



Evolución Química de los Colorantes Hematológicos

Carmen Myriam De La O Contreras,¹ Hilda Amelia Piñón Castillo² y Miriam Rosario Zermeño Ortega³

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Chihuahua. ¹: cdelao@uach.mx; ²: hpinon@uach.mx; ³: mrzermeno@uach.mx

Cite este artículo así:

APA: De la O-Contreras, C. Piñón-Castillo, H.; Zermeño-Ortega, M. (2023). Evolución Química de los Colorantes Hematológicos *Quimiofilia*, 2, (2) 21-25.

DOI <https://doi.org/10.56604/qfla2023221620>

ACS: De la O-Contreras, C.; Piñón-Castillo, H.; Zermeño-Ortega, M. *Quimiofilia*, 2023, 2, 2, 21-25

DOI <https://doi.org/10.56604/qfla2023221622>

Recibido: septiembre 13, 2023

Aceptado: noviembre 9, 2023

Publicado: noviembre 28, 2023

www.quimiofilia.com ISSN: 2683-2364 Registro IMPI: 2052060 QUIMIOFILIA Reserva de derechos al uso exclusivo 2022: 04-2019-062013201300-203

Resumen

Los colorantes hematológicos han sido utilizados para el diagnóstico, tratamiento, pronóstico y prevención de enfermedades, donde a lo largo de la historia poco a poco desde el siglo XVII a la fecha, se ha mejorado la capacidad para teñir células. Los avances en procesos de síntesis han permitido modificar químicamente la estructura de estos, además de incluir algunos componentes que le dan una mayor eficacia al proceso de tinción, dando como resultado diversas opciones para mejorar la observación de células de la sangre con una mayor eficacia como lo son las tinciones Romanowsky, Wright, May-Grünwald, Giemsa y Leishman.

Palabras Clave

Hematología; colorante; células; sangre; tinción.

La hematología es el área de la medicina sobre el diagnóstico, tratamiento, pronóstico y prevención de las enfermedades que atañen a la sangre, a través del estudio de los elementos formes que la componen que son eritrocitos (glóbulos rojos), leucocitos (glóbulos blancos) y trombocitos (plaquetas).¹ Para llevar a cabo el estudio morfológico de las células, es necesario utilizar herramientas como el microscopio y procesos de tinción, que permitan resaltar sus características y aumentar el contraste de anomalías que éstas tengan.^{2,3}

Debido a que los colorantes son específicos, la tinción de una muestra permite la ubicación de estas estructuras dentro de un

tejido, célula u organismo. Además, se puede determinar si una estructura está presente o no, o bien, si es posible hacer la cuantificación de la molécula detectada.^{4,5}

Los colorantes deben de reunir dos características para poder ser utilizados y contrastar las células a observar. En primer lugar, tienen un grupo cromóforo, esto es que la molécula contenga en una de sus partes grupos funcionales que absorben a una longitud de onda y les permiten emitir luz dentro del espectro visible.⁶ En segundo lugar, el colorante debe unirse a la célula mediante enlaces covalentes, iónicos o interacciones hidrofóbicas, además los colorantes deben de ser solubles.⁷

1. Lichtman, M.A.; Kaushansky, K.; Kipps, T.J.; Prchal, J.T.; Levi, M.M. Abordaje del Paciente. Williams Manual de Hematología. 8a edición; Mc Graw Hill Interamericana: México, México, 2014; 8

2. Alturkistani, H.A.; Tashkand, F.M.; Mohammedsaleh, Z.M. Histological Stains: A Literature Review and Case Study. *Global J. Health Sci.* 2016, 8, 72-79. DOI: [10.5539/gjhs.v8n3p72](https://doi.org/10.5539/gjhs.v8n3p72)

3. Javaeed, A.; Qamae, S.; Ali, S.; Talha-Mustafa, M.A.; Nusrat, A.; Khan-Ghauri, S. Histological Stains in the Past, Present, and Future. *Cureus* 2021, 13, 1-6. DOI: [10.7759/cureus.18486](https://doi.org/10.7759/cureus.18486)

