

Campo Oscuro

Microscopía Aplicada para la Evaluación Nutricional
y Corrección con Suplementos



Microscopía Nutricional para la Consultoría y Evaluación de la Salud,
Utilizando Microscopía de Sangre en Vivo

Manual de Referencia e Instrucción

Dr. Héctor E. Solórzano, M.D., D.Sc.
Prim. M. en C. M. Dr. Jaroslava Chocan-Somborac

*“El médico del futuro no prescribirá medicamentos, sino que
interesará a sus pacientes en el cuidado del marco humano, en cuanto a la
alimentación y en la causa y la prevención de la enfermedad.”*

Thomas Edison

Microscopía de Campo Oscuro - Una visión Microscópica de Células en Vivo

Daniel S. Lee

“El estudio de la estructura, los movimientos y el comportamiento de las células en vivo, bajo variadas condiciones experimentales, debiera ser una de las técnicas fundamentales de la citología de la sangre. Y sin embargo, esta forma de examinar a las células ha sido reemplazada por la evaluación de células teñidas de un frotis; un hecho que es explicado por el uso común de este método para el diagnóstico y el control del tratamiento. Afortunadamente y sin embargo, hoy en día, los hematólogos se están enfocando cada vez más hacia técnicas de la citología general. De estas técnicas, la del examen de células vivas es una de las más importantes, particularmente desde el descubrimiento de nuevos principios de microscopía (e.g. contraste de fase y contraste de interferencia)...” (5)

Vamos a explicar qué es lo que ha sido llamado en varias formas como “análisis de sangre en vivo”, “microscopía de campo oscuro”, “microscopía de contraste de fase”, “monitoreo de células en vivo”, o algunos de estos nombres. No es más que tomar una gota de sangre del dedo, colocarla en un portaobjetos cubierto, deslizarlo debajo de un microscopio y efectuar las observaciones. ¿Qué es lo que puede ser visto o detectado? Muchas cosas - y todas estas cosas se encuentran en los libros de texto.

Primero, nos gustaría mencionar que uno de los aspectos más importantes del microscopio se encuentra en el poder de la imagen, y más específicamente, de permitir al cliente/paciente ver la imagen de su propia sangre. Ver su propia sangre en vivo, ante sus ojos es una confirmación de los procesos de vida dinámicos que se llevan a cabo dentro de su interior y una comprensión de que las elecciones que ellos hacen tienen un impacto sobre el fluido corporal de mayor importancia, su sangre. Muchas personas, tras haber presenciado una sesión de monitoreo de sangre en vivo se van comprendiendo en un nivel central, el rol directivo que tienen sobre su propia salud, así como la responsabilidad que les pertenece, para obtenerla. En manos de un técnico/clínico experto que entiende el poder en esa imagen y su habilidad para llegar a niveles más profundos del pensamiento consciente e inconsciente, la esperanza puede ser más fácilmente proporcionada a cualquiera que desee obtener un mejor “panorama” de su propia salud.

Esto es sumamente poderoso, ya que si el paciente no cuenta con esta esperanza, se encuentra a medio camino de verse hundido, y debe aclararse que esta no es una falsa esperanza, ya que los milagros pueden suceder y suceden cuando la acción apropiada se lleva a cabo.

La microscopía de sangre en vivo es sólo una herramienta, pero en las manos de un técnico/clínico experto, esta herramienta puede ser una tan poderosa como para proporcionar los contenidos internos de los diferentes niveles de balance dentro de la persona. Más adelante, nos referiremos a textos que tratan más específicamente con el microscopio en sí, pero por el momento, veamos en forma breve algunos de los conceptos, todos ellos apoyados y validados, a través de libros de enfoque médico. La clave es conectar los puntos entre la teoría, los conceptos y la aplicación.

Es cierto que la energía de vida y salud de una persona se evidencian en las gotas de su sangre. El utilizar microscopios con video de alta definición para evaluar las formas y otras propiedades de las células sanguíneas individuales puede ser muy revelador. A menudo, se

identifican cosas que nunca se ven con los métodos tradicionales de monitoreo de la sangre. En sí mismo, el monitoreo de las células sanguíneas en vivo no es un procedimiento diagnóstico.

Sin embargo, con frecuencia, puede indicarle en qué dirección llevar a cabo subsecuentes pruebas de diagnóstico. Para nuestros fines, sólo queremos un panorama del “terreno” de la sangre, para obtener una idea del panorama global de la “carga tóxica” y el estado consecuente de salud de nuestro cliente/paciente.

Al observar con atención al microscopio y al ver la sangre en vivo, vemos "causa y efecto". Cuando usted no se está sintiendo bien, su sangre no se ve bien. A menudo, entre peor se siente, peor se ve. Cuando usted se recupera, también así su sangre se ve mejorada. Hay una correlación simple. Haga que su sangre se vea mejor y usted se sentirá mejor. Limpie su sangre, limpie su salud.

