Tema 26. Técnicas de identificación de células de la sangre: métodos morfológicos, histoquímicos y inmunológicos. Características que permiten la diferenciación. Citometría de flujo. Identificación de células sanguíneas.

Índice

0. Introducción 2
1. Métodos morfológicos de identificación 3
1.1. Morfología y características de las células sanguíneas 3
1.2. Frotis sanguineo 5
1.3. Tinciones del frotis sanguíneo y características morfológicas de los diferentes tipos celulares 6
2. Métodos histoquímicos y citoquímicos 11
2.1. Identificación de carbohidratos 11
2.1.1. Tinción de ácido periódico de Schiff (PAS) 11
2.2. Identificación de enzimas 11
2.2.1. Tinción de la peroxidasa (MPO) 11
2.2.2. Tinción de esterasas 12
2.2.3. Tinción de fosfatasa 13
2.2.4. Tinción de β-glucuronidasa 14
2.3. Identificación de lípidos 14
2.3.1. Tinción de negro Sudan B 14
3. Métodos inmunológicos de identificación leucocitaria 15
3.1. Técnica de inmunocitoquímica (ICQ) 16
3.2. Técnica de inmunofluorescencia (IF) 17
4. Citometría de flujo (CMF) 18
4.1. Componentes y fundamento del citómetro de flujo 18
4.2. Aplicaciones del citómetro de lujo en hematología 20
5. Conclusión 22
6. Bibliografía 23

PREPARAOPOSFP

CC BY NC ND

0. Introducción

La sangre es un tejido especializado esencial para la supervivencia y el mantenimiento de la homeostasis, compuesto por diversos tipos celulares que cumplen funciones fundamentales: transporte de oxígeno y nutrientes (eritrocitos), defensa frente a infecciones (leucocitos) y hemostasia (plaquetas). La correcta identificación y caracterización de estas células constituye un pilar central en el estudio hematológico, siendo imprescindible tanto para el diagnóstico de enfermedades hematológicas como para el seguimiento de tratamientos y la investigación clínica.

Para este fin, se emplean diversos métodos complementarios que permiten diferenciar las poblaciones celulares de manera precisa. Los **métodos morfológicos**, basados en la observación mediante microscopía tras la aplicación de tinciones específicas, permiten estudiar la forma, tamaño, relación núcleo/citoplasma y la presencia de inclusiones intracelulares. Los **métodos histoquímicos** utilizan reacciones enzimáticas y marcadores químicos que destacan determinadas características bioquímicas de las células, facilitando la diferenciación funcional. Por último, los **métodos inmunológicos**, que incluyen técnicas como la inmunofluorescencia y la citometría de flujo, permiten identificar moléculas específicas de superficie o intracelulares, ofreciendo una elevada sensibilidad y especificidad, y posibilitando el análisis de grandes poblaciones celulares de manera rápida y cuantitativa.

PREPARAOPOSFP

La **citometría de flujo**, en particular, representa una herramienta avanzada en hematología, capaz de evaluar múltiples parámetros simultáneamente, identificar subpoblaciones celulares y cuantificar marcadores de activación o diferenciación, siendo de gran utilidad tanto en laboratorios clínicos como en entornos de investigación. Estas técnicas permiten establecer criterios claros de diferenciación celular, que son fundamentales para la interpretación correcta de los estudios hematológicos y para la toma de decisiones clínicas basadas en evidencia.

En el **contexto del ciclo formativo de Laboratorio Clínico y Biomédico**, y más concretamente en el módulo de **Técnicas de análisis hematológico**, el aprendizaje de estas técnicas proporciona a los estudiantes competencias esenciales: desde la observación y el reconocimiento morfológico de las células sanguíneas, hasta la aplicación de métodos histoquímicos e inmunológicos y el manejo de citometría de flujo. Este conocimiento permite al alumnado analizar muestras de forma rigurosa y fiable, comprender alteraciones patológicas y adquirir destrezas prácticas fundamentales para su futura labor profesional en laboratorios clínicos y de investigación biomédica. El currículo de dicho ciclo y módulo podemos encontrarlo regulado en el Real Decreto 771/2014 a nivel nacional y en el 33/2022 a nivel autonómico de la CV (o añadir el de la comunidad donde se realice la oposición).

CC BY NC ND

1. Métodos morfológicos de identificación

La sangre es una **suspensión de células** que representa aproximadamente el 45 % del volumen sanguíneo, y que se encuentran en un componente líquido denominado **plasma**, que constituye el 55 % restante. Este plasma es una **solución acuosa de diversas sustancias**, entre las que destacan: sales minerales, glucosa, enzimas, productos derivados del catabolismo celular, proteínas, entre otros. De todos estos componentes, las **proteínas** son las más abundantes, existiendo distintos tipos con funciones específicas, entre las que destacan:

- **Fibrinógeno**: proteína soluble en plasma responsable de la coagulación sanguínea mediante su transformación en fibrina.
- **Seroalbúminas y seroglobulinas**: proteínas que desempeñan funciones diversas e importantes, como la coagulación de la sangre, el transporte de sustancias y la defensa frente a infecciones.

Cuando se elimina el fibrinógeno del plasma, se obtiene el **suero**, cuya obtención tiene gran utilidad en laboratorios clínicos y de investigación, ya que puede emplearse en una amplia variedad de técnicas analíticas.

En cuanto a las **células sanguíneas**, se clasifican en tres grupos principales:

PREPARAOPOSFP

- **Glóbulos rojos (GR)**, hematíes o eritrocitos.
- **Glóbulos blancos (GB)** o leucocitos.
- **Plaquetas o trombocitos**.

Todas estas células se originan en un tejido muy especializado denominado **tejido hematopoyético**, que se encuentra en la **médula ósea**. La vida de estas células es limitada y variable; por ejemplo, los eritrocitos tienen una vida media de aproximadamente 120 días, mientras que las plaquetas sobreviven solo unos pocos días. Esta vida relativamente corta hace necesaria la **producción continua de células sanguíneas**, en un proceso conocido como **hematopoyesis**.

El **estudio morfológico** de estas células se realiza mediante un **frotis o extensión sanguínea**, su tinción y la posterior observación al microscopio. En los siguientes apartados se describirán las particularidades más importantes de esta técnica de estudio y los criterios que permiten la diferenciación de las distintas células sanguíneas.

1.1. Las células sanguíneas (información no necesaria en el tema)

Como se ha mencionado, las **células sanguíneas** se originan mediante un proceso denominado **hematopoyesis**, por el cual, a partir de una célula primitiva **pluripotente**, pueden obtenerse todos los tipos celulares sanguíneos. Estas células pluripotentes siguen distintos procesos según

se diferencian en **eritrocitos (eritropoyesis)**, **granulocitos (granulopoyesis)**, **linfocitos (linfopoyesis)** o **plaquetas (trombopoyesis)**.

Dado que el interés principal es la **morfología y las características** de estas células, a continuación, se describen los tres grandes grupos en los que se dividen:

Glóbulos rojos, eritrocitos o hematíes

Son el componente más abundante de la sangre, con aproximadamente 5 millones por mm^3. Su función principal es el **transporte de oxígeno** a los tejidos y la recolección de **dióxido de carbono** generado en los procesos metabólicos. Esta función es posible gracias a la proteína **hemoglobina**, que además es responsable del color rojo de la sangre.