4. Horobin, R.W. Biological staining: mechanisms and theory. *Biotech. Histochem.* 2002, 77(1), 3-13. DOI: [10.1080/bih.77.1.3.13](https://doi.org/10.1080/bih.77.1.3.13)

5. Johnston, W.T. The discovery of aniline and the origin of the term "aniline dye". *Biotech. Histochem.* 2008, 83(2), 83-87. DOI: [10.1080/10520290802136793](https://doi.org/10.1080/10520290802136793)

6. Ahmouda, K.; Boudiaf, M.; Benhaoua, B. A novel study on the preferential attachment of chromophore and auxochrome groups in azo dye adsorption on different green synthesized magnetite nanoparticles: investigation of the influence of the mediating plant extract's acidity. *Nanoscale Advances* 2022, 4(15), 3250-3271. DOI: [10.1039/D2NA00302C](https://doi.org/10.1039/D2NA00302C)

7. Gürses, A.; Açıkyıldız, M.; Güneş, K.; Gürses, M.S. *Dyes and Pigments*, 1er. Ed., Springer, Cham., Switzerland, 2016; pp13-29, 31-45



Los colorantes empleados en el área biomédica se clasifican como colorantes ácidos y básicos, dependiendo de su carga ya sea positiva o negativa, siendo los cationes básicos y los aniones ácidos. En histoquímica e histología los colorantes que contienen grupos $-\text{SO}_3^{2-}$, $-\text{COO}^-$ y $-\text{O}^-$, son clasificados como colorantes ácidos.⁸ Los colorantes básicos se definen como aquellos que en su estructura tienen una carga positiva, como los derivados de azina, cristal violeta, entre otros.⁹ Las primeras técnicas de tinción celular que surgieron se basaron en el uso de colorantes que existían en la naturaleza, estas técnicas simples eran usadas para ver las características de las células y compararlas con otras, o bien conocer su estructura normal. Se sabe que Leeuwenhoek en el siglo XVIII, usó colorantes extraídos de plantas como el azafrán y el índigo solo para dar contraste a sus preparaciones, pero no hay evidencia de su uso en la observación de las células de la sangre solo en fibras musculares.^{3, 10,11,12} El principal componente natural del azafrán, responsable de producir color en solución es la crocetina, mientras que para el índigo es la indigotina (Figura 1).^{13,14}

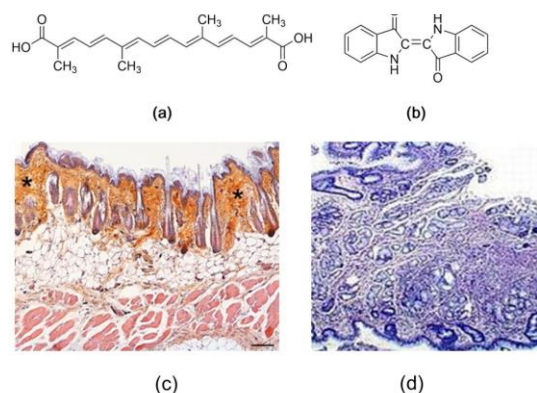


Figura 1. Estructura química de los componentes del azafrán e índigo y tinción celular. (a) Crocetina; (b) Indigotina; (c) tinción celular con azafrán; e (d) índigo.^{15,16,17,18}

La crocetina es una aglicona, presenta la estructura de un ácido conjugado poliinsaturado, cuatro grupos metilo y siete dobles enlaces conjugados.¹⁹ Se ha demostrado que tiene la capacidad de atravesar las membranas celulares por difusión pasiva, una vez en el interior puede establecer interacciones hidrofóbicas con diversos componentes moleculares aniónicos del citoplasma y núcleo.^{20,21}

La indigotina y sus derivados (carmín de índigo) presenta en el centro un enlace π conjugado que es el cromóforo, responsable de absorber la luz a una determinada longitud de onda y provocar que se observe de color azul cuando se incorpora por disolución en las estructuras celulares.¹⁴

Posteriormente en el siglo XIX comenzaron a utilizar colorantes extraídos de animales, el más usado fue el carmín obtenido del insecto del nopal (cochinilla). En 1858 Joseph von Gerlach establece el primer protocolo para tinción de células usando el carmín, sin embargo, no se usó en células de la sangre.²²

