

7  
24  
302827

# UNIVERSIDAD MOTOLINIA

ESCUELA DE QUIMICA  
Incorporada a la U. N. A. M.



**NUEVOS COLORANTES EN HEMATOLOGIA COMO LA  
APLICACION DE LA FTALOCIANINA CUPRICA ISO-INDOLICA**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**T E S I S**  
Que para obtener el Título de:  
**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**  
P r e s e n t a :  
**SONIA            ROGEL            FAVILA**



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

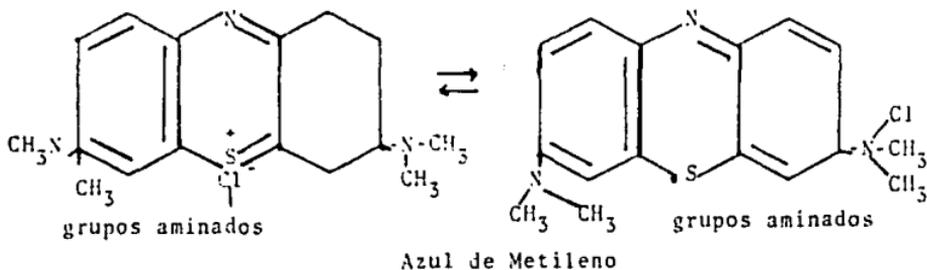
## INDICE

|   | Pag. |
|---|------|
| I INTRODUCCION . . . . .  | 1    |
| I.1 GENERALIDADES . . . . .   | 1    |
| I.1.1 CLASIFICACION DE LOS COLORAN-<br>TES . . . . .  | 9    |
| I.1.2 TABLA No. II DE GRUPOS DE CO-<br>LORANTES POR SUS CARACTERIS-<br>TICAS QUIMICAS . . . . .       | 12   |
| I.1.3 DIFERENCIAS Y SIMILITUDES --<br>QUIMICAS ENTRE EOSINA AZULA--<br>DA Y VERDE DE METILO . . . . . | 13   |
| I.1.4 OBTENCION DEL ANHIDRIDO S- AMINO<br>FTALICO . . . . .   | 14   |
| II OBJETIVOS . . . . .  | 17   |
| III HIPOTESIS . . . . .   | 18   |
| IV MATERIAL Y METODO . . . . .  | 19   |
| V RESULTADOS . . . . .  | 26   |
| VI DISCUSION . . . . .  | 34   |
| VII CONCLUSIONES . . . . .  | 39   |
| VIII LITERATURA CITADA . . . . .  | 40   |

## I. INTRODUCCION

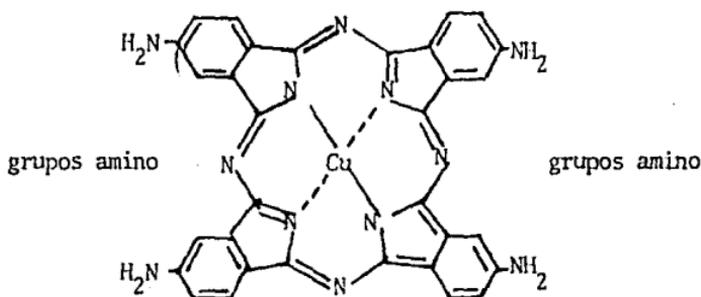
### I.1 GENERALIDADES

Tradicionalmente las técnicas para la tinción diferencial de eritrocitos, leucocitos y plaquetas, en el Laboratorio de Hematología, han estado basados en la técnica de Wright, Giemsa, May Grunwald<sup>(69)</sup>, la de Pappenheim, o variantes de ellas, en las cuales el colorante Azul de Metileno es su base. El Azul de Metileno y Eosina (Cloruro de metil-tionina) es un colorante heterocíclico derivado de una dibenzotiazina<sup>(28)</sup> y tiene la característica en su estructura química de contener grupos amino en los anillos adicionales del heterociclo. Estos grupos amino constituyen los radicales de su afinidad colorante por las estructuras nucleares de los leucocitos, que a su vez es la base de su diferenciación y apreciación morfológica al microscopio.



Recientemente fue introducido en Estados Unidos - por Technicon un sistema de tinción para leucocitos con un colorante llamado Ftalocianina Cúprica Isoindólica. - Este colorante desde el punto de vista químico, es diferente del Azul de Metileno y sus derivados, pues se trata de una Ftalocianina Cúprica Isoindólica y no es derivado de la dibenzotiazina<sup>(28)</sup>.

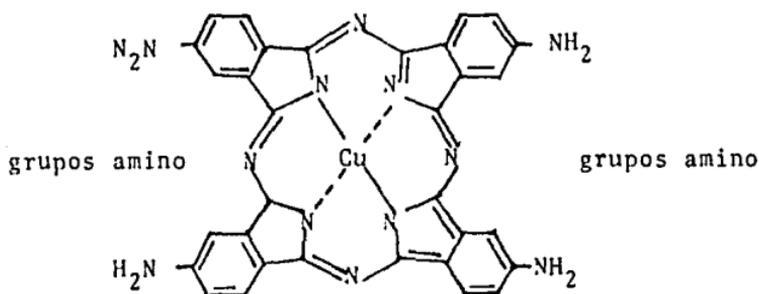
La estructura química de este colorante es la siguiente:



Ftalocianina Cúprica Isoindólica

Semejante con el Azul de Metileno la ftalocianina tiene un color azul y químicamente es una Ftalocianina Cúprica Isoindólica (se le llama comercialmente Azul de Alzacia) y tiene en su estructura también, grupos aniónicos amino, que cumplen las funciones fijadoras de este -

colorante, semejante con el Azul de Metileno en los leucocitos. Los grupos básicos que tiene el Azul de Metileno y sus derivados de la dibenzotiazina, son los grupos orgánicos que se fijan a los componentes bioquímicos de los leucocitos en la técnica de Wright o de Giemsa, para fines hematológicos.



Ftalocianina Cúprica Isoindólica

Esta Ftalocianina es un pigmento que se caracteriza por dar colores azules o verdes, y es un pigmento insoluble en agua; sus soluciones coloridas son estables, y hasta hace algunos años sólo se le había encontrado un uso como pigmento comercial y recientemente se le encontró otro uso para los autoanalizadores como es el Hema--log D, desarrollado por la Compañía Technicon en Estados

Unidos. Sin embargo, en nuestro país el uso de estos aparatos no está muy generalizado, por el costo: por el mantenimiento de sus refacciones y por lo cual se pensó en sustituir una transferencia de tecnología, y en este trabajo de tesis se refiere como objetivo a este punto y también a la síntesis de este colorante para Hematología, para llevar a cabo una técnica manual que pueda ser desarrollada en un Laboratorio de Análisis. Se puede usar esta Ftalocianina Cúprica Isoindólica y combinarse con la Fushina y otro colorante de contraste. De acuerdo a Mansber, Saunders, Groner<sup>(80)</sup>, la Ftalocianina Cúprica Isoindólica identifica a los leucocitos con la ayuda de otro colorante de contraste, de acuerdo a reacciones químicas entre los componentes bioquímicos de estas células como lípidos, ácidos nucleicos y enzimas, y los grupos aniónicos de la estructura química del colorante, antes mencionados. La Tabla No. I siguiente presenta los componentes bioquímicos principales de la afinidad tintorial en leucocitos.

| CELULA     | Lípidos<br>XX | RNA<br>XXX | DNA<br>XXXX | Fosfatasa -<br>Alcalina | Glucógeno | Peroxi-<br>dasa |
|------------|---------------|------------|-------------|-------------------------|-----------|-----------------|
| Blasto     | +             | ++++       | +a++        | neg                     | neg       | neg             |
| Mielocitos | +a++++        | ++         | ++          | +                       | neg       | ++++            |