Morfología: son células bicóncavas de unos 7,5 µm de diámetro, con un grosor de 2 µm en los bordes y 1 µm en el centro. Esta forma puede cambiar al atravesar capilares o con variaciones en la concentración del medio. Poseen gran cantidad de membrana en relación con su contenido interno, lo que les permite una **deformabilidad considerable** sin daño celular. Durante su maduración, pierden núcleo, aparato de Golgi y ribosomas, ocupando el espacio con hemoglobina. En individuos sanos, presentan uniformidad en tamaño, forma y color.

Glóbulos blancos o leucocitos

PREPARAOPOSFP

Son mucho menos abundantes que los eritrocitos (5.000–9.000/mm^3) y forman parte del **sistema inmune**. Se originan en la médula ósea, aunque algunos también maduran en ganglios linfáticos. Su morfología incluye núcleo y orgánulos, y pueden realizar **movimientos ameboides** para migrar a los tejidos. Se dividen en:

- **Leucocitos polinucleados o granulocitos**: 70 % de los leucocitos, con núcleo multilobulado, función principal en la **respuesta inmune innata**.
    - **Neutrófilos**: 65 % de los leucocitos, núcleo de 2-3 lóbulos y citoplasma con pequeñas granulaciones que contienen enzimas hidrolíticas; función destacada: **fagocitosis**.
    - **Eosinófilos**: 4 % de los leucocitos, ligeramente más grandes (10-14 µm), citoplasma con granulaciones grandes teñidas de rojo; función: fagocitosis y destrucción de complejos antígeno-anticuerpo.
    - **Basófilos**: <1 % de los leucocitos, 8-10 µm, citoplasma con abundantes granulaciones basófilas; función: reacciones inflamatorias, liberación de histamina y heparina, participación en alergias tipo I.
- **Leucocitos mononucleares**: núcleo redondeado, incluyen **monocitos y linfocitos**.

- **Monocitos/macrófagos**: 3,5–9 % de leucocitos, grandes (15–30 µm), citoplasma gris con vacuolas; al migrar a tejidos se convierten en macrófagos con capacidad fagocítica y funciones inmunorreguladoras.
- **Linfocitos**: 20–40 % de leucocitos, 7–18 µm, núcleo redondo con cromatina densa y citoplasma escaso; incluyen:
  - **Linfocitos T**: maduran en el timo, CD4 (helper) y CD8 (citotóxicos).
  - **Linfocitos B**: maduran en médula ósea y adquieren función en órganos linfoides secundarios; generan células plasmáticas productoras de anticuerpos.
  - **Natural killer (NK)**: destruyen células tumorales o infectadas por virus; carecen de marcadores T/B y presentan citoplasma granulado.

Plaquetas o trombocitos

Son fragmentos citoplasmáticos derivados de **megacariocitos**, discoides, 1–4 µm, sin núcleo, con orgánulos y gránulos púrpura. Poseen antígenos de membrana útiles para su detección por citometría: CD41, CD62 y CD42.

1.2. Frotis sanguíneo

PREPARAOPOSFP

El estudio de las **células sanguíneas** mediante microscopía se realiza utilizando una técnica denominada **frotis sanguíneo**, que consiste en la extensión de una gota de sangre sobre un portaobjetos para su observación. Esta técnica es una de las más antiguas y relevantes en el laboratorio clínico, y hoy en día sigue siendo utilizada. Además, la realización de estas extensiones permite aplicar **tinciones** que facilitan la observación de las diferencias entre los distintos tipos celulares.

Entre sus principales ventajas destacan su **gran utilidad**, **bajo coste** y **fácil ejecución**, aunque en la actualidad tiende a ser reemplazada por **contadores electrónicos**, que permiten un recuento más rápido y preciso, así como la distinción entre **subtipos celulares**.

La técnica de preparación es relativamente sencilla y consiste en:

1. Limpiar el dedo de la persona con alcohol y realizar una punción con una lanceta estéril.
2. Depositar la gota de sangre en el centro de un extremo de un portaobjetos limpio y seco.
3. Colocar otro portaobjetos formando un ángulo aproximado de 45° y extender la gota a lo largo de toda la longitud del primer portaobjetos. El movimiento debe ser continuo e ininterrumpido; posteriormente, se debe **etiquetar correctamente** el portaobjetos. Es recomendable realizar varias extensiones (2–4) y seleccionar la mejor.

En un frotis adecuado se distinguen **tres zonas** de diferente grosor y densidad celular:

- **Cabeza**: zona excesivamente gruesa donde las células se encuentran amontonadas.

- **Cuerpo**: zona intermedia, considerada la **ideal** para la observación, con una distribución celular adecuada.
- **Cola**: zona demasiado fina, inapropiada para el análisis correcto del frotis.



Estos frotis serán los que se pueden observar directamente o habitualmente, después de realizar una tinción que facilite la distinción de los tipos celulares por morfología y tinción.

1.3. Tinciones del frotis sanguíneo

A la hora de hablar de las tinciones se debe distinguir entre las diferentes clasificaciones que las distribuyen.

PREPARAOPOSFP

En primer lugar, podemos hablar de una clasificación entre **tinciones vitales/supravitales** y **tinciones no vitales**:

- Las tinciones vitales son aquellas que se realizan sobre **células vivas**.
- Las tinciones no vitales son las que se realizan sobre **células muertas** y que requieren un proceso previo de **fijación**, cuyo objetivo es conservar inalterada la estructura de las células y adherirlas firmemente al portaobjetos. Esta fijación puede realizarse con etanol, metanol o calor.

Esta clasificación, sin embargo, no es tan útil para el tema que nos ocupa, por lo que para explicarlas utilizaremos la clasificación que distingue entre **tinciones especiales** y **tinciones habituales**.

Las **tinciones especiales** son las que se utilizan cuando las habituales no proporcionan suficiente información o en casos específicos. Existen dos subtipos: **tinciones fluorescentes** y **tinciones citoquímicas**. Estas tinciones se verán en el apartado 2 y 3 del presente tema de forma ampliada.

Las **tinciones habituales** son tinciones que se consiguen generalmente con el uso de colorantes derivados de la anilina. Son tinciones relativamente fáciles, rápidas y baratas de realizar, y permiten visualizar muy bien la morfología de las células. Estas tinciones son materia de este apartado del tema, por lo que a continuación se detallarán los cuatro grandes grupos de tinciones habituales:

- **Colorantes ácidos**: tienen especial afinidad con las estructuras básicas de las células, como por ejemplo la hemoglobina. El principal colorante ácido es la **eosina**.
- **Colorantes básicos**: en contrapartida con los colorantes ácidos, tiñen estructuras ácidas, como los ácidos nucleicos. El más importante es el **azul de metileno**.
- **Colorantes neutros**: son sales coloreadas de un ácido y una base. Tiñen tanto el citoplasma como el núcleo; destaca el **eosinat de azul de metileno**.
- **Colorantes indiferentes**: a diferencia de los anteriores, no tienen afinidad con estructuras ácidas ni básicas, sino que son insolubles en agua y tiñen sustancias con un poder de disolución superior al del líquido en el que se han preparado. Destaca el **Sudán III**, que tiñe las grasas.

