



18  
2ej<sup>o</sup>

# Universidad Nacional Autónoma de México

Escuela Nacional de Estudios Profesionales  
ZARAGOZA

## IDENTIFICACION DE LEUCEMIAS AGUDAS EN NIÑOS MEDIANTE TECNICAS CITOQUIMICAS E INMUNOLOGICAS

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A N  
MA. DE JESUS GUTIERREZ ROSAS  
I R E N E R E Y E S C O R D O V A



TESIS CON  
FALLA LE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1991



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **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

	Pag
1. INTRODUCCION	1
2. GENERALIDADES	
2.1. Características de la Leucemia Aguda	2
2.2. Etiología	2
2.3. Manifestaciones Clínicas	3
2.4. Sintomatología	3
2.5. Clasificación de la Leucemia Aguda	4
2.5.1. Clasificación Morfológica	4
2.5.2. Clasificación Citoquímica	9
2.5.3. Clasificación Bioquímica	9
2.5.4. Clasificación Inmunológica	11
2.6. Anticuerpos Monoclonales (Ac Mo)	13
2.6.1. Obtención de los Ac Mo	13
2.6.2. Métodos utilizados para la detección de Ag.	14
3. DISEÑO EXPERIMENTAL	
3.1. Objetivos	19
3.2. Hipotesis	20
3.3. Material,Equipo y Reactivos	
Material	21
Equipo	22
Reactivos y soluciones	23
3.4. Consideraciones previas a la toma de muestra	25

	Pag
3.5. Desarrollo del trabajo	25
3.6. Metodología	
Biometría Hemática	28
Tinción de Leishman-Giemsa	32
Tinción de Peroxidasa	33
Tinción de Sudán Negro	34
Tinción de PAS	35
Tinción de Fosfatasa Acida	37
Tinción de Esterasa no específica	38
Separación de Linfocitos	40
Identificación de la estirpe afectada	42
Estandarización de la Técnica de Inmunoperoxidasa	44
4. RESULTADOS	51
5. ANALISIS DE RESULTADOS	62
6. CONCLUSIONES	68
7. APENDICE	71
8. BIBLIOGRAFIA	84

## INTRODUCCION

La Leucemia Aguda (LA) es una enfermedad maligna de los órganos hematopoyéticos, se caracteriza por la acumulación de células inmaduras (blastos) en la médula ósea y frecuentemente en sangre periférica; pudiendo infiltrar cualquier órgano o tejido del organismo. Como resultado de este sobrecrecimiento clonal de células leucémicas, el paciente presenta un funcionamiento anormal de la médula ósea, desencadenando anemia, neutropenia y trombocitopenia en algunos casos (1).

La Leucemia Aguda (LA) es la forma más común de cáncer en niños, presentando un aumento considerable en los últimos años.

En México, de acuerdo al Registro Nacional del Cáncer, de la Secretaría de Salud de 1983, se reporta que las leucemias y los linfomas constituyen el 51% de las neoplasias más frecuentes en niños (2).

Por tanto este trabajo esta encaminado a la identificación del tipo de Leucemia Aguda (LA) en pacientes que ingresen al Servicio de Hematopediatría del Hospital General Centro Médico "LA RAZA", con diagnóstico de Probable Leucemia Aguda (LA), utilizando para ello técnicas morfológicas, citológicas e inmunológicas.

## GENERALIDADES

### 2.1. Características de la Leucemia Aguda

En los últimos años la frecuencia de LA se ha incrementado, este aumento ha sido mayor observado comparado con otras enfermedades, correspondiendo aproximadamente el 75% de los casos a la Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) y el 25% a la Leucemia no Linfoblástica Aguda (LNLA) (3).

La LA se presenta más a menudo en las edades tempranas de la vida, mostrando un pico máximo entre los 2 y 6 años de edad. Ataca con mayor frecuencia el sexo masculino que al femenino.

En cuanto a grupos étnicos y raciales se refiere, la enfermedad es más común en la raza blanca que en la negra (4).

### 2.2. Etiología

Se desconocen las causas que dan lugar a una LA, sin embargo se han encontrado algunos factores predisponentes: factores ambientales, genéticos, infecciosos y estado de inmunodeficiencia.

Entre los factores ambientales destacan la radiación ionizante y el benceno.

Entre los factores genéticos, se han encontrado relación entre diversas anormalidades cromosómicas y la LA. En niños con Síndrome de Down el riesgo de leucemias es 15 veces mayor. Esta frecuencia se observa también en pacientes con Anemia de Fanconi, Síndrome de Bloom y en hermanos de pacientes con leucemia.

Los virus juegan un papel importante, ya que en el suero de algunos leucémicos se han encontrado partículas víricas caracterizadas como RNA (oncornavirus).

No obstante esta lista de factores etiológicos, se sabe poco del mecanismo patogénico auténtico (5,6).

### 2.3. Manifestaciones Clínicas

La LA se caracteriza por una proliferación neoplásica a nivel de médula ósea, estas células anormales pasan a la sangre periférica; infiltran y se multiplican en el bazo, ganglios linfáticos, hígado y otros tejidos, produciendo el engrandecimiento de éstos órganos.

### 2.4. Sintomatología

Apatía, falta de apetito, palidez, fatiga, dolor de las extremidades inferiores y huesos, epistaxis, petequias, sangrado de encías, hemorragias, cefalea, infecciones graves de las vías respiratorias, hipertermia y sudoraciones (7, 8).

## 2.5. Clasificación de las Leucemias Agudas (LA)

Inicialmente las Leucemias Agudas (LA) se clasificaron de acuerdo a criterios puramente morfológicos, utilizando la tinción de Romanowsky y nombrándolas según el tipo celular normal al que se asemeja la célula leucémica; lo que permitió establecer 2 grupos de LA: Las Leucemias Linfoblásticas Agudas (LLA) y las Leucemias no Linfoblásticas Agudas (LNLA) también llamadas Leucemias Mieloblásticas Agudas (LMA) (véase tabla 1).

Hoy en día se pueden clasificar a las LA desde un punto de vista morfológico, citoquímico, bioquímico e inmunológico (7.9).

### 2.5.1. Clasificación Morfológica (FAB)

En 1975 el comite Franco-Americano-Britanico (FAB) subdividió a la LA de acuerdo a la frecuencia de aspectos citológicos y al grado de heterogenicidad entre la población de células leucémicas, los aspectos considerados son: medida celular, cromatina nuclear, forma del núcleo, nucléolo, basofilia del citoplasma. En la evaluación inicial se emplearon muestras de sangre periférica y de médula ósea que se manejaron con la Tinción de Romanowsky. Así que la FAB clasificó a la LLA en 3 grupos ( $L_1$ ,  $L_2$  y  $L_3$ ) y la LNLA en 6 grupos ( $M_1$  a  $M_6$ ) integrado en 1985 a la  $M_7$  (véase tablas 2 y 3).



Tabla 1

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE LAS LEUCEMIAS AGUDAS  
(POR ROMANOWSKY)

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS	LLA	LMA (LNLA)
Proporción		
Núcleo/Citoplasma	Alto	Bajo
Núcleo		
Patrón cromático	Fino	Reticular
Nucléolo	0 - 2	2 - 5
Citoplasma		
Color	Azul obscuro	Azul gris
Gránulos	Ausentes	Presentes
Cuerpos de Auer	Ausentes	Presentes

Poplack, D. "Acute Lymphoblastic Leukemia". Pediatric Oncology Principles and Practice of. USA, 1989 pp. 323-335

Tabla 2

CLASIFICACION DE LAS LEUCEMIAS LINFOBLASTICAS AGUDAS

( FAB )

CARACTERISTICAS	L <sub>1</sub>	L <sub>2</sub>	L <sub>3</sub>
Tamaño de célula	Pequeño	Grande Heterogéneo	Grande Homogéneo
Cromatina	Homogénea	Heterogénea	Homogénea finamente Punteada
Contorno	Regular	Irregular	Regular
Nucléolo	No visible	Uno o más	Prominente
Citoplasma	Escaso	Variable	Abundante
Basofilia Citoplasmática	Ligera	Variable	Muy intensa
Vacuola Citoplasmática	Variabes	Variabes	Prominentes

Villegas, A. "Morphology and Citochemistry of Leukaemia"

Bood, 26 ( 5 C ): 963 - 981, 1981

Tabla 3

CLASIFICACION MORFOLOGICA DE LAS  
LEUCEMIAS NO LINFOBLASTICAS AGUDAS (LNLA) SEGUN FAB

. M<sub>1</sub> o Leucemias Mieloblásticas Indiferenciada

Las células blásticas apenas están diferenciadas, carecen de granulación y generalmente de bastones de Auer.

. M<sub>2</sub> o Leucemias Mieloblásticas con Diferenciación

Las células presentan mayor grado de diferenciación y existencia de granulaciones. La célula más común es el promilocito. Se observan mielocitos, metamielocitos, bandas y segmentados. En médula ósea más del 50% de las células son mieloblastos y promielocitos. Los blastos contienen bastones de Auer, generalmente uno por célula.

. M<sub>3</sub> o Leucemia Promielocítica

La mayoría de las células, más del 80% son promielocitos, con gruesas granulaciones azurófilas y numerosos cuerpos de Auer formando haces.

. M<sub>4</sub> o Leucemias Mielomonoblástica

Se encuentran ambas líneas celulares, tanto mieloides como monocitoide, pero se requiere la presencia de más de un 20% de mieloblastos y promielocitos para clasificarla como M<sub>4</sub>. La médula ósea puede contener un alto porcentaje de precursores granulocíticos, en cuyo caso se asemeja a la M<sub>2</sub>. Cuando el porcentaje de monoblastos es alto se puede confundir con la M<sub>5</sub>.

