

75



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

ACTUALIZACION SOBRE EL DIAGNOSTICO CELULAR Y
MOLECULAR DE LOS DIFERENTES TIPOS DE LEUCEMIAS
EN EL HUMANO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A :

JOSE LUIS TORRES CUADROS

ASESORA: Q.F.B. IDALIA AVILA MIYAZAWA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Actualización sobre el Diagnóstico Celular y Molecular de los
diferentes tipos de Leucemias en el Humano.

que presenta el pasante: José Luis Torres Cuadros
con número de cuenta: 9650956-6 para obtener el título de :
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 06 de Noviembre de 2001

PRESIDENTE	<u>Q.F.B. Idalia Avila Miyazawa</u>	
VOCAL	<u>Q.F.B. Ma. Esther Revuelta Miranda</u>	
SECRETARIO	<u>Q.B.P. Antonio Sánchez Ortega</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>Q.F.B. Martha P. Campos Peón</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Q.F.B. René Damián Santón</u>	

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se lo dedico a Dios y a mis Padres.

A Dios, porque me dio la oportunidad de existir y por haberme prestado vida y salud, para poder escribir este libro. Me ha acompañado siempre y me ha guiado, junto con mis Padres, en el camino de la superación personal y en la enseñanza de que en cada día se puede ser una mejor persona y brindar todo lo que represento, a mi Familia, a mi gente y a mi País. Gracias Dios mío, por permitirme llegar a este momento y decirte que no te he defraudado, que me falta mucho por hacer y mejorar, pero sin duda, daré mi mejor esfuerzo en cada instante de mi vida, para seguir en el camino que me has señalado.

A mis Padres José Luis Torres Pérez y Elia Cuadros López, porque con su amor y apoyo incondicional que me han dado durante toda mi vida, he obtenido la mayor herencia que toda persona puede tener: **educación**. Quiero decirte, Papá, que me has enseñado durante toda mi vida valores y sentimientos que ahora son parte de mí, como el **amar** y **respetar** a mis Padres ante cualquier situación, momento y circunstancia; en querer y ayudar sin condiciones a mis hermanos porque ellos son mi sangre y ellos son parte de mí; a darme cuenta de que el esfuerzo, el trabajo y la fuerza de voluntad, son las únicas herramientas para lograr lo que uno se proponga en la vida. Con tus consejos, regaños y afectos de amor que me has dado, soy la persona que conoces, me siento muy feliz por tenerte y créeme que no te defraudaré Papá. Gracias, te amo.

Mamá, te dedico este libro porque tú me inculcaste la auto superación y que nunca hay que estancarse ni ser mediocre. Quiero decirte, Mamá, que con tus consejos, cariño y guía, he aprendido a valorar a mi Familia y a las personas por lo que son; me enseñaste que la honestidad y la verdad son valores que siempre deben formar parte de mí, y créeme que lo son, gracias a ti. Has sido un gran apoyo en todos los aspectos de mi vida y perdóname por todos los momentos en que te he hecho sufrir; ninguno de ellos fueron

con la intención de herirte. Gracias por estar conmigo y por enseñarme siempre ver hacia arriba, hacia la superación, te amo. Papá y Mamá, les dedico este libro, porque representa un triunfo compartido y sufrido por los tres; este título es nuestro. Mil Gracias, de su hijo, Torres.

Quiero agradecer el apoyo, compañía y amor de mis hermanos Jesús Andrés Torres Cuadros y Guadalupe Torres Cuadros. Los quiero mucho y espero que este trabajo les sirva como un impulso para mejorar y lograr sus propias metas. Lupita y Jesús, los quiero mucho.

Agradezco el cariño, afecto y amor de mis abuelitas Felicitas López Jerónimo y Teresa Pérez Zavala que siempre me han dado. Gracias por su cuidado y preocupación Mamá Fe y Mamá Tere, las quiero mucho, su nieto Torres. A mi tío Juan Antonio Cuadros López, le agradezco su afecto y amor que siempre he recibido, porque tú, tío Juan, eres como mi segundo padre. Gracias por cuidarme y quererme, tu sobrino, Torres. Mil gracias a toda mi Familia, por preocuparse y seguirme durante todo el trayecto de mi vida. Los amo.

Muchas gracias a todos mis profesores y maestros que han contribuido en mi formación académica y personal, desde el pre-escolar Colegio del Alba, la primaria José Ma. Morelos y Pavón, la secundaria Moisés Sáenz, la preparatoria Angela Segovia de Serrano y a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México, porque a todos ellos, en mayor o en menor medida, me dieron la educación informativa para ser un profesionista y un hombre de bien.

A la maestra Idalia Avila Miyazawa le agradezco su tiempo y dedicación para realizar, en primer lugar, el Servicio Social y posteriormente, con su asesoramiento y consejos, el presente trabajo. Muchas gracias.

Agradezco también a los profesores que integraron mi jurado: Ma. Esther Revuelta Miranda, Antonio Sánchez Ortega, M. Patricia Campos Peón y René Santos Miranda, por su tiempo y dedicación en la revisión de esta Tesis.

