

### FECHA DE DEVOLUCION

El último sello marca la fecha tope para ser devuelto este libro. ~~40-~~  
 El lector pagará \$5.00 pesos por cada día que pase una semana después del vencimiento.

~~4 NOV. 1985~~

~~24 ABR. 1986~~

~~7 MAYO 1986~~

~~8 FEB. 1987~~

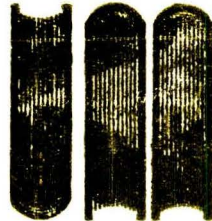
~~27 ABR. 1987~~

~~14 ABR. 1988~~

UNIVERSIDAD DE MONTERREY  
 VENCIMIENTO  
 OCT. 19 1996  
 BIBLIOTECA

BIBLIOTECA  
 VENCIMIENTO  
 OCT. 14 1992  
 BIBLIOTECA  
 UNIVERSIDAD DE MONTERREY

UNIVERSIDAD DE MONTERREY  
DIVISION DE CIENCIAS NATURALES  
Y EXACTAS



UNIVERSIDAD  
DE MONTERREY

*Clasif.*  
040.54  
P438ea  
1985  
c.1

*Título*  
ESTANDARIZACION DE VARIOS METODOS  
CITOLOGICOS ESPECIFICOS EN EL DIAGNOSTICO  
DE LEUCEMIAS.

REPORTE DEL PROGRAMA DE  
EVALUACION FINAL  
PRESENTADO POR

*Autas*  
MA. DEL CARMEN PEREZ GONZALEZ

EN OPCION AL TITULO DE  
LIC. QUIMICO CON ESPECIALIDAD  
EN ANALISIS CLINICOS

*Vo. Bo.*  
*A. Jaramilla*

900448

MONTERREY, N. L.

MAYO DE 1985

BIBLIOTECA  
UNIVERSIDAD DE MONTERREY

## I N D I C E

	Página
Introducción .....	1
Materiales y Métodos .....	18
Resultados .....	26
Discusión y Conclusiones .....	40
Resumen .....	44
Bibliografía .....	45

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

La leucemia es una enfermedad que se caracteriza por una proliferación o acumulación neoplásica de células leucopoyéticas que pueden o no invadir la sangre periférica.(1).

Esta enfermedad ha afectado al hombre desde hace muchos años, por lo que médicos e investigadores han dedicado su vida a la búsqueda de de la causa o del agente etiológico de esta alteración.

Cuando aun no se conocían los componentes celulares sanguíneos, a las células que se presentaban en esta enfermedad se les conocía como células de pus, pero a medida que se desarrolló la tecnología microscópica los investigadores identificaron las células de leucemia.

Fu  Vrichow en 1845 quien al observar que las células afectadas eran leucocitos, introdujo el término de leucemia, la cual fué desde entonces considerada como una entidad clínica independiente.

En 1857 Friedreich describió la leucemia aguda, pero solo consideró a la de tipo linfocítico, denominándose como leucemia mixta a la que contenía elementos no granulados a la par que granulocitos. En 1900 Naegeli describió la morfología del mieloblasto haciéndose posible la diferenciación entre la leucemia linfocítica y la leucemia mielocítica. En 1913 Reschad-Torgay dieron a conocer un caso de leucemia monocítica, pero debido a la baja frecuencia que presenta no fué posible que siguieran con su investigación.(2, 3).

En 1951 Dameshek cre  el término de síndrome mieloproliferativo para designar un grupo de enfermedades o síndromes que parecían debidos a la alteración de la médula ósea..

La leucemia es un trastorno de este tipo, en el pasado se hacían - clasificaciones de las leucemias de acuerdo a ciertas caracter sticicas de la enfermedad, el tipo de célula predominante, el avance natural de la enfermedad, etc.

En 1976 se integr  un grupo de expertos hematólogos de Europa y Estados Unidos con el objeto de establecer una designación uniforme de las leucemias agudas y el acuerdo al que se llegó originó la - clasificación actual que se conoce con las siglas de FAB (Franco-Americano-Británica).

El resultado de la clasificación establece dos grupos principales: leucemia linfoblástica aguda y leucemia mieloblástica aguda (Ver cuadros No. 1 y 3).

Los hematólogos expertos (FAB) hicieron la clasificación de las leucemias linfoblásticas agudas basandose en características morfológicas de las células involucradas como se muestra en el cuadro No. 2. Estas características fueron discutidas al realizarse un estudio con 200 casos de leucemia linfoblástica aguda donde se evaluó el grado de concordancia en la clasificación morfológica, obteniéndose un 84% de concordancia entre los hematólogos que revisaron los casos (4,5).

C U A D R O No. 1

LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA	
CLASIFICACION	FAB
L - 1	Leucemia Linfoblástica Aguda (Indiferenciada)
L - 2	Leucemia Linfoblástica Aguda (Diferenciada)
L - 3	Leucemia Linfoblástica Aguda (Tipo Burkitt)

Leucemia linfoblástica aguda (L-1):

La población celular predominante (mayor al 60%) son células de tamaño menor al diametro de los linfocitos pequeños, la cromatina nuclear es fina y dispersa, los nucleolos son muy pequeños por lo tanto no son visibles. El citoplasma es escaso y moderadamente basófilo. Este tipo de leucemia ataca principalmente a los niños.

### Leucemia linfoblástica aguda (L-2):

La característica mas notable es la diversidad en el tamaño celular. El diámetro puede medir de 7 a 20 micrómetros (Mn), la cromatina varía desde fina y dispersa hasta gruesa y condensada, se pueden observar nucleolos. La L-2 puede confundirse con la M-1 la diferencia entre estas leucemias esta marcada por la invariable negatividad de la L-2 a la reacción de Peroxidasa.

### Leucemia linfoblástica aguda (L-3):

La población celular es caracteristicamente homogénea. La cromatina nuclear es fina, se observan uno o mas nucleolos muy predominantes, el nucleo es redondo u oval. Presenta prominente vacuolización citoplásmica .

Los cuerpos de Auer tienen un alto valor diagnóstico debido a que generalmente solo se presentan en las leucemias mieloblásticas agudas, sin embargo se registró un caso de un paciente de 17 años de edad con LLA que contenía cuerpos de Auer (4,5,6,7).



C U A D R O No. 2

Diferenciación de las leucemias linfoblásticas agudas  
 en base a ciertos parametros morfológicos

TIPOS DE LEUCEMIA	PARAMETROS MORFOLOGICOS		
	T.C.	NUC.	VAC.
L-1	Homogeneo	No visibles	Negativa
L-2	Hererogeneo	Visibles en algunas cé- lulas	Ocacional
L-3	Homogeneo	Visibles	Abundante

T.C. Tamaño celular.

NUC. Nucleolos.

VAC. Vacuolización citoplásmica.

C U A D R O No. 3

LEUCEMIA MIELOBLASTICA AGUDA	
CLASIFICACION FAB	
M-1	Leucemia Mieloblástica Aguda (Indiferenciada)
M-2	Leucemia Mieloblástica Aguda (Diferenciada)
M-3	Leucemia Promielocítica Aguda Hipergranular Microgranular
M-4	Leucemia Mielomonoblástica Aguda
M-5	Leucemia Monoblástica Aguda A. Indiferenciada B. Diferenciada
N-6	Eritroleucemia

Leucemia mieloblástica aguda (M-1):

La célula predominante es el mieloblasto, constituye mas del 60% de los glóbulos blancos, su morfología es similar a la del mieloblasto normal, contiene 3 a 5 nucleolos y puede presentar cuerpos de Auer. Por lo general son células peroxidasa negativa aunque se acepta que puede haber 3% positivas. En base a esta negatividad a la peroxidasa y a la ausencia de granulación se le llamó indiferenciada.

Leucemia mieloblástica aguda (M-2):

La población celular predominante incluye un 50% de mieloblastos y menos del 50% de promielocitos, puede haber menos de 5% de eritroblastos sin características de eritroleucemias. Las células se distinguen por su grado de maduración en la cromatina, sin embargo la característica principal es la de tener granulación fina en el núcleo y el citoplasma (promielocitos). Se pueden encontrar cuerpos de Auer.

Leucemia promielocítica aguda (M-3):

Por definición la mayoría de las células tienen granulación citoplásmica abundante. La cromatina es fina y contiene nucleolos, que aveces es único y muy predominante. Actualmente se conocen dos tipos:

I. Clásica hipergranular: Se caracteriza por la presencia de granulación gruesa eosinófila y/o basófila.

Es muy frecuente observar cuerpos de Auer finos en el citoplasma

y en el núcleo.

II. Microgranular: Se presentan con abundante granulación pero muy fina y puede tener cuerpos de Auer.

Leucemia mielomonoblástica aguda (M-4):

Existe una doble población de blastos. Una de la serie mieloblástica que puede tener características de M-1 y M-2 y la otra de monoblastos cuya cromatina es fina y reticular, el núcleo suele ser dentado. El citoplasma es abundante, se observa color gris tenue en la tinción de Wright. Algunas células pueden mostrar vacuolización citoplásmica.