El ácido carmínico es el componente principal del carmín y es el responsable de dar color.²³ La estructura química se compone de un núcleo de antraquinona unido a residuos de ácido carboxílico, un grupo metilo, cuatro grupos hidroxilo y una hexosa, (Figura 2).²⁴ Este compuesto forma puentes de hidrógeno o complejos de coordinación si hay metales presentes.²³

8. Puchtler, H.; Meloan, S.N.; Spencer, M. Current chemical concepts of acids and bases and their application to anionic ("acid") and cationic ("basic") dyes. *Histochemistry* **1985**, *82*, 301-306. DOI: [10.1007/BF00494057](https://doi.org/10.1007/BF00494057).
9. Willey, J.M.; Kathleen, M.S.; Wood, D.H.; Prescott, L. M. Prescott's microbiology, 10th ed. McGraw-Hill. New York, **2017**; pp 32-34
10. Finlay, B.J.; Esteban, G.F. Exploring Leeuwenhoek's: the abundance and diversity of protozoa. *Int. Microbiol.* **2001**, *4*, 125-133. DOI: [10.1007/s10123-001-0027-y](https://doi.org/10.1007/s10123-001-0027-y).
11. Titford, M. Progress in the Development of Microscopical Techniques for Diagnostic Pathology. *The Journal of Histotechnology* **2009**, *32*, 9-19. DOI: [10.1179/his.2009.32.1.9](https://doi.org/10.1179/his.2009.32.1.9)
12. Musumeci, G. Past, present and future: overview on histology and histopathology. *J. Histol. Histopathol* **2014**, *1*, 1-3. DOI: [10.7243/2055-091X-1-5](https://doi.org/10.7243/2055-091X-1-5).
13. Alonso, G.L.; Zalacain, A.; Carmona M. Saffron. Handbook of Herbs and Spices 2^a edición. Editor K.V. Peter in Woodhead Publishing Series in Food Science Technology and Nutrition New York, Estados Unidos, **2012**; *1*, 469-498.
14. Castañeda-Delgado, M. El índigo en la pintura de caballete novohispana: mecanismos de deterioro. *Intervención* **2019**, *10*, 25-36. DOI: [10.30763/Intervencion.2019.19.206](https://doi.org/10.30763/Intervencion.2019.19.206)
15. Guo, Z.L.; Li, M.X.; Li, X.L.; Wang, P.; Wang, W.G.; Du, W.Z.; Yang, Z.Q.; Chen, S.F.; Wu, D.; Tian, X.Y. Crocetin: a systematic review. *Front. Pharmacol.* **2022**, *12*, 1-28. DOI: [10.3389/fphar.2021.745683](https://doi.org/10.3389/fphar.2021.745683).
16. Grosjean, D.; Whitmore, P.M.; Cass, G.R. Ozone fading of natural organic colorants-mechanisms and products of the reaction of ozone with indigos. *Environ. Sci. Technol* **1988**, *22*, 292-298. DOI: [10.1021/es00168a009](https://doi.org/10.1021/es00168a009)
17. Ceccopieri, C.; Skoinieczna, J.; Madej, J.P. Modification of hematoxylin, eosin and natural saffron staining method for the detection of connective tissue. *Am. J. Vet. Res.* **2021**, *65*, 125-130. DOI: [10.2478/jvetres-2021-0008](https://doi.org/10.2478/jvetres-2021-0008)
18. DDK Italia. Disponible en línea: <https://ddkitalia.net/prodotti/picro-indigo-carmine/?lang=es> (acceso 2, noviembre, 2023)
19. Peng, F.C.; Gao, C.; Qian, Z. Y. Protective effects of crocetin on anoxic injury in mice. *Chin. J. New Drugs* **2007**, *16*, 1772-1775.
20. Kanakis, C.D.; Tarantilis, P.A.; Tajmir-Riahi, H.A.; Polissiou, M.G. Crocetin, dimethylcrocetin, and safranal bind human serum albumin: stability and antioxidative properties. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 970-977. DOI: [10.1021/jf062638l](https://doi.org/10.1021/jf062638l)
21. Wang, S.L.; Huang, D.; Yang, F.Y.; Huang, W. Absorption and transport of crocetin in Caco-2 cell model. *Chin. J. Clin. Pharmacol.* **2018**, *34*, 1894-1897. DOI: [10.13699/j.cnki.1001-6821.2018.15.045](https://doi.org/10.13699/j.cnki.1001-6821.2018.15.045)
22. Weyers, W.M.D. Joseph von Gerlach a reminder of one of the pioneers of histochemistry on the occasion of his 200th birthday. *Am. J. Dermatopathol* **2020**, *42*, 731-738. DOI: [10.1097/dad.000000000000173](https://doi.org/10.1097/dad.000000000000173)
23. Dapson, R.W. The history, chemistry and modes of action of carmine and related dyes. *Biotech. Histochem.* **2007**, *82*, 173-187. DOI: [10.1080/10520290701704188](https://doi.org/10.1080/10520290701704188)
24. Harris, M.; Stein, B.K.; Tyman, J.H.P.; Williams, C.M. The structure of the colourant/pigment, carmine derived from carminic acid. *J. Chem. Res.* **2009**, *7*, 407-409. DOI: [10.3184/030823409X460768](https://doi.org/10.3184/030823409X460768)