• M<sub>5</sub> o Leucemia Monoblástica

Las células medulares son monoblastos con escasos número de mieloblastos más promielocitos, nunca excediendo del 20%

Puede presentarse como:

- pobremente diferenciada con grandes monoblastos de cromatina delicada y nucléolos vesiculares prominentes, el citoplasma es abundante, a menudo tienen seudópodos, rara vez con gránulos azurófilos.
- diferenciada, hay monoblastos, promonocitos y monocitos, la proporción de estos últimos es más alta en sangre periférica que en médula ósea, en ocasiones pueden presentar cuerpos de Auer.

• M<sub>6</sub> o Eritroleucemia

Componente eritrobástico superior al 50% de todas las células medulares nucleadas. Hay un exceso de mieloblastos más promielocitos superior al 40%.

• M<sub>7</sub> o Leucemia Megacarioblástica

Es la variedad más recientemente incluida por el grupo FAB. En la médula ósea debe existir más de un 30% de células de stirpe megacariocítica.

Villegas, A. "Morphology and Citochemistry of Acute Leukemia". Blood, 26 (5 C); 963-981, 1981.

### 2.5.2. Clasificación citoquímica

La clasificación propuesta por la FAB en muchas ocasiones es insatisfactoria, pues se requiere de una mayor precisión diagnóstica; por esta causa se ha establecido la clasificación citoquímica como auxiliar en la identificación de los diversos tipos celulares. Las técnicas están basadas en la demostración de ciertas enzimas y constituyentes químicos de las células, lo que caracteriza tendencia y grado de diferenciación celular. Dentro de las tinciones se puede mencionar la tinción de Mieloperoxidasa, PAS, Sudán Negro, Fosfatasa Acida y Esterasa Inespecífica (1,13, 14,15) (véase tabla 4).

### 2.5.3. Clasificación bioquímica

En relación a la clasificación bioquímica, se ha empleado la desoxinucleotidil transferasa terminal (Tdt), que es una enzima que permite diferenciar la LLA de la LNLA, ya que esta enzima sólo está presente en los linfoblastos y no en los linfocitos normales, tampoco se encuentra en la serie mieloide. La determinación de esta enzima es importante para diagnosticar recaídas a nivel testicular o del Sistema Nervioso Central (SNC) (2). (véase tabla 5).

Tabla 4

CITOQUIMICAS DE LAS LEUCEMIAS AGUDAS (LA)

LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA (LLA)

SUBTIPO DE LLA	Px	PAS	FOSFATASA ACIDA
		( % )	
L1	-	70 - 100	0 - 20
L2	-	0 - 20	70 -100
Indiferenciada	-	0 - 10	0 - 10

LEUCEMIA NO LINFOBLASTICA AGUDA (LNLA)

SUBTIPO DE LNLA	Px	SUDAN NEGRO	FOSFATASA ACIDA	PAS	ESTERASA
M1	+/**	+/**	+	-/+	+
M2	+/**	+/**	+	-/+	+
M3	+++	+++	+	+	+/-
M4	++	++	+	+	++
M5	-/+	-/+	+	-/+	+++
M6	++	++	+	++	+++
M7	-	-	-	+++	+

-: Negativo      + : Débilmente positivo      \*\*: Positivo

+++ : Fuertemente Positivo

.Mertelsmann, H.R. et al "Morphological Classification, Response to Therapy and Survival in 263 Patients With Acute Nonlymphoblastic Leukemia "Blood, Vol 56, No. 5 (November).1980.

.Villegas, A. "Morphology and Cytochemistry of Acute Leukaemia" Blood , 26 (5 C): 963-981, 1981.

#### 2.5.4. Clasificación inmunológica

La clasificación inmunológica es el avance más importante desde el punto de vista de diagnóstico, de la última década. La aplicación de los Anticuerpos Monoclonales (Ac Mo) al estudio de las leucemias ha permitido establecer subgrupos inmunológicos, que se traducen en estadios de maduración y diferenciación celular, con implicaciones pronósticas y terapéuticas.

La LLA puede ser clasificada según los marcadores superficiales de las células en: LLA T, LLA B, LLA no T no B.

Las LLA no T no B se subdividen en 2 grupos de acuerdo a la reacción del heteroantisuero de Greaves (suero que detecta la presencia de un antígeno linfoblástico común propio de la leucemia llamado CALLA) en: LLA no T no B común y LLA no T no B nula o indiferenciada. (16,17,18,19,20)

En nuestro país existen pocos estudios sobre la frecuencia inmunológica en la LLA. En 1987 el grupo de Puebla reportó los siguientes resultados: LLA CALLA 56%, LLA nula 10% LLA T 4.2%, LLA B 8.3% (2).

El estudio de los marcadores inmunológicos y su correlación con la FAB ha sido reportada; existe una mayor correlación entre L<sub>1</sub> y el antígeno CALLA y la L<sub>3</sub> y la expresión para marcadores B. No obstante lo antes mencionado cabe señalar que no existe una exacta correlación entre la clasificación citomorfológica y la inmunológica. (véase tabla

Tabla 5

## CLASIFICACION INMUNOLOGICA

LEUCEMIA	Ag CALLA	TdT	Ag Ia	CARACTERISTICAS	FRECUENCIA %	EDAD	PRONOSTICO
LLA T	-	-	-	Forma rosetas con eritrocitos de negro	20	Adultos principalmente	Malo
LLA B	-	-	+	Igs. de sup. morfología similar a las células de Burkitt	2	Adultos principalmente	extremadamente malo
LLA no T no B	-	-	-	Gran cantidad de receptores glucocorticoides en el citoplasma	70	Niños	Bueno
LLA pre B				Posee IgM intracitoplasmática	30% de los LLA común	Niños	Menor que la LLA común
LLA nula o Indiferenciada	-	-/-	-/-	Neg al suero de Graves	Variable	Grav Adultos	Variable

. Ag CALLA (Ag Linfoblástico común propio de las Leucemias

. TdT (Desoxinucleotidil Transferasa Terminal)

. Ag Ia (Ag. inmuno Asociado o Ag de células inmaduras)

Villegas, A. "Tratado de Medicina Práctica. Medicina. Hematología II". Primera serie, México, Mayo 1982. pp. 547-567



## 2.6 Anticuerpos Monoclonales (Ac Mo)

Los Anticuerpos Monoclonales (Ac Mo) surgieron accidentalmente en el Laboratorio de César Milstein, en Cambridge, Inglaterra, mientras se realizaban estudios sobre la genética de las Inmunoglobulinas utilizando técnicas de fusión y clonaje celular ( 21 ).

La fusión de células de mieloma y linfocitos esplénicos sensibilizados previamente con el Antígeno (Ag) permite obtener una línea celular, que luego de clonada es capaz de vivir indefinidamente como línea de cultivo y secretar Anticuerpos (Ac) homogéneos y específicos contra el Ag; a estos Ac se les llama Ac Mo (22).

### 2.6.1. Obtención de Anticuerpos Monoclonales

- 1.- Mantenimiento de una línea celular de mieloma en cultivo.
- 2.- Inmunización de ratones con el Ag apropiado.
- 3.- Realización de la esplenectomía.
- 4.- Las células esplénicas del ratón sensibilizado se fusionan con las células del mieloma, utilizando un agente solubilizador de membrana como el Polietilenglicol (PEG). Las células híbridas resultantes deben heredar del esplenocito sensibilizado la capacidad de producir Ac, y de las células mielomatosas la capacidad de vivir indefinidamente en cultivo.

5. Debido a que las células de mieloma tienen una vida ilimitada en los cultivos, se hace necesario separar las células híbridas de sus progenitores. Para esto se cultiva todo el conjunto en un medio selectivo HAT (Hipopoxantina Aminopterina Timidina). Las células del mieloma no fusionadas carecen de la enzima HGPRT (Hipopoxantina Guanina Fosforibosil Transferasa) 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 fusionaron no son inmortales y desaparecen en cultivos ininterrumpidos. De este modo solo sobreviven hibridomas estables en cultivo. (véase 4. 21, 22). (fig.1).

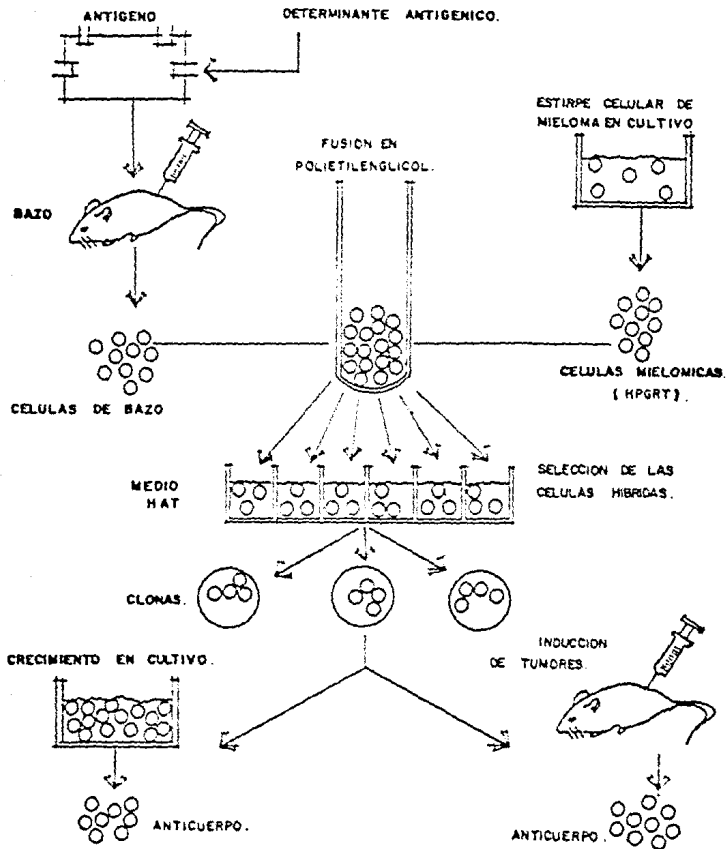
#### 2.6.2. Métodos utilizados para la detección de antígenos

Los anticuerpos (Ac) pueden ser unidos a una enzima, el conjunto así formado al entrar en contacto con el sustrato de la enzima hace posible detectar al antígeno (Ag) deseado.

