



**SIGMA-ALDRICH®**  
ENZIMAS LINFOCÍTICAS  
Procedimiento número 181

**APLICACIÓN**

Los kits de enzimas linfocíticas de Sigma-Aldrich se utilizan para la detección de fosfatasa ácida (kit n° 181-A),  $\alpha$ -naftil butirato esterasa (kit n° 181-B) o  $\beta$ -glucuronidasa (kit n° 181-C) en frotis de sangre o médula ósea, y en improntas de tejidos. Los kits de enzimas linfocíticas son para uso diagnóstico *in vitro*.

La disección de la maduración de células T normales en etapas discretas mediante citocímica enzimática y anticuerpos monoclonales, ha demostrado que la malignidad de las células T reproduce la misma diversidad ontogenética<sup>1-14</sup>. Estos informes, en su mayor parte, apoyan la conclusión de que las neoplasias de las células T reflejan una interrupción de la maduración durante el desarrollo normal.

Las series OKT® de anticuerpos monoclonales reconocedores de los antígenos de superficie de las células T, diferenciación los protimocitos y timocitos de las células T maduras. De forma parecida, la mayoría de células T de la sangre periférica y tejido linfático, cuando se tiñen para enzimas tales como fosfatasa ácida (AcP),  $\beta$ -glucuronidasa (BG) y  $\alpha$ -naftil butirato esterasa ( $\alpha$ -NB), muestran perfiles citocímicos característicos, relacionados con la edad. La AcP se adquiere mediante timocitos fetales precoces y se retiene durante toda la diferenciación de las células T<sup>15-16</sup>. La BG, que aparece más tarde en el desarrollo, se encuentra en timocitos postgestación y células T maduras circulantes<sup>17</sup>, y puede ser una auténtica enzima Pan T<sup>18-20</sup>. Las células T maduras y los timocitos medulares<sup>19-20</sup> expresan un epítipo de  $\alpha$ -NB, reactivo en un intervalo de pH estrecho (5,7-6,0). Basándose en sus resultados, Basso y cols.<sup>16</sup> han propuesto un esquema de maduración en el que se diferencia el progreso de las células T, de AcP+, BG-,  $\alpha$ -NB- a AcP+, BG+,  $\alpha$ -NB-, y finalmente, AcP+, BG+,  $\alpha$ -NB+.

La mayoría de células T maduras, definidas mediante rosetas de hematíes de oveja, muestran un patrón focal claro (de puntos) cuando se tiñen para AcP, BG y  $\alpha$ -NB<sup>21,22</sup>, y expresan receptores de superficie para IgM (T<sub>M</sub>, T<sub>H</sub>, For)<sup>23</sup>. Aquéllas que se caracterizan por una tinción difusa/granular, expresan receptores Fc para IgG (T<sub>G</sub>, gFcr)<sup>23</sup>. Existe evidencia de que los subconjuntos T<sub>M</sub>T<sub>G</sub> pueden solaparse con los subconjuntos OKT-4/OKT-8 (auxiliar-supresor)<sup>17-20</sup>. Se ha informado de datos discordantes referentes a esta relación<sup>23,24</sup>. Actualmente, parece ser que los fenotipos enzimáticos contribuyen principalmente a la determinación del estado de interrupción de la maduración en malignidades de las células T, permitiendo la diferenciación entre trastornos linfoproliferativos T-, B- y no T/no B.

Los procedimientos descritos permiten la disección del compartimiento de las células T en tres discretas fases de desarrollo. Estas técnicas no evitan el uso de anticuerpos monoclonales para un análisis fenotípico, sino que, usadas adecuadamente, pueden proporcionar información adicional en relación con la naturaleza de los trastornos linfoproliferativos de las células T.

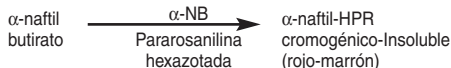
La reacción enumerada más abajo para  $\alpha$ -naftil butirato esterasa también demostrará una actividad de esterasa inespecífica en monocitos y macrófagos. Existen varios métodos para este fin. El método indicado más abajo no es específico de los monocitos y macrófagos, dado que el pH del medio de incubación ha sido ajustado para demostrar un patrón de tinción focal (de puntos) en algunos linfocitos. El procedimiento de  $\alpha$ -naftil butirato esterasa es menos sensible que el de  $\alpha$ -naftil acetato esterasa. Para procedimientos más sensibles a los monocitos, Sigma ofrece dos kits de esterasa, números de catálogo 90-A1 y 91-A. Estos kits también incluyen instrucciones para la demostración de  $\alpha$ -naftil acetato esterasa con inhibición de fluoruro.