Los monoblastos se tiñen intensamente con esterasa no específica -- (alfa-naftil) la cual se inhibe con fluoruro de sodio. Esta leucemia es también llamada tipo Naegeli.

Leucemia monoblástica aguda (M-5):

La célula predominante es el monoblasto con las características descritas en el componente M-4. Esta leucemia se divide en dos formas

A. Indiferenciada; en la cual la población celular consiste en monoblastos y escasos promonocitos.

B. Diferenciada; con marcado predominio de promonocitos generalmente acompañados de un 20% de monoblastos.

En un estudio de 64 casos de M-5 en el Hospital de Saint Louis de 1970 a 1978 basado en diferencias morfológicas y cit químicas se observó que la incidencia de la leucemia monoblástica aguda indiferen-

ciada fue mucho mayor. El diagnóstico se basó en la observación microscópica de médula ósea y sangre de acuerdo a la descripción morfológica de la clasificación de FAB. Se encontraron 58 pacientes -- con M-5 tipo A y 9 pacientes con tipo B .

#### Eritroleucemia (M-6):

Existen dos criterios respecto a la clasificación de esta leucemia.

Criterio I: Se encuentran mas de 50% de células juveniles de la serie roja (eritroblasto), aproximadamente un 10% de estas células tienen cambios diseritropoyéticos (cambios megaloblastoides, cariólisis, cariorexis, normoblastos bi y/o trinucleados) y mas o menos 30% de mieloblastos y promielocitos.

Criterio II: Incluye aproximadamente 30% de mieloblastos y promielocitos y 30% de eritroblastos con cambios diseritropoyéticos (4,5,7, 8,12).

El diagnóstico de las leucemias así como la diferenciación entre la leucemia linfoblástica y la no linfoblástica se ha apoyado en las reacciones citológicas, estas comprenden la morfología celular y la citoquímica.

El manejo de los dos tipos de métodos es de gran importancia en el laboratorio, por lo que a continuación se describen los conceptos generales en los cuales se fundamenta cada una de las técnicas.

En lo que se refiere a la morfología celular, los leucocitos madu -

ros que se encuentran en la sangre periférica provienen de células primitivas llamadas hemocitoblastos que son capaces de reproducirse y dar lugar a cualquiera de las líneas celulares de la médula ósea, además se han encontrado algunas que sólo dan lugar a una variedad celular. La morfología de estas células no ha sido definida y sólo es posible identificar las series celulares a partir de los blastos (3,9).

Existen dos grupos de series, la no granulocítica y la granulocítica, en esta última están comprendidas la serie mielocítica y la monocítica, las cuales se definen a continuación.

Serie linfocítica: También llamada no granulocítica, contiene las siguientes células, linfoblasto, prolinfocito y linfocito cuyas características se mencionan a continuación:

Linfoblasto: Rara vez o nunca se encuentran en sangre periférica, se distingue difícilmente del mieloblasto. mide de 10 a 18 Mn, la membrana nuclear es un poco más gruesa que la del mieloblasto, el núcleo es redondo y la cromatina es fina, se observa de uno a dos nucleolos. El citoplasma es basófilo y no contiene gránulos cuando se tiñe al Wright pero puede adoptar aspecto granuloso al aplicar el colorante de Schiff (PAS).

Prolinfocito: El diámetro de estas células es mayor a 15 Mn, el núcleo es redondo, la cromatina nuclear es espesa, en ocasiones se observa un nucleolo o restos nucleolares y el citoplasma es escaso.

Linfocito: Hay dos tipos de linfocitos, el grande que mide 20 Mn y el linfocito pequeño que tiene un diámetro de 7 a 10 Mn, el núcleo suele ser redondo y ocupa la mayor parte de la célula, no contiene nucleolos, el citoplasma es escaso y debilmente basófilo. No da reacción a la peroxidasa, no se tiñe con la tinción de la esterasa no específica (alfa-naftil) y da reacción positiva al PAS.

Serie mielocítica: Esta línea celular comprende al mieloblasto, -- promielocito, mielocito, metamielocito y célula segmentada que se definen en seguida.

Mieloblasto: Su tamaño varía entre 12 y 18 Mn, su núcleo es redondo u oval, la cromatina adopta el aspecto de cordones muy finos -- que producen la impresión de punteado uniforme, contiene de dos -- a cinco nucleolos y la membrana nuclear es muy fina. El citoplasma es escaso y muy basófilo. En algunos mieloblastos neoplásicos (leucémicos) aparecen cuerpos de Auer producidos por la fusión de los gránulos azurófilos, ambos comparten ciertas características -- como dar reacción positiva a la peroxidasa y al negro sudán, y bajo el microscopio electrónico su ultraestructura es semejante. Los mieloblastos normalmente no toman la tinción de la esterasa no específica (alfa-naftil) ni el colorante de Schiff.

Promielocito: Tiene parecido con el mieloblasto, su tamaño es de 12 a 18 Mn, contiene un gran número de gránulos azurófilos en el ci --

toplasma y en la región que recubre al núcleo, generalmente contiene de uno a dos nucleolos que no siempre son distinguibles. Se ha comprobado que al ir apareciendo los gránulos, los nucleolos van desapareciendo y se hacen nulos cuando se alcanza la etapa de mielocito. El citoplasma es menos basófilo que en el mieloblasto.

Mielocito: Es la primera célula de la serie granulocítica que contiene gránulos específicos, su diámetro es de 10 a 16 Mn, el núcleo tiene forma oval o ligeramente dentado y de posición exentérica, la cromatina es un poco gruesa, el citoplasma es abundante y menos basófilo. Da reacción positiva a la peroxidasa y al negro sudán.

Metamielocito o célula en banda: Su tamaño varía entre 10 y 15 Mn, el núcleo adopta forma de banda encurvada o arrollada y la cromatina nuclear es muy densa.

Célula segmentada: Es la célula más madura de esta serie, su diámetro es de 10 a 15 Mn, el núcleo está formado por dos o más lóbulos (regularmente tres) unidos por conexiones filamentosas, la cromatina nuclear es muy densa. Dependiendo de la coloración que toman los gránulos con la tinción diferencial, estas células son llamadas neutrófilos, eosinófilos y basófilos.

Los neutrófilos poseen granulación fina. Son positivos a la tinción de Schiff, peroxidasa y negro sudán.

Los eosinófilos se caracterizan por la presencia de gránulos volumi -



nosos que llenan el citoplasma y con la tinción de Wright son color rojizos, el núcleo rara vez tiene mas de dos lóbulos, el citoplasma es abundante, dan reacción positiva al negro sudán y a la peroxidasa.

Los basófilos son algo menor que los neutrófilos, lo característico de estas células es la presencia de gránulos de gran tamaño que con la tinción de Wright son color negro purpúreo y parecen llenarlas por completo. Estas células dan reacción negativa a la peroxidasa.

Serie monocítica: Esta serie la constituyen los precursores del monocito incluyendo a este último.

Monoblasto: Según el Comité de Nomenclatura de Células Sanguíneas se llama monoblasto a cualquier célula de la serie monocítica que contenga cromatina fina. Su diámetro varía entre 10 y 18 Mn, se observan uno o dos nucleolos, su citoplasma es escaso y normalmente no se encuentra en sangre periférica.

Promonocito: Mide de 10 a 18 Mn. el núcleo es dentado, la cromatina nuclear es fina y contiene un nucleolo o restos nucleolares, posee moderado citoplasma.

Monocito: Normalmente suele ser la célula de mayor tamaño en sangre periférica, su diámetro varía entre 16 y 22 Mn, su núcleo es dentado y posee estructura cromática filamentososa. El citoplasma es ligeramente basófilo y opaco, presenta gran número de gránulos finos. Al aplicar la tinción de esterasa no específica (alfa-naftil)

los monocitos y sus precursores dan resultados positivos (2,3,4,5,9, 10).

Las técnicas citoquímicas están respaldadas en tinciones que sirven para distinguir con mayor precisión la población celular predominante. Existe gran variedad de tinciones, lo cual hace posible seleccionar el conjunto de reacciones que más se acoplen a las necesidades de la investigación.

La Peroxidasa, el Negro Sudán, el Pas y la Esterasa no específica -- (alfa-naftil) forman un conjunto de tinciones en el cual se puede apoyar un diagnóstico.

#### Reacción de Peroxidasa:

La enzima peroxidasa está presente en los gránulos de la célula mieloides y actúa sobre el peróxido de hidrógeno originando la oxidación de la bencidina, produciéndose un compuesto de color café. De este modo cualquier estructura que contenga peroxidasa se tiñe de café por esta reacción.(11).

#### Reacción del Negro Sudán:

Esta tinción tiñe una amplia variedad de lípidos incluyendo grasas neutras, fosfolípidos y esteroides.

Se utiliza para distinguir las células mieloides de otro tipo de células. En los leucocitos la sudanofilia ocurre paralela a la peroxidasa (12).

### PAS:

El ácido peryódico es un agente oxidante que convierte los grupos - hidroxilo en átomos adyacentes de carbono a aldehídos. Los aldehídos resultantes se combinan con el reactivo de Schiff para dar un producto color rojo. Por lo tanto se observa una reacción positiva con los polisacáridos, mucopolisacáridos y glucoproteínas. Generalmente indica la presencia de glucógeno.