Además, se deben destacar las combinaciones de diferentes colorantes, las llamadas **tinciones policrómicas**. Estas pueden ser **panópticas** si las sustancias colorantes neutras se añaden sucesivamente o **pancrómicas** cuando se aplican todas juntas. El primer investigador que trabajó con estas tinciones fue **Romanowsky**, y actualmente casi todas las tinciones derivan de las que él creó.

Los colorantes de tipo Romanowsky constan de un colorante ácido (eosina) y un colorante básico (tiacinas). Las tiacinas son el **azul de metileno** y derivados de su oxidación, los llamados azures. Existen diversas tinciones derivadas de esta metodología, entre las que destacan:

PREPARAOPOSFP

- La tinción de **Wright** y **Wright-Giemsa**.
- La tinción de **Giemsa**.
- La tinción de **May-Grünwald-Giemsa** o panóptica rápida.
- La tinción de **Leishman**.

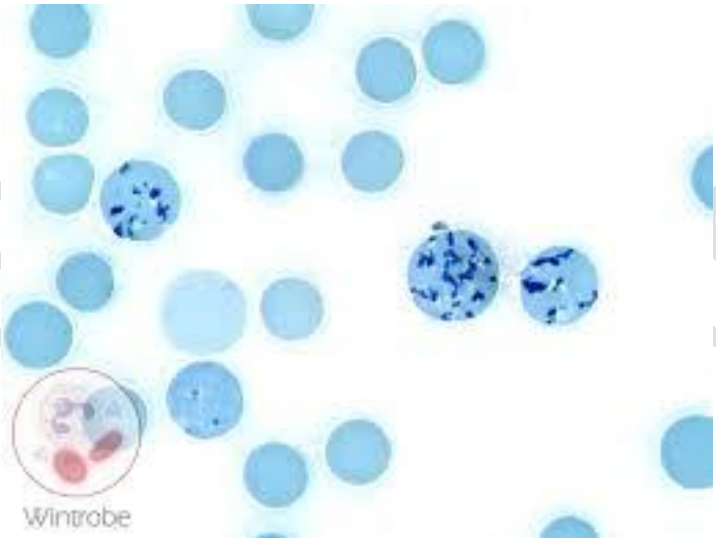
La explicación de los procedimientos de cada una de estas técnicas ocuparía un tema entero, ya que utilizan variaciones sobre el procedimiento de Romanowsky: tinciones por inmersión, azures en diferentes concentraciones, distintos tiempos de actuación de los colorantes… Como el tema se centra en la identificación de células sanguíneas, se tratará de describir la **morfología de cada tipo celular** tras estas tinciones.

En términos generales, las **estructuras basófilas** presentes en el núcleo (el nucleolo) o en el citoplasma (los ribosomas) aparecerán en color azul, mientras que estructuras más **acidófilas**, como la hemoglobina de los eritrocitos, aparecerán en color rosado.

Un caso especial es la tinción **azul cresil brillante,** una técnica supravital diseñada específicamente para la identificación y el **recuento de reticulocitos en sangre periférica**. Su funcionamiento se basa en la capacidad del colorante para penetrar en el interior de los glóbulos rojos jóvenes que aún no han sido fijados, interactuando con **los restos de ARN ribosómico** que

estos conservan tras expulsar su núcleo. Al entrar en contacto con este material genético residual, el colorante provoca su agregación y precipitación, lo que permite visualizar bajo el microscopio unas estructuras granulares o filamentosas de color azul intenso que destacan sobre el tono más pálido del resto del citoplasma.

En la práctica clínica, esta coloración es esencial para evaluar la capacidad regenerativa de la médula ósea, ya que permite distinguir con precisión los eritrocitos maduros de sus precursores inmediatos. Para realizarla correctamente, se mezcla una gota de sangre fresca con el colorante en un tubo de ensayo y se deja incubar durante unos minutos antes de realizar el frotis. El resultado es una imagen clara donde los reticulocitos presentan una especie de "red" o punteado oscuro en su interior, lo que facilita al técnico realizar un recuento porcentual que informará al médico sobre si la producción de glóbulos rojos es adecuada, excesiva o insuficiente según la patología del paciente.



Tinción azul cresil brillante para reticulocitos.

1.4. Características morfológicas de los diferentes tipos celulares

A continuación, se describen las características morfológicas de las células sanguíneas más importantes al observar un frotis con este tipo de tinciones:

A. **Eritrocitos o glóbulos rojos**

Se identifican por ser las células más abundantes en el frotis, tener forma bicóncava de unos 7,5 µm de diámetro y no presentar núcleo. Presentan un color rosado (más intenso en la periferia que en el centro) tras la tinción, debido al carácter básico de la hemoglobina (Hb). La hemoglobina es el pigmento más abundante en estas células y es, además, responsable de la capacidad de los eritrocitos de transportar O_2 por el cuerpo y recoger CO_2.

En personas sanas, estas células presentan forma, tamaño e intensidad de color muy uniformes, aunque su tamaño puede variar en estados patológicos como **anisocitosis**, **microcitosis** o **macrocitosis**, su forma en otras alteraciones como **eliptocitosis**, **esquinocitosis**, **dacriocitosis** o **acantocitosis**, y también su color en casos como **anisocromía**, **hipocromía** o **hipercromía**.

Dentro de este grupo se incluyen los **reticulocitos**, precursores de los eritrocitos, que al entrar en la sangre desde la médula ósea aún poseen ribosomas y ARN. Debido al carácter ácido de estas estructuras, se observa cierto color azul superpuesto al color rosado de la hemoglobina. Existen colorantes especiales para la detección de estas células, como el **azul brillante de cresil**. Su identificación es importante, ya que suelen representar un 1 % del total celular en sangre, y variaciones en esta proporción pueden indicar la presencia de patologías.

B. Leucocitos o glóbulos blancos

Esta segunda familia de células sanguíneas es mucho menos abundante y generalmente más grande que los eritrocitos. Sus funciones están relacionadas con el **sistema inmune** y, aunque se generan en la médula ósea, pueden madurar en otros órganos secundarios.

A pesar de estas características generales, se trata de un grupo celular muy diverso, cuya morfología se detalla a continuación, agrupándolos en dos grandes grupos:

PREPARAOPOSFP

- **Leucocitos polinucleados**, con núcleo lobulado que aparenta ser múltiple. En este grupo se encuentran **neutrófilos**, **eosinófilos** y **basófilos**. Este grupo también se conoce como **serie granulada**, ya que todos presentan abundantes gránulos en el citoplasma.
- **Leucocitos mononucleares**, con un único núcleo redondo en el centro de la célula. Son los **linfocitos** y los **monocitos**, que pertenecen a la **serie agranulada**.

A continuación, se detallan las características más importantes de cada tipo celular:

a. Neutrófilos

Son los granulocitos más numerosos (65 % de los leucocitos) y su núcleo está formado por 2 o 3 lóbulos en los neutrófilos maduros (segmentados). Esta lobulación es menos marcada en células jóvenes, que presentan solo una banda (neutrófilos de banda o en bastón). Su diámetro es de 10–15 µm, por lo que son mayores que los eritrocitos. Su función principal es la **fagocitosis** de partículas extrañas.