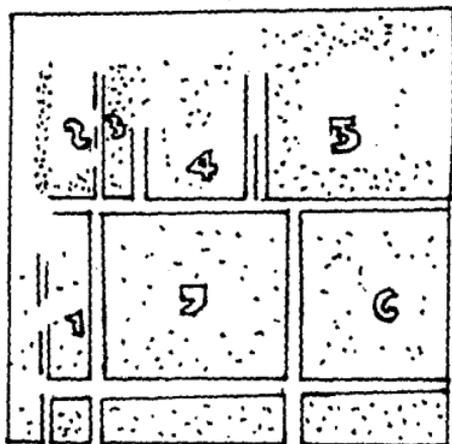
| CELULA                             | Lipidos<br>XX | RNA<br>XXX | DNA<br>XXXX | Fosfa-<br>tasa -<br>Alcali-<br>na | Glucó-<br>geno | Peroxi-<br>dasa |
|------------------------------------|---------------|------------|-------------|-----------------------------------|----------------|-----------------|
| Metamielocitos                     | +a++++        | neg        | +++         | +                                 | +              | ++++            |
| Neutrófilo<br>segmentado           | +a++++        | neg        | ++++        | +                                 | ++             | ++++            |
| Eosinófilos                        | +a++++        | neg        | ++++        | neg                               | neg            | ++++            |
| Basófilos                          | +a++++        | neg        | ++++        | neg                               | neg            | neg             |
| Linfocitos                         | +             | ++++       | ++++        | neg                               | ++++           | neg             |
| Monocitos                          | +a++          | neg        | ++++        | neg                               | neg            | + a++           |
| Megacariocitos                     | +             | ++         | +++         | +                                 | +              | neg             |
| Plaquetas                          | +             | neg        | neg         | neg                               | neg            | neg             |
| Pronormoblastos                    | neg           | +++        | +           | neg                               | neg            | neg             |
| Normoblastos<br>basófilos          | neg           | ++++       | ++          | neg                               | neg            | neg             |
| Normoblasto<br>policromático       | neg           | ++         | +++         | neg                               | neg            | neg             |
| Normoblasto<br>ortocromático       | neg           | +          | ++++        | neg                               | neg            | neg             |
| Reticulocitos                      | neg           | +          | neg         | neg                               | neg            | neg             |
| eritrocitos<br>adultos             | neg<br>+++++  | neg        | neg         | neg                               | neg            | neg             |
| Megaloblasto de<br>todos los tipos | neg           | ++++       | +a++++      | neg                               | neg            | neg             |
| Cuerpos de<br>Howell-Jolly         | neg           | ++         | neg         | neg                               | neg            | neg             |
| Cuerpos de Auer                    | ++++          | ++         | neg         | neg                               | neg            | ++++            |

+ leve, ++ moderado, +++ medianamente intenso e  
++++ intenso; dado por el porcentaje de células que se tiñen. (38)

La Ftalocianina Cúprica Isoindólica fue introducida como un colorante biológico por Steedman<sup>(31)</sup>. Desde -- aquel tiempo empezó a ser investigada firmemente su utilidad en citología, histoquímica, histología, etc. como un colorante para la demostración de mucopolisacáridos. Mc. Manus y Baillie<sup>(31)</sup> usaron el colorante para teñir fibroblastos, Dane y Herman<sup>(31)</sup> usaron la Ftalocianina Cúprica -- Isoindólica para teñir mucina, queratina y prequeratina. Goldstein usó la Ftalocianina Cúprica Isoindólica dentro del mecanismo de tinción de mucina. Así concluyó que la selectividad de la Ftalocianina Cúprica Isoindólica depende particularmente de la dimensión de su larga estructura (como demostró por sus experimentos en diálisis y por la alta porosidad de la estructura de los basófilos los cua-

les acepta y están coloreados por esto. Wismar<sup>(31)</sup> usó la Ftalocianina Cúprica Isodófica con Hematoxilina para teñir cortes de tejidos.

Pantalla del  
Hemalog D



La explicación de esta pantalla del osciloscopio demuestra la actividad de las partículas. Sólo señales sobre las líneas más bajas horizontales son leucocitos. La pantalla está dividida en 7 regiones numeradas. La población de leucocitos está caracterizada por su posición en la pantalla: región 1; región pequeña de linfocitos; región 2: células largas no teñidas (LUC); región 3: monocitos débilmente peroxidasa positivos, en las regiones 4, 5 y 7 neutrófilos.

Ehrlich<sup>(69)</sup> estableció las bases de la diferenciación morfológica de las células hemáticas en base a colorante de anilina, los colorantes de anilina consisten en sales de ácidos y bases. Este investigador unió los colorantes ácidos y básicos llamándolos neutros. Los colorantes policromáticos gracias a la unión de colorantes ácidos y básicos se mejoran las propiedades tintoriales y además se prolonga el colorante resultante. Al colorante de anilina se le denominó "colorante triácido de Ehrlich", que actualmente ya no tiene uso práctico.

Jenner<sup>(69)</sup> utilizó el precipitado de la Eosina mezclada con el Azul de Metileno, y posteriormente le agregó metanol para así obtener una sustancia colorante y fijadora al mismo tiempo. El colorante de Jenner, o colorante de May-Gruenwald en esencia actúa bajo el mismo método pero no tiene la capacidad de que se observen los detalles leucocitarios, las plaquetas y los núcleos de los parásitos.

Romanowsky<sup>(69)</sup> observó que uniendo la Eosina con el producto del Azul de Metileno enmohecido se forma el Azul de Metileno, que es el producto de la reacción del Azul de Metileno, y tiene un color rojo purpúreo; posteriormente Malachowski observó que con este colorante metacromático se observan formas que no aparecen en los de Jenner o

de May-Gruenwald y que el Azul de Metileno se puede obtener por la alcalinización del Azul de Metileno para después mezclarlo con Eosina.

Continuaron las numerosas modificaciones del método de Romanowsky. Una de ellas es la de Wright<sup>(69)</sup> que es la de más aplicación actualmente en los Laboratorios de Hematología.

### I.1.1 CLASIFICACION DE LOS COLORANTES

Con algunas excepciones todos los colorantes sintéticos son compuestos orgánicos aromáticos. Ellos pueden estar divididos dentro de dos grupos principales: no iónicos y iónicos (catiónicos y aniónicos)<sup>(31)</sup>.

El Índice de Color clasifica a los colorantes aniónicos como ácidos, básicos, directos y mordentes de acuerdo a su uso en la Industria Textil.

La molécula del colorante no-iónica consiste en tres partes principales llamadas el cromógeno, el cromóforo y el auxócromo.

Un cromógeno es aquella sustancia arilo sin cambio, la cual es coloreada en virtud de que contiene un cromóforo como parte de su estructura.

Un cromóforo es una configuración que tiene uno o más grupos de enlaces. El cromóforo es responsable de que el cromógeno sea colorido.

Conectando el cromógeno del colorante a un ión o no-ión forma el grupo llamado auxócromo, que pueden ser divididos en dos grupos según su función. Un coligador es una clase especial de auxócromo y por su naturaleza puede ser ácido o básico y puede ser cargado positiva o negativamente. En los colorantes el coligador está sin carga. La función del coligador cargado es transformar el cromógeno dentro del colorante ión y facilitar mas tarde la unión con sustancias de carga contraria.

En la tabla No. II de colorantes (pag 12) son clasificados de acuerdo a la función de sus coligadores.

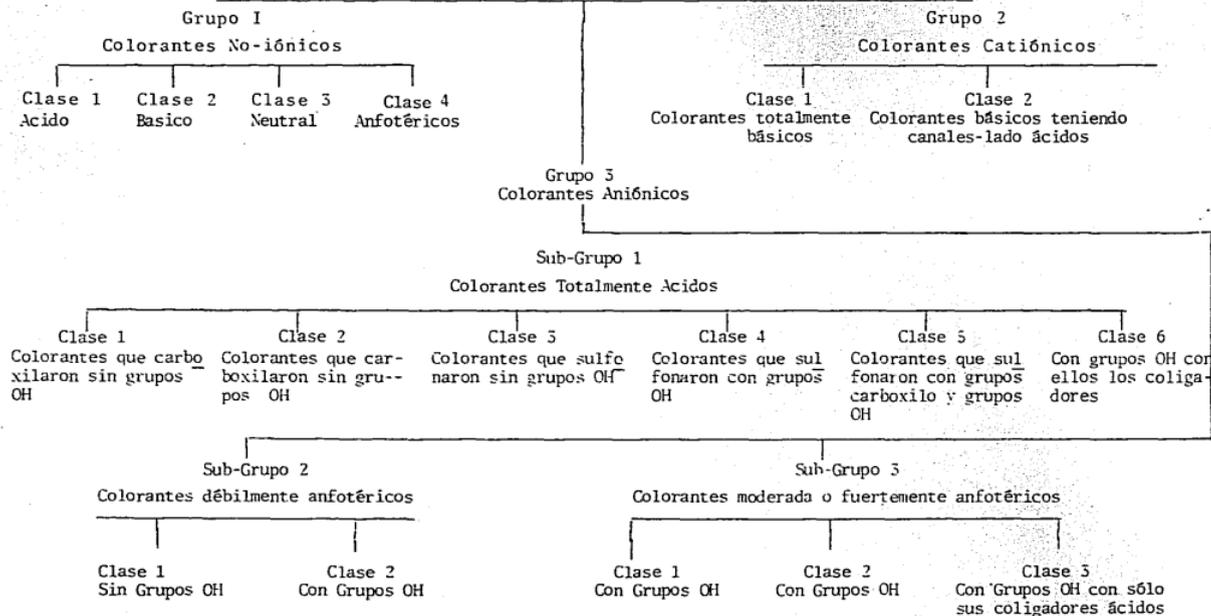
Los coligadores ácidos más importantes son  $\text{SO}_3^-$ ,  $\text{HSO}_3^-$ ,  $\text{NaSO}_3^-$ ,  $\text{COOH}$ ,  $\text{NaCOO}$ ,  $\text{OH}$ ,  $\text{NaO}$  y  $\text{KO}$ . Todos estos grupos son conocidos como coligadores aniónicos de una

clase u otra, pero los coligadores OH y COOH también ocurren en algunos colorantes catiónicos. Los coligadores básicos más importantes son  $N^+$ ,  $NH_2$  y NH. Estos están dentro de los colorantes catiónicos de una clase u otra. (31)