Los linfocitos y sus precursores son normalmente negativos o debilmente positivos al PAS, pero en la leucemia linfoblástica aguda los linfoblastos suelen tener grandes grumos de material positivo (1).

### Esterasa no específica:

Las estererasas son enzimas que hidrolizan las grasas neutras. Hay dos tipos la específica y la no específica, esta última sirve para identificar la población monocítica (11).

En la actualidad se ha venido observando un incremento en el número de casos de leucemia reportados, que puede deberse a la facilidad en el diagnóstico y a la difusión de este en los centros de servicio médico.

Considerando lo anterior el objetivo de este trabajo es la estanda-

rización de técnicas citológicas que permitan clasificar los diferentes tipos de leucemia y así colaborar con el tratamiento de las mismas.

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

En este estudio se utilizaron técnicas histoquímicas y morfológicas como herramientas útiles para el diagnóstico presuntivo de las leucemias.

Los métodos citológicos practicados están basados en la detección de ciertas estructuras y componentes celulares.

El trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Análisis Clínicos - de la División de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Monterrey durante los meses de Enero a Abril de 1985.

## M E T O D O S:

### 1. Coloración de Wright.\*

- a) Cubir el frotis sanguíneo con el colorante de Wright (R-1) por 5 minutos.
- b) Añadir el buffer de fosfatos (R-2) por 10 minutos.
- c) Lavar con agua destilada y dejar secar.

### 2. Tinción de Peroxidasa.

- a) Fijar las extensiones sanguíneas con solución fijadora (R-3). Dejar secar.
- b) Sumergir en el colorante (R-4) por 2 minutos. Lavar con agua y dejar secar.
- c) Contrateñir con el colorante de Wright.

### 3. Tinción de Negro Sudán (Sheehan y Storeg).

- a) Fijar los frotis con vapores de formalina por 20 minutos. Lavar con agua 10 minutos y dejar secar.
- b) Sumergir en el colorante (R-5) 60 minutos.
- c) Lavar con etanol al 70% (R-6) de 2 a 3 minutos.
- d) Lavar con agua 2 minutos y dejar secar.
- e) Contrateñir con el colorante de Wright.

\* Productos Sigma.

4. Tinción de PAS (Tomasi).

- a) Fijar los frotis con solución fijadora (R-3) por 5 minutos.
- b) Lavar con agua por 15 minutos y dejar secar al aire.
- c) Colocar los frotis en una jarra de Coplin con ácido peryódico (R-7) 20 minutos.
- d) Lavar con agua 5 minutos y dejar secar. Los frotis teñidos con Wright o Giemsa pueden teñirse a partir de este punto.
- e) Incubar en el reactivo de Schiff (R-8) por 20 minutos.
- f) Pasar los frotis de inmediato a baños de metabisulfito -- (R-9), tre baños consecutivos de 3 minutos cada uno.
- g) Lavar con agua por 5 minutos y dejar secar.
- h) Contrateñir con Hematoxilina de Meyer (R-10) por 15 minutos.
- i) Lavar con agua y dejar secar.

5. Tinción de Esterasa no Específica.

- a) Fijar los frotis con solución fijadora (R-3) por 1 minuto.
- b) Lavar con suero fisiológico.
- c) Incubar por 60 minutos en la solución del colorante (R-11).
- d) Lavar con agua destilada y dejar secar.
- e) Contrateñir con hematoxilina de Meyer por 8 minutos. Lavar y dejar secar.

REACTIVOS :

R-1 Colorante de Wright.

Colorante de Wright..... 200 mg

Metanol absoluto ..... 50 ml

Los reactivos se mezclan por agitación de 5 minutos diarios por 5 - días.

Se filtra la solución y se guarda en un frasco ámbar a temperatura ambiente.

R-2 Buffer de fosfatos.

Fosfato monopotásico..... 7.3 g

Fosfato disódico ..... 3.2 g

Disolver los reactivos en agua destilada y aforar a un litro.

R-3 Solución fijadora.

Etanol absoluto ..... 73 ml

Formaldehído 37% ..... 27 ml

Los reactivos deben mezclarse antes de utilizarse.

R-4 Colorante de Peroxidasa.

Bencidina ..... 350 mg

Etanol absoluto ..... 6 ml

Agua destilada ..... 4 ml



Peróxido de hidrógeno ..... 2 gotas  
Disolver la bencidina en el alcohol, agregar el agua y las gotas de peróxido de hidrógeno.

R-5 Colorante Negro Sudán B.

Colorante:

Negro Sudán B ..... 0.3 g  
Etanol absoluto ..... 100 ml

Buffer:

Cristales de fenol ..... 16 g  
Etanol absoluto ..... 30 ml  
Agua destilada ..... 100 ml  
Fosfato de sodio dibásico ..... 0.3 g

El colorante Negro Sudán B se disuelve en alcohol. Por otra parte se prepara el buffer disolviendo los cristales de fenol en alcohol y luego se agregan los reactivos en el orden descrito.

Se mezclan 60 ml del colorante Negro Sudán B con 40 ml del buffer. Esta solución se filtra por succión.

R-6 Etanol al 70%.

Etanol absoluto ..... 73 ml  
Agua destilada ..... 27 ml

R-7 Acido peryódico.

Acido peryódico ..... 0.25 g  
Agua destilada ..... 25 ml

R-8 Reactivo de Schiff.

Agua destilada ..... 100 ml  
Fucsina básica ..... 1 g  
Metabisulfito de sodio ..... 2 g  
Acido clorhídrico I N ..... 20 ml  
Carbón activado ..... 300 mg

Se pone el agua a ebullición y se agrega poco a poco la fucsina agitando fuera del calor. Enfriar a 60 °C, filtrar y agregar el metabisulfito y el ácido clorhídrico. Incubar de 18 a 26 horas en un frasco ámbar con tapón.

Agregar el carbón activado y mezclar por un minuto, para después filtrar la solución y conservarla en frasco ámbar a 4°C. Desechar cuando tome un color rosa.

R-9 Metabisulfito de sodio.

Metabisulfito de sodio ..... 0.5 g  
Agua destilada cbp ..... 100 ml

Prepararlo en el momento de usarse.

R-10 Hematoxilina de Meyer.

Hematoxilina de Meyer ..... 1 g  
 Agua destilada ..... 500 ml  
 Calentar a ebullición y agregar en el siguiente orden:  
 Agua destilada ..... 500 ml  
 Yodato de sódio ..... 0.2 g  
 Sulfato de potasio y aluminio ..... 50 g  
 Agutar hasta disolución completa, filtrar y guardar en un frasco -  
 ámbar. Filtrar antes de usarse.

R-11 Colorante de Esterasa no Específica (alfa-naftil).

Alfa-naftil acetato ..... 10 mg  
 Solución de pararosanilina (R'-11) ..... 1 gota  
 Solución de nitrito de sódio al 4 % ..... 1 gota  
 Buffer de fosfatos 0.2 M con pH de 7 a 7.1 (R"-11) ..... 25 ml  
 Acetona ..... 0.3 ml

En un vaso de precipitado de 10 ml colocar una gota de la solución de pararosanilina y una gota de nitrito de sódio al 4%, mezclar -- por 1 minuto, agregar 5 ml de buffer de fosfatos.

Por otra parte en un vaso de precipitado de 50 ml colocar el alfa-naftil acetato y la acetona. Agregar agitando 20 ml de buffer de fosfatos.

La mezcla del primer vaso se agrega a la mezcla del segundo vaso y esta solución final es el colorante que se utiliza.

R'-11 Solución de pararosanilina.

Pararosanilina ..... 2 g  
Acido clorhídrico 2 N ..... 50 ml  
Disolver por calentamiento la pararosanilina en el ácido. Enfriar  
y filtrar. Conservar a 4°C.

R"-11 Buffer de fosfatos 0,2 M pH de 7 a 7.1.

Solución A:

Fosfato de sodio monobásico ..... 13.8 g  
Agua destilada ..... 500 ml

Solución B:

Fosfato de sodio dibásico ..... 17.8 g  
Agua destilada ..... 500 ml

Mezclar 250 ml de la solución B con 130 ml de la solución A.

## R E S U L T A D O S

Las técnicas citoquímicas y morfológicas que mostraron cierta varia bilidad con respecto a los medios consultados, fueron la Peroxidasa, el PAS y el Wright como lo indican las tablas No. 1, 2, 3 y 4. Las dos primeras tablas revelan los ajustes en las concentraciones de los reactivos empleados en las técnicas de Peroxidasa y Wright, - mientras que las tablas No. 3 y 4 indican la variación de los tiempos de reacción en las técnicas de PAS y Wright.

En el presente estudio se analizaron frotis de sangre periférica de pacientes con diversos tipos de leucemias.

En la tabla No. 5 se muestra el grado de positividad de las técnicas citoquímicas utilizadas de acuerdo al tipo de leucemia.

En las fotos 1, 2 y 3 se presentan ciertas células con características morfológicas típicas que permiten distinguir a las leucemias linfoblásticas agudas.

Las células que predominan en las leucemias mieloblásticas agudas se muestran en la secuencia de fotos 4-9.