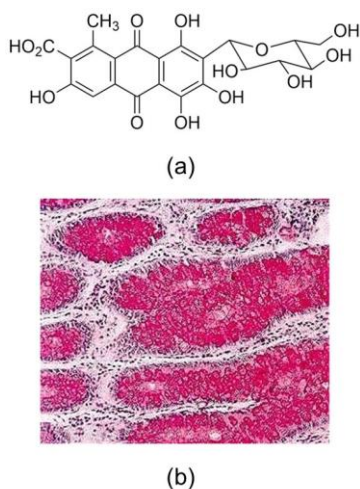


Figura 2. Estructura química del ácido carmínico y tinción celular. (a) ácido carmínico, (b) tinción celular con carmín.^{24,25}

La hematoxilina (1863) fue empleada como colorante nuclear, proviene del extracto vegetal de la planta palo de Campeche, fue modificada para mejorar su eficiencia mediante su oxidación a hemateína y mezclados con una sal metálica (Figura 3).²⁶ Es un colorante básico, interactúa con los componentes celulares de carga negativa, como los son los ácidos nucleicos.²⁷

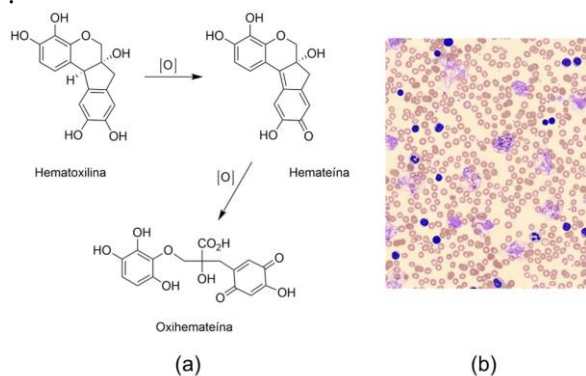


Figura 3. Estructura química de la hematoxilina y tinción celular. (a) oxidación de la hematoxilina a hemateína, (b) tinción celular con hematoxilina.^{26,28}

En 1879 Paul Erlich mejoró notablemente el estudio microscópico de las células sanguíneas desarrollando técnicas de tinción para distinguir sus características.²⁹ Empleó colorantes ácidos y básicos derivados de la anilina, tiñó los gránulos citoplasmáticos, que son distintivos de los glóbulos blancos.³⁰ Los derivados de la anilina están constituidos por un cromóforo de anillos bencénicos de alta densidad electrónica, además de la acción de los auxocromos como lo son los grupos amino que alteran los valores de las longitudes de onda en las que absorben la luz, generando un color. El verde de metilo y naranja G (Figura 4) son derivados de la anilina utilizados por Erlich, son colorantes catiónico y aniónico respectivamente, presentando afinidad por las cargas de las moléculas celulares.²⁷

