

24: 39



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

CLASIFICACION INMUNOLOGICA DE
LEUCEMIAS LINFOBLASTICAS AGUDAS POR
MEDIO DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A:
QUINTINA GALLEGOS LEYVA

MEXICO, D. F.

1987



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

	Página
I.- INTRODUCCION	2
II.- GENERALIDADES	4
Obtención de anticuerpos monoclonales	12
III.- OBJETIVO	14
IV.- HIPOTESIS	16
V.- DESARROLLO DEL PROBLEMA	
Planteamiento del problema	18
Diseño	19
VI.- RESULTADOS	22
VII.- ANALISIS DE RESULTADOS Y CONTRASTACION DE HIPOTESIS	27
VIII.- DISCUSION	35
IX.- CONCLUSIONES	42
X.- APENDICE	
Material	44
Métodos	46
XI.- BIBLIOGRAFIA	62

I N T R O D U C C I O N

Los trastornos linfoproliferativos se caracterizan por proliferación de células neoplásicas a nivel de la médula ósea, las células anormales circulan en la sangre periférica e infiltran y se multiplican en el bazo, hígado , ganglios linfáticos y otros tejidos.

La leucemia linfoblástica aguda dentro de las neoplasias es una de las causas más frecuentes de mortalidad , en la población infantil de nuestro país.

G E N E R A L I D A D E S

La clasificación inmunológica en las enfermedades linfoproliferativas es de gran utilidad, ya que el pronóstico y tratamiento depende del grado de maduración de la célula afectada.

Las leucemias agudas se caracterizan por una producción anormal de células blásticas, donde la maduración es tá retenida o bloqueada total o parcialmente, por lo que hay un predominio de células inmaduras que infiltran la médula ósea y a través de la sangre periférica otros tejidos. Esta situación dá como resultado una pérdida de la función hematopoyética de la médula ósea, con la subsecuente aparición de anemia, trombocitopenia y granulocitopenia (3,20).

La clasificación morfológica de las leucemias agu das contempla dos grandes grupos: Leucemias linfoblásticas y leucemias mieloblásticas, Virchow probablemente fue el prime ro en clasificar las leucemias desde el punto de vista anató mico en dos formas: Linfáticas y Esplénicas, esta clasificación fue empleada durante mucho tiempo. Para 1930 ya se cono cían las formas morfológicas de la leucemia aguda, descritas por varios investigadores (31). En 1948 Farber y colaboradores señalaron la importancia de una clasificación clínica, - que ofrecía ventaja por ser los inicios de la quimioterapia,

con la cual obtuvieron mejor respuesta en niños con leucemia linfoblástica o indiferenciada, que en aquellos con leucemia de origen granulocítica o monocítica. En 1950 cuando una nueva droga, la mercaptopurina mostró efectividad en el tratamiento de esta enfermedad, se puso de manifiesto la importancia de un diagnóstico citológico (17,24).

En 1958 " The medical Research Council's Working - P. " en Gran Bretaña, planeó su primer esquema terapéutico, - que consistió en la administración simultánea de mercaptopurina y prednisona a un grupo de pacientes leucémicos, en una evaluación posterior se encontró una mejor respuesta en los pacientes jóvenes y en los casos de morfología linfoblástica por lo que en lo sucesivo se han utilizado estos parámetros - en el pronóstico de la enfermedad (15,19).

La leucemia aguda puede ser diagnosticada en muchos de los casos por observación de un frotis de sangre periférica y médula ósea estableciendo morfológicamente y citoquímicamente la estirpe afectada, sin embargo en estudios de concordancia diagnóstica se encontró discrepancia en estos criterios, por lo que algunos años más tarde el grupo cooperativo Francés-Americano-Británico (FAB) , subclasificaron a las leucemias agudas, en linfoblásticas y no linfoblásticas (1,3).

Dentro de las linfoblásticas se citan tres grupos :

L_1 , L_2 Y L_3 .

Las cuales son clasificadas tomando en cuenta sus características morfológicas.

Las no linfoblásticas las clasificaron en :

- M_1 mieloide sin maduración
- M_2 mieloide con maduración
- M_3 promielocítica hipergranular
- M_4 mielomonocítica
- M_5 monocítica
- M_6 eritroleucemia

Para 1980 el grupo cooperativo Francés-Americano-Británico (FAB) examinó cientos de muestras de médula ósea y dieron el pronóstico de la enfermedad, llegando a la conclusión - que la L_3 conocida como tipo Burkitt era la de peor pronóstico encontrando que el 85% de estas correspondieron a la leucemia linfoblástica aguda (LLA) tipo 1 y el 14.4% a la LLA tipo 2 y el 0.8% a la leucemia linfoblástica aguda (LLA) tipo 3 , también se propuso que para diferenciar mejor entre L_1 y L_2 se observaran las siguientes características :

- a) relación núcleo citoplasma
- b) presencia o prominencia de nucleolos
- c) regularidad en el contorno de la membrana nuclear

d) tamaño de la célula.

Con lo que se incrementó la concordancia de criterios de un-63 a 83% . Además se encontró que el 74% de los pacientes con L_1 eran niños, mientras que el 66% de L_2 eran adultos y no observaron diferencias significativas para la incidencia de L_3 , observandose un mejor pronóstico para la L_1 , que para la L_2 y a su vez para la L_3 (4,11) .

Mathé y colaboradores subclasificaron a las leucemias linfoblásticas en :

- 1) Prolinfoblásticas : Los blastos están más indiferenciados que los blastos típicos (nucleolos más prominentes, más cromatina reticular, más citoplasma basófilo, menos relación núcleo citoplasma).
- 2) Macrolinfoblásticas : Los linfoblastos miden más o menos 12 micras de diámetro .
- 3) Microlinfoblásticas : Los linfoblastos miden menos de 12 micras de diámetro .
- 4) Prolinfocítica : Las células leucémicas están menos indiferenciadas que las linfoblásticas (nucleolo menos visible, menos cromatina reticular, menos relación núcleo citoplasma- (18,19) .

Las células leucémicas en la leucemia linfoblásti-

ca aguda (LLA), pueden diferenciarse por marcadores de células B y T y por los resultados de las pruebas con antisueros heterólogos o monoclonales contra células B,T y células nulas. Las células T humanas son reconocidas por su capacidad de formar rosetas con eritrocitos de carnero (EAC) y reaccionan con los antisueros contra los determinantes tempranos de las células T. Las células B humanas son reconocidas por la presencia de inmunoglobulinas sobre la membrana y receptores en la fracción C₃ del complemento. Las células pre-B tienen inmunoglobulinas unidas a la membrana y reaccionan con antisueros contra determinantes tempranos de las células B. Las células nulas carecen de todos los marcadores anteriores de las células T y B y no reaccionan con los antisueros (5,6,7).

