trabajo, sin el cual no es posible llegar a realizar el primero con exactitud. El recuento diferencial proporciona, además, un registro objetivo y útil como referencia para medir ulteriores cambios. El reconocimiento de los tipos celulares, y en particular de la fase de maduración dentro de cualquier serie dada, tiende a variar de un laboratorio en otro, a pesar de los numerosos esfuerzos realizados para unificar nomenclatura, con descripciones, fotografías y dibujos. No pueden aceptarse como universales ningún promedio ni márgenes normales. La línea de base más válida es la que determina cada laboratorio particular y aun entonces, de no emplear un adiestramiento en grupo, puede haber variaciones notables de un examinador a otro. Por fortuna estas limitaciones del método sólo son graves cuando no se tienen en cuenta. Con práctica y experiencia, los investigadores de laboratorio pueden obtener resultados provechosos y conseguir un alto grado de reproducibilidad en sus recuentos diferenciales de la médula. Es recomendable el siguiente procedimiento para examinar preparaciones de esta clase:

- 1- Inspección a simple vista de los portaobjetos, para escoger la extensión que contenga partículas.
- 2- Examen a poco aumento (16mm) de las partículas a fin de determinar previamente si la médula es normoplásica, hipoplásica o hiperplásica.
- 3- Seleccionar de una zona celular, generalmente en la porción caudal de la película, alrededor de las partículas, a la que sigue un estudio minucioso de los detalles citológicos a gran aumento y con objetivo de inmersión en aceite.

CELULARIDAD: El grado de celularidad, si el conjunto de la médula es hiperplásica o hipoplásica, es un aspecto difícil de determinar por el examen de un material aspirado. Si este dato es esencial, solo podemos asegurarnos estudiando cortes histológicos de partículas aspiradas o del material obtenido por biopsia por trocar o por biopsia quirúrgica. Si la aspiración se efectúa de una manera uniforme y si retiran solo cantidades mínimas de material, es posible poder obtener estimaciones útiles, aunque solamente aproximadas, de la celularidad.

La celularidad (expresada como relación entre el volumen de células hematopoyéticas en la medula y el volumen total de células más grasa) varía normalmente con la edad del individuo y la zona medular examinada. Por ejemplo a la edad media de 50 años, la celularidad en las vértebras es de un 75%; en el esternón de un 60%; en la cresta iliaca de un 50%, y en las costillas de un 30%. La celularidad normal del hueso iliaco en diferentes edades ha sido muy bien descrita por Hartsock y cols. en 1955.

El informe debe comprender los aspectos siguientes: descripción de la celularidad en general, tipo de eritropoyesis, madurez general de las células eritropoyéticas, y cálculo de los cocientes mieloide-eritroide o leucocito idee-eritroide, basados en un recuento de 500-1000 células.

Un recuento diferencial es útil, especialmente en casos seleccionados, como, por ejemplo, en una leucemia para seguir el efecto de la terapéutica. Pero se suelen conseguir mejores resultados examinando un número mayor de preparaciones en el mismo tiempo que se invierte en los recuentos diferenciales.

RELACIÓN MIELOIDE-ERITROIDE (M:E) En el adulto normal, la relación M:E viene a ser de 3:1 ó 4:1. Éste término muy, difundido, se refiere a los recuentos diferenciales en que no se han excluido, los granulocitos maduros.

La relación M:E al nacer es de 1.85:1 aumenta con rapidez poco después y alcanza el nivel normal máximo de 11:1 en las dos primeras semanas de vida, para descender luego gradualmente hasta un promedio de 3:1 en los primeros 20 años.

INTERPRETACIÓN: Una relación M:E aumentada, por ejemplo, de 6:1 puede significar la respuesta a una infección o a una leucemia, una reacción leucemoide o una hipoplasia eritroide. Cuando esta disminuida, esto es, menor de 2:1 puede significar una reducción de leucopoyesis o una hiperplasia eritropoyética. La hiperplasia eritroide normoblástica puede provenir de una de las muchas formas de anemia, de afecciones hepáticas o de una pilicitemia, mientras que la megaloblástica puede ser causada por una deficiencia de ácido fólico o de vitamina B12 como en la anemia perniciosa. Una relación M:E normal no significa necesariamente una medula normal.

Por ser irregular la distribución de los diversos tipos de células, los recuentos diferenciales de las células nucleadas de la medula no son más que aproximaciones. Las irregularidades se deben en parte a que los normoblastos, los granulocitos neutrófilos maduros.

RECuento DIFERENCIAL DE LA MEDULA: Los datos publicados respecto a los recuentos normales de las células medulares varían según los autores y se echan de menos las cifras normales generalmente aceptadas para la sangre periférica. Esta diversidad refleja la técnica de cada uno de los investigadores, tanto al realizar los recuentos como en la interpretación. Por consiguiente, es mejor que cada uno de establezca sus propios valores normales; de las observaciones nuestras se relacionan en la tabla 1:

RECuentos DIFERENCIALES DE LA MÉDULA ÓSEA EN PORCENTAJES DEL TOTAL DE CÉLULAS NUCLEADAS

ROSSE (1977)	MAUER (1969)	JANDI (1987)
-------------------------	-------------------------	-------------------------

INTERPRETACIÓN DE LOS HALLAZGOS CITOLÓGICOS:

1. Las células normalmente presentes pueden aumentar en número. Esto ocasiona un paro en la maduración con aparición de las células más jóvenes en cantidades anormalmente grandes.

2. Un recuento de eosinófilos de más de 5%, uno de los linfocitos de más de 20% y uno de células plasmáticas de más de 5% pueden ser significativos.
3. Células normalmente ausentes: células neoplásicas, metastásicas (cáncer) o primarias (mieloma múltiple, y las que se ven en las tesarismosis (enfermedad de Gaucher).
4. Lesiones granulomatosas: tuberculosis, enfermedad de Hodgkin y sarcoidosis.
5. Parásitos: paludismo, histoplasmosis.

METODOLOGÍA

Se organizarán equipos de tres integrantes los cuales llevarán a cabo la metodología descrita anteriormente, cada equipo contará con un microscopio en el cual podrá hacer las observaciones pertinentes, por otro lado el maestro contará con un CIRCUITO CERRADO DE TELEVISIÓN por medio del cual expondrá a los alumnos de manera clara las observaciones pertinentes y de esta manera complementar la información obtenida en las clases teóricas, cumpliendo con el proceso de enseñanza.

NOTA: cabe hacer notar que anteriormente se trabajó con equipos de hasta 8 personas lo que entorpecía el proceso enseñanza aprendizaje lo que se ha subsanado con la adquisición de material nuevo como microscopios de buena calidad y circuitos cerrados de microscopía y video.

PRÁCTICA 3
OBSERVACIÓN DE FROTIS CON LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA M0, M1, M2, M3
TABLA No.1: CLASIFICACIÓN DE LAS LEUCEMIAS

MIELOIDES	LINFOIDES
AGUDAS	AGUDAS
MIELOBLÁSTICA DIFERENCIADA MÍNIMAMENTE (M0) MIELOBLÁSTICA INMADURA (M1) MIELOBLÁSTICA MADURA (M2) PROMIELOCÍTICA HIPERGRANULAR (M3) MIELOMONOBLÁSTICA (M4) MONOBLÁSTICA (M5) ERITROLEUCEMIA (M6) MEGACARIOBLÁSTICA (M7)	LEUCEMIA L1 LEUCEMIA L2 LEUCEMIA L3
CRÓNICAS	CRÓNICAS
GRANULOCÍTICA	LINFOCÍTICA PLASMOCÍTICA CÉLULAS PELUDAS PROLINFOCÍTICA

TABLA No. 2: UTILIDAD DEL INMUNOFENOTIPO, CITOGÉNÉTICA, HISTOQUÍMICA Y MORFOLOGÍA EN EL DIAGNÓSTICO Y CLASIFICACIÓN DE LAS LEUCEMIAS

LEUCEMIAS AGUDAS MIELOBLASTICAS

CRITERIOS	CITOQUÍMICA	INMUNOFENOTIPO	CITOGÉNÉTICA
M0	PEROXIDASA - SUDAN NEGRO -	CD13, 34, 33	INESPECÍFICA
M1	PEROXIDASA + SUDAN NEGRO +	CD 33, 13	-7, +8, -5 del (5q) t(9:22)
M2	PEROXIDASA + SUDAN NEGRO +	CD 13, 33	t(8:21) t(6:9)bas. -7, +8 del (5q)
M3	PEROXIDASA + SUDAN NEGRO +	CD 13, 33	t(15:17) ó PML/RaR° t(11-17)no resp. Tx.
M4	ESTEARASANAFTOL + PEROXIDASA +/- SUDAN NEGRO +/-	CD 13, 33, 14	t(4:11) t(16:16)eos. T(6:9)bas.
M5	ESTEARASANAFTIL +	CD 13, 33, 14	t(9:11) del: t(11q)(q23) +8
M6	PAS +	GLUCOFORINA A CD 71	-7, +8, -5 FRECUENTES ABERRACIONES COMPLEJAS
M7	PAS +	CD 41, 42,61	ANORMALIDADES DEL CROMOSOMA 21 Y DEL 3 t(1:3)

La palabra leucemia significa “sangre blanca” y el término agudo se conserva en la actualidad por razones históricas. Un término más adecuado que el de leucemia aguda sería el de *leucemia de “blastos”* dado que en estos trastornos el tipo predominante de célula maligna proliferante es una célula inmadura poco diferenciada conocida como “blasto”. La proliferación descontrolada de estas células en la médula ósea, el desplazamiento de los precursores normales y la invasión del resto de los órganos de la economía son los mecanismos principalmente responsables de los efectos devastadores de la enfermedad.