Pero hay algo más en juego. Cuando se siente mejor, también su actitud es mejor. Su estado de salud mental está alineado muy de cerca con el estado de su salud física. Cambie su salud física e impactará su salud mental. Lo contrario también es cierto; cambie su salud mental, y cambiará su salud física. ¿En dónde se ve esto reflejado? En la sangre.

Cambie su sangre, y cambiará su consciencia.

Cambie su consciencia, y cambiará su sangre.

Nuestra sangre sostiene elementos -la huella vibracional- de quienes somos. Contiene la firma de nuestra alma. Como dice la Biblia: “La Vida está en la Sangre”. Hay muchas historias que correlacionan estas verdades.

Introducción - Examen de Campo Oscuro

La microscopía de campo oscuro ha estado en uso por un largo tiempo ya, y fue una forma muy importante para ver especímenes vivos bajo condiciones microscópicas, desde hace ya más de 100 años. Esencialmente, los especímenes son vistos sobre un campo oscuro o un fondo negro, y la luz es proyectada con un cierto ángulo desde los lados. Así, partículas invisibles son iluminadas contra el fondo oscuro.

Para antecedentes históricos, existe un número de textos, y vasta literatura que la mente curiosa puede consultar para realizar una mayor investigación en esta área. Algunos se encuentran fuera de impresión y serán difíciles de encontrar. Estos libros son:

- La Ciclogenia de la Bacteria, por Gunther Enderlein
- Introducción a los Diagnósticos en Campo Oscuro, por Cornelia Schwerdtle y Franz Arnoul
- Examen de Sangre en Campo Oscuro, por Maria Bleker
- Asesinos Ocultos, por Eric Enby, Peter Gosch y Michael Sheehan
- Guerreros del Campo Oscuro, por Greg Fredericks

¿Qué Es Exactamente Un Microscopio De “Campo Oscuro”?

Un microscopio de campo oscuro es sencillamente un microscopio estándar de laboratorio, en el que ciertas técnicas ópticas son utilizadas para transformar la forma en la cual la luz pasa a través del espécimen que se observa. Por ejemplo, digamos que estamos viendo sangre en

vivo en un portaobjetos de vidrio. El modo normal de un microscopio se llama de “campo luminoso”. En este modo de visión, la luz brilla directamente sobre el objeto. Cuando la luz brilla directamente sobre el objeto, los objetos transparentes son invisibles. Es como si usted estuviera parado a un lado de una ventana soleada, viendo a través del polvo. Si hubiera una pared blanca entre usted y el polvo, no vería nunca el polvo, ya que es transparente, cuando se trata de ver en contra de la pared blanca. Sin embargo, si colocara una cortina negra, en el lugar de la pared blanca, de repente, el polvo aparecería en su visión. El microscopio de campo oscuro hace lo mismo. El objeto se encuentra sobre un fondo oscuro (o campo), y la luz es proyectada con un ángulo sobre el objeto, desde los lados. Las cosas que antes eran invisibles se tornan visibles.

La iluminación del campo oscuro facilita el examen de películas de sangre húmeda y proporciona una imagen más precisa que el microscopio estándar de campo luminoso. Los leucocitos son vistos rápidamente, debido a las propiedades refractarias de sus gránulos, las pequeñas plaquetas son vistas claramente, el movimiento amiboideo de las células es visible, y los eritrocitos también pueden ser identificados fácilmente debido a que sus membranas celulares son altamente refractarias. El material quiloso (quilomicrones) es visto rápidamente como manchas blancas que pudieran ser comparadas con un efecto de “tormenta de nieve”. Los parásitos, tales como la malaria, pueden ser vistos debido a un pigmento refractario. Sin embargo, poco más que los gránulos de las células puede ser identificado. La microscopía de contraste de fase, por otro lado, intensifica diferencias relativamente diminutas en densidad óptica y le permite a uno ver los detalles íntimos de las células y de las estructuras citoplásmicas. La cromatina del núcleo, la mitocondria, el centrosoma, y los gránulos específicos del citoplasma son todos claramente visibles en la célula sin teñir y sin dañar, en vivo. Las plaquetas son vistas tan nítidamente con el contraste de fase que pueden ser contadas directamente en una cámara especial de conteo (22).

Introducción - El Microscopio de Contraste de Fase

El método por contraste de fase en la microscopía fue inventado por el físico holandés Fritz Zernike, quien obtuvo el Premio Nobel en 1953. Es interesante saber que el contraste de fase no fue descubierto durante sus trabajos con un microscopio, sino cuando trabajaba en una parte diferente de la óptica. Para un físico interesado en la óptica, no resultó ser un gran paso el cambiar de esta materia al microscopio (26, 15). Utilizado originalmente por su inventor para inspeccionar los espejos de los telescopios, la técnica por contraste de fase fue aplicada a la microscopía poco después. El trabajo inicial de Zernike, fue primero demostrado en 1935, pero el desarrollo efectivo de la microscopía por contraste de fase no fue antes de 1946 (15,16).