Los anticuerpos para estos antígenos pueden ser preparados mediante inmunizaciones en animales del laboratorio. Los antígenos séricos asociados con las leucemias y los antígenos en general pueden ser detectados por radioinmunoanálisis, por fluido citométrico, utilizando anticuerpos monoclonales (para identificar la presencia de antígenos particulares, técnicas de inmunofluorescencia) con anticuerpos preparados en animales del laboratorio (8).

Cuando se empezaron a clasificar las leucemias lin

foblásticas agudas (LLA) los frotis de médula ósea, eran teñidas con tinciones policromatófilas, lo cual fue de muy poca ayuda puesto que mostraban un bajo porcentaje de granulos azurófilos o primarios, estos granulos se encontraban ocasionalmente en los mielobláastos como bastones de aver.

Además de existir las diversas pruebas citoquímicas como son Peroxidasa y Sudán negro B, las cuales resultan negativas. La tinción de PAS era positiva en algunas ocasiones, mientras que la fosfatasa ácida muestra positividad en las células de desordenes linfoproliferativos de acuerdo a la naturaleza de las células B o T , siendo positiva para las de tipo T (9,16, 30).

ANTICUERPOS MONOCLONALES

A manera de definición se puede decir que los anticuerpos monoclonales son aquellas moléculas sintetizadas por células inmunocompetentes como consecuencia de la estimulación antigénica y posee una especificidad para reaccionar o unirse al antígeno (26).

Los llamados anticuerpos monoclonales surgieron casi accidentalmente en el laboratorio de César Milstein en Cambridge Inglaterra, cuando realizaban estudios sobre la genética de las inmunoglobulinas, utilizando técnicas de fusión-

y clonaje celular (12,13,26).

Técnicas de obtención de Anticuerpos Monoclonales

La creación de técnicas para la producción de anticuerpos monoclonales por parte de Kohler y Milstein, ha revolucionado el criterio serológico para el análisis de los antígenos presentes en la membrana de las células cancerosas. Con dicha técnica los linfocitos de bazo pueden immortalizarse, por fusión con una línea de células de mieloma que son células productoras de un solo tipo de anticuerpo y que secretan por tanto un anticuerpo homogéneo de alta especificidad. Estas células immortalizadas que producen el anticuerpo buscado pueden ser segregadas en clonas, es decir líneas seleccionadas y así obtenerse el anticuerpo deseado en cantidades ilimitadas, por ejemplo de esta manera pueden obtenerse líneas de células híbridas con capacidad de producir anticuerpos monoclonales, que reaccionan específicamente con linfocitos T de leucemias humanas (12,23).

Se utilizan ratones que son inyectados con las células de leucemias T humanas durante tres o cuatro días, después de la última inyección se sacrifica al animal, se separa el bazo y las células esplénicas se mezclan con una línea de células de mieloma murino que muestran deficiencia de la en-

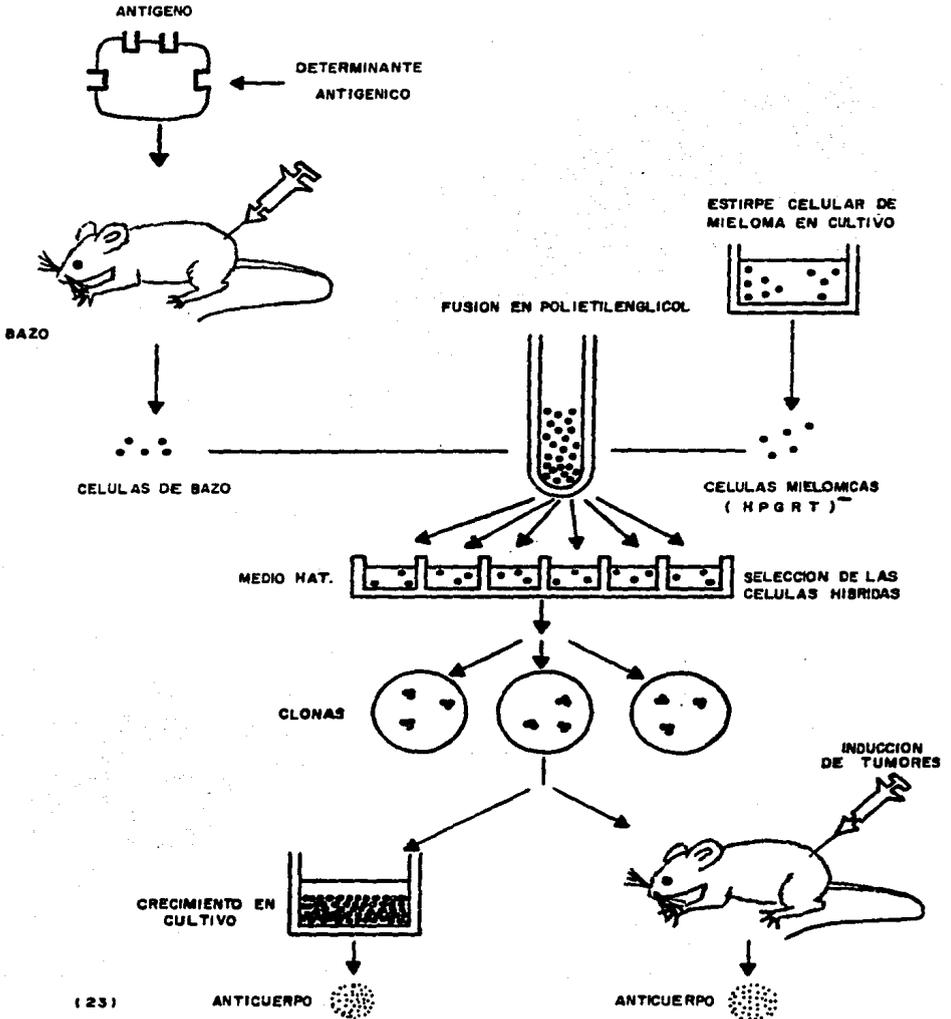
zima hipoxantina, guanina, fosforibosil transferasa (HPGRT)- en un medio de polietilenglicol. De este modo ocurre una fusión de ambos tipos celulares.

Las células de mieloma confieren la capacidad de crecimiento ininterrumpido y las células esplénicas inmunizadas confieren la capacidad de producir una inmunoglobulina específica. Las células no fusionadas se eliminan por cultivo en un medio que contenga aminopterina, hipoxantina y timidina (HAT), las células de mieloma no fusionadas carecen de la enzima HPGRT necesaria para la utilización de purinas exógenas, razón por la cual no sobreviven en un medio con aminopterina. Las células esplénicas normales que no se fusionan "no son inmortales" desaparecen en cultivo ininterrumpido, de este modo solo sobrevivirán los híbridos que han obtenido la actividad de la enzima HPGRT de las células de mieloma de crecimiento ininterrumpido (22,23) figura 1 .