Muchas gracias a todos mis amigos y compañeros que me han acompañado en toda mi etapa estudiantil, y sin duda, a aquellos que han dejado una gran huella en mí.

Gracias a Dios y a mis Padres.

José Luis Torres Cuadros.

INDICE

1- INTRODUCCION.....	1
2- OBJETIVOS.....	3
2.1- Objetivo General.....	3
2.2- Objetivos Particulares.....	3
3- EL CANCER Y LA LEUCEMIA.....	4
3.1- Generalidades.....	4
3.1.1- Tipos de alteraciones genéticas en los tumores.....	5
3.1.1.1- Cambios sutiles en la secuencia.....	5
3.1.1.2- Alteraciones en el número de cromosomas.....	6
3.1.1.3- Translocaciones cromosómicas.....	6
3.1.1.4- Amplificaciones de genes.....	6
3.1.2- Diferencia entre estado y velocidad.....	7
3.1.2.1- Inestabilidades de secuencias sutiles.....	8
3.1.2.2- Inestabilidad en el número de cromosomas.....	9
3.1.2.2.1- Bases Moleculares de la CIN.....	10
3.1.2.3- Inestabilidad en translocaciones cromosómicas.....	12
3.1.2.4- Inestabilidad en amplificación de genes.....	13
3.2- Definición de Leucemia.....	14
3.3- Clasificación de los diferentes tipos de Leucemias.....	14
3.3.1- Clasificación en base al tipo y grado de madurez celular.....	14
3.3.2- Clasificación MIC de las Leucemias Agudas.....	15
3.3.2.1- Clasificación morfológica.....	16
3.3.2.2- Clasificación inmunológica.....	16
3.3.2.3- Clasificación citogenética.....	17
3.3.3- Clasificación de las Leucemias Crónicas.....	18
3.3.3.1- Leucemia Mielocítica Crónica.....	18
3.3.3.2- Leucemia Linfocítica Crónica.....	19
3.3.3.3- Leucemia de las Células Pilosas.....	19
3.3.4- Clasificación de las malignidades hematológicas en base al Diagnóstico con Biología Molecular.....	20

3.3.4.1- Desórdenes mieloproliferativos.....	20
3.3.4.2- Desórdenes linfoproliferativos.....	21
3.4- Etiología de las diferentes clases de Leucemias.....	23
3.4.1- Etiología de la Leucemia Linfoblástica Aguda en niños.....	23
3.4.2- Etiología de la Leucemia Linfoblástica Aguda en adultos.....	23
3.4.3- Etiología de la Leucemia Mieloblástica Aguda.....	24
3.4.4- Etiología de la Leucemia Linfocítica Crónica.....	24
3.4.5- Etiología de la Leucemia Mielocítica Crónica.....	25
3.4.6- Etiología de la Leucemia de Células Pilosas.....	25
3.5- Rasgos generales sobre la patogenia de las Leucemias.....	25
3.5.1- Patogenia de la Leucemia Linfoblástica Aguda.....	26
3.5.2- Patogenia de la Leucemia Mieloblástica Aguda.....	28
3.5.3- Patogenia de la Leucemia Linfocítica Crónica.....	29
3.5.4- Patogenia de la Leucemia Mielocítica Crónica.....	29
4- INICIOS DEL DIGNOSTICO DE LAS DIFERENTES CLASES	
DE LEUCEMIAS.....	31
4.1- Datos del Laboratorio y Clínica de las diferentes clases de Leucemias.....	32
4.1.1- Cuadro Clínico de las Leucemias Agudas.....	32
4.1.2- Cuadro Clínico de la Leucemia Mielocítica Crónica.....	34
4.1.3- Cuadro Clínico de la Leucemia Linfocítica Crónica.....	34
4.1.4- Datos del Laboratorio de las Leucemias Agudas.....	36
4.1.5- Datos del Laboratorio de la Leucemia Mielocítica Crónica.....	36
4.1.6- Datos del Laboratorio de la Leucemia Linfocítica Crónica.....	37
4.1.7- Datos del Laboratorio de la Leucemia de Células Pilosas.....	37
4.2- Empleo de la Histología.....	38
4.2.1- Biopsia de Médula Osea.....	38
4.2.2- Obtención de Sangre Periférica.....	39
4.2.3- Preparación y Fijación de una extensión de médula ósea y sanguínea....	39
4.2.4- Teoría y tinción de Romanowsky – Giemsa.....	40
4.2.5- Teoría y tinción de Wright.....	42
4.2.6- Clasificación morfológica de la FAB de las Leucemias Agudas.....	46