El microscopio de contraste de fase es un aparato que presenta diferencias en los índices de refracción entre las regiones de un objeto, observadas como diferencias en intensidad. Más precisamente, las diferencias en las vías ópticas son convertidas en diferencias en intensidad. El microscopio de contraste de fase es, por tanto, un medio para producir contraste en objetos sin teñir (e.g., en donde las diferencias en la absorción entre las regiones del objeto son insignificantes). En algunas aplicaciones, el instrumento puede ser utilizado para evaluar diferencias cuantitativas en las vías ópticas, pero su principal función es cualitativa. Un microscopio de contraste de fase ajustado adecuadamente puede ser utilizado para observar contraste en el objeto, por cualquiera que esté familiarizado con los procedimientos empleados en la microscopía de campo luminoso normal (25,20).

La microscopía de contraste de fase depende de dos principios ópticos: (1) las ondas luminosas fuera de fase se cancelan entre sí, de manera total o parcial, dependiendo de si son de la misma o de una amplitud diferente, y (2) la velocidad de la luz que pasa a través de una sustancia varía según el índice de refracción de la sustancia. Las principales características de un microscopio de contraste de fase son las siguientes: En vez del condensador Abbe normal, utilizado en los microscopios estándares, existe un condensador de fase especial, que contiene un diafragma anular, localizado por debajo del lente inferior, el cual, sólo transmite luz alrededor del ánulo de la circunferencia, y el centro queda bloqueado y oscuro. Los objetivos de fase también son diferentes; un anillo de película fina es aplicado en la parte trasera del plano focal, ya sea en un disco por separado o directamente sobre la superficie del lente posterior. Esta película actúa como una rejilla de difracción, la luz que la atraviesa es sacada fuera de fase. Cuando se observa el sistema óptico de fase, a través de la pieza especial de centrado ocular, la película anular de cambio de fase del objetivo aparece negra, en tanto que la imagen del ánulo del condensador es brillante. Cuando los dos anillos se encuentran en una posición exactamente concéntrica y están sobrepuestos, el sistema óptico es tal, que los rayos de luz son ligeramente difractados al atravesar el objeto, y se encuentran fuera de fase en $1/4$ de longitud de onda de los rayos que se encuentran más difractados, los cuales pasan principalmente a través del centro del objetivo. Esa porción del objeto que es un mayor impedimento a las ondas luminosas, debido a un mayor espesor de difracción es visto como una estructura oscura en contra de un fondo más claro, obtenido por las áreas que difractan las ondas de luz en menor medida. Las diferencias, por ello, resultan marcadamente acentuadas. Las estructuras invisibles para la microscopía estándar, debido a que poco difieren de las áreas adyacentes en cuanto a refracción, en esta forma se convierten en claramente delimitadas. En la microscopía estándar, se usan tinciones diferenciales para obtener dichas estructuras, pero al costo de matar a las células y someter a sus componentes a daños químicos severos. Con la microscopía de contraste de fase, por otro lado, la célula viviente y sin distorsión puede ser examinada. La experiencia de ver células vivas y distinguir sus detalles mínimos estructurales es algo excitante (22).

Las tres propiedades, aumento, poder de resolución y contraste, son a menudo llamadas, las piedras angulares de la microscopía. Dicken's Sam Weller (The Picwick Papers) comentó: "Sí, tengo un par de ojos... y eso es todo. Si fueran un par de microscopios de patente de doble misión y aumento por gas de alto poder, tal vez sería capaz de ver a través de las escaleras y de una puerta cerrada...". Para el hombre común, los microscopios equivalen al aumento del tamaño; sin embargo, el aumento resulta ser el parámetro menos importante de estos tres, es sencillamente, aumentar el detalle, con suficiente resolución para el último receptor del sistema óptico - el ojo humano. El microscopio sirve principalmente para dar resolución a detalles más finos en el objeto, para que puedan ser percibidos a la distancia más cercana de una visión distinta, o del punto más cercano, del ojo. El segundo requerimiento es que la resolución del detalle debe ser visible. El contraste del objeto y/o el sistema óptico deben ser optimizados para facilitar la visión y extraer la información del detalle inherente al objeto que se estudia (24).

La microscopía convencional se basa en las diferencias en el color o en las diferencias en la absorción para producir el contraste necesario y puedan ser detectadas por el ojo. Muchos especímenes biológicos, tales como los componentes de las células vivas, no cambian la amplitud de la luz que pasa a través de ellos, pero sí cambian la fase de las ondas de luz. Ya que el ojo no es sensible a los cambios de fase, esto no hace visible al objeto. El propósito del método por contraste de fase es convertir estos cambios de fase en cambios de amplitud, que son visibles (16).