Las leucemias agudas mieloblásticas más frecuentes en México son M3 y M7 por ser predominantes en la población mestiza.

En las leucemias M3 o M4 los pacientes jóvenes, tienen mejor pronóstico que los pacientes mayores de 55 años.

Desde un punto de vista morfológico las leucemias agudas linfoblásticas pueden clasificarse en tres grandes grupos: L1, L2, L3. Es bien conocido de que los pacientes con L3 tienen en términos generales el pronóstico más desfavorable. En estudios inmunológicos de leucemias realizado en la Ciudad de Puebla a lo largo de 3 años se encontró que la variedad más frecuente de leucemia aguda linfoblástica fue la común.

En estudios realizados entre 1983 y 1989 se agrupó a los pacientes con leucemias agudas linfoblásticas favorables y desfavorables. Entre las favorables se encuentran las leucemias agudas linfoblásticas común, nula, y en las desfavorables se presenta la T, Pre-B, y B.

En estudios recientes se pudo comprobar que el estado nutricional influye en el pronóstico de los niños con leucemias aguda linfoblástica. Las leucemias linfoides estirpe B son más frecuentes y las Pre-B son menos frecuentes.

Las leucemias agudas son las más frecuentes, en un reporte estadístico se puede observar que las linfoblásticas se presentan en un 61.6%, las mieloblásticas en el 37.5% y el 0.90% son híbridas. Las leucemias crónicas no son frecuentes, por lo que no se reportan estadísticas.

Numerosos estudios han demostrado que los pacientes receptores de un trasplante renal que reciben tratamiento inmunodepresor prolongado presentan una alta incidencia de neoplasias y de éstas un porcentaje pequeño son leucemias agudas, mientras que es excepcional la aparición de Síndromes mieloproliferativos crónicos.

ETIOLOGÍA: Las leucemias agudas, cuya etiología, al igual que acontece en otras neoplasias, no es clara, se relacionan algunos factores que intervienen en la etiopatogenia. Los factores genéticos tienen una gran importancia (activación de oncogenes), ciertas cromosopatías y desordenes genéticos e inmunológicos pueden ser causas determinantes. Es posible que la exposición a derivados del benceno desempeña algún papel en la leucemogénesis, así como la exposición a radiaciones ionizantes. Los agentes que dañan el ADN, como los alquilantes, pueden causar leucemias. Los virus desempeñan un papel etiológico indudable en la aparición de las leucemias en ciertas especies animales. Sin embargo, cada vez son más firmes las impresiones de que la leucemia humana puede tener una etiología vírica. En los últimos años han aparecido casos importantes de leucemias agudas postquimioterapéuticas en enfermos sometidos a terapéutica citostática por enfermedad maligna previa (enfermedad de Hodgkin, mieloma, policitemia esencial, cáncer de mama y de ovario) o no neoplásicas como poliartritis crónica progresiva, trasplante renal y otras.

CUADRO CLÍNICO: Los pacientes que sufren leucemia aguda se presentan con síndromes hemorrágicos, anémicos o infiltrativos, aisladamente o en combinación. La

hemorragia puede deberse a trombocitopenia por invasión leucémica de médula ósea o coagulopatias por consumo, la anemia se debe también a invasión tumoral de la médula. El síndrome infiltrativo supone crecimiento de ganglios, bazo o hígado; las leucemias monoblásticas infiltran encías con mayor frecuencia que las linfoblásticas. Puede presentar dolor óseo por la proliferación celular y la expansión de la cavidad nodular. Las LAL de células T con frecuencia generan crecimiento del timo. Un 50% de las leucemias agudas cursan con leucocitos altos, un 25% normales y un 25% disminuidos. El examen físico revela pérdida de peso, debilidad, hepatoesplenomegalia y en ocasiones linfadenopatías. Las lesiones producidas varían desde eritema, petequias, equimosis a tumores.

°DIAGNÓSTICO: El diagnóstico de leucemia aguda se efectúa con el estudio de extendidos de sangre periférica y aspirado de médula ósea, empleando tinciones pancromáticas del tipo de May-Grunwald-Giemsa, Wright o Romanowsky. Cuando la infiltración blástica de la médula es grave, no hay dificultad para establecer el diagnóstico de leucemia aguda; esto ocurre preferentemente en niños con leucemia aguda linfoblástica. Sin embargo, en algunos casos de leucemia aguda mielóide la infiltración blástica no es tan grave. Se acepta que se requiere más del 30% de las células nucleadas de la médula ósea sean blastos para establecer el diagnóstico de leucemia aguda. Cuando se emplea la morfología panóptica convencional como único recurso para clasificar las leucemias agudas, se puede cometer errores diagnósticos y en consecuencia, terapéuticos, aproximadamente en 20% de los casos. Los errores más frecuentes son: no diferenciar entre variedades L1-M0, M2-M0, L1-M1, L2-M1; no reconocer la variante M0, no reconocer la variante M7, no distinguir entre M3 microgranular y una M4.

El empleo combinado de tinciones histoquímicas, de la clasificación inmunológica de las leucemias, citogenética y en algunos casos, microscopia electrónica permite establecer con certeza la naturaleza de las células malignas y de ese modo, el diagnóstico preciso y el tratamiento adecuado.

TRATAMIENTO: Las leucemias agudas son las neoplasias más frecuentes de infantes y adolescentes. Sin embargo, no existe una definición precisa sobre la edad en la cual un paciente con leucemia aguda debe tratarse como adulto o como niño. Los resultados de los tratamientos de las leucemias agudas se pueden predecir de acuerdo con diversos factores pronósticos. La edad en el momento del diagnóstico tiene valor pronóstico, en diversos estudios realizados se ha encontrado que la capacidad de regeneración de la médula ósea de pacientes desnutridos es menor que la de sujetos normales y que, en consecuencia, las dosis de quimioterapia mielosupresora deben disminuirse en pacientes desnutridos para evitar toxicidad, por lo que se incrementan las posibilidades de que se presente una recaída leucémica en la médula ósea. También ha sido posible demostrar que la tolerancia a la quimioterapia mielosupresora mejora, si las condiciones nutricionales del paciente se incrementan. Los mejores resultados terapéuticos en las leucemias agudas linfoblásticas se obtienen en niños entre 2-10 años de edad; los adultos tienen un pronóstico comparativamente desfavorable, a pesar de numerosos intentos e iniciativas para mejorar las perspectivas con relación a los resultados del tratamiento de la leucemia aguda en adultos, el avance objetivo y real en los últimos 10 años es mínimo. La supervivencia a 5 años libre de enfermedad oscila entre el 15-40% tanto para leucemias agudas linfoblásticas como para la variedad mieloblástica. Sin embargo en los últimos 4 años la mejoría en los sistemas de apoyo: medicina de transfusión, antibióticos, antimicóticos, factores de crecimiento hemolinfopoyéticos y tecnología de trasplante, permiten objetivamente esperar avances en el tratamiento de la leucemia aguda en los adultos, tal como se ha logrado en los niños, los niños lactantes menores de un año de edad tienen un mal pronóstico. El tratamiento de pacientes con leucemia aguda siempre debe ser conducido por un hematólogo capacitado.

M1

90% DE BLASTOS
NÚCLEO REDONDO
CROMATINA LAXA
2 o MÁS NUCLEOLOS
ESCASOS CUERPOS DE AUER
MIELOPEROXIDASA +
SUDÁN NEGRO +
CLOROACETATO ESTERASA +
SIN ANOMALIAS CROMOSOMICAS

M2

BUEN PRONÓSTICO DE VIDA
30-40% DE BLASTOS
10% DE PROMIELOCITOS
FRECÜENTES CUERPOS DE AUER
OCASIONAL PSEUDO PELYER-HUET
OCASIONAL PSEUDO CHEDIAK
SUDÁN NEGRO POSITIVO
TRASLOCACIÓN 8:21
PÉRDIDA CROMOSÓMICA SEXUAL
BUENA RESPUESTA TERAPÉUTICA
SUPERVIVENCIA LARGA

M3

ALTERACIONES HEMORRÁGICAS GRAVES
COAGULACIÓN INTRAVASCULAR
PROMIELOCITOS >30%
MÚLTIPLES CUERPOS DE AUER
TRASLOCACIÓN 15:17
REMISIONES PROLONGADAS
MEDIANO PRONÓSTICO DE VIDA

METODOLOGÍA

Se organizarán equipos de tres integrantes los cuales llevarán a cabo la metodología descrita anteriormente, cada equipo contará con un microscopio en el cual podrá hacer las observaciones pertinentes, por otro lado el maestro contará con un CIRCUITO CERRADO DE TELEVISIÓN por medio del cual expondrá a los alumnos de manera clara las observaciones pertinentes y de esta manera complementar la información obtenida en las clases teóricas, cumpliendo con el proceso de enseñanza.