Según las técnicas de Sigma-Aldrich, las preparaciones o frotis citocentrifugados se fijan en una solución de citrato-acetona-formaldehído. Seguidamente, la fosfatasa ácida, el  $\alpha$ -naftil butirato esterasa y la  $\beta$ -glucuronidasa se visualizan mediante los siguientes principios de captura simultánea.

**Fosfatasa ácida:**



**$\alpha$ -naftil butirato esterasa:**



**$\beta$ -Glucuronidasa:**



**REACTIVOS**

**SOLUCIÓN DE  $\alpha$ -NAFTIL BUTIRATO**, número de catálogo 180-1  $\alpha$ -naftil butirato, 2,4 g/l, en solución de metanol con disolventes.

**SOLUCIÓN DE NAFTOL AS-BI ÁCIDO FOSFÓRICO**, número de catálogo 180-2 Naftol AS-BI ácido fosfórico, 4 g/l, en solución de metanol con disolventes.

**SOLUCIÓN DE NAFTOL AS-BI  $\beta$ -D-ÁCIDO GLUCURÓNICO**, número de catálogo 180-3 Naftol AS-BI  $\beta$ -D-ácido glucurónico, 2,5 g/l, en solución de metanol con disolventes.

**SOLUCIÓN DE PARAROSANILINA**, número de catálogo 180-4 Pararosanilina, 40 g/l, en 2 ml/l de ácido clorhídrico.

**SOLUCIÓN BASE DE FAST GARNET GBC**, número de catálogo 387-2 Base de Fast Garnet GBC, 7,0 mg/ml, en 0,4 ml/l de ácido clorhídrico y estabilizador.

**SOLUCIÓN DE NITRITO SÓDICO**, número de catálogo 91-4 Nitrito sódico, 0,1 mol/l.

**TABLETAS DE NITRITO SÓDICO**, número de catálogo 180-9 Nitrito sódico, 250 mg por tableta.

**SOLUCIÓN DE CITRATO**, número de catálogo 91-5 Ácido cítrico, 18 mmol/l, citrato sódico, 9 mmol/l, cloruro sódico, 12 mmol/l, y surfactante. El pH debe ser de 3,6 + 0,1.

**SOLUCIÓN DE ACETATO**, número de catálogo 386-3 Tampón acetato, 2,5 mol/l, pH 5,2.

**TAMPÓN FOSFATO**, número de catálogo 180-5 Fosfatos sódico y potásico.

**SOLUCIÓN DE AZUL DE METILENO**, número de catálogo 180-8 Azul de metileno, 1,4 % (p/v) en etanol al 95 %.

**ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD:**

Almacenar las soluciones de  $\alpha$ -naftil butirato, naftol AS-BI ácido fosfórico y naftol AS-BI  $\beta$ -D-ácido glucurónico en el congelador, a una temperatura inferior a 0 °C. Calentar las soluciones a 37 °C y mezclarlas bien antes de su uso. Desechar si los reactivos se vuelven amarillos o si se forma un precipitado.

Almacenar la solución de pararosanilina, el tampón fosfato, las tabletas de nitrito sódico y la solución de azul de metileno a temperatura ambiente (18-26 °C), protegidos de la luz.

Almacenar las soluciones de base de Fast Garnet GBC, nitrito sódico, tabletas de nitrito sódico, acetato y tampón fosfato en el frigorífico (2-8 °C).

Las etiquetas de los reactivos indican la fecha de caducidad.

Las soluciones de nitrito sódico y citrato son adecuadas para usar en ausencia de crecimiento microbiano.

**DETERIORO:**

Desechar las soluciones de  $\alpha$ -naftil butirato, naftol AS-BI ácido fosfórico y naftol AS-BI  $\beta$ -D-ácido glucurónico, si el reactivo se vuelve amarillo o se forma precipitado.

Desechar la solución de pararosanilina si ésta no se vuelve de color ámbar tras la adición de nitrito sódico.

Las soluciones de nitrito sódico y tampón fosfato deben desecharse si se vuelven turbias.