La positividad de las técnicas histoquímicas se muestran en la secuencia de fotos 10-13.

T A B L A No. 1

Variabilidad de las concentraciones de los reactivos utilizados en la técnica de la Peroxidasa.

TIPOS DE CONCENTRACION	REACTIVOS			
	Bencidina	Etanol	Agua	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Recomendada	200.mg	6 ml	4 ml	2 gotas
Utilizada	350 mg	6 ml	4 ml	2 gotas

T A B L A No. 2

Variabilidad de las concentraciones de los reactivos utilizados en la técnica Wright.

TIPOS DE CONCENTRACION	REACTIVOS	
	Colorante de Wright	Buffer Fosfatos
Recomendada	2 g/lto	No varió
Utilizada	4 g/lto	No varió



T A B L A No. 3

Variabilidad de los tiempos de reacción en la  
técnica de Wright.

TIEMPOS DE REACCION	ETAPAS DE AJUSTE	
	Colorante	Buffer
Recomendada	.2 minutos	3 minutos
Observado	4 minutos	5 minutos

T A B L A No. 4

Variabilidad de los tiempos de reacción en la técnica de PAS

TIEMPOS DE REACCION	ETAPAS DE AJUSTE	
	Acido Peryódico	Colorante de Shiff
Recomendado	10 minutos	10 minutos
Observado	20 minutos	20 minutos

T A B L A No. 5

Relación del grado de positividad de las técnicas  
citoquímicas con el tipo de leucemia

	POX*	N.S.**	PAS	E.I.***
M-1	+	+	+	+
M-2	++	++	+	+
M-3	+++	+++	++	+
M-4	++/+	++/+	+	++
M-5	+	+	+	+++
M-6	++	++	+++	-
L-1	-	-	++	-
L-2	-	-	+++	-
L-3	-	-	-	-

\* Peroxidasa

\*\* Negro Sudán

\*\*\* Esterasa no específica (alfa-naftil)

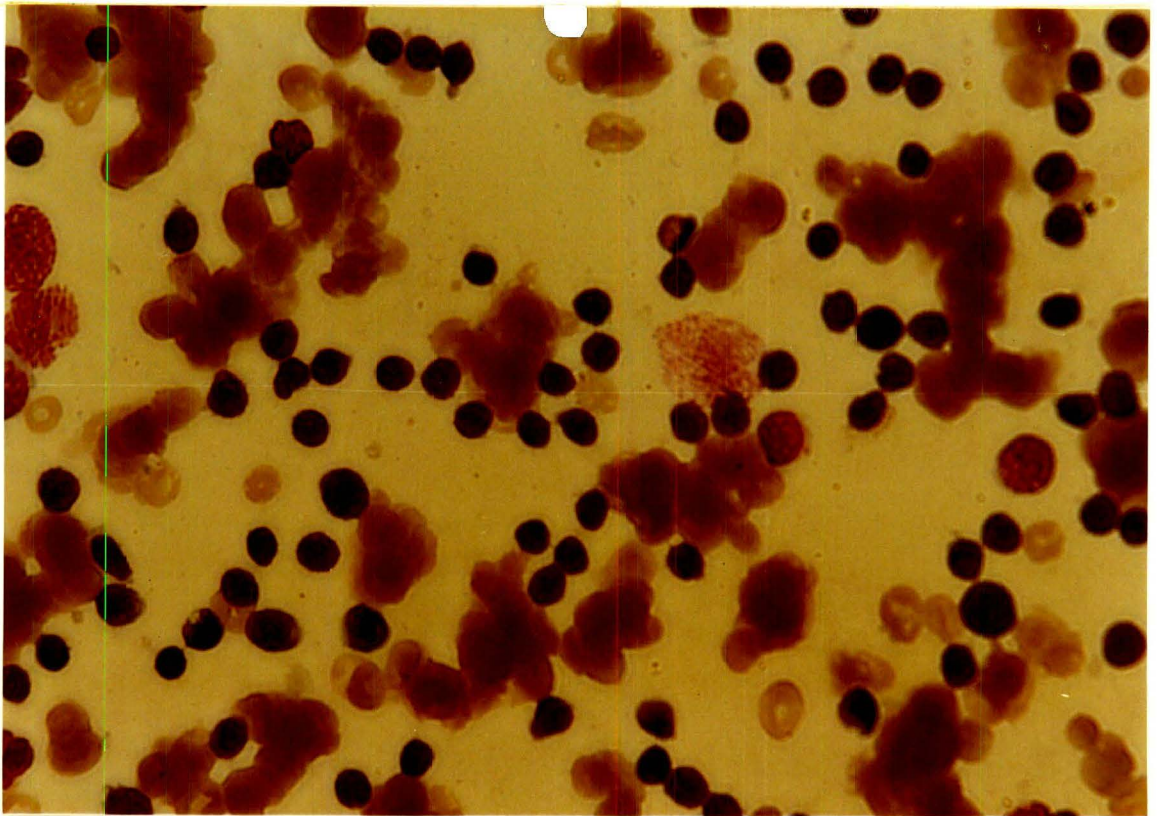


Foto 1: Leucemia Linfoblástica Aguda (L-1)

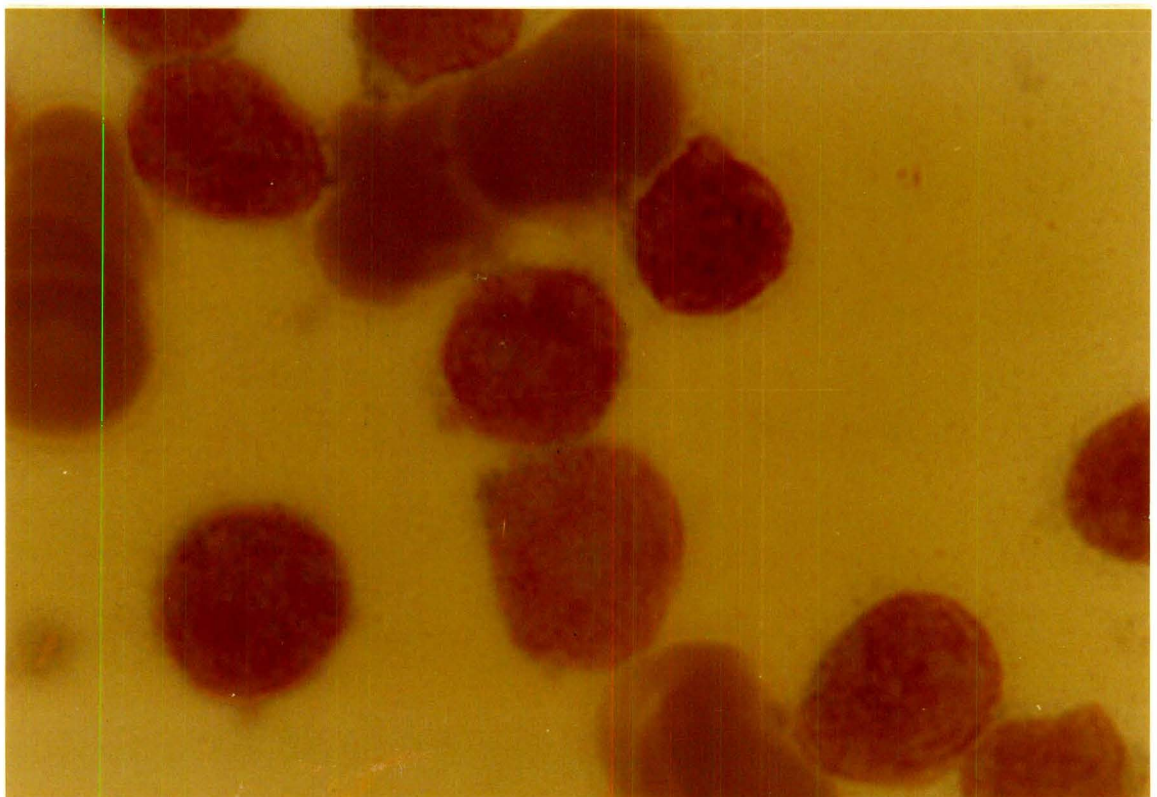


Foto 2: Leucemia Linfoblástica Aguda (L-2)