Se explica la fijación de los colorantes como un fenómeno físico-químico, explican que la entrada de los colorantes a los tejidos, es por ósmosis. La fijación del colorante dentro de los tejidos es por propiedades de afinidad electrónica de grupos con cargas (40).

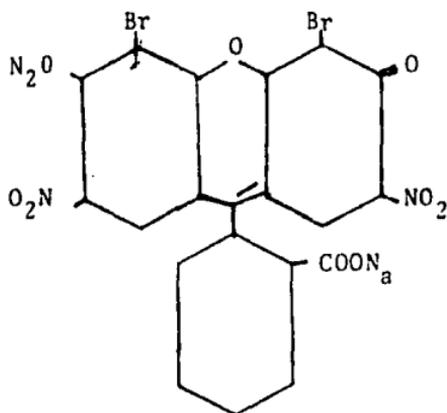
La Ftalocianina Cúprica Iso-Indólica (colorante catiónico Clase 1).

I.1.2 TABLA No. II  
 GRUPOS DE COLORANTES POR SUS CARACTERISTICAS QUIMICAS<sup>(51)</sup>  
 COLORANTES SINTETICOS ORGANICOS



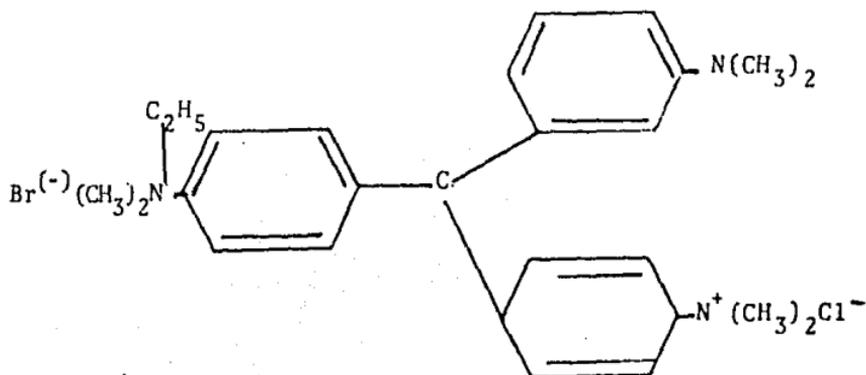
### I.1.3 DIFERENCIAS Y SIMILITUDES QUIMICAS ENTRE EOSINA AZULADA Y VERDE DE METILO

La eosina azulada es una sal disódica de 4', 5'-Dibromo-2', 7'-dinitrofluoresceína; hidroxidibromo de sodio dinitro-o-carboxi-fenil-fluorina. Es soluble en agua con fluorescencia verde y es soluble en álcali. Se usa para teñir madera, algodón y papel. En Histología y Hematología se usa en la técnica de Wright como el colorante de contraste para ver las tinciones de epitelio, fibras musculares, ver el núcleo que se tiñe de color morado. Paredes celulósicas y es un colorante citoplásmico. Proviene de la nitración del 4', 5'-dibromo-fluoresceína. Tiene por fórmula desarrollada (1).



Eosina Azulada

El Verde de Metilo es una doble sal de color pardo muy obscura o negro grisáceo. Soluble en agua y poco soluble en alcohol que forma soluciones azules-verdosas. Es soluble en hidróxido de sodio con precipitado rojo-violado. Se utiliza en la industria para imprimir y teñir textiles y como tinción biológica. Tiene una estructura que tiñe los núcleos de los leucocitos de color verde. Su fórmula química es<sup>(1)</sup>,

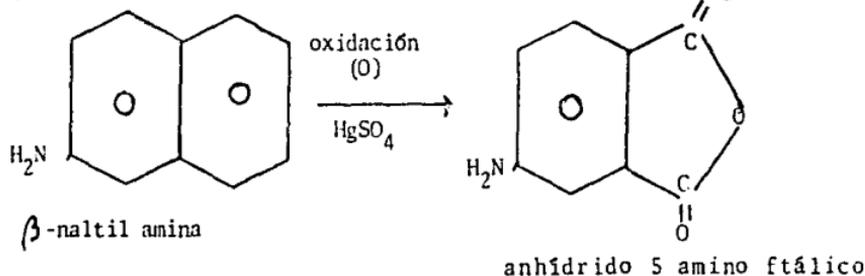


Verde de Metilo

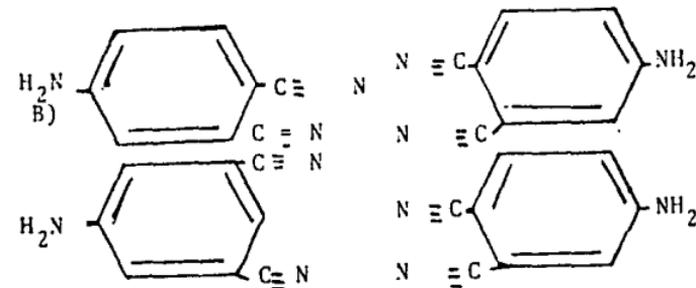
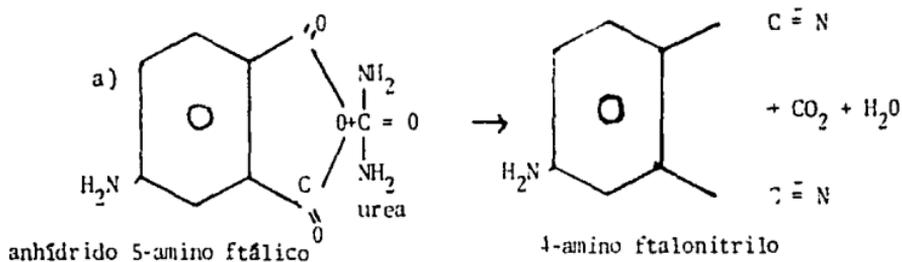
#### I.1.4 OBTENCIÓN DEL ANHÍDRIDO 5-AMINO FTÁLICO

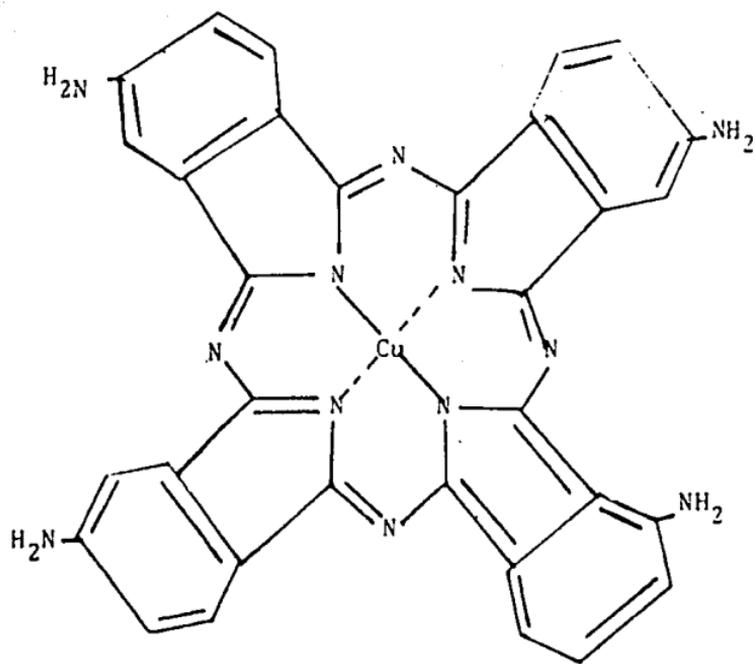
El anhídrido 5-amino ftálico se puede obtener a partir de la  $\beta$ -naftil amina por la oxidación controlada, usando como catalizadores el sulfato mercurioso en medio ácido, este paso de síntesis no se realizó, sino

que se contó con el anhídrido 5-amino ftálico<sup>(28)</sup>



El anhídrido 5-amino ftálico reacciona con la urea para dar el 4-amino ftalonitrilo, formado, reaccionará con el cloruro cuproso, para originar la Ftalocina Cúprica Isoindólica, condensándose en cuatro moléculas. En esta reacción.