4.2.6.1- Leucemia Mieloblástica Aguda.....	46
4.2.6.2- Leucemia Linfoblástica Aguda.....	51
4.2.7- Morfología de la Leucemia Mielocítica Crónica.....	53
4.2.8- Morfología de la Leucemia Linfocítica Crónica.....	54
4.2.9- Morfología de la Leucemia de Células Pilosas.....	55
4.3- La Citogenética en el Diagnóstico de las diferentes clases de Leucemias.....	62
4.3.1- Preparaciones cromosómicas.....	63
4.3.2- Técnicas de bandedo.....	65
4.3.2.1- Bandas Q.....	67
4.3.2.2- Bandas G.....	67
4.3.2.3- Bandas C.....	67
4.3.2.4- Bandas NOR.....	68
4.3.2.5- Bandas R.....	69
4.3.3- Interpretación de las técnicas de bandedo.....	69
4.3.3.1- Realización de un ideograma.....	70
4.3.4- Alteraciones citogenéticas en las diferentes clases de Leucemias.....	72
4.3.4.1- Leucemia Linfoblástica Aguda.....	72
4.3.4.2- Leucemia Linfocítica Crónica.....	73
4.3.4.3- Leucemia Mieloblástica Aguda.....	73
4.3.4.4- Leucemia Mielocítica Crónica.....	73

5- DIAGNOSICO DE LAS DIFERENTES CLASES DE LEUCEMIAS DESDE LOS AÑOS 70'S DEL SIGLO XX HASTA LOS INICIOS DEL

SIGLO XXI.....	75
5.1- Empleo de las técnicas citoquímicas.....	75
5.1.1- Tinción de Peroxidasa.....	76
5.1.2- Tinción de Cloroacetato esterasa.....	78
5.1.3- Tinción de Esterasas inespecificas Acetato o Butirato de α -naftilo.....	79
5.1.4- Tinción de Fosfatasa Alcalina Leucocitaria.....	81
5.1.5- Tinción de Fosfatasa Acida (con resistencia al Tartrato).....	82
5.1.6- Reacción del Acido Peryódico de Schiff.....	84
5.1.7- Tinción de Sudán Negro B.....	85
5.1.8- Tinción con azul de toluidina.....	87

5.2- Empleo de los Anticuerpos Monoclonales para identificar marcadores de membrana.....	88
5.2.1- Hibridomas y Anticuerpos Monoclonales.....	90
5.2.2- Marcadores de membrana.....	94
5.2.2.1- Marcadores fenotípicos de las diferentes clases de Leucemias.....	95
5.2.2.1.1- Leucemia Linfoblástica Aguda.....	96
5.2.2.1.2- Leucemia Linfocítica Crónica.....	96
5.2.2.1.3- Leucemia de Células Pilosas.....	96
5.2.2.1.4- Leucemia Mieloblástica Aguda.....	97
5.2.2.1.5- Leucemia Mielocítica Crónica.....	97
5.3- Empleo de la Inmunocitoquímica.....	98
5.3.1- Métodos Biotina – Avidina.....	98
5.3.1.1- Conjugación de la Peroxidasa a anticuerpos.....	99
5.3.1.2- Complejo Avidina – Biotina.....	101
5.3.1.3- Amplificación de la señalización con Tiramida.....	103
5.3.2- Técnica de la Fosfatasa alcalina-anti Fosfatasa alcalina.....	104
5.4- Empleo de Marcadores Fluorescentes para Anticuerpos y de Sondas Moleculares con aplicación en Citometría de Flujo.....	105
5.4.1- FITC.....	107
5.4.2- Ficobiliproteínas.....	107
5.4.3- R-Ficoeritrina.....	108
5.4.4- Alofocianina.....	108
5.4.5- R-PE: Cy5.....	108
5.4.6- Citómetro de flujo.....	111
5.5- Empleo de la Inmunofluorescencia.....	119
5.5.1- Inmunofluorescencia directa.....	121
5.5.2- Inmunofluorescencia indirecta.....	121
5.6- Empleo de la Hibridación por Fluorescencia <i>in situ</i> y de la Hibridación Comparativa Genómica.....	122
5.6.1- Hibridación Comparativa Genómica.....	125

5.7- Empleo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa y su variante	
con Transcriptasa Reversa.....	126
5.7.1- Diseño de la PCR.....	127
5.7.2- Transcriptasa Reversa de la PCR.....	131
5.7.2.1- Detección de la LPA por RT-PCR.....	133
5.7.3- PCR de Tiempo Real.....	135
5.7.4- Aplicaciones de las técnicas basadas en PCR para el estudio	
de malignidades hematológicas.....	136
5.7.4.1- Aplicación de las técnicas de PCR en la Igh.....	137
5.7.4.2- Estudios de rearrreglos genéticos en el TCR en los	
desordenes linfoproliferativos.....	137
6- PERSPECTIVAS Y TRASCENDENCIA DEL DIAGNOSTICO DE LAS	
DIFERENTES CLASES DE LEUCEMIAS.....	139
6.1- Leucemia Linfoblástica Aguda.....	139
6.2- Leucemia Linfocítica Crónica.....	140
6.3- Leucemia Mieloblástica Aguda.....	142
6.4- Leucemia Mielocítica Crónica.....	146
6.4.1- Leucemia Mielomonocítica Crónica.....	146
6.4.2- Leucemia Mielocítica Crónica Juvenil.....	147
6.5- Papel del Q.F.B. en el desarrollo y establecimiento del Diagnóstico	
de las diferentes clases de Leucemias.....	148
7- CONCLUSIONES.....	150
8- REFERENCIAS.....	153