Se han utilizado varias enzimas tales como: fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, glucosa oxidasa, pero la mejor aceptada ha sido la peroxidasa, por tener un tamaño molecular pequeño y un nivel endógeno relativamente bajo en muchas muestras tisulares (23).

FIGURA 1.

PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.



## MÉTODOS PARA LA APLICACION DE AC MO CON INMUNOPEROXIDASA

### Método Directo (Px)

En este método directo, la enzima Peroxidasa (Px) se une covalentemente al Ac para formar el llamado conjugado. Después que el conjugado se ha agregado se adiciona el sustrato de la enzima y el cromógeno para generar un producto final coloreado.

Este es un procedimiento de una etapa y por lo tanto es el método de inmunoperoxidasa más rápido. (véase fig. 2)

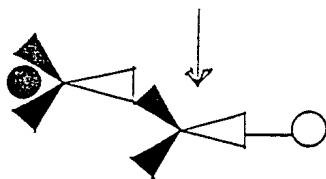
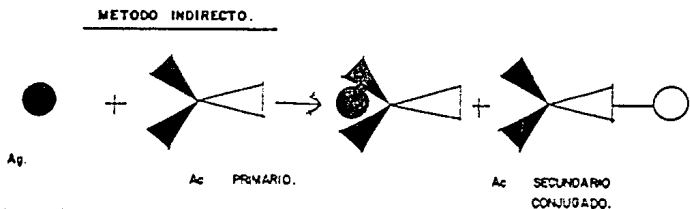
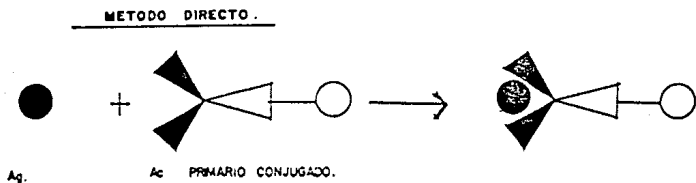
### Método Indirecto (Px)

Este método requiere de 2 Acs y es el llamado método del "sandwich".

- 1a. etapa Se adiciona el Ac primario producido en una segunda especie, dirigido contra el Ag en cuestión.
- 2a. etapa Adición del Ac secundario el cual se produce en una 3a. especie, dirigido contra la 2a. especies y conjugado con la enzima (23).  
(véase fig. 2 ).

FIGURA 2

METODOS PARA LA APLICACION DE AC MO CON INMUNOPEROXIDASAS.



**DISEÑO EXPERIMENTAL**

### 3.1. Objetivos

- . Clasificar morfológicamente las células inmaduras encontradas en un frotis de sangre periférica, según los criterios de la FAB.
- . Identificar el tipo de Leucemia Aguda (LA) por medio de tinciones citoquímicas de médula ósea.
- . Determinar dentro de los casos de LA el tipo y estado de diferenciación celular que se ve afectado con mayor frecuencia.
- . Clasificar las diferentes etapas de maduración de la población celular afectada dentro de las Leucemias Linfoblásticas Agudas (LLA), utilizando Anticuerpos Monoclonales.

### 3.2. Hipotesis

Las células sanguíneas al igual que las demás células del organismo, poseen marcadores tanto inmunológicos como citoquímicos con los cuales se hace posible su identificación.

Las reacciones citoquímicas permiten reconocer algunas veces la línea celular afectada por medio de la presencia o ausencia de ciertas enzimas (peroxidasa, fosfatasa ácida y esterasa) o sustancia almacenada (glucógeno y lípidos).

Con el uso de Anticuerpos Monoclonares dirigidos contra antígenos de superficie celular, se puede reconocer con exactitud la población o subpoblación y el grado de maduración en que se encuentran las células alteradas.



### 3.3. Material y Equipo

- Material biológico

Sangre periférica anticoagulada (aprox. 2ml)

Médula ósea (laminillas preparadas con médula ósea)

- Material de vidrio

caja de Petri "PYREX"

Cámara de Neubauer "AMERICAN OPTICAL"

Capilares sin heparina "PROPPER"

Cubrehematímetros "NBS"

Cubre objetos de 22 X 22 mm "MADESA"

Embudos de vidrio tallo corto "PYREX"

Matraces volumétricos de: 50, 100 y 1000 ml "PYREX"

Matraces Erlenmeyer de: 125 y 250 ml "PYREX"

Pipetas graduadas de: 1, 2, 5 y 10 ml "IVA"

Pipetas Pasteur

Pipetas de Sahli "PROPPER TROPHY"

Pipetas de Thoma para glóbulos blancos "PROPPER TROPHY"

Pipetas de Thoma para glóbulos rojos "PROPPER TROPHY"

Porta objetos 26 x 76 mm "MADESA"

Probetas de: 50, 100 y 500 ml "PYREX"

Tubos de ensaye 13 x 100 y 12 x 75 mm "PYREX"

Vasos de Coplin

Vasos de precipitado de: 100, 250, y 500 ml "PYREX"

Material diverso

Aceite de inmersión "SIGMA ZEISS"

Algodón y grasas

Aplicadores de madera

Barras magnéticas

Espátulas

Gradillas

Jeringas de plástico de 5 y 10 ml "JERIPLAS"

Mechero Fisher

Papel filtro No. 3

Papel parafilm "AMERICAN COMPANY"

Pipetas automáticas de: 10, 25, 100 y 500  $\mu$ l

Rejilla de alambre

Tripie

Contador (piano) "CLAY ADAMS"

Equipo

Balanza analítica "METTLER"

Balanza granataria "METTLER"

Centrifuga "SOL BAT"

Congelador a -20 °C "REVCO RHEEM"

Refrigerador a 4 °C "GENERAL ELECTRIC"

Estufa a 37 °C "J. M. ORTIZ"

Microscopio de luz visible "CARL ZEISS"

Espetrofotómetro "COLEMAN"

Agitador mecánico de pipetas "J 15"

Potenciómetro "BECKMAN"

## Reactivos

### Sólidos

Ferricianuro de potasio  
Cianuro de potasio  
Bicarbonato de sodio  
Oxalato de amonio  
Benzidina diclorhidrato  
Sulfato de zinc heptahidratado  
Fenol (cristales)  
Fosfato de sodio dibásico dodecahidratado  
Fosfato de sodio dibásico anhidro  
Acido peryódico  
Metabisulfito de sodio  
Carbón activado  
Nitrito de sodio  
Acetato de sodio trihidratado  
Naftol AS BI  
Acido tartárico  
Cloruro de sodio  
Fosfato de potasio monobásico  
Tris- Hidroximetil-aminometano

### Líquidos

Acido acético glacial  
Formaldehído  
Etanol absoluto  
Peróxido de hidrógeno  
Acido clorhídrico

Acetona  
N,N-dimetilformamida  
Isopaque  
Ficoll

- Colorantes

Violeta de genciana  
Safranina "0"  
Sudán negro B  
Fuchsina básica  
Clorhidrato de p-rosanilina  
Verde de metilo  
Leishman  
Giemsa

- Soluciones

Versanato de sodio al 10%  
Líquido de Drabkin  
Líquido de Hayem  
Líquido de Turk  
Oxalato de amonio al 1%  
Peróxido de hidrógeno al 3%  
Hidróxido de sodio 1.0 N  
Acido clorhídrico 1.0 N  
Acido acético 1.0 N  
Amortiguador de acetatos 0.1 N  
Verde de metilo al 1%

### 3.4. Consideraciones previas a la toma de muestra

Se seleccionaron 64 pacientes que ingresaron al servicio de Hematopediatria del Hospital General Centro Médico "LA RAZA", con diagnóstico de Probable Leucemia, los pacientes requerían estar sin tratamiento para ser incluidos en este trabajo.

### 3.5. Desarrollo del Trabajo

A los 64 pacientes se les realizaron las siguientes determinaciones:

- . Citometría
  - Concentración de Hemoglobina
  - Hematócrito
  - Cuenta de leucocitos
  - Cuantificación de plaquetas
  - Recuento diferencial de leucocitos
  
- . Tinción de Leishman-Giemsa en Médula Osea (M.O.) para clasificación morfológica.
  
- . Tinciones Citoquímicas

Se realizaron Tinciones Citoquímicas en M.O. de acuerdo al diagrama 1.
  
- . La clasificación de las LLA utilizando Anticuerpos Monoclonales (Ac Mo), no se realizó porque demostró no ser confiable, ya que los resultados obteni

dos siguiendo la Técnica de Inmunoperoxidasa no fueron lo suficientemente claros para hacer la interpretación y cuantificación de la células positivas al anticuerpo debido a la presencia de tinciones inespecíficas y difusas, por lo tanto el objetivo se enfocó a estandarizar dicha Técnica realizando diversas pruebas con el fin de detectar la causa o causas que provocan esos resultados.

(Véase en metodología "Estandarización de la Técnica de Inmunoperoxidasa").







## HEMATOCRITO

Fundamento: Técnica del micrométodo.

El hematocrito se basa en la separación de los glóbulos rojos y el plasma cuando se centrifuga la sangre, el paquete de eritrocitos en por ciento es el resultado que se informa.

Procedimiento:

1. Llenar las dos terceras partes de un tubo capilar con sangre mezclada con anticoagulante.
2. Sellar a la flama o con plastilina por el extremo más distante a la sangre con el objeto de no hemolizarla.
3. Colocarlo en una microcentrífuga y centrifuga de 10.000 a 12.000 r.p.m. durante 5 minutos.
4. Leer en mm la longitud total y la del paquete eritrocitario.
5. Calcular el porcentaje del paquete eritrocitario con relación al volumen total.