Ftalocianina Cúprica Isoindólica

## II. OBJETIVOS

- 1) Con la Ftalocianina Cúprica Isoindólica una téc  
nica de tinción manual para los leucocitos.
- 2) Sintetizar químicamente a este colorante en el-  
Laboratorio para ser usado en la tinción hematol  
lógica.

### III. HIPOTESIS

Con el colorante de Ftalocianina Cúprica Isoindólica se observa una morfología leucocitaria, eritrocítica y plaquetaria simple y adecuada. Esta tinción sustituirá a la del colorante de Wright y otras.

#### IV. MATERIAL Y METODO

En el Hemalog D, de la Compañía Technicon los leucocitos son contados por medios computarizados en los autoanalizadores, pero por otra parte pensamos que se pueden realizar también manualmente con la ayuda de un microscopio de luz y un objetivo de inmersión y fué necesario experimentar a este respecto, encontrando diferentes concentraciones tanto, de reactivos y tiempos necesarios para que ocurra la tinción hematológica y que se aprecien buenas imágenes y también contables de los leucocitos al microscopio (ver fotografías pág 26-33).

Estas condiciones son diferentes de aquellas que se utilizan en los aparatos automatizados como el Hemalog D, que es en la detección osciloscópica y es diferente para su conteo porcentual.

#### Material y Método

Primer colorante de Ftalocianina Cúprica Isoindólica

Se prepara una solución de:

1. Verde de Metilo 1 gr.
2. Solución de acetato de sodio 0.1 N cbp. 100 ml de etanol ajustar el pH a 4.2

3. Ftalocianina Cúprica Isoindólica 1gr.
4. EDTA 100 mgr.
5. Cloruro de cetil piridino 5-6 gotas 1% (500 mgr -10 ml de metanol).
6. Tween 20, 5-6 gotas al 1% (0.1 ml- 10 ml de metanol).

Disolver los colorantes (1 y 3) en la solución - dos, verificar pH a 4.2 y ajustar 4, 5 y 6.

7. Añadir 25 ml de H<sub>2</sub>O destilada, se calienta para disolver el colorante.
8. Se agregan 25 ml de propilenglicol, se calienta hasta ebullición y luego se filtra en papel filtro Watmann # 2. Se checa el pH a 7.4 y sino, se ajusta.

#### Segundo Colorante de Fushina.

1. Se prepara una solución de fushina
  - a) Se prepara una solución de fushina 1 gr.
  - b) Disolviendo el HCl 2N.
2. Se prepara una solución de NaNO<sub>2</sub>
  - a) Se disuelven NaNO<sub>2</sub> al 4% (disolviendo 1 gr en 25 ml de agua destilada).

A la hora de preparar el frotis se disuelven la solución de fushina hexazotizada con nitrito de sodio.

## Buffer de Wright

|                      |           |
|----------------------|-----------|
| Fosfato disódico     | 4.539 gr  |
| Fosfato monopotásico | 5.940 gr  |
| Agua destilada       | 100.00 ml |

De ésta solución tomar 9.54 ml y aforar a 2 lt de agua destilada y checar el pH entre 6.4 y 6.5

## TECNICA

1. Hacer el frotis.
2. Dejar secar al aire.
3. Fijar con metanol 98%, dextrosa 1.5%, resorcinol 0.5% y fluoruro de sodio 84 mg.
4. Secar con pistola de aire 30 segundos.
5. Teñir con el colorante 1° de Ftalocianina Cúprica Isoindólica 10 minutos.
6. Lavar con Buffer de Wright.
7. Contateñir con el colorante preparado de fushina y nitrito de sodio 30 segundos.
8. Lavar con Buffer de Wright 5 minutos.

9. Secar con pistola de aire.
10. Observar.

### Material

Portaobjetos

Aceite de inmersión

Sangre con anticoagulante (oxalato de sodio) para el frotis.

Frascos para guardar los colorantes.

Goteros.

Vásos de precipitados para hacer los lavados.

Pistola de aire caliente.

Papel filtro Watmann # 2.

Cámara reflex

Lente macro marca "Cano"

### Material y Método

#### Material

3 matraces de 250 ml de erlenmeyer

baño maría

aceite

1 termómetro de  $-10^{\circ}$ a  $250^{\circ}$ C

1 embudo Buchner

1 matraz kitasato de 250 ml PYREX

1 mechero con manguera  
 1 soporte  
 tela de alambre  
 1 embudo de talle largo  
 1 tripie  
 1 bureta  
 2 matraces aforados de 250 ml  
 1 vidrio de reloj

#### Sustancias

|  |        |
|--|--------|
| anhídrido 5-amnio ftálico              | 6.0 gr |
| urea                                   | 8.0 gr |
| cloruro cuproso                        | 2.0 gr |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0.1 N) |        |
| etanol                                 |        |
| agua destilada                         |        |
| Espectrofotómetro Coleman              |        |

#### TECNICA

En un matr az que contenga la urea y el ácido bórico se introducen en un baño de aceite luego calentando a -180 - 200 C. La urea, el ácido bórico funden en una mezcla transparente y desprendiendo amoníaco. Cuando la -

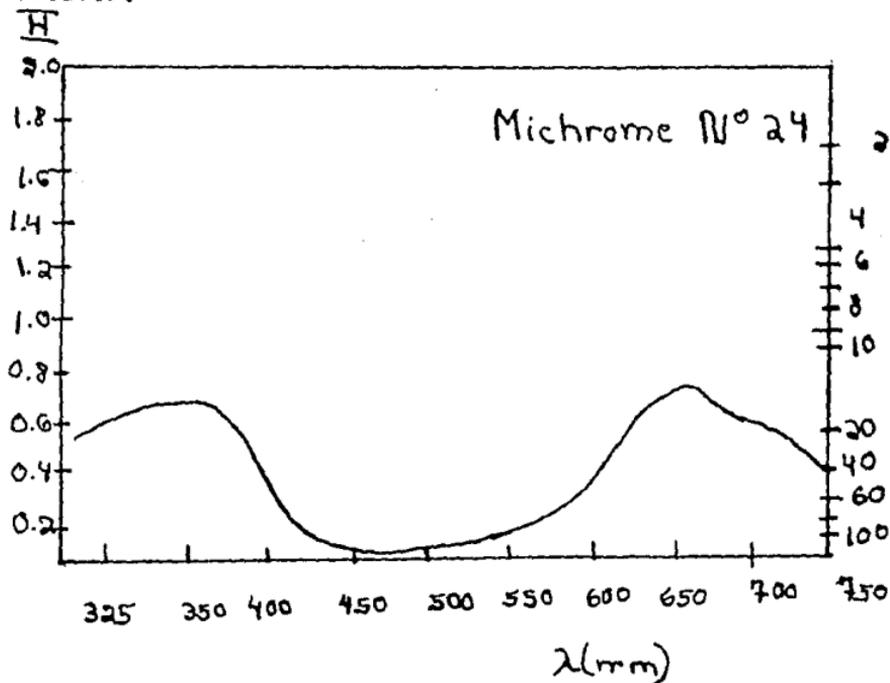
temperatura interior llegue a 150°C, se agrega una mezcla pulverizada, de cloruro cuproso y del anhídrido 5-amino ftálico. Con el termómetro introducido en la masa fundida, se vigila la temperatura entre 150°C y 180°C, y se mezclan el polvo agregado de anhídrido 5-amino ftálico y cloruro cuproso, conviene tapar la boca del matraz de éste con vidrio de reloj con objeto de evitar pérdidas del anhídrido 5-amino ftálico por sublimación de esta sustancia.

Al añadir la mezcla de cloruro cuproso se produce primeramente un color verde que termina transformándose en un colorante azul con brillo purpúreo que es la Ftalo cianina Cúprica Isoindólica, la mezcla debe quedar totalmente seca, lo que ocurre al cabo de 30 minutos de calentamiento.

