



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Ciencias Químicas
Licenciatura en Químico Farmacobiólogo

**“Estandarización de técnicas histoquímicas en
componentes hematopoyéticos de medula ósea de rata
Wistar”**

TESIS

**Presentada como requisito parcial para obtener el título de:
Licenciado en Químico Farmacobiólogo**

Presenta:
Miguel Rovirola Forcelledo

Director
Dr. Samuel Treviño Mora

Asesor
Dra. Violeta Aburto Luna

Agosto 2017

Agradecimientos

Agradezco primeramente a mi madre, por todo el apoyo incondicional que me brindo para poder culminar con esta etapa de mi vida, que me enseñó que con dedicación y esfuerzo se puede lograr lo que quieras.

Igualmente a mi familia por estar siempre a mi lado.

A mi director y asesor, por compartir su conocimiento y guiarme en este proyecto, ya que sin su ayuda no me hubiese sido posible terminarlo.

A mis amigos por estar ahí para escuchar cada que tenía problemas con este trabajo.

Índice

MARCO TEÓRICO.....	4
Microambiente hematopoyético	4
Linajes celulares.....	8
Tinciones histoquímicas	16
Wright.....	16
Mieloperoxidasa (MPO)	20
Sudan Negro B	21
Reacción el ácido peryódico de Schiff (PAS).....	23
Tinción de Perls	24
Fosfatasa acida.....	25
Esterasa inespecífica alfa alfa naftil acetato esterasa (ANAE)	26
Técnicas inmunológicas	27
Hemoaglutinación directa.....	27
Hemoaglutinación indirecta.....	28
Técnica de enzimoimmunoensayo.....	28
Citometría de flujo	29
Medula Ósea	30
Patología en medula ósea	30
PLANTEAMIENTO DEL Problema.....	31
Justificación.....	32
Objetivos	33
Objetivo general	33
Objetivos particulares.....	33
Hipótesis nula.....	34
Hipótesis alternativa	34
Diagrama de trabajo.....	35
Material y métodos	36
Discusión de resultados	39
CONCLUSIÓN	77
Bibliografía.....	78
Anexos	94

Extracción de medula ósea.....	94
Tinción de Wright	94
Tinción de Perls	95
Mieloperoxidasa	95
Tinción de PAS	95
Tinción de esterasa.....	96

MARCO TEÓRICO

Microambiente hematopoyético

Las células madres se encuentran en la medula ósea, estas cuentan con la doble capacidad tanto de renovarse, como de crear nuevas células de tejido mesenquimal, con la finalidad de que el proceso de producción de células maduras sea constante y eficaz (Figura 1). Parte importante en el abordaje de la maduración es que las células totipotentes antes de diferenciarse a un linaje específico, es decir cuando son consideradas pluripotentes o multipotentes, cuentan con un ciclo de renovación de ellas mismas, sin embargo, para poder proliferar o diferenciarse son necesarios otros factores externos que se les denomina microambiente hematopoyético[1].

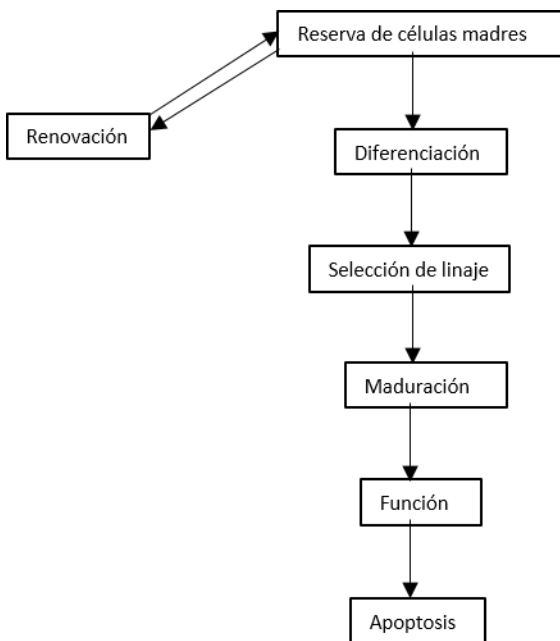


Figura 1-Estadios del desarrollo hematopoyético [1].

En el ambiente hematopoyético existen células como macrófagos, adipocitos, fibroblastos estromales, osteoblastos, osteoclastos, neuronas o cuerpos neuronales, entre otros, que regulan la interacción célula-célula, las cuales expresan el complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC II), marcadores de diferenciación leucocitaria (CD = cluster of differentiation, por sus siglas en inglés), CD45, CD24, CD11c, C68, y regulan la secreción de citosinas, factor estimulante de colonias monocíticas

(FEC-M), factor estimulante de colonias granulo monocíticas (FCE-GM), diferentes clases de interleucinas (IL) como: IL1, IL3, IL6, IL8, factor de necrosis tumoral alfa (TNF α)[1].

Al conjunto de células y componentes que ayudan a proliferar y madurar a las células madre se les denomina ambiente hematopoyético (Figura 2), teóricamente está dividido en 3 partes:

1. Zona osteoblástica (localizada cerca de los osteoblastos)
2. Zona medular de células madres hematopoyéticas (CMH's) quiescentes y proliferantes
3. Zona vascular (cerca de los sinusoides)

Zona osteoblástica: los osteoblastos interactúan con las células madre hematopoyéticas con ayuda de la N-caderina, induciendo su diferenciación a osteocitos para continuar con la formación del hueso y la β -1 integrina que se une a la fibronectina ayudando a que las células estromales se unan con la médula ósea [3-4].

Zona medular: Se encarga del control de la proliferación de las CMH's. Las células progenitoras secretan diversos factores para inhibir la proliferación de las células cercanas; sin embargo, cuando dicha celularidad disminuye entonces el número de las CMHs vuelven a proliferar [3-4].

Zona vascular- se encuentra cerca de los sinusoides, que permite que salgan las células maduras a la circulación, juega un rol importante en la auto renovación de las CMH's, otros estudios sugieren que ayuda a la maduración y diferenciación de las células con un microambiente más rico en oxígeno y en factores de crecimiento[3-4].

Los macrófagos de médula ósea están encargados de eliminar elementos o material ajeno al microambiente hematopoyético, siempre con ayuda de las células dendríticas, así como también liberan factores importantes para la hematopoyesis como TNF-alfa, IL-1 β , IL-6, IL-8 and IL-12; las células dendríticas presentan el antígeno a otras células del sistema inmune [5].

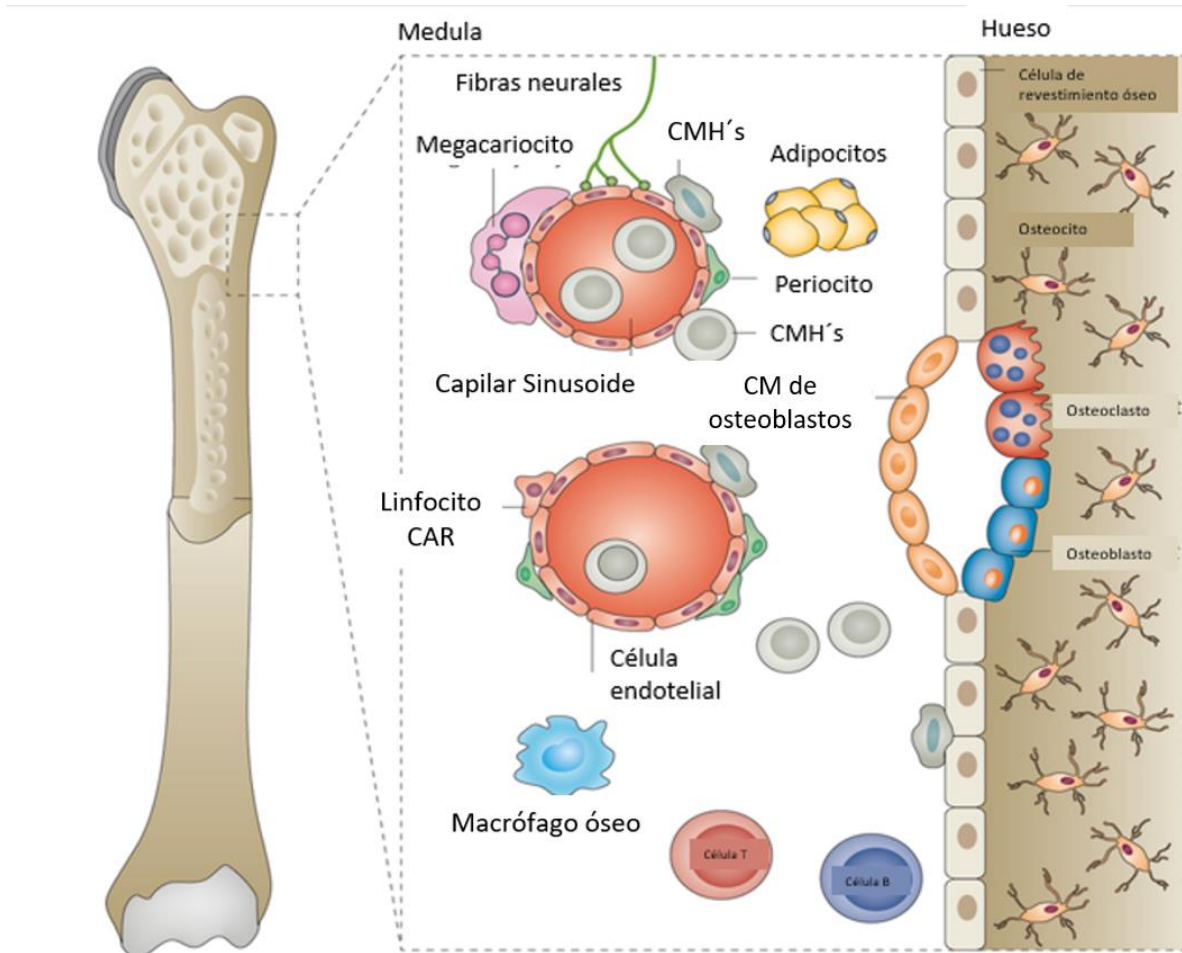


Figura 2-Células que componen el ambiente hematopoyético [2].

Los osteoblastos interactúan con CMH's por medio de moléculas de adhesión (ICAM-1), manteniéndolas en un estado de reposo, los factores que regulan la linfopoyesis de células B afectan osteoblastos y osteoclastos. Los osteoclastos que derivan de células indiferenciadas de linajes monocito-macrófago, necesitan factor RANKL Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand o en español "Ligando de Receptor activador para el factor nuclear κ B o factor de diferenciación de osteoclasto. Las CMH's tienen una población en médula ósea de aproximadamente el $<0.01\%$, y poseen la capacidad de la renovación y regeneración del tejido mesenquimal [6].

Las CMHs como se ha mencionado son células pluripotenciales, es decir, que se pueden diferenciar en células de cualquier linaje (Figura 3); particularmente las CMHs que tienen actividad repobladora expresan CD34/CD38, y son inusuales en medula ósea (<0.1%). Con ayuda de los factores de transcripción PU1 y GATA1 se logra diferenciar estas células pluripotentes, es decir, solo se puede diferenciar en linajes específicos, en este caso se diferencian en el progenitor mieloide mixto (CMP) y en progenitor linfoide común (CLP) [1].

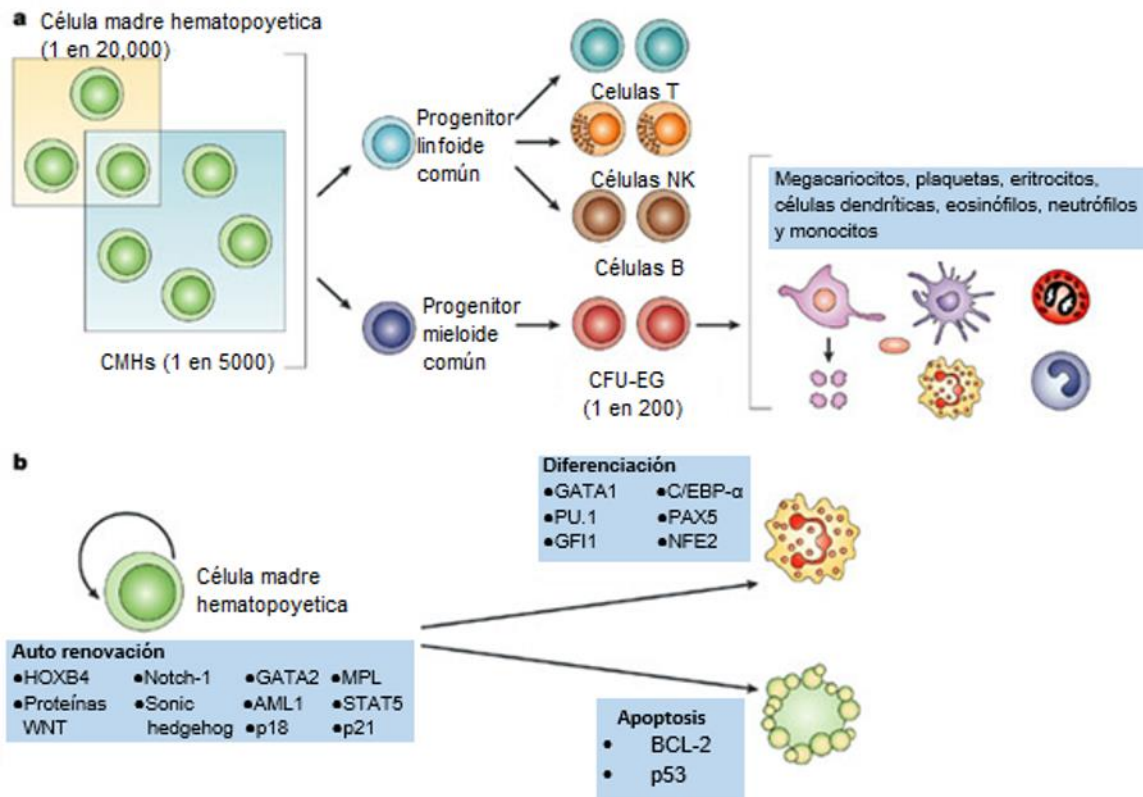


Figura 3 – A) Proceso de autorenovación y posibles linajes de las CMH's
 B) Factores que intervienen en la autorenovación, diferenciación y apoptosis de las CMH's [7].

LINAJES CELULARES

La hematopoyesis es un proceso donde células madres se diferencian, dando origen a diferentes tipos de células circulantes maduras (Figura 4). En general, la hematopoyesis se divide en cuatro linajes, que son los más comunes, pero no los únicos, dicha división está conformada en linfopoyesis, mielopoyesis, megacariopoyesis y eritropoyesis.

Las células madre se diferencian con la interacción con ciertas interleucinas, dando origen a células madres mieloides (IL-1, 6, 3) y linfoides (IL-1, 6); las células madre mieloides interactúan con el factor estimulante de crecimiento granulomonocítico y con la IL-3 generando la unidad formadora de colonias de granulocitos, eritrocitos, monocitos y megacariocitos (UFC-GEMM) [6].

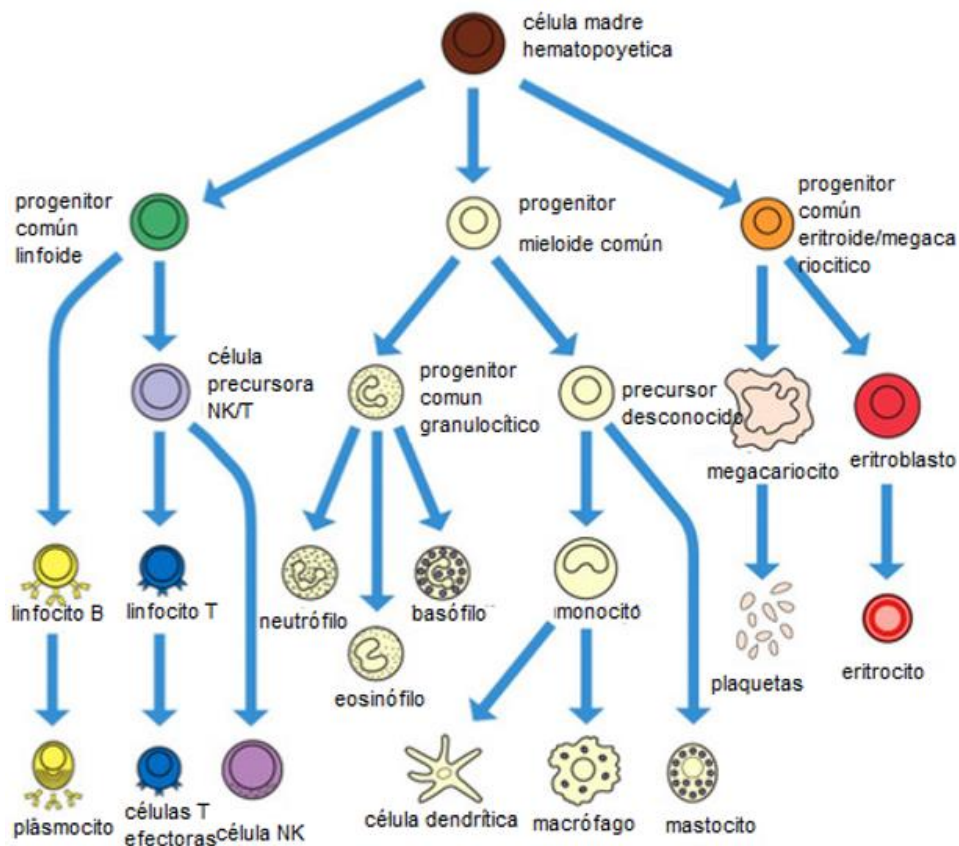


Figura 4-Líneas de maduración celulares [8].

La eritropoyesis (Figura 5) comienza cuando el progenitor mieloide/megacariocítico se diferencia a la unidad formadora de colonias eritroides o CFU-E por sus siglas en inglés, por medio del GATA-1.

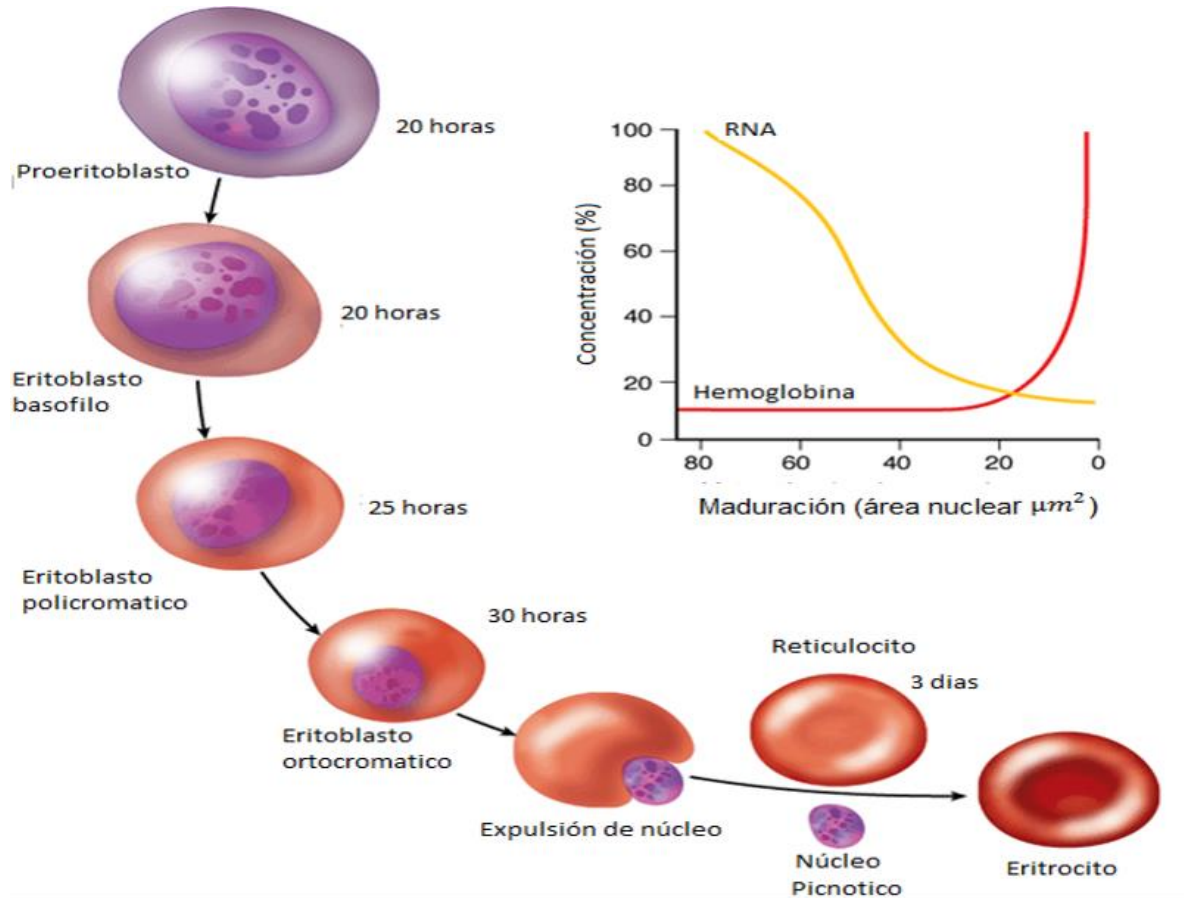


Figura 5 – Etapas y tiempo de maduración del eritrocito [11]

El Proeritoblasto es la célula más inmadura del linaje eritroide que se puede reconocer por tinciones asociadas a microscopía de campo claro, esta es una célula de 15-19 μm inmadura que procede de la CFU-E (eritroide). Este progenitor comienza la síntesis de hemoglobina (Hb), por lo que presenta un citoplasma abundante con presencia de aparato de Golgi, ribosomas libres, escasos gránulos azurófilos, y un núcleo con poca heterocromatina, pero presenta nucléolos. Carece

de abundante retículo endoplásmico rugoso (RER). Histológicamente, son células que se tiñen de azul en el citoplasma en la tinción de Wright, debido a la abundante presencia de ribosomas y poca hemoglobina. Las células hijas expresan más hemoglobina. Es entonces cuando se puede denominar eritroblasto basófilo. El citoplasma es aun azul intenso por el alto contenido ribosomal, el cual tiene características ácidas, haciéndolo más afín a colorantes básicos [1].

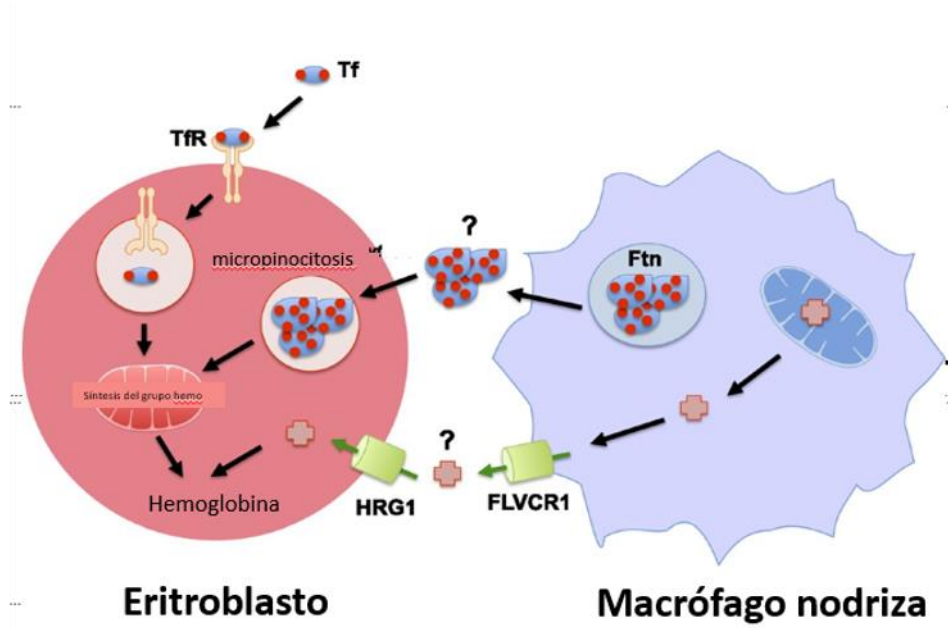


Figura 6-Interacción macrófago nodriza- eritroblasto para empezar a producir hemoglobina [9].

La hemoglobina (Hb) es una proteína globular, que está presente en altas concentraciones en los glóbulos rojos y se encarga del transporte de O_2 del aparato respiratorio hacia los tejidos periféricos; y del transporte de CO_2 y protones (H^+) de los tejidos periféricos hasta los pulmones para ser excretados. El Hem es una molécula plana que consta de un hierro ferroso (Fe^{2+}) y un anillo tetrapirrólico, la protoporfirina III o IX. El Hem es un factor fundamental en la regulación de la tasa de síntesis de la globina. Su principal efecto se ejerce en el inicio de la traducción, donde bloquea la acción de un inhibidor de la producción de globina. También participa en la transcripción y el procesamiento del ARNm. Por lo que, el átomo de hierro que se

encuentra en estado de oxidación ferroso (+2) puede formar 5 o 6 enlaces de coordinación dependiendo de la unión del oxígeno a la Hb [10].

Al seguirse dividiéndose, las células sintetizan más hemoglobina, y entonces se le denomina eritroblasto policromatófilo (Figura 6). Cabe resaltar que en condiciones fisiológicas en sangre periférica no se encuentran; sin embargo, en procesos de sangrado severo, anemias hemolíticas y circunstancias en las cuales el número de eritrocitos disminuya súbitamente o la concentración de hemoglobina decaiga, y coincidan con una alta eritropoyesis pueden hallarse en la periferia. En médula ósea son comunes de hallar manteniendo la relación del ambiente hematopoyético, ya que es allí donde se diferencian en eritrocito ortocromático o normoblasto policromatófilo que va perdiendo el núcleo por procesos de cariorresis y cariólisis. De esta manera, el material nuclear sale de la célula, y esta célula anucleada permanece en la vecindad del sinusoides. Además, los normoblastos y reticulocitos pierden sus ribosomas (y por ende la capacidad de síntesis de proteínas, y entran a la circulación generalmente, como eritrocitos. El 1-3% de los eritrocitos circulantes presentan basofilia difusa, y por lo tanto presentan finas redes de ribosomas que se ponen de manifiesto por métodos histoquímicos que presenten características de tinción o coloración supravital como azul de metileno o de cresilo). Por eso se les llama reticulocitos. Al madurar los eritrocitos son anucleados con forma de disco bicóncavo. Cuando hay un exceso de hierro en medula ósea, es posible que acumulen hierro [1].

Por otro lado, durante la Granulopoyesis, la unidad formadora de colonias de granulocitos, eritrocitos, macrófagos y megacariocitos (UFC-GEMM) se transforma a unidad formadora de colonias granulocítica y monocítica (UFC-GM) dando origen a las unidades formadoras de colonias granulocítica / monocítica/eosinofila respectivamente (UFC-G/M/EO), aunque para los basófilos la UFC-GEMM solo interacciona con la IL-3 dando origen a la unidad formadora de colonias basofila (UFC-Bas). La granulopoyesis puede identificarse por la primera célula diferenciable por características morfológicas, la cual corresponde al mieloblasto, esta tiene un tamaño entre 15-20 μm , de forma redondeada u oval y de contorno liso. El núcleo,

de gran tamaño en relación con el diámetro celular, es redondo y está provisto de una cromatina finamente reticulada, con presencia de un nucléolo prominente. El citoplasma es de color basófilo, aunque menos intenso que el del proeritroblasto, es escaso y está desprovisto ópticamente de granulación y endosomas. A nivel ultraestructural pueden detectarse gránulos que contienen diversas enzimas, de las cuales la mieloperoxidasa es la representativa y se sintetiza en el retículo endoplásmico y aparato de Golgi, resguardándose en gránulos primarios [6].