Debemos enfrentar el hecho de que el microscopio convencional deja mucho que desear. En un campo en particular, principalmente en la evaluación de material vivo, ha manifestado varias desventajas. La materia viva es, como regla, más o menos transparente. Sus constituyentes esenciales, el citoplasma y el resto, están dispersos en agua y tienen un índice de refracción, sólo marginalmente diferente del medio acuoso que rodea a la célula. Como resultado, los rayos de luz transmitidos por el objeto no son refractados materialmente de su curso, y sólo imágenes muy débiles se forman. Los efectos visuales del contraste de fase son muy útiles: incluso, una alteración muy sutil en el brillo de la imagen observada, y estructuras pequeñas (virtualmente invisibles) pueden ser claramente diferenciadas (14).

Investigación Científica

La investigación puede ser definida como la búsqueda organizada para obtener un nuevo conocimiento. Es el proceso activo de la ciencia, "conocer". Este proceso tiene varias características importantes. La investigación busca la objetividad, es pública, acumulativa y es ética.

La investigación científica generalmente cae en una de dos categorías: básica y aplicada. La investigación básica estudia la naturaleza tal como existe; la investigación aplicada estudia la intervención humana en los procesos naturales. Así, el investigar la relación entre la autoeficacia percibida y la frecuencia de comportamientos en un trastorno alimenticio, sería una investigación básica. El evaluar la efectividad de un programa para mejorar la autoeficacia entre los individuos con desórdenes en la alimentación es una investigación aplicada. Ya que la salud es, por definición, una disciplina aplicada, gran parte de la investigación en el campo de la salud resulta ser, aplicada más que básica. La efectividad de las pruebas diagnósticas; el resultado de un tratamiento en particular; el éxito de las intervenciones diseñadas para afectar el conocimiento, las actitudes o los comportamientos; todos ellos temas comunes de investigación aplicada en el área de la salud general.

Los filósofos de la ciencia sugieren que el propósito de la investigación, sea básica o aplicada, es de dos vías. Primera, la investigación intenta descubrir patrones o relaciones en los eventos. Por ejemplo, un investigador podrá encontrar que un conjunto de síntomas está asociado con la presencia de un virus en particular, o que un cierto conjunto de cambios de situación vital estresantes conduce a un mayor riesgo de enfermedad. A veces, estas relaciones pueden ser cuantificadas y ser declaradas como "leyes científicas". A menudo, son más cualitativas y menos precisas. En cualquiera de los casos, sin embargo, la identificación de dichos patrones hace a la naturaleza algo más predecible para el científico. Esta predictibilidad es importante, si las intervenciones pueden extenderse al control humano sobre los procesos naturales que aún restan por descubrirse. El reconocimiento de que un cierto estilo de vida produce un conjunto estable de síntomas, por ejemplo, puede ser un importante primer paso descubrir un proceso de cambio que corrija esas condiciones así como los síntomas relacionados.

Aplicación de la Información de la Investigación

Es interesante saber que cuando Zernike descubrió el principio detrás del contraste de fase, la compañía Zeiss inicialmente no tuvo interés en su aplicación. Ellos se habían formado bajo la creencia de que todo lo valioso del conocimiento o lo que pudiera intentarse en el campo de la microscopía ya había sido alcanzado (5).

La aplicación del conocimiento o de puntos de vista divergentes en el conocimiento toma muchas avenidas diferentes en cuanto al enfoque. El principal motivador, sin embargo, se origina en los conceptos comunes de la mercadotecnia. Si tiene alguna aplicación, si la gente puede quedar convencida y estar segura de su aplicación, y si además encuentra cierta economía en ello. Esto es, si la energía o el gasto involucrado garantizan la inversión de cambiar sus mentes y hacer uso de los nuevos descubrimientos. Esta es una declaración simplificada, de lo que es más bien, un proceso complejo de “llevar un producto al mercado”.

El microscopio de contraste de fase es un instrumento que es ampliamente utilizado en el proceso científico del análisis celular. Es en todo sentido, no el único ni el instrumento definitivo utilizado para las determinaciones finales en muchos de los procesos de investigación, pero es un adjunto en las investigaciones en un amplio campo de observaciones celulares. La investigación está repleta del uso del microscopio de contraste de fase en células vivas, en los análisis de tinción y en las investigaciones a nivel celular.

En este punto, es importante entender la diferencia entre la aplicación de la ciencia en el diagnóstico para el tratamiento, a través de métodos convencionales y la aplicación de los medios científicos para efectuar un cambio en el estilo de vida personal. Un médico puede prescribir un medicamento como resultado de un diagnóstico de una anomalía, pero el paciente aún debe decidir tomar el medicamento. De igual forma, el médico puede ser capaz de sugerir al paciente sobre cambios necesarios en su estilo de vida para una mejor salud, pero el cliente/paciente deberá tomar los pasos que lo guiarán hacia una mejor salud. En cualquiera de los enfoques, el paciente o cliente deberá estar convencido de que cualquiera que sea la acción recomendada, ésta lo conducirá hacia una mejor salud. Este es de hecho, un enfoque de mercadotecnia. Deberá existir credibilidad, confiabilidad y aceptación con una resolución del paciente para seguir el tratamiento.