La forma del núcleo depende del estado de maduración (segmentado o de banda) y siempre aparece teñido de azul. Además, en células con doble cromosoma X se observa una estructura con forma de raqueta llamada **corpúsculo de Barr**.

El citoplasma contiene pequeñas granulaciones distribuidas regularmente, que en su mayoría contienen **enzimas hidrolíticas**. Dado que el citoplasma es ligeramente ácido, adquiere color

parduzco o salmón, pero algunas granulaciones aparecen púrpuras por su contenido en proteínas básicas (ricas en arginina).

b. Eosinófilos

Representan hasta un 4 % de los glóbulos blancos y son ligeramente mayores que los neutrófilos (12–16 µm). Su núcleo aparece violeta, generalmente con dos lóbulos. El citoplasma destaca por sus grandes gránulos redondeados, que no cubren el núcleo y se tiñen de color anaranjado con eosina. Su función incluye **fagocitosis** (menor que en neutrófilos), destrucción de parásitos grandes como helmintos y participación en reacciones alérgicas mediadas por IgE.

c. Basófilos

Menos abundantes, <1 % de los leucocitos. Diámetro 12–14 µm, citoplasma con abundantes gránulos variables e intensamente basófilos, que dan nombre al tipo celular. Núcleo violeta, con hendiduras pero no segmentado. Función: **reacción inflamatoria**, liberación de histamina, heparina y peroxidasa; intervienen en alergias tipo I junto con inmunoglobulinas E.

d. Monocitos y macrófagos

Células de la línea mieloide, comparten precursor con los neutrófilos y son las primeras en aparecer en sangre periférica en condiciones normales.

PREPARAOPOSFP

- Forma irregular, gran tamaño (15–30 µm), núcleo grande, central, redondeado con escotadura (aspecto de riñón). Cromatina condensada, tinción violeta intensa. Citoplasma abundante gris, con vacuolas. Positivo para tinciones especiales de **peroxidasa** y **fosfatasa ácida**.
- Circulan y pueden emigrar a tejidos, adoptando forma de **histiocito**, que se convierte en **macrófago** con capacidad fagocítica. Funciones: fagocitar bacterias, virus, tejido necrótico, secretar sustancias que refuerzan inflamación aguda, presentar antígenos a linfocitos y sintetizar sustancias reguladoras de la respuesta inmune.

e. Linfocitos

Únicos leucocitos de la línea linfoide. Darán lugar a linfocitos T, B y **células NK**. Morfológicamente indistinguibles; requieren técnicas específicas. Forma redonda, tamaño 7–18 µm, núcleo redondo con cromatina densa (color púrpura oscuro). Citoplasma escaso en linfocitos pequeños, más abundante en grandes; basófilo pálido con pequeñas granulaciones azurófilas.

C. <u>Plaquetas o trombocitos</u>

Fragmentos citoplasmáticos de un megacariocito. Forma variable, generalmente discoide, tamaño 1–4 µm, sin núcleo, con orgánulos y citoplasma azul pálido con gránulos púrpura. Fáciles

de distinguir por su pequeño tamaño y tendencia a agruparse, imposibles de confundir con otros tipos celulares.

2. Métodos histoquímicos y citoquímicos

Para complementar el estudio que se puede realizar con las **tinciones hematológicas habituales**, se han desarrollado una serie de **técnicas citoquímicas** que permiten la identificación de ciertas sustancias presentes únicamente en determinados tipos celulares y que nos ayudarán a su identificación. Además, también permiten establecer con mayor exactitud el **grado de maduración y funcionalidad** de las células. Finalmente, se debe destacar su utilidad en el **diagnóstico de las diferentes leucemias** y para evaluar los tratamientos que combaten estas patologías.

Para desarrollar una **técnica citoquímica** deben seguirse tres pasos fundamentales:

- **Fijación** de la extensión para evitar el deterioro celular y la difusión de sustancias al medio extracelular. Puede realizarse con **metanol, etanol o acetona**, que actuarán coagulentando proteínas celulares, o con **formaldehído o glutaraldehído**, que formarán puentes intra e inter-proteicos que mantendrán la estructura celular.
- **Incubación**, donde se pondrán las células en contacto con un **medio de reacción** para que reaccionen y den lugar a un **precipitado apreciable al microscopio óptico**.
- **Tinción de contraste** para facilitar la identificación morfológica de la célula en la que se ha producido la reacción.

PREPARAOPOSFP

2.1. Identificación de carbohidratos

2.1.1. Tinción de ácido periódico de Schiff (PAS)

La **tinción PAS** pone de manifiesto la presencia de **glucógeno, mucopolisacáridos, mucoproteínas, glucoproteínas y glucolípidos** del citoplasma celular. En los casos de células positivas (denominadas **PAS-positivas**) se observan **precipitados de color rojo púrpura intenso**. Los tipos celulares positivos son los **neutrófilos, megacariocitos y plaquetas**. En algunos casos, también aparecen como positivas las **células plasmáticas**, células derivadas de la activación de un linfocito B.

Esta técnica tiene especial importancia en el **diagnóstico de leucemias linfoblásticas agudas (LLA)**, con positividad intensa por la formación de masas de células teñidas, y en la **eritroleucemia**, con positividad difusa en los eritroblastos.

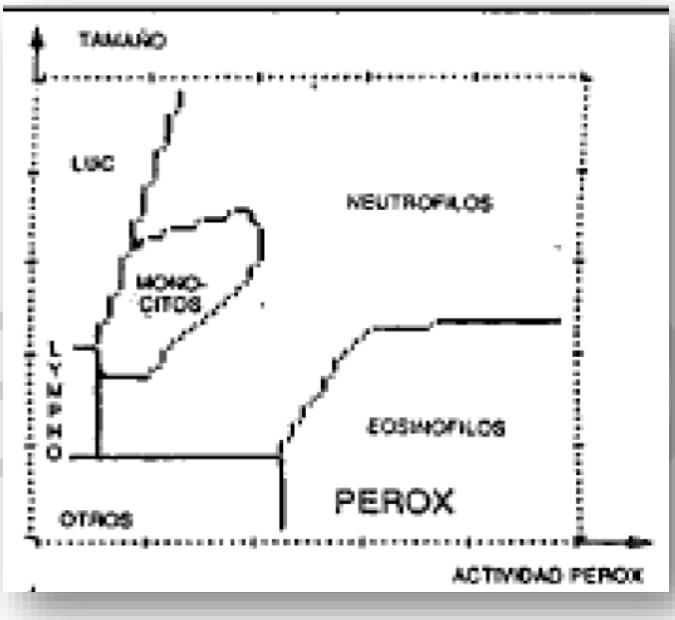
2.2. Identificación de enzimas

2.2.1. Tinción de la peroxidasa (MPO)

La **peroxidasa** es una enzima que se encuentra en cantidad variable en el citoplasma de casi todos los leucocitos, excepto los linfocitos. Esta variabilidad provoca que aparezcan **células**

fuertemente positivas (todas las del grupo de granulocitos), **células con tinción débil** como los monocitos y **células que aparecen como negativas**, como los ya mencionados linfocitos, eritroblastos o megacariocitos.