**PREPARACIÓN:**

Calentar las soluciones de  $\alpha$ -naftil butirato, naftol AS-BI ácido fosfórico y naftol AS-BI  $\beta$ -D-ácido glucurónico, a 37 °C.

La solución de tabletas de nitrito sódico, 4 g/dl, se prepara disolviendo 1 tableta en 6,25 ml de agua desionizada. Almacenar esta solución bien tapada, a 2-8 °C. Calentar a temperatura ambiente antes de su uso. Desechar si presenta turbidez.

La solución de tampón fosfato se prepara disolviendo el contenido del tampón fosfato, número de catálogo 180-5, en 500 ml de agua desionizada. El tampón tiene una concentración de 0,067 mol/l, pH 7,7 a 25 °C. Almacenar en el frigorífico (2-8 °C). Desechar si el crecimiento microbiano es evidente.

NOTA: El crecimiento microbiano puede retrasarse mediante el filtrado con un filtro de 0,22 micras.

La contratención con azul de metileno se prepara añadiendo 5 ml de solución de azul de metileno, número de catálogo 180-8, a 45 ml de agua desionizada. Mezclar bien. Las preparaciones deben ser del día.

Fijador de citrato-acetona-formaldehído: A 25 ml de solución de citrato, número de catálogo 91-5, añadir 65 ml de acetona y 8 ml de formaldehído al 37 %. Colocarlo en una botella de vidrio bien tapada. Almacenar en el frigorífico (2-8 °C). Calentar a 23-26 °C antes de su uso. La solución es estable si se almacena en el frigorífico, bien tapada.

**PRECAUCIONES:**

Se deben seguir las precauciones normales ejercidas en el manejo de reactivos de laboratorio. Deshacerse de los desechos observando todas las normativas locales, regionales y nacionales. Consultar la Hoja de datos de seguridad del material para obtener cualquier información actualizada sobre riesgos, peligros o seguridad.

Declaración de riesgos y seguridad (EE.UU.)

La solución de  $\alpha$ -naftil butirato es INFLAMABLE y TÓXICA. Tóxica por inhalación, en contacto con la piel y en caso de ingestión. Tóxica: peligro de efectos irreversibles muy graves por

inhalación, por contacto con la piel y en caso de ingestión. Irritante para los ojos y la piel. Mantener el envase bien cerrado. Mantener alejada de las llamas – no fumar. Tomar medidas cautelares contra descargas de electricidad estática. Evitar el contacto con la piel. Usar ropa y guantes protectores adecuados. En caso de accidente o de malestar, buscar atención médica inmediatamente (mostrar la etiqueta si es posible).

La solución de naftol AS-BI ácido fosfórico es INFLAMABLE y TÓXICA. Tóxica por inhalación, en contacto con la piel y en caso de ingestión. Tóxica: peligro de efectos irreversibles muy graves por inhalación, por contacto con la piel y en caso de ingestión. Irritante para los ojos y la piel. Mantener alejada de las llamas – no fumar. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar atención médica. Usar ropa y guantes protectores adecuados. En caso de accidente o de malestar, buscar atención médica inmediatamente (mostrar la etiqueta si es posible).

La solución de naftol AS-BI  $\beta$ -D-ácido glucurónico es INFLAMABLE y TÓXICA. Perjudicial en caso de inhalación e ingestión. Irritante para los ojos y la piel. Mantener alejada de las llamas – no fumar. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar atención médica. Usar ropa y guantes protectores adecuados. En caso de accidente o de malestar, buscar atención médica inmediatamente (mostrar la etiqueta si es posible).

La solución de pararosanilina es TÓXICA. Tóxica por inhalación. Provoca quemaduras. Puede causar cáncer. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar atención médica. Usar ropa protectora adecuada, guantes y protección para los ojos y el rostro. En caso de accidente o de malestar, buscar atención médica inmediatamente (mostrar la etiqueta si es posible). Órganos a los que afecta: hígado y tiroides. Calif. PROP 65 (carcinógena).

Evitar el contacto y la inhalación del tampón fosfato.

La solución de azul de metileno es INFLAMABLE e IRRITANTE. Irritante para los ojos, sistema respiratorio y piel. Mantener el envase bien cerrado. Mantener alejada de las llamas – no fumar. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar atención médica. Llevar ropa protectora adecuada.