Las clonas obtenidas se pueden conservar indefinidamente en cultivos o proliferar como un tumor de ascitis in vivo. El líquido ascítico producido por estos hibridomas, contienen anticuerpos en cantidades extraordinariamente grandes y el líquido de ascitis a menudo posee títulos superiores a una parte por millón (12,22).

PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

FIGURA No. 1



O B J E T I V O

Identificar la línea celular involucrada en las leucemias linfoblásticas agudas, utilizando anticuerpos monoclonales, con el objeto de valorar el pronóstico y tratamiento del paciente, de resultar útil, pensamos que se podría implantar como método diagnóstico más, en algunos centros hospitalarios de nuestro país.

H I P O T E S I S

HIPOTESIS NULA (H₀)

Los métodos tradicionales identifican con la misma precisión las etapas de maduración de la célula - que los anticuerpos monoclonales.

HIPOTESIS ALTERNA (H₁)

La utilización de anticuerpos monoclonales - permite identificar con mayor precisión la etapa de maduración de las líneas celulares que las técnicas tradicionales.

D E S A R R O L L O
D E L
P R O B L E M A

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se sabe que en los procesos linfoproliferativos malignos, es de gran utilidad identificar y clasificar precozmente el tipo de célula afectada.

Existen métodos morfológicos o citoquímicos que no logran este objetivo plenamente, es necesario disponer de un método que ofrezca mayor precisión para identificar y clasificar las células malignas, ya que se ha observado en algunos casos que el pronóstico y tratamiento de los pacientes - dependerá de ello(1,26).

DISEÑO

Se estudiaron 25 niños de ambos sexos, cuyas edades fluctuaron entre 2 y 15 años, con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda (LLA) en un lapso de 6 meses y sin haber recibido quimioterapia. El diagnóstico se estableció cuando los propositus tuvieron :

- Síndrome anémico
- Síndrome purpúrico
- Síndrome infiltrativo

DATOS DEL LABORATORIO :

Biometría hemática completa y el estudio morfológico de frotis de médula ósea.

Con las muestras de sangre periférica se formó un grupo y con el aspirado medular otro.

En la sangre periférica se determinó la maduración celular - por medio de la investigación de anticuerpos monoclonales marcados con fluoresceína.

En el aspirado medular se realizaron las tinciones citoquímicas tradicionales:

PEROXIDASA

PAS

SUDAN NEGRO B

FOSFATASA ACIDA

Con cada uno de los pacientes se hizo la correlación de los datos obtenidos con la determinación de anticuerpos monoclonales y su tinción citoquímica.

R E S U L T A D O S

TABLA 1

Muestra los resultados obtenidos por medio de anticuerpos monoclonales, de los 25 pacientes estudiados, 11 correspondieron a la leucemia linfoblástica aguda (LLA) de células B inmadura, donde el anticuerpo monoclonal aumentado es el BMA 0120; 6 casos de LLA de células pre-B, los anticuerpos monoclonales aumentados son el BMA 020 y el BMA 0120; 1 caso fue de células pre-T, el anticuerpo monoclonal aumentado es el BMA 090 y 7 casos que no muestran marcador inmunológico, por lo que son denominadas LLA indiferenciada.

TABLA I
RESUMEN DE RESULTADOS
CON ANTICUERPOS MONOCLONALES

Paciente LLA	EDAD AÑOS	BMA ⁺ 010	BMA 020	BMA 030	BMA 040	BMA 060	BMA 090	BMA 0120
1	13	100%	19%	78%	86%	0.5%	0.5%	11.5%
2	4	100%	17%	63%	60%	0%	30%	1%
3	5	100%	11%	60%	50%	0%	1%	0.5%
4	3	100%	80%	60%	53%	1%	1%	56%
5	4	100%	17%	60%	49%	0%	1%	15%
6	5	100%	39%	65%	54%	0%	1%	34.5%
7	8	100%	24%	70%	44%	0%	0.5%	53%
8	3	100%	33%	60%	43%	0.5%	1%	54%
9	8	100%	27%	70%	50%	0.5%	1%	22%
10	15	100%	23%	74%	51%	0.5%	1%	18%
11	4	100%	28%	63%	40%	0.5%	1%	22%
12	6	100%	52%	73%	59%	1%	0.5%	70%
13	13	100%	16%	65%	52%	1%	0%	0%
14	11	100%	9%	61%	54%	1%	0.5%	0%
15	3	100%	23%	71%	42%	1%	0.5%	19%
16	7	100%	14%	63%	42%	1%	0.5%	15%
17	7	100%	14%	61%	46%	0.5%	0.5%	1%
18	2	100%	9%	75%	46%	1%	0%	0%
19	4	100%	12%	75%	56%	0.5%	0%	35%
20	2	100%	10.5%	60%	44%	1%	0%	22%
21	13	100%	17%	72%	37%	1%	0%	0.5%
22	6	100%	10%	65%	60%	0%	0%	41%
23	13	100%	10%	76%	37%	0%	0.5%	1%
24	13	100%	51%	73%	51%	0%	0.5%	31%
25	7	100%	10%	61%	60%	1%	0.5%	36%

* ANTICUERPOS MONOCLONALES, CASA BEHRING

TABLA 2

Muestra los resultados obtenidos con las tinciones citoquímicas, se observa en el 100% de los casos negatividad para la tinción de peroxidasa, la cual es útil para diferenciar la LLA de la leucemia mieloblástica aguda (LMA), siendo positiva en esta última. La tinción del sudán negro B está estrechamente correlacionada con la reacción de peroxidasa, por lo que se observa un 100% de negatividad; 17 casos muestran positividad para la tinción del PAS, las cuales equivalen al 68%, donde las leucemias de células B en estadios tempranos de maduración muestran esta positividad; 1 caso presentó reacción con la tinción de la fosfatasa ácida correspondiendo al 4% del total de la población estudiada, las leucemias de células T son positivas para esta reacción; 7 casos que equivalen al 28% no presentan reacción con ninguna de las tinciones mencionadas, las cuales son clasificadas dentro de las LLA indiferenciada.

TABLA II
RESUMEN DE RESULTADOS
CON ESTUDIO CITOQUIMICO.