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 3.1- Clasificación morfológica de las Leucemias Agudas.....	16
Tabla 3.2- Clasificación inmunológica simplificada de las Leucemias Agudas...17	
Tabla 3.3- Estudios Clínicos de Binet de la Leucemia Linfocítica Crónica.....	19
Tabla 3.4- Clasificación por función de los oncogenes en las conexiones de translocaciones en la Leucemia Linfoblástica Aguda.....	27
Tabla 4.1- Características Clínicas de la Leucemia Linfocítica Crónica según Rai.....	35
Tabla 4.2- Estudios Clínicos de Binet de la Leucemia Linfocítica Crónica.....	35
Tabla 4.3- Criterios del grupo FAB para los subtipos de la Leucemia Linfoblástica Aguda.....	51
Tabla 4.4- Sistema de puntuación FAB para las variantes L1 y L2.....	53
Tabla 4.5- Relación entre los grupos de cromosomas con sus correspondientes pares.....	71
Tabla 5.1- Reacciones citoquímicas en las células sanguíneas y en los blastos de la Leucemia Aguda.....	87
Tabla 5.2- Características de fluorocromos usados en Citometría de flujo.....	109
Figura 4.1- Aspirado de médula ósea de un paciente con Leucemia Linfoblástica Aguda.....	43
Figura 4.2- Aspirado de médula ósea de un paciente con Leucemia Linfocítica Crónica.....	44
Figura 4.3- Extensión de una muestra de Sangre Periférica teñido con tinción de Wright.....	45
Figura 4.4- Muestras de Leucemias Mieloblásticas Agudas tipos M1 y M2.....	55
Figura 4.5- Muestras de Leucemia Mieloblástica Aguda tipo M3.....	56
Figura 4.6- Muestras de Leucemias Mieloblásticas Agudas tipos M3v, M4 y M5.....	57
Figura 4.7- Muestras de Leucemia Mieloblástica Aguda tipo M6.....	58
Figura 4.8- Muestras de Leucemia Mieloblástica Aguda tipo M7.....	58
Figura 4.9- Extensiones de sangre y médula ósea con Leucemia Mielocítica Crónica.....	59

Figura 4.10- Extensiones de sangre y médula ósea con Leucemia Linfocítica Crónica.....	60
Figura 4.11- Extensiones de médula ósea con Leucemia Linfoblástica Aguda.....	60
Figura 4.12- Extensión sanguínea con Leucemia Linfoblástica Aguda.....	61
Figura 4.13- Cromosoma Filadelfia.....	73
Figura 5.1- Citometría de flujo de la Leucemia Linfoblástica Aguda pre-B.....	115
Figura 5.2- Citometría de flujo de la Leucemia Linfoblástica Aguda de Células T.....	116
Figura 5.3- Citometría de flujo de la Leucemia Linfocítica Crónica de Células B.....	117
Figura 5.4- Citometría de flujo de la Leucemia Mieloblástica Aguda.....	118

LISTA DE ABREVIATURAS

AcMo	Anticuerpo Monoclonal
ADN	Acido Desoxirribonucleico
ADNc	Acido Desoxirribonucleico complementario
Ag	Antígeno
ANAE	α -Nafilacetato-esterasa
ANBE	α -Nafilbutirato-esterasa
APAAP	Fosfatasa alcalina – anti fosfatasa alcalina
APC	Aloficocianina
ARN	Acido Ribonucleico
ARNm	Acido Ribonucleico mensajero
ASO	Oligonucleótidos alelo - específicos
ATM	Ataxia telangiectasa mutada
CAE	Cloroacetato esterasa
CD	Grupo de diferenciación
CIN	Inestabilidad Cromosómica Verdadera
CNE	Células No Eritroides
CRC	Cáncer Colorectal Esporádico
CrPh	Cromosoma Filadelfia
DSB	Rompimientos de recombinación / promoción en la doble cadena
FAB	Clasificación Franco-Americano-Británica
FACS	Clasificador Celular mediante Citometría de Flujo
FAL	Fosfatasa Alcalina Leucocitaria
FISH	Hibridación con fluorescencia <i>in situ</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
G6PD	Glucosa – 6 – fosfato deshidrogenasa
HAT	Medio enriquecido con hipoxantina y timidina
HCG	Hibridación Comparativa Genómica
HGPRT	Hipoxantina – guanosina fosforribosiltransferasa
HLA	Antígenos de Leucocitos Humanos
HNPCC	Cáncer hereditario sin poliposis
HTLV-1	Virus de la Leucemia Humana en células T tipo I
IgH	Cadena pesada de las Inmunoglobulinas
KDa	Kilo daltones