Las tabletas de nitrito sódico son TÓXICAS, OXIDANTES y peligrosas para el medio ambiente. En contacto con combustible pueden provocar incendio. Tóxicas en caso de ingestión. Muy tóxicas para los organismos acuáticos. Mantener alejadas de material combustible. Usar ropa protectora adecuada, guantes y protección para los ojos y el rostro. En caso de accidente o de malestar, buscar atención médica inmediatamente (mostrar la etiqueta si es posible). Evitar su liberación en el medio ambiente. Consultar las hojas de instrucciones y de datos de seguridad.

La solución de base de Fast Garnet GBC es TÓXICA. Perjudicial en caso de ingestión. Tóxica por inhalación. Provoca quemaduras. Puede causar cáncer. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar atención médica. Usar ropa protectora adecuada, guantes y protección para los ojos y el rostro. En caso de accidente o de malestar, buscar atención médica inmediatamente (mostrar la etiqueta si es posible). Órganos a los que afecta: hígado y riñones.

Solución de acetato – Precaución: sustancia en proceso de prueba.

La acetona es INFLAMABLE e IRRITANTE. Irritante para los ojos. Una exposición reiterada puede causar sequedad o grietas en la piel. Los vapores pueden causar somnolencia o mareo. Mantener el envase en un lugar bien ventilado. Mantener alejada de las llamas – no fumar. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar atención médica. Órganos a los que afecta: hígado y riñones.

La solución de formaldehído es TÓXICA. Tóxica por inhalación, en contacto con la piel y en caso de ingestión. Provoca quemaduras. Evidencia escasa de efectos carcinógenos. Puede causar sensibilización por contacto con la piel. Puede causar daños genéticos hereditarios. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar atención médica. Usar ropa protectora adecuada, guantes y protección para los ojos y el rostro. En caso de accidente o de malestar, buscar atención médica inmediatamente (mostrar la etiqueta si es posible). Utilizar sólo en zonas bien ventiladas.

Declaración de riesgos y seguridad (U.E.) (Precaución: sustancias en proceso de prueba)

La solución de  $\alpha$ -naftil butirato es TÓXICA. Tóxica por inhalación, en contacto con la piel y en caso de ingestión. Tóxica: peligro de efectos irreversibles muy graves por inhalación, por contacto con la piel y en caso de ingestión. Usar ropa y guantes protectores adecuados. En caso de accidente o de malestar, buscar atención médica inmediatamente (mostrar la etiqueta si es posible).

La solución de naftol AS-BI ácido fosfórico es TÓXICA. Inflamable. Tóxica por inhalación, por contacto con la piel y en caso de ingestión. Tóxica: peligro de efectos irreversibles muy graves por inhalación, por contacto con la piel y en caso de ingestión. Irritante para los ojos y la piel. Mantener alejada de las llamas – no fumar. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar atención médica. Usar ropa y guantes protectores adecuados. En caso de

accidente o de malestar, buscar atención médica inmediatamente (mostrar la etiqueta si es posible).

La solución de naftol AS-BI  $\beta$ -D-ácido glucurónico es TÓXICA. Inflamable. Perjudicial por inhalación, por contacto con la piel y en caso de ingestión. Irritante para los ojos y la piel. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar atención médica. Usar ropa protectora adecuada, guantes y protección para los ojos y el rostro. En caso de accidente o de malestar, buscar atención médica inmediatamente (mostrar la etiqueta si es posible).

La solución de pararosanilina es IRRITANTE. Irritante para los ojos, sistema respiratorio y piel. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar atención médica. Usar ropa y guantes protectores adecuados.

Tampón fosfato: Precaución: sustancia en proceso de prueba.

La solución de azul de metileno es ALTAMENTE INFLAMABLE. Altamente inflamable. Mantener el envase bien cerrado. Mantener alejada de las llamas – no fumar.

Las tabletas de nitrato sódico son OXIDANTES, TÓXICAS y peligrosas para el medio ambiente. En contacto con combustible pueden provocar incendio. Tóxicas en caso de ingestión. Muy tóxicas para los organismos acuáticos. En caso de accidente o de malestar, buscar atención médica inmediatamente (mostrar la etiqueta si es posible). Evitar su liberación en el medio ambiente. Consultar las hojas de instrucciones y de datos de seguridad.