El producto obtenido se filtra y se recristaliza de etanol o  $\text{CHCl}_3$  se lava con un poco de agua, se acidifica con ac. sulfúrico (0.1 N) y se seca al vacío en Buchner.

El anhídrido 5-amino ftálico se puede conseguir en el comercio puede ser sintetizado, nosotros lo obtuvimos comercialmente.

Esta Ftalocianina Cúprica Isoindólica puede ser identificada por su espectro de absorción ya en la zona de uv del E.P. da un máximo de absorción entre 600 y 650 nm - de longitud de onda ( $\lambda$ ) o una absorción de 0.4 a 0.6, - éste sería un esquema de su espectro de absorción ultravioleta.



## V. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en las siguientes preparaciones obtenidas y coloreadas con este método de tinción, usando como base el colorante heterocíclico Ftalocianina Cúprica Isoindólica, se presentan en las siguientes microfotografías, y esquemas que hemos interpretado en ellas.

Estas fueron obtenidas usando un microscopio SPENCE 40X/0.65 modelo A/O DARK PHASE y usando objetivo de aumento 40X/0.65 y usando una cámara reflex marca Cano y lente macro marca Cano modelo PX-64 CB, POLAROID: MINI-PORTRAIT, HITACON AUTO-3000 S.

### Explicación de las fotografías en color.

FIG. 1 tinción de Ftalocianina Cúprica Isoindólica-Fushina. Gránulos de colorante. En el sentido siguiendo las manecillas del reloj se aprecia en el centro un leucocito, cromatina azul, citoplasma de color pardo y núcleo masivo.

FIG.1 Fotografía en color.

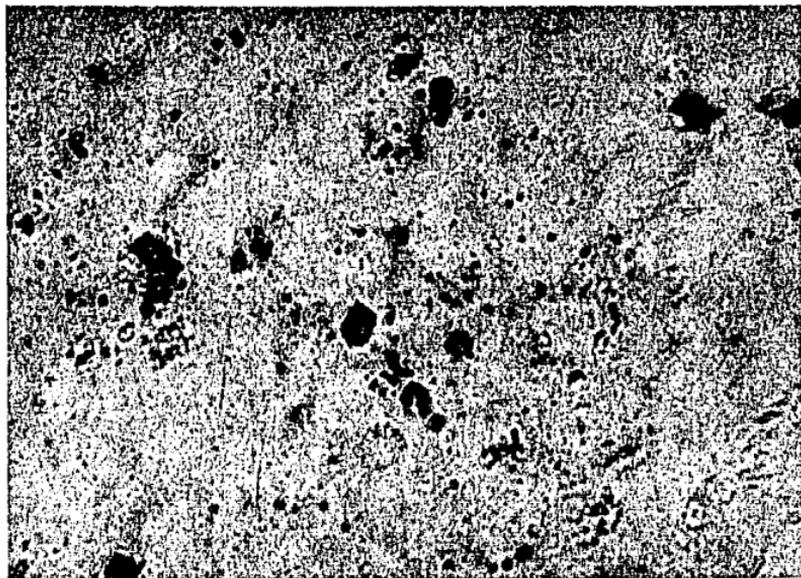


FIG. 2 Tinción de Ftalocianina Cúprica Isoindólica-Fushina. Gránulos de colorante. No se encontraron leucocitos. No se filtró el colorante de Ftalocianina Cúprica Isoindólica antes de la tinción, ni tampoco se disolvió íntegramente al ser calentado. Algunas estructuras pudieran ser plaquetas. Fué una de las primeras imágenes obtenidas para tratar de ajustar las condiciones de la técnica.

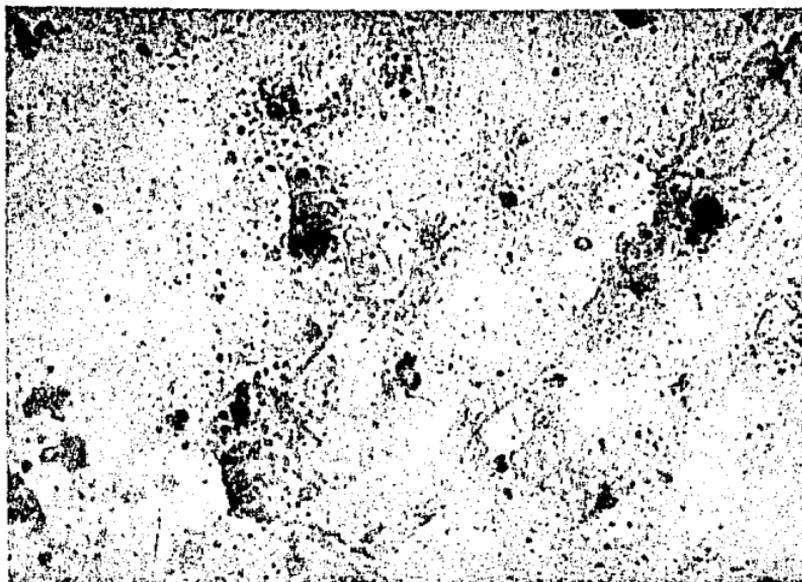


FIG. 3 Tinción de Ftalocianina Cúprica Isoindólica-Fushina, Gránulos de colorante. Residuos de leucocitos polimorfonucleares, se aprecian sus núcleos azules, membranas no muy teñidas, faltó tiempo de tinción para contrarrestar, hubo plasmólisis, núcleos teñidos de azul y citoplasma color pardo a las cuatro y cinco de la tarde - en sentido de las manecillas del reloj.

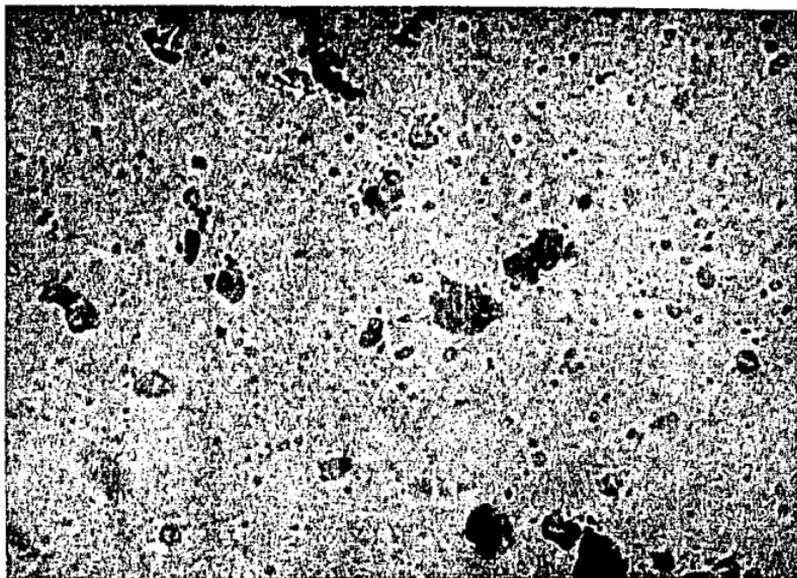


FIG. 4 Tinción de Ftalocianina Cúprica Isoindólica - Fushina. A las ocho de la noche en sentido de las manecillas del reloj se aprecia un leucocito en banda, con cromatina reticular azul, citoplasma sin teñir, se aprecia la forma arrifonada del núcleo, granulaciones citoplásmicas, granulaciones nucleares pardas. En el centro se observa un linfocito con núcleo pardo, citoplasma azul, por contraste se observa su membrana citoplasmática, bien limitada la membrana nuclear, apreciación de cromatina masiva, se aprecia claramente una zona vacuolada y una concentración de cromatina según la gráfica.

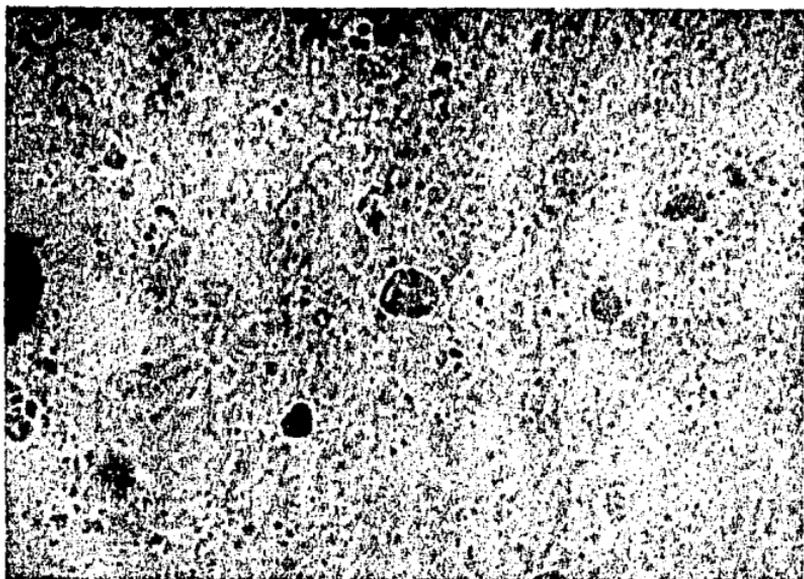


FIG. 5 Tinción de Ftalocianina Cúprica Isoindólica-Fushina. Esta imagen se seleccionó para demostrar la imagen en los eritrocitos, se aprecian algunos gránulos de color también.