PACIENTE L L A	EDAD (AÑOS)	PEROXIDASA	P A S	SUDAN NEGRO 8	FOSFATASA ACIDA
1	13	NEGATIVA	Positivo Débil	NEGATIVO	NEGATIVA
2	4	NEGATIVA	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVA
3	5	NEGATIVA	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVA
4	3	NEGATIVA	POSITIVO ++	NEGATIVO	NEGATIVA
5	4	NEGATIVA	POSITIVO +	NEGATIVO	NEGATIVA
6	5	NEGATIVA	POSITIVO ++	NEGATIVO	NEGATIVA
7	8	NEGATIVA	POSITIVO +	NEGATIVO	NEGATIVA
8	3	NEGATIVA	Positivo Débil	NEGATIVO	NEGATIVA
9	8	NEGATIVA	POSITIVO +	NEGATIVO	NEGATIVA
10	15	NEGATIVA	POSITIVO ++	NEGATIVO	NEGATIVA
11	4	NEGATIVA	POSITIVO +++	NEGATIVO	NEGATIVA
12	6	NEGATIVA	POSITIVO +++	NEGATIVO	NEGATIVA
13	13	NEGATIVA	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVA
14	11	NEGATIVA	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVA
15	3	NEGATIVA	POSITIVO +++	NEGATIVO	NEGATIVA
16	7	NEGATIVA	Positivo Débil	NEGATIVO	NEGATIVA
17	7	NEGATIVA	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVA
18	2	NEGATIVA	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVA
19	4	NEGATIVA	Positivo Débil	NEGATIVO	NEGATIVA
20	2	NEGATIVA	POSITIVO +	NEGATIVO	NEGATIVA
21	13	NEGATIVA	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVA
22	6	NEGATIVA	POSITIVO +	NEGATIVO	NEGATIVA
23	13	NEGATIVA	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVA
24	13	NEGATIVA	POSITIVO ++	NEGATIVO	NEGATIVA
25	7	NEGATIVA	POSITIVO +	NEGATIVO	NEGATIVA

ANALISIS DE RESULTADO

Y

CONTRASTACION DE HIPOTESIS

TABLA III
ANALISIS DE RESULTADOS
CON ANTICUERPOS MONOCLONALES

ANTICUERPO MONOCLONAL	VALOR DE REFERENCIA	LEUCEMIA B-INMADURA	LEUCEMIA PRE-B	LEUCEMIA PRE-T	LEUCEMIA INDIFERENCIADA
BMA 010	100 %	100	100	100	100
BMA 020	12 ± 5%	12	80	12	12
BMA 030	70 ± 10%	70	70	70	70
BMA 040	50 ± 15%	50	50	50	50
BMA 060	≅ 1%	0.5	0.5	0.5	0.5
BMA 090	≅ 1%	0.5	0.5	30	0.5
BMA 0120	≅ 1%	41	60	0.5	0.5

TABLA 3

Muestra los diferentes tipos de leucemia, observando que en la leucemia tipo B inmadura el anticuerpo monoclonal que se encuentra aumentado es el BMA 0120 , en la leucemia pre-B los anticuerpos monoclonales aumentados son el BMA 020 y el BMA 0120 , en la leucemia pre-T se encuentra aumentado el BMA 090 y en la leucemia indiferenciada se encuentran los anticuerpos monoclonales, dentro de los valores de referencia.

TABLA IV
ANALISIS DE RESULTADOS
CON ESTUDIO CITOQUIMICO

TIPO DE LEUCEMIAS	PEROXIDASA	P A S	SUDAN NEGRO-B	FOSFATASA ACIDA
CELULAS B	NEGATIVA	POSITIVA	NEGATIVO	NEGATIVO
CELULAS T	NEGATIVA	NEGATIVA	NEGATIVA	POSITIVO
MIELOBLASTICAS	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
INDIFERENCIADA	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO

FIGURA 2
FRECUENCIA DE LAS LEUCEMIAS
IDENTIFICADAS POR MEDIO DE
ANTICUERPOS MONOCLONALES

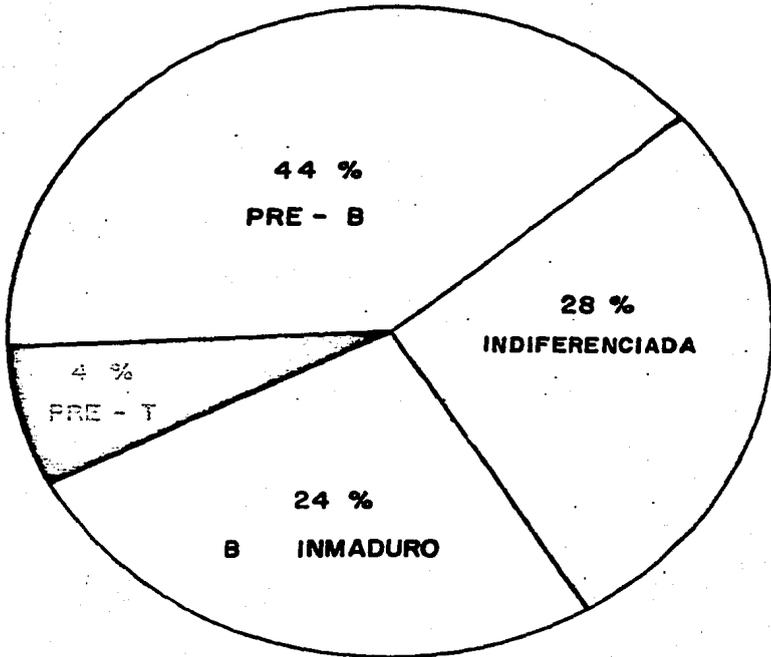


FIGURA 2

Muestra la frecuencia de las leucemias linfoblásticas clasificadas con anticuerpos monoclonales, encontrándose una mayor incidencia en la leucemia linfoblástica aguda (LLA) de células pre-B, con respecto a los otros tipos inmunológicos así mismo se observa que el grupo menos frecuente es el de células pre-T, no hay evidencias de estadios celulares más evolucionados (células T y células B).

Se ha visto que las leucemias de peor pronóstico son las de células diferenciadas (28).

En el presente estudio se detectó un mayor porcentaje de leucemias con buen pronóstico, ya que los tipos celulares involucrados presentan estadios muy tempranos.

TABLA N.º 5
CORRELACION DE RESULTADOS CON MARCADORES CITOQUIMICOS Y ANTICUERPOS -
MONOCLONALES EN LAS LEUCEMIAS LINFOBLASTICAS AGUDAS

TIPO DE LEUCEMIA TECNICAS	LEUCEMIA B- INMADURA	LEUCEMIA PRE-B	LEUCEMIA PRE-T	LEUCEMIA INDIFERENCIADA
ANTICUERPOS MONOCLONALES BNA * O10	+	+	+	+
BNA O20	-	+	-	-
BNA O30	-	-	-	-
BNA O40	-	-	-	-
BNA O60	-	-	-	-
BNA O80	-	-	+	-
BNA O120	+	+	-	-
CITOQUIMICAS PEROXIDASA	-	-	-	-
SUDAN NEGRO B	-	-	-	-
P A S	+	+	-	-
FOSFATASA ACIDA	-	-	+	-

* ANTICUERPOS MONOCLONALES CASA BHERING

CONTRASTACION DE HIPOTESIS

De acuerdo con el presente estudio la hipótesis a elegir es la hipótesis alterna, ya que los resultados obtenidos con los anticuerpos monoclonales identifican con mayor precisión la maduración celular, lo cual no es posible con las técnicas citoquímicas tradicionales.