La solución de base de Fast Garnet GBC es TÓXICA. Perjudicial en caso de ingestión. Puede causar cáncer. En caso de accidente o de malestar, buscar atención médica inmediatamente (mostrar la etiqueta si es posible).

Solución de acetato – Precaución: sustancia en proceso de prueba.

La acetona es ALTAMENTE INFLAMABLE e IRRITANTE. Altamente inflamable. Irritante para los ojos. Una exposición reiterada puede causar sequedad o grietas en la piel. Los vapores pueden causar somnolencia o mareo. Mantener el envase en un lugar bien ventilado. Mantener alejada de las llamas – no fumar. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar atención médica.

La solución de formaldehído es TÓXICA. Tóxica por inhalación, en contacto con la piel y en caso de ingestión. Provoca quemaduras. Evidencia escasa de efectos carcinógenos. Puede causar sensibilización por contacto con la piel. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar atención médica. Usar ropa protectora adecuada, guantes y protección para los ojos y el rostro. En caso de accidente o de malestar, buscar atención médica inmediatamente (mostrar la etiqueta si es posible). Utilizar sólo en zonas bien ventiladas.

## PROCEDIMIENTO

### RECOGIDA DE LA MUESTRA:

Se recomienda que la recogida de la muestra se lleve a cabo de acuerdo con las directrices del documento M29-A2 de la NCCLS. Ningún método de prueba puede garantizar la completa seguridad de que las muestras de sangre o tejido no transmitan infecciones. Por lo tanto, todos los derivados de la sangre o muestras de tejido deben considerarse potencialmente infecciosos.

Las muestras pueden recogerse en EDTA o heparina. Después de su fijación, los portaobjetos pueden almacenarse a temperatura ambiente durante al menos 2 semanas. Si las células mononucleares deben aislarse utilizando HISTOPAQUE®-1077, la separación deberá realizarse dentro de las 4 horas, aunque también se ha experimentado una buena recuperación tras 24 horas<sup>26</sup>. Los frotis de sangre, particularmente los procedentes de individuos leucopénicos, no están recomendados para estos procedimientos ya que la evaluación de este material lleva bastante tiempo. Deben utilizarse preparaciones citocentrífugas o de capa leucocitaria. Los frotis de médula ósea y las improntas de tejidos no representan ningún problema para una evaluación microscópica.

### MATERIAL ESPECIAL NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO:

Acetona, reactivo ACS

Formaldehído

Formaldehído, 37 %

Baño de agua capaz de mantener 37 °C protegido de la luz

### NOTAS:

Las células procedentes de donantes sanos se deben incluir en cada prueba.

Las células aisladas en gradientes de polisucrosa-diatrizoato sódico pueden almacenarse en nitrógeno líquido (LN<sub>2</sub>) para fines de control. Para ello, 1 x 10<sup>7</sup> - 10<sup>8</sup> células se congelan a 1 ± 0,3 °C por minuto, en un medio con suero fetal de ternera al 50 %, RPMI-1640 al 40 % (u otros líquidos de cultivo de tejidos adecuados) y dimetilsulfóxido (DMSO) al 10 %. Pueden almacenarse en la fase líquida o de vapor de LN<sub>2</sub>.

Los portaobjetos deben evaluarse utilizando un aumento de 1000X. Los filtros de dimidio pueden realzar el color, particularmente el de la tinción difusa de  $\alpha$ -NB.

Los datos obtenidos mediante este procedimiento sólo sirven como ayuda en el diagnóstico y deben ser revisados junto con otras pruebas clínicas o información de diagnóstico.