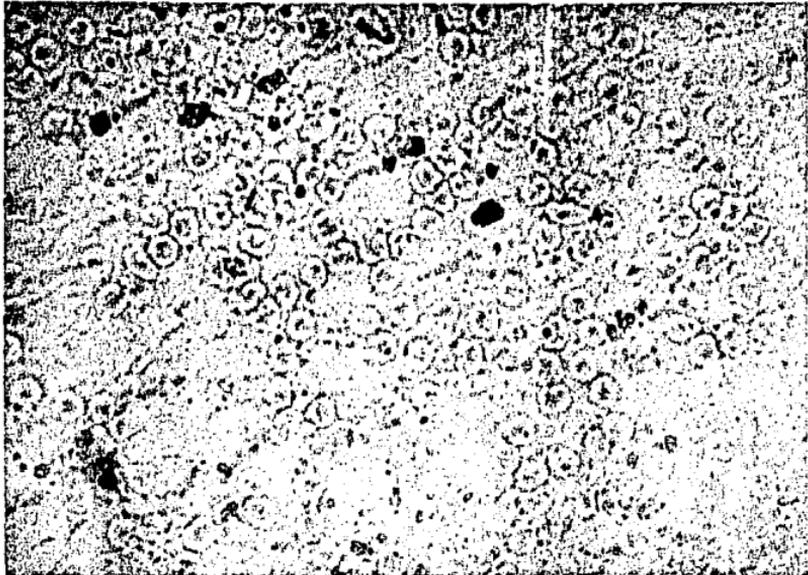


FIG. 6 Tinción de Ftalocianina Cúprica Isoindólica-Fushina. A las once de la noche, este campo de tinción se seleccionó para demostrar la imagen microscópica de los leucocitos neutrófilos segmentados maduros, se aprecian dos neutrófilos cada uno de ellos con tres segmentos, núcleo azul, el otro se encuentra a las seis de la tarde. Granulaciones citoplasmáticas, eritrocitos pardos.

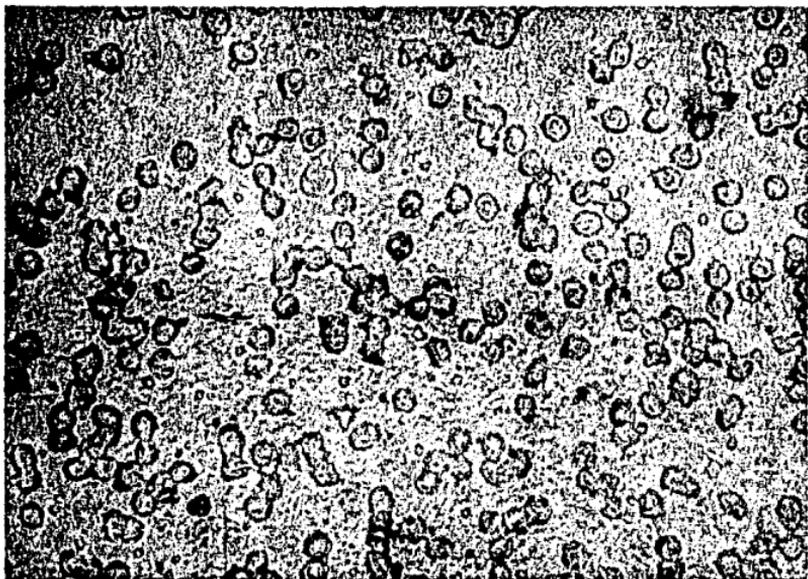
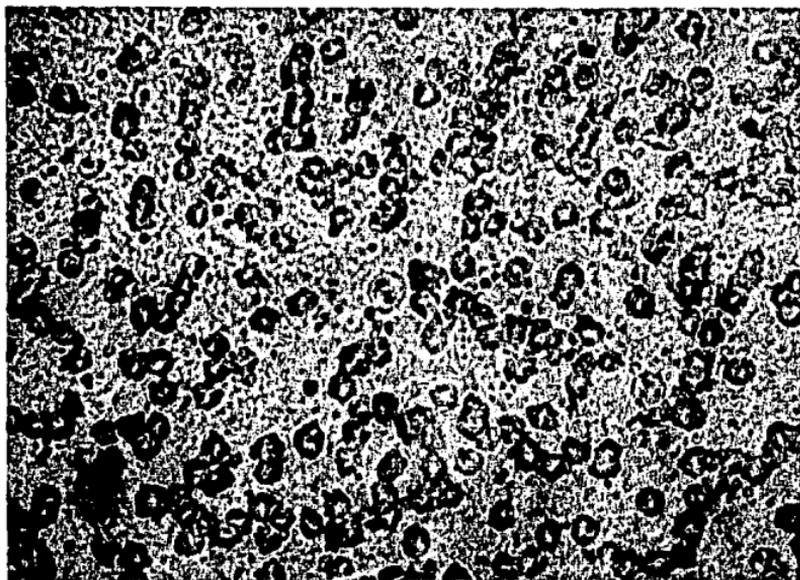


FIG. 7 Tinción de Ftalocianina Cúprica Isoindólica--Fushina. En el centro y a las diez de la noche. Este -- campo de tinción se seleccionó también para demostrar imá genes microscópicas de leucocitos polimorfonucleares; leu cocitos neutrófilos segmentados maduros. Se aprecian - dos neutrófilos uno con dos segmentos y otro con tres -- segmentos. El centro que tiene dos lóbulos, aparecen tam bién en el citoplasma granulaciones teñidas en color par do.



## VI. DISCUSION

La técnica empleada sería sumamente útil en la diferenciación de padecimientos infecciosos generales como es el caso de la mononucleosis infecciosa en el que se tiñen perfectamente el núcleo de color azul y el citoplasma de color pardo los linfocitos.

En la Compañía de TECHNICON se utiliza saponina para destruir los eritrocitos, pero en este trabajo, experimental no se ocupó saponina, por lo cual los eritrocitos no se destruyen y por esto sirve esta técnica, para determinación de tipos de anemia.

El anticoagulante usado en esta técnica fué el oxalato de sodio que como sabemos actúa sobre el factor V de la coagulación y el calcio y no altera la morfología de los leucocitos en pequeñas cantidades que es lo que tratamos de identificar.

La temperatura a la que estuvo sometida la muestra fué de 10°C, se refrigera al inicio del experimento puesto que a altas temperaturas las células de la sangre total y sus enzimas se desproteinizan y aumentan su actividad enzimática. Lo más factible es bajar la temperatura para que los componentes de la célula se conserven más tiempo y se puedan obtener frotis donde se observen los

leucocitos mejor.

Esta técnica de tinción para la diferencial de leucocitos es confiable porque es reproducible aunque no es exacta.

Los métodos del cloroacetato de esterasa y esterasa inespecífica proveen algunas ventajas sobre los métodos descritos (como es el caso del PAS). Estos métodos son simples, reproducibles y la localización de la enzima es precisa. Los productos de la reacción son altamente cromógenos e insolubles en muchos solventes orgánicos. Los frotis teñidos por esos métodos pueden ser preparados en Permount y guardados permanentemente.

Varios autores han usado de esterasa inespecífica con el marcador de enzima para monocitos. En sus métodos los mielocitos exhiben una actividad clara y fuerte pero pueden ser diferenciados de los monocitos por tener una actividad en presencia de fluoruro. En el método en el que se utiliza acetato de  $\alpha$ -naftil y fushina hexazotizada, la actividad enzimática de los granulocitos es difusa y muy débil, considerando que la actividad de los monocitos es muy fuerte y granular. El contraste entre esas dos es tan marcado que no es necesario usar fluoruro para ampliar más la diferenciación. Este método

do es muy útil en la identificación de monocitos e histiocitos en frotis y determinando la pureza de la preparación de linfocitos.