Valores de referencia: Hombres  $47 \pm 7\%$   
Mujeres  $42 \pm 5\%$

## CUENTA DE GLOBULOS BLANCOS

Fundamento:

El líquido de Turck que contiene acético glacial

lisa los eritrocitos, permitiendo la cuenta de los leucocitos.

Procedimiento:

1. Llenar con sangre anticoagulada la pipeta de Thoma para globulos blancos hasta la marca de 0.5
2. Limpiar la sangre adherida en el exterior de la pipeta con una gasa.
3. Completar hasta la marca 1.1. con líquido de Turck.
4. Homogenizar durante 3 minutos en el agitador de pipetas.
5. Colocar el cubrenematímetro sobre la cámara de Neubauer.
6. Descartar las primeras 4 ó 5 gotas de la pipeta y llenar la cámara por uno de sus bordes.
7. Dejar que el líquido penetre lentamente en la superficie de la cámara.
8. Dejar reposar de 3 a 5 minutos.
9. Observar al microscopio con el objetivo 10 X. Contar los leucocitos en los cuatro cuadrantes de los extremos.

Valores de referencia: 5,000 - 10,000 cel/mm<sup>3</sup>

## CUANTIFICACION DE PLAQUETAS

### Fundamento:

Se lisan los eritrocitos con una solución de oxalato de amonio al 1.0% y se hace cuenta directa de plaquetas con microscopio de contraste de fases en una cámara de Neubauer.

### Procedimiento:

1. Mezclar perfectamente la sangre anticoagulada.
2. Llenar con la muestra la pipeta de Thoma para glóbulos rojos hasta la marca de 0.5.
3. Limpiar la sangre adherida al exterior de la pipeta con una gasa.
4. Completar hasta la marca 101 con diluyente de plaquetas (oxalato de amonio al 1.0%).
5. Homogenizar por 3 minutos en el agitador de pipetas.
6. Colocar el cubrehematímetro sobre la cámara de Neubauer.
7. Descartar las primeras 5 ó 6 gotas de la pipeta. Llenar la cámara por uno de los bordes.
8. Dejar reposar durante 15 minutos dentro de una cámara húmeda.
9. Observar al microscopio con el objetivo de 40 X .

10. Contar las plaquetas en 10 cuadros pequeños  
(como para recuento de eritrocitos).

Valores de referencia: 150,000 - 450,000 plaq./mm<sup>3</sup>

#### TINCION DE LEISHMAN-GIEMSA

##### Fundamento:

Esta formado por la combinación de un colorante ácido y un básico que permite su uso en una tinción simple para producir una variedad de reacciones de color predecibles.

Los colorantes ácidos se unen con los componentes básicos de las células (citoplasma). Inversamente los colorantes básicos son atraídos por los compuestos ácidos de la célula y se combinan con ellos (ácidos nucleicos y nucleoproteínas del núcleo).

##### Procedimiento:

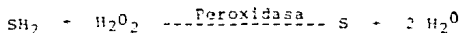
1. Teñir durante 6 min aproximadamente con Leishman.
2. Enjuagar 2 veces con agua destilada.
3. Teñir con Giemsa 3 min aproximadamente.
4. Enjuagar con agua destilada.

\* Los tiempos dependen de la maduración del colorante.

## TINCION DE PEROXIDASA

### Fundamento:

Las peroxidasa que contienen hierro son localizadas en los gránulos primarios (azurófilos) de los miembros de la serie mielóide. Su presencia puede ser demostrada por medio de sustancias cromogénicas y  $H_2O_2$ . El sistema peroxidasa/-peróxido oxida rápidamente las sustancias indicadoras de peroxidasa incoloras (S) a productos colorados de acuerdo a la siguiente reacción:



### Procedimiento:

1. Fijar la extensión de médula ósea con mezcla de etano/ formol durante 60 segundos.
2. Lavar con agua corriente de 15 a 30 segundos, quitar el exceso de agua.
3. Colocar en mezcla la tinción durante 30 segundos a temperatura ambiente.
- 4.- Lavar con agua corriente por 5 a 10 segundos, retirar el exceso de agua.
5. Teñir con safranina durante 60 segundos.
6. Lavar con agua y dejar secar.

### Interpretación:

Las células peroxidasa positiva contienen gránulos café verdosos y amarillo - azul - verdoso. el núcleo y los eritrocitos se tiñen de rojo con la safranina.

## TINCION DE SUDAN NEGRO B

### Fundamento:

El Sudán Negro B tiñe una variedad de lípidos, incluyendo grasas neutras, fosfolípidos y esteroides. La presencia de los lípidos se demuestra por la capacidad del colorante de abandonar su solvente y concentrarse preferencialmente en el lípido intracelular.

### Procedimiento:

1. Fijar la extensión de médula ósea con vapores de formal durante 15 minutos.
2. Sumergir en solución de trabajo por 45 minutos.
3. Lavar en etanol absoluto (aproximadamente con 2 ml).
4. Lavar con agua corriente y dejar secar.
5. Contrateñir con Giemsa de 3 a 6 minutos.

### Interpretación:

Gránulos citoplásmicosnegros o coloración negra difusa del citoplasma indican reacción positiva.

## TINCIÓN DE PAS

### Fundamento:

El glucógeno de las células hemáticas es el polisacárido más importante que reacciona positivamente con el reactivo de Schiff. La fase inicial de la tinción de PAS es la oxidación de polisacáridos. El ácido peryódico escinde los grupos hidroxílos próximos y forma dialdehídos; posteriormente los aldehídos reaccionan con la leucofucsina (reactivo de Schiff) y forman compuestos quinonoídicos coloreados. El glucógeno es la única sustancia PAS positiva que es diastasa (amilasa) sensible.

### Procedimiento:

- 1.- Fijar con vapores de formol durante 5 minutos.
2. Lavar con agua corriente durante 15 minutos.
3. Dejar secar.
4. Sumergir en ácido peryódico al 0.5% durante 10 minutos.
5. Lavar con agua destilada 3 ó 4 veces. Dejar secar.
6. Sumergir en reactivo de Schiff durante 30 minutos al abrigo de la luz.
7. Lavar con solución de metabisulfito de sodio al 0.5% Tres veces de tres minutos cada una.
8. Lavar con agua destilada 3 veces de tres minutos cada una.
9. Contrateñir con Hematoxilina por 10 minutos.

10. Lavar con agua.

**Interpretación:**

**El material que contiene carbohidratos de tinte de rojo.**



## TINCIÓN DE FOSFATASA ÁCIDA

### Fundamento:

La fosfatasa ácida esta presente en las células mieloides linfocitos, células plasmáticas, monocitos y plaquetas. Las fosfatasas poseen la característica de liberar fosfato de muchos fosfomonoésteres alcohólicos o fenólicos a un pH por arriba o abajo de la neutralidad. Su demostración depende de la información de un precipitado coloreado en los sitios de hidrólisis del sustrato.

### Procedimiento :

1. Se deben preparar 2 frotis de cada paciente (sangre o médula ósea). Marcar un frotis de cada paciente y control normal con I y el frotis con II.
2. Fijar los frotis con amortiguador de formalina/acetona a 4 - 10 °C durante 30 segundos.
3. Lavar con agua destilada
4. Colocar los frotis marcados en la mezcla de incubación correspondiente. Incubar a 37 °C durante 60 minutos.
5. Lavar dos veces con agua destilada.
6. Contrateñir con solución de verde de metilo al 1% en amortiguador de acetatos 0.1 N pH 5 durante 2 minutos.
7. Lavar rápidamente con agua corriente y dejar secar.

### Interpretación :

Tinción difusa del citoplasma o gránulos de color rojo indican reacción positiva.

## TINCION DE ESTERASA NO ESPECIFICA

### Fundamento:

Las esterases son un grupo de enzimas lisosomales que hidrolizan ésteres alifáticos y aromáticos. La esterasa no específica se puede demostrar usando alfa-naftil-acetato como sustrato y pararosanilina como agente copulante azo para formar un colorante diazo café-rojizo.

### Procedimiento:

1. Fijar con vapores de formol de 4 a 5 minutos. Lavar con agua corriente y después con agua destilada. Secar al aire.
2. Los frotis de médula ósea serán desengrasados con éter por inmersión durante 60 segundos.
3. Mezclar 2 gotas (0.1 ml) de solución de nitrito de sodio al 4% y 2 gotas de solución de pararosanilina al 4%, dejar reposar por lo menos 60 segundos. Diluir la mezcla con 5 ml de solución amortiguadora de fosfatos 0.2 M de pH 7.0 - 7.1.
4. Disolver completamente 10 mg de alfa-naftil-acetato en 0.3 ml de acetona. Diluir en 20 ml de solución amortiguadora de fosfatos a agitar enérgicamente hasta la desaparición del enturbiamiento inicial.
5. Mezclar las soluciones (3) y (4), filtrar la mezcla (solución de incubación).

6. Incubar los frotis durante 60 minutos a temperatura ambiente .
7. Lavar con agua corriente.
8. Contrateñir con hematoxilina de Mayer por 8 a 10 minutos. Lavar con agua corriente.

Interpretación :

El citoplasma de las células que poseen una actividad este rásica se colorea de café o café-rojizo.

La reacción es particularmente indicativa de monocitos, donde el citoplasma se colorea de una manera homogénea e intensa. Los linfocitos T muestran algunos gránulos aislados del mismo color.

## SEPARACION DE LINFOCITOS

### Fundamentos:

El procedimiento se basa en la separación de las células al ser centrifugadas en un gradiente de densidad proporcionado por la mezcla de Ficoll-Hypaque. Este método da un rendimiento de 70 a 90 % de células mononucleares con alto grado de pureza.