La mieloperoxidasa, cataliza la conversión del peróxido de hidrógeno y cloruro a ácido hipocloroso. Este es un potente agente oxidante que contribuye al mecanismo de defensa contra los agentes infecciosos; sin embargo, puede ser capaz de actuar sobre las células del hospedero [12].

El promielocito es la célula sucesora del mieloblasto, tiene un tamaño ligeramente superior al de su precursor (16-25 μm), su forma es redondeada u oval. La cromatina puede ser laxa como el de un mieloblasto o puede ser un poco más densa, por lo tanto aún podemos apreciar un nucléolo ligeramente visible. El citoplasma es amplio y basófilo, y contiene un número variable de gránulos primarios o azurófilos, que se disponen alrededor del núcleo dejando una zona más clara, agranular, que corresponde a la zona centrosómica. La granulación azurófila toma una coloración rojo-violácea con las tinciones panópticas habituales. Los promielocitos son citoquímicamente positivos a la mieloperoxidasa, fosfatasa ácida, arilsulfatasa y naftol-AS-D-cloro-acetatoesterasa. Su contenido en mieloperoxidasa es responsable de la positividad con el negro Sudán. El citoplasma posee glucógeno, detectable citoquímicamente con la tinción del PAS [13 - 14].

A medida que progresa la maduración del promielocito, éste se transforma en mielocito, célula redondeada de tamaño entre 12 y 18 μm . El núcleo, también redondeado, posee una cromatina condensada en cúmulos, de color violeta oscuro y sin nucléolo visible. El citoplasma que ha perdido toda su basofilia, contiene un gran número de gránulos secundarios y comienza la síntesis de los gránulos terciarios. A partir de este estadio comienza la formación de la granulación secundaria específica (neutrófila, eosinófila, basófila), que junto a la primaria

persiste en todos los elementos de la serie. Para el eosinófilo su proceso de maduración es muy parecido al del neutrófilo, pero se distingue en que este presentará gránulos grandes y numerosos, que contienen un compuesto cristalóide formado mayoritariamente por una proteína básica, la cual condiciona la tinción de los gránulos, presentándose de color naranja; para el caso particular del basófilo, no es completamente conocido el proceso de maduración desde la célula troncal, ya que esta célula presenta un doble linaje de producción, el mielóide y las células troncales de estirpe mastocito; sin embargo, en maduración son indistinguibles ya que los gránulos se presentan con una alta apetencia basófila . [15 - 16]

El metamielocito tiene un tamaño entre 10 y 15 μm , y posee las mismas características morfológicas del mielocito, exceptuando la forma del núcleo, el cual adopta un aspecto reniforme, con la parte convexa situada en la periferia celular y la cóncava dirigida hacia el centrosoma. El núcleo está dotado de una cromatina condensada en numerosos cúmulos cromáticos. Esta célula ha perdido la capacidad mitótica [1 - 16].

La siguiente etapa de maduración es el neutrófilo/eosinófilo/basófilo en banda este se caracteriza por el estrechamiento del núcleo del metamielocito formando una banda en forma de C o S, en los neutrófilos se caracteriza por la producción de gránulos terciarios, que contienen lisosomas y acetiltransferasa entre otros compuestos y en la membrana aparecen receptores para el complemento, específicamente "Complement receptor 1&3". Esta célula ya posee funciones de adhesión y fagocitosis. A medida que la muesca de nucleó crece, algunos filamentos de membrana y heterocromatina forman segmentos y crean un núcleo lobulado y recibe el nombre de neutrófilo/ eosinófilo/basófilo polimofronuclear (segmentado) [13].

Neutrófilos: Constituyen del 55 al 60% en los granulocitos, miden 9-12 micras de diámetro y tienen de 2 hasta 5 lobulaciones, los más inmaduros tienen el núcleo en cayado, la cantidad de lobulaciones aumenta con la edad del leucocito. Los neutrófilos cuentan con 2 tipos de gránulos los inespecífico o primarios que contienen mieloperoxidasa, hidrolasas ácidas y glucoronidasas; mientras que los

específicos o secundarios contienen fosfatasa alcalinas, colagenasas, lisozima, lactoferrina y fagocitina [16].

Eosinófilos: Su porcentaje en sangre va de 1-3%, son bilobulados, miden 12-15 micras. Contiene proteína básica mayor, proteína catiónica eosinofila, neurotoxina derivada de eosinófilos y fosfatasa acida [16].

Basófilos: Son los menos abundantes 0.5-1%, miden 8-10 micras, suelen tener de 2-3 lóbulos contienen gránulos de 0.5 micras densamente agrupados y estos contiene histamina, heparina, factor quimiotáctico de los eosinófilos/neutrófilos y lisosomas [16].

Por otro lado, en la Monopoyésis, todo comienza cuando la CFU-GEMM que con la ayuda de IL3, KL y GM-CSF se transforma en monoblasto, este se caracteriza por su cromatina laxa y su citoplasma basófilo, no es agranular, su núcleo localizado de manera excéntrica que contiene uno o dos nucléolos visibles, cuando se tiñe es débilmente mieloperoxidasa (MPO) positivo; cuando madura se llama promonocito, la característica principal es su núcleo irregular con una escotadura, presentan una mayor cantidad de gránulos, el nucléolo esta doblado o torcido, poseen motilidad y pueden participar en la fagocitosis. Los monoblastos completan su maduración cuando salen al torrente sanguíneo, transformándose en monocito, algunas de sus principales características son: núcleo centralizado con forma de herradura y se observan pliegues, vacuolas en el citoplasma, algunas veces tienes una granulación PAS positiva entre fina y moderada [14 - 16].

Por su parte en la linfopoyesis que inicia en la medula ósea, los linfocitos no maduran completamente en ella, si no que migran a otros tejidos para terminar su maduración. Comienza con el progenitor linfoide común (CLP), es la primera célula en expresar receptor para la IL7, esta dará origen a los precursores B, T y a las células "natural killers" (NK). La CLP de la célula B precursora interactúa con las células del estroma de medula ósea, exponiendo receptores de antígeno muy tardío (Very late antigen) VLA-4, VLA-5 y antígeno 1 de función leucocitaria (LFA-1) que se unen a la molécula de adhesión vascular VCAM-1, a la fibronectina y al ICAM-1. Esta interacción está regulada positivamente por la interleucina 7, el ligando kit

(KL), IL11, el factor derivado de las células estromáticas, el factor de crecimiento tipo insulina, la hormona tiroidea. Los inhibidores son: la IL1, IL4, el factor transformante del crecimiento β (TGF- β) y el interferón γ , convirtiéndose en linfoblasto (pro-B), esta célula mide 10-18 μm , núcleo redondo u ovalado que contiene cromatina laxa, citoplasma escaso, el linfoblasto interacciona por medio de la interacción de c-kit (CD117) y factor de células madre (SCF), lo que ocasiona que la célula exprese receptores para la IL7, a esta célula se le conoce como prolinfocito (pre-B), morfológicamente difiere del linfoblasto por una cromatina ligeramente condensada, reducción de la prominencia nucleolar y por el cambio del grosor en la membrana del núcleo. Cuando madura se convierte en un linfocito B inmaduro mide de 11-14 μm , tiene gránulos azurófilos, la relación de núcleo citoplasma es similar, en esta célula se desencadena la reorganización de los genes de las inmunoglobulinas citoplasmáticas principalmente D y M, cuando el linfocito B posee un complemento integro de IgM e IgD se considera que es un linfocito B maduro. Cada una de las diferentes células puede identificarse por sus antígenos CD de superficie, designados con un número. La célula precursora y la pro B se caracterizan por tener una enzima nuclear llamada desoxi-nucleotidil-transferasa terminal (TdT) [16].

Por otra parte el estadio de los linfocitos T en medula ósea es muy corta; ya que el linfocito más primitivo que se encuentra en medula ósea es la unidad formadora de colonias linfoides (CFU-L) viaja hacia el timo para su maduración y diferenciación, esta solo se puede reconocer con inmunomarcadores específicos. Los linfocitos ocasionalmente presentan gránulos positivos a la tinción de ácido peryódico de Schiff (PAS por sus siglas en inglés), pero generalmente son negativos [1].

En cambio los linfocitos NK llevan a cabo su maduración en la MO, para asegurar el linaje de la NK desde la CLP interviene el factor de transcripción ID2 y el factor E4EP4, el primero secuestra a la proteína E2A asegurando este linaje. Una vez que se especifica el linaje se conoce como célula inmadura NK, para continuar la maduración interviene la IL15, convirtiéndose en una célula NK inactiva, esta se caracteriza por tener un citoplasma granular, en esta etapa dependerá del

microambiente que la rodea para activarse, cuando pone en contacto con citosinas inflamatorias para a ser una célula NK activa [17 – 18 - 19].

TINCIONES HISTOQUÍMICAS

Wright

El reactivo de Wright está compuesto por eosina y azul de metileno, cuando este se oxida se conoce como azurB. La eosina es un colorante ácido que tiene afinidad por componentes alcalinos. La propiedad de este compuesto está basada en su polaridad negativa, lo que le permite enlazarse con componentes celulares de carga positiva; por esta razón colorea componentes citoplasmáticos, la tonalidad resultante es rosada-anaranjada para citoplasma y rojo intenso para eritrocitos. El color azul de los núcleos es dado por el complejo azul de metileno- DNA. El resultado de la tinción se puede ver afectada por diferentes factores como el pH de los colorantes y de la solución amortiguadora.

azurB-DNA

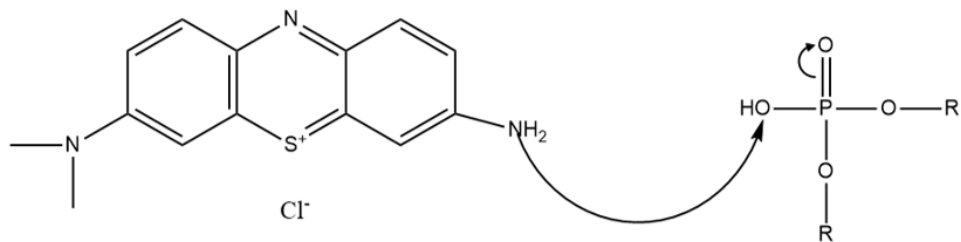


Figura 7-El grupo amino se une al fosfato, provocando que el enlace doble del oxígeno se rompa y el oxígeno se quede con más electrones, por lo tanto adquiere carga negativa.

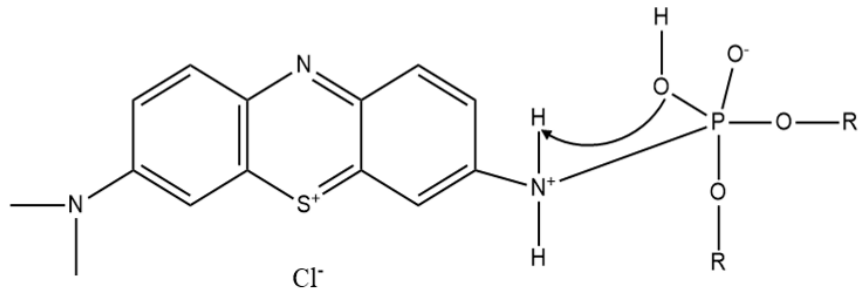


Figura 8-El oxígeno del grupo alcohol con su par electrones libres atrae al hidrogeno del amino, quedando con carga positiva.

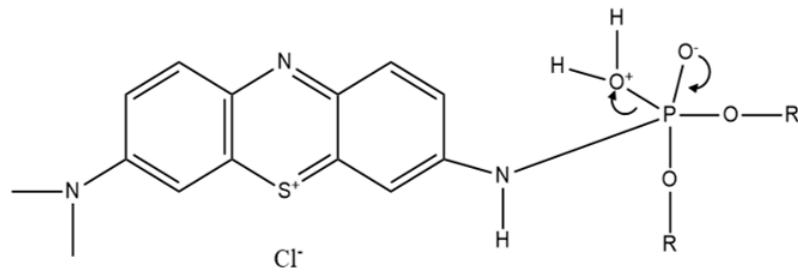


Figura 9-El oxígeno positivo recupera sus electrones rompiendo el enlace con el fosfato y el oxígeno con carga negativa vuelve a crear un enlace doble con el fosfato.

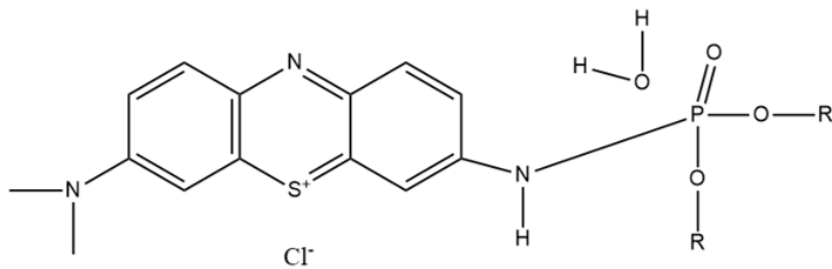


Figura 10 -Con la unión azurB-DNA se genera el color morado en la tinción de Wright

Eosina

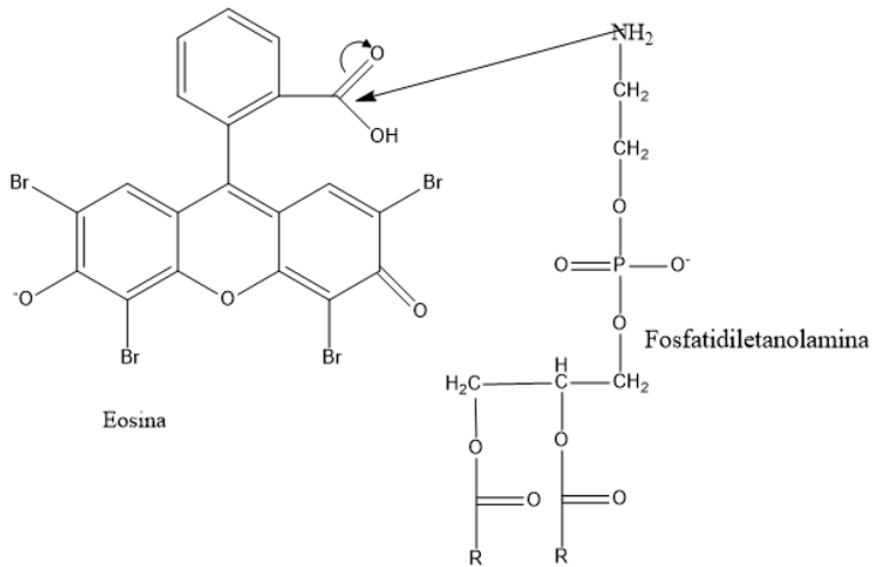


Figura 11 –El grupo amino hace un ataque nucleofílico al carbono del ácido carboxílico y el oxígeno del doble enlace recupera sus electrones quedando con carga negativa.

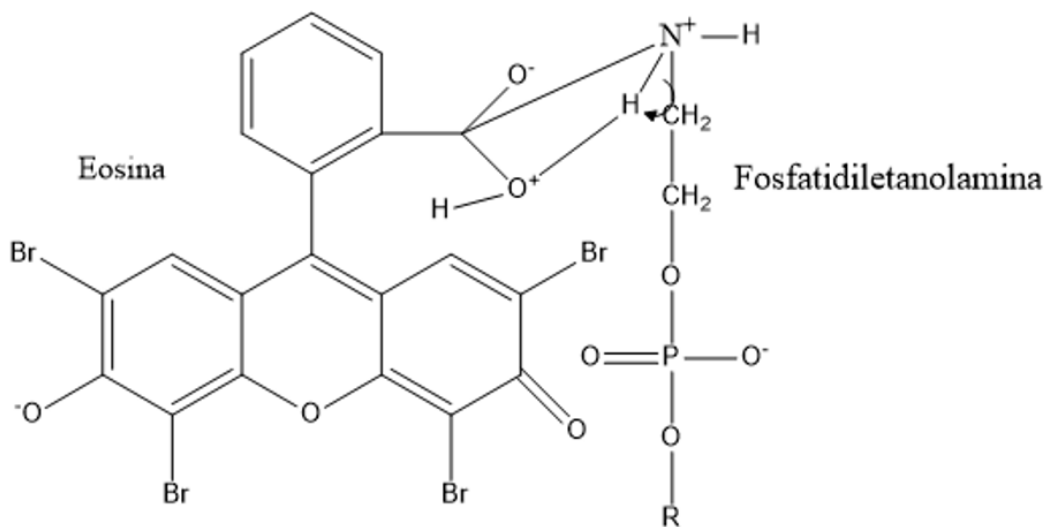


Figura 12 –El oxígeno atrae un hidrógeno del grupo amino, quedando con carga positiva.

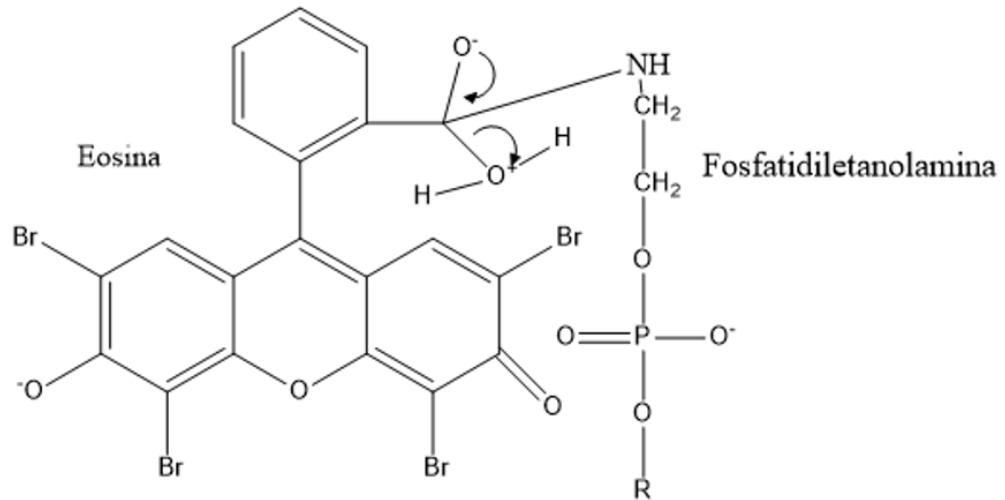


Figura 13–El oxígeno positivo recupera sus electrones rompiendo el enlace con el carbono, el oxígeno negativo vuelve a formar un doble enlace con el carbono.

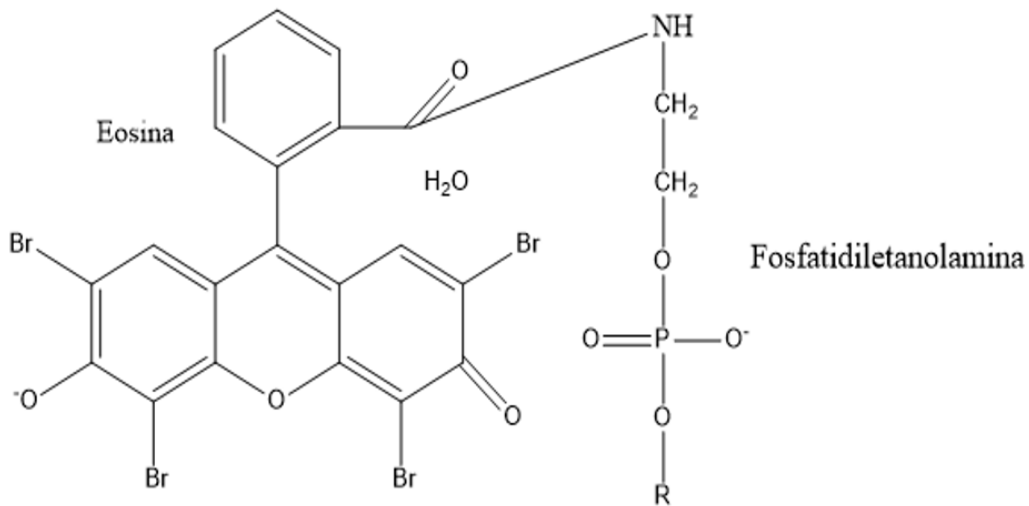


Figura 14 –Al final de reacción se obtendrá una molécula de agua y el complejo eosina-Fosfatidiletanolamina, este complejo generará el color rosado de la tinción.

Mieloperoxidasa (MPO)

La mieloperoxidasa se sintetiza en el retículo endoplasmático rugoso, de donde pasa a las cisternas del aparato de Golgi quedando localizada fundamentalmente en la granulación 1ª o azurófila. Se localiza sobre todo, en los gránulos primarios de los neutrófilos y precursores, así como en los gránulos de los eosinófilos y monocitos. La enzima se combina in vivo con peróxido de hidrógeno transformándose en un potente agente bactericida, viricida y fungicida. La enzima se encuentra en los gránulos azurófilos o inespecíficos. La aplicación fundamental de la mieloperoxidasa se refiere a la capacidad discriminatoria entre celularidad blástica mieloide y linfoide, ya que los mieloblastos muy precoces sin estigmas de diferenciación mieloide ya pueden ser mieloperoxidasa positivos. Un déficit de mieloperoxidasa en los polimorfonucleares (PMN) maduros, excepto en el caso de que se trate de una deficiencia congénita, debe interpretarse como un signo disgranulopoyético. Su interpretación es positiva en células granulocíticas, las células del sistema mononuclear fagocítico no se tiñen [20].

Su fundamentó se basa en la acción de la enzima, que en presencia de peróxido de hidrógeno oxida al clorhidrato de bencidina, lo que ocasiona que de ser incolora se torne a un color marrón [21 - 22].

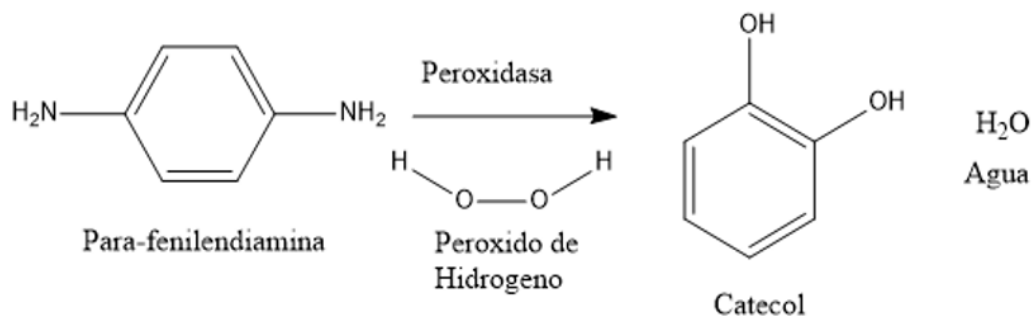


Figura 15- La enzima peroxidasa reconoce a la Para-fenilendiamina en presencia de peróxido de hidrógeno y lo oxida dando como producto Catecol y agua.

Sudan Negro B

El sudan negro B es un colorante diazónico que tiñe fosfolípidos, grasas neutras y esteroides de la membrana de los gránulos tanto específicos como inespecíficos de los neutrófilos y percusores. Aparecerán teñidos sus gránulos de un color gris muy oscuro, aunque los eosinófilos cuentan también con granulación, estos aparecerán con una zona de palidez en el centro, los monocitos pueden o no teñirse, dependerá de si tienen gránulos o no; los linfocitos y linfoblastos son negativos. Los resultados que se observan son paralelos a la tinción de mieloperoxidasa [23].

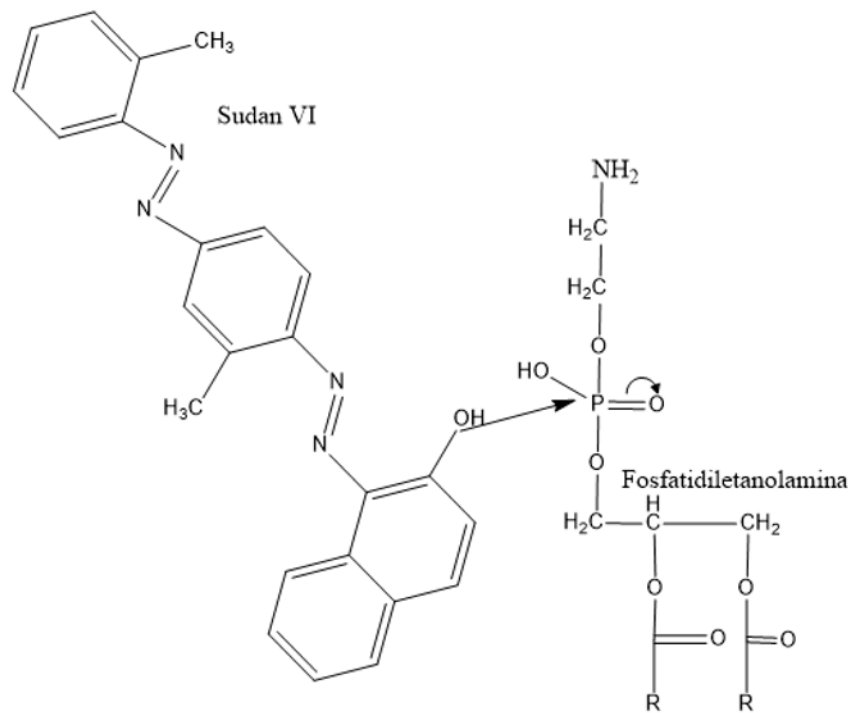


Figura 16- El grupo hidróxido hace un ataque nucleofílico al fosfato.

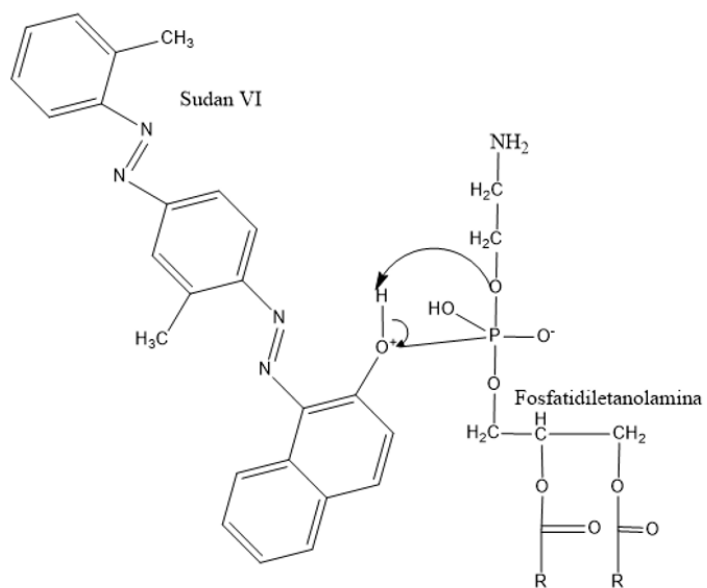


Figura 17- El oxígeno que ataco al fosfato queda con carga positiva y recupera electrones del hidrógeno, que este es atraído por el oxígeno correspondiente a la etanolamina.