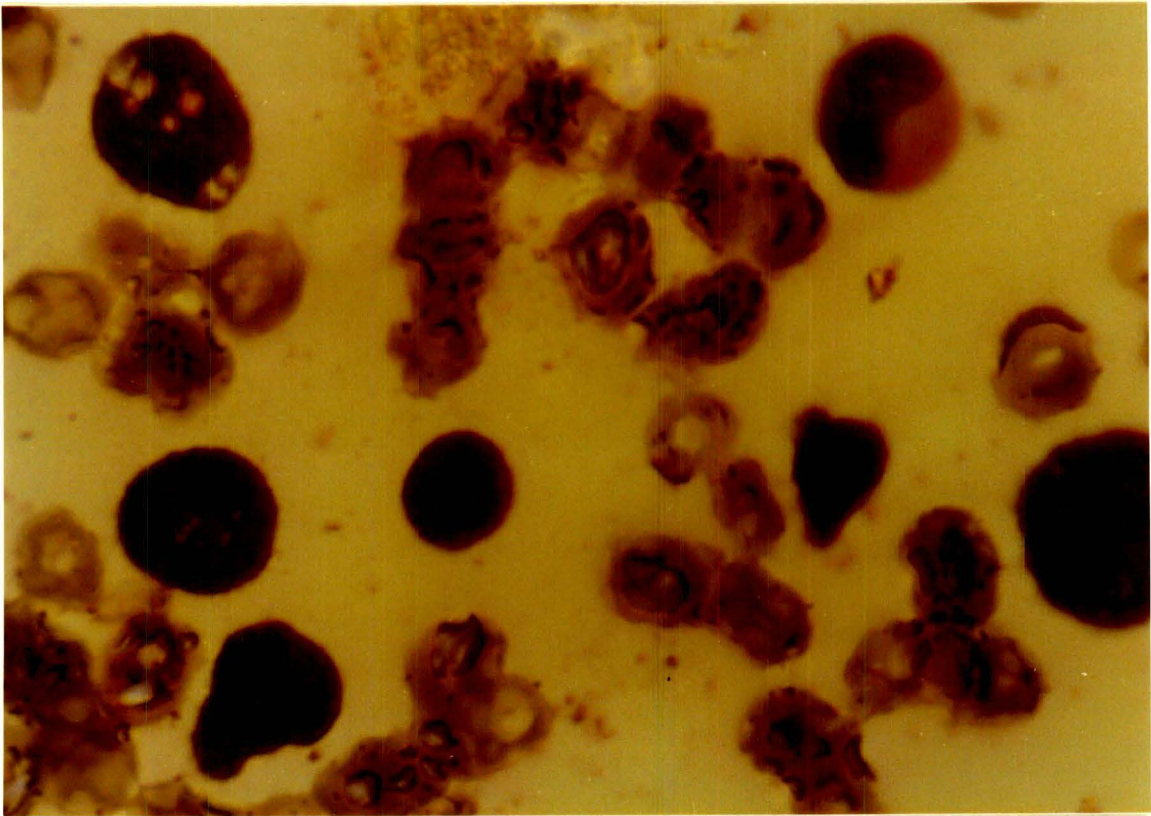


Foto 3: Leucemia Linfoblástica Aguda (L-3)

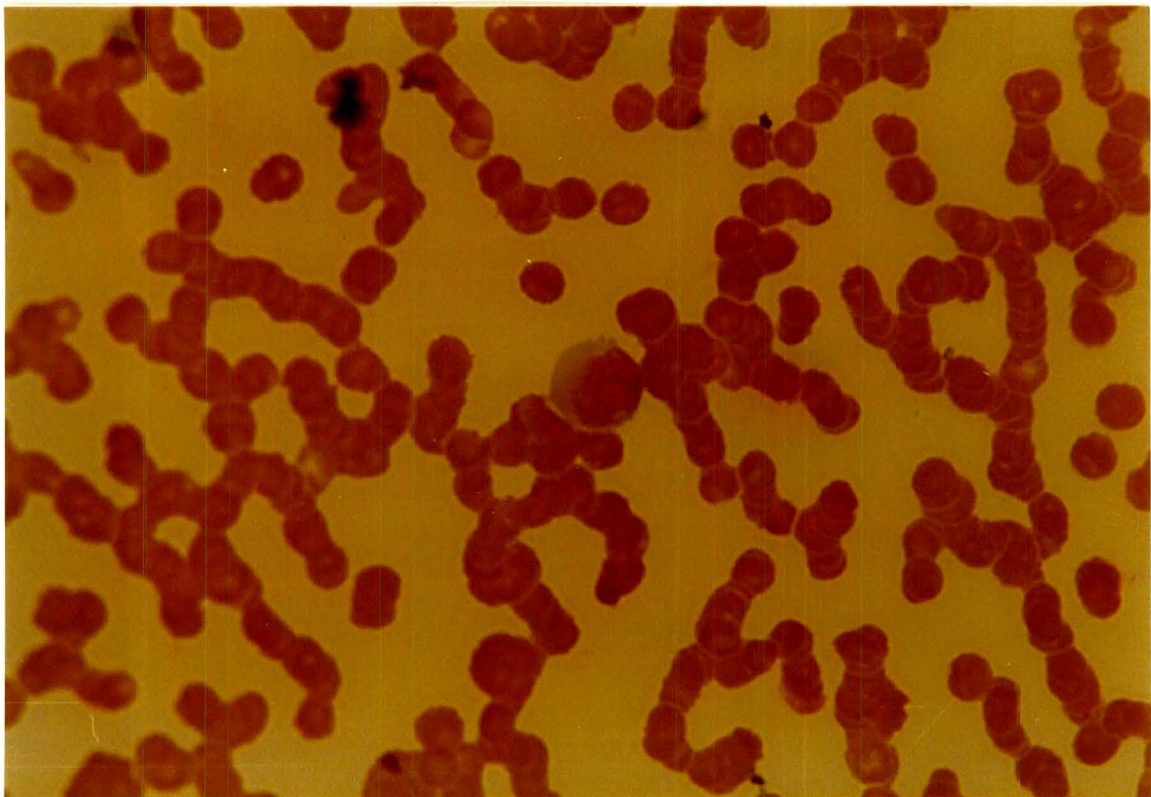


Foto 4: Leucemia Mieloblástica Aguda (M-1)

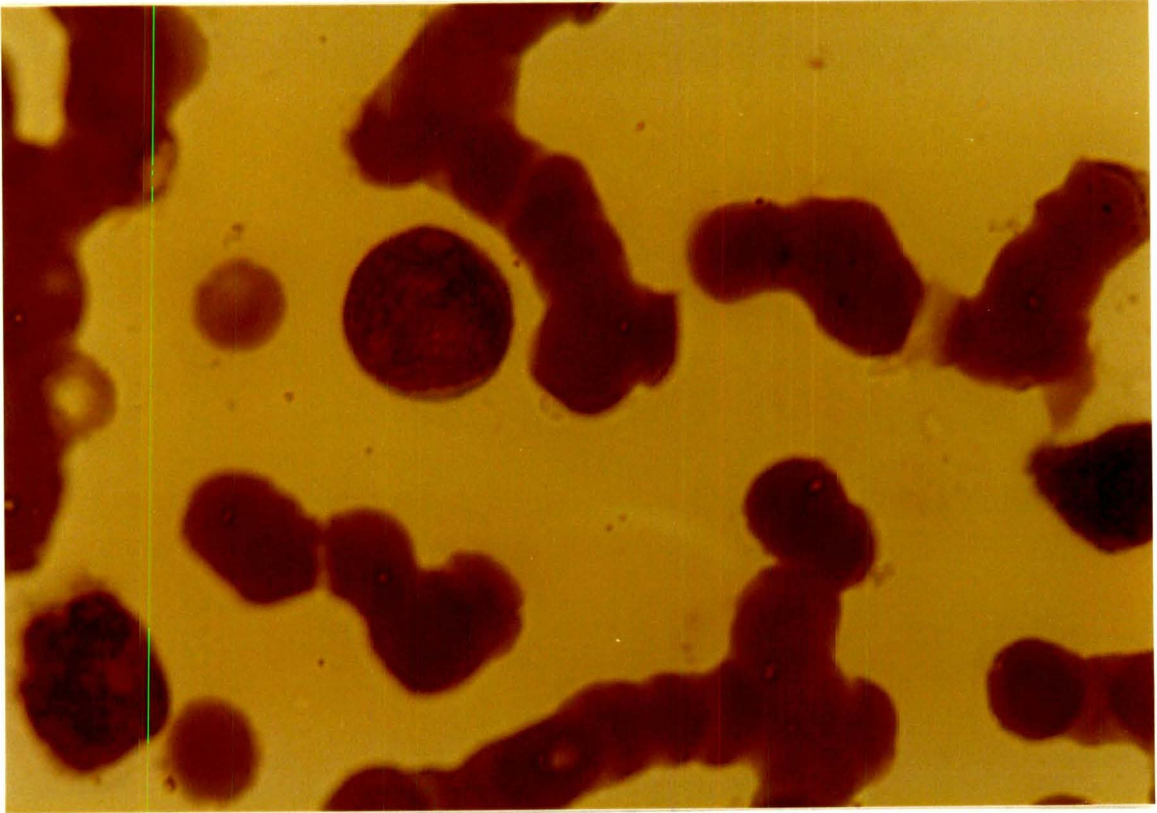


Foto 5: Leucemia Mieloblástica Aguda (M-2)