LCP	Leucemia de Células Pilosas
LLM	Leucemia de Linaje Mixto
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
LLA-c	Leucemia Linfoblástica Aguda común
LLA-preB	Leucemia Linfoblástica Aguda pre B
LLA pre-preB	Leucemia Linfoblástica Aguda pre-pre B
LLC	Leucemia Linfocítica Crónica
LMA	Leucemia Mieloblástica Aguda
LMC	Leucemia Mielocítica Crónica
LMMA	Leucemia Mielomonocítica Aguda
LMMC	Leucemia Mielomonocítica Crónica
LPA	Leucemia Promielocítica Aguda
MIC	Clasificación morfológica, inmunológica y citogenética
MIN	Inestabilidad en microsatélites
MMR	Reparación sin relación
MPO	Mieloperoxidasa
MRD	Enfermedad mínima residual
N/C	Relación núcleo/citoplasma
NER	Reparación de excisión de nucleótidos
NOR	Organzadores nucleolares
PAGE	Electroforesis en gel con poliacrilamida
PAS	Acido Peryódico de Schiff
PE:Cy5	R-PE:cianina-5
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
REAL	Linfoma Revisado por Europeos y Americanos
R-PE	R-Ficoeritrina
RT-PCR	Transcriptasa Reversa de la Reacción en Cadena de la Polimerasa
SNB	Sudán Negro B
SPDP	<i>N</i> -succinimidil-3-(2-piridiltio) propionato
TCR	Receptor de Células T
TK	Timidina cinasa
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
UV	Rayos Ultravioleta

1- INTRODUCCION

Sin duda alguna, una de las entidades patológicas que afecta a los mamíferos, y particularmente hablando, al humano, con una capacidad devastadora y mortal, es el cáncer. El cáncer es un proceso que afecta a diversos órganos y tejidos; uno de ellos es el tejido hematopoyético, alterando así la funcionalidad de las células que constituyen a la sangre y a otros tejidos que están íntimamente relacionados a ella.

El proceso cancerígeno que afecta a la sangre, a grandes rasgos, es denominado *Leucemia*. Desde los últimos años del siglo XIX, el sector clínico ha tenido el interés de descubrir las causas que provocan la Leucemia, también el hecho de saber cuándo se presenta y sobre todo, cómo poder tratar este tipo de cáncer para lograr la recuperación total, o por lo menos, una recuperación parcial del paciente que la padece.

El presente trabajo consiste en la recopilación de la información más actual sobre las técnicas de diagnóstico que se cuentan para determinar las diferentes clases de Leucemias en los humanos; para esto, es importante definir en primer lugar, qué es el cáncer, cómo se origina y las consecuencias que tiene un proceso de este tipo.

Una vez definida esta parte, es conveniente explicar el término de Leucemia, las clases de Leucemias que existen y la etiopatogenia de la enfermedad que nos permitirá asociarla con los procedimientos en el ámbito de laboratorio para el diagnóstico de las diferentes clases de Leucemias.

Tener un diagnóstico preciso y certero de esta entidad patológica es de vital importancia para el sector clínico, ya que contribuye de manera decisiva en el tratamiento en la cual el paciente es sometido, con la intención de ayudarlo a curarse, o por lo menos, lograr su mejora y darle la oportunidad de tener una calidad de vida lo más óptima posible.

El presente trabajo muestra un análisis de los procedimientos usados en el diagnóstico de las diferentes clases de Leucemias, durante los últimos años del siglo XIX, todo el siglo XX e inicios del siglo XXI, considerando el uso del historial clínico del paciente, los resultados de la Biometría Hemática, el empleo de la Histología tomando como muestras sangre periférica y biopsias de tejido hematopoyético y terminando con las modernas técnicas de Biología Molecular, Inmunológicas y Citogenéticas, que se han desarrollado y que han

7

marcado una gran precisión en el área de Diagnóstico del Laboratorio y Clínico de las diferentes clases de Leucemias.

También se remarcará la importancia que juega el Químico Farmacéutico-Biólogo en la determinación y desarrollo de las técnicas y métodos de diagnóstico de las Leucemias, ubicándolo en una posición importante como parte del equipo de salud cuya meta primordial es lograr el bienestar del paciente.

2- OBJETIVOS

2.1- OBJETIVO GENERAL

Elaborar una revisión bibliográfica, hemerográfica y en Internet sobre el diagnóstico de las diferentes clases de Leucemias que afectan al humano para presentar los conocimientos y avances más actuales referentes a este tema.

2.2- OBJETIVOS PARTICULARES

2.2.1- Establecer la importancia que tiene el diagnóstico correcto y temprano de las diferentes clases de Leucemias en el humano con el uso de diferentes técnicas celulares y moleculares y que permita como consecuencia, la elección del mejor tratamiento para el paciente.

2.2.2- Explicar el fundamento de cada una de las técnicas involucradas en el diagnóstico más actual de las diferentes clases de Leucemias para comprender y asociar la etiopatogenia de la enfermedad con los diferentes tipos de marcadores biológicos que permiten identificar a las células alteradas por este tipo de cáncer.

2.2.3- Comparar los diferentes métodos y técnicas que han existido para el diagnóstico de las diferentes clases de Leucemias con los métodos y técnicas más actuales para establecer la importancia, beneficios y desventajas que presentan cada uno de ellos.