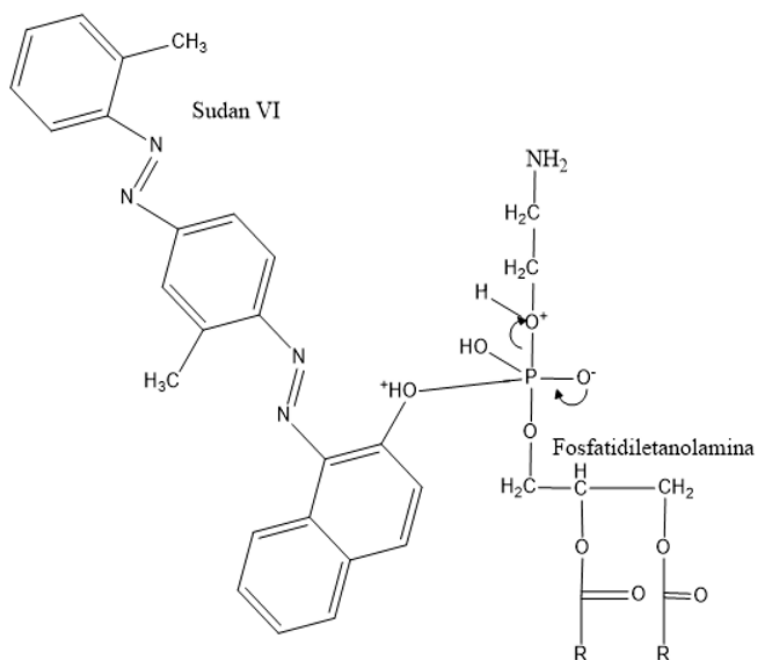


Figura 18-El oxígeno negativo vuelve a formar el doble enlace con el fosfato y el oxígeno positivo recupera sus electrones rompiendo el enlace con el fosfato.

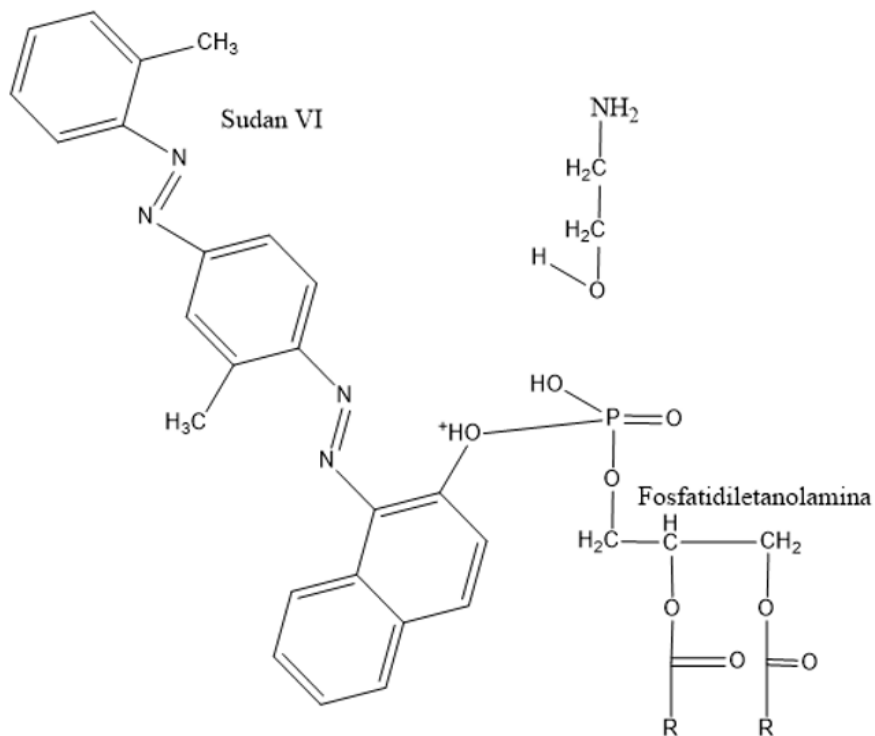


Figura 19- Quedando unido el sudan al lípido y la etanolamina separada.

Reacción el ácido peryódico de Schiff (PAS)

La reacción de PAS o del ácido peryódico de Schiff se basa en la oxidación de los grupos 1,2 glicol en aldehídos, por la acción del ácido peryódico, potente agente oxidante, los grupos aldehído se combinan con el reactivo de Schiff dan un compuesto de color rojo púrpura intenso. Identifica al glucógeno en el citoplasma celular. Los componentes celulares que contiene polisacáridos, mucopolisacáridos y glucoproteínas poseen el grupo 1,2 glicol por lo tanto se tiñen [24].

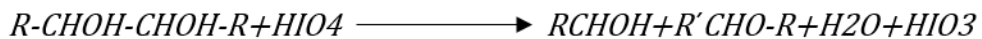


Figura 20- El ácido tretaoyódico(VII) oxida los grupos aldehído de los lípidos.

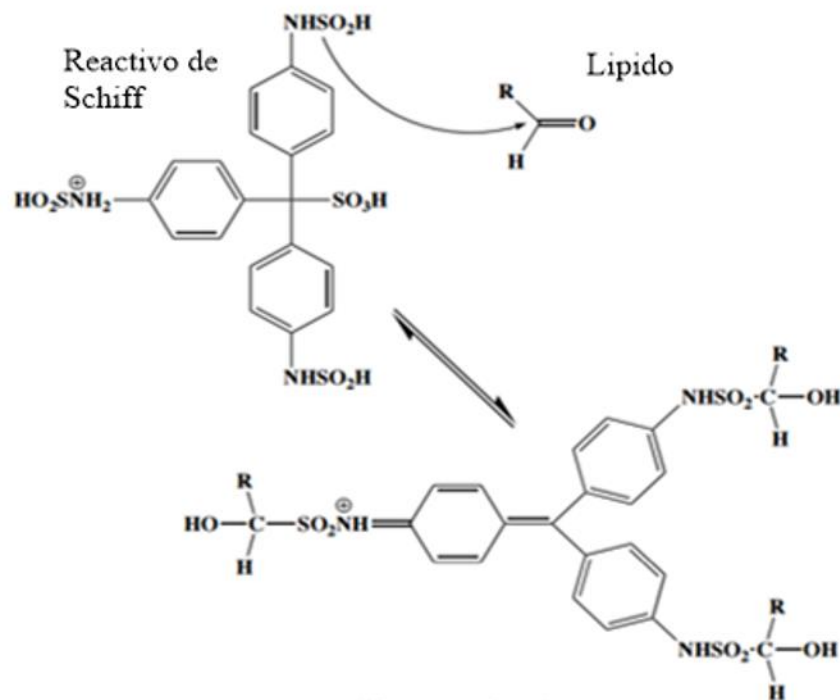


Figura 21-El reactivo de Schiff reconoce a los grupos aldehído, generando el color rosado [25].

La reacción de Pas es muy útil en la diferenciación de diferentes tipos de leucemias linfoblásticas, en la eritroleucemia y en diversas mielodisplasias. En la tinción se observara un precipitado de color rojo purpura los polinucleares neutrófilos y algunos elementos de la serie mieloide [26].

Tinción de Perls

Esta tinción es fundamental para conocer las reservas de hierro en la medula ósea, lo cual es fundamental para el diagnóstico de una variedad de condiciones asociadas a la anemia. Ocurre una liberación de los iones férricos de su unión con las proteínas por la acción del ácido clorhídrico, los iones al reaccionar con el ferrocianuro de potasio, forman un precipitado azul de ferrocianuro férrico [27].

La intensidad del color es un parámetro solamente cualitativo y su utilidad es evaluar las reservas de Fe al permitir una semicuantificación de los depósitos. Los depósitos de hierro los podemos encontrar en células inmaduras eritrocitarias y en macrófagos nodriza. Se observara su actividad de la fosfatasa alcalina por un precipitado azul brillante en los gránulos [28].

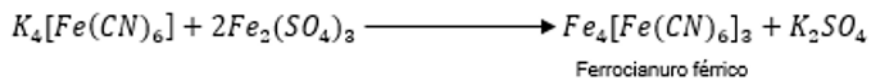
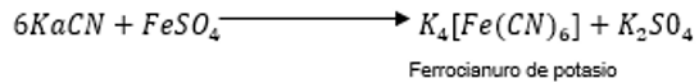


Figura 22-Cuando los iones son liberados reaccionan con el ferrocianuro de potasio, esta unión da como resultado una coloración azul.

Fosfatasa acida

Se basa en la hidrolisis del sustrato naftolfosfato, se libera naftol insoluble que se acopla con pararrosanilina, una sal diazonica, generando un precipitado en el citoplasma; esta enzima está presente en la mayor parte de los leucocitos [20].

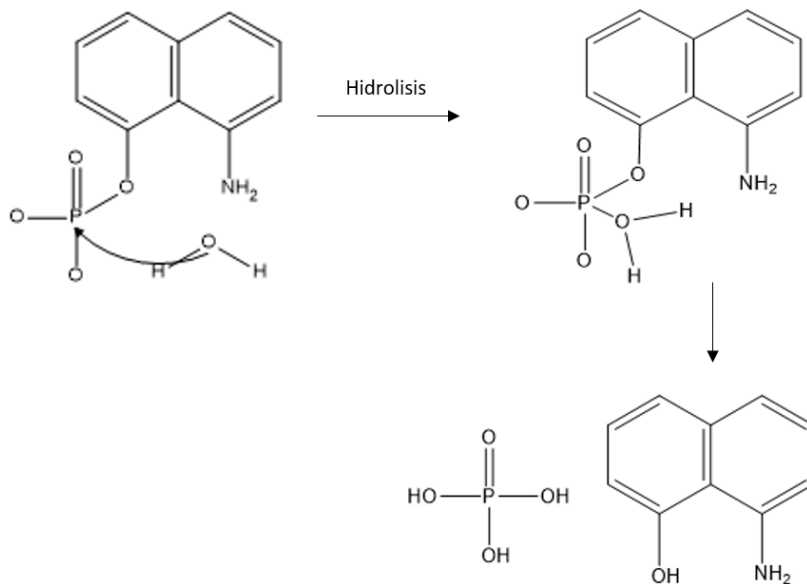


Figura 23- La esterasa hidroliza naftolfosfato liberando naftol, este se conjuga con una sal diazonica generando un precipitado en el citoplasma.

Esterasa inespecífica alfa naftil acetato esterasa (ANAE)

Como resultado de la actividad de la esterasa hay una hidrolisis enzimática de los enlaces éster y se liberan compuestos de naftol libre. El naftol se acopla a una sal diazónica, para formar un pigmento visible. La actividad enzimática se puede detectar en megacariocitos, macrófagos e histiocitos, está prácticamente ausente en granulocitos. Se manifiesta en forma de un precipitado difuso por todo el citoplasma [29].

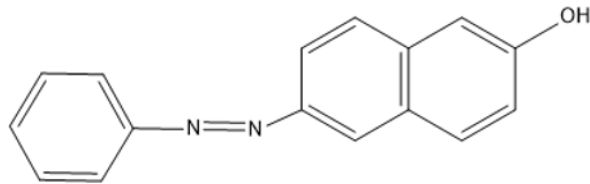
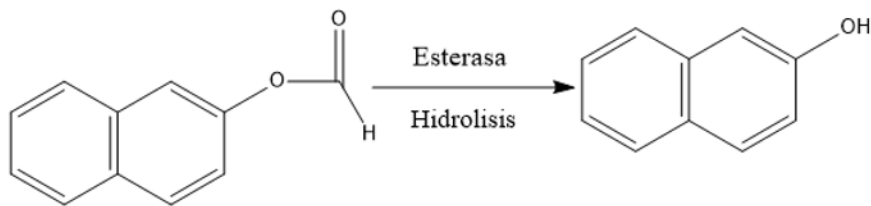


Figura 24- Es una reacción parecida a la fosfatasa, solo que cambia la enzima, pero igual mente se libera naftol que se acopla a una sal diazónica para generar la coloración.

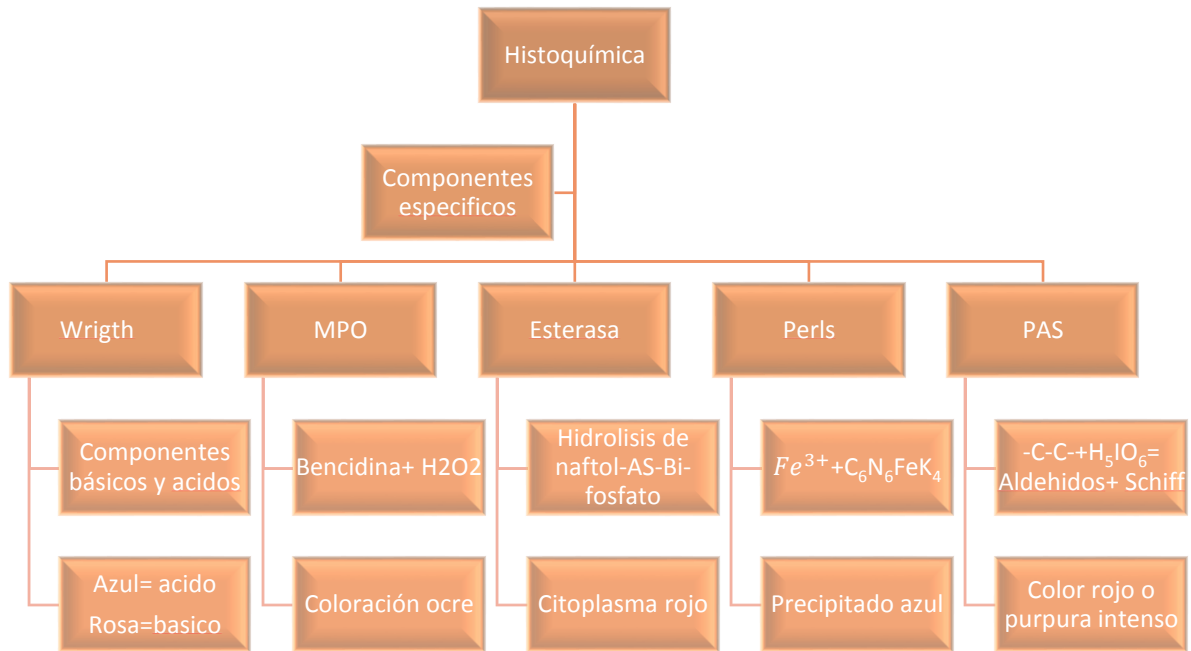


Figura 25- Esquema general de las tinciones utilizadas.

TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS

El fundamento de estas técnicas es básicamente el mismo, reacción antígeno-anticuerpo (Ac-Ag), es una interacción que se da por medio de enlaces covalentes que se da en dos etapas, la primaria que no es visible y la secundaria que ya es visible como la aglutinación o precipitación.

Hemoaglutinación directa

La presencia de antígenos en la superficie de los glóbulos rojos se puede detectar por la hemoaglutinación producida cuando se añade un antisuero con anticuerpos frente a dichos antígenos. Esta técnica se emplea habitualmente para la identificación de los grupos sanguíneos y Rh, para lo cual a la sangre heparinizada se le añaden los antisueros correspondientes: anti-A, anti-B o anti-AB (todos ellos anti-Rh negativos [30])

Hemoaglutinación indirecta

Se basa en el principio de la inhibición de la hemoaglutinación. Para su realización se precisan glóbulos rojos a los cuales se les ha unido la misma sustancia que se desea detectar o cuantificar (Figura 13). Si estos glóbulos rojos son puestos en presencia de anticuerpos preparados frente a dicha sustancia se producirá su aglutinación. Por el contrario, cuando se añade un suero problema que contiene la sustancia a cuantificar entonces los anticuerpos se unirán a dicha sustancia y no a los glóbulos rojos. En este caso no se producirá la hemoaglutinación. Por tanto, aglutinación (+) indica ausencia de la sustancia a estudiar, y aglutinación (-) indica presencia de la misma. La medida de gonadotrofina coriónica (HCG) para el diagnóstico de embarazo puede realizarse por esta técnica [30].

Técnica de enzimoinmunoensayo

Esta técnica, también se conoce como ensayo de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). La identificación de los complejos Ag-Ac, se hace mediante el empleo de enzimas, bien unidas al antígeno, o bien unidas al anticuerpo. El ensayo de ELISA puede ser directo o no competitivo, constando de los siguientes pasos: a) Se tapiza la placa con el anticuerpo específico frente al antígeno a determinar. b) Se añade la muestra con el antígeno. c) Se adiciona el anticuerpo secundario marcado con la enzima que en presencia de su sustrato da un producto coloreado soluble, este producto es cuantificado mediante el lector de ELISA, e indirecto o competitivo, se diferencia del caso anterior en que se añaden los anticuerpos, previamente incubados con la muestra, los anticuerpos que no se han unido a los antígenos de la muestra lo harán a los antígenos de los pocillos. Como enzimas se suelen utilizar la peroxidasa, la galactosidasa o la glucosa oxidasa. Otra variante de las aplicaciones inmunoenzimáticas es cuando el antígeno se encuentra fijo en células o tejidos. Al igual que hemos visto en el apartado de inmunofluorescencia indirecta, en este caso también se emplean dos anticuerpos. El primero, con actividad frente a los antígenos a estudiar, y el segundo, que va dirigido frente al primero y que actúa de puente con el complejo portador de la enzima. Cuando la enzima es la peroxidasa, este complejo suele ser una peroxidasa-antiperoxidasa (PAP). La diferencia principal entre las técnicas de RIA

y ELISA es que la primera utiliza como marcador un isótopo y la segunda la actividad de un enzima, así el RIA directo y el ELISA competitivo serían equivalentes, y también existiría ELISA de inhibición y ELISA en sándwich. El ensayo ELISA tipo sándwich es un ensayo de captura de antígeno y detección mediante inmunocomplejos. Se trata de un ensayo muy empleado en el que se recubre el pocillo con un primer anticuerpo anti-antígeno. Después de lavar el exceso de anticuerpo se aplica la muestra problema en la que se encuentra el antígeno, que será retenido en el pocillo al ser reconocido por el primer anticuerpo. Después de un segundo lavado que elimina el material no retenido se aplica una solución con un segundo anticuerpo anti-antígeno marcado. Así pues cada molécula de antígeno estará unido a un anticuerpo en la base que lo retiene y un segundo anticuerpo, al menos, que lo marca [30].

CITOMETRÍA DE FLUJO

Es un método analítico que permite la medición rápida de ciertas características físicas y químicas (tamaño, forma y complejidad y, cualquier componente celular o función que pueda ser marcada con un fluorocromo) de las células suspendidas en líquido que producen una señal al interferir con una fuente de luz.[31]

El fundamento de la citometría de flujo es hacer pasar células u otras partículas en suspensión alineadas y pasar por delante de un haz luminoso. La información producida se divide en dos tipos fundamentales: la generada por la dispersión de la luz y la relacionada con la emisión de luz por los fluorocromos presentes en la célula o partícula al ser excitados por el rayo luminoso. Las señales luminosas detectadas se transforman en impulsos eléctricos que se amplifican y se convierten en señales digitales que son procesadas por una computadora [31].

MEDULA ÓSEA

El Aspirado de medula ósea y biopsia de hueso se utilizan para diagnosticar, confirmar o en el seguimiento de enfermedades hematológicas, así como una herramienta de diagnóstico en los trastornos no hematológicos y neoplasias malignas. En los adultos, la aspiración de médula ósea puede realizarse desde el esternón a nivel del espacio intercostal segunda o tercera, la cresta ilíaca anterior, o la cresta ilíaca posterior. Debido a la mayor profundidad de penetración requerida, la médula ósea biopsias se realizan normalmente de la cresta ilíaca posterior, en la región de la espina ilíaca posterosuperior, un lugar que normalmente tiene una alta concentración muy hematopoyética de médula ósea activa [32].

La biopsia de médula ósea se obtiene a través del sitio de la incisión cutánea mismo que se utiliza para la aspiración de médula, pero la aguja tiene un ángulo diferente de la aguja de punción aspiración con el fin de tomar muestras de un área diferente. Debido a la mayor calibre de la aguja de la biopsia de la médula ósea, más fuerza se requiere generalmente que con la aguja de aspiración [32].

Patología en medula ósea

Las alteraciones medula ósea más comunes son: trastornos de la serie roja (disminución de producción de hematíes, defectos en la síntesis de los hematíes, aumento en la destrucción de hematíes, poliglobulia), trastornos en la serie blanca(leucopenia, leucemias agudas), trastornos en la serie megacariocítica (trombocitopenia, trombocitosis), síndromes mieloproliferativos, policitemia vera, mielofibrosis idiopática, síndromes mielodisplásicos, tumores en medula ósea(mieloma múltiple, metástasis) [33].

Estas patologías guardan una relación muy estrecha con la citoquímica celular, ya que hay un incremento o disminución de un componente celular, la célula sufrirá cambios significativos que se verán reflejados en la morfología de la célula, que pueden ser evidenciados histoquímicamente.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Según la OMS, entre 250 000 y 500 000 personas sufren cada año en todo el mundo lesiones medulares, actualmente el estudio de enfermedades hematopoyéticas, se basa en técnicas sofisticadas, de reconocimiento inmunológico (identificación de CD) y citogenético (translocaciones, deleciones y mutaciones en cromosomas específicos), ocasionando que los costos sean elevados. Un citómetro de flujo oscila desde los \$50,000 hasta \$1 000,000, por lo tanto para laboratorios de rutina o de enseñanza no es costeable adquirir un equipo de esta índole.

Debido a esto, los lineamientos para la clasificación Franco-Américo-Británica (FAB, por sus siglas en inglés) se han basado en el reconocimiento morfológico y citoquímico como parte integral del diagnóstico celular. Sin embargo, el conocimiento de las reacciones químicas que acompaña a dichas reacciones es limitado y a menudo se cometen errores técnicos basados en la comprensión de las reacciones (interacción colorante componente, reactividad del histomarcage, pH de la muestra).

JUSTIFICACIÓN

La histoquímica son técnicas sencillas de realizar que no requieren de implementación tecnológica a gran escala, por lo que estas se pueden implementar en la mayoría de los laboratorios clínicos y de enseñanza. Además, estas sirven como un tamizaje confiable para orientar el diagnóstico. Adicionalmente a la reducción de costes, promueven enseñanza y capacitación entre los químicos que laboran en el área histoquímica, siempre tomando como base el fundamento químico de cada una de ellas.

Así mismo, la estandarización de dichas tinciones en modelos experimentales como lo es la médula ósea de rata, permite la adquisición de elementos para su marcaje tanto positivo como negativo, lo cual es de suma importancia al momento de estandarizar una histoquímica, por lo que en el presente trabajo se pretende emplear esta herramienta experimental como base celular de histomarcajes, los cuales ayuden al laboratorista clínico a estandarizar con facilidad las tinciones en su centro de trabajo.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estandarizar las diferentes técnicas histoquímicas relacionadas con la identificación celular hematopoyética en médula ósea de rata Wistar

Objetivos particulares

Estandarizar técnicas de extracción para médula ósea de rata Wistar

Adecuar técnicas histoquímicas para componentes celulares de médula ósea de rata Wistar

Caracterizar la morfometría de los componentes hematopoyéticos.

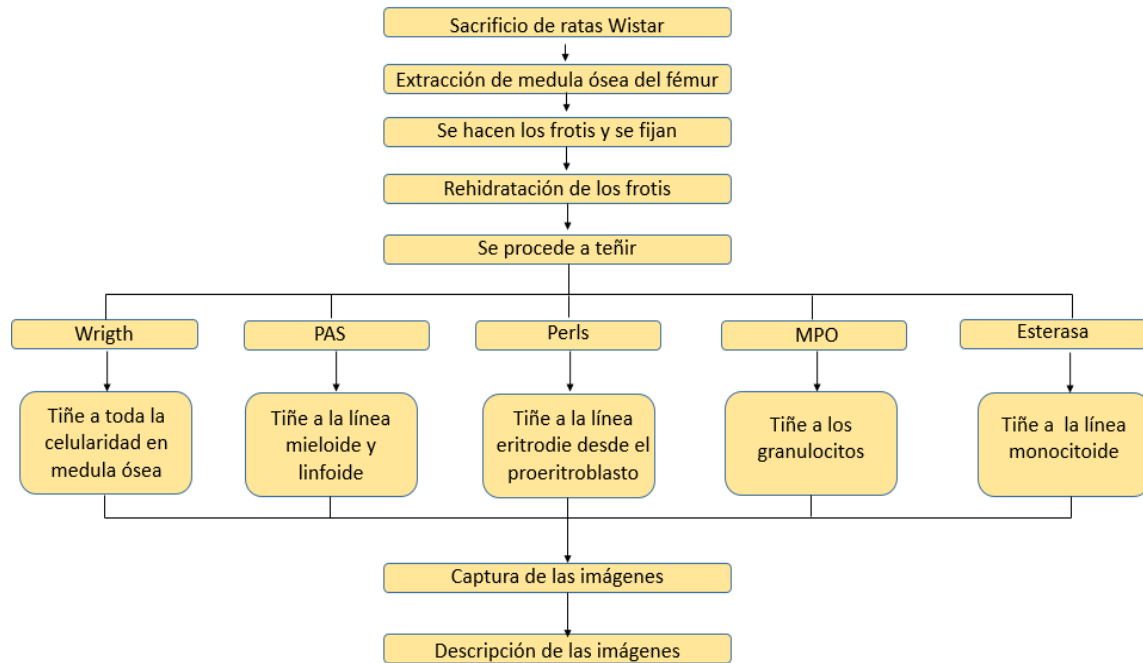
HIPÓTESIS NULA

Las técnicas histoquímicas desarrolladas para humanos no funcionan para caracterizar componentes hematopoyéticos de medula ósea de rata Wistar

HIPÓTESIS ALTERNATIVA

Las técnicas histoquímicas desarrolladas para humanos funcionan para caracterizar componentes hematopoyéticos de medula ósea de rata Wistar.

DIAGRAMA DE TRABAJO



MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas Wistar del bioterio Claude Bernard que pertenece a la BUAP, se tomaron muestras de ratas Wistar adultas jóvenes, es decir, de 4 a 6 semanas con un peso dentro del rango de 250g a 350g. Se sacrificaron por medio de dislocación cervical y se extrajeron los fémures con la técnica descrita en el anexo 1.



Figura 26- Extracción de fémur en rata Wistar

Para realizar la estandarización de técnicas y teñir la medula ósea, se utilizaron kits de tinción *Hycel*.

Tinción de Wright

Se hidrato el frotis con agua destilada, después se colocaron en puentes de tinción de acero inoxidable, se hizo un lavado con detergente triton al 0.1%, después se colocó el colorante de Wright con una punta azul, en forma de una capa fina que cubra homogéneamente el extendido celular, después de las modificación establecidas, fue adicionado el buffer fosfatos con un pH 6.4 (aproximadamente 2ml) con una punta azul diferente, se mezcló gentilmente buffer y colorante con la punta azul de la pipeta, generando una mezcla homogénea, esperando a que se formara una capa metálica, después se procedió a realizar un lavado con agua, evitando el chorro directo. Se dejó secar y se sumergió en Xilol, antes de que el Xilol se evapore se colocan 2 gotas de resina Araldite® 506 en un costado del portaobjetos y se coloca el cubreobjetos delicadamente para que por capilaridad la resina se esparza uniformemente, evitando burbujas que interfieran con la observación. Se procedió a observar en un microscopio Leica, en un objetivo seco fuerte para verificar homogeneidad y en inmersión para la toma de fotomicrografías.