El microscopio de contraste de fase es usado efectivamente en el laboratorio como un enfoque científico para la investigación. Pero ¿cómo es que esta herramienta puede ser utilizada en forma efectiva como una demostración científica válida, al ver la sangre en vivo, de tal forma que ayude a la gente en su deseo de cambiar su estilo de vida para tener una mejor salud? Para contestar esta pregunta, la siguiente información le ayudará al mostrar la correlación que hay entre la investigación realizada en el análisis de las células con el microscopio de contraste de fase y cómo la forma de las células puede ser vívidamente distinguida y observada en un marco científico.

Diferenciación De Células Sanguíneas

El mecanismo por el cual sucede la diferenciación de una célula raíz para transformarse ya sea en una célula roja, una blanca o en una plaqueta no ha sido determinado en forma concluyente. No es necesario decirlo, los problemas que plantea esta pregunta se encuentran entre los más importantes en hematología. Cuando los primeros cultivos de la médula ósea fueron hechos, había una gran esperanza de que al manipular el ambiente, lo cual es relativamente fácil de llevar a cabo in "vitro", podríamos conocer no sólo las razones de dicha diferenciación, sino también conocer las respuestas relacionadas con el origen de las líneas de células sanguíneas diferenciadas (5).

El diagnóstico de discrasias hematológicas (enfermedad) es ulteriormente resuelto por la identificación microscópica y la caracterización de las células de la sangre y de la médula ósea. A menudo, la delineación entre la morfología de una célula normal y una patológica depende de diminutas alteraciones en la morfología celular. La relativa facilidad de visualización

proporcionada por el microscopio de contraste de fase para el estudio de células vivas ha motivado a muchos laboratorios a utilizar esta técnica como un adjunto en el diagnóstico de discrasias hematológicas (1).

El microscopio de escaneo de electrones tiene una resolución de 200 Å, o 10 veces mayor poder que el microscopio de luz. Además, tiene una gran profundidad de foco y presenta una vista tridimensional de las células rojas. Estas características han hecho posible delinear dos prototipos de células espiculadas, de manera clara e inequívoca: acantocitos y equinocitos. Una vez que los detalles de la morfología del equinocito y del acantocito, así como de otras formas, como se ven en el microscopio de escaneo de electrones, son apreciados, los diferentes tipos de células espiculadas pueden usualmente ser distinguidos en frotis ordinarios (8). Como un ejemplo del uso del microscopio de fase, en la observación de equinocitos en ocho pacientes, después de la observación de células rojas espiculadas en los frotis, una cuidadosa confirmación de equinocitosis fue hecha por la observación de células rojas frescas con la microscopía de contraste de fase y después la microscopía de electrones (MEE), después de su fijación. En todos los casos, la confirmación de la presencia de células rojas anormales fue hecha primero por un cuidadoso examen de la sangre en preparaciones húmedas observadas en el de contraste de fase y después en el (MEE). También se observó, en los mismos experimentos, que el glutaraldehído, el cual fijaba las células rojas preparadas para el MEE eran mucho menos espiculadas que las células rojas frescas. En otras palabras, el proceso de preparación y de tinción de la muestra, alteró las células (13).

Existen muchos estudios que confirman que las células rojas diferenciadas pueden ser distinguidas con el microscopio de contraste de fase, y de hecho, se le utiliza en los estudios de investigación morfológica (18, 13, 23, 7, 3, 12). En el libro de Hematología de Williams, Quinta Edición, Tabla 32-2, se representa la nomenclatura de las formas de las células rojas y los estados asociados de enfermedad (7). En el libro de Gradwohl, Métodos y Diagnósticos Clínicos de Laboratorio, Vol. 2, pág. 1768, se menciona: "Wied ha hecho una evaluación comparativa extensa de la microscopía de fase y el rutinario método del Papanicolau. Él concluye que la microscopía de fase es la segunda mejor opción para los exámenes citológicos de rutina. Él cita la posibilidad de un examen microscópico inmediato como la mayor ventaja y sugiere la utilización de la microscopía de fase, como una técnica adicional empleada para la detección del cáncer y para la evaluación hormonal de especímenes ginecológicos (16).

El uso del microscopio de contraste de fase para ver las células blancas de la sangre es tan amplio como para las células rojas. Los estudios involucran los megacariocitos (19), fagocitos mononucleares (9,10,11), el destino del estafilococo dentro de los leucocitos humanos (21), el rol de los neutrófilos en neutrófilos adherentes unidos a las células endoteliales por inducción con citosina (2), y el factor de estimulación de colonias de macrófagos que estimula la supervivencia y el comportamiento quimiotáctico en osteoclastos aislados (17), como sólo una pequeña muestra.