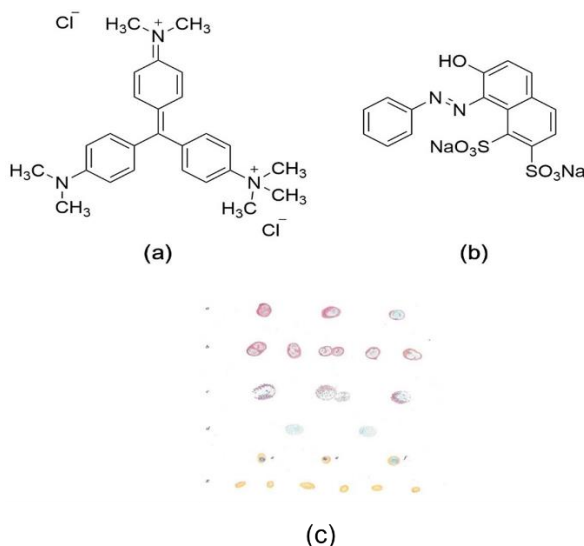


Figura 4. Estructura química de los colorantes usados por Erlich. (a) verde de metilo; (b) naranja G y (c) tinción celular con técnica de Erlich.^{30,31}

Otros colorantes derivados de la anilina son el tipo Romanowsky, constan de un colorante de azul de metileno y sus productos de oxidación (azul B) y la eosina Y.³²

Las tinciones tipo Romanowsky son: Wright, Giemsa, May Grunwald, Jenner, Nocht y Leishman. Todas estas tinciones tienen como base la mezcla del azul de metileno, tiazina y eosina. La tiazina es azul B según Giemsa, el cual se puede obtener por oxidación del mismo azul de metileno, el componente eosina por lo

25. Ellis, R. Gallery of histological section. IMVS Division of Pathology. The Queen Elizabeth Hospital. Disponible en línea en: <https://www.ihcworld.com/royellis/gallery/mucicar.htm> (acceso 2, noviembre, 2023)
26. Titford, M. The long history of hematoxylin. *Biotech. Histochem.* **2005**, *80*, 73-78. DOI: [10.1080/10520290500138372](https://doi.org/10.1080/10520290500138372)
27. Corrales-Ramírez, L.C.; Caycedo-Lozano, L. Principios fisicoquímicos de los colorantes utilizados en microbiología. *NOVA* **2020**, *8*, 73-100. DOI: [10.22490/24629448.3701](https://doi.org/10.22490/24629448.3701)
28. Leukostasis in Chronic Lymphocytic Leukemia, Scientific Figure on ResearchGate. Disponible en línea: https://www.researchgate.net/figure/Hematoxylin-eosin-stained-peripheral-blood-film-showing-many-small-and-large_fig1_342691154 (acceso 1 noviembre 2023)

29. Rodak, F.B. Morfología y Función de los componentes Celulares y Examen de Extendidos de Sangre Periférica. *Hematología Fundamentos y Aplicaciones Clínicas*, 2ª edición.; Editorial Médica Panamericana: Buenos Aires, Argentina, 2010; pp 57.
30. Kay, A.B. Paul Ehrlich and the early history of granulocytes. *Microbiol. Spectrum* **2016**, *4*, 1-13. DOI: [10.1128/microbiolspec.MCHD-0032-2016](https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MCHD-0032-2016)
31. Kay, A.B. The early history of the eosinophil. *Clinical & Experimental Allergy* **2015**, *45*, 575-582. DOI: [10.1111/cea.12480](https://doi.org/10.1111/cea.12480)
32. Marshall, P.N. Romanowsky-type stains in haematology. *Histochem. J.* **1978**, *10*, 1-29. DOI: [10.1007/bf01003411](https://doi.org/10.1007/bf01003411)



regular es eosina Y.³³ Estas interactúan con la estructura catiónica plana y las sialiladas de la membrana del glóbulo rojo, en las regiones hidrofílicas y el glucocálix, con capacidad de disolverse en lípidos. La formación de especies neutras de quinoneimina presenta mayor distribución intracelular, por tal motivo el azul de metileno tiñe los eritrocitos de color azul verdoso.³⁴ El color púrpura de los núcleos, se da gracias a la interacción molecular entre la eosina y el complejo azul B-ADN.³³ Las propiedades de este tipo de tinciones dependen del número de enlaces de los colorantes con las estructuras químicas de la célula, así como de las interacciones del azul B y la eosina Y (Figura 5).