Tinción de Perls

Se hidrato el frotis con agua destilada, después se colocaron en puentes de tinción de acero inoxidable, se mezcló en una cubeta de tinción 12.mL de Ferrocianuro de potasio con 12.5ml de ácido clorhídrico al 5% utilizando probetas de vidrio de 50ml y puntas amarillas de .5ml y dejó actuar 1 minuto. Pasado el tiempo de interacción de sumergen los frotis 20 minutos en la solución, transcurrido el tiempo se hace un lavado con agua destilada, se sumerge el frotis en otra cubeta con rojo nuclear rápido durante 5 minutos, se realiza un lavado con agua destilada Se dejó secar y se sumergió en Xilol, antes de que el Xilol se evapore se colocan 2 gotas de resina Araldite® 506 en un costado del portaobjetos y se coloca el cubreobjetos delicadamente para que por capilaridad la resina se esparza uniformemente, evitando burbujas que interfieran con la observación. Se procedió a observar en un microscopio Leica, en un objetivo seco fuerte para verificar homogeneidad y en 80x para la toma de fotomicrografías.

Tinción de Mieloperoxidasa

Se hidrato el frotis con agua destilada, después se colocaron en puentes de tinción de acero inoxidable, se mezcló en una cubeta de tinción 54mL de agua destilada más 4 mL del buffer concentrado, mezclar, e incubar a 37°, se midió en probetas de vidrio de 50ml. Se añadió con una punta amarilla 0.2% mL de peróxido de hidrogeno al 3%. Se sumergen los frotis 25 minutos en la solución, transcurrido el tiempo se hace un lavado con agua destilada, se sumerge el frotis en otra cubeta con safranina durante 3 minutos, se realiza un lavado con agua destilada Se dejó secar y se sumergió en Xilol, antes de que el Xilol se evapore se colocan 2 gotas de resina Araldite® 506 en un costado del portaobjetos y se coloca el cubreobjetos delicadamente para que por capilaridad la resina se esparza uniformemente, evitando burbujas que interfieran con la observación. Se procedió a observar en un microscopio Leica, en un objetivo seco fuerte para verificar homogeneidad y en 80x para la toma de fotomicrografías.

Tinción de PAS

Se hidrato el frotis con agua destilada, después se colocaron en puentes de tinción de acero inoxidable, se sumergió el frotis en una cubeta de tinción con ácido peryodio durante 5 minutos, pasado el tiempo se hizo un lavado con agua destilada. Después de las modificaciones establecidas en el reactivo de Schiff durante 25 minutos, pasado este tiempo se lava durante 5 minutos y procedemos a contrateñir en otra cubeta de tinción con hematoxilina durante 2. Después se hace una rampa de deshidratación con alcoholes al 80%, 90% 100% (sumergir un minuto en cada concentración). Después se sumergió en Xilol, antes de que el Xilol se evapore se colocan 2 gotas de resina Araldite® 506 en un costado del portaobjetos y se coloca el cubreobjetos delicadamente para que por capilaridad la resina se esparza uniformemente, evitando burbujas que interfieran con la observación. Se procedió a observar en un microscopio Leica, en un objetivo seco fuerte para verificar homogeneidad y en 80x para la toma de fotomicrografías.

Tinción Esterasa

Se hidrato el frotis con agua destilada, después se colocaron en puentes de tinción de acero inoxidable, se hizo una dilución de 6mL de buffer con 54mL de agua destilada se midió en probetas de vidrio de 50ml. Se adicionar el reactivo alfa naftil acetato disuelto en acetona. Después en un tubo de ensayo se mezclan 0.75mL de pararosanilina tomado con un punta amarilla y 0.75mL de nitrito de sodio tomado con una punta amarilla, se deja reaccionar 1 minuto y se vacían a la cubeta de tinción. Se sumergen los frotis durante 60 minutos en la cubeta de tinción con la solución. Se hace un lavado con agua destilada y se contratiñe con verde de metilo 4 minutos. Se hace un lavado con agua destilada. Se dejó secar y se sumergió en Xilol, antes de que el Xilol se evapore se colocan 2 gotas de resina Araldite® 506 en un costado del portaobjetos y se coloca el cubreobjetos delicadamente para que por capilaridad la resina se esparza uniformemente, evitando burbujas que interfieran con la observación. Se procedió a observar en un microscopio Leica, en un objetivo seco fuerte para verificar homogeneidad y en 80x para la toma de fotomicrografías.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

James Homer Wright creó la tinción de Wright modificando la tinción de Romanowsky, esta tinción permite diferenciar componentes celulares de la sangre periférica y de medula ósea. El principio de la tinción está basado en el contraste adquirido por un par de colorantes como los son el azul de metileno y la eosina, mismos que son afines a diferentes macromoléculas presentes tanto en núcleo como en citoplasma en diferentes momentos de maduración celular. Debido a su afinidad química los componentes básicos (azul de metileno) se fijan al núcleo celular el cual presenta un componente ácido; mientras que los componentes ácidos de la tinción (eosina) reaccionan con componentes básicos primordialmente proteínas en el citoplasma celular [34].

Es importante precisar que todas las tinciones de tipo Romanowsky se componen de azul de metileno oxidado y eosina. Se sabe ahora que el azul de metileno es sólo uno de una familia más grande de tintes de tiazina que tiñen azul. En esta familia se incluyen el violeta de metileno; Azur A; Azur B (que tiene un pico de absorción similar al del azul de metileno de Giemsa); Azur C; Y tionina (Figura 27). Estos colorantes se denominan colorantes básicos porque se unen a componentes celulares ácidos, tales como ADN, ARN, matrices de gránulos específicos de neutrófilos y proteínas celulares ácidas [35]. Actualmente, la tinción Wright se compone de azul de metileno y eosina en una proporción aproximada de 2: 1. El azul de metileno representa aproximadamente el 75% del colorante básico presente, mientras que sus derivados (principalmente el azul celeste B) representan aproximadamente el 25%. Los derivados se producen de manera controlada calentando azul de metileno con bicarbonato de sodio, lo que provoca la desmetilación oxidativa y la desaminación del azul de metileno. La eosina, el colorante ácido, es un miembro de la familia de colorantes de hidroxixanteno (fluorona). Estos colorantes se denominan ácidos porque se unen a componentes celulares básicos, tales como hemoglobina, contenido de gránulos eosinófilos y

proteínas celulares básicas. Dos miembros de la familia de la eosina, la eosina Y (amarillenta) y la eosina B (azulada), son más ácidas y de color rojo claro que las otras eosinas y, como tales, son particularmente adecuadas como contra tinción para el azul de metileno policromado. De los dos, la eosina Y parece funcionar mejor que la eosina B. Afortunadamente, la composición de la eosina no es tan crítica y delicada como la del azul de metileno policromado [36]

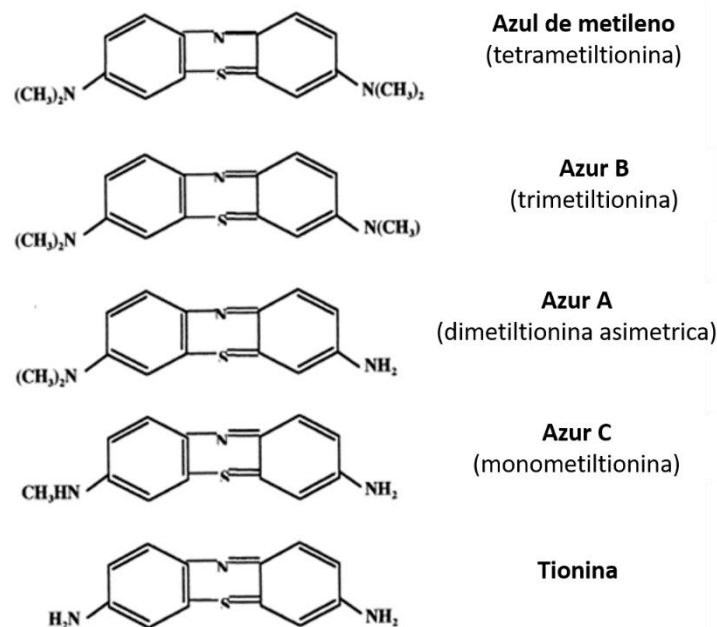


Figura 27- Diferentes tipos de Tiazinas

Debido a que la tinción fue creada para teñir células hemáticas para humanos, la adaptación en otros mamíferos tiene ligeros inconvenientes, debido a los componentes mismos de cada especie. Particularmente en la rata, un inconveniente de esta tinción es la poca permeabilidad en núcleo, por lo que en el presente trabajo se implementó un lavado extra con Tritón-X100 al 0.1%, un tensoactivo no iónico el cual es un compuesto químico que actúa como agente humectante en los laboratorios de histología y microscopía, se emplea en diluido como humectante en algunos protocolos de tinción lo cual ayuda a la permeabilidad membranal, por lo

que con esta modificación de la técnica se logró establecer una correcta apetencia tintorial en los componentes celulares. Así mismo, se modificaron los tiempos de interacción del colorante y el buffer, con los componentes celulares a 7 minutos, para asegurar la coloración de las estructuras internas, la estandarización de la técnica fue parte de los objetivos del presente trabajo.

En México y Estados Unidos, la tinción de Wright es la de mayor uso en los laboratorios clínicos. Esta tinción puede variar dramáticamente de fabricante a fabricante en su capacidad de teñir ciertos componentes celulares. Encontrar las condiciones ideales de tinción es quehacer del analista clínico, así como, establecer la estandarización y modificaciones necesarias para lograr una excelente observación de las características de cada componente y linaje celular. En el presente trabajo se realizaron adecuaciones a la metodología que permitieron el correcto reconocimiento de los componentes de médula ósea de rata Wistar. En este sentido, se han encontrado que el uso de combinaciones de tinciones de Wright entre fabricantes diferentes es la mejor manera de asegurar una tinción adecuada de todas las líneas celulares. Incluso dentro de una misma marca de la tinción de Wright, puede haber variación considerable de lote a lote. La calidad de la tinción debe ser reevaluada como parte de los protocolos analíticos que se establecen en el manual de procedimientos descrito en la NOM-007-SSA3-2011, así como los tiempos de tinción predeterminados, por cada nuevo lote de Wright utilizado [35].

Lograda la estandarización de la técnica por las modificaciones antes mencionadas, se observó que en las células inmaduras en las que existe un predominante contenido de RNA, presentan afinidad al componente azul, es por ello que en blastos el núcleo se tiñe de manera dual azul-rojizo y el citoplasma fuertemente basófilo. Mientras que en la madurez celular el número de RNAs (mensajeros, transcripcionales y de transferencia) disminuye, por lo que la afinidad por el azul de metileno es menor y la afinidad por la eosina incrementa [37]. Este comportamiento está en relación al linaje celular presente en el microambiente de médula ósea.

Particularmente, en el caso de la maduración eritroide el núcleo menos maduro adquirió colores rojos en donde se puede distinguir la presencia de nucléolos y de

cromatina laxa (eucromatina; Fig 28-29); mientras el núcleo se va compactando hasta ser expulsado de la célula, un color azul intenso aparece en policromatófilos y ortocromáticos, estas células presentan primordialmente heterocromatina y no observan nucléolos, así mismo, el citoplasma torna a un color azul rojizo, indicativo de la producción de hemoglobina en el caso de los policromatófilos y un color rojo – rosáceo en el caso de los ortocromáticos (Fig. 30-31).

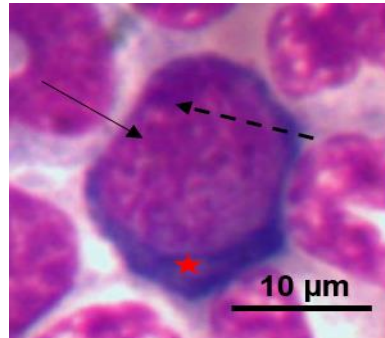


Figura 28- Proeritroblasto- Mide 17.3 µm, el citoplasma altamente basófilo (estrella roja), agranular y la presencia de 1 nucléolo (línea punteada).

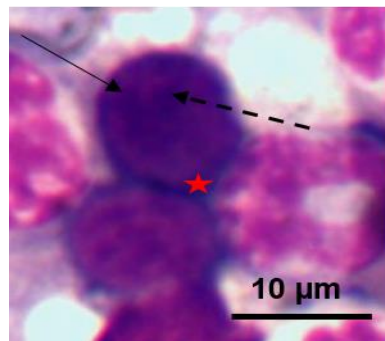


Figura 29-Eritroblasto basófilo- Mide 12 µm, el citoplasma altamente basófilo(estrella roja) y no se aprecian un nucléolo (línea punteada) , el núcleo es redondo, citoplasma agranular.

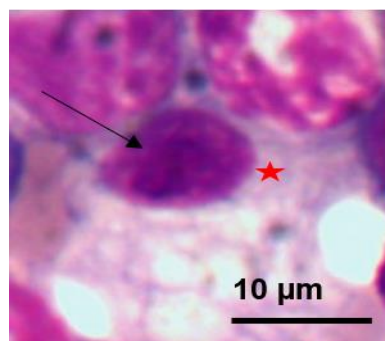


Figura 30- Eritroblasto policromático- Mide 13.8 µm, el citoplasma presenta una basofilia leve(estrella roja), agranular y no se aprecian un nucléolos, el núcleo es redondo.

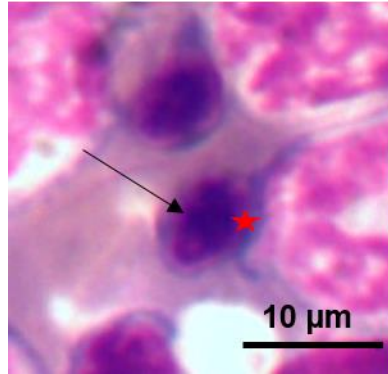


Figura 31-Ortocromático-Mide 8.6 μm, el citoplasma presenta una basofilia leve (estrella roja), el núcleo es redondo, compacto y no se encuentra en el centro de la célula.

Adicionalmente, estas células pueden ser identificadas en relación al hierro presente en la celularidad y se correlaciona con su maduración. El hierro (Fe) es un metal esencial muy importante para todos los organismos vivos. La función del Fe en los procesos biológicos depende de su capacidad de existir en dos estados redox (hierro ferroso y férrico). En consecuencia, el Fe es crucial para las reacciones metabólicas de la respiración y la fotosíntesis. Aunque a nivel de toda la planta los mecanismos moleculares de adquisición y almacenamiento de Fe están bien documentados, el control de la distribución de Fe en los niveles de órganos, células y subcelulares es muy poco comprendido y representa una apuesta importante. Aprovechando la alta reactividad de iones metálicos para ligandos orgánicos, se han utilizado varios reactivos como cromóforos para la tinción histoquímica de metales. Entre ellos, el ferrocianuro de potasio, también conocido como reactivo de Perl. Este se utilizó desde finales del siglo XIX para producir el azul de Prusia, después de la reacción con hierro férrico. El reactivo de Perl's ha sido ampliamente utilizado para teñir el Fe en los tejidos. Sin embargo, es posible aumentar la sensibilidad de la tinción por reacciones secundarias con diaminobenzidina (DAB) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). De hecho, dado que el complejo Fe-Perls es activo redox, la adición de DAB y H_2O_2 desencadena la polimerización oxidativa de DAB, produciendo pigmentos marrones [38]. Esta reacción es la base de la intensificación de la tinción Perls (Perls / DAB). Dichas modificaciones han demostrado que Perls / DAB podía teñir tanto Fe^{2+} como Fe^{3+} [39]. Sin embargo, en el presente a trabajo únicamente se realizó la tinción tradicional de Perls sin modificaciones para poner de manifiesto la serie roja y sus estadios de maduración.

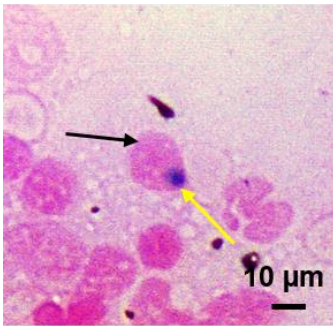


Figura 32- Tinción de Perls en medula ósea de rata Wistar. La flecha negra señala a un Proeritroblasto (15.7 μm) positivo a la tinción de Perls, las flechas amarillas indican el deposito acumulado de ferrocianurio de Potasio en la célula, ya que empieza la producción de hemoglobina. La magnificación de las imágenes fue adquirida en un objetivo de 80X.

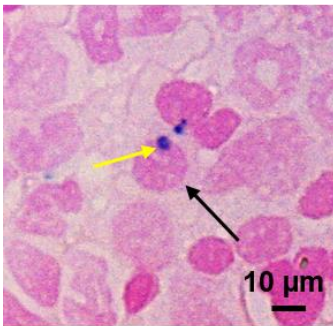


Figura 33- Tinción de Perls en medula ósea de rata Wistar. La flecha negra señala a un Eritroblasto basófilo (13.8 μm) positivo a la tinción de Perls, las flechas amarillas indican las concentración acumulada del ferrocianurio de Potasio en la célula. La magnificación de las imágenes fue adquirida en un objetivo de 80X.

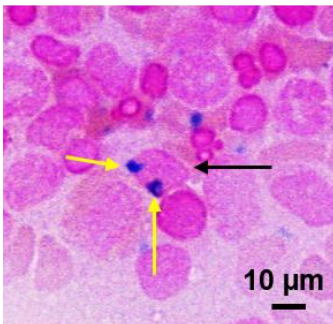


Figura 34- Tinción de Perls en medula ósea de rata Wistar. Eritroblasto policromático 13 μm , se observan 2 precipitaciones (flechas amarillas) de ferrocianurio de potasio, la concentración del ferrocianurio de potasio varía de acuerdo al estado de maduración de la célula. La magnificación de las imágenes fue adquirida en un objetivo de 80X.

Todos los precursores normales de glóbulos rojos contienen hierro que no se ha incorporado en el hemo y la tinción de Perls puede revelar hasta tres o cuatro gránulos de hierro visibles en microscopía óptica que parecen estar compuestos de agregados Ferritina [40]. De dos a tres millones de glóbulos rojos (glóbulos rojos) se producen cada segundo y requieren 30-40 mg de hierro entregado al eritrón para hacer 30 pg de hemoglobina por célula, un total de 6 g de hemoglobina al día. El grupo de hierro unido a la transferrina [Tf-Fe³⁺] es 10 veces más pequeño que los requerimientos diarios de hierro, requiriendo un giro rápido para asegurar un

suministro suficiente de hierro. El hierro diario requerido para la eritropoyesis es predominantemente derivado del reciclado del hierro hemo por los macrófagos que fagocitan a los glóbulos rojos senescentes. Debido a que la mayoría del hierro en la mayoría de los organismos se puede encontrar en el compartimiento de la hemoglobina, la eritropoyesis domina el metabolismo del hierro y los dos están inextricablemente entrelazados. Este proceso dinámico de tráfico de hierro para la eritropoyesis requiere diafonía significativa para prevenir la deficiencia de hierro o la sobrecarga de hierro y proteger al organismo del desarrollo de la anemia, así como de la toxicidad potencial del exceso de hierro. Por ejemplo, la absorción de hierro aumenta, a menudo dramáticamente, cuando la eritropoyesis se produce a una tasa superior a la normal para acomodar la mayor demanda de hierro [41].

El hierro dirigido al compartimento eritroide está restringido al hierro ligado a transferrina Tf-Fe³⁺ y su capacidad para unirse al receptor de transferrina (TfR1) es un paradigma bien elaborado. La transferrina es la segunda proteína sérica más abundante, después de la albúmina, y absorbe el hierro de los enterocitos duodenales cuando se absorbe y de los macrófagos cuando el hierro se recicla de los hematíes renales. La absorción y el reciclado del hierro están regulados por la hepcidina, una hormona peptídica que se cree es el principal regulador de los flujos de hierro en el cuerpo. La hepcidina ejerce su función al unirse a la única proteína de exportación de hierro conocida, la ferroportina (FPN-1), encontrada en hepatocitos, macrófagos, enterocitos duodenales y células placentarias, todas ellas implicadas en el metabolismo del hierro. Hepcidina se une a FPN-1, provoca su internalización y degradación, y los resultados en el cese de la liberación de hierro de las células [42].

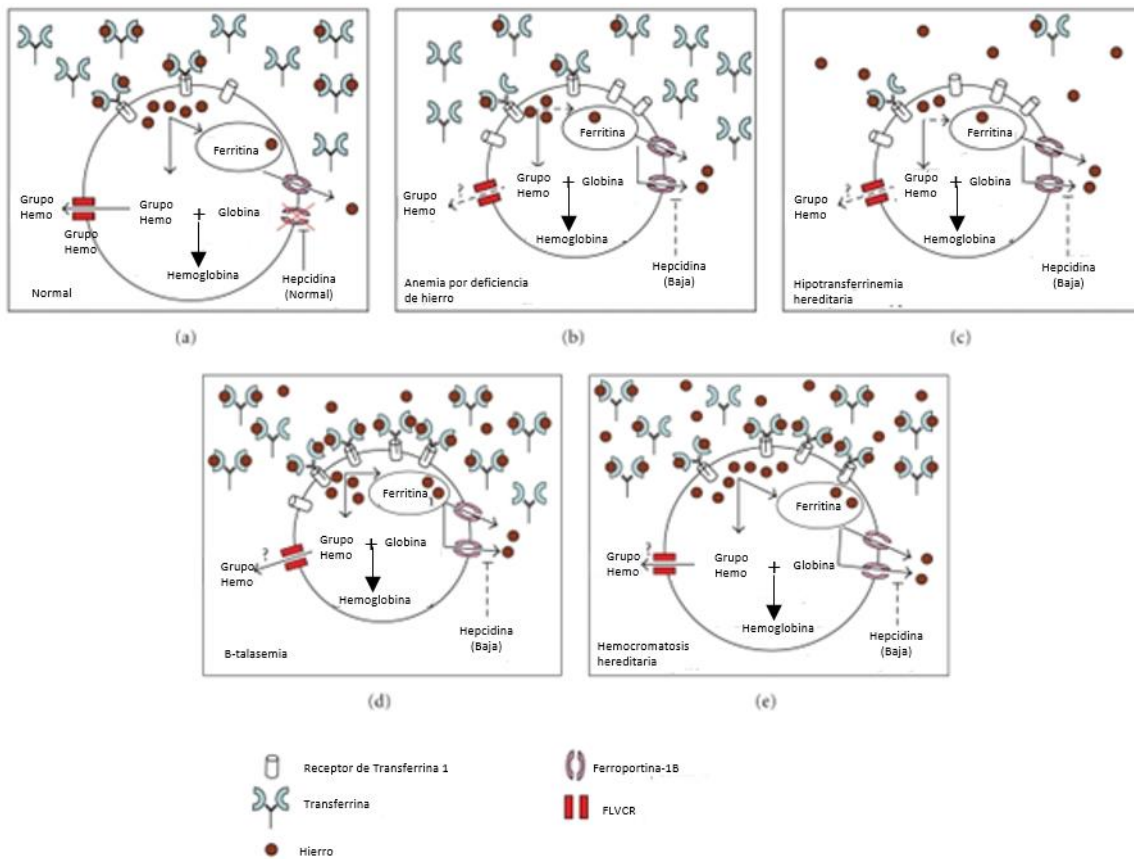


Figura35- Modelo de la relación entre la entrega de hierro, habilidades relativas para sintetizar hemoglobina, exportación de hemo y hierro en diversas enfermedades asociadas con patología concurrente de hierro eritroide [43].

La aparición de más de seis gránulos en el eritroblasto es anormal y se cree que estos sideroblastos son patológicos. En algunos sideroblastos patológicos, conocidos como sideroblastos anillados, los gránulos están dispuestos alrededor del núcleo y se cree que son depósitos mitocondriales de hierro. Los sideroblastos patológicos, tanto anillados como no anillados, se han encontrado en una serie de situaciones anormales, pero los procesos metabólicos precisos implicados en su producción son desconocidos. En algunos sujetos puede observarse un aumento del número de gránulos de eritroblastos en ausencia de anemia, o puede ocurrir en presencia de una anemia aparentemente no relacionada con los sideroblastos.

Cabe mencionar que a pesar que la morfología hemática es la principal herramienta diagnóstica para el analista clínico de rutina, no es la mejor. Para clasificar correctamente a la celularidad se requiere de una batería de proteínas de superficie las cuales se les realiza un inmunomarcaje, el cual deberá corresponder a CD34⁺ sólo en proeritroblastos y a medida que madura las marcas de membrana corresponderán a CD71 positivo, (90% de la celularidad); CD117 positivo. Mientras los componentes mielomonocíticos, megacariocíticos o linfocíticos no son expresados (1% de las células expresan CD14; 2.4% de las células expresan CD41; 3% de las células expresan CD4; 2.5% de las células expresan CD8) [44].

Así mismo, fue analizada la apetencia tintorial del linaje granulocítico el cual proviene de un precursor mieloide granulocítico común conocido como unidad formadora de colonias granulo-monocíticas, el cual por estímulos de interleucinas, citocinas y factores de crecimiento específicos de linaje da paso a la primera célula que es reconocible por sus características morfológicas, el Mieloblasto [13]; mientras la maduración avanza dentro de los macrófagos nodriza que se ubican en la médula ósea, la serie granulocítica se distinguen por la presencia de gránulos primarios o azurófilos que son sintetizados en mieloblastos de tipo II y III, además de los promielocitos. Nuestros resultados mostraron que el mieloblasto fue caracterizado por la basofilia del citoplasma característica, sin granulación presente (sólo se observaron mieloblastos de tipo I), núcleo grande de color rojizo y cromatina laxa (eucromatina) con presencia de nucléolos (Fig. 10.5); en esta célula además de su característica morfológica clásica se podría caracterizar su patrón de cluster designation el cual correspondería a: CD45, CD38, CD34, CD33 y CD13 [45]. El CD45 es un antígeno común de leucocitos, una proteína transmembrana de tipo I presente en todas las células hematopoyéticas excepto en las de estirpe eritrocitaria que ayuda a la activación celular; Expresada en linfomas, leucemia linfocítica crónica de células B, leucemia de células pilosas y leucemia no linfocítica aguda. CD38, involucrados en ecto-ADP-ribosil ciclasa y activación celular en muchas células hematopoyéticas, plasmáticas y activadas por B y T; aumenta con la seroconversión del VIH, la co-expresión con CD8 asociada con la progresión (indica la estimulación viral persistente). Algunos anticuerpos dirigidos a CD38 se están

ensayando en mieloma múltiple y linfoma no Hodgkin, p. Daratumumab o MOR202 Celgene. CD34, es un marcador de células madre, adhesión, encontrado en precursores hematopoyéticos (se encuentran en altas concentraciones en la sangre del cordón umbilical), endotelio capilar y fibroblastos embrionarios. CD33, es un marcador de función desconocida encontrado en las células inmaduras mieloides, incluyendo blastos de leucemia mieloide aguda y monocitos maduros. Los anticuerpos monoclonales anti-CD33 se utilizan ampliamente para el diagnóstico de todos los tipos de LMA. CD13, es una metaloproteínasa de zinc, también conocida como aminopeptidasa N, que se encuentra naturalmente en células mielomonocíticas desde la diferenciación temprana hasta la madurez; usualmente presente en blastos de leucemia mieloide aguda y rara vez se encuentra en algunas formas de linfoma y leucemia linfocítica [45].