2.2.4- Indicar el papel que tiene el Químico Farmacéutico Biólogo para el desarrollo y establecimiento del diagnóstico de las diferentes clases de leucemias en el humano a nivel del Laboratorio Clínico y como consecuencia, permita visualizar la posición que tiene el Q.F.B. como parte integral en el equipo de Salud que trabaja para mejorar o curar a los pacientes que padecen este tipo de cáncer.

3- EL CANCER Y LA LEUCEMIA

3.1- Generalidades

Por definición, el cáncer es un "tumor maligno en general y especialmente el formado por células epiteliales. Las características de la malignidad son: es un proceso anormal, hay una disminución o nulo control de crecimiento y la función celular". (2)

Como podemos ver, un cáncer es un proceso anormal que ocurre en un organismo en donde existe una proliferación descontrolada de las células, las cuales sufren un proceso de mitosis mayor con respecto a las células que no padecen este proceso; pero además, un cáncer implica que las células que se vayan generando, no pasen por un proceso de diferenciación normal, es decir, que son células inmaduras incapaces de realizar las funciones que originalmente están encaminadas.

Desde el punto de vista patológico, el cáncer se le ha clasificado de la siguiente manera:

Carcinoma: "Tumor o neoplasia maligna formada por células epiteliales neoformadas, con anaplasia en mayor o menor grado y con capacidad de provocar metástasis a distancia en cualquier momento de su evolución". (2)

Sarcoma: "Tumor maligno derivado de las células mesenquimatosas; puede formarse a expensas de células del tejido conectivo diferenciado (condrosarcoma, miosarcoma, liposarcoma, etc.), de células del tejido conectivo común (fibrosarcoma) o del tejido ganglionar (linfosarcoma, reticulosarcoma); y son tumores de gran malignidad. (2)

Un proceso cancerígeno es devastador porque implica, en primer lugar, destrucción de la anatomía "arquitectónica" del órgano en donde se origina el proceso, pero además, esto conlleva a que en dicho órgano se vean interrumpidos los procesos fisiológicos que normalmente deben ocurrir y esto como consecuencia origina que el órgano involucrado no trabaje adecuadamente, alterando obviamente, la funcionalidad de los órganos vecinos; alterando también la funcionalidad del sistema o aparato en donde formen parte dichos órganos; todo esto puede conllevar como última consecuencia, hasta la muerte.

Existen diversas interrogantes como: cuál es el origen de un cáncer; por qué se da este tipo de proceso; estas preguntas, hasta la fecha, para muchos tipos de cánceres, son difíciles de contestar o es más, aún no hay respuesta. Lo que es un hecho, es que la función genética en el cáncer puede ser interrumpida tanto por alteraciones genéticas, las cuales directamente mutan o delecionan genes, o por alteraciones epigenéticas las cuales alteran el estado heredable de la expresión genética. Se puede mencionar por ejemplo, que la metilación aberrante del ADN (Acido Desoxirribonucleico) puede originar de manera muy temprana una progresión de tumor y regula muchas de las rutas anormales importantes en el cáncer, que incluyen: **pérdida del control del ciclo celular, función alterada de los factores de transcripción, función alterada de receptores, interrupción de las interacciones célula – célula normal y célula – sustrato, inactivación de las rutas de señales de traducción, pérdida de las señales apoptóticas y la inestabilidad genética (24)**. Ahora es ampliamente aceptado el hecho de que el cáncer resulta de la acumulación de mutaciones en los genes que controlan directamente el nacimiento y muerte celular. Se ha argumentado que una inestabilidad genética fundamental se requiere para la generación de múltiples mutaciones que originan al cáncer. Sin embargo, se ha sugerido también que velocidades normales de mutación, acompañado con “ondas” de expansión clonal, son suficientes para que dicho proceso ocurra en humanos. (34)

3.1.1- Tipos de alteraciones genéticas en los tumores.

Numerosas alteraciones genéticas que afectan a los genes que controlan al crecimiento se han identificado en células neoplásicas en los últimos 15 años, originando evidencias persuasivas para las bases genéticas del cáncer humano. Las alteraciones genéticas pueden ser divididas en 4 principales categorías:

3.1.1.1- Cambios sutiles en la secuencia.

Estos cambios involucran sustituciones, deleciones o inserciones de bases o de pocos nucleótidos y a diferencia de las alteraciones descritas posteriormente, estos cambios no pueden ser detectados a través de un análisis citogenético. Por ejemplo, mutaciones que no

se advierten en el gen *K-ras* se dan alrededor del 80% en los pacientes con cáncer en el páncreas. (34)

3.1.1.2- Alteraciones en el número de cromosomas.

Alteraciones en el número de cromosomas involucra la pérdida o ganancia de cromosomas completos (aneuploidia). Tales cambios se encuentran en casi todos los tipos principales de tumores humanos. Ejemplos incluyen la pérdida del cromosoma 10 en los glioblastomas, algunos reflejan la inactivación del gene supresor de tumores *PTEN*, y la ganancia del cromosoma 7 en los carcinomas renales papilares, reflejando una duplicación del oncogen mutante *MET*. (34)

3.1.1.3- Translocaciones cromosómicas.