Ventajas del Campo Oscuro y Contraste de Fase para la Demostración Clínica de Sangre en Vivo

Los métodos de las preparaciones de frotis de sangre viva para la observación en microscopio de contraste de fase, deben seguir procedimientos clínicos establecidos para asegurar que la muestra sea clara y esté libre de los artefactos que se encuentran fuera de la muestra de sangre. Las ventajas de observar la sangre en vivo, (muestra húmeda) son: (a) toma menos tiempo preparar la muestra y puede ser observada inmediatamente en un estado vivo, (b) la muestra

húmeda no se ve afectada por la fijación con químicos, tales como el glutaraldehído y con ciertas tinciones (13, 6), (c) La preparación de películas teñidas, en seco, para la evaluación de eritrocitos, introduce numerosas alteraciones morfológicas. Al inicio del frotis, conforme inicia el secado, muchas células nonales son transformadas en equinocitos. Al final del frotis, cerca de todos los eritrocitos, incluyendo los equinocitos, están dispersos y son aplanados por la tensión superficial (6), (d) La transformación de los disocitos-equinocitos, "in vitro", en preparaciones "húmedas" puede ser evitada si aseguramos superficies de vidrio limpias, un adecuado volumen entre el portaobjetos y el cubreobjetos, así como una inmediata inspección del espécimen (6). Debe ser mencionado que en el escenario clínico, en donde la muestra húmeda es vista inmediatamente y las precauciones normales son tomadas, el portaobjetos puede ser preparado sin sellar las orillas del cubreobjetos. Si, en todo caso, el portaobjetos será observado tiempo después, entonces las orillas del cubreobjetos deberán ser selladas con cera, vaselina u otro tipo de gel.

Microscopía de Electrones (ME)

El uso de microscopios de electrones puede permitir el examen de los detalles celulares ultraestructurales, su capacidad de aumento es suficiente para distinguir moléculas individuales. Los análisis con ME pueden revelar información importante en lo relativo a la estructura y función de las células y de los organelos celulares.

Aunque rara vez se requiere para evaluaciones hematológicas de rutina, el ME es una herramienta importante de investigación y puede ser útil en el diagnóstico de enfermedades escasamente diferenciadas.

Los dos tipos básicos de técnicas de ME son por transmisión y escaneo. La técnica de transmisión involucra el uso de electrones de alta velocidad que se enfocan en una sección ultra delgada. Conforme los electrones pasan a través de la sección, diferentes partes de la célula absorben, difractan, o transmiten el rayo de electrones. El rayo de electrones es entonces enfocado por lentes electromagnéticas en una película fotográfica sensible a los electrones. Con el uso de esta técnica, los objetos pueden ser magnificados, tanto como 1 millón de veces. La microscopía de escaneo de electrones (MEE) es una técnica que proporciona una imagen de una superficie con perspectiva que imita la visión estereoscópica normal, pero a un mayor aumento. Un rayo de electrones es reflejado desde una superficie en un patrón difuso; la dispersión de electrones crea imágenes de luz y sombras oscuras que pueden retratar las características de la superficie. El efecto es análogo a la técnica de sombreado, utilizado en las formas de arte, el observador percibe la imagen en tres dimensiones. Esta técnica ha probado su valor como un medio para estudiar las características de la membrana celular, pero su uso es mínimo en el diagnóstico hematológico.

Conclusión

La Clave para la Validación es Conectar los Puntos

Digamos que usted tiene una foto de la sangre que muestra altos niveles de fibrógeno presente (llamados espículas); puede que comience a pensar en razones y proporciones, como la relacionada con las proteínas- albúmina, globulina, fibrinógeno. Es muy probable en este caso, que con altos niveles de fibrinógeno, pueda ver bajos niveles de albúmina concurrentes. Tiene que ser. La correlación; entre más enferma una persona, más baja su albúmina (y más alta

es la presencia de espículas en la sangre). Esto puede darle pauta para que piense en el hígado. El proceso continúa desde ahí y los puntos comienzan a conectarse.

Digamos que observa altos niveles de células rojas aglutinadas, usted sabrá que la persona tendrá una tasa de sedimentación más alta. Comience a unir los puntos.

Digamos que parece ser que existen muchos coacervados (organismos de tipo protoplásmico) en el plasma. Es muy probable que esta persona padezca de algo que está trastornando su balance iónico de mineralización en la sangre. Surgirán aún más preguntas para el paciente para que usted pueda conectar aún más puntos.

Digamos que está observando células blancas neutrofílicas hipersegmentadas. Justo en cualquier texto de hematología, esto se relaciona con deficiencias de B12 y de ácido fólico. Comience a conectar los puntos. Para obtener la B12 de los alimentos, usted debe tener una buena producción de HCL. Si la persona está teniendo problemas de digestión, debido a una hipoclorhidria, puede ser probable que el bicarbonato esté siendo intercambiado por cloruro en los riñones (lo que significa problemas en el equilibrio ácido-base- sí, justo como lo menciona el libro de Fisiología de Guyton). Avance aún más y observe una correlación con los tipos de células rojas llamadas estomatocitos o equinocitos, los cuales son concurrentes con un desequilibrio en el pH celular, en una forma u otra, antes de que se dé cuenta, estará comenzando a armar una imagen de lo que realmente está pasando con este paciente.