Los promielocitos mostraron un tamaño promedio de entre 15 – 20 micras, núcleos ovales a redondos en los que los nucléolos no fueron del todo evidentes, mientras su cromatina presentó una densidad media (intermedia entre compacta y laxa), citoplasma ligero azul con presencia abundante de gránulos primarios (Fig.10.6); en esta célula además de su característica morfológica clásica se podría caracterizar su patrón de cluster designation el cual correspondería a: CD45, CD33, CD15 y CD13 [13, 43]. Algunos CD van perdiéndose durante la maduración celular mientras otros comienzan a sintetizarse y exponerse primordialmente en las membranas de las células. El CD15, es una molécula de adhesión de carbohidratos (no una proteína) que media la fagocitosis y la quimiotaxis, que se encuentra en los neutrófilos; esta es expresada en pacientes con enfermedad de Hodgkin, algunas leucemias linfocíticas crónicas de células B, leucemias linfoblásticas agudas y la mayoría de las leucemias no linfocíticas agudas. También se denomina Lewis x y SSEA-1 (antígeno embrionario específico del estadio 1) y representa un marcador para las células madre pluripotentes murinas, en las que desempeña un papel importante en la adhesión y migración de las células en el embrión pre-implantación [46]. En relación a los gránulos primarios observados, estos se dan durante la granulopoyesis se inicia en los promielocitos tempranos, cuando las vesículas inmaduras de transporte brotan del Golgi y se fusionan [47, 48,49]. Los gránulos de

aparición temprana resultantes se definieron originalmente por su alto contenido en mieloperoxidasa (MPO) y, en consecuencia, denominados "gránulos positivos a la peroxidasa", pero también se denominan "gránulos de azurofilo" debido a su afinidad por el colorante básico [50], o simplemente designados "gránulos primarios". La producción de MPO cesa en la transición promielocito / mielocito. Por consiguiente, los gránulos formados en etapas posteriores de mielopoyesis son negativos a la peroxidasa.

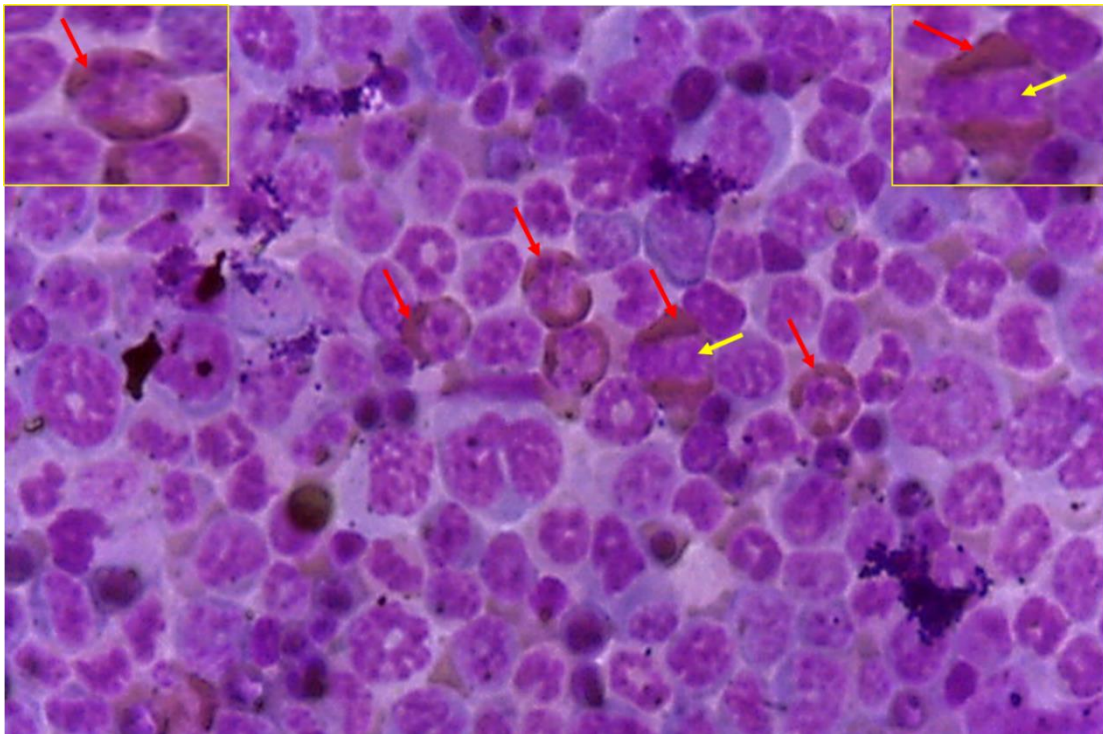


Figura 36- Tinción de mieloperoxidasa (MPO) en médula ósea de rata Wistar. Las flechas rojas indican las células positivas a la reacción de MPO resaltando los gránulos primarios presentes en ellas y por ende su grado de inmadurez; Las flechas amarillas resaltan los nucléolos de los mieloblastos tipo III. La magnificación de las imágenes fue adquirida en un objetivo de 80X.

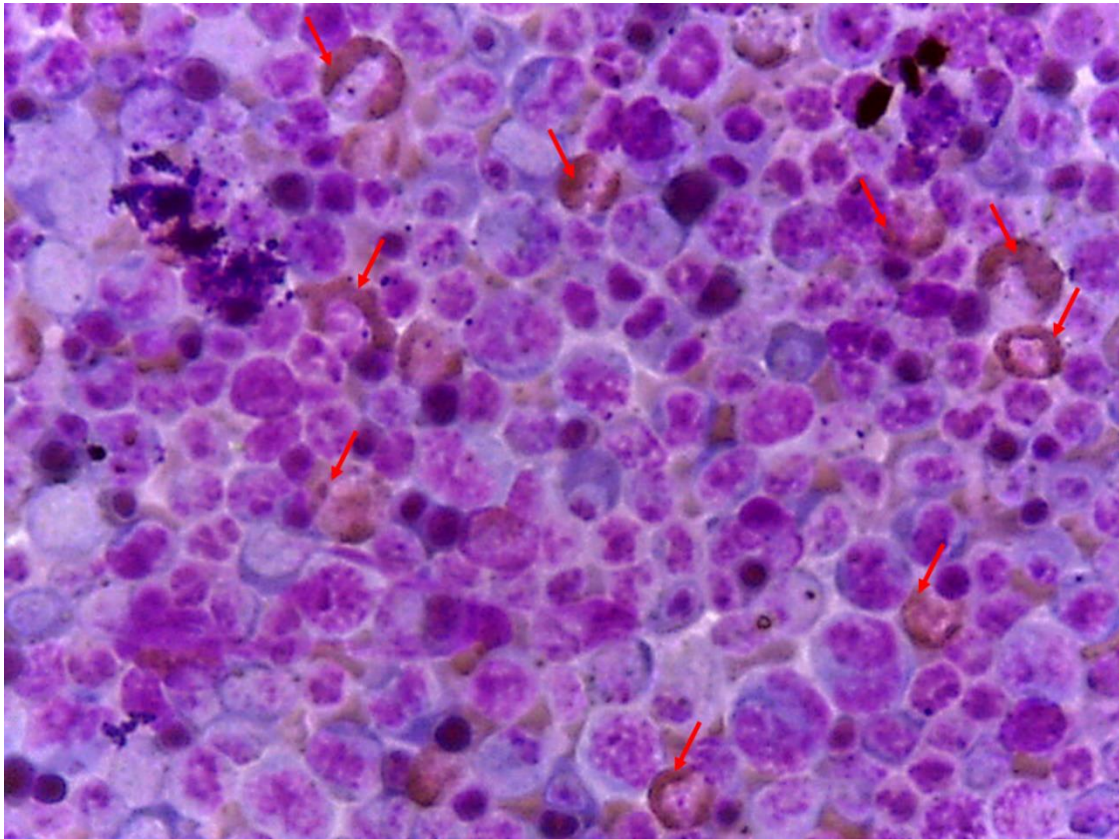


Figura 37- Tinción de mieloperoxidasa (MPO) en médula ósea de rata Wistar. Las flechas rojas indican las células positivas a la reacción de MPO resaltando los gránulos primarios presentes en ellas y por ende su grado de inmadurez. La magnificación de las imágenes fue adquirida en un objetivo de 80X.

En el presente trabajo se evidenciaron los gránulos primarios ricos en MPO por medio de la histoquímica correspondiente, en la cual se pueden observar la presencia de dichos gránulos desde el mieloblasto tipo III, hasta en las transición promielocito / mielocitos (Fig 36 y 37). Además de contener grandes cantidades de MPO, los gránulos de azurófilos se empaquetan con hidrolasas ácidas y proteínas antimicrobianas y durante muchos años se consideraron como lisosomas primarios. Al igual que los lisosomas, los gránulos azurófilos contienen granulofisina (CD63) en su membrana [51]. Sin embargo, a diferencia de los lisosomas, no expresan las proteínas de membrana asociadas a los lisosomas LAMP-1 y LAMP-2 [52], y la clasificación de proteínas A azurófilas de estos gránulos no implica el sistema de

receptor de manosa-6-fosfato esenciales para las enzimas lisosomales dirigidas [53, 54,55]. Por lo tanto, los gránulos azurófilos probablemente se consideran mejor regulados por el ciclo celular, y no como parte de los lisosomas especializados [52]. Además de CD63, las únicas proteínas de membrana identificadas en los gránulos azurófilos hasta el momento son CD68 [56], presenilina 1 [57], estomatina [58], y un tipo vacuolar de H⁺-ATPasa [59]. Los gránulos azurófilos muestran una gran heterogeneidad de tamaño y forma, y varias subpoblaciones con distintas características físicas, citoquímicas y morfológicas han sido demostrados [48, 60, 61,62]. Sobre la base de su tiempo de aparición en la mielopoyesis, los gránulos azurófilos pueden dividirse en dos subconjuntos principales: gránulos de defensina tempranos de pobre contenido en azurodicina, que se forman desde el comienzo de la fase temprana promielocítica, y gránulos de defensina tardíos de ricos en azurodicina, que se forman cerca de la transición de promielocitos / mielocitos [63]. Los gránulos azurófilos sufren exocitosis limitada en respuesta a la estimulación [64 y 65], y se cree que contribuyen principalmente a la muerte y degradación de microorganismos que tienen lugar en el fagolisosome [66].

Muchas proteínas de gránulos azurófilos se sintetizan como pro-formas, que pasan por procesos proteolíticos antes de llegar al compartimiento del gránulo primario. Después de la eliminación de los pro-péptidos del amino terminal, las proteínas se almacenan en su conformación activa [67,68, 69]]. Los pro-péptidos de las proteínas de gránulos de azurófilos no son reconocidas por ser importantes para el procedimiento de direccionamiento descrito para las proteínas LAMP y LIMP. Más bien, los pro-péptidos pueden prevenir el mal plegamiento, la auto-toxicidad o la retención de las proteínas maduras durante su paso a través de la maquinaria biosintética de la célula [67, 68, 70, 71,72].

Por otro lado, en las etapas de maduración, es decir, mielocitos (Figura 38-44), puede ser reconocida por la identificación del tamaño promedio que correspondió de 13 – 20 micras, núcleo oval, denso, rojo – púrpuro, de cromatina densa, mientras que el citoplasma ya presenta gránulos finos, secundarios y específicos por lo que el color que adquiere es rosa – anaranjado. Mientras que los metamielocitos presentan un núcleo más compacto, por lo tanto la cromatina más densa y la formación de una escotadura, la presencia de gránulos específicos aumenta. A medida que madura la escotadura se hace más grande hasta llegar a tener una forma de banda o U, este proceso continúa hasta que el núcleo se segmenta en varios lóbulos.

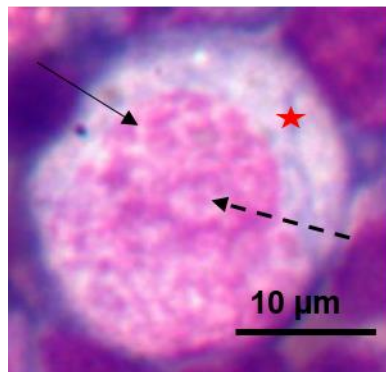


Figura 38 - Mieloblasto-Mide 25.1 μm , el citoplasma presenta una basofilia leve (estrella roja), granuloso leve, el núcleo es deforme, presenta 1 nucléolo (línea punteada).

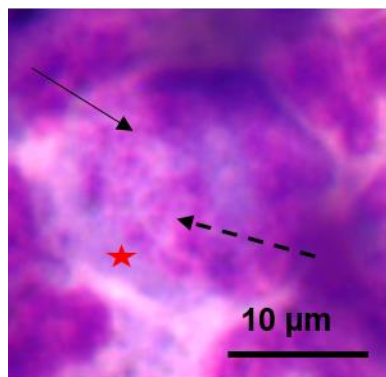


Figura 39 - Promielocito-Mide 19.6 μm , el citoplasma presenta una basofilia leve (estrella roja), granuloso azurofilo más denso, el núcleo es deforme presenta 1 nucléolo (línea punteada)

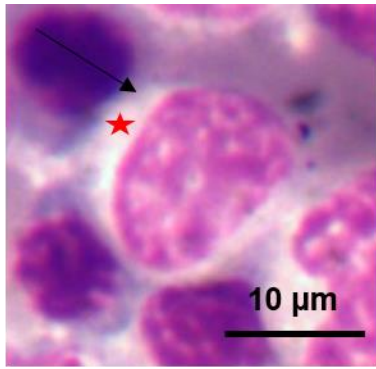


Figura 40- Mielocito-Mide 13.2 μm , el citoplasma presenta una basofilia leve (estrella roja), mantiene el granulado azul, el núcleo es más compacto, no presenta nucléolos.

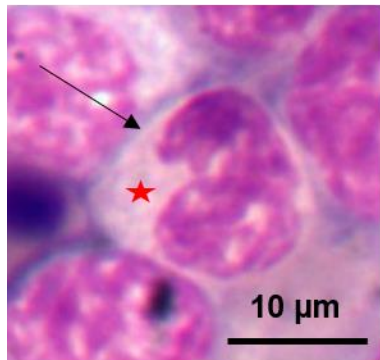


Figura 41- Metamielocito-Mide 15. μm , el citoplasma presenta una basofilia leve (estrella roja), mantiene el granulado azul, el núcleo es más compacto, no presenta nucléolos.

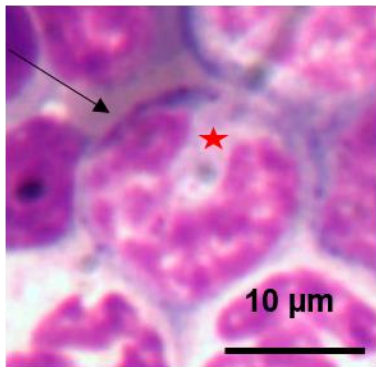


Figura 42- Neutrofilo en banda- Mide 17.4 μm , el citoplasma presenta un granulado neutro (estrella roja), característico de los neutrofilos, el núcleo se compacta tomando la forma de una banda.



Figura 43- Neurofilo Segmentado- Mide 16 μm , el citoplasma presenta un granulado neutro (estrella roja), característico de los neutrofilos, el núcleo con forma de banda se compacta formando lóbulos unidos por delgados filamentos.

Las células con grado de maduración como son mielocitos, metamielocitos, neutrófilos en banda y segmentados tienen en común gránulos negativos a la peroxidasa, estos pueden dividirse en gránulos específicos (secundarios) y gránulos de gelatinasa (terciarios) [73]. Esta separación es arbitraria ya que los gránulos negativos a la peroxidasa se forman como un continuo en los mielocitos, los metamielocitos, las células de la banda y los neutrófilos segmentados. Sin embargo, desde un punto de vista fisiológico, la separación conceptual de los gránulos negativos a la peroxidasa en dos subconjuntos es significativa, ya que los gránulos específicos y los gránulos de gelatinasa difieren significativamente entre sí con respecto al contenido de proteínas y propiedades secretoras. Así, mientras que los gránulos específicos más grandes son ricos en sustancias antibióticas, los gránulos de gelatinasa son más pequeños y no tienen esta función. Por el contrario, gránulos de gelatinasa son más fácilmente exocitados que los gránulos específicos [74]. Estas características reflejan que los gránulos de gelatinasa son importantes principalmente como un reservorio de enzimas degradantes de la matriz y receptores de membrana necesarios durante la extravasación de neutrófilos y la diapédesis, mientras que los gránulos específicos participan principalmente en las actividades antimicrobianas de los neutrófilos movilizándolo su arsenal de sustancias antimicrobianas al fagosoma o al exterior de la célula [75-76].

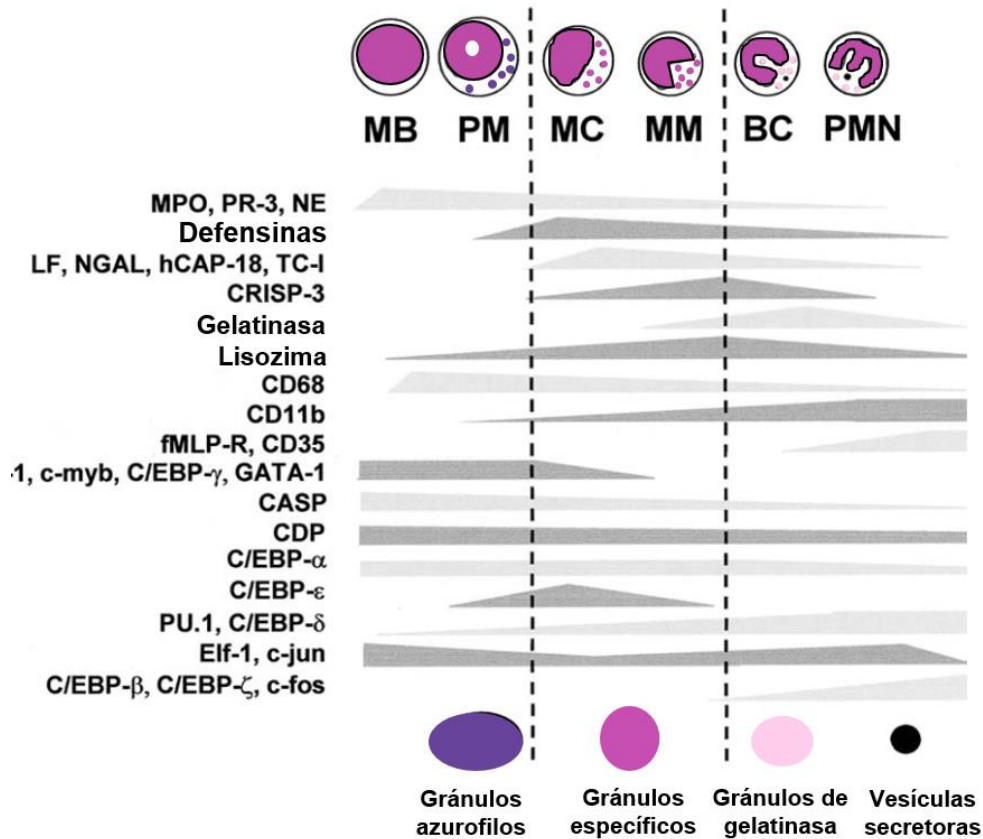


Figura 44- Etapas biosintéticas de gránulos, proteínas de gránulos y factores de transcripción. Gránulos formados en una etapa dada de la mielopoyesis están empaquetados con proteínas sintetizadas de forma simultánea, y surge la heterogeneidad gránulo secundariamente a las diferencias en las ventanas de biosíntesis de proteínas de gránulos. El control de la expresión de la proteína del gránulo está mediado por combinaciones de factores de transcripción presentes en distintas etapas de desarrollo de células mieloides. MB, mieloblasto; PM, promielocito; MC, mielocito; MM, metamielocito; BC, célula de banda; PMN, neutrófilos polimorfonucleares. Proteínas gránulos: MPO, mieloperoxidasa; PR - 3, proteinasa 3; NE, elastasa de neutrófilos; LF, lactoferrina; TC - I, transcobalamina - I; CRISP-3, proteína secretora rica en cisteína-3 (SGP-28). Factores de transcripción: CASP, CDP alternativamente empalmado producto; CDP, proteína de desplazamiento de CCAAT; C / EBP, CCAAT / notenciador proteína de unión (tomado y modificado de Cowland y Borregaard) [77]

Los constituyentes conocidos de gránulos específicos y de gelatinasa abarcan varios péptidos antimicrobianos potentes que incluyen lactoferrina, hCAP18, NGAL, lisozima y Nramp-1. Los gránulos negativos a la peroxidasa también contienen tres metaloproteasas de gran importancia fisiológica y fisiopatológica, a saber, la colagenasa (metaloproteinasa de matriz-8; MMP-8), la gelatinasa (MMP-9) y la recién descubierta leucolisina (MMP-25). El citocromo p22 / gp91phox (citocromo b) es un constituyente de la membrana de ambos subgrupos de gránulos negativos a la peroxidasa que se transfiere a la superficie o la membrana fagosomal en la activación de neutrófilos [75]. Después de la translocación, el citocromo b 558 funciona como el portador de electrones terminal de la explosión de la ráfaga respiratoria montada. Los compartimentos intracelulares movilizables de los neutrófilos difieren en la disponibilidad para la exocitosis. Vesículas secretoras son más propensas a la liberación extracelular, seguido de gránulos de gelatinasa, gránulos específicos, y azurófilos gránulos [76]. Por lo tanto, la estimulación *in vitro* con concentraciones nanomolares de mediadores inflamatorios tales como fMLP conduce a una descarga rápida y casi completa de vesículas secretoras sin liberación significativa de gránulos [78]. La estimulación con agonistas más poderosos como el acetato de miristato de forbol (PMA) induce la liberación exhaustiva de gránulos de gelatinasa, liberación moderada de gránulos específicos y exocitosis de bajo grado de gránulos azurófilos [79].

Las vías de señalización que ligan la ligación de los receptores de superficie a la degranulación son complicadas y sólo han sido parcialmente mapeadas. La movilización jerárquica de gránulos de neutrófilos y vesículas secretoras descritas anteriormente puede reproducirse *in vitro* mediante elevaciones graduales en el nivel de Ca intracelular [80]. Se ha demostrado que varios estímulos inducen incrementos en la concentración de Ca²⁺ citosólica, incluyendo ligación de L-selectina, CD11b / CD18 y el receptor fMLP [81-82]. La unión con las integrinas induce la activación de proteínas citoplasmáticas tirosina quinasas [83- 84], que fosforilan y activan un rango de proteínas, incluyendo fosfolipasa C y fosfolipasa D [85-86]. Las fosfolipasas activadas catalizan fosfatidilinositol y descomposición de fosfatidilcolina y generación de inositol (1, 4,5) P₃, diacilglicerol y ácido fosfatídico.

A su vez, estos metabolitos activan la proteína quinasa C y desencadenan la liberación de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares y el flujo de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática [87-88-89]. Del mismo modo, la estimulación vía el receptor de fMLP acoplado a proteína G eleva rápidamente la concentración de inositol citosólico (1, 4,5) P₃ a niveles suficientes para movilizar Ca^{2+} desde almacenes intracelulares [90]. Los mecanismos anteriores vinculan la rotación de lípidos y la transición de Ca^{2+} como factores principales de la degranulación leucocitaria.

Así mismo, los gránulos secundarios de los leucocitos han sido demostrados por técnicas y métodos bioquímicos, en los que, los leucocitos neutrófilos contienen cantidades considerables de glucógeno en relación a su maduración, por lo tanto es bastante lógico que tengan una fuerte reacción periódica ácido-Schiff (PAS). La reacción se basa en la oxidación de los grupos 1,2 glicol aldehídos, por la acción del ácido peryódico, los grupos aldehído se combinan con el reactivo de Schiff dando un compuesto de color rojo púrpura intenso, para contrastar se utiliza hematoxilina para poner en evidencia núcleos de las células. Tiñendo los gránulos presentes en citoplasma y glucógeno presente en este. Como se muestra en la figura 45.

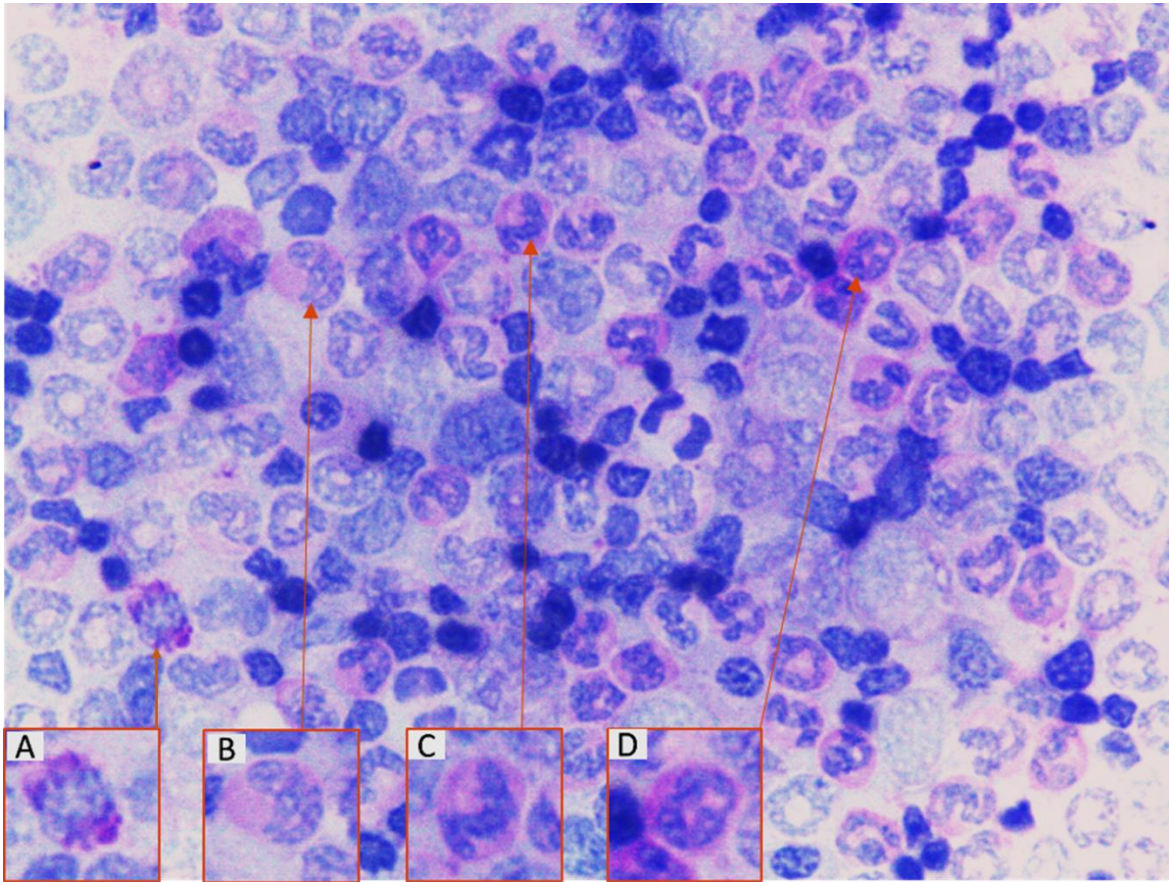


Figura 45- Tinción de ácido periódico de Schiff (PAS) en médula ósea de rata Wistar. Las flechas naranjas indican células positivas a la reacción de PAS resaltando los gránulos secundarios presentes en ellas y por ende su grado de maduración. La magnificación de las imágenes fue adquirida en un objetivo de 80X. En el metamielocito (B) se observa la forma característica del núcleo con un a escotadura y la granulación es fina y dispersa por todo el citoplasma, debido a que es una célula más inmadura, el neutrófilo en banda (C) el núcleo se compacto, tomando la forma de una “banda”, de ahí su nombre, por lo tanto la cromatina se vuelve más densa, es por eso el que el color morado es más intenso, el granulado rosa sigue disperso por el citoplasma, pero más denso, para el neutrófilo maduro (D) el núcleo presenta 2 lobulaciones y se puede observar como el color rosa del granulado se volvió más denso, debido a que la producción de gránulos aumenta a medida de que la célula madura.