Estas alteraciones pueden ser detectadas citogenéticamente como fusiones de diferentes cromosomas o de segmentos normalmente no contiguos de un solo cromosoma. En el ámbito molecular, tales translocaciones pueden darse en fusiones entre dos genes diferentes, dotando al transcrito fusionado con propiedades tumorigénicas. Un ejemplo que muestra esto es el cromosoma Filadelfia en la Leucemia Mielocítica Crónica; la parte carboxilo terminal del gen *c-abl* en el cromosoma 9 se une a la región amino terminal del gen *BCR* del cromosoma 22. (34)

3.1.1.4- Amplificaciones de genes.

Las amplificaciones genéticas son vistas a nivel citogenético como regiones teñidas homogéneamente o "dobles minutos". En el ámbito molecular, copias múltiples de un *amplicon* que contienen un gen(es) de promoción de crecimiento pueden ser vistos. Los amplicones contienen de 0.3-10 megabases de ADN y son diferentes de las duplicaciones de regiones mucho más grandes de cromosomas que resultan de la aneuploidia y translocaciones. Un ejemplo es la amplificación del gen *N-myc* que se da alrededor del 30% de los neuroblastomas avanzados. (34)

3.1.2- Diferencia entre estado y velocidad.

Los 4 tipos de alteraciones descritos anteriormente se dan de manera común en tipos de tumores específicos y son raramente o nunca observados en células normales. Pero la existencia de alteraciones genéticas en un tumor, aún cuando es frecuente, no significa que el tumor sea genéticamente inestable. *Inestabilidad* es por definición, una cuestión de velocidad y la existencia de una mutación (*estado*) no provee información a cerca de la velocidad de su desarrollo. Varios factores adicionales a la verdadera inestabilidad podrían explicar una mayor prevalencia de mutaciones en tumores comparado con células normales. Las condiciones selectivas en el ambiente del tumor, incluyendo interacciones nutriente-células aberrantes humorales y célula-célula cancerígena, son diferentes con respecto en aquellas en el ambiente de células normales. Como resultado, las mutaciones en genes que controlan el crecimiento podrían darse a la misma velocidad en células tumorales como en células normales, pero las ventajas selectivas que se posee para cada mutación en el ambiente de las células tumorales podría alcanzar la expansión clonal, permitiendo a las células tumorales con la mutación sobrepasar a sus células hermanas. La misma mutación que ocurre en las células normales, en ausencia de la expansión clonal, podría ser indetectable, así como podría ser enmascarado por millones de células hermanas sin la mutación. (34)

También es posible que las células normales experimenten mutaciones y que sean destruidas por apoptosis, una ruta que conduce a la muerte celular programada y que pueda proteger al organismo de las consecuencias tumorigénicas de tales mutaciones. De hecho, las mutaciones en algunos oncogenes conducen a la estimulación del crecimiento bajo algunas circunstancias, pero la apoptosis bajo otras.

Una complicación adicional resulta de la naturaleza dinámica de los tumores. Los cánceres toman generalmente décadas para desarrollarse, y es importante determinar si la inestabilidad genética, aún si está presente en algunas etapas de la tumorigénesis, persiste. Se han estudiado experimentalmente las inestabilidades que resistan completamente el tiempo de vida media de las células tumorales, y de acuerdo a los resultados encontrados,

se puede comentar lo siguiente para cada una de las alteraciones genéticas discutidas anteriormente. (34)

3.1.2.1- Inestabilidades de secuencias sutiles.

Las inestabilidades de este tipo no son comunes en cánceres humanos, pero cuando están presentes, causan fenotipos dramáticos. Los mecanismos moleculares que fundamentan la fidelidad de la replicación del ADN se basan en los procesos de la polimerización de la molécula de ADN (control en la velocidad de error de dicho proceso, asociado al grado de lectura de las polimerasas) y en el proceso de reparación. La maquinaria de reparación opera sobre secuencias de error generado por las polimerasas o por mutágenos. Ningún patrón consistente de defectos en polimerasas se ha visto en los tumores. Sin embargo, defectos en dos principales sistemas de reparación –reparación de excisión de nucleótidos (NER en inglés) y reparación sin relación (MMR en inglés)- se ha estudiado bien. (34)

La reparación de excisión de nucleótidos (NER) es el mecanismo responsable para la reparación del daño causado por muchos mutágenos exógenos. Se ha documentado muy bien el caso del tumor en la piel; éste representa el tipo de tumor principal en donde los pacientes con deficiencias en NER son susceptibles; la incidencia de cánceres internos en pacientes con defectos en NER no está dado en el mismo grado. La explicación más simple para estos resultados es que los rayos ultravioleta (UV) son los principales mutágenos que provocan un daño en el NER que repara al ADN cuando los humanos se exponen. (34)