D I S C U S S I O N

En un estudio realizado por Thiel, en 12 centros hospitalarios de Alemania, se estudiaron 226 niños con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda (LLA), basado en el examen morfológico y citoquímico, posteriormente se les realizó el examen inmunológico por medio de anticuerpos monoclonales, obteniéndose los siguientes resultados:

38% LLA pre-pre-B (común)

31% LLA pre-B

13% LLA pre-T

13% LLA T

1% LLA B

4% LLA indiferenciada

Los anticuerpos monoclonales que utilizaron fueron:

E-R receptor para eritrocitos de carnero

anti CALL (CALLA)

inmunoglobulinas de superficie (SIG)

antígeno de células T (HUTLA)

En la LLA pre-pre-B (común), el anticuerpo monoclonal que se pone de manifiesto es el CALLA; en la LLA pre-B encontraron el CALLA y el HUTLA positivos; en la LLA-B la inmunoglobulina de superficie (SIG) fue positiva y el CALLA se encontró positivo en algunos niños.

En la LLA pre-T esta positivo el HUTLA; en la LLA-T esta positivo el HUTLA y el E-R.

En la LLA-indiferenciada, todos los marcadores inmunológicos fueron negativos.

En otro estudio realizado por Robert, con marcadores inmunológicos, en el centro médico de la UCLA en 12 pacientes, obtuvieron los siguientes resultados :

66.6% LLA pre-pre-B (común)

16.6% LLA pre-T

16.6% LLA - T

Los anticuerpos monoclonales que utilizaron fueron los siguientes :

OKT 3 , Leu 1 panel de linfocitos T

OKT 4 , Leu 3 células T ayudadora/inductora

OKT 8 , Leu 2 células T citotóxica/supresora

HLA-DR antígeno asociado a la respuesta inmune

anti CALL (CALLA) común

células formadoras de rosetas con eritrocitos de carnero (ERFC)

En la LLA pre-pre-B se encontró el CALLA positivo ; en la LLA pre-T el Leu 1 está positivo, pero no forma rosetas con eritrocitos de carnero, el Leu 1 y el OKT 3 estan positivos.

En el presente estudio, se trabajó con 25 niños con diagnóstico de LLA y posteriormente se les realizó el examen citoquímico e inmunológico, obteniendose los siguientes resultados :

24 % LLA-B inmadura o común

44 % LLA pre-B

4% LLA pre-T

28% LLA-indiferenciada

Los anticuerpos monoclonales empleados fueron:

BMA 010 panel de leucocitos

BMA 020 linfocitos B, antígeno asociado a la respuesta inmune

BMA 030 panel de linfocitos T

BMA 040 linfocitos T ayudadores

BMA 060 timocitos corticales

BMA 090 transferrinreceptor

BMA 0120 linfocito B asociado al antígeno

En la LLA-B inmadura el anticuerpo monoclonal que se pone de manifiesto es el BMA 0120 ; en la LLA pre-B los anticuerpos monoclonales que están positivos son, el BMA 020 y el BMA 0120 en la LLA pre-T está positivo el BMA 090 . En la LLA indiferenciada no presenta marcadores inmunológicos.

Comparando los resultados obtenidos con la revisión bibliográfica (tabla No. 6), se encontró cierta correlación.

En la tabla No. 7 se pueden analizar los resultados obtenidos comparandolos con estudios similares encontrados en la literatura.

La mayoría de los casos son de estadios celulares tempranos y de tipo celular B. No encontramos casos de LLA tipo T ni LLA tipo B maduro, esto pudo deberse a que la población estudiada

es muy pequeña, llama la atención el 28% de las leucemias indiferenciadas esto se debe a que no se cuenta con un equipo completo de diagnóstico, tanto citoquímico como inmunológico (27,29).

TABLA No. 6

TABLA COMPARATIVA DEL PRESENTE ESTUDIO CON OTROS
GRUPOS DE TRABAJO

TIPO DE LEUCEMIA	E. THIEL 226 NIÑOS	%	ROBERT 12 NIÑOS	%	GRUPO ANALIZADO 25 NIÑOS	%
PRE-PRE-B (Común)	86	38 %	8	66.6 %	6	24 %
PRE-B	70	31 %	—	0 %	11	44 %
PRE-T	29	13 %	2	16.6 %	1	4 %
T	29	13 %	2	16.6 %	—	0 %
B	3	1 %	—	0 %	—	0 %
INDIFERENCIADA	9	4 %	—	0 %	7	28 %

TABLA No. 7

**TABLA COMPARATIVA DEL PRESENTE ESTUDIO EMPLEANDO ANTICUERPOS
MONOCLONALES CON OTROS GRUPOS DE TRABAJO**

	PRE - PRE - B (Común)			PRE - B		INDIFERENCIADA	
	THIEL	ROBERT	GRUPO ANALIZADO	ROBERT *	GRUPO ANALIZADO	ROBERT *	GRUPO ANALIZADO
BMA 020 HLA - DR	NP	-	-		+		-
BMA 030 OKT 3	NP	-	-		-		-
BMA 040 OKT 4	NP	-	-		-		-
BMA 0120 CALLA	+	+	+		+		-

NP NO PROBADO
* NO ESTUDIADO

C O N C L U S I O N E S

- 1.- Por medio de este trabajo se demostró que los anticuerpos monoclonales identifican con mejor precisión la línea celular involucrada; diferenciandolas en LLA pre-pre-B, LLA pre-B , LLA-B , LLA-T , LLA pre-T y LLA indiferenciada ; en tanto que por las técnicas citoquímicas no se logra hacer este tipo de diferenciación, siendo de gran ayuda para el médico ya que de ello depende que se le de el tratamiento adecuado al paciente. Se hizo seguimiento durante el desarrollo del trabajo de la evolución clínica de los pacientes con el objeto de valorar el pronóstico dependiendo del tipo celular, siendo de mejor pronóstico - las leucemias poco diferenciadas.

- 2.- Este procedimiento desde el punto de vista técnico requiere cierta habilidad pero es posible efectuarlo de manera rutinaria en los centros hospitalarios.