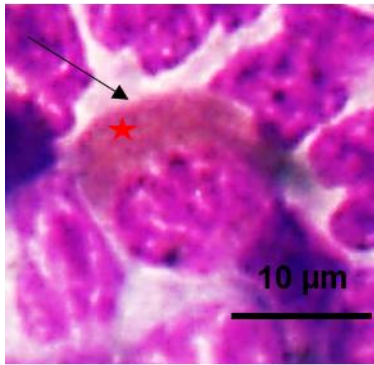


Figura 46 - Mielocito eosinofilo 14.3 µm citoplasma presenta un granulado naranja (estrella roja), es en esta etapa de la maduración que empieza la producción de gránulos específicos del linaje, la forma del núcleo es compacta y no presenta nucléolos.

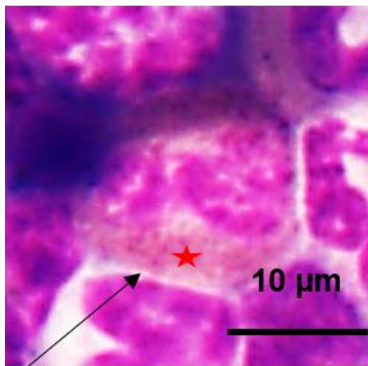


Figura 47 - Eosinofilo Mide 14.5 µm, el citoplasma presenta un granulado naranja (estrella roja), característico de los eosinofilos, el núcleo tiene forma de lobulaciones unidad por delgados filamentos de cromatina.

Por otro lado el linaje agranulocítico también conocido como monocítico, surge de la monopoiesis por la cual monocitos en sangre periférica y macrófagos en los tejidos son producidos a partir de sus precursores en médula ósea. El linaje monocit-macrófago es derivado de un precursor común conocido como precursor granulomonocítico (GMP). El GMP, por influencia del factor estimulante de colonias granulomonocíticas (GM-CSF), factor estimulante de colonias monocíticas (M-CSF) e interleucina 3; además de una proteína de cierre de leucinas básicas (bZIP), el factor de transcripción MafB, lleva a la maduración del monoblasto a monocito, pasando por promonoblasto. Los precursores monoblasticos son reconocibles morfológicamente por sus características, tanto tintoreales como morfológicas que son plenamente diferenciables entre el monoblasto, el promonocito y el monocito. En los que sólo el monoblasto y promonocito tienen capacidad de división. Los monocitos en circulación tienen una sobrevivencia de 20 – 40 horas, y posteriormente migran a diferentes tejidos en donde maduran a macrófagos, para cumplir su papel en las funciones fagocíticas, cooperadoras en inflamación y su direccionalidad celular, así como el papel de presentadoras antigénicas [91-92-93].

Morfológicamente por microscopía de campo claro los monoblastos son células agranulares de tamaño similar al mieloblasto y de citoplasma basófilo, el núcleo a diferencia de los mieloblastos es invaginado, lobular e irregular asemejando una forma arriñonada o en forma de frijol, sus nucléolos son menos evidentes, normalmente polarizados a los extremos [94]. En nuestros resultados, los monoblastos mostraron las siguientes características, citoplasma agranular con ligera basofilia, núcleo con pliegues y sin una forma definida, cromatina laxa con nucléolos visibles. En este mismo sentido, su maduración lleva a la fase de promonocitos que son ligeramente más grandes como se observa en la figura 48, su relación núcleo citoplasma disminuye, así como la basofilia citoplasmática, su núcleo es un tanto más ovoidal e indentado pero sus nucléolos son prominentes, el citoplasma presenta ligeras granulaciones azurófilas.

Este linaje se asocia principalmente al marcaje de designación CD14, CD36 y CD64. En el proceso de maduración se presenta la regulación negativa de CD34 y CD117, por otro la expresión de los antígenos CD64, CD33, CD36 y HLA-DR, CD45 y CD15 es alta, mientras que la expresión de CD13 es moderadamente baja. Durante la maduración progresiva a monocitos incrementa la expresión de CD14, CD11b, CD13, CD36 y CD45, mientras que la expresión de CD15 y HLA-DR desciende de manera progresiva. Los monocitos completamente maduros en relación a sus antígenos de superficie presentan un amplio inmunomarcaje para CD14, CD33, CD36, CD38 y CD64, variable para CD13 y bajo para CD15 [95-96-97].

Con lo que respecta a monocitos, estos son los leucocitos más grandes de la sangre periférica. En los frotis, varían considerablemente en diámetro (15 - 30 μm) y en morfología (Figura 49). El núcleo es grande y excéntrico y puede ser redondeado, en forma de riñón, en forma de herradura o lobulado. La cromatina es compacta, el citoplasma es abundante de color azul grisáceo y contiene pocos granos azurófilos finos e generalmente imperceptibles por microscopía de campo claro. Algunos de estas células pueden presentar endosomas intracitoplasmáticas. Los estudios citoquímicos con el microscopio óptico han demostrado la presencia de muchas enzimas hidrolíticas, incluyendo fosfatasa ácida, esterases no específicas,

galactosidasas y lisozima. Los monocitos también contienen en pequeñas concentraciones enzimas de defensa como la mieloperoxidasa, colagenasa, elastasa y proteínas del sistema de coagulación (factor tisular, factores V, VII, IX, X y XIII, activador del plasminógeno) y tienen receptores de membrana para IgG-Fc y C3. Además, tienen dos receptores de quimiocinas, CCR2 y CCR5, que se unen a diversas quimiocinas, tales como a la proteína quimioatrayente monocítica 1 (MCP-1), MCP-2, MCP-3, RANTES, la proteína inflamatoria de macrófago-1 α (MIP-1 α) y MIP-1 β c [98-99-100].

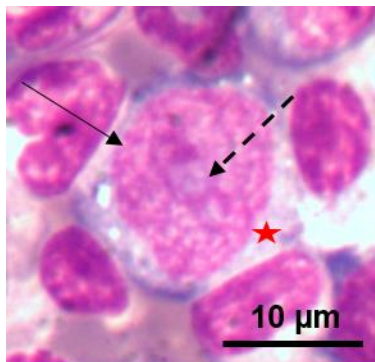


Figura 48 - Monoblasto- Mide 25.1 μ m, el citoplasma presenta una basofilia leve, agranular, el núcleo no tiene una forma definida, tiene pliegues, la cromatina es laxa y presenta un nucléolo prominente (flecha punteada).

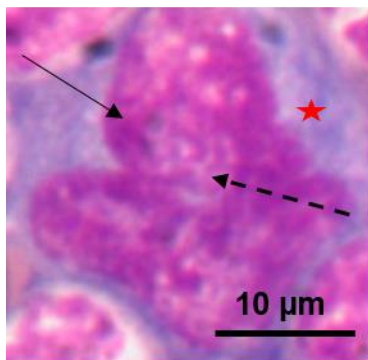


Figura 49 - Promonocito- Mide 26.6 μ m, el citoplasma incremento su basofilia, tiene un granulado leve, el núcleo presenta pliegues, no tiene una forma uniforme, la cromatina es mas compacta.

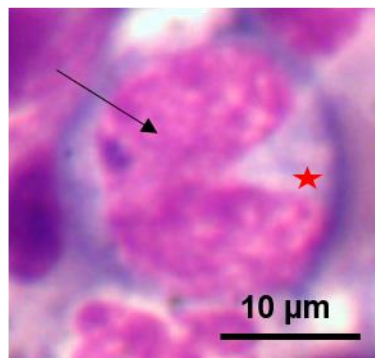


Figura 50 - Monocito- Mide 20 μ m, el citoplasma es granulado leve, el núcleo esta plegado, con forma arriñonada, cromatina densa.

Bajo el microscopio electrónico, los gránulos de monocitos varían considerablemente en tamaño y forma, y son relativamente homogéneos en electrones densos. Algunos de los gránulos contienen fosfatasa ácida y peroxidasa. Los gránulos positivos a la peroxidasa son característicamente más pequeños que los de los neutrófilos. En secciones delgadas, los monocitos muestran proyecciones de su membrana celular, similares a los dedos de una mano. Su citoplasma contiene cantidades apreciables de retículo endoplasmático rugoso, número moderado de ribosomas dispersos, un aparato de Golgi bien desarrollado, varias mitocondrias y haces de microfibrillas. El núcleo tiene cantidades moderadas de heterocromatina y los nucléolos se ven comúnmente por microscopía electrónica. Los monocitos sanguíneos son, como los neutrófilos, distribuidos entre el “pool circulante” y un “pool marginal”; en promedio, existen 3,6 veces más pool marginal que las células en circulación. Los monocitos dejan la circulación de forma exponencial, con un promedio de un tiempo de estancia media de aproximadamente 71 horas. Luego se transforman en macrófagos en diferentes tejidos y pueden sobrevivir en esta forma durante varios meses [100-101-102]

Los monocitos son células activamente móviles que responden a estímulos quimiotácticos (por ejemplo, MCP-1, RANTES, MIP-1 α y MIP-1 β), partículas para fagocitar y matan microorganismos de una manera similar a la descrita para los granulocitos neutrófilos. Los monocitos y los macrófagos son conspicuos en sitios de inflamación crónica. Además de su papel como célula fagocítica, los macrófagos desempeñan papeles importantes en diversos aspectos de la respuesta inmune. Estos incluyen el procesamiento y presentación de antígeno en moléculas del complejo de histocompatibilidad principal (MHC) de clase II (moléculas Ia) en una forma reconocible por los linfocitos T auxiliares y la degradación del exceso de antígeno. También segregan citoquinas pro-inflamatorias, inmunorreguladoras o anti-inflamatorias tales como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Los macrófagos del hígado, el bazo y la médula ósea destruyen los glóbulos rojos senescentes y los de la médula producen varias citocinas que regulan diversos aspectos de la hemopoyesis, incluyendo el G-CSF, el M-CSF, el GM-CSF, eritropoyetina y timosina B. Los macrófagos también

producen fibroblastos Factor de crecimiento y factor de crecimiento derivado de plaquetas [103-104-105-106]

Como ya se ha mencionado en párrafos anteriores, los monocitos se tiñen positivamente para la esterasa de acetato de α -naftil (esterasa no específica) y la alfa-naftil-butirato-esterasa, pero son negativos a α -naftol-AS-D-cloroacetato-esterasa. La actividad tanto del acetato de α -naftilo como de la esterasa de butirato son inhibidas por el fluoruro (en contraste con los granulocitos). Las esterases no específicas (EC 3.1.1) son un grupo heterogéneo y omnipresente de carboxilesterasas celulares que se detectan citoquímicamente con sustratos de éster de naftilo y acopladores diazotizados. Las características especiales de la enzima en los monocitos, la convierten en un marcador citoquímico clave en la subclasificación de las leucemias mieloides agudas, según lo recomendado por el grupo de estudio de leucemias franco-estadounidense-británica (FAB) [107-108]. Nuestros resultados muestran una positividad fuerte para las células del linaje monocítico de medula ósea de rata Wistar, como se muestra en las figuras 51 y 52 y se manifiesta en forma de un precipitado difuso o concentrado por todo el citoplasma.

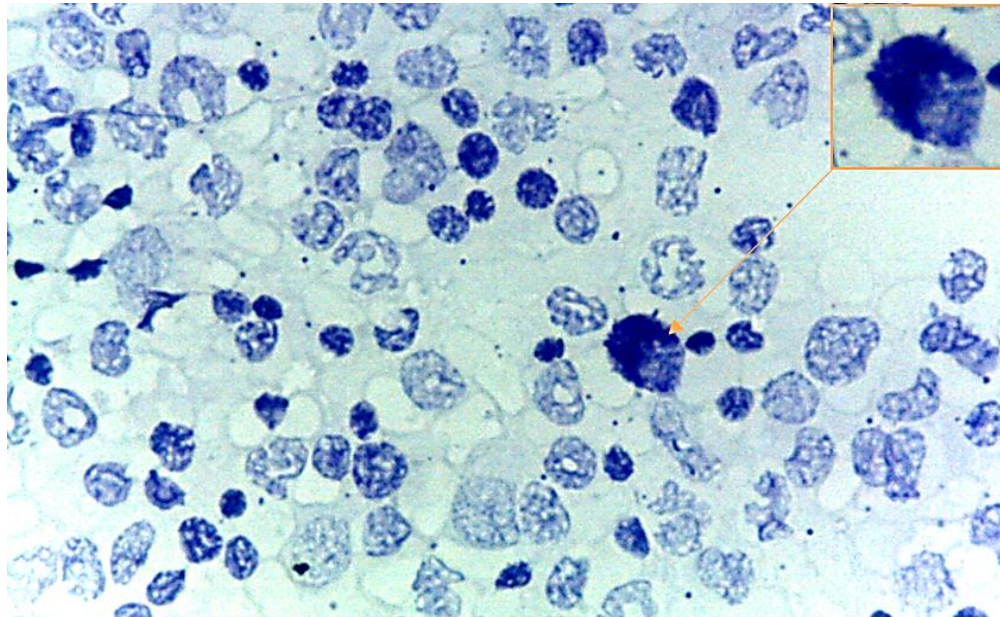


Figura 51-Tinción de esterasa ANAE en médula ósea de rata Wistar. La flecha naranja indica un promonocito (19.5 μm) esterasa positivo, debido a que es un célula inmadura tiene gran concentración de esta esterasa, que abarca más de la mitad de la célula y parte del núcleo. La magnificación de las imágenes fue adquirida en un objetivo de 80X.

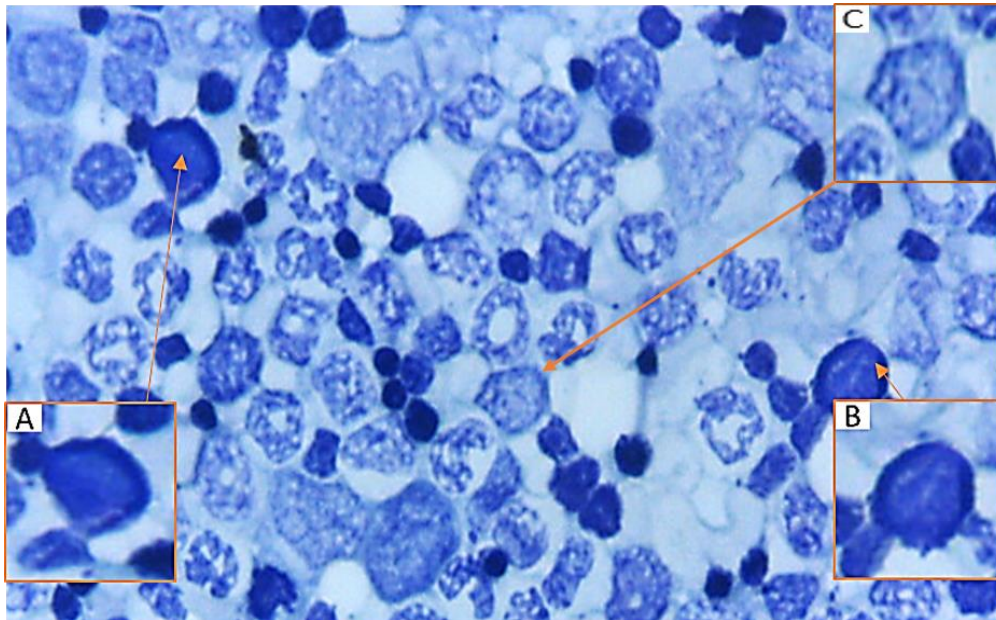


Figura 52 - Tinción de esterasa ANAE en médula ósea de rata Wistar. En esta fotografía podemos comparar la positividad de células inmaduras con células maduras para, los monoblastos (A y B) son esterasa altamente positivos, debido a que son células inmaduras, en cambio un monocito (C) es levemente positivo o nulo. La magnificación de las imágenes fue adquirida en un objetivo de 80X.

La(s) función(es) exacta(s) de esta enzima en monocitos y sus sustratos naturales permanecen esquivas. La familia de las carboxilesterasas es importante en aspectos farmacológicos y toxicológicos porque son capaces de degradar o transformar xenobióticos, incluyendo fármacos y contaminantes ambientales que contienen enlaces éster o amida. Su amplia especificidad y la disponibilidad de múltiples formas de esterasas que transforman el mismo sustrato permiten esta desintoxicación. Por otra parte, el amplio espectro de sustratos posibles complica la búsqueda de los sustratos normales y el papel fisiológico de muchas de las esterasas[109]. La evidencia ha mostrado que la ausencia de las esterasas en los monocitos, puede conducir a ciertas enfermedades malignas y autoinmunes. Se ha encontrado que la deficiencia de esta enzima (ausencia completa o reducción sustancial) aumenta significativamente (con una incidencia del 4-14% A 0,8% en donantes de sangre normales) en pacientes con enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, leucemia linfocítica crónica (CLL), cáncer gastrointestinal y ciertas

enfermedades autoinmunes [110-111-112]. Además, se ha observado una capacidad reducida para matar células tumorales, en contraste con los monocitos positivos para la enzima, que tras la estimulación con lactoferrina presentaron un aumento de 5 a 11 veces su citotoxicidad, los monocitos esterasa negativos de individuos normales son incapaces de lisar células de la línea celular de eritroleucemia K - 562. En conjunto, los procesos de desintoxicación fisiológica y / o en la defensa autoinmune contra los tumores parecen relevantes y definitivos por la actividad de dicha esterasa [113-114-115]

Así mismo, los monocitos y sus precursores tienen alguna positividad granular PAS, leve positividad granular MPO, fuerte apetencia tintorial para la fosfatasa ácida y falta de actividad de la fosfatasa alcalina. Los monocitos contienen lisozima. Proporciones similares de promonocitos, monocitos en médula ósea y monocitos sanguíneos tienen receptores IgG-Fc, IgE-Fc y C3b. En la figura 53 se muestra de manera comparativa la afinidad por PAS entre la serie monocítica y granulocítica.

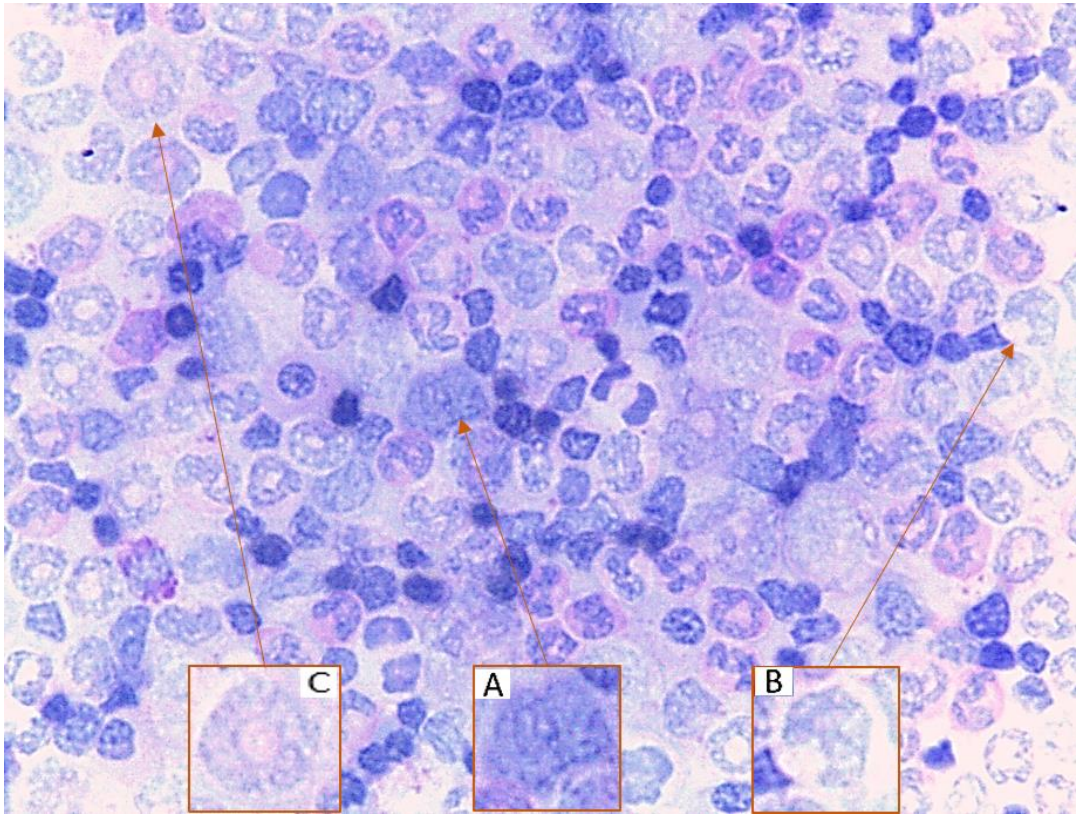


Figura 53 – Tinción de PAS medula ósea. Toda la serie Granulocítica es positiva a la tinción de PAS, en cambio, la afinidad tintorial para la serie monocitoide, dependerá de la madures de la célula, el Monoblasto será nulo debido a la ausencia de gránulos, los promonocitos pueden son levemente positivos o nulos, ya que esta célula empieza la producción de gránulos, el monocito que es la célula más madura y presenta granularidad será PAS

Por otro lado, en la serie linfocitaria, el progenitor linfoide común (CLP), es el precursor de los linfocitos maduros, surge de la diferenciación del HSC bajo la influencia de IL-7 y FLT3. Las células progenitoras linfoides comunes existen en los tejidos hematopoyéticos tanto fetal como postnatal. Éstos generan células B, células T y células NK progenitoras y dan lugar a todos los tipos de linfocitos. Gran parte de la linfopoyesis que ocurre en la médula ósea normal es independiente de la estimulación antigénica y sirve para suministrar al organismo linfocitos B maduros o progenitores linfoides T, que maduran en células T en el timo. Las células B y T maduras recién formadas entran en la circulación y luego migran a los tejidos linfoides periféricos (bazo, ganglios linfáticos, placas de Peyer, anillo de Waldeyer) [116-117-118].

La producción de células B comienza en la vida fetal dentro de la médula ósea, el hígado fetal y el saco vitelino. Postnatalmente se restringe a la médula ósea donde es dependiente de la interacción de la CLP y su progenie con células del estroma de la médula. Las principales características del desarrollo de una célula CLP en una célula plasmática secretora de anticuerpos; este desarrollo se caracteriza por la transposición escalonada de los segmentos V, D y J de los loci de genes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina (Ig), y de la expresión diferencial de los genes reordenados. La maduración de células B tempranas, pro-B, pre-B y células B inmaduras es independiente del antígeno y se produce dentro de la médula ósea bajo la influencia de PAX5 e IL-4 [119-120-121]. Las células B maduras que abandonan la médula tienen IgM e IgD en su superficie. Las células B recién formadas que entran en tejidos linfoides periféricos pueden sufrir proliferación dependiente de antígenos dentro del tejido linfoide y maduración adicional en células plasmáticas. La activación de una célula B madura resulta de la unión del anticuerpo de superficie con una especificidad de antígeno única (generada por el reordenamiento del gen de la inmunoglobulina) al antígeno no procesado correspondiente. Las células B también pueden activarse mediante antígeno procesado a través de un mecanismo dependiente de células T. Algunas células B sufren un desarrollo dependiente de antígeno en las células plasmáticas en la propia médula ósea. Otras células B activadas por antígenos se desarrollan en células B de memoria en lugar de células plasmáticas, lo que permite una rápida producción de anticuerpos en una respuesta inmune secundaria [122-123-124]

La producción de células T ocurre predominantemente en el timo y esto requiere un suministro de progenitores tempranos (células progenitoras de siembra de timo) de la médula ósea. El desarrollo de los linfocitos T depende de la interacción de las células precursoras con las moléculas superficiales y los productos secretores de los elementos epiteliales del timo. Durante la linfopoyesis de T en el timo, el progenitor de la semilla del timo (TSP) madura secuencialmente a partir de progenitores tímicos tempranos, a través de etapas de transición a los linfocitos T maduros. Durante las etapas tempranas de la reorganización de la ontogenia de células T de los genes del receptor de células T (TCR) se produce en la secuencia

δ , γ , β y luego α . El TCR (el receptor de antígeno en la superficie de una célula T) es un heterodímero que consiste en una cadena α y una β en aproximadamente 95% de los timocitos maduros y células T maduras, y de una cadena γ y una cadena δ el resto. Durante el desarrollo de las células T timicas, la célula atraviesa un estadio doble positivo (timocito común) cuando se expresan los antígenos CD4 y CD8. Los timocitos maduros y las células T maduras son CD4 + CD8- (células T auxiliares) o CD4 + CD8 + (células T citotóxicas) [125-126-126-128].

La regulación de la linfopoyesis es compleja, e implica citoquinas, factores de transcripción y células estromales; La misma citoquina puede afectar el desarrollo de diferentes linajes. Para la linfopoyesis de células B, la IL-4 derivada de células del estroma desempeña un papel clave, así como IL-5, IL-6, KL (ligando kit), FL (ligando FLT3) e IL-11. La expresión de los factores de transcripción EBF (factor de células B tempranas) y PAX5 compromete la célula progenitora linfoide al linaje B. IL-7 tiene un papel crítico para el linaje T y es indispensable para el desarrollo de linfocitos T. Otras citoquinas clave son el factor de células madre, FL, IL-2, IL-3, IL-4, IL-12 e IL-10. La unión de ligandos en nichos intratímicos al receptor Notch-1 y la franja lunática de glicosil transferasa (Lfng) sobre la superficie progenitora compromete progenitores al linaje de células T [129-130].

Por su parte la expresión antigénica de la célula progenitora linfoide común es CD34+, CD10+, CD45RA+, CD24- y no expresa marcadores de superficie para células T, B o NK. Las células B y T experimentan entonces una secuencia ordenada de expresión de antígeno durante su diferenciación. Células B: existen patrones característicos de expresión de antígeno a través de la diferenciación de células B en la médula ósea. El concepto actual es que las células B progenitoras experimentan diferenciación como sigue:

1. Líneas B comprometidas en el linaje: CD34+, CD10-, TdT+, cCD79a+, CD19+, progenitor linfoide común o etapa temprana de B (E-B).
2. Células Pro-B: CD34+, CD19+, CD10+, TdT+, CD38++, CD20-, citIgM-. Las moléculas de MHC Clase II se expresan en Pro-células B y células más maduras hasta las células B maduras.

3. Células pre-B: disminución de la regulación de CD34 y TdT para convertirse en CD34+, CD19+, CD38++, cytlgM+, CD20+. Las células pre-B pueden subdividirse en subconjuntos de tipo I y II.

4. Células B inmaduras (IM): CD34-, CD19+, CD20+, CD38++, CD10^{dim} / - sIgM^{low}- TdT-.

5. Células B maduras: CD10-, CD19+, CD38+/-, CD20+, sIgM+, sIgD y cadenas ligeras expresas.

Al microscopio de campo claro, como podemos observar en nuestros resultados los linfoblastos son morfológicamente identificables en la médula y también son conocidos como hematogones, la mayoría de los cuales son precursores de células B. Son células mononucleares redondas de tamaño pequeño a intermedio, con una alta relación núcleo/citoplasma 4:1, núcleos redondeados o indentados, cromatina condensada homogénea, nucléolo ausente o discreto y citoplasma agranular ligeramente basófilo (Figura 54). Comprenden hasta el 5% de las células en la médula ósea de nuestros modelos. Los prolinfocitos presentan citoplasma agranular, muy similar al linfoblasto, pero tiende a ocupar una mayor proporción de la célula. El núcleo es redondo, oval o indentado, muestra la cromatina más compactada, los nucléolos no son usuales, puede llegar a tener uno pero no más (Figura 55) Los linfocitos maduros de la médula, en contraste, son más pequeños con un núcleo redondeado, cromatina más gruesa y sin nucléolo. Tienen una relación núcleo / citoplasma moderadamente alta y citoplasma basófilo que es visible alrededor de la mayoría del núcleo. La morfología de los linfocitos B y T maduros no es diferente.