NOTA: cabe hacer notar que anteriormente se trabajó con equipos de hasta 8 personas lo que entorpecía el proceso enseñanza aprendizaje lo que se ha subsanado con la adquisición de material nuevo como microscopios de buena calidad y circuitos cerrados de microscopía y video.

PRÁCTICA No. 4 TINCIÓN DE SUDÁN NEGRO Y PEROXIDASA PARA MO, M1, M2, M3 (SEMINARIO)

CITOQUÍMICA

INTRODUCCIÓN: La histoquímica constituye, en la práctica hematológica, un complemento indispensable de la morfología óptica convencional. Su finalidad es estudiar la presencia de ciertos componentes químicos (enzimas o sustancias diversas) en el interior de las células sanguíneas tanto hematopoyéticas como circulantes en la sangre periférica.

La mayor parte de técnicas citoquímicas derivan de modificaciones de técnicas citoquímicas, siendo las más útiles en hematología la tinción del hierro de Perls para el diagnóstico de ciertas anemias y la tinción de peroxidasa para diferenciar la estirpe celular mieloide de la linfoide. Asimismo, las técnicas citoquímicas de mayor importancia diagnóstica han sido estandarizadas por el ICSH (International Committee For Standardization In Haematology).

DEFINICIÓN: 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 químicos definidos en su real ubicación citológica para lo cual no deben destruir la célula, y si lo hacen deben reemplazar la sustancia identificada en su topografía.

Las finalidades primordiales de la citoquímica son:

1. El reconocimiento y diagnóstico celular.
2. El estudio de la fisiología y fisiopatología celulares.
3. El diagnóstico de la patología.

ESTANDARIZACION DE MÉTODOS EN CITOQUÍMICA

Es fundamental para lograr uniformidad de lectura y correcta interpretación. Como norma general, que no excluye otras más particulares por reacción, se fijan las siguientes:

1. Preparación estricta de los reactivos, con drogas de calidad probada.
2. Práctica permanente de las reacciones con preparados testigo.
3. Realización, fijación y conservación de los preparados.
4. Determinación de tiempos exactos para cada uno de los pasos.
5. Idem de temperatura (en forma muy especial para las enzimáticas).
6. Tiempo y condiciones de la inmersión para lectura.
7. Diámetro y conservación idóneos sobre los cuales se lleva a cabo la determinación.

EVALUACIÓN DE RESULTADOS EN CITOQUIMICA CLÁSICA

1. Puntaje o Escorificación.

Incluye normas generales aplicables a la gran mayoría de las reacciones (fosfatasa alcalina y ácida; estereasas; peroxidosas; PAS en neutrófilos; lípidos, etc.) y especiales para algunas otras (Perls; betaglucuronidasa; PAS en linfocitos; PAS en leucemia linfática aguda, etc.

Para la expresión matemática de los valores hallados, en forma general se califican los elementos en grados 0 (reacción negativa) a 4 (los de positividad máxima).

Los del grado 1 son aquellos en los que la positividad es mínima pero claramente discernible; los del grado 2 presentan una infestación difusa o parcial en alguna zona de la célula (por lo general el hilio comprendido entre los lóbulos nucleares); los de grado 3 exhiben una infestación franca en todo el citoplasma y zonas granulares de reacción. Finalmente el grado 4 presenta tal intensidad que la reacción a veces se superpone al núcleo.

Grado	Número	Cálculo	Puntaje
0	6	0 x 6	0
1	20	1 x 20	20
2	54	2 x 54	108
3	18	3 x 18	54
4	3	4 x 3	12
Número de elementos tabulados	100	Puntaje	194

TINCIÓN DE AZUL DE TOLUIDINA

Una coloración es metacromásica cuando tiñe selectivamente determinadas estructuras de otro color que no es el del colorante. El fenómeno se produce por empleo de diversas sustancias del grupo de las tiazinas que tienen la propiedad común de poseer el grupo auxócromo básico: azul de metileno, tionina y azul de toluidina.

IDENTIFICACIÓN DE LA METACROMASIA CON AZUL DE TOLUIDINA REACTIVOS:

- Fijador de Motta.
 Se ha observado que algunas sales de plomo aumentan la metacromasia. Motta emplea el subacetato, en cambio Lille usa nitrato. Ambos son útiles.
 Subacetato de plomo1.0 g.
 Etanol 95%..... 50.0 ml.
 Agua destilada 50.0 ml.
 Acido acético0.5 ml.
- Solución acuosa de azul de toluidina 0.5 %

DESARROLLO

- Frotis de sangre o de órgano hematopoyético de 24 horas o más secos, pueden colorearse sin necesidad de fijación; no obstante de disponerse de las drogas para preparar el líquido de Motta, conviene usarlo. En este caso se deja actuar 30 minutos lavar.
- Cubrir el frotis en gradilla o por inmersión con solución de azul de toluidina durante 1 hora.
- Escribir y lavar por inmersión rápida en agua destilada. Secar en posición vertical.

RESULTADOS

Núcleos azules con intensidad suficiente para permitir la correcta identificación celular. Sustancias metacromáticas en violeta (beta metacromasia) o rojo (gamma metacromasia). Granulación de basófilos:Rojo. Granulaciones neutrófilas: violeta. Granulaciones eosinófilas: sin coloración. Sustancias PAS positiva de la eritroleucemia: violeta claro (demostrando presencia parcial de mucopolisacaridos ácidos en su composición).

TINCION DE PERLS

REACCIÓN DE PERLS PARA Fe

FUNDAMENTO

Se basa en la producción de ferrocianuro férrico (azul de Prusia) cuando los iones (Fe^{+++}) férricos, reaccionan con ferrocianuro en solución ácida.

REACTIVOS

1. Ferrocianuro de potasio al 2% 1 vol.
Acido clorhídrico exento de Fe al 2% 1 vol.
2. Solución de safranina al 0.5% en agua bicarbonatada a pH 7.5- 8.0

DESARROLLO

1. Fijación: vapores de formol durante 10- 15 minutos o etanol o metanol absoluto 3 minutos.
2. Lavado por inmersión con agua destilada dos o tres veces.
3. Inmersión en el reactivo ácido de ferrocianuro (o recubrimiento en gradilla) durante 30 minutos.
4. Lavar con agua destilada alcalinizada levemente con carbonato o bicarbonato de sodio (pH 7.5- 8.0).
5. Controlar al microscopio con cubreobjetos interpuesto.
6. Si es necesario hacer reaccionar otros 30 minutos.
7. Lavar los extendidos con agua bicarbonatada.
8. Escurrir y sin lavar agregar solución colorante de safranina. Dejar de 5 a 10 minutos. Es importante mantener la alcalinidad del medio porque de lo contrario se disuelve el precipitado de azul de Prusia. Secar en posición vertical y observar con inmersión directamente sobre el preparado. Resiste la conservación de manera indefinida. Puede lavarse con xilol para quitar aceite.

RESULTADOS

Hierro no hemínico azul brillante.
En estado normal es pequeña la cantidad de Fe no hemínico.

MÉTODO DEL ALFA NAFTIL CLOROACETATO AS- D (HIGGY Y COL.)

REACTIVOS

1. Solución sustrato revelador:
Alfa naftil AS- D cloroacetato 1 mg.
Buffer de fosfatos 0.1 mol pH 8 10 ml.
Acetona pro análisis 0.1 ml.
Fast Blue BB SALT 15 ml.
2. Solución verde de metilo o hemalumbre Mayer.

DESARROLLO

1. Fijación: 3 minutos en borrel con vapores de formol.
2. Lavado rápido en agua destilada y secar.
3. Inmersión en la solución sustrato revelador a 37oC, 15 minutos.
4. Lavado rápido en agua destilada y control microscópico.
5. Contracolor: 5- 10 minutos.
6. Lavado con agua común, secado en posición vertical y examen.

TINCION DE SUDÁN NEGRO “B”

MÉTODO DE SUDÁN NEGRO B (PARA LÍPIDOS SIMPLES)

Si a una solución de colorante de sudan se agrega peroxidasa (por lo común obtenida del rábano) pierde su efecto colorante sobre los lípidos intraleucocitorios de todos los elementos que los contienen. En cambio lo mantiene para adipositos, los macrófagos y las demás grasas. Schaffer y Frscher, autores del procedimiento, piensan que el sudan agota parcialmente su efecto colorante en la peroxidasa del rábano que actúa en forma competitiva respecto de la leucocitaria.

La serie linfoide contiene lípidos de los cuales la tercera parte son fosforados y por lo tanto están enmascarados; otro tercio son los lípidos simples (triglicéridos y colesterol) y una sexta parte son Glucolípidos. Sin embargo, mientras toda la serie granulocítica que contiene componentes similares no iguales es profundamente sudanófila y peroxidasa positiva, los linfocitos son por completo negativos a igualdad de tipo de tratamiento tanto para la peroxiasa como para el Sudan.

Según autores la sudanófilia se expresa más precozmente en la serie granulocítica que la peroxidasa. Sería por ello mejor reveladora de la orientación mieloide de un blasto agranular todavía peroxidasa negativo. No obstante, en nuestra experiencia hemos visto meiosis agudas peroxidasa positiva y Sudan negativas pero paralelo.