### PROCEDIMIENTOS:

#### PROCEDIMIENTO CON FOSFATASA ÁCIDA:

##### Reactivos

Solución de naftol AS-BI ácido fosfórico, número de catálogo 180-2

Solución de base de Fast Garnet GBC, número de catálogo 387-2

Solución de nitrato sódico, número de catálogo 91-4

Solución de citrato, número de catálogo 91-5

Solución de acetato, número de catálogo 386-3

Solución de azul de metileno, número de catálogo 180-8

1. Precalentar a 37 °C una cantidad suficiente de agua desionizada para todo un día.
2. Inmediatamente antes de la fijación, añadir 1 ml de solución de nitrato sódico, número de catálogo 91-4, a 1 ml de solución de base de Fast Garnet GBC, número de catálogo 387-2. Mezclar con cuidado mediante inversión y dejar reposar durante 2–5 minutos.
3. Añadir la solución del paso 2 a 38 ml del agua desionizada precalentada.
4. Añadir 5 ml de solución de acetato, número de catálogo 386-3.
5. Añadir 5 ml de solución de naftol AS-BI ácido fosfórico, número de catálogo 180-2. Mezclar bien y decantar en un vaso de Coplin. La solución será ámbar. La formación de un precipitado indica el deterioro del reactivo.
6. Fijar los portaobjetos durante 30 segundos en fijador citrato-acetona-formaldehído, a temperatura ambiente (23–26 °C). Aclarar los portaobjetos con agua desionizada durante 45-60 segundos. No dejar que los portaobjetos se sequen.
7. Inmediatamente después del aclarado, colocar los portaobjetos en la solución del paso 5 e incubar durante 1 hora a 37 °C.  
NOTA: Si los portaobjetos no se colocan en una solución de incubación tras la fijación, deberán dejarse secar al aire durante al menos 45 minutos.
8. Después de 1 hora, extraer los portaobjetos del vaso de Coplin y aclararlos con agua corriente del grifo durante al menos 2 minutos. Desechar la solución de tinción.
9. Los portaobjetos deben dejarse secar al aire durante al menos 15 minutos antes de la contratinción.
10. Contrateñir durante 2 minutos en contratinción de azul de metileno.
11. Aclarar con agua desionizada.

#### PROCEDIMIENTO CON $\alpha$ -NAFTIL BUTIRATO ESTERASA:

##### Reactivos

Solución de  $\alpha$ -naftil butirato, número de catálogo 180-1

Solución de pararosanilina, número de catálogo 180-4

Tabletas de nitrato sódico, número de catálogo 180-9

Tampón fosfato, número de catálogo 180-5

Solución de azul de metileno, número de catálogo 180-8

Solución de citrato, número de catálogo 91-5

1. Precalentar la solución de tampón fosfato a 37 °C.
2. Inmediatamente antes de la fijación, añadir 1,5 ml de solución de tabletas de nitrato sódico a 1,5 ml de solución de pararosanilina, número de catálogo 180-4. Mezclar con cuidado mediante inversión, dejar reposar durante al menos 5 minutos y luego añadir 40 ml de la solución de tampón fosfato precalentada.
3. Añadir 5 ml de solución de  $\alpha$ -naftil butirato, número de catálogo 180-1.
4. Mezclar bien y decantar en un vaso de Coplin. La solución será ámbar. La formación de un precipitado indica el deterioro del reactivo.
5. Fijar los portaobjetos durante 10 segundos en fijador citrato-acetona-formaldehído, a temperatura ambiente (23–26 °C). Aclararlos con agua desionizada durante 45 segundos. No dejar que los portaobjetos se sequen.
6. Inmediatamente después del aclarado, colocar los portaobjetos en la solución del paso 4 e incubar durante 1 hora a 37 °C.  
NOTA: Si los portaobjetos no se colocan en una solución de incubación tras la fijación, deberán dejarse secar al aire durante al menos 45 minutos.
7. Después de 1 hora, extraer los portaobjetos del vaso de Coplin y aclararlos con agua corriente del grifo durante 2–3 minutos. Desechar la solución de tinción.
8. Los portaobjetos deben dejarse secar al aire durante al menos 15 minutos antes de la contratinción.
9. Contrateñir durante 5 minutos en contratinción de azul de metileno.
10. Aclarar con agua desionizada.