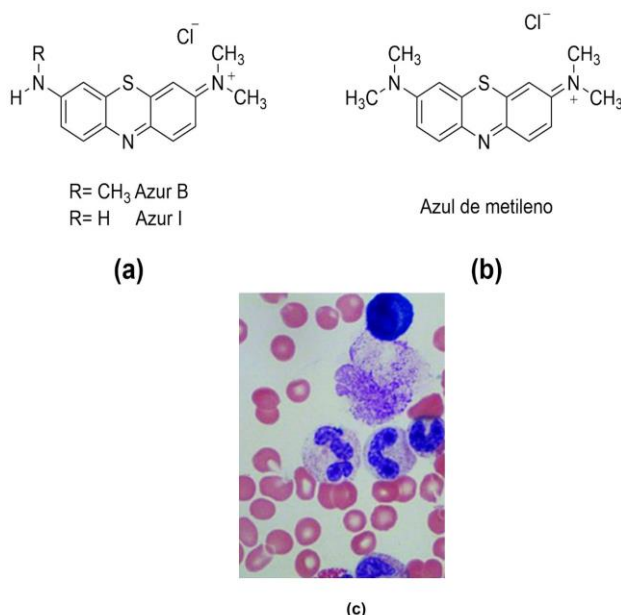


Figura 5. Estructura química de los derivados de anilina tipo Romanowsky. (a) azul B, azul I, (b) azul de metileno. (c) Tinción celular por técnica de Romanowsky.^{35,36}

En la tinción de Wright se utiliza el colorante azul de metileno, en un proceso de oxidación lenta dando origen a los policromos. La oxidación del azul de metileno ocurre en los grupos metilos, los cuales son eliminados sucesivamente y de esta manera se producen derivados metilados de los grupos amino primarios de la tionina, los cuales han sido considerados por Wright y Kehermann.³⁵

La composición del colorante de Giemsa consta del azul B (cloruro de 3-metilamino-7-dimetilaminofenazonio) y eosina unidos, los cuales van a actuar a nivel de la cromatina, dando un color rojo al núcleo mientras que el citoplasma toma el color azul, gracias a que el azul I se une a los radicales fosfatos del ADN celular. Según Wittekind el colorante azul B es obtenido a partir del azul I.³⁵

La tinción de May-Grünwald es una mezcla de eosina ácida y azul de metileno, que químicamente se transforma en eosinato de azul de metileno (catiónico), los azules y la eosina ácida (aniónico),³⁷ siguiendo el mismo fundamento que los colorantes usados en Giemsa (Figura 6).²⁷

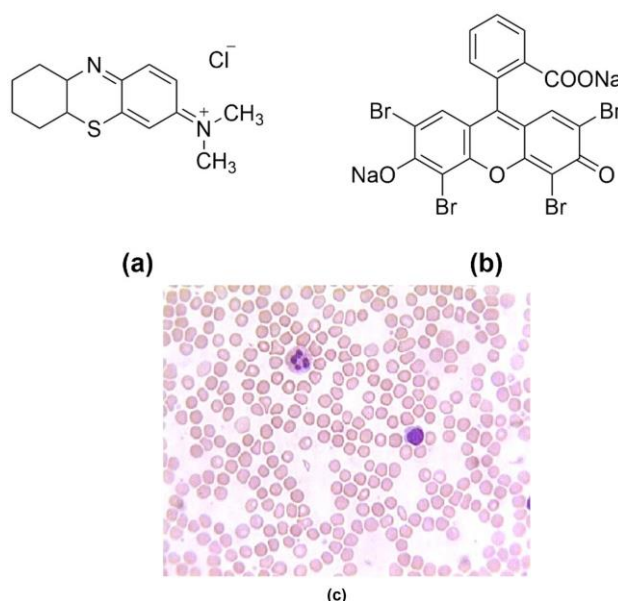


Figura 6. Estructura química de los colorantes usados en Giemsa y la tinción celular. (a) Cloruro de metionina, (b) Eosina (eosinato), y (c) tinción celular por técnica de Giemsa.^{27,38}