REACTIVOS

1. Fijador : formol calcio (ya expuesto).
2. Colorante:
Sudan negro B 1 g.
Alcohol absoluto 70 ml.

Mezclar y disolver por agitación suave. Cuando la disolución sea completa agregar:

Agua destilada 30 ml.

Se obtiene así la solución inestable de colorante en alcohol al 70 %. Dejar madurar 36 horas. Debe filtrarse siempre antes de usar.

3. Diferenciador: alcohol 70% y absoluto.
4. Contracolor: Giemsa al 10%.

DESARROLLO

1. Fijación: 30 minutos por inmersión.
2. Lavado con agua por inmersión.
3. En el fondo de una cápsula de petri se colocan dos fragmentos de portaobjetos o dos varillas de vidrio delgadas como puente sobre el que se dispone el preparado boca abajo. Se agrega la solución colorante a la cápsula hasta cubrirlo. Se deja entre 1 y 2 horas. Este dispositivo evita precipitados del colorante sobre la cara útil.
4. Se escurre y sumerge en un borrel con alcohol al 70%. Se efectúan movimientos suaves para acelerar el lavado. Si el preparado desprende mucho colorante es útil renovar el alcohol. Por lo general en menos de 5 minutos se logra la limpieza.
5. examen bajo agua en el microscopio para controlar. Si es necesario puede repetirse la maniobra p pasarse rápidamente el preparado por alcohol de 95% y agua, para volver a controlar.
6. En gradilla se lo cubre con Giemsa al 10% durante 30 minutos.
7. lavado con agua del grifo, secado contrario, con inmersión en aceite. Hay casos en que la penetración del colorante es tan intensa que resiste hasta al lavado con xilol. No es frecuente.

RESULTADOS

Hematíes incoloros o muy levemente coloreados. Polinucleares neutrófilos y eosinófilos totalmente cubiertos de gránulos de colorante; basófilos: positivos o negativos; linfocitos: negativos; monocitos: positivos en gránulos dispersos; plaquetas: negativas; células plasmáticas: negativas.

PEROXIDASAS

MÉTODO DE WASHBURN

FUNDAMENTO

Las células hemáticas se impregnan en una solución de bencidina. Ante el agregado de agua oxigenada aquellas que poseen la enzima desprenden oxígeno naciente del agua oxigenada y éste oxida la dencidina a un óxido intermedio color azul oscuro al principio que luego vira a negro. La reacción dentro de lineamientos escritos no difunden, de manera que es posible reconocer los lugares preciosos. Pueden hacerse a nivel óptico común o para microscopía electrónica. Para el primero se emplea el método de Washburn con catalizador metálico.

REACTIVOS

1. Bencidina base de buena calidad 300 mg.
Solución de nitro Prusiato de sodio 1 ml.

Alcohol etílico absoluto 99 ml.

Conservar en la oscuridad. Dura semanas pero es preferible la preparación extemporánea.

2. Agua destilada 10 ml.
- Agua oxigenada de 20 o 30 vol. 1 gota.

No debe usarse una concentración mayor porque produce una oxidación demasiado rápida de la bencidina y precipita el derivado azul como agujas.

DESARROLLO

1. Extendidos secos de cualquier tiempo de conservación, sin fijar.
2. Colocación en gradilla y cobertura con 10 gotas de la solución alcohólica de bencidina de 3 a 5 minutos. Durante esta etapa se produce la fijación del preparado y la impregnación de las células por la bencidina.
3. sin volcar se agragan 10 gotas de dilución de agua oxigenada mezclando por soplado a través de un apipeta. Se deja actuar 5 minutos.
4. Lavado con agua corriente y control microscópico del preparado aún húmedo. Si hubiera necesidad (es excepcional) se repiten los pasos 2 y 3 pasando directamente del segundo al tercero porque el preparado ya está fijado, se deja actuar de 2 a 3 minutos más.
5. Lavado en agua de canilla.
6. Coloración en Giemsa al 10 % durante 30 minutos.

METODOLOGÍA

Se organizarán equipos de tres integrantes los cuales llevarán a cabo la metodología descrita anteriormente, cada equipo contará con un microscopio en el cual podrá hacer las observaciones pertinentes, por otro lado el maestro contará con un CIRCUITO CERRADO DE TELEVISIÓN por medio del cual expondrá a los alumnos de manera clara las observaciones pertinentes y de esta manera complementar la información obtenida en las clases teóricas, cumpliendo con el proceso de enseñanza.

NOTA: cabe hacer notar que anteriormente se trabajó con equipos de hasta 8 personas lo que entorpecía el proceso enseñanza aprendizaje lo que se ha subsanado con la adquisición de material nuevo como microscopios de buena calidad y circuitos cerrados de microscopia y video.

RESULTADOS

Eritrocitos y su prominente: no reactivos. Granulocitos y su progenie: mieloblastos agranulares hasta 30% positivos; demás elementos: intensa positividad masiva hasta el granulocito maduro que aparece totalmente cubierto. El neutrófilo es siempre positivo en el 100%. El eosinófilo también pero el color es pardo amarillento en lugar de negro. El basófilo arroja positividad tipo neutrofilica en un 50% de elementos. Linfocitos y su progenie y plaquetas y su progenie negativos. Monocitos con positividad en gránulos dispersos.

PRÁCTICA No. 5
OBSERVACIÓN DE FROTIS DE SANGRE Y MÉDULA ÓSEA CON LEUCEMIA
MIELOIDE AGUDA; M4, M5, M6, M7

M4

BLASTOS SEMEJANTES A M1 Y M2
DE 20% DE PROMONOCITOS Y MONOCITOS
ABUNDANTES MONOBLASTOS
UNA POBLACIÓN CLORACETATO + Y OTRA INESPECÍFICA
EXISTE UNA VARIEDAD EOSINOFÍLICA SIN EOSINOFILIA PERIFÉRICA Y ANOMALIA
CROMOSÓMICA 16

M5

MONOBLASTOS EN UN80%
INFILTRACIÓN EXTRAHEMATOPOYÉTICA A ENCIAS, GANGLIOS Y SNC
TRASLOCACIÓN CROMOSÓMICA 9:11

- INDIFERENCIADA: CON MONOBLASTOS SUPERIORES AL 80%
DE TODAS LAS CÉLULAS CON CITOPLASMA ABUNDANTE,
OCASIONALMENTE PUEDE TENER CUERPOS DE AUER
- DIFERENCIADA: PROMONOCITOS Y MONOCITOS JUNTO CON
ALGUNOS PROMONOBLASTOS

M6

PROLIFERACIÓN LEUCÉMICA MIXTA DE SERIE MIELOBLÁSTICA Y ERITROBLÁSTICA,
CON ASPECTO MEGALOBLASTOIDE Y GIGANTISMO CELULAR
50% DE LAS CÉLULAS AFECTADAS SON ERITROBLASTOS
MIELOBLASTOS 30% o < DE LAS NO ERITROBLÁSTICAS
LA VARIANTE M6 ES UNA FORMA ESPECIALMENTE AGRESIVA DE LEUCEMIA AGUDA
NO LINFOBLÁSTICA Y CON ESCASA REMISIÓN.

M7

PROMEGACARIOBLASTOS
BLASTOS INDIFERENCIADOS
BLASTOS CON CITOPLASMA BASÓFILO
PROLONGACIONES CITOPLASMÁTICAS SEMEJANTES A PSEUDÓPODOS

METODOLOGÍA

Se organizarán equipos de tres integrantes los cuales llevarán a cabo la metodología descrita anteriormente, cada equipo contará con un microscopio en el cual podrá hacer las observaciones pertinentes, por otro lado el maestro contará con un CIRCUITO CERRADO DE TELEVISIÓN por medio del cual expondrá a los alumnos de manera clara las observaciones pertinentes y de esta manera complementar la información obtenida en las clases teóricas, cumpliendo con el proceso de enseñanza.

NOTA: cabe hacer notar que anteriormente se trabajó con equipos de hasta 8 personas lo que entorpecía el proceso enseñanza aprendizaje lo que se ha subsanado con la adquisición de material nuevo como microscopios de buena calidad y circuitos cerrados de microscopía y video.

PRÁCTICA No. 6 TINCIÓN DE PAS Y ESTERASAS PARA M4, M5, M6, M7 (SEMINARIO)

TINCIÓN DE PAS

FUNDAMENTO: La oxidación por ácido peryódico rompe la unión 1:2 glicol de la glucosa o de un derivado amino o alquilo sustituto. Por este mecanismo da origen a funciones aldehído revelables por el Schiff. En cambio, en el DNA el glicol está unido al diesterfosfórico, unión que existe la acción del ácido peryódico pero no la del HCL en caliente; de aquí la diferencia entre las reacciones de Feulgen y de PAS que emplean el mismo reactivo de Schiff como revelador de las mismas funciones, pero liberadas de diferente forma.