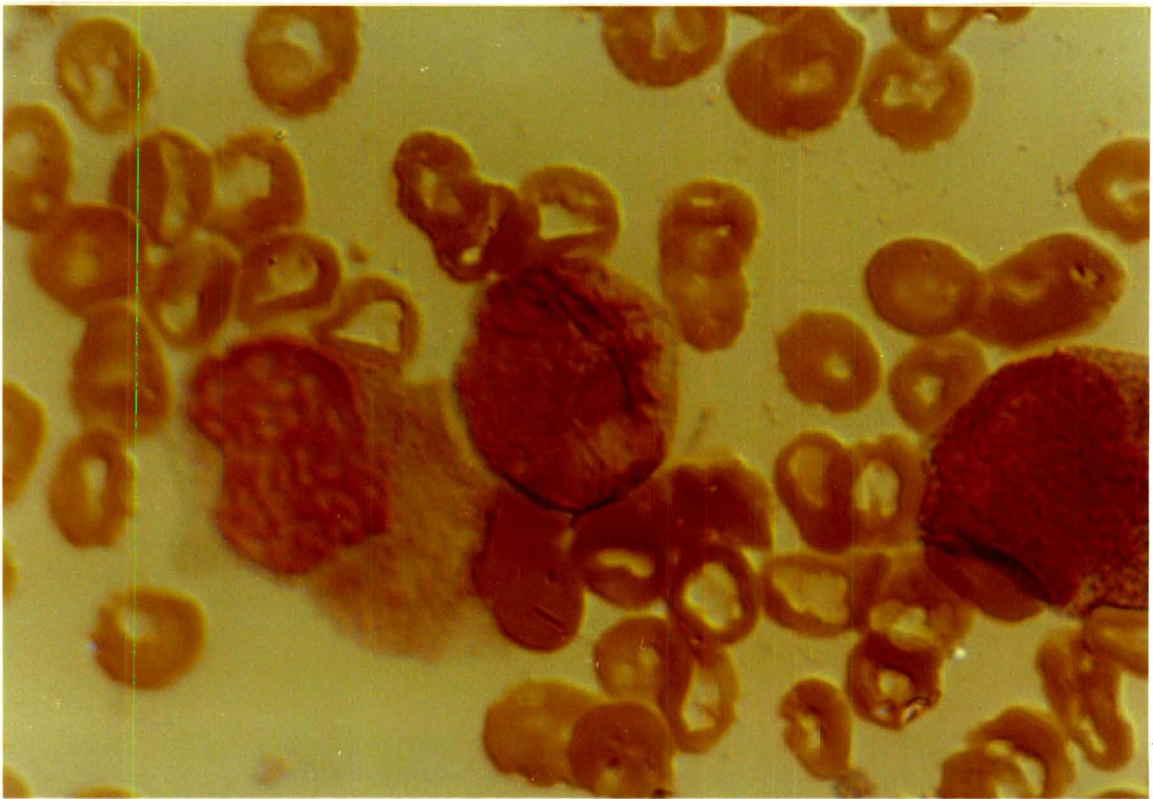


Foto 6: Leucemia Promielocítica Aguda (M-3)

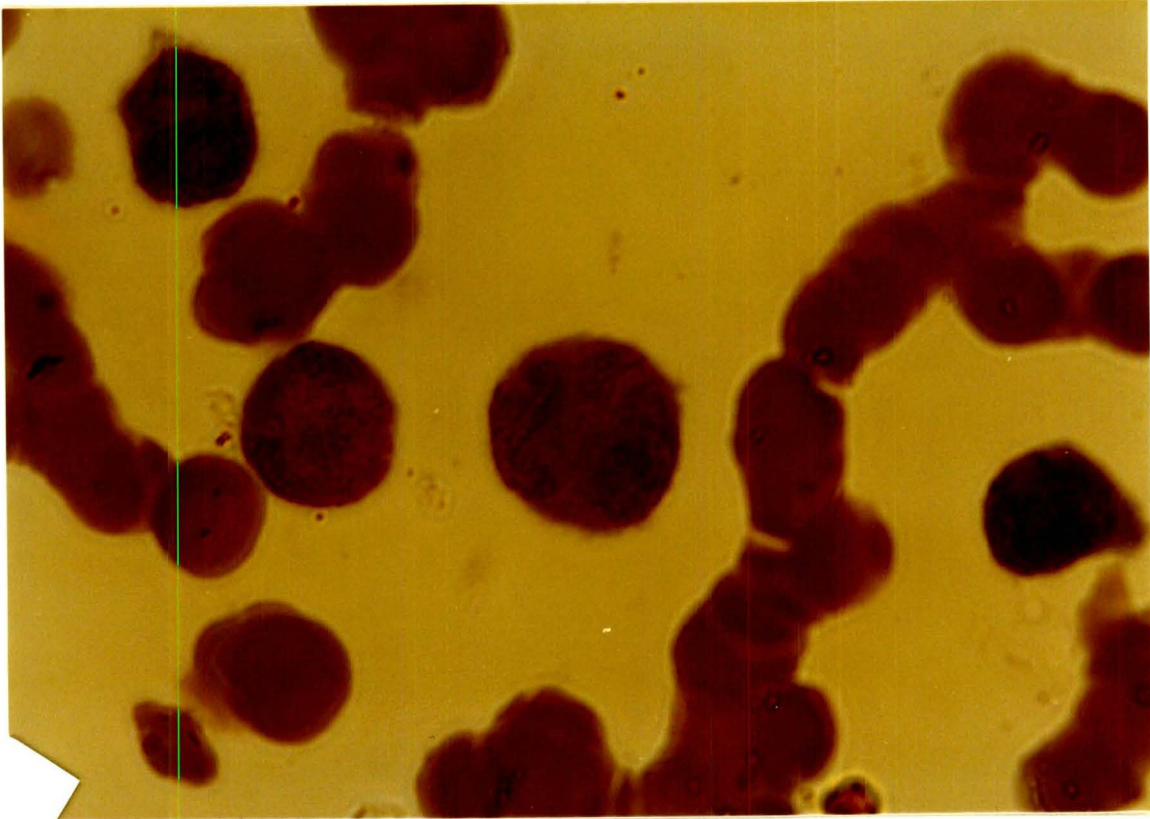


Foto 7: Leucemia Mielomonoblástica Aguda (M-4)

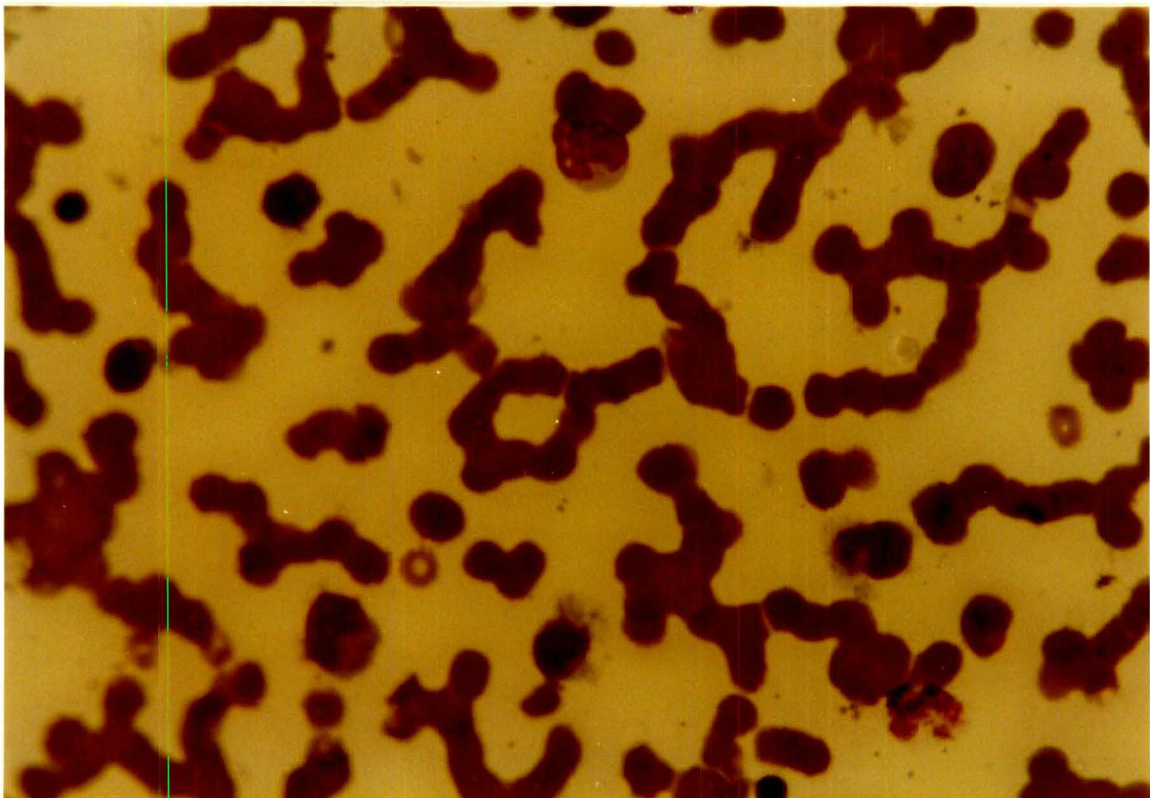


Foto 8: Leucemia Monoblástica Aguda (M-5)