### Procedimiento :

1. Realizar una toma de 5 a 10 ml sangre periférica y agregar dos gotas de heparina.
2. Diluir al doble con amortiguador PBS pH 7.4.
3. Estratificar 4ml de sangre diluida sobre 2 ml de solución de Ficoll-hypaque en un tubo de ensayo de 13 x 100 mm.
4. Centrifugar a 2000 rpm durante 20 minutos.
5. Separar la tracción de células mononucleares (capa de células entre el plasma y la solución de Ficoll-Hypaque) con la ayuda de una pipeta Pasteur.
6. Transferir la copa de células a un tubo de ensayo de 13 x 100 mm y centrifugar a 2000 rpm durante 10 minutos.
7. Lavar la células con amortiguador PBS centrifugar a 2000 rpm durante 10 minutos por tres ocasiones.
8. Decantar el sobrenadante y resuspender en un mínimo de volumen de PBS, ajustando la concentración de células

de uno a tres millones por  $\text{mm}^3$

9. Marcar círculos pequeños (aproximadamente 1 cm de diámetro) y aplicar una gota de la suspensión de células en cada uno de ellos y dejar secar.

## IDENTIFICACION DE LA ESTIRPE LINFOIDE AFECTADA

### (ANTICUERPOS MONOCLONALES)

#### Fundamento:

Las células del sistema inmune humano pueden ser clasificadas y divididas dentro de subpoblaciones por determinantes antigénicos sobre la superficie celular y estructuras internas.

Los linfocitos aislados reaccionan con los anticuerpos monoclonales en el caso de que exista el correspondiente receptor en el linfocito. A continuación se añade el conjugado de peroxidasa se revela su actividad con ayuda de un cromógeno del cual depende la formación de un ligero precipitado color marrón en los sitios de unión del anticuerpo monoclonal.

#### Procedimiento ;

1. Fijar las preparaciones durante 30 seg en formalina al 37% .
2. Enjuagar durante 5 min con amortiguador TRIS pH 7.6.
3. Incubar 15 min en cada mezcla de 48.5 ml de metanol y 1.5 ml de peróxido de hidrógeno.
4. Enjuagar durante 5 min con amortiguador TRIS pH 7.6.
5. Diluir el anticuerpo monoclonal con 245 microlitros de solución de TRIS-albúmina sérica bovina al 1 % .
6. Colocar 20 microlitros sobre cada preparación.

7. Incubar durante 30 min en cámara húmeda a temperatura ambiente.
8. Enjuagar durante 5 min con amortiguador TRIS pH 7.6
9. Diluir el conjugado de peroxidasa 1:20 con TRIS-albúmina sérica bovina al 1 %.
10. Colocar 20 microlitros sobre cada preparación e incubar durante 30 min en cámara húmeda a temperatura ambiente.
11. Enjuagar durante 5 min con amortiguador TRIS pH 7.6
12. Preparar DAB ( disolver 0.6 mg/ml de 3,3'-diaminobencidina tetracloruro en amortiguador TRIS), inmediatamente antes de la tinción añadir 0.01 % de  $H_2O_2$ .
13. Incubar los portaobjetos en solución DAB durante 8 min a temperatura ambiente.
14. Enjuagar 2 veces durante 5 min con TRIS pH 7.6.
15. Contrateñir con Hematoxilina de Mayer durante 3 min.
16. Enjuagar con agua corriente.

Valoración microscópica :

Contar 200 linfocitos y determinar el porcentaje de células positivas al anticuerpo monoclonal.

## ESTANDARIZACION DE LA TECNICA DE INMUNOPEROXIDASA

La estandarización se realizó con 2 conjugados de diferentes casas comerciales:

- . Anti IgG de ratón (de conejo) conjugado con peroxidasa de Behring.
- . Anti-Fragmento Fc de ratón (de cabra) conjugado con peroxidasa de Cooper-Biomedical Cappel.

Los Anticuerpos Monoclonales fueron de Behring (véase tabla en apéndice).

Todas las pruebas se efectuaron con sangre de persona sana y se ejecutaron por duplicado como mínimo.

Pruebas realizadas:

1. Empleo de diferentes fijadores a distintas concentraciones y tiempos, para determinar cual de ellos conservaba en mejores condiciones a la célula (mínima afectación de la membrana celular).

- . Acetona
  - . Formaldehído
  - . Mezcla de metanol + peróxido de hidrógeno al 1 % + 0.5 % de formaldehído al 30 %.
- Contratinción con hematoxilina.

El fijador que conservó en mejor estado a la célula fue la mezcla de metanol + peróxido de hidrógeno + formaldehído, a partir de este punto, todas las fija



ciones e inhibiciones se realizaron con dicha mezcla.

2. Evaluación de la actividad de los Ac Mo por el Método de Fluorescencia (método estandarizado). Véase técnica apéndice.

Ac Mo utilizados:	Valores de referencia
. BMA 020 (Linfocitos B. DR)	12 $\pm$ 5
. BMA 030 (PAN T-Linfocitos)	70 $\pm$ 10
. BMA 040 (Linfocitos T ayudadores)	50 $\pm$ 15

Resultados:

. BMA	020	6
. BMA	030	62
. BMA	040	60

Los resultados obtenidos estuvieron dentro de los valores de referencia, con lo que se comprobó que los Ac Mo se unían a su correspondiente receptor en el linfocito y por lo tanto se encontraban en buen estado para ser utilizados.

3. Detectar tinción inespecífica

Control 1:

- . Fijar e inhibir la peroxidasa endógena con metanol + peróxido de hidrógeno + formalina durante 30 min.
- . Lavar 2 veces de 5 min. cada una con TRIS
- . Revelar con DAB por 8 min.
- . Lavar 2 veces de 5 min. cada una con TRIS

- . Tinción de contraste con hematoxilina de de Harris por 2 seg.
- . Lavar con agua corriente.

Control 2:

- . Fijar e inhibir la peroxidasa endógena
- . Lavar con TRIS
- . Agregar el monoclonal dil 1:10 con SFT al 5% con TRIS
- . Incubar 30 min a temperatura ambiente
- . Lavar con TRIS
- . Revelar con DAB por 8 min
- . Lavar con TRIS
- . Contrateñir con hematoxilina de Harris
- . Lavar con agua corriente.

Control 3:

- . Fijar e inhibir la peroxidasa endógena
- . Lavar con TRIS
- . Agregar el Conjugado de Peroxidasa (Cooper Biomedical Cappel) dil 1:10
- . Incubar 30 min
- . Lavar con TRIS
- . Revelar con DAB por 8 min
- . Lavar con TRIS
- . Contrateñir con hematoxilina de Harris
- . Lavar con agua.

Control 4:

Realización de la técnica original empleando el conjugado de Behring. (Véase "Identificación de la estirpe afectada por medio de Ac Mo").

Control 5:

Realización de la técnica original empleando el conjugado de Cooper Biomedical Cappel.

Los Ac Mo utilizados fueron BMA 020 y BMA 030

Resultados:

1. Tinción negativa
  2. Tinción negativa
  3. Tinción inespecífica y células con diferentes grados de tinción.
  4. Tinción negativa
  5. Tinción inespecífica y células con diferentes grados de tinción.
4. Técnica efectuada en suspensión (Conjugado Cappel)
- . 25  $\mu$ l de Ac
  - . 25  $\mu$ l de suspensión de linfocitos
  - . Incubar 30 min a temperatura ambiente
  - . Lavar 2 veces con TRIS (200  $\mu$ l)
  - . 25  $\mu$ l de conjugado de Px
  - . Incubar 30 min a temperatura ambiente
  - . Lavar 2 veces con TRIS

- . Incubar 10 min con DAB
- . Lavar 2 veces con TRIS
- . Contrateñir con hematoxilina de Harris.

Para evaluar las células muertas se agregó Azul Tripan.

Resultados:

Aproximadamente la mitad de las células se encontraron muertas.

No se observó reacción positiva.

#### 5. Utilización de Lisina

Lisina 1.0 M para bloquear grupos aldehído (posibles causantes de la unión inespecífica del conjugado). Se realizó la técnica original, con la única variante de lavar después de la fijación e inhibición con lisina 1.0 M en PBS.

Resultados:

Tinción inespecífica no uniforme.

#### 6. Empleo de suero de cabra

Suero de cabra diluido para inhibir la tinción inespecífica.

Se aumento una incubación de 1 h con suero de cabra diluido 1:10 y 1:20 después de agregar el Ac Mo, los pasos siguientes se realizaron de acuerdo a la técnica

ca original.

**Resultados:**

Se observó tinción inespecífica, no distinguiéndose con precisión las células positivas al Ac Mo, debido a que se presentaron diferentes grados de tinción.

R E S U L T A D O S

- . Gráfica 1, muestra la edad y sexo en la que se presenta mayor incidencia de LA.
- . Tabla 1, se aprecian los valores obtenidos de los parámetros hematológicos que presentaron los pacientes antes de iniciar el tratamiento.
- . Gráfica 2, se observa la frecuencia de las LA clasificadas por la FAB en el grupo de estudio.
- . Gráfica 3 y 4, se observan los porcentajes encontrados de los diferentes subtipos de LLA y LNLA.
- . Tabla 2, se comparan los porcentajes de subtipos de LLA clasificados por FAB obtenidos en este estudio con los reportados en la literatura.
- . Gráfica 5, muestra la comparación de la incidencia de LLA y LNLA con respecto a la edad.
- . Tablas 3 y 4, se aprecia la correlación encontrada entre la clasificación morfológica y la clasificación citoquímica de las LLA y las LNLA.