Esta técnica es especialmente importante para realizar la **fórmula leucocitaria** a través de los contadores hematológicos, donde aparecerá un diagrama con las diferentes poblaciones celulares, distinguiéndolas gracias a su positividad en MPO y a su tamaño. Con estos datos, el autoanalizador obtendrá el **MPXI**, o índice de actividad de peroxidasa media de los neutrófilos. Si estos valores están fuera de lo habitual, indicará una patología relacionada con la serie mieloide.



Distribución de los diferentes tipos de células de la sangre si enfrentamos su actividad peroxidasa frente a su tamaño. Esta distribución puede ser realizada por contadores celulares.

2.2.2. Tinción de esterasas

Las **esterasas** son enzimas que hidrolizan los ésteres de cadena corta de los ácidos grasos. Existen dos grupos: **específicas**, si actúan sobre un sustrato concreto, como la acetilcolinesterasa de los megacariocitos que actúa sobre la acetilcolina; y **no específicas**, si el sustrato es un éster simple.

La mayoría de estas técnicas se basan en la hidrólisis de sustratos naftálicos para formar precipitados coloreados que se observan al microscopio.

A. Tinción de esterasas ácidas

Esta esterase es especialmente útil para la tipificación de los linfocitos T, ya que cuando es positiva genera un precipitado de color marrón café.

B. Tinción de la naftol-AS-D-acetato-esterasa (NASDA)

Esta tinción presenta un precipitado puntiforme de color azul en las células que dan positivo. La mayoría de las células sanguíneas dan positivo, aunque la intensidad será diferente. La máxima intensidad se aprecia en monocitos, megacariocitos y plaquetas.

C. Tinción de la α-naftil-acetato-esterasa (ANAE)

En la tinción ANAE, los positivos aparecen con un precipitado de color marrón o pardorrojizo. Esta tinción es especialmente positiva en monocitos, aunque también marca ligeramente los linfocitos T, las células plasmáticas y los eritroblastos en casos de anemia perniciosa. Por lo tanto, es muy útil para la identificación de células de estirpe monocítica.

2.2.3. Tinción de fosfatasa

Las **fosfatasas** son enzimas que eliminan grupos fosfato de su sustrato mediante la hidrólisis del ácido fosfórico monoéster hacia el ion fosfato y una molécula con un grupo hidroxilo libre. Es, por tanto, el proceso opuesto al de las proteínas fosforilasas y quinasas. La clasificación teniendo en cuenta el sustrato es muy extensa y poco relacionada con el tema que nos ocupa, por lo que se simplificará la clasificación en **fosfatasas ácidas** y **fosfatasas alcalinas**.

PREPARAOPOSFP

A. Fosfatasa ácida leucocitaria (FAL)

Esta enzima lisosómica se encuentra habitualmente en las células hematíes en diferentes proporciones según su maduración. Por ello, su utilidad es limitada, aunque se utiliza para el diagnóstico diferencial de síndromes linfoproliferativos (leucemia de células peludas), donde los leucocitos presentan una intensa positividad en fosfatasa ácida. Esta positividad, junto con el aspecto morfológico (células peludas), ayuda a un diagnóstico fiable. La positividad se observará como puntos rojos brillantes en el citoplasma de las células observadas.

B. Fosfatasa alcalina granulocitaria (FAG)

Por otra parte, encontramos la **fosfatasa alcalina granulocitaria** o FAG, que se localiza en los gránulos secundarios de los leucocitos polimorfonucleares. La positividad aparecerá en las células maduras de esta familia y en los neutrófilos en banda, con aspecto de puntos marrones. Según la intensidad de la tinción, se clasifican en tres grados:

- **Grado 0**, si no hay precipitado en el interior celular.
- **Grado 1**, si hay un precipitado leve.
- **Grado 2**, si el precipitado es abundante.

Esta tinción permite establecer un **índice de FAG**, anotando el grado de reacción en cada una de las 100 células observadas y sumando el número de células con grados 1 y 2. En un individuo

CC BY NC ND

normal, el índice debería estar entre 20 y 80, por lo que diferencias en este valor se utilizan para el diagnóstico diferencial de **leucemia mieloide crónica (LMC)**.

2.2.4. Tinción de β-glucuronidasa

La **β-glucuronidasa** es una hidrolasa ácida que se encuentra fundamentalmente en los lisosomas, aunque también puede aparecer en el **Golgi** o en el **retículo endoplasmático**. La positividad aparecerá como una **granulación roja**, siendo muy intensa en los **macrófagos**, **células plasmáticas** y **linfocitos T**, mientras que los **monocitos** y **neutrófilos** son, o bien negativos, o presentan una positividad muy difusa.

Esta tinción especial es útil para diferenciar los **síndromes linfoproliferativos**, ya que en la **tricoleucemia** la tinción de la **fosfatasa ácida** es positiva y la **β-glucuronidasa** es negativa.

2.3. Identificación de lípidos

En algunos casos, la **identificación diferencial de lípidos** puede ayudar en el **diagnóstico diferencial** de algunas enfermedades como las **leucemias**. Especialmente importante y utilizada es la técnica del **negro de Sudan B**.

2.3.1. Tinción de negro Sudan B

PREPARAOPOSFP

Esta tinción tiñe las sustancias lipídicas como los ésteres, fosfolípidos y grasas neutras. Se apreciarán los positivos con una granulaciones de color gris oscuro en los **neutrófilos polimorfonucleares** y sus precursores. Algunos **monocitos** también pueden presentar algún gránulo positivo, pero mucho más suave, y los **linfocitos** son totalmente negativos.

Esta tinción es especialmente útil en la **diferenciación entre las leucemias mieloides y las leucemias linfoides**.

2.4. Identificación de hierro

2.4.1. Tinción de Perls

La **tinción de Perls** (también conocida como reacción del **Azul de Prusia**) es una técnica histoquímica fundamental en los laboratorios de hematología y anatomía patológica. Su objetivo principal es **detectar la presencia y distribución de hierro. Detecta específicamente el hierro férrico (Fe3+), que es la forma en la que el cuerpo almacena el hierro de reserva (principalmente unido a las proteínas ferritina y hemosiderina).**

La técnica utiliza una mezcla de dos reactivos principales:

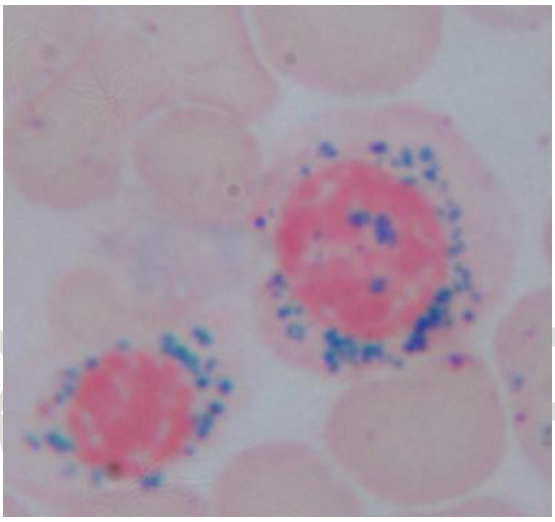
1. **Ácido clorhídrico (HCl) diluido:** Su función es "romper" la unión entre el hierro y la proteína que lo transporta/almacena, dejando los iones de hierro (**Fe3+),** libres.