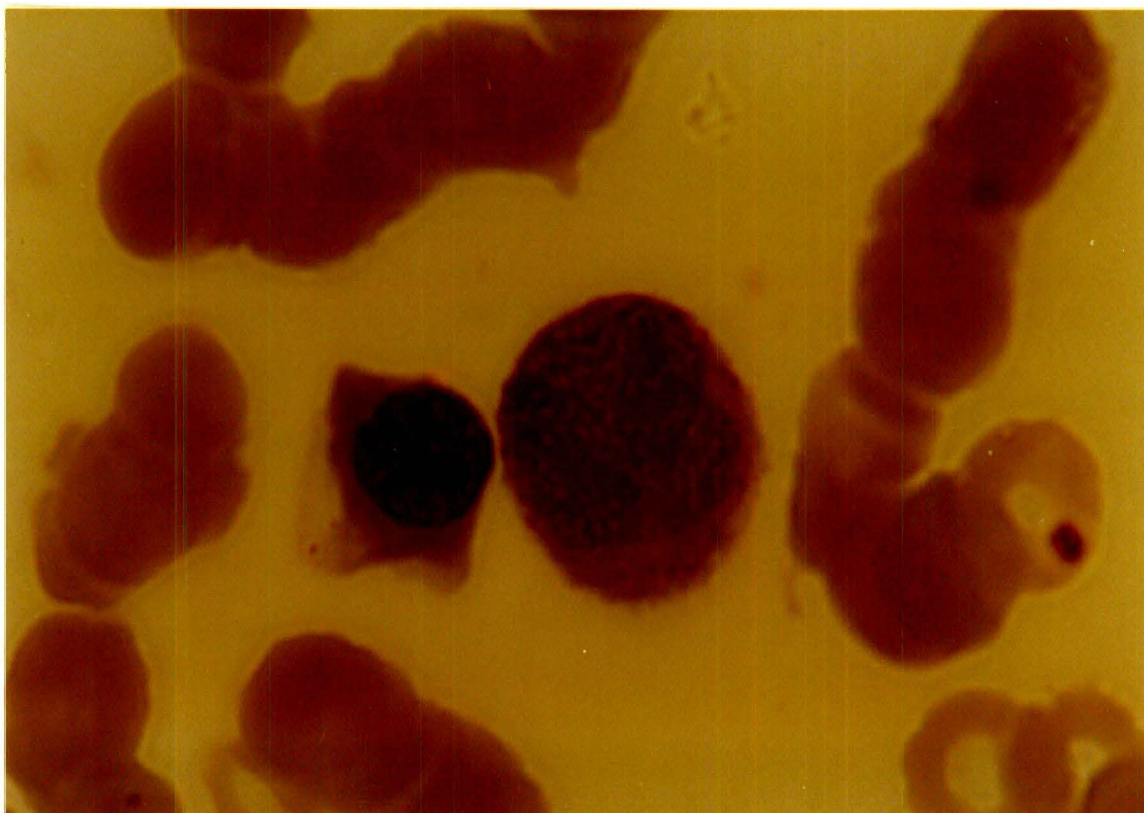


Foto 9: Eritroleucemia (M-6)

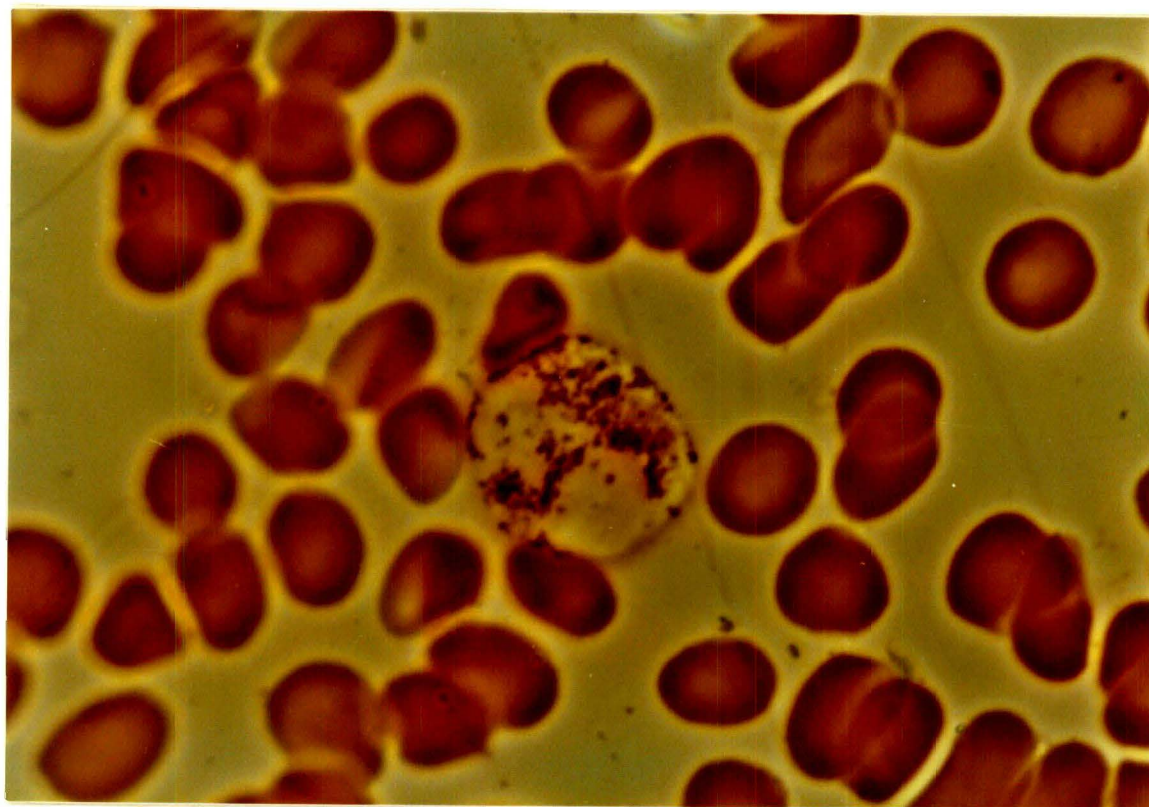


Foto 10: Tinción de Peroxidasa



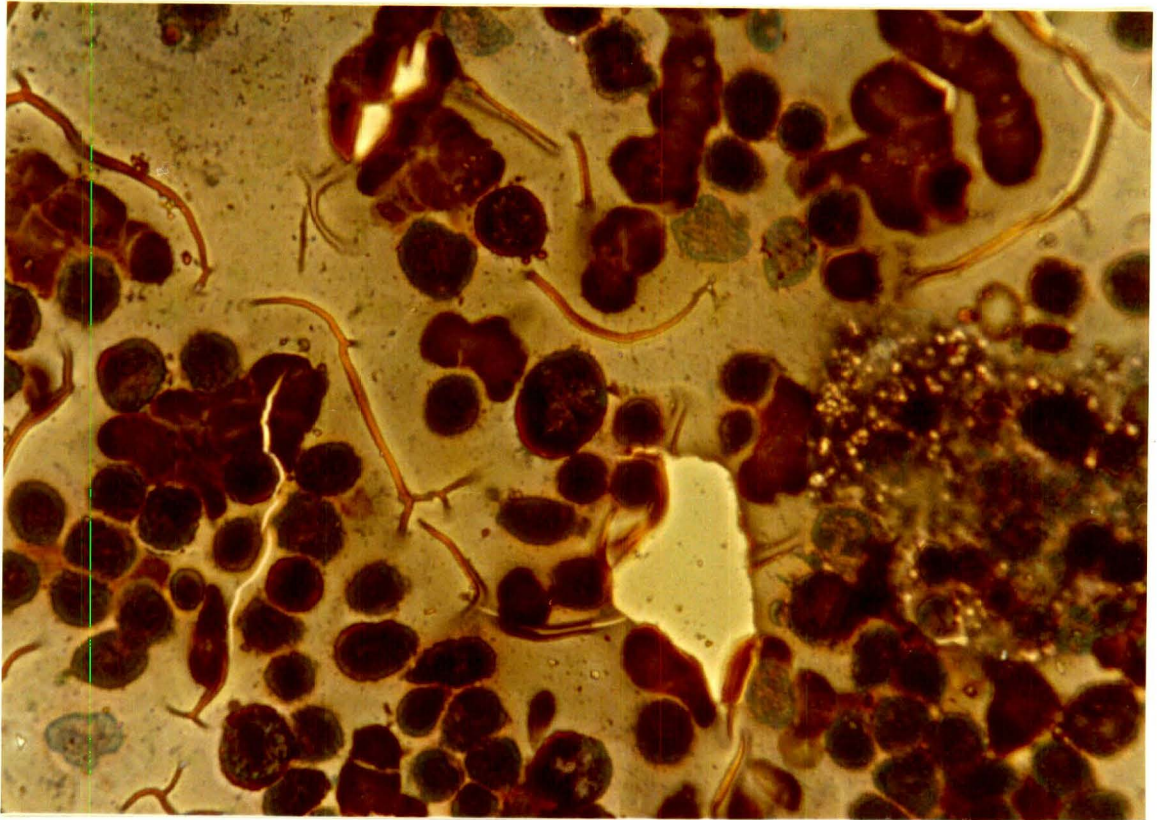


Foto 11: Tinción de Negro Sudán



Foto 12: Tinción de Esterasa no específica (alfa-naftil)