La combinación de los métodos para la esterasa inespecífica y el cloroacetato de estera provee un significado objetivo y exacto demostrando monocitos y granulocitos simultáneamente en muchas preparaciones citológicas. En las leucemias agudas esta combinación de métodos citoquímicos es superior a la tinción de Romanowsky en la identificación de células y puede auxiliar en la diferenciación del diagnóstico de algunas leucemias monocíticas o granulocíticas. En muy raros casos se demuestran mieloblastos con poca o nula actividad del cloroacetato de esterasa, el método inespecífico de la esterasa-peroxidasa puede ser usado en lugar del método del cloroacetato de esterasa.

En el método de la peroxidasa los monocitos y los granulocitos son positivos. Es frecuente experimentar que esos dos tipos de células puedan ser diferenciadas por la reacción de la peroxidasa por la actividad de esta enzima en los monocitos es más débil que la encontrada en los granulocitos por cualquier técnica, pueden tener una fuerte actividad de la peroxidasa, mas que de

los monocitos. Esta diferencia cuantitativa entre las actividades de las enzimas de los monocitos y los granulocitos puede ser despreciable cuando un método es sensitivo usando el método de Kaplow. En lo que respecta a esta reacción del cloroacetato de esterasa es más inespecífica para los granulocitos que la reacción de la peroxidasa.

Los métodos del cloroacetato de esterasa y peroxidasa fueron examinados para determinar la habilidad para teñir los mieloblastos en la sangre de pacientes con leucemia aguda. El método de Kaplow fué el más sensitivo para el método de cloroacetato de esterasa. La combinación técnica del cloroacetato de esterasa y peroxidasa pueden probar que es más sensitiva la identificación de mieloblastos en una leucemia granulocítica aguda que cualquiera de los métodos por aislado.

Generalmente se acepta que los neutrófilos, eosinófilos y granulocitos basófilos son derivados de 1 mieloblasto común y un promielocito. Si esto es verdad, después de rastrear las conexiones del sistema de enzimas o productos metabólicos intermedios debería ser encontrado en esas células. De cualquier modo cuando los granulocitos fueron examinados

con peroxidasa (cianuro-resistente o cianuro-sensitivo) - cloroacetato de esterasa y metacromasia, sólo los granulocitos neutrófilos (pero no los eosinófilos o basófilos) demostraron que se podían rastrear conexiones con mieloblastos y promielocitos. El mielocito eosinófilo y sus descendientes difieren porque sus mieloblastos y promielocitos tienen gránulos metacromáticos y son muy débiles de actividad de cloroacetato de esterasa y peroxidasa. - Esos lineamientos encontrados en los eosinófilos y en -- los granulocitos basófilos pueden ser derivados de algún mieloblasto o promielocito que son diferentes de la célula madre o de los granulocitos neutrófilos. Esas células jóvenes son cianuro-resistentes a la actividad de la peroxidasa o con gránulos metacromáticos presentes en los frotis de pacientes con o sin leucemia de la médula ósea. Es muy raro en los teñidos de frotis de pacientes con leucemia escogidos para este fin que no se les encuentre leucemia. Considerando que los frotis de pacientes con leucemia granulocítica crónica que presentan eosinofilia o basofilia de células jóvenes se han encontrado difícilmente.

## VII. CONCLUSIONES

1. El diseño de una técnica manual para la tinción de leucocitos usando el colorante heterocíclico Ftalocianina Cúprica Isoindólica puede ser llevado a cabo en un Laboratorio de Análisis Clínicos que cuente con el equipo sencillo de tinción.

2. La síntesis de este colorante sí es posible, peró actualmente por la situación de nuestro país para obtener las materias primas, sólo lo logramos parcialmente.

### VIII. LITERATURA CITADA

1) An Encyclopedia of Chemicals and Drugs. The Merck Index. 9<sup>th</sup> edition. Published by Merck Co., Inc. Printed in the USA, 1979.

2) Ansley H and Ornstein L. Enzyme histochemistry and differential white counts on Technicon Hemalog D. Adv. Automated Anal 1:437, 1971.

3) Archer RK and Broome J. Studies on the peroxidase reaction of living eosinophils and other leukocytes. Acta Haemat 29: 147-156, 1963.

4) Atamer M and Groner W. Investigation of the left shift with peroxidase chemistry of Hemalog D. Adv. Automated Anal 3:33, 1973.

5) Barka T and Anderson PJ. Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium pararosanilin as coupler. J Histochem Cytochem 10: 741-753, 1962.

6) Benveniste J. The Diagnosis of allergic disorders using the Technicon Hemalog D System for in vitro

basophil counting and degranulation. 2<sup>th</sup> edition. - -  
Technicon International Division. Geneva Switzerland --  
1980.

7) Binet J.L. and collaborates. Investigation of  
a New Parameter in Chronic Lymphocytic Leukemia: The --  
Percentage of Large Peripheral Lymphocytes Determined by  
the Hemalog D. Prognostic Significance. Am J Med 63:683,  
1977.

8) Brittin G and Brecher G. Instrumentation and --  
automation in Clinical Hematology, Progress in Hematolo-  
gy. Edited by EB Brown, CV Moore. Vol 7. Grune and --  
Stratton, New York, USA, 1971.

9) Boseila AWA. Hormonal influence on blood and  
tissue basophilic granulocytes. Ann N.Y. Acad SCI 103:  
394, 1963.

10) Bozdech M; Bainton, D and Mustacchi P. Partial  
peroxidase deficiency in neutrophils and eosinophils - -  
associated with neurological disease: a case report --  
with histochemical, cytochemical and biochemical studies.  
Am J Clin Pathol (in press), 1979.

11) Braunstein H. Esterase in leukocytes. J Histochem Cytochem 7: 202, 1959.

12) Brittin G and Brechar G. Instrumentation and automation in clinical hematology. 7 edition. Edited by EB Brown, C.V. New York, USA, vol 7, 1971.

13) Cline M.J. The White Cell. Harvard University Press, 461-471, 1973.

14) Cooper J.P and Cruickshank CND. Improved method for direct counting of basophil leukocytes. J Clin Pathol 19: 402, 1966.

15) Davis BJ. Histochemical demonstration of erythrocyte esterase. Proc. Soc. Exp. Biol. 101:90-93, 1959.

16) Davis BJ and Ornstein L. High resolution enzyme localization with a new diazo reagent. J. Histochem Cytochem 7: 297, 1959.

17) Davidson E. Consecutive cytochemical staining. Adv. Automated Anal 1: 447, 1971.

18) Davidsonh y colaboradores. Diagnóstico Clínico por el Laboratorio. 6<sup>a</sup> edición. Salvat editores - México 4: 103-310, 1981.

19) De Laey P. Ed Clinical benefits of Automated Differential Counting. 1<sup>a</sup> edition. Technicon Instruments Co. Ltd. Printed in England, 1978.

20) Debauche R. Evaluation of the Utilisation of the Hemalog D System in a Hospital Clinical Laboratory. Technicon International Colloquium on Automation in Hematology. Paris, 1976.

21) Gilbert H.S. The Quantitation and Classification of Leucocytes. The Clinical Value of the Hemalog D. Proceedings of Automated Cytochemistry and Haematology Exchange (ACHE) Workshop 1, Brugge, 81-84 (Section -- 2.1), 1978.

22) Gilbert H.S. The Clinical Application of Automated Cytochemical Techniques in Patient Management. -- Technicon International Congress 1972, Advances in Automated Analysis, Vol. 3, 51-56 (mediad Inc. 1973).

23) Gilbert S.H. and Ansley H.R. Application of Automated Cytochemical Techniques to the Characterization of Leukemic Cells. Technicon International Congress, - 1976, pp 1-8.

24) Gilbert H.S.; Ohnuma T; Ferbach B and Ansley, - H. Characterization of leukemic cell populations by automated cytochemistry, Proc. of the 16<sup>th</sup> International -- Congress of Hematology, Kyoto, Jpan, 1976.

25) Gilbert H.S. and Ornstein L. Basophil Counting With a Newstaining Method Using Alcian Blue. Proceeding By American Cancer Society and by the Jack Martin Fund. Vol 46 (USA): 279-286, 1975.

26) Gilbert H.S. and Ornstein L. A new method for basophil counting with alcian blue. 1<sup>a</sup> edition, Technicon Instruments Corporation. USA - 99, 1973.

27) Gilbert H and Ornstein L. A new method of basophil counting using Ancian Blue. In press.

28) Giral F. Productos Químicos y Farmacéuticos. Editorial Salvat. Vol III: 1797-1800, 1946.

29) Goodpasture EW. A peroxidase reaction with so  
dium nitroprusside and benzidine in blood smears and --  
tissue. J Clin Lab Med 4: 442-444, 1919.