A P P E N D I C E

MATERIAL

- Probeta graduada de 250 ml
- Probeta graduada de 500 ml
- Probeta graduada de 100 ml
- Probeta graduada de 50 ml
- Matraz erlenmeyer de 1000 ml
- Matraz erlenmeyer de 500 ml
- Matraz erlenmeyer de 250 ml
- Matraz aforado de 1000 ml
- Matraz aforado de 500 ml
- Vaso de precipitado de 50 ml
- Vaso de precipitado de 10 ml
- Tubos de vidrio de 16 x 150 mm
- Tubos de vidrio de 13 x 100 mm
- Tubos de vidrio de 10 x 25 mm
- Tubos de ensayo (EPENDORF)
- Pipetas graduadas de 10 ml
- Pipetas graduadas de 5 ml
- Pipetas graduadas de 1 ml
- Pipetas graduadas de 0.2 ml
- Pipetas pasteur larga
- Cámara húmeda
- Refrigerador
- Balanza analítica

- Balanza granataria
- Microscopio de luz visible
- Microscopio de inmunofluorescencia
- Potenciómetro
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Centrífuga
- Vidrio de reloj
- Cajas petri
- Vaso coplin
- Reloj de intervalo
- Varilla de vidrio
- Bulbo
- Estufa a 37°
- Lápiz diamante
- Agitador con barra magnética
- Termómetro de -10°C a 100°C
- Embudos
- Frascos ámbar de 100 ml a 1 litro
- Piano counter de dos teclas
- Pipeta automática de 500 microlitros
- Pipeta automática de 100 microlitros
- Pipeta automática de 50 microlitros
- Pipeta automática de 5 microlitros

SEPARACION DE LINFOCITOS

REACTIVOS :

Fycoll - Hypaque (MICROLAF)

AMORTIGUADOR PBS (pH 7.2 - 7.4)

- 1.- 500 ml de agua desionizada
- 2.- Poner al matraz o recipiente la barra magnética y agitar
- 3.- Agregar 4 g de NaCl al agua en el recipiente
- 4.- Agregar 0.10 g de KCl a la solución en el recipiente
- 5.- Agregar 0.10 g de K_2HPO_4 (fosfato de potasio monobásico)
- 6.- Agregar 1.08 g de $Na_2HPO_4 \cdot 7 H_2O$ (fosfato de sodio dibásico heptahidratado) a la solución en el recipiente
- 7.- Mezclar hasta disolver
- 8.- Quitar la barra magnética de la solución, el pH debe ser de 7.2 - 7.4
- 9.- Guardar la solución de 2 - 8°C , etiquetando el recipiente

PROCEDIMIENTO :

- 1.- Tomar una muestra de 5 a 10 ml de sangre periférica con 3 o 4 gotas de heparina (100 U.I por ml)
- 2.- Diluir al doble con amortiguador de PBS pH 7.2 - 7.4
- 3.- Estratificar 3 partes de la sangre diluida sobre 2 partes de Fycoll - Hypaque en un tubo de ensaye de 13 x 100

mm

- 4.- Centrifugar de 3000 a 3500 rpm durante 17 minutos
- 5.- Separar la fracción de linfocitos (separados como una - capa de células en la interfase), con la ayuda de una - pipeta pasteur.
- 6.- Transferir la capa de células a un tubo de ensaye de 13 x 100 mm y lavar las células con amortiguador de PBS pH 7.2 - 7.4 por centrifugación a 3000 o 3500 rpm durante 5 minutos en tres ocasiones
- 7.- Decantar el sobrenadante y resuspender en un mínimo de volúmen, ajustando a la concentración de células adecudas, pudiendo ser de 1 a 3 millones de células por mm^3 .

IDENTIFICACION DE LA ESTIRPE LINFOCITARIA POR MEDIO DE ANTICUER
POS MONOCLONALES

REACTIVOS :

AMORTIGUADOR TRIS pH 7.6

Tris-Hidroximetil Amino-Metano -----	6.05 g
NaCl -----	5.8 g
H ₂ O destilada -----	850 ml
Ajustar a pH 7.6 con HCl al 25%	
Aforar a -----	1000 ml

Guardar en refrigeración en frasco ámbar.

TRIS + SUERO FETAL DE TERNERA (SFT) 5%

Tris pH 7.6 -----	95 ml
Suero fetal de ternera -----	5 ml

ANTICUERPOS MONOCLONALES

Anticuerpo monoclonal -----	5 microlitros
Tris pH 7.6 -----	245 microlitros

BMA 010 ----- Pan-Leucocytes (panel de leucocitos)

BMA 020 ----- B-Lymphocytes, Ia DR (Ia = antígeno asociado a
la respuesta inmune)
(DR = región DR HLA(histo
compatibilidad).

BMA 030 ---- Pan T-Lymphocytes (panel de linfocitos T)
BMA 040 ---- Helper T - Lymphocytes (linfocitos T de ayuda)
BMA 060 ---- Thymocytes (timocitos)
BMA 090 ---- Transferrinreceptor (receptor para transferrinas)

BMA 0120 ---- cALL (linfocitos-B asociado al antígeno)
ANTI-IgG de ratón conjugado con fluoresceína (conjugado)
Conjugado ----- 5 microlitros
Tris pH 7.6 ----- 95 microlitros

GLICEROL AL 10%

Glicerol Q.P ----- 1 ml
Tris pH 7.6 ----- 9 ml

PROCEDIMIENTO :

- 1.- Colocar 50 microlitros de cada uno de los anticuerpos - monoclonales en tubos de ensaye de 10 x 25 mm y agregar 50 microlitros de la suspensión de linfocitos
- 2.- Incubar 30 minutos a 4°C
- 3.- Hacer tres lavados a 3000 revoluciones por minuto (rpm) cada uno, con 500 microlitros de tris pH 7.6 + SFT 5%
- 4.- Después de la última centrifugación, tirar el sobrenadante, resuspender en un mínimo de volumen y adicionar 50 microlitros de conjugado con fluoresceína
- 5.- Incubar 30 minutos a 4°C

- 6.- Hacer tres lavados a 3000 rpm cada uno, con 500 microlitros de tris pH 7.6 + SFT 5%
- 7.- Después de la última centrifugación, tirar el sobrenadante, resuspender en un mínimo de volumen y adicionar una gota de glicerol al 10%
- 8.- Montar las laminillas, colocar una gota de cada uno de los tubos en un portaobjeto limpio, previamente marcado con cada anticuerpo monoclonal y colocar el cubreobjeto
- 9.- Leer en el microscopio de fluorescencia.

P E R O X I D A S A

FUNDAMENTO DE LA PRUEBA :

La enzima mieloperoxidasa de las células mieloides - actúa sobre el peróxido de hidrógeno descomponiéndolo en agua y un superóxido, contando con un sistema indicador el cual se oxida (Bencidina, amino carbazoles y O-tolidina) se puede valorar este efecto.

REACTIVOS :

FORMOL - ETANOL

Formol ----- 10 ml
Etanol ----- 90 ml

MEZCLA DE TINCION

Etanol al 30% (vol/vol) ----- 100 ml
Dicloruro de bencidina ----- 0.3 ml
ZnSO₄. 7 H₂O 0.132 M ----- 1.0 ml
Acetato de sodio trihidro (NaC₂H₃O₂. 3H₂O) ----- 1.0 ml
Peróxido de hidrógeno al 3% (H₂O₂) ----- 0.9 ml
NaOH 1.0 N ----- 1.5 ml
Safranina ----- 0.2 ml

NOTA: ZnSO₄.7H₂O con P.M de 287.54 para una solución 0.132M se pesa 3.8 gramos.

Los reactivos deben adicionarse según el orden dado. El dicloruro de bencidina puede contener algún material insoluble y - por la adición del $ZnSO_4$ se forma un precipitado, el cual se disuelve con la adición de los reactivos restantes.