CC BY NC ND

2. **Ferrocianuro potásico:** Reacciona con esos iones de hierro libres para formar un precipitado insoluble llamado **ferrocianuro férrico**, que tiene un color azul intenso característico (Azul de Prusia).

La principal aplicación clínica es la valoración de los depósitos de hierro (para detectar anemias ferropénicas) y para el diagnóstico de anemias sideroblásticas, donde se identifican los sideroblastos en anillo, un glóbulo rojo inmaduro normal que contiene algunos puntitos azules (hierro) en su citoplasma. En las anemias sideroblásticas, el hierro no se puede usar bien y se acumula en las mitocondrias alrededor del núcleo, formando una corona o "anillo" azul inconfundible.





Sideroblastos en anillo con la tinción de Perls.

3. Métodos inmunológicos de identificación leucocitaria

Los métodos inmunológicos se basan en la **detección de antígenos de membrana** en células normales y leucémicas de diferentes estirpes: linfoide, granulopoyética, eritroide y megacariocítica. Para lograrlo se utilizan **anticuerpos monoclonales comerciales**.

Estos anticuerpos (Ac) provocarán una reacción de tipo inmunológico, donde la molécula diana reconocerá el anticuerpo específico. Esta reacción será la que se podrá detectar, informando que efectivamente la célula detectada presenta el antígeno que se quiere visualizar.

Esta detección puede realizarse mediante una **reacción química** que produzca un residuo visible (**técnicas de inmunocitoquímica**) o mediante **fluorescencia** (**técnicas de inmunofluorescencia**).

En resumen, estas técnicas permiten **localizar moléculas muy diversas en células y tejidos** con una especificidad muy alta, proporcionando un resultado diagnóstico mucho más claro que los métodos clásicos.

Estas técnicas han contribuido enormemente a la **clasificación y diagnóstico de enfermedades**, gracias a su capacidad para diferenciar entre los dos linfocitos habituales en sangre: los linfocitos T y los linfocitos B.

3.1. Técnica de inmunocitoquímica (ICQ)

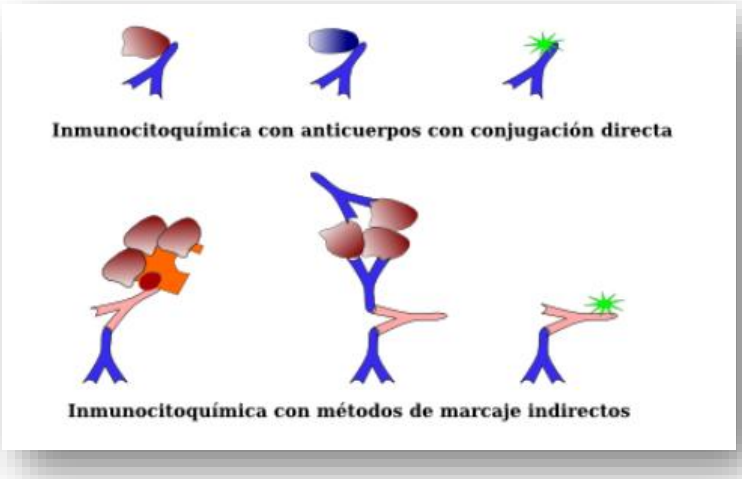
Como se ha mencionado anteriormente, esta técnica utiliza **anticuerpos monoclonales** que detectarán un antígeno de membrana en las células a analizar. Estos anticuerpos llevan unidos un **enzima**, el cual provocará una reacción cuando el anticuerpo al que está unido detecte el antígeno, produciendo un **resultado visible** que nos informará de la positividad de la célula.

El proceso mediante el cual se genera un sustrato visible se basa en que estos enzimas pueden provocar que determinadas moléculas solubles e incoloras reaccionen, produciendo una nueva molécula **insoluble y coloreada**. Este nuevo sustrato visible podrá ser detectado mediante el **microscopio**.

PREPARAOPOSFP

Esta detección se denomina **directa** porque es el mismo anticuerpo que detecta el antígeno el que lleva unido el enzima. También se puede realizar una detección de tipo **indirecto**, en la que el anticuerpo que detecta el antígeno **no lleva ningún enzima** unido, y es un **segundo anticuerpo**, que reconoce al primero, el que lleva el enzima.

El resultado final no es del todo diferente, pero las reacciones de tipo indirecto, aunque parezcan más complicadas, permiten **mayor versatilidad** y una **intensidad de señal algo más alta**. Inicialmente se utilizaron métodos directos, aunque más tarde se generalizó el uso de los métodos indirectos, especialmente el método llamado **peroxidasa-antiperoxidasa**. Actualmente, este método está en desuso, y el más utilizado es el método **avidina-biotina-peroxidasa**.



Diferencia entre las técnicas de inmunocitoquímica con marcaje directo e indirecto

3.2. Técnica de inmunofluorescencia (IF)

Las **técnicas de inmunofluorescencia** guardan gran similitud con las de inmunocitoquímica. La diferencia, sin embargo, radica en que el anticuerpo que permite la detección **no lleva unido un enzima**, sino un **fluorocromo**. Los fluorocromos son moléculas que **emiten luz visible** cuando se las ilumina con una determinada longitud de onda.

PREPARAOPOSFP

Al igual que se explicó antes en las técnicas de inmunocitoquímica, el método puede ser **directo**, si el fluorocromo está unido al anticuerpo que detecta el antígeno, o **indirecto**, si el fluorocromo está unido a un anticuerpo secundario que se unirá al primero. Hoy en día, en las técnicas de inmunofluorescencia, el método **indirecto** también es el más utilizado.

Esta técnica puede utilizarse para **detectar únicamente un antígeno**, aunque el verdadero potencial reside en la **detección de múltiples antígenos**, es decir, detectar diferentes moléculas de forma simultánea en una o varias células. Esto es posible gracias a la existencia de una gran variedad de fluorocromos capaces de **emitir luz visible de diferentes longitudes de onda** al ser excitados con determinadas radiaciones. De esta manera, se puede **excitar secuencialmente los diferentes fluorocromos** unidos a distintos anticuerpos y posteriormente superponer las imágenes, observando si las moléculas se expresan en un mismo tipo celular. Algunos de los marcadores más utilizados son los fluorocromos como la **fluoresceína**, que emite luz verde, y la **rodamina**, que emite luz roja.

Algunas aplicaciones de estas técnicas son la **diferenciación entre linfocitos T y B**, ya que los B tienen en su superficie inmunoglobulinas (IgM, IgD, IgG e IgA) que pueden ser detectadas por

un anticuerpo, marcando la diferencia con los linfocitos T. De esta manera se pueden diferenciar los **síndromes linfoproliferativos de tipo B**.

En las técnicas de inmunodiagnóstico para células sanguíneas pueden ocurrir problemas que dificulten la capacidad de detectar antígenos, por ejemplo: problemas de **fijación, inclusión o tratamientos previos**. En estas situaciones, el antígeno puede quedar **enmascarado** y ser inaccesible o incluso haber sido destruido.

4. Citometría de flujo (CMF)

La **citometría de flujo (CMF)** es una técnica de análisis celular multiparamétrica que se basa en pasar una suspensión de partículas (células sanguíneas en este caso) de forma alineada y de una en una por un **láser focalizado**. El haz del láser impactará en cada célula produciendo **señales correspondientes a los diferentes parámetros de la célula**, que podrán ser recogidos por los receptores de este aparato. Estas señales serán convertidas en señales electrónicas que un sistema informático podrá digitalizar y relacionar con los distintos parámetros que nos interesan.