Los linfocitos tienen un volumen medio de aproximadamente 180 fl y un diámetro de 7-12 μm . La mayoría de los linfocitos son pequeños y como se pudo observar en nuestros resultados (Figura 56) tienen citoplasma azulado escaso, el núcleo es redondo o ligeramente indentado y hay una condensación considerable de la cromatina nuclear. El citoplasma, que a veces sólo consiste en un borde estrecho alrededor del núcleo, puede contener unos pocos gránulos azurófilos. Estudios ultraestructurales revelan que los linfocitos pequeños contienen unos pocos

monorribosomas dispersos, un aparato de Golgi inactivo, unas pocas mitocondrias, unos pocos gránulos lisosómicos y un pequeño nucléolo [131]. Aproximadamente el 10% de los linfocitos son linfocitos grandes. Estos son de aproximadamente 12-16 μm de diámetro, contienen más citoplasma y cromatina menos condensada que los linfocitos pequeños. En la sangre, un linfocito grande ocasionalmente tiene citoplasma voluminoso y varios gránulos azurófilos gruesos (grandes linfocitos granulares). Los linfocitos dejan la circulación sanguínea a través de las células endoteliales de las vénulas postcapilares de los órganos linfoides y finalmente regresan a los canales linfáticos y vuelven a entrar en la sangre a través del conducto torácico. La duración de vida de los linfocitos varía considerablemente. La vida media en seres humanos parece ser de unos 4 años, pero algunas células sobreviven durante más de 10 años. En roedores van de uno a varios meses [132].

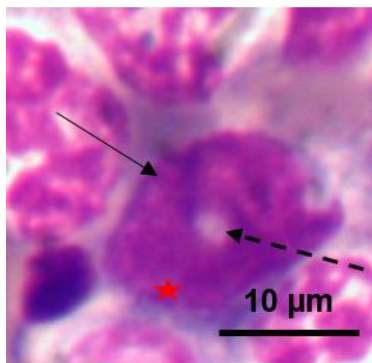


Figura 54 - Linfoblasto- Mide 16.2 μm , el citoplasma es agranular basófilo (estrella roja), en el núcleo se observa un nucléolo prominente (línea punteada)

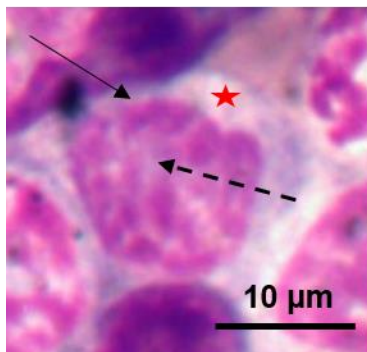


Figura 55 – Prolinfocito - Mide 15.7 μm , el citoplasma es agranular, con una basofilia leve (estrella roja), la cromatina es mas laxa y el nucléolo se aprecia menos (línea punteada).

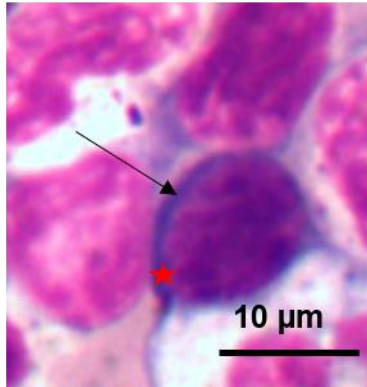


Figura 56 - Linfocito- Mide 11.7 μm , el núcleo se condensa y tiene una forma circular definida, el citoplasma se ve altamente reducido (estrella roja)

Aunque la mayoría de los linfocitos maduros son morfológicamente similares entre sí, pueden dividirse en dos grandes grupos funcionalmente distintos, los linfocitos B (células B) y los linfocitos T (células T) [133]. En base a la naturaleza de las dos cadenas unidas por disulfuros al receptor de células T (TcR), las células T se dividen en células $\alpha\beta$ -T (con $\alpha\beta$ -TcR) y $\gamma\delta$ -T (con $\gamma\delta$ - TcR); La mayoría de las células T son células $\alpha\beta$ -T. Existen cuatro grupos funcionalmente diferentes de células $\alpha\beta$ -T, llamadas células auxiliares o células T, células T citotóxicas / supresoras o células TC, células T reguladoras o células Treg y células TH17[134]. Las TH son células CD4 positivas, reconocen el antígeno y liberan linfocinas implicadas en la promoción de las funciones de las células B y la maduración de otros tipos de células T, incluidas las células TC. Las células TH se subdividen en células TH1 y células TH2. Cuando las TcR de las células T1 reaccionan con los fragmentos de antígeno en las moléculas del CMH de clase II en las células dendríticas, las células presentadoras del antígeno producen IL-12, IL-18 e IFN- γ que a su vez estimulan las células T1 para secretar las citoquinas inflamatorias TNF- Y IFN- γ [135]. Estas citoquinas activan los macrófagos, promoviendo así la muerte de patógenos intracelulares, y también atraen a los leucocitos. Cuando se activan por fragmentos de antígeno en células dendríticas, las células TH2 producen citoquinas tales como IL-4 que afectan al crecimiento y diferenciación de células B (que promueven la síntesis de anticuerpos, incluyendo IgE), IL-13 que promueve la síntesis de IgE, recluta y activa basófilos, y a IL-5 que recluta y activa eosinófilos. De esta manera están involucrados en la muerte de patógenos extracelulares. Después de la reacción con antígenos peptídicos específicos sobre moléculas de MHC clase II, algunas células T CD4

positivas pueden funcionar directamente como células citotóxicas [135], células TC son positivas para CD8, inhiben las funciones de otros linfocitos y también tienen capacidad citotóxica contra células malignas o infectadas por virus. Reaccionan y son activados por péptidos presentados con moléculas de MHC clase I en la célula anormal. Las células TC activadas adquieren gránulos citoplasmáticos azurofílicos (lisosomas) que contienen perforina que forma poros en la membrana celular diana y granzimas (serina proteasas) que entran en la célula a través de los poros y median la apoptosis de la célula diana [136-137].

También expresan más ligando Fas en su superficie; la reacción con Fas en la superficie de la célula diana da como resultado la apoptosis de la célula blanco. Cuando se activan por péptidos presentados en moléculas MHC de clase II, otro subconjunto de células T, las células T reguladoras (células Treg) producen IL-10 que inhibe los efectos estimulantes mediados por TH1 sobre la inflamación y los efectos estimulantes mediados por TH2 sobre la síntesis de anticuerpos; estos efectos operan hacia el final de una respuesta inmune[138]. Un subconjunto adicional de células T, células TH17, se localiza cerca de la piel y las superficies de mucosas, y cuando se activan producen TGF- β e IL-21 y eventualmente IL-17[139]. Los efectos antibacterianos de células TH17 están mediados por la secreción de defensinas y la atracción de los neutrófilos al sitio de la inflamación. También existen linfocitos que no son ni células B, ni células T. Estos fueron originalmente llamados células nulas, pero ahora se llaman células NK (natural killer); Tienen la apariencia de grandes linfocitos granulares [136]. Las células NK carecen de receptores específicos del antígeno pero tienen receptores NK que tienen una capacidad innata para reconocer células infectadas con virus y células tumorales con baja expresión de moléculas MHC de clase I, y matan dichas células por exocitosis de perforina y granzimas. También secretan la citocina antiviral IFN- γ y la citoquina proinflamatoria TNF- α . Los linfocitos TH regulan la hemopoyesis normal incluyendo la granulocitopoyesis eosinófila y la eritropoyesis [140]. Además, las anomalías en las subpoblaciones de células T parecen jugar un papel en la patogénesis de las citopenias en algunos casos de anemia aplásica, aplasia de glóbulos rojos pura asociada con leucemia linfocítica crónica y neutropenia idiopática crónica, de aquí

la relevancia de su identificación tanto histomorfológicamente por tinciones rutinarias como especiales.

Finalmente, la serie megacariocítica también fue analizada en el presente trabajo. La megacariopoyesis es el proceso de desarrollo de megacariocitos y plaquetas dentro de la médula. Los seres humanos generan 10^{11} plaquetas por día, y la producción se puede aumentar 20 veces cuando se demanda[141]. Los megacariocitos se derivan de una cascada de diferenciación del progenitor megacariocito-eritroide (MEP). El MEP bipotente se compromete a la megacariopoyesis bajo la influencia de la trombopoyetina (TPO), el regulador primario de la producción de plaquetas, IL-6 e IL-11 para generar unidades formadoras de colonias de megacariocitos (CFUMK). CFU-MK es una población de células diploides, en la que la síntesis de ADN y la división nuclear (cariocinesis) es seguida por la división celular (citocinesis). CFU-MK sufren una maduración adicional a los megacarioblastos, el primer miembro morfológicamente reconocible de la serie de megacariocitos. Se pueden identificar cuatro tipos de células megacariocíticas en los frotis de médula ósea teñidos con Romanowsky. Estos son, en orden creciente de madurez:

1. megacarioblastos (megacariocitos del grupo I)
2. promegacariocitos (megacariocitos del grupo II)
3. megacariocitos granulares (megacariocitos del grupo III), que producen plaquetas
4. núcleos "desnudos".

La síntesis de ADN ocurre en el 44% de los megacarioblastos, el 18% de los promegacariocitos y en sólo el 2% de los megacariocitos granulares. La síntesis de ADN no está asociada con la división celular y, por lo tanto, los ciclos de síntesis de ADN dan lugar a la producción de células poliploides mononucleadas. El contenido de ADN de un megacarioblasto oscila entre $4n$ y $32n$ ($1n$ = contenido de ADN haploide) y el de los promegacariocitos y megacariocitos granulares de $8n$ a $64n$. Estas células poliploides experimentan una ampliación celular masiva para permitir que se formen grandes cantidades de plaquetas; Cada megacariocito genera 1000-

3000 plaquetas. El citoplasma de megacariocitos contiene una red de membranas especializadas, el sistema de membrana de demarcación (DMS), cuerpos densos, vesículas secretoras y otros orgánulos. Extensiones largas del DMS forman ramas y sufren evaginación para formar procesos pro-plaquetas. Las plaquetas, que se forman por la fragmentación de estos procesos citoplasmáticos, tienen un diámetro de 1-3 μm . Durante la liberación plaquetaria, los megacariocitos granulares sobresalen procesos citoplasmáticos cercanos o directamente a los sinusoides de la médula, trozos de citoplasma se separan y se fragmentan en plaquetas. El núcleo casi "desnudo" que permanece después de la liberación de las plaquetas está rodeado por un estrecho borde de citoplasma que contiene unos pocos gránulos y otros organelos. El tiempo necesario para que un megacarioblasto madure en un megacariocito granular que produce plaquetas es de aproximadamente 6 días. Aunque la mayoría de los megacariocitos están en la médula, algunos entran en la circulación a través de los sinusoides y quedan atrapados en los pulmones; Algunos megacariocitos pulmonares parecen producir plaquetas.

Los megacarioblastos tempranos son difíciles de distinguir de los mieloblastos en médula ósea, pero tienen una apariencia y un fenotipo ultraestructurales distintos. Los megacarioblastos (20-30 μm de diámetro) tienen un único núcleo oval, de forma de riñón o de lóbulo grande, con varios nucléolos, una relación de núcleo a citoplasma muy alta y un citoplasma agranular profundamente basófilico como se puede observar en la figura 53. Promegacariocitos son generalmente más grandes que los megacarioblastos y tienen un núcleo más bajo a la proporción del citoplasma y menos citoplasma basófilo (Figura 54). Tienen lóbulos nucleares superpuestos y el citoplasma puede contener gránulos citoplasmáticos azurófilos. Los megacariocitos granulares (Figura 55) tienen un diámetro de hasta 70 μm y poseen abundante citoplasma de coloración pálida y numerosos gránulos citoplasmáticos azurófilos. El núcleo tiene cromatina gruesa granular y múltiples lóbulos que se extienden a través de gran parte de la célula. Antes de la formación de las plaquetas por la fragmentación de procesos citoplasmáticos, los lóbulos nucleares se unen bastante apretadamente. Después de completar la formación de plaquetas, un núcleo "desnudo" permanece.

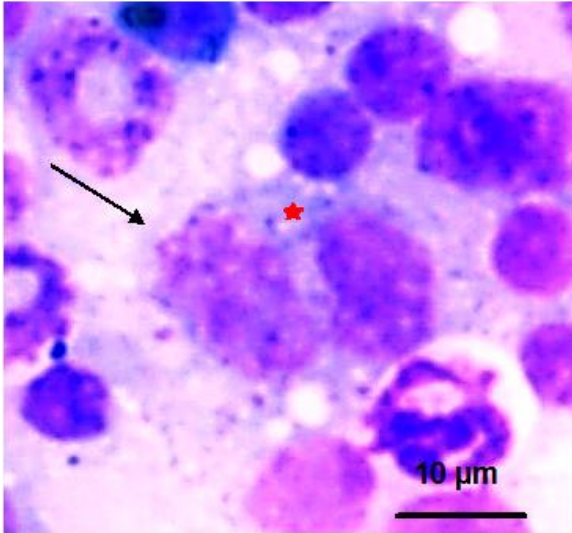


Figura 57 – Megacarioblasto -
Mide 20 μm , con citoplasma
granular (estrella roja), el
núcleo tiene forma oval, se
observan dos núcleos ya que
se encuentra en división.



Figura 58 – Promegacariocito -
Mide 37.5 μm , con citoplasma
granular (estrella roja), el
núcleo contiene lóbulos
superpuestos.

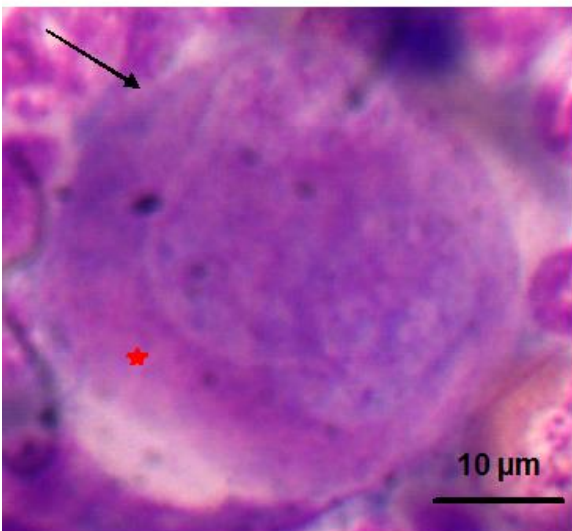


Figura 59- Megacariocito- Mide
35.5 μm , núcleo multilobulado
y con relación
núcleo/citoplasma disminuida,
citoplasma granular (estrella
roja)

Las células del linaje de megacariocitos expresan glicoproteínas plaquetarias. La glicoproteína IIIa (CD61, integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$) seguida por la glicoproteína IIb (CD41, integrina αIIb), la glicoproteína Ib (CD42), la glicoproteína V y el antígeno relacionado con el factor VIII. También se expresan el receptor de trombospondina (CD36, glicoproteína IIIb) y el factor de adhesión celular plaquetaria-endotelial molecular (PECAM-1, CD31). Se han realizado extensos estudios de megacariocitos a lo largo de la diferenciación. Estudios citoquímicos y ultraestructurales han demostrado una peroxidasa plaquetaria (PPO), distinta de la mieloperoxidasa (MPO), en el retículo endoplasmático y el espacio perinuclear de promegacarioblastos, megacarioblastos y megacariocitos. PPO también está presente en los cuerpos densos y el sistema tubular denso de las plaquetas [94-95]. Así mismo, los megacarioblastos granulares son altamente PAS positivos como se puede observar en la figura 56.

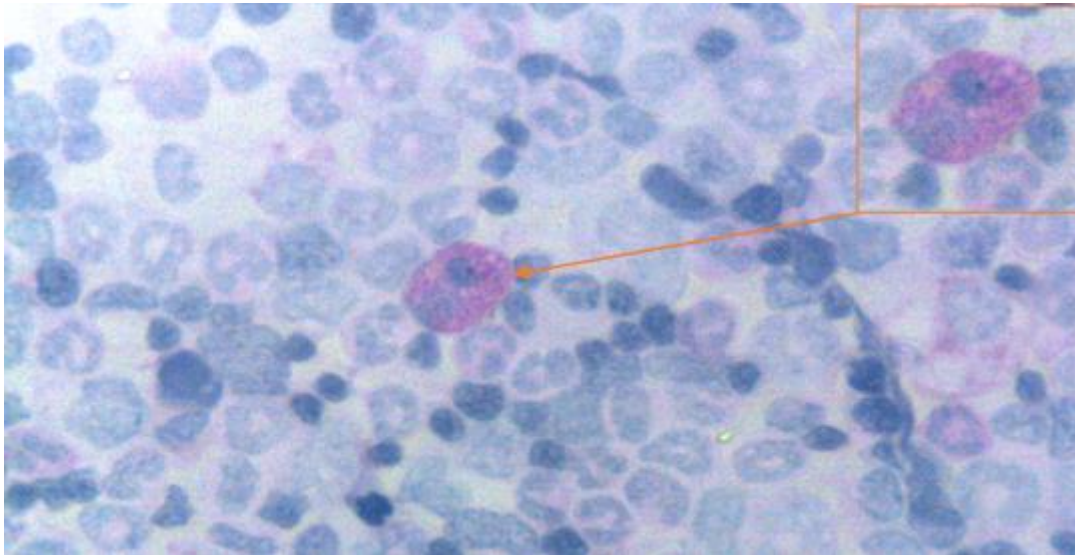


Figura 60 – Tinción de PAS medula ósea. Megacarioblasto con alto contenido de glucógeno en sus gránulos, es por eso que tiene una alta positividad a la tinción.

CONCLUSIÓN

1. Se logró realizar la técnica extracción de médula ósea de huesos largos de las extremidades inferiores de rata.
2. Se demostró que las técnicas histoquímicas para humanos funcionan para caracterizar los componentes hematopoyéticos en la médula ósea de ratas, haciendo las variaciones y adecuaciones necesarias en dependencia del grado de grasa contenida en la muestra primaria.
3. Se caracterizaron histoquímica y morfométricamente a de los componentes hematopoyéticos de las 5 líneas celulares en médula ósea.

BIBLIOGRAFIA

- [1] (Hoffbrand, A. (2005). Postgraduate Haematology (Fifth edition ed). Malden, Massachusetts: Blackwell Publishing)
- [2] Reagan, M. & Rosen, C. (2015). Navigating the bone marrow niche: translational insights and cancer-driven dysfunction. *Nature Reviews Rheumatology*, 12(3), 154-168. <http://dx.doi.org/10.1038/nrrheum.2015.160>
- [3] Yin, T. (2006). The stem cell niches in bone. *Journal Of Clinical Investigation*, 116(5), 1195-1201. <http://dx.doi.org/10.1172/jci28568>
- [4] He, N., Zhang, L., Cui, J., & Li, Z. (2014). Bone Marrow Vascular Niche: Home for Hematopoietic Stem Cells. *Bone Marrow Research*, 2014, 1-8. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/128436>
- [5] Células Madre Hematopoyéticas: origen, diferenciación y función. (2014). 1st ed. [ebook] Veracruz: Marilú Domínguez Pantoja, Héctor Romero-Ramírez, Juan Carlos Rodríguez Alba. Available at: <http://www.medigraphic.com/pdfs/veracruzana/muv-2015/muv151d.pdf> [Accessed 16 Jul. 2016].
- [6] Porwit, A., McCullough, J., & Erber, W. (2011). Blood and bone marrow pathology (1st ed.). Edinburgh: Churchill Livingstone/Elsevier.
- [7] hematopoyética Sorrentino, B. (2004). Clinical strategies for expansion of haematopoietic stem cells. *Nature Reviews Immunology*, 4(11), 878-888. <http://dx.doi.org/10.1038/nri1487>
- [8] Parham, P. (2009). The art of immune system (1st ed.). New York: Garland Publishing [u.a.].
- [9] Korolnek, T. & Hamza, I. (2015). Macrophages and iron trafficking at the birth and death of red cells. *Blood*, 125(19), 2893-2897. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2014-12-567776>
- [10] Brandan, N., Aguirre, M., & Giménez, C. (2008). HEMOGLOBINA (1st ed., pp. 1-3). Corrientes, Arg. Retrieved from https://docs.moodle.org/all/es/images_es/5/5b/Hemoglobina.pdf

- [11] L. Mescher, A. (2009). Junqueira's Basic Histology (13th ed.). McGraw-Hill.
- [12] (1997, 10). ENZIMAS GENERADORAS DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO: MIELOPEROXIDASA. Biblioteca Virtual en Salud. Obtenido 06, 2016
- [13] (Rodak, B., Giovaniello, O., Oxemberg, J., Rondionone, S., & Taveira, J. (2005). Hematología (2st ed., p.130-131). Buenos Aires: Médica panamericana.)
- [14] Manascero Gómez, A. (2003). Atlas de morfología celular, alteraciones y enfermedades relacionadas (1st ed., p. 29). Bogotá: CEJA.
- [15] Mielopoyesis. (2010). MEDICINA INTERNA. Retrieved from <http://www.elrincondelamedicinainterna.com/2010/05/mielopoyesis.html>
- [16] <http://mural.uv.es/monavi/disco/segundo/histologia/Tema27> (1st ed., pp. 1-5). Valencia. Retrieved from <http://mural.uv.es/monavi/disco/segundo/histologia/Tema27>
- [17] J. Miale (1985). Hematóloga Medicina de Laboratorio (Sexta edición). Barcelona, Barcelona: Reverte.
- [18] C. Sun, J. and L. Lanier, L. (2017). Factors that influence the development, homeostasis and survival of NK cells and T cells. Nature Reviews Immunology. [online] Available at: http://www.nature.com/nri/journal/v11/n10/fig_tab/nri3044_F2.html [Accessed 24 Nov. 2016].
- [19] Sistema linfoide. Studylib.es. Obtenido 06, 2016 https://books.google.com.mx/books?id=uC9MpqhMvecC&pg=PA312&lpg=PA312&dq=proteina+ID2++celula+NK&source=bl&ots=kcXUeqB_qJ&sig=Rf3sZglTL3UqGqAq0uYfKniSTAo&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjThrjfoljSAhWa3oMKHS9JBVMQ6AEIIDAB#v=onepage&q=proteina%20ID2%20%20celula%20NK&f=false
- [20] <http://www.telmeds.org/wp-content/uploads/2011/01/T%C3%89CNICAS-CITOQU%C3%8DMICAS-DE-IDENTIFICACI%C3%93N-LEUCOCITARIA.doc>

[21] Krieg, R., & Halhuber, K. (2010). Detection of endogenous and immuno-bound peroxidase — The status Quo in histochemistry. *Progress In Histochemistry And Cytochemistry*, 45(2), 81-139. <http://dx.doi.org/10.1016/j.proghi.2009.11.001>

[22]https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/General_Information/1/390.pdf

[23] McKenzie, S. and Mérito Jane, J. (2000). *Hematología clínica*. 1st ed. México: El Manual Moderno.

[24] BANGLE, R., & ALFORD, W. (1954). THE CHEMICAL BASIS OF THE PERIODIC ACID SCHIFF REACTION OF COLLAGEN FIBERS WITH REFERENCE TO PERIODATE CONSUMPTION BY COLLAGEN AND BY INSULIN. *Journal Of Histochemistry & Cytochemistry*, 2(1), 62-76. <http://dx.doi.org/10.1177/2.1.62>

[25]<http://www.chem.umass.edu/~samal/269/aak.pdf>

[26] MANUAL DE TINCIONES HEMATOLOGICAS. (2013). Scribid. Retrieved 5 October 2016, from <https://es.scribd.com/doc/173280173/MANUAL-DE-TINCIONES-docx>

[27] Crudo, C., Erramouspe, B., Sueldo, E., & Arias, M. (2016). Tinción de hierro medular. *Coloración de Perls. Sociedad Argentina De Hematología*, 20(2), 234-246.

[28] (Tinción de hierro medular. Coloración de Perls. (2016). *Sociedad Argentina De Hematología*, 20(2), 243-246. Retrieved from <http://www.sah.org.ar/revista/numeros/14%20vol%2020%20N2%20%202016.pdf>

[30] Calderón Pascacio, R. (2017). *Curso de Métodos Físicoquímicos en Biotecnología*. 1st ed. [ebook] Cuernavaca, Morelos, Junio 2007. Available at: <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/inmunoquimica.pdf> [Accessed 11 Feb. 2017].

[31] BARRERA RAMÍREZ, L., DRAGO SERRANO, M., PÉREZ RAMOS, J., CECILIA ZAMORA, A., GÓMEZ ARROYO, F., SAINZ ESPUÑES, T., & MENDOZA PÉREZ, F. (2004). CITOMETRÍA DE FLUJO: VÍNCULO ENTRE LA INVESTIGACIÓN

BÁSICA Y LA APLICACIÓN CLÍNICA. Revista Del Instituto Nacional De Enfermedades Respiratorias, 17(1), 42-55. ISSN 0187-7585

[32]ASPIRADO DE MÉDULA ÓSEA Y BIOPSIA DE HUESO. (2010). 1st ed. [ebook] DEPARTAMENTO DE ONCOLOGIA – HOSPITAL “SANTA ROSA”. Available at: http://www.hsr.gob.pe/transparencia/pdf/guiasclinicas/oncologia/guia_aspirado_medula_osea.pdf [Accessed 3 Feb. 2017].

[33] Acevedo, A. (1993). PATOLOGÍA DE LA MÉDULA ÓSEA. 1st ed. [ebook] Madrid. Available at: <http://www.conganat.org/seap/congresos/2003/cursomedulaosea/acevedo.pdf> [Accessed 8 Jan. 2017].

[34] López-Jácome, L., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G. and Franco-Cendejas, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. medigraphic, [online] 3(1), pp.10-18. Available at: <http://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2014/ir141b.pdf>.

[35] The wright-giemsa stain. Secrets revealed. (2002). Clin Lab Med. 2002, pp.(1):15-23.

[36] TEERASAKSILP, S., WIWANITKIT, V. and LEKNGAM, P. (2005). Comparative Study of Blood Cell Staining with Wright-Giemsa Stain, Field Stain, and a New Modified Stain. Laboratory Hematology, 11(1), pp.76-78.

[37] Hoffman, R., Benz, E., Silberstein, L., Heslop, H., Weitz, J., & Anastasi, J. Hematology: Basic Principles and Practice, 2nd ed (2nd ed.). Elsevier.

[38] Bolesse M, Pulicani JP, N. (1980). Diaminobenzidine black" as a new histochemical demonstration of exogenous iron (author's transl)]. Histochemistry.

[39] Kim, S., Punshon, T., Lanzirotti, A., Li, L., Alonso, J., Ecker, J., Kaplan, J. and Guerinot, M. (2006). Localization of Iron in Arabidopsis Seed Requires the Vacuolar Membrane Transporter VIT1. Science, 314(5803), pp.1295-1298.

[40] BAINTON, D.F. & FINCH, C.A. (1964) The diagnosis of iron deficiency anemia. American journal of Medicine, 37, 62-70. DOUGLAS, AS. & DACIE, J.V. (1953) The

incidence and significance of iron containing granules in human erythrocytes and their precursors. *Journal of Clinical Pathology*, 6, 307-313.