La tinción de Leishman está compuesta por azul de metileno con metanol, una mezcla de alcohol y glicerol como disolventes de los colorantes, en ocasiones se sustituye por el DMSO (dimetilsulfóxido) debido a su estabilidad en soluciones acuosas. Su composición química es el azul B (trimetilitionina), producto oxidativo del azul de metileno,³⁹ además puede contener derivados catiónicos de tiazina: azul de metileno, azul A y en ocasiones violeta.⁴⁰

33. Wittekind, D.H. On the nature of Romanowsky-Giemsa staining and its significance for cytochemistry and histochemistry: an overall view. *J. Chemother* **1983**, 15, 1029-1047. DOI: 10.1007/BF01002498

34. Wainwright, M., Crossley, K. B. Methylene blue a therapeutic dye for all seasons. *J. Chemother* **2002**, 14, 431-443. DOI: 10.1179/joc.2002.14.5.431

35. Perea-Sasiain, J. Cien años del colorante de Giemsa. *Biomedica* **2003**, 23, 5-18. DOI: 10.7705/biomedica.v23i1.1193

36. PDGFR^β-Rearranged Myeloid Neoplasm with Marked Eosinophilia in a 37-Year-Old Man; And a Literature Review - Scientific Figure on ResearchGate. Disponible en línea: https://www.researchgate.net/figure/Wrights-stain-of-peripheral-blood-cells-shows-increased-eosinophil-A-and-marked_fig1_313819793 (acceso 2, noviembre 2023)

37. Tinción de May Grünwald-Giemsa ¡Pipetealo! Disponible en línea: <https://pipetealo.wordpress.com/2016/12/11/tincion-de-may-grunwald-giemsa/> (acceso 4, septiembre, 2023)

38. Hamghalam, M.; Ayatollahi, A. Automatic counting of leukocytes in Giemsa-stained images of peripheral blood smear. *2009 International Conference on Digital Image Processing* **2009**, 13-16. DOI: 10.1109/ICDIP.2009.9

39. Fasakin, K.; Okogun, G.R.A. Tinción de Leishman modificada: el misterio se revela. *Brit. Med. J.* **2014**, 4, 4591-4606. DOI: 10.9734/bjmmr/2014/10855

40. Lyon, H.O.; De-Leenheer, A.P. Standardization of reagents and methods used in cytological and histological practice with emphasis on dyes, stains and chromogenic reagents. *Histochem. J.* **1994**, 26, 533-544. DOI:10.1007/BF00158587



Una de las tinciones más actuales es el método de tinción rápida conocida como Field, la cual se introdujo para proporcionar un método rápido de tinción en las extensiones hematológicas de gota fina. Ésta se fundamenta en los principios de la tinción tipo Romanowsky, teniendo como base el azul de metileno policromo y la eosina, se prepara con fosfato disódico dodecahidratado y fosfato monopotásico para policromar, uniéndose así a las moléculas de ARN del citoplasma de los glóbulos blancos.⁴¹

Conclusión

Las tinciones hematológicas y sus modificaciones a través del avance químico, el entendimiento de las interacciones moleculares entre los colorantes y las estructuras celulares son herramientas que han impactado significativamente en el desarrollo de diferentes áreas como lo son enseñanza, diagnóstico e investigación médica. Actualmente, se continúa en la búsqueda de nuevas estrategias con una perspectiva de mejora en tiempos, costo y selectividad de los procesos de tinción usados en el área de Hematología.

Esta publicación llega a ti gracias a los amables donativos de:



División Latinoamérica
www.buchi.com



Consultoría analítica, regulatoria e industrial
<https://grupoidaii.com>



Dra. Berenice Rivera Ramirez
cardiólogo pediatra Ecocardiografista
draberenicerivera.com

41. Bain, B.J.; Bates, I. Métodos de preparación y tinción de las extensiones sanguíneas y de la médula ósea. *Hematología Práctica*, 12ª ed.; Elsevier: Barcelona España, 2018; pp 53-55