**GRAFICA 1**  
**DISTRIBUCION POR EDAD Y SEXO DE**  
**PACIENTES CON DIAGNOSTICO DE LA**

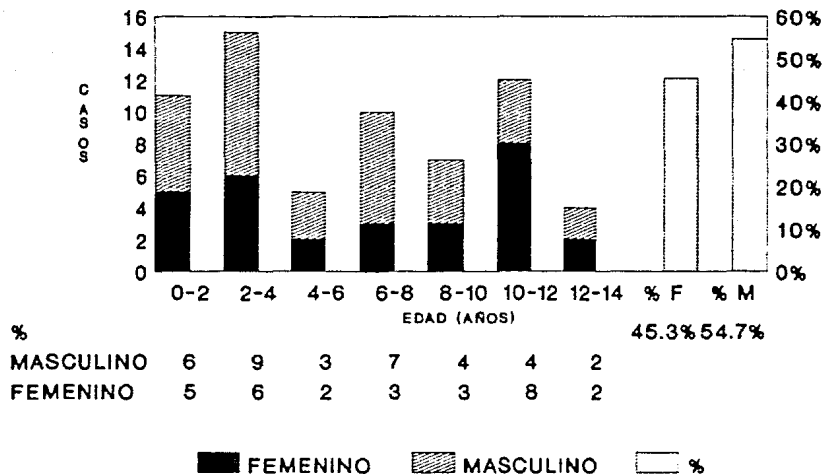




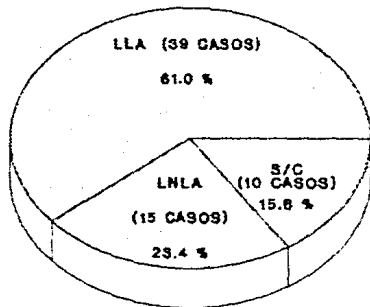
Tabla 1

## RESULTADOS DE PARAMETROS HEMATOLOGICOS

	No. de Pacientes	%
No. de Leucocitos (células/mm <sup>3</sup> )		
menos de 5 000	17	26.6
de 5 000 a 10 000	9	14.0
de 10 000 a 50 000	22	34.4
más de 50 000	16	25.0
Hemoglobina (g/100 ml)		
menos de 7.0	20	31.3
de 7.0 a 11.0	39	60.9
más de 11.0	5	7.8
No. de plaquetas (células /mm <sup>3</sup> )		
menos de 20 000	23	35.9
de 20 000 a 150 000	32	50.0
más de 150 000 a 350 000	6	9.4
más de 350 000	3	4.7
No. de Blastos en sangre periférica (presentes en 100 células)		
2 a 24	22	34.4
25 a 49	9	14.4
50 a 74	8	12.6
75 a 100	25	39.0

Nota: Valores obtenidos antes de iniciar tratamiento.

GRAFICA 2  
FRECUENCIA DE LA LEUCEMIA AGUDA (LA)  
SEGUN CLASIFICACION FAB

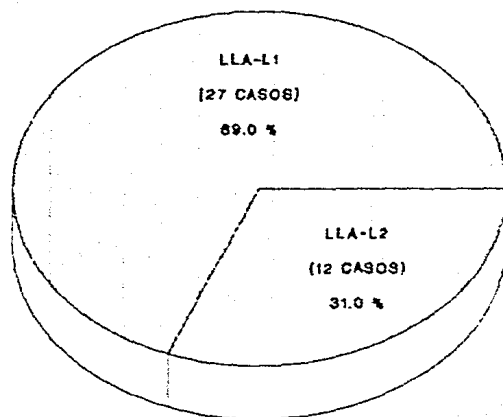


LLA - LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA

LNLA - LEUCEMIA NO LINFOBLASTICA AGUDA

S/C - LEUCEMIA SIN CLASIFICACION FAB

GRAFICA 3  
INCIDENCIA DE LOS DIFERENTES SUBTIPOS  
DE LLA IDENTIFICADOS SEGUN FAB



GRAFICA 4  
INCIDENCIA DE LOS DIFERENTES SUBTIPOS  
DE LNLA IDENTIFICADOS POR FAB

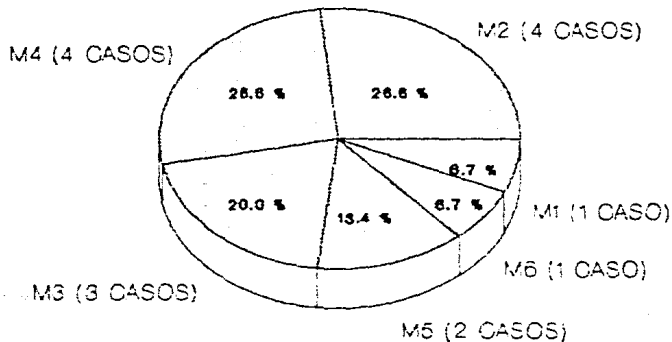


Tabla 2

TABLA COMPARATIVA DE LOS SUBTIPOS MORFOLOGICOS DE LLA++

AUTOR	L <sub>1</sub>	L <sub>2</sub>	L <sub>3</sub>
	( % )		
Keleti et al *	63	36	1
Coccia et al +	78	22	0
Hann et al +	73	24	3
Viana et al	71	25	4
Bennet et al +	80	17	3
Trabajo Realizado (HGCM LA RAZA)	69	31	0

\* Bennet et al "The Morfological Classification of Acute Lymphoblastic Leukaemia: Concordance Among Observers and Clinical Correlations". British Journal of Hematology, 1981, 47, 553-561.

\*\* Clasificación obtenida por la FAB

GRAFICA 5  
CASOS DE LEUCEMIA AGUDA CLASIFICADOS  
POR CITOQUIMICA. DISTRIBUCION POR EDAD

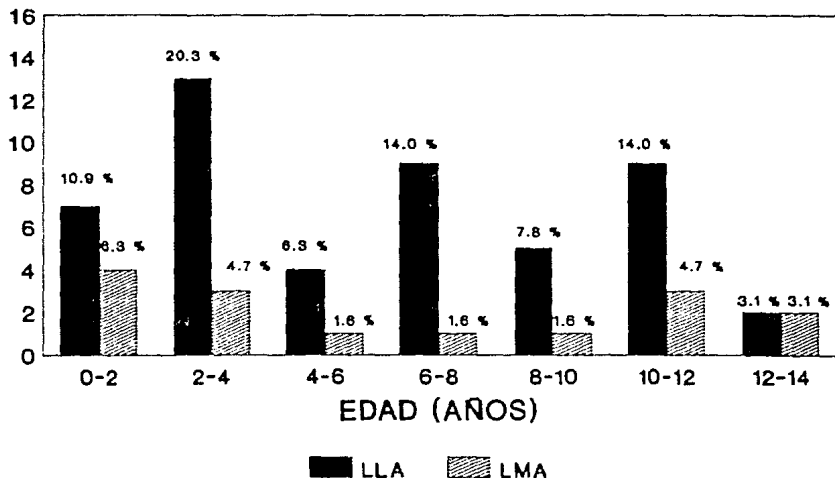


TABLA 3

CORRELACION DE LLA ENTRE LA CLASIFICACION FAB  
Y LA CLASIFICACION CITOQUIMICA

		CLASIFICACION CITOQUIMICA			
		L1	L2	I	TOTAL
CLASIFICACION FAB	L1	15	3	9	27
	L2	2	2	8	12
	S/C	1	1	8	10
	TOTAL	18	6	25	49

I = LEUCEMIA INDIFFERENCIADA AGUDA

S/C = SIN CLASIFICACION MORFOLOGICA (FAB)

TABLA 4

CORRELACION DE LNLA ENTRE LA CLASIFICACION DE LA FAB  
Y LA CLASIFICACION CITOQUIMICA

		CLASIFICACION CITOQUIMICA						
		M1	M2	M3	M4	M5	M6	TOT
C L A S I F I C A C I O N  F A B	M1	1	-	-	-	-	-	1
	M2	-	4	-	-	-	-	4
	M3	-	-	3	-	-	-	3
	M4	-	2	-	1	1	-	4
	M5	-	-	-	-	2	-	2
	M6	-	-	-	-	-	1	1
	TOT	1	6	3	1	3	1	15



ANALISIS DE RESULTADOS

De los 64 pacientes estudiados el 54.7% (35 pacientes) corresponden al sexo masculino y el 45.3% (29 pacientes) al femenino. El sexo masculino fue predominante en todos los grupos, a excepción del comprendido entre 10 y 12 años. La relación entre el número de pacientes masculinos y femeninos fue de 1.207, concordando con lo reportado en la literatura que es de 1.3.

La edades de los pacientes fluctuaron entre recién nacidos y 14 años. Presentándose el mayor número de casos 23.4% (15 pacientes) entre 2 y 4 años, con una tendencia descendente hasta los 10 años y un incremento entre 10 y 12 años (véase gráfica 1).

En cuanto a los parámetros hematológicos encontrados inicialmente en sangre periférica; el 14% de los casos tuvieron una cuenta de leucocitos normal (5,000 a 10,000 células/mm<sup>3</sup>), el mayor porcentaje (34.4%) fue para valores de 10,000 a 50,000 células/mm<sup>3</sup>, los extremos en los que los leucocitos fueron menores a 5,000 ó mayores a 50,000 tuvieron porcentajes similares, 26.6 y 25.0 respectivamente. Con referencia a la hemoglobina, el 7.8% presentó cifras mayores de 11.0 g/100 ml, el 31.2% menores a 7.0 g/100 ml y el porcentaje mayor (60.9%) fue de 7.0 a 11.0 g/100 ml. El número de plaquetas fue normal en sólo el 9.4% de los pacientes, el mayor número de casos (85.9%) fue para los pacientes que reportaron de 20,000 a 150,000 plaquetas/mm<sup>3</sup>.

En la totalidad de los pacientes la presencia de blastos fue la pauta para la realización del estudio morfológico y citoquímico. Notándose que el mayor número de pacientes presentaban blastos entre los rangos menor y mayor establecidos para este trabajo, siendo estos de 2 a 24 y de 75 a 100 blastos (véase tabla 1).

Los resultados obtenidos concuerdan con la literatura, ya que ésta reporta que: alrededor del 15% de los casos presentan al momento del diagnóstico cifras normales de leucocitos, el 30% aproximadamente leucopenia y el 25% cifras superiores a 50 000 células/mm<sup>3</sup>. La hemoglobina entre 5 y 8 g/100 ml. Las cifras de plaquetas son inferiores a lo normal en el 50% de los pacientes y en el 40% inferior a 50 000. Las cifras de blastos son reportadas como muy variables (2).