REACTIVOS

1. Schiff.
2. Solución de ácido peryódico.
3. IO₄H800mg.
Acetato de sodio al 2.7%.....10 ml.
Agua destilada.....100 ml.
4. Solución reductora
Hiposulfito de sodio3 g.
Yoduro de potasio3 g.
Alcohol etílico absoluto.....90ml.
Agua destilada60ml.
HCl N3ml.
5. Agua sulfurosa, como para el Feulgen.
6. Contracolor:
Opcional.
 - a) Verde de metilo depurado en cloroformo como se ha señalado.
 - b) Hemalumbre de mayer.

Ambos son adecuados. El verde de metilo es más contrastado por ser color complementario. El hemalumbre define mejor la morfología nuclear.

DESARROLLO:

1. Doble fijación de los preparados con alcohol etílico absoluto, 3 minutos en gradilla y luego 10 minutos en vapores de formol. Se obtiene una cámara correcta colocando un trozo de papel de filtro, gasa u algodón en la cara interna de la tapa de un borrel. El vaso cerrado se lleva a la estufa a 37 °C para favorecer el desprendimiento de vapores. La fijación debe ser primero alcohólica por que el glucógeno es hidrosoluble.
2. Lavado por inmersión en agua destilada.
3. Colocación en gradilla, se le cubre con la solución de ácido peryódico durante 5min. exactos. Fase crítica de la reacción; tiempo menor no rompe las uniones 1:2 glicol, mayor los oxida a COOH que no reacciona con el Schiff.
4. Volcar y cubrir con reductor exactamente 1min.
5. Lavar con agua destilada, secar el dorso.
6. Sumergir en Schiff durante 1hr.
7. Escurrir y pasar el agua sulfurosa como para Feulgen.
8. Enjuagar con agua destilada.
9. Controlar con verde de metilo o hemalumbre durante 5-10min.
10. Lavar rápidamente con agua común y secar en posición vertical. Observar bajo capa de aceite, con inmersión, se conserva indefinidamente, soporta xilol.

METODOLOGÍA

Se organizarán equipos de tres integrantes los cuales llevarán a cabo la metodología descrita anteriormente, cada equipo contará con un microscopio en el cual podrá hacer las observaciones pertinentes, por otro lado el maestro contará con un CIRCUITO CERRADO DE TELEVISIÓN por medio del cual expondrá a los alumnos de manera clara las observaciones pertinentes y de esta manera complementar la información obtenida en las clases teóricas, cumpliendo con el proceso de enseñanza.

NOTA: cabe hacer notar que anteriormente se trabajó con equipos de hasta 8 personas lo que entorpecía el proceso enseñanza aprendizaje lo que se ha subsanado con la adquisición de material nuevo como microscopios de buena calidad y circuitos cerrados de microscopia y video.

RESULTADOS: núcleos verdes, citoplasma que contenga hidratos de carbono (glucógeno, algunos mucopolisacáridos) rojo brillante
Puntaje o escorificación de la reacción PAS.

La progenie eritrocítica normalmente es negativa.

La granulocítica es positiva desde el mieloblasto en forma progresiva hasta el neutrófilo y el eosinófilo maduro, el basófilo puede ser PAS positivo o negativo, la progenie linfocítica normal es negativa en absoluto hasta llegar al linfocito en el que un 30% de los elementos es positivo en corona de gránulos y más raramente en forma difusa.

Los megacariocitos y plaquetas lo son en forma de bloques y gránulos, las células plasmáticas muestran PAS con una positividad discreta difusa. El puntaje en los neutrófilos sigue la regla general ya señalada antes.

ESTEREASAS

Son enzimas que hidrolizan los ésteres simples de alcoholes de cadena corta. Se denomina lipasas las que lo hacen con alcoholes de cadena larga. No hay línea divisoria franca entre ambas.

Nachlas y Seligmann publicaron en 1949 un método para la demostración de las estereasas basado en el empleo de alfa naftil acetato como sustrato sugerido por Gomori. El mecanismo de acción es el mismo de copulación azoica descrito para el Menten- Kaplow usado para las fosfatasas.

MÉTODO DEL ALFA NAFTIL ACETATO (NACHLAS Y SELIMANN)

REACTIVOS

1. Sustrato revelador:
Alfa naftil acetato 20 mg.
Acetato purísima 0.25 mg.
Buffer de fosfos 0.1 M, pH 7.4 20 ml.
Fast Blue BB salto o Fast Garnett GBC 20 mg.
2. Solución verde de metilo o hemalumbre de Mayer.

RELACION ESTEREASA- SUSTRATO

	Eritrocitos y progenie	Granulocitos y progenie	Linfocitos y progenie	Plaquetas y progenie	Monocitos y progenie
Alfa naftil acetato o butirato	Negativa Intensamente positiva en los eritroblastos de la eritroleucemia y en anemias megaloblásticas	Negativa o con algunos gránulos. Fluoruro resistente.	L. T. Fuertemente positivos con uno o más grumos intensos a pH 6. L. B. Negativos. L, Null leve positividad pulverulenta.	Positividad intensa con naftil acetato	Intensamente positivos. Fluoruro sensibles.
Alfa naftil AS-D cloroacetato.	Negativa. En E. L. Puede ser discretamente positiva.	Positiva (bastones de Auer positivos).	Positiva la banda 2	Negativa	Positividad ligera a discreta.

DESARROLLO

1. Fijar 3 minutos en vapores de formol. El envase se saturará antes con vapores.
2. Lavar en agua destilada.
3. Sumergir son sustrato revelador; incubar en estufa a 37°C 30 minutos.
4. Lavar rápidamente por inmersión en agua destilada.
5. Contracolorar durante 5- 10 minutos.
6. Lacar ligeramente, secar, examinar con inmersión acuosa o aceitosa según se deseen conservar o no los preparados.
- 7.

METODOLOGÍA

Se organizarán equipos de tres integrantes los cuales llevarán a cabo la metodología descrita anteriormente, cada equipo contará con un microscopio en el cual podrá hacer las observaciones pertinentes, por otro lado el maestro contará con un CIRCUITO CERRADO DE TELEVISIÓN por medio del cual expondrá a los alumnos de manera clara las observaciones pertinentes y de esta manera complementar la información obtenida en las clases teóricas, cumpliendo con el proceso de enseñanza.

NOTA: cabe hacer notar que anteriormente se trabajó con equipos de hasta 8 personas lo que entorpecía el proceso enseñanza aprendizaje lo que se ha subsanado con la adquisición de material nuevo como microscopios de buena calidad y circuitos cerrados de microscopia y video.

RESULTADOS

Granulación azul con el Fast Blue; roja con el Fast Garnett.

PRÁCTICA No. 7
OBSERVACIÓN DE FROTIS DE SANGRE Y MÉDULA ÓSEA CON LEUCEMIA
LINFOIDE AGUDA: L1, L2 Y L3

TABLA No.1: LEUCEMIAS AGUDAS LINFOBLÁSTICAS

CRITERIOS	HISTOQUÍMICA
L1	PAS +
L2	PAS +
L3	PAS + ROJO AL ACEITE +

TABLA No. 2: LEUCEMIAS CRÓNICAS LINFOIDES Y MIELOIDES

CRITERIOS	CITOQUÍMICA	INMUNOFENOTIPO	CITOGÉNÉTICA
LLC	FOSFATASA ÁCIDA +	CD 5, 43, 23	+12 del 13q14,6q- 11q+; 14q+
LPL	FOSFATASA ÁCIDA +	IgS, CD 43, 22 FMC7	t(11:14)
TRICOLEUCEMIA	FOSFATASA ÁCIDA RESISTENTE AL TARTRATO +	IgS CD 43, 22, 25, FMC7, CD 103, CD11c	HC2 +; +5
LGC	DISMINUIDA FOSFATASA ALCALINA	CD 16	t(9:22)

TABLA No.3: CLASIFICACIÓN DE LAS LEUCEMIAS AGUDAS
LINFOBLÁSTICAS DE LÍNEA B

FENOTIPO	CD 19	CD 22c	CD 10	clg-u	slg	TdT
B PRECOZ (PRO-B)	+	+	-	-	-	+
B COMÚN	+	+	+	-	-	+
PRE-B	+	+	+	+	-	+
B	+	+	+/-	-	+	+/-

TABLA No. 4: CITIGÉNÉTICA DE LAS LEUCEMIAS AGUDAS LINFOBLÁSTICAS
DE LA LÍNEA B

t(9:22)
t(1:19)
t(4:11)
t(12:21)

NOTA: EN LA CITOGÉNÉTICA EL CROMOSOMA
PHYLADELPHIA PUEDE SER POSITIVO SI LA
PROTEÍNA AFECTADA ES LA 190

TABLA No. 5: CLASIFICACIÓN INMUNOLÓGICA DE LAS LEUCEMIAS

LINFOBLÁSTICAS DE LÍNEA T

FENOTIPO	TDT	CD7	CD3c	CD2	CD3s	CD1	CD4	CD8
PRE T	+	-	+	-	-	-	-	-
TIMOCITOS:								
PRECOZ	+	+	+	+	-	-	-	-
CORTICAL	+	+	+	+	-	+	+	+
MEDULAR	+	+	+	+	+	-	+/-	0 +/-

**TABLA No. 6: CITOGENÉTICA DE LAS LEUCEMIAS AGUDAS
 LINFOBLÁSTICAS DE LÍNEA T.**

t(11:14)
t(1:14)
t(10:14)
TAL 1 del

**NOTA: EN LA CITOGENÉTICA DE LA LGC EL CROMOSOMA
 PHYLADELPHIA ES POSITIVO SI LA PROTEÍNA
 ALTERADA ES LA 210**

METODOLOGÍA

Se organizarán equipos de tres integrantes los cuales llevarán a cabo la metodología descrita anteriormente, cada equipo contará con un microscopio en el cual podrá hacer las observaciones pertinentes, por otro lado el maestro contará con un CIRCUITO CERRADO DE TELEVISIÓN por medio del cual expondrá a los alumnos de manera clara las observaciones pertinentes y de esta manera complementar la información obtenida en las clases teóricas, cumpliendo con el proceso de enseñanza.