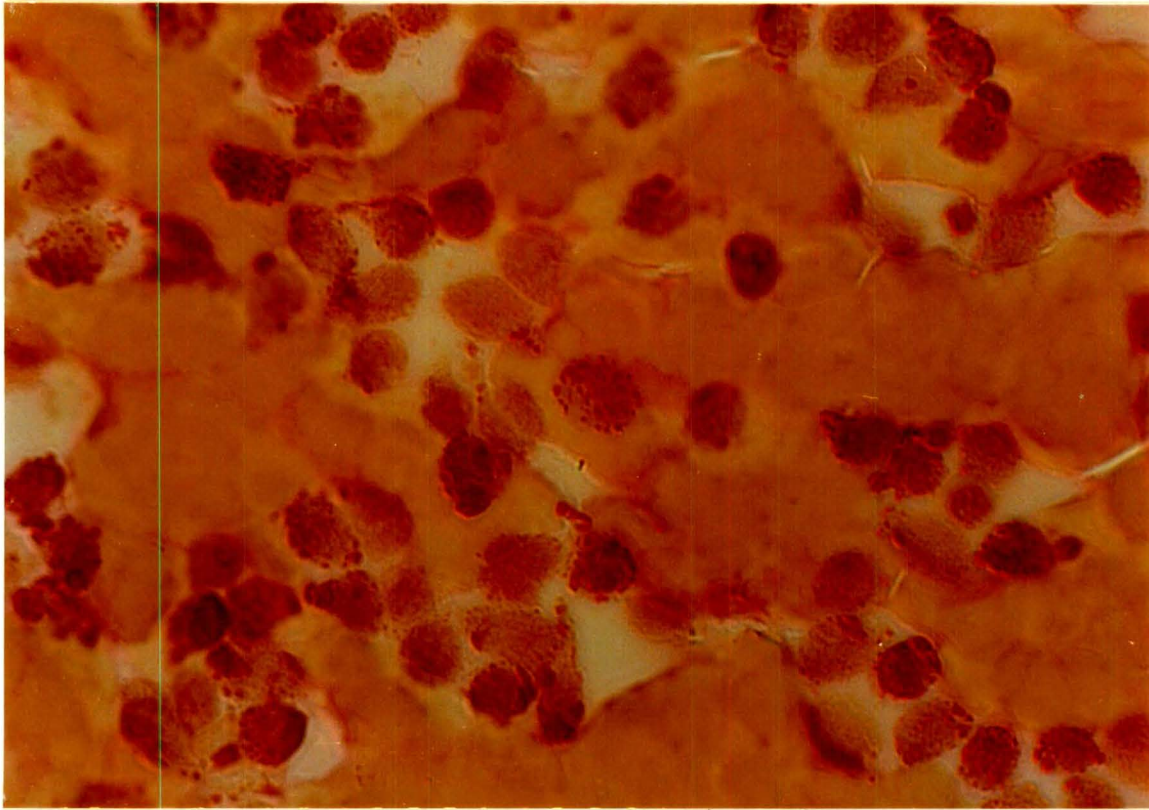


Foto 13: Tinción de PAS

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

La efectividad de la quimioterapia en el tratamiento de las leucemias agudas se ha incrementado particularmente en las que afectan a los niños. El rango de variaciones morfológicas en ambas leucemias linfoblástica y mieloblástica es muy alto, por lo que en años recientes se ha venido intentando definir subgrupos para detectar si existe alguna correlación entre estos y los hallazgos clínicos y de laboratorio, la respuesta al tratamiento y el pronóstico. ( 4.).

En base a lo anterior, en este estudio se estandarizaron varios métodos morfológicos y citoquímicos, con el objeto de correlacionar los resultados del análisis microscópico de frotis sanguíneos =

correspondientes a pacientes leucémicos con las características morfológicas y citoquímicas establecidas por la clasificación del grupo FAB.

En lo que se refiere a la estandarización de los métodos citológicos, es importante considerar los factores directamente involucrados en los métodos. Entre los cuales se encuentran el tiempo de reacción, la concentración de los reactivos, la estabilidad en el pH de las soluciones, el grado de pureza, la temperatura y la sensibilidad a la luz de los reactivos.

El tiempo de reacción puede considerarse como un parámetro específico de cada método y depende de la concentración de los reactivos y de la pureza de los mismos. En relación a esto la variación de los resultados que se muestra en las tablas No. 3 y 4 manifiesta un incremento significativo en el tiempo, aproximadamente del 50%, lo que es explicable debido a que de los parámetros involucrados el tiempo de reacción es el más adaptable a una modificación, a diferencia de la concentración que involucraría un procedimiento más complicado, sobre todo si se consideran soluciones constituidas por más de un reactivo, como lo son las utilizadas en las técnicas de PAS y Wright.

Por otra parte, los resultados demuestran cambios muy marcados entre las concentraciones recomendadas por los métodos y las utilizadas en este estudio (tablas No. 1 y 2) por lo que si se toma en cuenta la magnitud de la variación en la concentración, se puede

concluir que estos cambios estan relacionados con una mala calidad de los reactivos.

Otro de los factores directamente involucrados en este tipo de reacciones biológicas, es la sensibilidad de los reactivos a la luz y a la temperatura, por lo que se recomienda considerar estos parámetros tanto para conservar la viabilidad de los reactivos, como para garantizar su actividad óptima de reacción.

En 1976 Un grupo de siete hematólogos de origen frances, americanos y británicos, propusieron una clasificación para las leucemias agudas, basada en criterios morfológicos y citoquímicos. Sobre las bases de esta clasificación se agruparon los resultados de este trabajo en la tabla No. 5, dónde se relacionan los diferentes tipos de leucemias y su grado de positividad en cada una de las técnicas citoquímicas practicadas, observándose una gran concordancia entre el grado de positividad y las características morfológicas de la célula predominante en cada tipo de leucemia, particularmente en la M-3 que manifiesta una marcada relación, debido al contenido de granulación que presentan las células a medida que sufren el proceso de maduración. Por lo tanto, se considera de gran importancia, hacer notar que no existe una especificidad de las pruebas histoquímicas al tipo de leucemia, sino mas bien a una línea celular.

En base a la característico morfológica relacionada con la presen -

cia o ausencia de gránulos citoplásmicos, la tabla No. 5 muestra la gran utilidad que confieren las pruebas histoquímicas en la identificación diferencial de las leucemias no linfoblásticas, así como también en la clasificación de los diferentes subtipos.

En los que se refiere a las linfoblásticas, los resultados muestran una positividad citoquímica casi nula, lo que permite establecer su clasificación diferencial, sin embargo para llegar a diferenciar cualquiera de los tres tipos, es necesario atender a las características morfológicas celulares y a los resultados de la tinción de PAS.

Considerando lo anteriormente expuesto, se puede concluir que la identificación del tipo de leucemia en el establecimiento de un diagnóstico, representa una herramienta decisiva para la elección del tratamiento y la elaboración del pronóstico.

## R E S U M E N

Se estandarizaron varias tinciones citológicas con el objeto de corroborar en el diagnóstico de los diversos tipos de leucemia, utilizando para ello frotis de sangre periférica.

Las tinciones realizadas en este trabajo fueron: la tinción de Per--  
roxidasa, de Negro Sudán, de PAS, de Esterasa no específica (alfanaftil) y de Wright.

Los frotis teñidos se agruparon de acuerdo a la clasificación establecida por el grupo FAB.

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

1. Davidsohn I. y J. B. Henry. 1979. Diagnóstico clínico por el Laboratorio. 6a. ed. Editorial Salvat, México.
2. Wintrobe Maxwell M. 1948. Hematología Clínica. 2 ed. Editorial Interamericana, México.
3. Leavell B. y O.A. Thorup. 1978. Hematología Clínica. 4a. ed. Editorial Interamericana, México.
4. Bennett J.M., D. Catovsky y otros. 1976. "Proposal for the classification of the Acute leukaemias". British Journal of Haematology. 33: 451-458.



5. Gralnick h., D. A. Galton y otros. 1977. "Classification of Acute Leukemia Annals of Internal Medicine. 87: 740-753.
6. Bennett J. M., D. Catovsky y otros. 1981. "The Morphological Classification of Acute Lymphoblastic Leukaemia: Concordance among observers and Clinical correlations." British Journal of Hematology. 47: 553-556.
7. Jehn V., E. Thiel y R. Baumgart. 1980. "Auer-Bodies in Acute Lymphocytic Leukemia (ALL)." Blood. No. 1 55: 167-168.
8. Tobelm G., C. Jacquilat y otros. 1980. "Acute Monoblastic Leukemia: A clinical and Biologic study of 74 cases". Blood No. 1 55: 71-76.
9. Ham Artur W. 1975. Tratado de Histología. 7a. ed. Editorial Interamericana. México.
10. Lynch Raphael, Mellor y otros, 1972. Métodos de Laboratorio. 2a. ed. Editorial Interamericana. México.
11. Troyer Henry. 1980. Principles and Techniques of Histochemistry Little Brown and Company, Boston.
12. Yam Lt., Cy Li y W. H. Crosby. 1971. "Cytochemical Identification of Monocytes and Granulocytes." A.J.C.P. 55: 283-290