#### PROCEDIMIENTO CON $\beta$ -GLUCURONIDASA:

##### Reactivos

Naftol AS-BI  $\beta$ -D-ácido glucurónico, número de catálogo 180-3

Solución de pararosanilina, número de catálogo 180-4

Tabletas de nitrato sódico, número de catálogo 180-9

Solución de acetato, número de catálogo 386-3

Solución de azul de metileno, número de catálogo 180-8

Solución de citrato, número de catálogo 91-5

1. Precalentar a 37 °C una cantidad suficiente de agua desionizada para todo un día.
2. Inmediatamente antes de la fijación, añadir 0,5 ml de solución de tabletas de nitrato sódico a 0,5 ml de solución de pararosanilina, número de catálogo 180-4. Mezclar con cuidado mediante inversión, dejar reposar durante al menos 5 minutos y luego añadir 38 ml del agua desionizada precalentada.
3. Añadir 5 ml de solución de acetato, número de catálogo 386-3.
4. Añadir 5 ml de solución de naftol AS-BI  $\beta$ -D-ácido glucurónico, número de catálogo 180-3.
5. Mezclar bien y decantar en un vaso de Coplin. La solución será ámbar. La formación de un precipitado indica el deterioro del reactivo.
6. Fijar los portaobjetos durante 30 segundos en fijador citrato-acetona-formaldehído, a temperatura ambiente (23–26 °C). Aclararlos con agua desionizada durante 45 segundos. No dejar que los portaobjetos se sequen.
7. Inmediatamente después del aclarado, colocar los portaobjetos en la solución del paso 5 e incubar durante 90 minutos a 37 °C, protegidos de la luz.  
NOTA: Si los portaobjetos no se colocan en una solución de incubación tras la fijación, deberán dejarse secar al aire durante al menos 45 minutos.
8. Después de 90 minutos, extraer los portaobjetos del vaso de Coplin y aclararlos con agua corriente del grifo durante 2–3 minutos. Desechar la solución de tinción.
9. Los portaobjetos deben dejarse secar al aire durante al menos 15 minutos antes de la contratinción.
10. Contrateñir durante 3 minutos en azul de metileno.
11. Aclarar con agua desionizada.

## CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

**FOSFATASA ÁCIDA:** La tinción focal (de puntos) de los linfocitos sugiere un linaje tímico (células T).

**$\alpha$ -NAFTIL BUTIRATO ESTERASA:** El patrón de tinción focal (de puntos) observado en algunos linfocitos está asociado con células T maduras portadoras de receptores Fc para IgM. Este subconjunto se solapa con la población de células T auxiliares hasta cierto punto, pero no es una medición precisa de la función auxiliar. La tinción difusa o granular de los linfocitos porta receptores a la parte Fc de IgG y se solapa hasta cierto punto con la población de células T supresoras.

**$\beta$ -GLUCURONIDASA:** La tinción positiva aparece asociada con los timocitos maduros, las células T circulantes y una subpoblación de células B inmaduras. Los patrones focales (de puntos) y difusos-granulares marcan de forma parecida a  $\alpha$ -naftil butirato esterasa. Los monocitos y granulocitos generalmente son negativos.

Si los resultados observados varían de los esperados, póngase en contacto con el Servicio Técnico de Sigma-Aldrich.

## REFERENCIAS



1. Nadler LM, Ritz J, Reinherz EL, Schlossman SF: Cellular Origins of Human Leukemias and Lymphomas. IN Leukemia Markers, W Knapp, Editor, Academic Press, London, 1981, p 3
2. Greaves MF: Monoclonal Antibodies as Probes for Leukaemic Heterogeneity and Haemopoietic Differentiation. *ibid.*, p 19
3. Janossy G: Differentiation of Human Bone Marrow Cells and Thymocytes. *ibid.*, p 45
4. Kersey JH, LeBien TW, Gail-Peczalska K, Nesbit M, et al: Acute Lymphoblastic Leukemia/Lymphoma: Cell Markers Define Phenotypic Heterogeneity. *ibid.*, p 453
5. Reinherz EL, Schlossman SF: The characterization and function of human immunoregulatory T lymphocyte subsets. *Immunology Today*, April 1981, p 69
6. Banker DS, Pahwa RN, Miller DR, Hilgartner MW et al: Immunoregulatory properties of childhood leukemias. *J Clin Immunol* 2:230, 1982
7. Reinherz EL, Schlossman SF: The differentiation and function of human T lymphocytes. *Cell* 19:821, 1980
8. Catovsky D, Enno A: Morphological and cytochemical identification of lymphoid cells. *Lymphology* 10:77, 1977
9. Bevan A, Burns GF, Gray L, Cawley JC: Cytochemistry of human T-cell subpopulations. *Scand J Immunol* 11:223, 1980
10. Yang K, Bearman RM, Pangalis GA, Zelman RJ, et al: Acid phosphatase and alpha-naphthyl acetate esterase in neoplastic and non-neoplastic lymphocytes. *Am J Clin Pathol* 78:141, 1982
11. Crockard A, Chalmers D, Matutes E, Catovsky D: Cytochemistry of acid hydrolysis in chronic B- and T-cell leukemias. *Am J Clin Pathol* 78:437, 1982
12. Ranki A: Non-specific esterase activity in human lymphocytes. *Clin Immunol Immunopathol* 10:47, 1978
13. Zicca A, Lepri A, Cadoni A, Franzì AT, et al: Ultrastructural localization of alpha-naphthyl acetate esterase in human TM lymphocytes. *Am J Pathol* 105:40, 1981
14. Knowles DM II, Halper JP: Human T-cell malignancies: Correlative clinical, histopathologic, immunologic and cytochemical analysis of 23 cases. *Am J Pathol* 106:187, 1982
15. Stein H, Peterson N, Gaedick G, Lennert K, et al: Lymphoblastic lymphoma on convoluted or acid phosphatase type-A tumor of T precursor cells. *Int J Cancer* 17:292, 1976
16. Basso G, Cocito MG, Semenzato G, Pezzutto A, et al: Cytochemical study of thymocytes and T lymphocytes. *Br. J. Haematol* 44:577, 1980