Cuando escucho un comentario de un médico como: “Eso del microscopio de campo oscuro son puras tonterías, nada científico”, sé que la persona, o nunca fue a la escuela de medicina, o se durmió en sus clases. Tal vez, sólo estén regurgitando palabras profesionales escuchadas en su clase de ética médica. Estas personas, a menudo, juran ser “sólo científicas”, pero parece que es una ficción conveniente a divulgar y lo que en verdad están diciendo es que dejaron su pensamiento cognitivo junto con su sentido común en casa, o eligieron no abandonar su zona de confort. Una vez que una persona se mete dentro de esa caja, es difícil que escape.

Para otras personas, es difícil admitir que el sudor, el esfuerzo y el tremendo costo de acudir a la escuela de medicina no les brindaron todas las respuestas concebibles en el cuidado de la salud. Pero aprender acerca de la salud no fue el propósito de la escuela de medicina y el mayor error consiste en pensar que fue así. Así que cuando algunos médicos vienen en contra de otro tipo de doctores “alternativos”, con un enfoque diferente en el cuidado de la salud, se pueden dar de toques. Ambas partes piensan que la otra está mal, y así sucesivamente. Pero lo interesante de esto es que hay un puente entre las dos facciones; viene de la anatomía básica, fisiología, bioquímica, y la realidad que nace de los resultados y del entendimiento de que la naturaleza, a menudo, proporciona la cura.

Y éste es realmente el corazón de la validación de este trabajo. El entendimiento de los libros de texto, la aplicación de los propios procesos de la naturaleza al problema, y los resultados obtenidos. Con eso dicho, veamos ahora al microscopio en sí mismo y el proceso del análisis de sangre.

Las siguientes declaraciones del libro de Hematología Clínica, de Wintrobe, novena edición, resume la importancia de un examen cuidadoso de los elementos que conforman la sangre y la aplicación del contraste de fase.

“... un aspecto igualmente importante de la evaluación hematológica es el examen cuidadoso y completo de la morfología celular. La importancia de este procedimiento no puede ser sobreestimado. Probablemente incluso contribuye más al diagnóstico que ninguna otra prueba individual de laboratorio. Casi cualquier enfermedad que afecta los componentes celulares de

la sangre puede ser visualizada en la forma de; o bien, cambios citológicos en la morfología de la célula, o una distribución alterada de los tipos de células” (27).

“La mayor ventaja de las evaluaciones por contraste de fase es la habilidad para evaluar detalles finos en células vivas. El observador puede reconocer y estudiar la cromatina, la mitocondria, el centrosoma, y los gránulos específicos con un alto grado de claridad. En particular, los gránulos de los leucocitos pueden ser definidos más precisamente que en las preparaciones fijas. Los exámenes por contraste de fase son útiles para identificar las inclusiones de células rojas, y otras numerosas partículas intracelulares también. Más aún, las técnicas de contraste de fase son los medios preferidos para enumerar manualmente a las plaquetas. Las diferencias en las membranas del núcleo y nucleolo entre los linfoblastos y los mieloblastos son más aparentes en el análisis microscópico de fase que en los frotis con tinción de Romanovsky”. (27).

La psicología de la educación y la motivación de las personas para la acción es una ciencia y ha sido estudiada dentro de virtualmente todo negocio exitoso. El antes confiable adagio: “Si construyes una mejor trampa para los ratones, la gente construirá una ruta hasta tu puerta”, no resulta válido para nuestra sociedad actual. Hoy, las personas son inundadas de todo tipo de información, de muchas fuentes diferentes, y por muy sofisticados métodos. En consecuencia, se han hecho muy selectivas en cuanto a lo que creen o hacen, en los intentos o acciones que pretenden influir en su proceso de decisión.

Hay una extensa preocupación de que en el futuro, los recursos no estarán disponibles para cuidar de la gente que necesita asistencia médica. ¿Cómo es que entonces algo tan simple como una declaración del Cirujano General, demostrando la relación de la enfermedad con el estilo de vida, y que está directamente relacionada en 8 de cada 10 causas de muerte en los Estados Unidos, no puede ser un foco de extrema importancia y un enfoque poco costoso hacia el mejoramiento de la salud?

Si busca convencer a las personas de que necesitan efectuar un cambio en el estilo de vida que llevan, debe tener en consideración los conceptos básicos de la psicología de la mercadotecnia. Usted debe primero, obtener su atención. El microscopio de contraste de fase utilizado en la demostración de una muestra de sangre in vivo, en el asesoramiento de la salud es tanto un instrumento científico válido, como una herramienta gráfica muy poderosa en el proceso de modificación del comportamiento. El cliente comenzará a entender cómo su estilo de vida puede contribuir con la degeneración celular, así como el papel que la nutrición juega en el estado general de salud del cuerpo.