30) Groner W and Tycko D. Characterizing blood - -  
cells by biophysical measurements in flow. First Edi-  
tion. Technicon Instruments Corporation 6: 141-155,  
1980.

31) Gurr E. Synthetic Dyes in Biology, Medicine --  
and Chemistry. Second edition. Academic Press INC. --  
Printed in Great Britain: 1-8, 1962.

32) Harris S.C. Evaluation of the Technicon Hema-  
log D for Automated Determination of Leukocyte Differen-  
tials. Second edition. Technicon Instruments Corpora-  
tion, 1976.

33) Kim YR and Saunders AM. Chemical control of -  
peroxidase activity of fixed human leukocytes in suspen-  
sion as measured by glow thoub techniques. J Histochem  
Cytochem 22: 292, 1974.

34) Kaplow LS. Simplified myeloperoxidase stain - using benzidine-dihydrochloride. Blood 26: 215-219, 1965.

35) Karmen A. Clinical Experimentation with the Technicon Hemalog D Leukocyte and Differential Counter. Technicon International Colloquium on Automation in Hematology, Paris, May 7, 1976.

36) Mansberg HP. High speed, high precision leukocyte differential counting by cytochemical electro-optical detection (abstr) 26<sup>th</sup> Annual Conference on Engineering in Medicine and Biology, September, 1973.

37) Mc Henry L.E; Parker PK and Branch B. Workload Patterns in Hematology Before and After Hemalog D. Internal Communication, Technicon Instruments Corporation, -- Tarrytown, N.Y., 1974.

38) Miale JB. Laboratory, Medicine, Hematology. 5<sup>th</sup> edition. Ed. 2 CV Mosby Company, ST. Louis, 1967.

39) Mansberg H.P.; Saunders A.M. and Groner W. The Hemalog D white cell differential system. J Histochem - Cytochem 22: 711, 1974.

40) Murillo, H. Tratado Elemental de Química Orgánica. Tercera edición. Editorial E.C.L.A.L.S.A. Impreso en México, D.F. 389-396, 1974.

41) Nakane P. Simultaneous localization of multiple tissue antigens using peroxidase-labeled antibody. J Histochem Cytochem 16: 557, 1968.

42) Neumann N. A comparative study of the Morphological and Histochemical Methods for Establishing Leucocyte Differentials. Second edition. Symposium Technicon Germany, Frankfurt: 1-5, 1978.

43) Nies K.S. and collaborates. Chronic Lymphocytic Leukemia with Gamma Chain Cytoplasmic Inclusions. Am J Clin Pathol 65, 948-956, 1976.

44) Ornstein L and Ansley HR. Spectral matiching of Classsical cytochemistry to automated cytology. J Histochem Cytochem 22: 453, 1974.

45) Ornstein L; Ansley H and Saunders A. Improving manual differential white cell counts with cytochemistry, Blood Cells 2: 557-1976.

- 46) Pearse RJ; Zee TW and Mickelson MM. Purification of lymphocytes and platelets by gradient centrifugation. J Lab Clin Med 72: 842-845, 1968.
- 47) Richards J.D.M. An Evaluation of the Technicon Hemalog D Differential White Blood Cell Counter in a Routine Hospital Laboratory. Technicon International Colloquium on Automation in Hematology, France, 1976.
- 48) Richter M.N. Leukemia, the relative values of cell morphology and the peroxidase reaction as diagnostic aids. Arch Int. Med 36: 13-23, 1925.
- 49) Ross ND and Bardwell A. Automated Cytochemistry and The White Cell Differential in Leukemia. USA. Blood Cells 6, 455-470, 1980.
- 50) Ross D.W. and Bayer C. Evaluation of the Hemalog D automated White Blood Cell Differential in Hematology Patients. 2<sup>th</sup> edition. Proceeding Technicon Symposium, Germany: 127-133, 1978.
- 51) Ross D.W. and Bayer C. Cancer patients monitored by Hemalog D automated cytochemistry. In. Proceed---

dings on VIII Int. Technicon Congress, (in press) 1980.

52) Ross D.W. and Bayer C. Evaluation of the Hemalog D Automated White Blood Cell Differential in Hematology Patients. Proceedings Technicon Symposium, Germany, Second edition. Technicon Instruments Co. Ltd. 1978.

53) Ross W.D. and Bayer C. Cancer Patients Monitored by Hemalog D Automated Cytochemistry. First edition. Technicon Instruments Co. Ltd. Printed in England, 1978.

54) Roth KL and Saunders AM. Evaluation of methods for White cell evaluating and counting Adv. Automated -- Anal 1:461, 1971.

55) Roziemzajn L; Leibonich M. and Shoham D. et al. The esterase activity in megaloblasts, leukemic and normal hemopoietic cells. Brit J. Haemat 14:605-610, 1968.

56) Rumke C.L. Variability of Results in Differential Cell Counts on Blood Smears Triangle 4: 154, 1960.

57) Saunders AM. Histochemical identification of acid mucopolysaccharides with acridine orange. J Histo-

chem 12: 164, 1964.

58) Saunders AM. Development of automation of differential leukocyte counts by use of cytochemistry. - Clin Chem 18: 783, 1972.

59) Saunders AM. Hemalog D. Recent Development. - Adv Automated Anal 3:27, 1973.

60) Saunders AM. Development of automation of differential leukocyte count by use of cytochemistry. Clin. Chem. 18: 783-788, 1972.

61) Saunders AM; Groner W. and Kusnetz J. A rapid automated system for differentiating and counting white blood cells. Adv Automated Anal 1: 453, 1971. .

62) Saunders A.M. and collaborates. A rapid automated system for differentiating and counting white blood cells. In: Barton, E.C., ed Advances in Automated Analysis. Second edition, Thurman Assoc. 453, 1971.

63) Schiller S; Slover and Dorfman A. method for the separation of acid mucopolysaccharides. J Biol Chem

236: 983, 1961.

64) Schmalzl F and Braunsteiner H. On the origin of monocytes. Acta Haematol (Basel) 39:177, 1968.

65) Scott J. Aliphatic ammonium salts in the essay of acidic polysaccharides from tissue. Methods of Biochemical Analysis. 3<sup>th</sup> edition. Edited by D Glick. vol 8. Interscience Publishers. Inc. New York, 1960.

66) Shelley WB. The circulating basophil as indicator of hypersensibility in man. Arch Dermatol 88: 759, 1963.

67) Shelley WB and Parnes HM. The absolute count. JAMA 192:108, 1965.

68) Simmons A. and Elbert G. Hemalog D and Manual Differential Leukocyte Counts. J Clin Path, 64, 512, - 1975;

69) Sonner CA and Janett L. Métodos y Diagnóstico Clínico . 8<sup>a</sup> edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina. Tomo I: 334-342, 1970.

70) Simmons A; Leaverton P; Hildebrand J and Elbert G. Factors affecting manual white cell differential counts. Am J Med Technol 39: 354, 1973.

71) Statland B E. Physiological Variability of the Concentration Values of Leukocyte Types in the Blood of Healthy Subjects. First edition. Technicon Instruments Co. Ltd. Germany, 101. 1979.

72) Stoker W and Reinold MH. Total Automated Hematology. Second edition. Technicon Instruments Co. Ltd. Printed in England 1-16, 1978.

73) Swan T.H. Clinical Importance of Identifying Abnormalities in White Cells. First edition. Technicon Instruments Co. Ltd. Printed in England 1-19, 1978.

74) Undritz E. S. Atlas of Hematology. Basel, Switzerland, Sandoz, LTD., 28, 1952.

75) Wachstein M and Wolf G. The histochemical demonstration of esterase activity in human blood and bone marrow smears. J Histochem Cytochem 6:457, 1958.

76) Washburn AH. A combined peroxidase and Wright stain for routine blood smears. J Lab Med 14: 246-250-1928.

77) Wintrobe MM. Hematologia Clinica. Ed 6 Lea & Febiger Philadelphia. Argentina, 337-342, 1969.

78) Wyngaarden JB; Howell RR and Acaralasia. The Metabolic Basis of Inherited Disease. Edited by JB Stanbury, JB Wyngaarden, DS Frederickson. Ed 2 Mc Graw Hill, New York, USA, 1968.

79) Yam LT; Castolid GL and Mitus WJ. Quantitative evaluation of phytohemagglutination stimulated lymphocyte cultures. J Lab Clin Med 70;699-706, 1967.

80) Yam L.T.; Li C.Y. Crosby, W.H., Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. Am J Clin Path 55:283, 1971.