17. Machin GA, Halper JP, Knowles DM II: Cytochemically demonstrable  $\beta$ -glucuronidase activity in normal and neoplastic human lymphoid cells. *Blood* 56:1111, 1980
18. Ranki A, Totterman TH, Hayry P: Identification of resting human T and B lymphocytes by acid  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase staining combined with rosette formation with *Staphylococcus aureus* strain Cowan 1. *Scand J Immunol* 5:1129, 1976
19. Knowles DM II, Hoffman T, Ferrarini M, Kunkel HG: The demonstration of acid  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase activity in human lymphocytes: Usefulness as a T-cell marker. *Cell Immunol* 35:112, 1978
20. Knowles DM II, Halper JP: Human medullary and cortical thymocytes are distinguishable according to the presence or absence of cytochemically demonstrable acid  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase (ANAE) activity. *J Immunol* 125:2823, 1980
21. Armitage RJ, Linch DC, Worman CP, Cawley JC: The morphology and cytochemistry of human T-cell subpopulations defined by monoclonal antibodies and Fc receptors. *Br J Haematol* 51:605, 1982
22. DeWaele M, DeMey J, Moeremans M, Broodtaerts L, et al: Colloidal gold as a marker for the light microscope detection of leukocyte cell surface antigens with monoclonal antibodies. *J Clin Immunol* 2:24S, 1982 (Suppl)
23. Manconi PE, Marrosu MG, Paghi L, Correale G, et al: Alpha-naphthyl acetate esterase activity in human lymphocytes: Distribution in lymphocyte subpopulations and in mitogen-activated cells. *Scand J Immunol* 9:99, 1979
24. Reinherz EL, Moretta L, Roper M, Breard JM, et al: Human T lymphocyte subpopulations defined by Fc receptors and monoclonal antibodies: A comparison. *J Exp Med* 151:969, 1980
25. Zito DR, Johnson KL, Skipper ME, Normansell DE: Isolation of mononuclear cells from the whole blood: Comparison of two media. *Lab Med* 17:94, 1986

OKT es marca registrada de Ortho Diagnostic Systems, Inc., Raritan, NJ, EE.UU.

Sigma-Aldrich, Inc. garantiza que sus productos concuerdan con la información contenida en ésta y otras publicaciones de Sigma-Aldrich. El comprador debe determinar la idoneidad de los productos para su uso particular. Es posible que deban aplicarse términos y condiciones adicionales. En el reverso de la factura o del albarán se incluyen los términos adicionales y las condiciones de venta.

Procedimiento número 181  
 Revisión anterior: 2003-02  
 Revisión: 2003-09

  AR-MED Ltd., Runnymede Malthouse  
 Egham TW20 9BD Reino Unido

SIGMA-ALDRICH, INC.  
 3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 EE.UU. +1 314 771 5765  
 Servicio Técnico: a cobro revertido al +1 314 771 3122  
 o por correo electrónico a [clintech@sial.com](mailto:clintech@sial.com)  
 Para realizar pedidos: a cobro revertido al +1 314 771 5750  
[www.sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com)

SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH  
 P.O. 1120, 89552 Steinheim, Alemania 49-7329-970