Los **parámetros estudiables** son:

PREPARAOPOSFP

- **Parámetros relacionados con las características morfológicas e intrínsecas** de la célula, como el tamaño, la complejidad del núcleo y del citoplasma.
- **Parámetros relacionados con las características antigénicas** de cada célula. Esto es el **inmunofenotipo**, que es el conjunto de estructuras propias de la célula con funciones variadas y que actúan como antígenos. Estas estructuras antigénicas serán detectables mediante la **previa incubación de las células con anticuerpos** que se unirán a estos antígenos y que ayudarán a su detección, ya que habitualmente llevan un **fluorocromo unido** (de la misma manera que ocurría en los métodos de inmunofluorescencia previamente descritos).

4.1. Componentes y fundamento del citómetro de flujo

Los **componentes de un citómetro** son muy complejos, tratándose de un aparato muy singular. Los componentes más destacables son:

- **El sistema de flujos**, que transporta las células hacia el centro del láser de una en una, es decir, realizando un flujo laminar. El hecho de que pasen alineadas es esencial para definir correctamente las poblaciones.
- **Sistemas ópticos**, donde se debe destacar la fuente de luz, que estará constituida por uno o varios láseres, y los detectores que captarán las variaciones que ocurren en este haz debido a las características celulares y también a las emisiones de los posibles

fluorocromos. Las señales producidas serán de dos tipos: señales de **dispersión** y señales de **fluorescencia**.

- Las **señales de dispersión** ocurren cuando la luz interactúa con una partícula y se produce un cambio de dirección (no de longitud de onda) en las diferentes direcciones del espacio. Las características morfológicas que determinan la dispersión de la luz son fundamentalmente el **tamaño celular, la membrana, el núcleo y el material granular del interior celular**, comúnmente denominado **complejidad**. En los CMF se miden dos fracciones de dispersión: la que ocurre en un **ángulo cónico pequeño** (0 a 10º), denominada **FSC (Forward Scatter)**, que es causada y proporcional al tamaño celular; y la luz dispersada en **ángulo recto**, denominada **SSC (Side Scatter)**, que es proporcional a la complejidad interna celular.
- Las **señales de fluorescencia** ocurren cuando se tiñe fluorescentemente un tipo celular o se utilizan anticuerpos con fluorocromos unidos que atacarán antígenos específicos de cada célula, marcándola fluorescentemente. Una vez dentro del citómetro, este fluorocromo podrá ser excitado y emitirá en una longitud de onda específica, que será recogida por el detector y nos informará de la cantidad de células de ese tipo que han pasado por la cámara. La longitud de onda de **excitación** siempre será menor que la de **emisión**, ya que se pierde energía en el proceso. La diferencia entre ambas longitudes se llama **Stokes shift**.

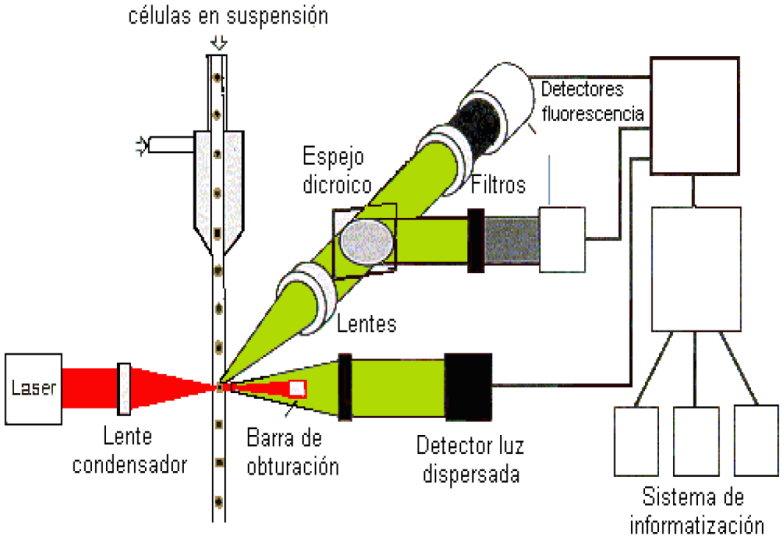
PREPARAOPOSFP

En resumen, calculando la cantidad total de fluorescencia de un tipo que ha sido detectada, se podrá calcular la cantidad de partículas de ese tipo presentes en la mezcla celular. Si se van a marcar diferentes tipos celulares con distintos fluorocromos, se debe tener en cuenta que ambos fluorocromos sean excitables por el aparato y que emitan en diferentes longitudes de onda. Algunos de los fluorocromos más utilizados son: **FITC (Isotiocianato de fluoresceína, excitación 490 nm y emisión 514 nm)**, **PE o ficoeritrina (excitación entre 480-565 nm y emisión 578 nm)**, u otros como **ioduro de propidio, bromuro de etidio**, etc.

- **Sistemas electrónicos y un ordenador**. Estos sistemas están constituidos por un **amplificador-convertidor de la señal** y por un **sistema informático** que traducirá esta señal en datos que los técnicos podrán interpretar. Habitualmente, se representan los resultados del citómetro (**citograma**) mostrando las poblaciones celulares de forma gráfica en un eje de coordenadas X/Y. Las poblaciones celulares, representadas por

agrupaciones homogéneas de puntos, se situarán en los citogramas dependiendo de sus características físicas de dispersión (SSC/FSC) y antigénicas.

Las muestras utilizadas en los citómetros son muy variadas y pueden ser: **médula ósea, sangre periférica, exudados y trasudados, líquido cefalorraquídeo, tejidos sólidos como ganglios disgregados o células procedentes de cultivos celulares**. Aun así, los tipos celulares más típicos son los dos primeros mencionados.



Esquema del diseño de un citómetro de flujo.

PREPARAOPOSFP

4.2. Aplicaciones del citómetro de lujo en hematología

Las **aplicaciones del citómetro de flujo** son muy numerosas, por lo que se mencionarán aquellas de mayor relevancia para el tema.

La aplicación más utilizada y clara del citómetro es la **medición de parámetros de la sangre**, especialmente de las células sanguíneas y su composición:

- **De la serie roja** es posible medir:
  - **Hemoglobina (Hb)**, que informa de la cantidad de esta proteína por unidad de volumen y que resulta muy útil para determinar si existe o no anemia. Los valores normales son **14-18 g/dL en hombres** y **12-16 g/dL en mujeres**.
  - **Hematocrito (Hct)**, que es la fracción de la sangre ocupada por los eritrocitos, siendo lo establecido **40-50% en hombres** y **37-47% en mujeres**.
  - **Número de eritrocitos por unidad de volumen (GR)**, con valores normales entre **4,5-6,1 × 10^6/mm³ en hombres** y **4,2-5,5 × 10^6/mm³ en mujeres**.
  - **Volumen globular medio (VGM)**, que indica el volumen promedio de los eritrocitos y ayuda a diagnosticar **anemias microcíticas** si el volumen es menor de lo esperado.