En los 64 casos estudiados se realizó la clasificación morfológica según los criterios de la FAB, encontrándose que un 61.0% corresponde a LLA, 23.4% a LNLA y en el 15.6% restante no fue posible efectuar dicha clasificación por no ser suficientemente claras las características morfológicas, y es en estas ocasiones donde son de gran utilidad las citoquímicas (véase gráfica 2).

En la gráfica 3, se observan los subtipos de la LLA clasificados por FAB, siendo el mayor porcentaje (69.0%) para las L<sub>1</sub>.

La gráfica 4, nos muestra que la M<sub>2</sub> y la M<sub>4</sub> son los subtipos más frecuentes para las LNLA con un 26.6%.

En la tabla 2, se comparan los resultados obtenidos en este estudio y los reportados por diversos investigadores, observándose que existe una alta correlación.

La gráfica 5, nos indica que de acuerdo a la clasificación realizada en base a la reacción de peroxidasa, el número mayor de casos de LLA fue para el intervalo de 2 a 4 años, asimismo se muestra que para la LNLA fue de 0 a 2 años disminuyendo en el rango de 4 a 10 años y aumentando entre 10 y 12 años para estas últimas.

La correlación entre la clasificación de la FAB y la clasificación citoquímica para las LLA se muestra en la tabla 3, encontrándose que de los 27 casos clasificados por FAB como L<sub>1</sub>, el 55.6% (15 casos) corresponden con la clasificación citoquímica. De los 12 casos de L<sub>2</sub> sólo concordaron el 16.0% (2 casos); los casos restantes de ambos subgrupos fueron clasificados en su mayoría como Leucemia Indiferenciada Aguda (LI), por presentar porcentajes de positividad muy bajo o bien negativo. Y según la literatura los hematólogos consideran que cuando las tinciones citoquímicas tienen valores de positividad muy bajos o negativos las leucemias se clasifican como Indiferenciadas Agudas. Los resultados obtenidos en esta tabla corroboran que en

muchas ocasiones la morfología no es suficiente para hacer una correcta clasificación, pues células de aspecto morfológico similar pueden tener diferente actividad enzimática (7).

En los 10 casos en los que no fue posible realizar una clasificación morfológica, se efectuó clasificación por medio de citoquímicas, quedando 8 casos dentro de las Leucemias Indiferenciadas y los 2 restantes como L<sub>1</sub> y L<sub>2</sub>.

Con respecto a las LNLA, la tabla 4 nos muestra mayor correlación entre ambas clasificaciones, de los 15 casos señalados morfológicamente sólo 3 no corresponden a su clasificación citoquímica, siendo éstos los correspondientes al tipo M<sub>4</sub> que por citoquímica quedaron 2 como M<sub>2</sub> y 1 como M<sub>5</sub>.

Esta discrepancia se debió a que la médula ósea puede contener un alto porcentaje de precursores granulocíticos en cuyo caso M<sub>2</sub> puede confundirse con M<sub>4</sub>. Y cuando el porcentaje de monocitos es alto, se hace difícil el diagnóstico diferencial entre M<sub>4</sub> y M<sub>5</sub> (24).

De acuerdo a los controles realizados en la estandarización de la Técnica de inmunoperoxidasa, se identificó que la tinción inespecífica presente se debe al Conjugado con Peroxidasa, ya que en el Control 3 se esperaban resultados negativos debido a la ausencia de un Ac Mo previo, sin embargo se obtuvieron resultados positivos sin uniformidad

de tinción, tal como aparece en el procedimiento completo. En un principio se creyó que la tinción inespecífica se debía a un grupo aldehído no eliminados y dado que estos se pueden bloquear con lisina, se utilizó esta en los lavados, pero con resultados insatisfactorios pues se siguió obteniendo una tinción positiva no uniforme e inespecífica. Dado que el Anti Fc de ratón se obtiene en cabra se utilizó suero de esa especie para evitar la unión inespecífica, sin obtener buen resultado (23).

CONCLUSIONS

- . La Leucemia Aguda (LA) se presenta en pacientes de edad pediátrica, con un pico máximo entre 2 y 4 años.
- . La LA es más frecuente en el sexo masculino, con una relación entre el número de pacientes masculinos y femeninos de 1.207.
- . La Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) es el tipo predominante dentro de las leucemias infantiles con un 61.0%
- . Dentro de las LLA el subtipo más frecuente es el L<sub>1</sub> (69.0%) seguido por L<sub>2</sub> (31.0%), siendo este último el subtipo de leucemia más frecuente en adultos.
- . La reacción de Peroxidasa (Px) se utiliza como tinción patrón para diferenciar entre LLA y LNLA, siendo negativa para la primera y positiva para la segunda.
- . Una clasificación basada en datos morfológicos, muchas veces es insatisfactoria por lo cual se hace necesario establecer una clasificación citoquímica como auxiliar en los diversos subtipos celulares, ya que esto permite un diagnóstico más certero.
- . El Conjugado de Peroxidasa no se une solamente a la porción Fc del Ac Mo utilizado, sino a diversos receptores de superficie encontrados en las células, sin ser estos los que se desea poner de manifiesto.



## SUGERENCIAS

Se propone un método inmunológico para clasificar las diferentes etapas de maduración de la población celular afectada dentro de las leucemias, este es el sistema Avidina-Biotina, es un sistema de "sandwich" usado en conjunto con anticuerpos. La Biotina es relativamente polar y puede ser conjugada bajo condiciones moderadas con muy baja descomposición de su estructura. La Avidina puede ser usada como un reactivo de segunda etapa, estable de alta afinidad, el cual puede ser conjugado con fluorocromos, enzimas y ferritinas.



## REACTIVOS UTILIZADOS EN LA BIOMETRIA HEMATICA

### DILUYENTES DE DRASKIN

Ferricianuro de potasio 200 mg

Cianuro de potasio 50 mg

Bicarbonato de sodio 1 g

Disolver y aforar un litro con agua destilada.

Conservar en frasco ambar.

### LIQUIDO DE TURCK

Acido acético glacial 2 ml

Solución acuosa de violeta de

genciana 1 ml

Aforar a 100 ml con agua destilada.

### OXALATO DE AMONIO AL 7 %

Disolver un gramo de oxalato de amonio en 100 ml de agua destilada.

Agregar unas gotas de azul de metileno y agitar.

Filtrar y conservar en refrigeración a 4 °C.

Filtrar antes de usar.

## TINCION DE LEISHMAN - GIEMSA

### 1. Leishman:

Leishman polvo	4 g
Alcohol metílico	1 l

### 2. Giemsa:

Giemsa	10 g
Glicerina	540 ml
Alcohol metílico	840 ml

Disolver el Giemsa en la glicerina en baño maría a 60°C durante 48 h, agregar el alcohol, mezclar, dejar madurar y filtrar finalmente.

### 3. Amortiguador de fosfatos pH 6.9

Fosfato monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0.79 g
Fosfato disódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ )	1.21 g

Moler las sales por separado, mezclarse bien, tomar 1 g de la mezcla y disolverlo en 2 l de agua destilada.

### 4. Mezcla Giemsa - Amortiguador

10 ml de Amortiguador pH 6.9 + 3.5 ml de Giemsa

## PEROXIDASA

### 1. Formalina - etanol (refrigerar).

Formalina ( 37 % )	10 ml
--------------------	-------

Etanol absoluto	90 ml
2. Mezcla de incubación	
Etanol al 30%	100 ml
Benzidina · 2 HCL	0.3 g
Sulfato de zinc heptahidratado al 3.8 % (0.132 M)	1.0 ml
Acetato de sodio ( $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ )	1.0 g
Peroxido de hidrógeno al 3%	0.7 ml
Hidroxido de sodio 1.0 N	1.5 ml
Safranina "O"	0.2 g

pH final:  $6.0 \pm 0.05$ , filtrar la solución y almacenar.

Estable por cerca de 6 meses.

## SUDAN NEGRO B

### 1. Solución de Sudán Negro B:

Sudán negro B	0.3 g
Etanol absoluto	100.0 ml

### 2. Solución amortiguadora:

Fenol (cristales)	16.0 g
Etanol absoluto	30.0 ml

Fosfato de sodio dibásico dodecahidratado al 0.3 % en agua

### 3. Solución de trabajo:

Solución de Sudán Negro B	60.0 ml
Solución amortiguadora	40.0 ml

Filtrar a vacío. Estable por dos a tres meses.

## TINCION DE PAS

### 1. Solución de ácido peryódico:

Acido peryódico	0.5 g
Agua destilada	100.0 ml

### 2. Reactivo de Schiff:

Fuchsina básica	1.0 g
Acido clorhídrico 1.0 N	20.0 ml
Metabisulfito de sodio anhidro	1.0 g
Carbón activado aproximadamente	0.3 g

Disolver 1.0 g de fuchsina básica en 200 ml de agua destilada hirviendo, enfriar a 50 °C. Agregar 20 ml de acido clorhídrico 1.0 N, enfriar. Añadir 1.0 g de metabisulfito de sodio anhidro.

Almacenar en la obscuridad de 24 a 48 horas (color pa ja). Agregar carbón activado y agitar por un minuto, filtrar, (desechar las primeras gotas) el reactivo debe ser incoloro. Refrigerar.

### 3. Solución de metabisulfito de sodio:

Metabisulfito de sodio	0.5 g
Agua destilada	100.0 ml

## FOSFATASA ACIDA

1. Fijador: Buffer formalina - acetona pH 6.6 - 6.8

Fosfato de sodio dibásico anhidro	0.2 g
Fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	1.0 g
Agua destilada	300 ml
Acetona	450 ml
Formalina	250 ml

Guardar en refrigeración.
2. Nitrito de sodio al 4% peso en volumen (dura una semana)

Nitrito de sodio ( $\text{NaNO}_2$ )	4.0 g
--------------------------------------	-------

Diluir a 100 ml con agua destilada. Refrigerar.
3. Solución de para-rosanilina.