Referencias

1. Ackerman A, Bellios N: A Study of the Morphology of the Living Cells of Blood and Bone Marrow in Vital Films with Phase Contrast Microscope: II. Blood and Bone Marrow from Various Hematologic Dyscrasias. Blood X,12:1183, 1955.
2. Bargatze RF, et al: Neutrophils Roll on Adherent Neutrophils Bound to Cytokineinduced Endothelial Cells Via L-selectin on The Rolling Cells. Journal of Experimental Medicine 180: 1785, 1994.
3. Bessis M, Weed RI, Leblond PF: Red Cell Shapes. An Illustrated Classification and its Rationale. In Red Cell Shape. New York: Springer- Verlag
4. Bessis M: In Cytology of the Blood and Blood-Forming Organs. Ed. E Ponder. New York: Grune & Stratton. 1956.
5. Bessis M: In Living Blood Cells and Third Ultrastructure. Ed. RI Weed. New York: Springer-Verlag, 1973.

6. Bessis M: The Discocyte-echinocyte Equilibrium of the Normal and Pathologic Red Cell. *Blood* 36,3:399.
7. Beutler E, M.D., et al: Morphology of the Erythron. In Williams Hematology, Fifth Edition. New York: McGraw-Hill, Inc. 1995.
8. Brecher G, Bessis M: Present Status of Spiculed Red Cells and Their Relationship to the Discocyte-echinocyte Transformation: A Critical Review. *Blood* 40,3:333, 1972.
9. Cohn ZA, Benson B: The Differentiation of Mononuclear Phagocytes - Morphology, Cytochemistry, and Biochemistry. *The Journal of Experimental Medicine* 121:153,1964.
10. Cohn ZA, Benson B: The In Vitro Differentiation of Mononuclear Phagocytes. I. The Influence of Inhibitors and the Results of Autoradiography. *The Journal of Experimental Medicine* 121 :279, 1964.
11. Cohn ZA, Benson B: The In Vitro Differentiation of Mononuclear Phagocytes. II. The Influence of Serum on Granule Formation, Hydrolase Production and Pinocytosis. *The Journal of Experimental Medicine* 121 :835, 1964.
12. Daleke, et al: Erythrocyte Morphology Reflects the Transbilayer Distribution of Incorporated Phospholipids. *Journal of Cell Biology* 108:1376.
13. Feo CJ, Subtil E, Leblond PF: Observation of Echinocytosis in Eight Patients: A Phase Contrast and SEM Study. *British Journal of Haematology*, 40:519, 1978.
14. Ford BJ: Phase Contrast. In *The Optical Microscope Manual*. New York: David & Charles.
15. Francon M: Phase Contrast Microscopy. In *Progress in Microscopy*. New York: Row, Peterson & Co.
16. Frankel S, Stanley R, Sonnenwirth AC: Phase Contrast Microscopy. In *Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis*. Saint Louis: The C. V. Mosby Company, 1963.
17. Fuller K, et al: Macrophage Colony-stimulating Factor Stimulates Survival and Chemotactic Behavior in Isolated Osteoclasts. *Journal of Experimental Medicine* 178:1733,1993.
18. Leblond PF, Lyonnais J, Dlage JM: Erythrocyte Population in Pyruvate Kinase Deficiency Anemia Following Splenectomy. *British Journal of Haematology* 39:55, 1978.
19. Levine RF: Isolation and Characterization of Normal Human Megakaryocytes. *British Journal of Haematology* 45 :487, 1980.
20. Lovrien RE, Anderson RA: Stoichiometry of Wheat Germ Agglutinin as a Morphology Controlling Agent and as a Morphology Protective Agent for the Human Erythrocyte. *J. Cell Biology* 85:534, 1980.
21. Melly MA, Thomison JB, Rogers DE: Fate of Staphylococci Within Human Leukocytes. *The Journal of Experimental Medicine* 112:1121. 1960.
22. Miale J: Phase Contrast Microscopy. In *Laboratory Medicine Hematology*. St. Louis: The C. I. Mosby Co.
23. Mohanuriad KS, et al: Phase Contrast Microscopic Examination of Urinary Erythrocytes to Localise Source of Bleeding: an Overlooked Technique? *J. Clin. Pathol* 46:642, 1993.
24. Sanderson JB: Contrast in Light . Microscopy: An Overview. *Royal Microscopical Society* 29/4:263, 1994.
25. Slayter E: Phase Contrast Microscopy. In *Optical Methods in Biology*. New York: Wiley-Interscience.
26. Zernike F: How I discovered Phase Contrast. *Science* 121:345, 1955.
27. Bessis M. Phase Contrast Microscopy and Electron Microscopy Applied to the Blood Cells. *Blood* 10:272, 1955.