El pH debe ser 6.0 ± 0.05 , se filtra la sal y se conserva en frasco ámbar a temperatura ambiente, varios meses.

PROCEDIMIENTO :

- 1.- Los frotis de sangre periférica o médula ósea, se secan al aire y se fijan sumergiendo las laminillas durante - 60 segundos en la solución fijadora (alcohol-formol) a temperatura ambiente
- 2.- Lavar las laminillas por 30 segundos con agua destilada
- 3.- Sumergir las laminillas en la solución de tinción durante 30 segundos y secar totalmente
- 4.- Contrateñir con safranina un minuto, lavar con agua destilada
- 5.- Observar al microscopio con objetivo de inmersión.

INTERPRETACION :

Cuando existe la enzima mieloperoxidasa en los blastos, se observan como granulos color negro, tomando como referencia al neutrófilo (25).

TINCIÓN DEL ACIDO PERIÓDICO DE SCHIFF (PAS)

FUNDAMENTO DE LA PRUEBA :

El ácido peryódico oxida los glicoles a aldehídos, los cuales reaccionan con el schiff, liberando fucsina y tificándose los compuestos celulares que contienen compuestos oxidables. En las células de la sangre y de la médula ósea, el glicógeno parece ser el compuesto principalmente responsable ya que la tinción puede ser bloqueada por digestión con amilasa.

REACTIVOS :

FORMOL

ACIDO PERIÓDICO

Acido peryódico	-----	2.5 g
Agua destilada	-----	500 ml

REACTIVO DE SCHIFF

Fucsina básica	-----	1 g
Agua destilada hirviendo	-----	200 ml

enfriar a 50°C y agregar :

HCl 1N	-----	50 ml
--------	-------	-------

enfriar a 25°C y agregar :

Metabisulfito de sodio	-----	2.5 g
------------------------	-------	-------

Conservar en la oscuridad, después adicionar 0.5 g de carbón activado, agitar por un minuto, filtrar y guardar en un frasco ámbar en refrigeración.

METABISULFITO DE SODIO AL 0.5%

Metabisulfito de sodio	-----	1 g
Agua destilada	-----	200 ml

PROCEDIMIENTO :

- 1.- Los frotis de médula ósea se secan al aire y se fijan con vapores de formol, durante 5 minutos
- 2.- Lavar con agua corriente durante 15 minutos
- 3.- Lavar con agua destilada dos veces, dejar secar totalmente
- 4.- Colocar los frotis en un vaso coplin con ácido peryodico durante 10 minutos
- 5.- Lavar con agua destilada y secar
- 6.- Colocar los frotis en un vaso coplin con reactivo de Schiff durante 40 minutos en la oscuridad
- 7.- Colocar los frotis en un vaso coplin con metabisulfito de sodio al 0.5% tres minutos, en tres ocasiones, eliminando el metabisulfito cada vez
- 8.- Lavar con agua destilada tres veces, tres minutos, dejar secar
- 9.- Contrateñir con hematoxilina de Mayer durante 10 minutos
- 10.- Lavar con agua destilada y secar
- 11.- Observar al microscopio con objetivo de inmersión

INTERPRETACION :

El tejido linfoide tiene gran cantidad de glucógeno, los blastos pueden presentar una positividad y es proporcional a la cantidad de glucógeno que contiene la célula (13,14).

S U D A N N E G R O B

FUNDAMENTO DE LA PRUEBA :

El sudán negro B tñe gran variedad de lípidos incluyendo las grasas neutras, fosfolípidos y esteroides, también colorea algunos componentes celulares que no son lípidos, como se demuestra por la imposibilidad de eliminar completamente el colorante, en los disolventes de los lípidos como la acetona.

En los leucocitos la sudanofilia corre paralela con la reacción de la peroxidasa, los linfocitos y los linfoblastos no se tñen con el sudán negro B, mientras que los precursores de los eritrocitos y los monocitos inmaduros muestran características patrones de tñción.

REACTIVOS :

FORMALINA

SOLUCION AMORTIGUADORA

Fenol	-----	80 g
Etanol	-----	150 ml
NaHPO ₄	-----	1.5 g
Agua destilada aforar a	-----	500 ml

SOLUCION STOCK DE SUDAN NEGRO B

Alcohol etílico absoluto	-----	100 ml
Sudán negro B	-----	0.3 g

SOLUCION DE TRABAJO

Sudán negro B -----30 ml

Solución amortiguadora -----20 ml

GIEMSA

PROCEDIMIENTO :

- 1.- Los frotis de médula ósea se secan al aire y se fijan -
con vapores de formalina durante 15 minutos
- 2.- Sumergir las laminillas en la solución de trabajo en un
vaso coplin durante 45 minutos
- 3.- Lavar con etanol absoluto y dejar secar al aire
- 4.- Contrateñir con giemsa por 10 minutos, lavar con agua -
destilada y dejar secar
- 5.- Observar al microscopio con el objetivo de inmersión.

INTERPRETACION :

La reacción se observa positiva, con granulos de color azul -
intenso en los mieloblastos (21).

F O S F A T A S A A C I D A

FUNDAMENTO DE LA PRUEBA

La fosfatasa ácida es una enzima que se encuentra presente en los linfocitos, células plasmáticas, monocitos y plaquetas. En esta tinción el citoplasma de las células se tiñen de color rojo, cuando se encuentra la presencia de la enzima.

REACTIVOS :

AMORTIGUADOR FORMALINA-ACETONA DE FIJACION pH 6.6-6.8

Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4)	-----	0.2 g
Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4)	-----	1.0 g
Agua destilada	-----	300 ml
Acetona	-----	450 ml
Formalina	-----	250 ml

Guardar en refrigeración.

NITRITO DE SODIO AL 4%

Nitrito de sodio (Q.P)	-----	4 g
Agua destilada	-----	100 ml

SOLUCION DE PARAROSANILINA (preferencia química sigma)

Pararosanilina hidroclicorada	-----	1.0 g
Agua destilada	-----	20 ml
HCl (Q.P)	-----	5.0 ml

Mezclar de 10 a 15 minutos hasta que la pararosanilina se disuelva y almacenar en un cuarto oscuro.

ACIDO ACETICO 1N

Acido acético glacial ----- 6.0 ml
Agua destilada ----- 1 lt

AMORTIGUADOR DE ACETATO 0.1 N pH 5.0

Acetato de sodio ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) ----- 4.797 g
Acido acético 1 N ----- 14.75 ml
Agua destilada aforar a ----- 1 lt

Guardar en refrigeración.