NOTA: cabe hacer notar que anteriormente se trabajó con equipos de hasta 8 personas lo que entorpecía el proceso enseñanza aprendizaje lo que se ha subsanado con la adquisición de material nuevo como microscopios de buena calidad y circuitos cerrados de microscopia y video.

PRÁCTICA No. 8

OBSERVACIÓN DE FROTIS DE SANGRE Y MÉDULA ÓSEA: LEUCEMIAS CRÓNICAS LGC, LLC, PROLINFOCÍTICA

LEUCEMIAS CRÓNICAS

Las leucemias crónicas de origen mielóide son aquellas que afectan a las células granulopoyéticas de la médula ósea, y presentan un comienzo solapado. La fase inicial representa una producción excesiva de elementos maduros, derivados de las células elementales mieloides. Estudios enzimáticos, genéticos y de biología molecular han puesto de manifiesto que son enfermedades clonales. La fase terminal de la enfermedad consiste en la progresión a una fase menos diferenciada o blástica. A menudo el diagnóstico se hace durante un examen de rutina por signos inespecíficos como pérdida de peso y debilidad. Las leucemias crónicas progresan con lentitud. La prevalencia de las leucemias crónicas en México es similar a la observada en otras poblaciones; sin embargo, se ha señalado que la exposición a productos agrícolas derivados del benceno podría tener relación con esta alteración. Las leucemias crónicas de importancia en México son tres: Linfocítica, mielocítica y de células peludas o tricoleucemia, su curso indolente, larga evolución y ausencia de células muy indiferenciadas las distingue de las leucemias agudas.

Los distintos tipos de leucemias crónicas de origen mielóide muestran importantes diferencias en cuanto a pronóstico y respuesta al tratamiento, por lo que un diagnóstico correcto tiene gran importancia clínica. Las similitudes morfológicas que en ocasiones existen entre algunos de estos cuadros han planteado problemas de diagnóstico diferencial, lo que indujo al grupo FAB a establecer algunas guías útiles para su diagnóstico. Aunque las leucemias crónicas se han clasificado con frecuencia como un grupo distinto de trastornos hematopoyéticos, se han agrupado también con otros trastornos neoplásicos crónicos de las células precursoras.

Las leucemias mieloides crónicas representan aproximadamente 20% de todas las leucemias. El paso de leucemia mielóide crónica a fase blástica en un estudio reciente en nuestro país nos reveló, que la crisis mielóide se presenta en 53%, la linfóide con 35%, e híbridas de linaje mixto 12%.

En las leucemias granulocíticas crónicas hay un deterioro de la función granulocítica lo que explica las infecciones que presentan estos pacientes. Tiene una marcada proliferación de células mieloides maduras, e invariablemente progresa a fase terminal o blástica. El cromosoma Ph (Philadelphia) se encuentra aproximadamente en 90% de los sujetos con leucemia mielóide crónica, el arreglo BCR-ABL (gen híbrido) es detectable por el examen Southern blot. El evento que ocasiona el progreso a fase blástica no es conocida aún. La crisis blástica medular acontece en el 60-90% y la extramedular en un 10%.

El interferón alfa humano recombinante, combinado con quimioterapia suprime la clona portadora del cromosoma Philadelphia en leucemia mielóide crónica, de este modo se puede retrasar la presencia de crisis blástica y alargar la supervivencia.

En la leucemia Mielomonoblástica Crónica se presenta una monocitosis y un incremento en los granulocitos maduros, esta concuerda con los síndromes mielodisplásicos ya que presenta personalidad propia.

En la leucemia granulocítica crónica algunos casos de infiltración blástica a piel con una incidencia de 10% a 20% en todas las leucemias. Se presentan como placas nodulares e hiperpigmentación en tronco. También en la leucemia aguda mielóide M3 puede existir un hallazgo de células blásticas a piel, aunque los subtipos M4 y M5 son más frecuentes.

Una investigación realizada en dos estados del noreste, en dos del sureste, y en dos del centro del país nos reveló que el mayor riesgo ocurre en los estados del norte, se especula que es consecuencia de la exposición a solventes en agricultores y trabajadores forestales.

La frecuencia con se presentan las neoplasias malignas en los niños depende del país en que se estudie. En los países latinoamericanos, se comprobó que las leucemias se encuentran ocupando el primer lugar con el 30% y 33%, el segundo lugar los linfomas con 15-20%, seguidos de tumores del Sistema Nervioso Central entre 8% y 15%.

También se ha encontrado que los pacientes con neoplasias se aísla en un 70% gérmenes Gram (+) como Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes, Streptococcus pneumoniae. Los hongos aislados con frecuencia son: Candida sp, Aspergillus sp, Cryptococcus y Mucor sp. En los últimos años se han observado grandes avances en el manejo de las complicaciones infecciosas y bacterianas.

En el trasplante de médula ósea las causas más frecuentes de mortalidad son: injerto contra huésped, sepsis por Candida, Streptococcus virisans, Neumococcus, entre otros.

Las leucemias tienen una mayor probabilidad en el curso de algunas enfermedades como: Macroglobulinemia de Waldstrom, Hodgkin, Anemia hemolítica autoinmune, Trombocitemia Esencial, SIDA, Síndrome de Down. Dentro de algunos casos raros se presentaron leucemias linfocíticas agudas hipergranulares la cual es rara en mestizos mexicanos, la necrosis de médula ósea en pacientes con leucemia aguda, en periodo de recaída y después del empleo de quimioterapia. También se ha presentado que en tratamiento de una leucemia linfoblástica aguda L3 desarrolló una leucemia linfoblástica L1 y a la remisión completa, presentó una nueva recaída L3. En un estudio multicéntrico en México de 1991 a 1995 se detectaron 2416 pacientes adultos con hemopatías de los cuales 1968 presentaban alguna forma de leucemia.

Posteriormente en 1996 se reunieron diversas organizaciones académicas y científicas iniciaron esfuerzos para armonizar la tecnología, indicaciones, metodología e interpretación de la tipificación de las leucemias, solo pudieron establecer consenso en cuanto a las indicaciones médicas del procedimiento, considerando los aspectos clínico práctico se aceptó que estrictamente deben cumplirse únicamente dos objetivos.

Establecer la línea celular la línea celular y definir su grado de inmadurez, merece destacar que estas recomendaciones no deben considerarse como limitantes en cuanto al empleo de anticuerpos adicionales para subclasificar a las células leucémicas. Para definir las se determinó que deben emplearse, redundantemente, dos anticuerpos para la leucemia aguda linfoblástica B, dos para leucemia aguda linfoblástica T, y tres para leucemias agudas mieloblásticas. Para definir el grado de inmadurez, se consideró de utilidad el empleo de 2 ó 3 anticuerpos más, como se muestra en la tabla N° 5.

PROPÓSITO	LAL B	LAL T	LAM
DEFINIR LÍNEA	CD 79a/CD 19	CD 3c/CD 7	MPO c/CD 13,33
MADURACIÓN	CD 34/TdT	CD 34/TdT	CD 34/CD 15/HLADR

METODOLOGÍA

Se organizarán equipos de tres integrantes los cuales llevarán a cabo la metodología descrita anteriormente, cada equipo contará con un microscopio en el cual podrá hacer las observaciones pertinentes, por otro lado el maestro contará con un CIRCUITO CERRADO

DE TELEVISIÓN por medio del cual expondrá a los alumnos de manera clara las observaciones pertinentes y de esta manera complementar la información obtenida en las clases teóricas, cumpliendo con el proceso de enseñanza.

NOTA: cabe hacer notar que anteriormente se trabajó con equipos de hasta 8 personas lo que entorpecía el proceso enseñanza aprendizaje lo que se ha subsanado con la adquisición de material nuevo como microscopios de buena calidad y circuitos cerrados de microscopia y video.

PRÁCTICA No. 9 TINCIÓN DE FOSFATASA ALCALINA A FROTIS DE SANGRE CON LGC (SEMINARIO)

FOSFATASA ALCALINA

Método de Menten- Kaplow

Es una fosfomonoestereasa que como su nombre lo indica es activa a pH francamente alcalino. Para su revelación se emplea pH 9. en reemplazo de los componentes del método original de Menten- Kaplow se utiliza una solución al 6% de dietilbarbiturato de sodio (veronal sódico) para obtenerlo.

Es la enzima marcadora de la granulación B, neutrofilia, específica de Bagglioni, y la que primero entra en el fagosoma en el proceso de degranulación que forma parte de la bactericida, precediendo en algunos minutos a la peroxidasa.