  - **Hemoglobina corpuscular media (HCM)**, que indica la cantidad de hemoglobina por eritrocito.
  - Otros parámetros como la **concentración media de hemoglobina corpuscular (CMBHb)** o el **coeficiente de variación del volumen globular medio (CV-VGM)**.
- **De la serie blanca** se miden:
  - El número y porcentaje de los diferentes leucocitos: **neutrófilos (40-70%)**, **eosinófilos (2-10%)**, **basófilos (0-1%)**, **linfocitos (20-40%)** y **monocitos (2-10%)**.

Otra aplicación del citómetro es la **detección y cuantificación de antígenos específicos**, que informan sobre el nivel de presencia de un tipo celular. Esta aplicación permite multitud de determinaciones; un ejemplo muy claro es la medición del número de **linfocitos T CD4+ (helpers)** y **CD8+ (citotóxicos)**. La alteración del equilibrio entre estos dos tipos celulares tiene un **gran valor diagnóstico**, ya que permite la monitorización del **síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA)**. De esta manera, se puede controlar periódicamente el nivel de CD4+ en estos pacientes, ya que la enfermedad provoca su disminución.

Otros ejemplos incluyen la monitorización de enfermedades autoinmunes como **esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico** o **artritis reumatoide**.

PREPARAOPOSFP

Otras patologías detectables mediante la detección de antígenos son: **leucemias mieloblásticas agudas, síndromes linfoproliferativos o leucemias agudas en remisión**. Además, esta aplicación es útil para **el seguimiento de la recuperación inmune tras un trasplante de médula ósea**, en caso de rechazo.

Otras aplicaciones destacables del citómetro son:

- Detección de **inmunoglobulinas humanas**.
- Diagnóstico de **trombocitopatías congénitas**.
- Tipificación dirigida frente al **antígeno HLA-B27**, relacionado con trastornos autoinmunes.

Por último, este aparato también permite la **cuantificación de ADN y ARN**, facilitando la identificación de **anomalías clonales de ADN en patologías tumorales**, la monitorización de la respuesta a tratamientos o la determinación de la madurez de células como los **reticulocitos** (gracias al recuento de ARN).

Como se puede ver, las aplicaciones del citómetro son tan numerosas que se necesitarían varios temas para abarcar todas, pero queda claro que es un aparato que proporciona **grandes ventajas** gracias a su rapidez de medición y determinación, su **especificidad y seguridad** en las determinaciones, y las **infinitas posibilidades** que ofrece gracias a la combinación con fluorocromos.

5. Conclusión

Las **técnicas de tinción** y los métodos **citoquímicos**, **inmunológicos** y de **citometría de flujo** constituyen herramientas fundamentales en el **análisis y diagnóstico hematológico**, permitiendo no solo la **identificación morfológica de las células sanguíneas**, sino también la **caracterización funcional** y la **detección de patologías específicas**. Las **tinciones habituales**, como los **colorantes ácidos, básicos, neutros e indiferentes**, permiten observar la **morfología de eritrocitos, leucocitos y plaquetas**, destacando la importancia de las **tinciones tipo Romanowsky** (Wright, Giemsa, May-Grünwald-Giemsa, Leishman) para diferenciar los distintos tipos celulares en un **frotis sanguíneo**. Estas tinciones aportan información visual clara sobre **estructuras basófilas y acidófilas**, lo que facilita la identificación de **anomalías celulares** y la diferenciación de los **leucocitos polinucleados y mononucleares**.

Las **técnicas citoquímicas** complementan la morfología con información funcional mediante la detección de **enzimas** como la **peroxidasa, esterasa ácida, fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina o β-glucuronidasa**, y la identificación de sustancias intracelulares como **glucógeno, mucopolisacáridos o lípidos** (Sudan B). Son esenciales en el **diagnóstico de leucemias**, **síndromes linfoproliferativos** y **anemias**, evaluando además el **grado de maduración y actividad funcional de las células**.

PREPARAOPOSFP

Por su parte, los **métodos inmunológicos** basados en **anticuerpos monoclonales** permiten detectar **antígenos específicos de membrana** mediante **inmunocitoquímica** o **inmunofluorescencia**, diferenciando **linfocitos T y B**, identificando **síndromes linfoproliferativos** y monitorizando **enfermedades autoinmunes** o infecciones como el **VIH/SIDA**.

Finalmente, la **citometría de flujo** ofrece un método **multiparamétrico, rápido y preciso**, evaluando **características morfológicas y antigénicas**, cuantificando células y monitorizando **enfermedades hematológicas, inmunodeficiencias, trasplantes y respuestas a tratamientos**. Su combinación con **fluorocromos y sistemas informáticos** proporciona una herramienta poderosa para la **investigación y diagnóstico clínico**.

En conjunto, estas técnicas ofrecen un **panorama integral de la sangre y sus componentes**, integrando **morfología, bioquímica y biología molecular**, y constituyen la base del **diagnóstico y seguimiento de patologías hematológicas, inmunológicas y neoplásicas**, permitiendo intervenciones médicas más **precisas y efectivas**.

6. Bibliografía

1. **Vives Corrons, J.L. y Aguilar Bascompte, J.L. (2014).** *Manual de técnicas de laboratorio en hematología*. (4ª ed.). Barcelona: Elsevier Masson.
2. **Rodak, B.F., Fritsma, G.A. y Keohane, E. (2014).** *Hematología: Fundamentos y aplicaciones clínicas*. (4ª ed.). Madrid: Editorial Médica Panamericana.
3. **Gil, J.L. (2010).** *Manual de metodología de trabajo en el laboratorio de hematología*. Barcelona: Elsevier.
4. **Alberts, B. et al. (2021).** *Biología molecular de la célula*. Ed. Omega.
5. **García Espinosa, B., Rubio Campal, F., & Crespo González, M. R. (2015).** *Técnicas de análisis hematológicos*. Ediciones Paraninfo.
6. **Bain, B.J.** (2022). *Blood Cells: A Practical Guide*. 6ª edición. Wiley-Blackwell.
7. **Orfila, A., & Bosch, M. (2006).** *Manual de citometría de flujo*. Asociación Española de Citometría.
8. **Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH)**. Guías clínicas y protocolos actualizados. https://www.sehh.es.
9. **American Society of Hematology (ASH).** (n.d.). https:// www.hematology.org
10. **OMS. (2023).** *Clasificación de los tumores hematopoyéticos y linfoides*.
11. **Real Decreto 771/2014,** de 12 de septiembre, por el que se establece el título de Técnico Superior en Laboratorio Clínico y Biomédico y se fijan sus enseñanzas mínimas.

PREPARAOPOSFP

ESPECÍFICA

1. **Orfila, A., & Bosch, M. (2006).** *Manual de citometría de flujo*. Asociación Española de Citometría.

VALENCIA

2. **DECRET 33/2022,** de 25 de març, del Consell, pel qual s'estableix per a la Comunitat Valenciana el currículum del cicle formatiu de grau superior corresponent al títol de tècnic o tècnica superiors en Laboratori Clínic i Biomèdic.

GALICIA

3. **DECRETO 77/2016,** de 28 de abril, por el que se establece el currículo del ciclo formativo de grado superior correspondiente al título de técnico superior en Laboratorio Clínico y Biomédico**.**