SOLUCION A

Nitrito de sodio al 4% ----- 1.2 ml
Solución de pararosanilina ----- 1.2 ml

SOLUCION B

Naftol AS-BI (7-bromo-3 hidroxil-2-naphto-O anisidide)-- 20 mg
N,N- dimetil formamida ----- 2.0 ml
Buffer de acetato 0.1 N , pH 5.0 ----- 35.6 ml

En este orden mezclar y usar

MEZCLA DE INCUBACION

Mezclar la solución B + solución A , ajustar el pH 5.1 con -
NaOH saturada, filtrar en un vaso coplin y usar.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- A. Villegas, J. García Talavera, A. Alvarez Carmona y D. Espinós Pérez. Leucemia aguda: Consideraciones Generales Clasificación y Manifestaciones Clínicas., Tratado de Medicina Práctica, Primera Serie 545-560 ; 1982
- 2.- Barbara A. Brown. Hematology: Principles and Procedures Third Edition, Lea & Febiger, Philadelphia 1980
- 3.- Bennett J.M. Catovsky D., Daniel M.T., Flandrin G., Galton D.A.G., Gralnick H.R., Sultan C.: Proposals for the Classification of the Acute Leukemias. Br. J Hematol, 33 451-458 :1976
- 4.- Bennett J.M., Catovsky D., Daniel M.T., Flandrin G., Galton D.A.G., Gralnick H.R., Sultan C.: The Morphological Classification of Acute Lymphoblastic Leukemia: Cancer - dance among Observers and Clinical Correlations. British Journal of Haematology, 47: 553-561 ; 1981
- 5.- By E. Thiel, H.Rodt, D.Huhn, B.Netzel, H. Grosse-Wilde , K. Ganeshaguru, and S. Thierfelder.Multimarker Classification of Acute Lymphoblastic Leukemia: Evidence for Further T Subgroups and Evaluation of Their Clinical Significance. Blood Vol 56, No. 5: 759-772 ; 1980
- 6.- By Harry w. Findley, Jr., Max D. Cooper, Tae H. Kim, Carlos Alvarado, and Abdelsalam H. Ragab.: Two New Acute - Lymphoblastic Leukemia Cell Lines With Early B-Cell Phenotypes. Blood Vol. 60, No. 6: 1305-1308 ; 1982

- 7.- By Kenneth A.Foon, Robert W. Schroff, and Robert Peter-Gale Surface Markers on Leukemia and Lymphoma Cells: Recent Advances. Blood, Vol. 60, 1-13 ; 1982
- 8.- Catovsky D.: Leukemic Cell (Methods in Hematology) Churchill Livingstone : Londres 1981
- 9.- Catovsky D. Galetto J., Okos A., Miliani E., and Galton A.G.: Cytochemical Profile of B and T Leukaemic Lymphocytes with Special Reference to Acute Lymphoblastic Leukaemia. J. Clin. Path., 27: 767-771 ; 1974
- 10.- Catovsky D., Greaves M.F., Pain C., Cherchi M., Janossy G., Kay H.E.M.: Acid Phosphatase Reaction in Acute Lymphoblastic Leukaemia; The Lancet, 749-751 ; 1978
- 11.- Denis H. Miller, Sanford Leikin, Vincent Albo, Habland Sather and Denman Hammond,: Prognostic Importance of - Morphology (FAB Classification) in childhood Acute Lymphoblastic Leukaemia(ALL). British Journal of Haematology 199-206 ; 1980
- 12.- E. Thiel,: Monoclonal Antibodies against Differentiation Antigens of Lymphopoiesis, Blut 47: 247-261 ; 1983
- 13.- F.G.J, Hayhoel D.Quaglino. Haematological Cytochemistry Churchill Livinstone Edinburgh, London and New York: 1980
- 14.- George E. Cartwrigh.: El Laboratorio en el Diagnóstico Hematológico. Editorial Científico Médica; Barcelona - España 1973

- 15.- Harvey R. Gralnick, M.D., D.A.G. Galton, M.D., Daniel Catovsky, M.D., Claude Sultan, M.D., and John M. Bennett.: Classification of Acute Leukemia. Annals of Internal Medicine, 87: 740-753 ; 1977
- 16.- Larocha R.C. et al.: Correlación entre Marcadores de Membrana y Marcadores Citoquímicos en Enfermedades proliferativas T Aguda. Sangre, 30: 741-751 ; 1983
- 17.- López Borrasca A., González M., Hernández F., Ledezma M., Corrales A., San Miguel J.: Marcadores Enzimáticos e Inmunológicos en las Leucemias Agudas.: Sangre; 26 : 756-782 ; 1981
- 18.- Mathe G. et al.: Subdivision of Classical Varieties of Acute Leukemias: Correlation with Prognosis and Cure - Expontancy J.Clin. Biol. Res. 16: 554-560 ; 1971
- 19.- Mathe G. et al.: Classification and Subclassification - of Acute Leukemias, Correlated with Clinical Expression Therapeutic Sensitivity and Prognosis. Cancer Research 43: 6-20 ; 1973
- 20.- M. Bernácer Borja, J. Sánchez Fayos, C. Vecilla Rivelles y M. Lillo Lillo.: Leucemias Agudas Linfoblásticas . Tratado de Medicina Práctica, Segunda Edición, 502 511 ; 1985
- 21.- Miale, B.J.: Laboratory Medicine: Hematology. Six Edition; The C.V. Mosby Company USA ; 1982

- 22.- Milstein C.: Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity., *Nature*, 256: 495-497 ; 1975
- 23.- Milstein Cesar.: *Anticuerpos Monoclonales; Investigación y ciencia*. Edición en Español del Scientific American, 38-48 ; 1980
- 24.- Nelson A.D.: Cytomorphological Diagnosis of the Acute - Leukemia., *Seminars in Oncology*, No. 3: 201-208 , 1976
- 25.- Platt, R.W.: *Color Atlas and Textbook of Hematology*, Second Edition, J.B. Lippincott Company ; USA 1979
- 26.- Rivero Jiménez, R.A.: Los Anticuerpos Monoclonales en - las Investigaciones Biomédicas. *Rev Cub Hematol Inmun-Hematol* 1: 3-31 ; 1985
- 27.- Robert W. Schroff, Kenneth A. Foon, Ronald J. Billing, and Jhon L. Fahey : Immunologic Classification of Lymphocytic Leukemias Based on Monoclonal Antibody-Defined Cell Surface Antigens. *Blood*, Vol 59: 207-215 ; 1982
- 28.- Sallan S.E. Ritz J. Pesado et al.: Cell Surface Antigens Prognostic Implications in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia , *Blood*, 55: 395-402 ; 1980
- 29.- Thiel E., H.Rodt, D.Huhn, B Netzek, H. Grosse-Wilde.: Multimarker Classification of Acute Lymphoblastic Leukemia: Evidence for Further T Subgroups and Evaluation of their Clinical Significance. *Blood*, Vol 56: 759; 1980

- 30.- Wehinger et al.: Cytochemical Studies on T and B Lymphocytes with Special Reference to Acid Phosphatase .
Acta Hematol 56 ; 129-132 ; 1976
- 31.- Wintrobe , M.M.: Clinical Hematology, 5Th and 6 Th Editions
Lea & Febiger , Philadelphia 1961 ; 1967