REACTIVOS

1. Solución sustrato (preparación extemporanea).
Alfa naftil fosfato ácido de sodio
(usar la sal blanca), cuando se
oxida a rosado debe purificarse..... 30 mg.
Fast Blue RR (sal de diazonio) 30 mg.
Solución de veronal sódico pH 9 60 ml.

Puede aumentarse a 50 mg cada una si hay baja reactividad de droga.
2. Solución de veronal sódico.
Veronal sódico 6 g.
Agua destilada 100 ml.
Controlar pH debe ser 9 o superior. Es suficiente con papel.
3. Fijador.
Etanol absoluto 90 ml.
Formol (solución comercial al 40%) 10 ml.
Enfriar entre 5 y 0°C.
4. Verde de metilo o hemalumbre de Mayer.

DESARROLLO

1. en el fijador enfriado entre 0 y 5 °C se introducen extendidos secos de pocas horas de obtención o de lo contrario mantenidos en heladera en desecador. Se dejan reposar entre 30 segundos y 1 minuto.
2. Lavar con agua destilada.
3. Introducir en la solución sustrato previamente llenada en baño o estufa a 37oC controlados con un termómetro colocado en el borrel que la contiene. Siempre debe agregarse un preparado testigo adosado al problema en todas las etapas. Permanencia 15 minutos.
4. Lavar con agua destilada y aún húmedos observar el desarrollo de la reacción al microscopio con aumentos mediano y fuerte (x40) con objetivo seco.

5. Colorear en gradilla con verde de metilo o hemalumbre de Mayer durante 5 o 10 minutos.
6. Lavado rápido, secado en posición vertical y observación microscópica con inmersión acuosa cuando se desea conservar el preparado u oleosa cuando es descartable. En el primer caso, luego de retirado el cubreobjetos y secado el extendido se lo envuelve en papel absorbente y se lo guarda en desecador en la heladera.

METODOLOGÍA

Se organizarán equipos de tres integrantes los cuales llevarán a cabo la metodología descrita anteriormente, cada equipo contará con un microscopio en el cual podrá hacer las observaciones pertinentes, por otro lado el maestro contará con un CIRCUITO CERRADO DE TELEVISIÓN por medio del cual expondrá a los alumnos de manera clara las observaciones pertinentes y de esta manera complementar la información obtenida en las clases teóricas, cumpliendo con el proceso de enseñanza.

NOTA: cabe hacer notar que anteriormente se trabajó con equipos de hasta 8 personas lo que entorpecía el proceso enseñanza aprendizaje lo que se ha subsanado con la adquisición de material nuevo como microscopios de buena calidad y circuitos cerrados de microscopia y video.

RESULTADO

Como esta reacción es de la máxima trascendencia para el diagnóstico diferencial entre la leucemia mielóide crónica y la reacción leucemioide, especificaremos los conceptos.

Solamente un 30% de neutrófilos dan positiva esta reacción a la microscopia común con la electrónica el 100% es positiva y la positividad se remonta hasta el mielocito inmaduro coincidiendo con la aparición de la granulación específica y aumentando en los estadios posteriores.

El grado 0 no muestra reacción, pero sí leve coloración citoplasmática amarillenta, similar a los de los hematíes que lo rodean. Se debe a que el sustrato actúan en grado leve como colorante inespecífico, transmitiendo el tinte de la mezcla a las células del frotis. Es decir que ante un citoplasma leucocitario ligeramente coloreado hay que descontar de dicha coloración el tinte que presentan los hematíes próximos.

El grado 1 presenta una coloración difusa o con micropuntuaciones de color pardo megruzco.

El grado 2 a los caracteres señalados agrega mayor densidad a la puntuación cromática en una zona, por lo general en el pseudo hilio que forman los lóbulos nucleares.

El grado 3 se caracteriza porque la granulación oscura es mayor y cubre todo el citoplasma.

El grado 4 es un neutrófilo transformado en una mancha negra de la cual resaltan por la negatividad los lóbulos nucleares teñidos por el verde de metilo. La diferencia es menos conspicua usando hematoxilina.

PRÁCTICA No. 10
TINCIÓN DE FOSFATASA ÁCIDA EN FROTIS DE SANGRE CON LLA, MIELOMA
MÚLTIPLE Y LINFOMAS HOGDKIN Y NO HOGDKIN (SEMINARIO)

FOSFATASA ÁCIDA

MÉTODO DE LOEFFLER Y BERGHOFF

FUNDAMENTO

Son los mismos que para la alcalina, a pH ácido, y reemplazando el Fast Blue RR por el Fast Garnett GBC en razón del tipo excesivamente grosero de los gránulos del primer azocolorante en pH ácido.

REACTIVOS

1. Fijador:
Acetona purísima 60 ml.
Agua destilada 40 ml.
2. Buffer de Michaelis, veronal acetato, a pH entre 4.5 y 6.2
Acetato de sodio 9.714 g.
Veronal 14.514 g.
Agua destilada 500 ml.
3. Solución sustrato.
Alfa naftil fosfato ácido de sodio 30 ml.
Brentamine Fast Garnett BGC 30 ml.
Buffer pH 4.5- 6.2 60 ml.
Puede elevarse hasta 50 mg si es necesario.
4. Solución verde de metilo o hemalumbre de Meyer.

DESARROLLO

1. Preparados con las mismas características de conservación que para la fosfatasa alcalina. Inmersión en el fijador entre 0 y 5°C durante 30 segundos a 1 minuto.
2. Lavado con agua destilada.
3. Inmersión en la solución sustrato en estufa a 37°C durante 1 hora, con testigo tratado igual, dorso con dorso.
4. Controlar al microscopio el preparado húmedo con aumento fuerte a seco (x400).
5. Lavado con agua destilada.
6. Contracolor con verde de metilo o hemalumbre de Mayer. Secar en posición vertical y observar. Si se desea conservar los preparados rigen las mismas consideraciones que para la fosfatasa alcalina.

METODOLOGÍA

Se organizarán equipos de tres integrantes los cuales llevarán a cabo la metodología descrita anteriormente, cada equipo contará con un microscopio en el cual podrá hacer las observaciones pertinentes, por otro lado el maestro contará con un CIRCUITO CERRADO DE TELEVISIÓN por medio del cual expondrá a los alumnos de manera clara las

observaciones pertinentes y de esta manera complementar la información obtenida en las clases teóricas, cumpliendo con el proceso de enseñanza.

NOTA: cabe hacer notar que anteriormente se trabajó con equipos de hasta 8 personas lo que entorpecía el proceso enseñanza aprendizaje lo que se ha subsanado con la adquisición de material nuevo como microscopios de buena calidad y circuitos cerrados de microscopia y video.

RESULTADOS

Excepto los eritrocitos todos los demás elementos figurados inclusive las plaquetas son positivos. La determinación osienzimática paralela permite una interpretación discriminativa de la positividad, según se ha dicho. De los granulocitos, el eosinófilo es el más intensamente positivo. Los linfocitos T muestran alta positividad y notablemente menor y aún ausente los B. Pero son los monocitos lo elementos más violentamente positivos del extendido. Las respectivas progenies son más intensamente positivas que los elementos maduros. Esto rige también en los casos patológicos.

También son violentamente positivas las del mieloma (con un antigado llamativo). En cambio, si bien son también positivas las células de Sternberg de la enfermedad de Hodking, no lo son tanto como las demás. Las del reticulosarcoma (linfoma histiocitario) son notoriamente más positivas que las de linfosarcoma (hoy llamado linfoma linfocítico de células diferenciadas o indiferenciadas). Grignaschi y Col. Han efectuado el puntaje de los elementos de la sangre periférica empleando el mismo criterio que para la fosfatasa alcalina.

Los resultados son los siguientes:

Neutrófilos	90.9+/- 13.45
Eosinófilos	339.6 +/- 9.96
Basófilos	No efectuado
Linfocitos	66.5 +/- 24.86
Monocitos	325 +/- 24.45
Plaquetas	Positivas.

PRÁCTICA No. 11 CONTEO DEL NÚMERO DE PLAQUETAS Y OBSERVACIÓN DE FROTIS CON TROMBOCITOPENIA

INTRODUCCIÓN:

TROMBOCITOPENIAS PRIMARIAS: En este grupo no es conocida la causa de la disminución de las plaquetas en la sangre circulante. La entidad que representa a las formas primarias es la púrpura trombocitopénica idiopática o enfermedad de Werhof.

Es afección frecuente que puede aparecer en todas las edades, aunque con predilección para niños y jóvenes y predominio en el sexo femenino. No tiene carácter hereditario. Aunque su causa no es conocida, es probable que se trate de una reacción inmunológica antígeno-anticuerpo, que disminuye la vida media, siendo el papel del bazo importante pero no exclusivo en la génesis del proceso, destruyendo las plaquetas previamente afectadas.

Sus manifestaciones clínicas (petequias, equimosis, epistaxis, gingivorrágias, gastrorragias, melenas y hematuria, etc) pueden presentarse de forma aguda (comienzo brusco en niños, tras un proceso infeccioso) o crónico (evolución con crisis de exacerbación y mejoría en adultos jóvenes). No suele estar aumentado el volumen del bazo.

La cifra de plaquetas está disminuida (menos de 30,000/mm³) el tiempo de hemorragia se encuentra prolongado y la prueba del lazo es positiva.