[41] Li, H. and Ginzburg, Y. (2010). Crosstalk between Iron Metabolism and Erythropoiesis. *Advances in Hematology*, 2010, pp.1-12.

[42] Nemeth, E. (2004). Heparin Regulates Cellular Iron Efflux by Binding to Ferroportin and Inducing Its Internalization. *Science*, 306(5704), pp.2090-2093.

[43] Li, H., & Ginzburg, Y. (2010). Crosstalk between Iron Metabolism and Erythropoiesis. *Advances In Hematology*, 2010, 1-12.
<http://dx.doi.org/10.1155/2010/605435>

[44] Xi, J., Li, Y., Wang, R., Wang, Y., Nan, X., He, L., Zhang, P., Chen, L., Yue, W. and Pei, X. (2013). In Vitro Large Scale Production of Human Mature Red Blood Cells from Hematopoietic Stem Cells by Coculturing with Human Fetal Liver Stromal Cells. *BioMed Research International*, 2013, pp.1-12.

[45] Human and Mouse CD Marker Handbook. (2017). [ebook] BD Biosciences. Available at: https://www.bdbiosciences.com/documents/cd_marker_handbook.pdf

[46] Garcia de Insausti, C. (2012). También se denomina Lewis x y SSEA-1 (antígeno embrionario específico del estadio 1) y representa un marcador para las células madre pluripotentes murinas, en las que desempeña un papel. Retrieved from
<http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/108184/TCLGDI.pdf;jsessionid=CD7004A1E4D2FF4BA0E68710A084DF8E?sequence=1>

[47] D.F. Bainton, M.G. Farquhar, Origin of granules in polymorphonuclear leukocytes. Two types derived from opposite faces of the Golgi complex in developing granulocytes, *J. Cell Biol.* 28 (1966) 277–301.foto

[48] D.F. Bainton, J.L. Ulliyot, M.G. Farquhar, The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow, *J. Exp. Med.* 134 (1971) 907–934.

- [49] J. Hartmann, S. Sceppek, M. Lindau, Regulation of granule size in human and horse eosinophils by number of fusion events among unit granules, *J. Physiol.* 483 (Pt. 1) (1995) 201–209.
- [50] S.S. Spicer, J.H. Hardin, Ultrastructure, cytochemistry, and function of neutrophil leukocyte granules, A review, *Lab. Invest.* 20 (1969) 488–497.
- [51] B.P. Cham, J.M. Gerrard, D.F. Bainton, Granulophysin is located in the membrane of azurophilic granules in human neutrophils and mobilizes to the plasma membrane following cell stimulation, *Am. J. Pathol.* 144 (1994) 1369–1380.
- [52] A.M. Cieutat, P. Lobel, J.T. August, L. Kjeldsen, H. Sengelov, N. Borregaard, D.F. Bainton, Azurophilic granules of human neutrophilic leukocytes are deficient in lysosome-associated membrane proteins but retain the mannose 6-phosphate recognition marker, *Blood* 91(1998) 1044–1058.
- [53] N.M. Dahms, P. Lobel, S. Kornfeld, Mannose 6-phosphate receptors and lysosomal enzyme targeting, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 12115–12118.
- [54] D. Michaelson, J. Rayner, M. Couto, T. Ganz, Cationic defensins arise from charge-neutralized propeptides: a mechanism for avoiding leukocyte autotoxicity? *J. Leukocyte Biol.* 51 (1992) 634–639.
- [55] W.M. Nauseef, S. McCormick, H. Yi, Roles of heme insertion and the mannose-6-phosphate receptor in processing of the human myeloid lysosomal enzyme, myeloperoxidase, *Blood* 80 (1992) 2622–2633.
- [56] N. Saito, K.A. Pulford, J. Breton-Gorius, J.M. Marse, D.Y. Mason, E.M. Cramer, Ultrastructural localization of the CD68 macrophage-associated antigen in human blood neutrophils and monocytes, *Am. J. Pathol.* 139 (1991) 1053–1059.
- [57] Z.K. Mirinics, J. Calafat, L. Udby, J. Lovelock, L. Kjeldsen, K. Rothermund, S.S. Sisodia, N. Borregaard, S.J. Corey, Identification of the presenilins in hematopoietic cells with localization of presenilin1 to neutrophil and platelet granules, *Blood Cells Mol. Dis.* 28 (2002) 28–38.

- [58] E. Feuk-Lagerstedt, M. Samuelsson, W. Mosgoeller, C. Movitz, A. Rosqvist, J. Bergstrom, T. Larsson, M. Steiner, R. Prohaska,
- [59] A. Nanda, J.H. Brumell, T. Nordstrom, L. Kjeldsen, H. Sengelov, N. Borregaard, O.D. Rotstein, S. Grinstein, Activation of proton pumping in human neutrophils occurs by exocytosis of vesicles bearing vacuolar-type H⁺-ATPases, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 15963–15970.
- [60] R.T. Parmley, W.G. Rice, J.M. Kinkade Jr., C. Gilbert, J.C. Barton, Peroxidase-containing microgranules in human neutrophils: physical, morphological, cytochemical, and secretory properties, *Blood* 70 (1987) 1630–1638
- [61] R.T. Parmley, W.G. Rice, J.M. Kinkade Jr., C. Gilbert, J.C. Barton, Peroxidase-containing microgranules in human neutrophils: physical, morphological, cytochemical, and secretory properties, *Blood* 70 (1987) 1630–1638
- [62] A. Egesten, J. Breton-Gorius, J. Guichard, U. Gullberg, I. Olsson, The heterogeneity of azurophil granules in neutrophil promyelocytes: immunogold localization of myeloperoxidase, cathepsin G, elastase, proteinase 3, and bactericidal/permeability increasing protein, *Blood* 83 (1994) 2985–2994.
- [63] K. Arnljots, O. Sorensen, K. Lollike, N. Borregaard, Timing, targeting and sorting of azurophil granule proteins in human myeloid cells, *Leukemia* 12 (1998) 1789–1795.
- [64] H. Sengelov, L. Kjeldsen, N. Borregaard, Control of exocytosis in early neutrophil activation, *J. Immunol.* 150 (1993) 1535–1543.
- [65] M. Faurschou, O.E. Sorensen, A.H. Johnsen, J. Askaa, N. Borregaard, Defensin-rich granules of human neutrophils: characterization of secretory properties, *Biochim. Biophys. Acta* 1591 (2002) 29–35.
- [66] K.A. Joiner, T. Ganz, J. Albert, D. Rotrosen, The opsonizing ligand on *Salmonella typhimurium* influences incorporation of specific, but not zurophil, granule constituents into neutrophil phagosomes, *J. Cell Biol.* 109 (1989) 2771–2782.

[67] D. Garwicz, A. Lindmark, A.M. Persson, U. Gullberg, On the role of the proform-conformation for processing and intracellular sorting of human cathepsin G, *Blood* 92 (1998) 1415–1422.

[68] U. Gullberg, A. Lindmark, G. Lindgren, A.M. Persson, E. Nilsson, I. Olsson, Carboxyl-terminal prodomain-deleted human leukocyte elastase and cathepsin G are efficiently targeted to granules and enzymatically activated in the rat basophilic/mast cell line RBL, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 12912–12918.

[69] A. Lindmark, D. Garwicz, P.B. Rasmussen, H. Flodgaard, U. Gullberg, Characterization of the biosynthesis, processing, and sorting of human HBP/CAP37/azurocidin, *J. Leukocyte. Biol.* 66 (1999) 634–643.

[70] D. Michaelson, J. Rayner, M. Couto, T. Ganz, Cationic defensins arise from charge-neutralized propeptides: a mechanism for avoiding leukocyte autotoxicity? *J. Leukocyte Biol.* 51 (1992) 634–639.

[71] A. Lindmark, D. Garwicz, P.B. Rasmussen, H. Flodgaard, U. Gullberg, Characterization of the biosynthesis, processing, and sorting of human HBP/CAP37/azurocidin, *J. Leukocyte. Biol.* 66 (1999) 634–643.

[72] L. Liu, T. Ganz, The pro region of human neutrophil defensin contains a motif that is essential for normal subcellular sorting, *Blood* 85 (1995) 1095–1103.

[73] L. Kjeldsen, O.W. Bjerrum, J. Askaa, N. Borregaard, Subcellular localization and release of human neutrophil gelatinase, confirming the existence of separate gelatinase-containing granules, *Biochem. J.* 287 (Pt. 2) (1992) 603–610.

[74] H. Sengelov, P. Follin, L. Kjeldsen, K. Lollike, C. Dahlgren, N. Borregaard, Mobilization of granules and secretory vesicles during in vivo exudation of human neutrophils, *J. Immunol.* 154 (1995) 4157–4165.

[75] A.J. Jesaitis, E.S. Buescher, D. Harrison, M.T. Quinn, C.A. Parkos, S. Livesey, J. Linner, Ultrastructural localization of cytochrome *b* in the membranes of resting and phagocytosing human granulocytes, *J. Clin. Invest.* 85 (1990) 821–835.

[76] F. Mollinedo, M. Nakajima, A. Llorens, E. Barbosa, S. Callejo, C. Gajate, A. Fabra, Major co-localization of the extracellular-matrix degradative enzymes heparanase and gelatinase in tertiary granules of human neutrophils, *Biochem. J.* 327 (Pt. 3) (1997) 917–923

[77] J.B. Cowland, N. Borregaard, The individual regulation of granule protein mRNA levels during neutrophil maturation explains the heterogeneity of neutrophil granules, *J. Leukocyte Biol.* 66 (1999) 989–995.

[78] H. Sengelov, L. Kjeldsen, M.S. Diamond, T.A. Springer, N. Borregaard, Subcellular localization and dynamics of Mac-1 (alpha and beta 2) in human neutrophils, *J. Clin. Invest.* 92 (1993) 1467–1476.

[79] L. Kjeldsen, O.W. Bjerrum, J. Askaa, N. Borregaard, Subcellular localization and release of human neutrophil gelatinase, confirming the existence of separate gelatinase-containing granules, *Biochem. J.* 287 (Pt. 2) (1992) 603–610.

[80] H. Sengelov, L. Kjeldsen, N. Borregaard, Control of exocytosis in early neutrophil activation, *J. Immunol.* 150 (1993) 1535–1543.

[81] C. Laudanna, G. Constantin, P. Baron, E. Scarpini, G. Scarlato, G. Cabrini, C. Dechecchi, F. Rossi, M.A. Cassatella, G. Berton, Sulfatides trigger increase of cytosolic free calcium and enhanced expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-8 mRNA in human neutrophils. Evidence for a role of L-selectin as a signaling molecule, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 4021–4026

[82] J. Ng-Sikorski, R. Andersson, M. Patarroyo, T. Andersson, Calcium signaling capacity of the CD11b/CD18 integrin on human neutrophils, *Exp. Cell Res.* 195 (1991) 504–508.

[83] G. Berton, L. Fumagalli, C. Laudanna, C. Sorio, Beta 2 integrin-dependent protein tyrosine phosphorylation and activation of the FcγR protein tyrosine kinase in human neutrophils, *J. Cell Biol.* 126 (1994) 1111–1121.

[84] M. Fuortes, W.W. Jin, C. Nathan, Adhesion-dependent protein tyrosine phosphorylation in neutrophils treated with tumor necrosis factor, *J. Cell Biol.* 120 (1993) 777–784.

[85] M. Fallman, M. Gullberg, C. Hellberg, T. Andersson, Complement receptor-mediated phagocytosis is associated with accumulation of phosphatidylcholine derived diglyceride in human neutrophils. Involvement of phospholipase D and direct evidence for a positive feedback signal of protein kinase, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 2656–2663.

[86] C. Hellberg, L. Molony, L. Zheng, T. Andersson, Ca signaling mechanisms of the beta 2 integrin on neutrophils: involvement of phospholipase C gamma 2 and Ins(1,4,5)P₃, *Biochem. J.* 317 (Pt. 2) (1996) 403–409.

[87] D.E. Agwu, L.C. McPhail, M.C. Habot, L.W. Daniel, R.L. Wykle, C.E. McCall, Choline-linked phosphoglycerides. A source of phosphatidic acid and diglycerides in stimulated neutrophils, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 1405–1413.

[88] S.J. Suchard, T. Nakamura, A. Abe, J.A. Shayman, L.A. Boxer, Phospholipase D-mediated diradylglycerol formation coincides with H and lactoferrin release in adherent human neutrophils, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 8063–8068.

[89] G. Berton, C.A. Lowell, Integrin signalling in neutrophils and macrophages, *Cell Signal.* 11 (1999) 621–635.

[90] P.G. Bradford, R.P. Rubin, Quantitative changes in inositol 1,4,5-trisphosphate in chemoattractant-stimulated neutrophils, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 15644–15647.

[91] van Lochem EG, van der Velden VH, Wind HK, et al. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry B Clin Cytom* 2004;60(1):1–13.

[92] Bellantuono I. Haemopoietic stem cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36(4): 607–20.

[93] Hanspal M, Smockova Y, Uong Q. Molecular identification and functional characterisation of a novel protein that mediates the attachment of erythroblast to macrophages. *Blood Reviews* 1998;92:2940–50.

[94] Breton-Gorius J, Reyes F. Ultrastructure of human bone marrow cell maturation. *International Review of Cytology* 1976;46:251–321.

[95] Larsen T. Emperipolesis of granular leukocytes within megakaryocytes in human hemopoietic bone marrow. *American Journal of Clinical Pathology* 1970;53:485–9.

[96] Escribano L, Navalon R, Nunez R, et al. Immunophenotypic analysis of human mast cells by flow cytometry. *Curr Protoc Cytom* 2001;Chapter 6:Unit 6

[97] Porter R, Calvi LM. Communications between bone cells and hematopoietic stem cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2008;473:193–200.

[98] Barbara A. Nichols, Dorothy Ford Bainton, and Marilyn G. Farquhar. DIFFERENTIATION OF MONOCYTES Origin, Nature, and Fate of Their Azurophil Granules, *J Cell Biol.* 1971 Aug 1; 50(2): 498–515.

[99] Xiaoying Ye,¹ Donald J. Johann, Jr,² Ramin M. Hakami,³ Zhen Xiao,¹ Zhaojing Meng,¹ Robert G. Ulrich,⁴ Haleem J. Issaq,¹ Timothy D. Veenstra,¹ and Josip Blonder¹, Optimization of Protein Solubilization for the Analysis of the CD14

Human Monocyte Membrane Proteome Using LC-MS/MS, J Proteomics. 2009 Nov 2; 73(1): 112–122.

[100] van Furth R, Cohn ZA, Hirsch JG, Humphrey JH, Spector WG, Langevoort HL. Mononuclear phagocytic system: new classification of macrophages, monocytes and of their cell line, Bulletin of the World Health Organization. 1972; 47(5): 651-658

[101] Charlotte Summers, Sara M. Rankin, Alison M. Condliffe, Nanak Singh, A. Michael Peters, and Edwin R. Chilvers, Neutrophil kinetics in health and disease, Trends Immunol. 2010 Aug; 31(8): 318–324.

[102] Kátia Iadocicco, Luiz Henrique Alves Monteiro and José Guilherme Chaui-BerlinckEmail, A theoretical model for estimating the margination constant of leukocytes, BMC Physiology, 2002, 2:3.

[103] Guillermo Arango Duque and Albert Descoteaux, Macrophage Cytokines: Involvement in Immunity and Infectious Diseases, Front Immunol. 2014; 5: 491.

[104] Huber C, Stingl G, Macrophages in the regulation of immunity. Haematol Blood Transfus. 1981; 27():31-7.

[105] Unanue ER, Beller DI, Calderon J, Kiely JM, Stadecker MJ Am J Pathol, Regulation of immunity and inflammation by mediators from macrophages. 1976 Nov; 85(2):465-78.

[106] Stow JL, Murray RZ Cytokine Growth Factor Rev, Intracellular trafficking and secretion of inflammatory cytokines. 2013 Jun; 24(3):227-39.

[107] Show less J Yourno, P Burkart, W Mastropaolo, F Lizzi, A Tartaglia. Monocyte nonspecific esterase. Enzymologic characterization of a neutral serine esterase associated with myeloid cells. Journal of Histochemistry & Cytochemistry Vol 34, Issue 6, 1986

[108] Uphoff CC , Drexler HG.walker. Biology of monocyte-specific esterase. Leuk Lymphoma. 2000 Oct;39(3-4):257-70.

- [109] Walker.C.H. ;and Machness, M.I. (1983) Esterases: Problems, of identification and claisification. *Biochemical Pharmacology*, 32. 316.5-3269
- [110] Markey. G.M.. Morris. T.C.M., Alexander. H.D.. Kyle, A., Middleton. D.. Turner, A., Burnside, P., Drexler. H.G, Gaedicke.Gi.. Hartman. W. and Robertson, J.H. (1987) Monocyte esterase? A factor involved in the pathogenesis of lympho--proliferative neoplasia. *Leukemia*. 1, 236-239.
- [111] Markey, G.M., McCormick, J.A., Morris, T.C.M., Alexander, H.D., Nolan, L., Morgan, L.M., Reynolds, M.E., Edgar, S., Bell, A.L., McCaigue, M.D. and Robertson, J.H. (1990) Monocyte esterase deficiency in malignant neoplasia. *Journal of Clinical Pathology*, 45,282-286. Markey, G.M., Curry, R.C., Swain, D., Morris, T.C.M.,
- [112]McCormick, J.A., Alexander, H.D. and Edgar, S. (1993)Monocyte esterase deficiency in gastrointestinal cancer.*Journal of Clinical Pathology*, 46,529-532.
- [113] McCormick, J.A., Markey, G.M., Morris, T.C.M., Auld, P.W. and Alexander, H.D. (1 99 I) Lactoferrin inducible monocyte cytotoxicity defective in esterase deficient monocytes. *British Jonrnal of Haematology*, 77, 287-290.
- [114] McCormick, J.A., Markey, G.M. and Morris, T.C.M. (1991) Lactoferrin-inducible monocyte cytotoxicity for K562 cells and decay of natural killer lymphocyte cytotoxicity. *Clinical and Experimental Immunology*, 83, 154-156.
- [115] Newcombe, D.S. (1992) Immune surveillance, organophosphate exposure, and lymphoma-genesis. *Lancet*, 339, 539- 541.
- [116] Blom B, Spits H. Development of human lymphoid cells. 2006. *Annu Rev Immunol* 2006;24:287–320.
- [117] LeBien T, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 2008;112:1570–80.
- [118] Strominger J. Developmental biology of T cell receptors. *Science* 1989;244: 943–50.

[119] Amy Reichlin, Yun Hu, Eric Meffre, Hitoshi Nagaoka, Shiaoqing Gong, Manfred Kraus, Klaus Rajewsky, and Michel C. Nussenzweig B Cell Development Is Arrested at the Immature B Cell Stage in Mice Carrying a Mutation in the Cytoplasmic Domain of Immunoglobulin β , *Exp Med*. 2001 Jan 1; 193(1): 13–24. PMID: PMC2195879

[120] Wing-Yiu Lee and Pavel Tolar, Activation of the B Cell Receptor Leads to Increased Membrane Proximity of the Ig α Cytoplasmic Domain PLoS One. 2013; 8(11): e79148. Published online 2013 Nov 11. doi: 10.1371/journal.pone.0079148

[121] Jang C1, Machtaler S, Matsuuchi L., The role of Ig- α/β in B cell antigen receptor internalization. *Immunol Lett*. 2010 Nov 30; 134(1):75-82. doi: 10.1016/j.imlet.2010.09.001. Epub 2010 Sep 15.

[122] William Hoffman,* Fadi G. Lakkis, and Geetha Chalasani Clin J Am Soc Nephrol. B Cells, Antibodies, and More 2016 Jan 7; 11(1): 137–154.23. doi: 10.2215/CJN.09430915

[123] Wing-Yiu Lee and Pavel Tolar, Activation of the B Cell Receptor Leads to Increased Membrane Proximity of the Ig α Cytoplasmic Domain, PLoS One. 2013; 8(11): e79148.

[124] Thomas MD, Srivastava B, Allman D, Regulation of peripheral B cell maturation. *Cell Immunol*. 2006 Feb; 239(2):92-102.

[125] Christopher S Seet, Chongbin He, Michael T Bethune, Suwen Li, Brent Chick, Eric H Gschweng, Yuhua Zhu, Kenneth Kim, Donald B Kohn, David Baltimore, Gay M Crooks & Amélie Montel-Hagen, Generation of mature T cells from human hematopoietic stem and progenitor cells in artificial thymic organoids, *Nature Methods* 14, 521–530 (2017)

[126] Van Coppenolle, S. *et al.* Functionally mature CD4 and CD8 TCR- $\alpha\beta$ cells are generated in OP9-DL1 cultures from human CD34+ hematopoietic cells. *J. Immunol*. 183, 4859–4870(2009).

[127] Casero, D. *et al.* Long noncoding RNA profiling of human lymphoid progenitor cells reveals transcriptional divergence of B cell and T cell lineages. *Nat. Immunol.* 16, 1282–1291 (2015).

[128] Snauwaert, S. *et al.* *In vitro* generation of mature, naive antigen-specific CD8⁺ T cells with a single T cell receptor by agonist selection. *Leukemia* 28, 830–841 (2014).

[129] Pongubala J, Northrup DL, Lanckim DW, *et al.* Transcription factor EBF restricts alternative lineage options and promotes B cell fate commitment independently of Pax5. *Nature Immunology* 2008;9: 203–15.

[130] Visan I, Tan JB, Yuan JS, *et al.* Regulation of T lymphopoiesis by Notch1 and Lunatic fringe-mediated competition for intrathymic niches. *Nature Immunology* 2006;7:634–43.

[131] J. G. Vos, P. J. M. Roholl, W. Leene Ultrastructural studies of peripheral blood lymphocytes in T cell-depleted rabbits *Cell and Tissue Research* 1980 Volume 213, Issue 2, pp 221–235

[132] David F. Tough Jonathan Sprent Lifespan of lymphocytes *Immunologic Research* 1995 Volume 14, Issue 1, pp 1–12

[133] Blom B, Spits H. Development of human lymphoid cells. 2006. *Annu Rev Immunol* 24:287–320.

[134] Romagnani S. Regulation of the T cell response. *Clin Exp Allergy* 2006 Nov;36(11):1357–66.

[135] van de Berg PJ, van Leeuwen EM, ten Berge IJ, van Lier R. Cytotoxic human CD4⁺ T cells. *Curr Opin Immunol* 2008 Jun;20(3):339–43.

[136] Andoniou CE, Coudert JD, Degli-Esposti MA. Killers and beyond: NK-cell-mediated control of immune responses. *Eur J Immunol* 2008 Nov;38(11):2938–42.

[137] Dent AL, Kaplan MH. T cell regulation of hematopoiesis. *Front Biosci*

[138] Askenasy N, Kaminitz A, Yarkoni S. Mechanisms of T regulatory cell function. *Autoimmun Rev* 2008 May;7(5):370–5.

[139] Chen Z, O’Shea JJ. Th17 cells: a new fate for differentiating helper T cells. *Immunol Res* 2008;41(2):87–102.

[140] Dent AL, Kaplan MH. T cell regulation of hematopoiesis. *Front Biosci* 2008;13:6229–36.

[141] Kaushansky K. Historical review: megakaryopoiesis and thrombopoiesis. *Blood* 2008;111(3):981–6

ANEXOS

Extracción de médula ósea

Las ratas fueron sacrificadas por dislocación. Una vez dentro de la campana de cultivo y con el material de cirugía previamente esterilizado, se extraían los dos fémures y las tibias de la rata. Para la obtención de la médula ósea, se cortan los huesos por ambos extremos y se pasaban 2 ml de medio de cultivo a través del hueso, utilizando una aguja 25G

En el presente trabajo fue realizado para lograr una estandarización de técnicas histoquímicas para identificar celularidad específica de médula ósea para lo cual se realizó como primer paso una técnica de extracción de médula ósea, esta fue realizada en fémur de rata Wistar, en donde posterior a la limpieza de la pieza ósea, la médula fue extraída por medio de aspirado con jeringa y posteriormente 25 – 50 uL de la muestra primaria fue colocado en una laminilla previamente electrocargada por polilisina y se realizó un extendido de tipo impronta, para evitar que las células se aglomeraran en la impronta y así no dificultar la tinción y la lectura de las mismas.

Tinción de Wright

- 1) Hidratar el frotis 1 minuto con agua destilada
- 2) Cubrir el frotis con “tritón” al 0.1% durante 2 minutos
- 3) Lavar con agua destilada
- 4) Cubrir el frotis con el colorante de Wright durante 7 minutos
- 5) Agregar el buffer y soplar suavemente hasta ver la formación de una capa metálica y dejar interactuar 7 minutos
- 6) Lavar con agua destilada
- 7) Dejar secar
- 8) Fijar con resina

Tinción de Perls

- 1) Hidratar el frotis 1 minuto con agua destilada
- 2) Mezclar en el portaobjetos 12.mL de Ferrocianuro de potasio con 12.5ml de ácido clorhídrico al 5% y dejar actuar 1 minuto
- 3) Sumergir el frotis en las soluciones 20 minutos
- 4) Lavar con agua destilada
- 5) Contrateñir con rojo nuclear rápido durante 5 minutos
- 6) Lavar con agua destilada
- 7) Dejar secar
- 8) Fijar con resina

Mieloperoxidasa

- 1) Hidratar el frotis 1 minuto con agua destilada
- 2) En la cubeta de tinción colocar 54mL de agua destilada más 4 mL del buffer concentrado, mezclar, e incubar a 37°
- 3) Disolver el reactivo 4-cloro-1-naftol en 5 mL de metanol y adicionar a la cubeta de tinción
- 4) Adicionar 0.2% mL de peróxido de hidrogeno al 3%
- 5) Sumergir el frotis durante 25 minutos
- 6) Lavar el frotis con agua destilada
- 7) Contrateñir con safranina durante 3 minutos
- 8) Lavar con agua destilada
- 9) Dejar secar
- 10) Fijar con resina

Tinción de PAS

En esta técnica se tuvo que modificar el tiempo de interacción con el reactivo de Schiff a 25 minutos.

- 1) Hidratar el frotis 1 minuto con agua destilada
- 2) Sumergir en ácido peryódico durante 5 minutos
- 3) Lavar con agua destilada
- 4) Sumergir en el reactivo de Schiff durante 25 minutos
- 5) Lavar durante 5 minutos
- 6) Contrateñir sumergiendo el frotis en hematoxilina durante 2 minutos
- 7) Lavar con agua destilada
- 8) Sumergir en alcohol ácido y automáticamente en agua por 30 segundos
- 9) Sumergir 5-10 segundos en carbonato de litio
- 10) 1 minuto a un 1:30 segundos en alcohol al 80%
- 11) 1 minuto a un 1:30 segundos en alcohol al 96%

- 12) 1 minuto a un 1:30 segundos en alcohol al 100%
- 13) Sumergir en Xilol
- 14) Fijar con resina

Tinción de esterasa

- 1) Hidratar el frotis 1 minuto con agua destilada
- 2) En la cubeta de tinción hacer una dilución de 6mL de buffer con 54mL de agua destilada
- 3) Adicionar el reactivo alfa naftil acetato disuelto al mezclar
- 4) En un tubo mezclar 0.75mL de pararosanilina y 0.75mL de nitrito de sodio, dejar reaccionar 1 minuto y vaciar a la cubeta de tinción
- 5) Sumergir el frotis en la mezcla 60 minutos
- 6) Lavar con agua destilada
- 7) Contrateñir con verde de metilo 4 minutos
- 8) Lavar con agua destilada
- 9) Dejar secar
- 10) Fijar con resina