Clorhidrato de p-rosanilina	1.0 g
Agua destilada	20.0 ml
Acido clorhídrico concentrado	5.0 ml

Mezclar de 10 a 15 minutos hasta que la p-rosanilina se disuelva. Guardar en frasco ambar a temperatura ambiente.
4. Acido acético 1.0 N

Acido acético glacial ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ )	60.0 ml
--	---------

Aforar a 1 litro con agua destilada.
5. Amortiguador de acetatos pH 5.0

Acetato de sodio ( $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ )	4.797 g
Acido acético 1.0 N	14.75 ml

Diluir a 1 litro con agua destilada. Guardar en refri-



geración.

6. Solución A

Nitrito de sodio al 4%	2.40 ml
Solución de p-rosanilina	2.40 ml

7. Solución B

Naftol AS-BI (7-bromo-3-hidroxi-2-nafto-o-anisidina)	40.00 mg
N,N-dimetilformamida	4.00 ml
Amortiguador de acetatos 0.1 N	71.20 ml

8. Mezcla de incubación I

Solución A - Solución B, mezclar y separar 40 ml. Ajustar la mezcla restante a pH 5.1 con solución de hidróxido de sodio saturado, filtrar y usar inmediatamente.

9. Mezcla de incubación II

Acido L ( + ) tartárico	300.0 mg
Mezcla de incubación I	40.0 ml

Mezclar y ajustar a pH 5.1, filtrar y usar inmediatamente.

10. Verde de metilo al 1%

Verde de metilo	1.0 g
Amortiguador de acetatos 0.1 N pH 5.0	100.0 ml

Ajustar el pH de ésta solución a 4.2 - 4.5

## SEPARACION DE LINFOCITOS Y ANTICUERPOS MONOCLONALES

### 1. PBS pH 7.4

Cloruro de sodio (NaCl)	8.20 g
Fosfato de sodio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0.89 g
Fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0.58 g

Aforar con agua destilada a 1 lt.

### 2. Solución Ficoll-Hypaque

Isopaque (metrocato de sodio) 10 partes  
con una densidad de 1.2 g/ml

Ficoll al 9% 24 partes

Diluir con agua destilada hasta producir una solución  
con una densidad de 1.077 g/ml.

### 3. Amortiguador TRIS 0.05 M

Tris-(hidroximetil)-aminometano 6.05 g

Cloruro de sodio (NaCl) 5.80 g

Disolver en 850 ml de agua destilada, ajustar a pH 7.6  
con ácido clorhídrico al 25%, aforar a 1 lt con agua  
destilada.

### 4. Hematoxilina de Mayer

Solución A:

Disolver 50 g de sulfato de amonio y aluminio en 500 ml  
de agua caliente (no hervir)

Solución B:

Disolver 50 g de hidrato de cloral , 1.00 g de ácido

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

cítrico y 0.20 g de iodato de sodio en 500 ml de agua destilada.

Solución C:

Disolver 1.00 g de hematoxilina en 10.0 ml de etanol absoluto.

Mezclar las tres soluciones. No es necesario dejar madurar.

Dura de dos a tres meses.

IDENTIFICACION DE LA ESTIRPE LINFOIDE AFECTADA  
POR MEDIO DE FLUORESCENCIA INDIRECTA (Ac Mo)

Fundamento:

Este es un método que utiliza la propiedad del isotiociano de fluoresceína de emitir luz (fluorescencia) cuando es excitado con energía radiante.

En la inmunofluorescencia indirecta, el primer antisuero se utiliza sin marcar, siendo necesario hacer una segunda incubación con un antisuero frente al primero marcado con fluorocromo.

Procedimiento:

1. 25  $\mu$ l de Ac Mo dil 1:40 con una solución de PBS + 5% de suero fetal de ternera (SFT).
2. 25  $\mu$ l de suspensión de linfocitos en PBS.
3. Incubar a 4 °C por 30 min.
4. Lavar con 500  $\mu$ l de PBS + SFT, 3 veces por 3 min.
5. 25  $\mu$ l de Fluorocromo dil 1:30 con una solución de PBS + SFT.
6. Incubar 30 min a 4 °C.
7. Lavar con 500  $\mu$ l de PBS + SFT, 3 veces por 3 min.
8. Tirar el sobrenadante y resuspender en un mínimo de volumen con PBS + SFT.
9. Agregar una gota de una mezcla al 10% de Glicerol en PBS + SFT.
10. Colocar una gota sobre una laminilla y un portaobjetos sobre la preparación.

**Valoración microscópica:**

Leer a inmersión en el microscopio de fluorescencia, contar 200 células observar primero a luz visible y después sobre esas mismas contar las células fluorescentes, reportando el porcentaje. Las células que presentan fluorescencia son positivas al Ac Mo probado.

TABLA DE ANTICUERPOS MONOCLONALES (Ac Mo)

(Behring)

Código BMA	MARCADOR ESPECIFICO	CLASE DE Igs	VALORES DE REFERENCIA %
010	Pan leucocitario	IgG <sub>1</sub>	100
020	Linfocitos B, Ia DR	IgG <sub>1</sub>	12 <sub>-</sub> 5
030	Linfocitos T maduros	IgG <sub>2a</sub>	70 <sub>-</sub> 10
040	Subpoblación T (Linfocitos T ayudadores)	IgG <sub>1</sub>	50 <sub>-</sub> 15
060	Tomocitos corticales	IgG <sub>2a</sub>	1
090	Receptor de Transferrina	IgG <sub>1</sub>	1
0120	Antígeno asociado a linfocitos B	IgG <sub>3</sub>	1

## BIBLIOGRAFIA

1. Arnold, J., Altman, M.D. "Cytologic Diagnosis of the Acute nonlymphoid Leukemias". The American Journal of Pediatric Hematology/Oncology 7 (1): 21-44 New York, 1985.
2. Plasencia, A.P., Mota, et al. "Leucemias Agudas no Linfoides". Medicine. Tratado de Medicina Práctica. Hematología I. 3a. ed. México, Agosto 1989. pp 56-67.
3. Poplack, D.G. "Acute Lymphoblastic Leukemia". Pediatric Oncology Principles and Practice of. USA, 1989 pp. 323-335.
4. Clinicas Pediatricas de Norteamérica "Oncología Pediátrica". Vol. 3 Interamericana. España, 1985. pp. 607-617; 701-713.
5. Brown, A. "Hematology Principles and Procedures" 3 th edition. Lea and Febeger. USA, 1980. pp. 181-183.
6. Williams, J.W. "Hematology" Second ed. Mc. Grav-Hill Book Company. USA, 1985 pp 659-666; 852,881.
7. Villegas, A., Talavera, J.G, et al. Medicine. Tratado de Medicina Práctica "Hematología II". Primera serie, México, Mayo 1982. pp 547-567.
8. Miale, B.J. "Laboratory Medicine, Hematology" 6 th ed. The C.v. Mosby Company. USA, 1982 pp. 206-210, 234.



9. Bennett, J., Catovsky, D., et al. "The Morphological Classification of Acute Lymphoblastic Leukemia" Concordance Among Observers and Clinical Correlations" British Journal of Hematology 47: 553. 1981.
10. Mertolsman, R., Thaler, H., et al "Morphological Classification, Response to Therapy, and Survival in 263 Adult Patients with Acute Nonlymphoblastic Leukemia" Blood 56 (5): 773, 1980.
11. Miller, D., Sanford, L., et al "Prognostic Importance of Morphology ( FAB Classification) in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL). British Journal of Hematology 48: 199, 1981.
12. Van Eys, et al. "FAB Classification of Childhood ALL" Cancer 57: 1046-1051 1986.
13. Catovsky, D. "Acid-Phosphatase Reaction in Acute Lymphoblastic Leukemia" The Lancet 1: 749 1978.
14. PLATT, R.W. "Color Atlas and Textbook of Hematology" Second. ed. J. B. Lippincott Company. USA, 1979 pp. 518, 529.
15. Yourno, J. et al. "Enzymologic Classification of Acute Leukemias: Nonspecific Esterase Markers Distinguish Myeloid and Lymphoid Varieties" Blood 60 (2): 304, 1982.
16. Neame, P. B., et al. "Classifying Acute Leukemia by Immunophenotyping. A Combined FAB Immunologic Classification of AML" blood vol 68. no. 6 (December) 1986. pp. 1355-1362.

17. Catovaky, D., Galette, J. et al. "Cytochemical Profile of B and T Leukaemic Lymphocytes with Especial Reference to Acute Lymphoblastic Leukemia" Journal of Clinical Pathology 27: 767. 1974.
18. Findley, H.W. "Two New Acute Lymphoblastic Leukemia Cell Lines with Early B-Cell Phenotypes". Blood 60: 1305, 1982.
19. Foon, K.A., Schroff, R. "Surface Markers on Leukemia and Lymphoma Cells: Recent Advances". Blood 60 (1): 1.1982.
20. Thiel, E., et al "Multimarker Classification of Acute Lymphoblastic Leukemia: Evidence for Further T Subgroups and Evaluation of Their Clinical Significance" Blood 56 (5): 759, 1980.
21. Milstein, C. "Anticuerpos Monoclonales" Investigación y Ciencia No. 51: 38, 46 1980.
22. Rivero, J.R. "Los anticuerpos Monoclonales en las Investigaciones Biomédicas" Rev. Cub. Hematol. Inmun. Hemat. 1:3. 1985.
23. Wordingn, R. J. "Manual of Immunoperoxidase Techniques" American Society of Clinical Pathologist Press, Chicago 1983.
24. Villegas, A. "Morphology and citochemistry of Acute Leukemia". Blood, 26 (5 C); 963-981, 1981.