El número de megacariocitos está aumentado en la médula ósea con alteraciones en su proceso de maduración.

TROMBOCITOPENIAS SECUNDARIAS: son también llamadas sintomáticas puesto que aparecen como epifenómenos en distintas intoxicaciones y enfermedades.

- a. **TROMBOCITOPENIAS SECUNDARIAS AMEGACARIOCÍTICAS:** en las que la causa actúa a nivel de los megacariocitos progenitores de las plaquetas.
- b. **TROMBOCITOPENIAS SECUNDARIAS MEGACARIOCÍTICAS:** con acción periférica de la causa responsable, actuando sobre las plaquetas circulantes.

LAS TROMBOCITOPENIAS AMEGACARIOCÍTICAS: con destrucción o inhibición funcional de los megacariocitos, pueden producirse por depresión de la médula ósea de origen infeccioso, tóxico, radiactivo, neofornativo, hipoplásico, aplásico o mieloesclerótico. En estos casos, la enfermedad suele encuadrarse dentro de una panhemocitopenia.

LAS TROMBOCITOPENIAS MEGACARIOCÍTICAS: se producen por el contacto con un agente externo con el consiguiente choque de sensibilización en el paciente. Este agente puede ser medicamentoso (sedormid, barbitúricos, meprobamato, quinina, piramidón, sulfamidas, estreptomycin, quinidina, tolbutamida, clorotiacida, etc).

LAS TROMBOCITOPENIAS DEL HIPERESPLENISMO: son probablemente mixtas, ya que el aumento de la función esplénica (en la hipertensión portal, en las infecciones crónicas, en las trombosis de la vena esplénica, etc) si bien inhibe la función de los megacariocitos en la médula ósea, también destruye más plaquetas de la sangre circulante, secuestradas en el bazo.

METODOLOGÍA

Se organizarán equipos de tres integrantes los cuales llevarán a cabo la metodología descrita anteriormente, cada equipo contará con un microscopio en el cual podrá hacer las observaciones pertinentes, por otro lado el maestro contará con un CIRCUITO CERRADO DE TELEVISIÓN por medio del cual expondrá a los alumnos de manera clara las observaciones pertinentes y de esta manera complementar la información obtenida en las clases teóricas, cumpliendo con el proceso de enseñanza.

NOTA: cabe hacer notar que anteriormente se trabajó con equipos de hasta 8 personas lo que entorpecía el proceso enseñanza aprendizaje lo que se ha subsanado con la adquisición de material nuevo como microscopios de buena calidad y circuitos cerrados de microscopia y video.

PRÁCTICA No. 12 OBSERVACIÓN DE FROTIS SANGUÍNEOS CON TROMBOCITOSIS

INTRODUCCIÓN

TROMBOCITOSIS: el aumento del número de plaquetas puede ser fugaz o transitorio y, en este caso, conviene utilizar el término de trombocitosis. Este aumento debe de superar la cifra de 500,000/mm³. Se presenta como reacciones sintomáticas a otros procesos; infecciones, hemorragias, carcinoma, tuberculosis esplénica y, sobre todo, después de una esplenectomía. Estas trombocitosis no suelen producir fenómenos hemorrágicos.

TROMBOCITEMIAS: Cuando el aumento del número de las plaquetas se presenta con carácter indefinido, usaremos el término de trombocitemias.

Las trombocitemias pueden asociadas a otras hemopatías, tales como la policitemia vera, la leucemia mieloide crónica, la osteomielorreticulosis y la enfermedad de Hodgkin.

Las formas esenciales de la trombocitemia son dos: la trombocitemia esencial hemorrágica y la trombocitemia esplenomegálica no hemorrágica. Desde el punto de vista quirúrgico tiene gran interés conocer que una afección que curse con aumento de la cifra de sus plaquetas puede producir graves hemorragias

Los fenómenos hemorrágicos de la trombocitemia esencial pueden ser espontáneos o provocados por traumatismos accidentales y quirúrgicos. Las hemorragias cutáneas se presentan en forma de amplias equimosis.

METODOLOGÍA

Se organizarán equipos de tres integrantes los cuales llevarán a cabo la metodología descrita anteriormente, cada equipo contará con un microscopio en el cual podrá hacer las observaciones pertinentes, por otro lado el maestro contará con un CIRCUITO CERRADO DE TELEVISIÓN por medio del cual expondrá a los alumnos de manera clara las observaciones pertinentes y de esta manera complementar la información obtenida en las clases teóricas, cumpliendo con el proceso de enseñanza.

NOTA: cabe hacer notar que anteriormente se trabajó con equipos de hasta 8 personas lo que entorpecía el proceso enseñanza aprendizaje lo que se ha subsanado con la adquisición de material nuevo como microscopios de buena calidad y circuitos cerrados de microscopía y video.

Questionarios

Práctica no. 1

1. ¿morfológicamente como se presenta un eosinófilo en el recuento diferencial?
2. ¿en el recuento diferencial como diferencia un eosinófilo de un basófilo?
3. ¿como se observan los eritrocitos en una anemia ferropénica
4. Que cambios presentan los linfocitos reactivos respecto a uno no reactivo?
5. ¿que es un policito?
6. ¿como se observan las granulaciones tóxicas en los neutrófilos?
7. ¿cuantas divisiones presenta normalmente un neutrófilo?
8. ¿cual es el número normal en conteo relativo de los linfocitos?
9. ¿que es una neutrofilia?
10. ¿cual es el número absoluto de eosinófilos en un conteo de leucocitos?

Práctica no. 2

1. ¿cual es la relación mieloide/eritroide en médula ósea normal?
2. ¿como se observa una hiperplasia eritroide?
3. ¿que significa un aumento >del 5% de los eosinófilos en médula ósea?
4. ¿es normal encontrar eritrocitos maduros en aspirados de médula ósea?
5. ¿como se presentan los cambios en tamaño en la serie roja de acuerdo a su linea de maduración?
6. ¿de la serie roja cuales son las etapas madurativas que se presentan con mayor frecuencia en médula ósea?
7. ¿como selecciona una zona ideal del extendido para una correcta observación?
8. ¿indique las causas de error en la interpretación microscópica de la médula ósea?
9. ¿como diferencia un eritroblasto ortocromático de un policromático?
10. ¿cuales la serie linfoide más abundante en médula ósea?

Práctica no. 3

1. ¿que porcentaje de blastos presenta una lam1?
2. ¿que características presenta el núcleo de las células involucradas en una lam1?
3. ¿en que etapa de maduración se encuentra la célula representativa de una lam 2?
4. ¿cual es el porcentaje aproximado de blastos en una lam2?
5. ¿morfológicamente como se observan los cuerpos de auer en una lam3?
6. ¿en una lam1 cuantos nucleolos exhiben las células involucradas?
7. ¿que son los cuerpos de Auer?
8. ¿como se presentan las plaquetas en forma cualitativa en una lam3?
9. ¿como se observan los eritrocitos en una lam2?
10. ¿como se observa un pseudo Pelyer-Huet en la lam2?

Práctica no. 4

1. ¿como se observa una positividad grado 1 en un examen citoquímico?
2. ¿de que color se tiñen los núcleos con azul de toluidina?
3. ¿cual es la utilidad de la tinción de Pearls?
4. ¿como se observan los eritrocitos teñidos con sudan negro?
5. ¿como se observan los linfocitos teñidos con sudan negro?
6. ¿cual la utilidad de la tinción con sudan negro?
7. ¿cual es la utilidad de la tinción de peroxidasa?
8. ¿como se presentan los basófilos teñidos con peroxidasa?
9. ¿como se presenta el eosinófilo teñido con peroxidasa?
10. ¿que positividad presentan los monocitos teñidos con peroxidasa?

Práctica no. 5

1. ¿que aspecto presentan los promegacarioblastos en la lam7?
2. ¿en cuanto al tamaño que características presenta la serie eritroide en la m6?
3. ¿en cuanto a la proporción de células, cuales son más abundantes las eitroides o las mieloides?
4. ¿en una lam5 indiferenciada cual es la célula involucrada?
5. ¿como diferencia un monocito de un promonocito en la lam4?
6. ¿que diferencia un monoblasto de un monocito?
7. ¿como diferencia morfológicamente una lam 4 de una lam 5?
8. ¿cuantos nucleolos exhiben los monoblastos?
9. ¿que aspecto presenta el citoplasma de los promegacarioblastos?
10. ¿que diferencia existe entre una leucemia aguda y una crónica en cuanto a la maduración celular?

BIBLIOGRAFÍA

1. Casas A., Salve M. L., Amich S., Laboratorio Clínico de Hematología; Primera edición; Ed. Interamericana-Mc Graw Hill, 1994.
2. Mckenzie Shirly B; Hematología clínica; Segunda reimpresión de la primera edición; Ed. Manual moderno; 1994.
3. Ruíz A. G. J.; Fundamentos de Hematología; Segunda edición; Ed. Panamericana; 1998.
4. Grignaschi U. J.; Diagnóstico citológico de las hemopatías; Ed. Médica Panamericana; Madrid España 1991.
5. Dr. Joaquín Carrillo Farga; Atlas de Hematología; Ed. Scientyc; 1995.