La reparación no relacionada (MMR) primero se descubrió en procariotas; el primer indicio del papel del MMR en el cáncer vino con el descubrimiento de un grupo de tumores colorectales esporádicos (sin relación familiar) que exhibieron alteraciones amplias de trectos de poli(A) en sus genomas. Estudios subsecuentes mostraron que los microsatlélites que incluían repeticiones poli(CA), fueron similarmente afectados, originándose el término “inestabilidad en microsatlélites (MIN en inglés)”. Aunque es inusual en el cáncer colorectal esporádico (CRCs), las MIN’s se dan en muchos de los pacientes con cáncer hereditario sin poliposis (HNPCC en inglés). El loci responsable para el HNPCC fue mapeado y ligado a los cromosomas 2p16 y 3p21. Estos resultados indicaron que los pacientes con HNPCC deberían heredar un gen de replicación o de reparación que fuera mutado somáticamente en

los casos esporádicos asociados con la MIN, y que dos de estos genes pueden residir en los cromosomas humanos 2 y 3.

En general, los pacientes con HPNCC tienen un alelo normal del gen relevante MMR; este alelo tipo-natural, es suficiente para mantener los niveles normales de MMR. Solamente cuando el alelo natural sea inactivado durante la tumorigénesis – a través de un evento cromosomal grande o una mutación sutil intragénica- que la MMR sea abolida y las mutaciones se acumulen. La progenie de esta célula entonces acumulará mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores, originando una expansión clonal (es decir, una tumorigénesis). (34)

Ahora, en el caso de un heterocigoto con un alelo MMR defectuoso, todo lo que requiere para empezar a acumular mutaciones a una alta velocidad es la inactivación del alelo heredado normal del padre que no está afectado. Esta inactivación inmediatamente conduce a los errores que no son corregidos durante la replicación del ADN. En un heterocigoto con un alelo MMR defectuoso, sin embargo, la inactivación del alelo normal no siempre conduce a una velocidad de mutación alta.

Una pregunta interesante es saber qué tan frecuente se dan defectos MMR en las neoplasias humanas. Apenas el 13% en los cánceres colorectales y porcentajes similares de cánceres endometriales y gástricos contienen tales defectos. Los cánceres de otros tipos son raros (<2%) en deficiencia en MMR. Aunque muchos cánceres pueden contener pocos cambios en microsatélites, la extensión de estos cambios es mucho menos pronunciada que en los cánceres que fallan en la MMR. Estos bajos niveles de alteraciones de microsatélites se debe principalmente a que reflejan velocidades, cerca de lo normal, de mutación durante los múltiples ciclos de división celular que acompañan las ondas de expansión clonal a través del cual evoluciona el cáncer avanzado. (34)

3.1.2.2- Inestabilidad en el número de cromosomas.

La ganancia o pérdida de cromosomas enteros involucra el tipo de inestabilidad más común en muchas malignidades. Las pérdidas de heterocigocidad, esto es, la pérdida de un alelo paterno o materno en un tumor, están ampliamente distribuidas y algunas veces están acompañadas por una ganancia del alelo opuesto. Un tumor podría perder la parte materna del cromosoma 8, por ejemplo, mientras se duplica la parte paterna del mismo cromosoma,

dejando a la célula con un cariotipo normal en el cromosoma 8, pero con un *alelotipo* anormal en dicho cromosoma. Tales cambios en el genoma de las células cancerosas se puede pensar a que se deba a una inestabilidad cromosómica verdadera (CIN en inglés), aunque hay que establecer que ni el cariotipo estático ni los alelotipos pueden ser usados para determinar la velocidades de alteración genética. (34)

En un estudio, la Hibridación con fluorescencia *in situ* (FISH en inglés) se uso para mostrar la pérdida o ganancia de múltiples cromosomas que ocurrió de 10 – 100 veces más veces en una línea celular cancerígena colorectal que en células normales o en cánceres diploides del mismo subtipo histológico. Las altas velocidades de pérdida o ganancia de cromosomas vistas en este estudio muestran que no solamente los cánceres aneuploides, sino que el cariotipo de un solo tumor es algunas veces heterogéneo, reflejando la generación persistente de nuevas variaciones cromosómicas. (34)

Relación entre MIN y CIN. Se ha visto que en los cánceres colorectal y endometrial, hay una relación inversamente proporcional entre la inestabilidad por microsatélites (MIN) y la inestabilidad cromosómica (CIN). Los cánceres que muestran deficiencia MMR son, en general, diploides y exhiben velocidades normales de cambios cromosómicos, mientras que los tumores que contienen MMR son tumores aneuploides y exhiben incremento en velocidades de cambio cromosómico en los mismos ensayos. De hecho se puede determinar una serie de comparaciones. Primero, ambas inestabilidades parecen darse durante la evolución del tumor, pero, las variaciones genéticas que resultan de estas inestabilidades incrementan con la progresión del tumor. Tales incrementos con progresión son esperados durante la expansión clonal con cada nueva “onda” de expansión, originando en una célula que se ha dividido muchas veces desde la última “onda”. Segundo, cuando las células MIN y CIN son fusionadas, originan híbridos que exhiben CIN, pero no MIN. Esto demuestra que el fenotipo CIN tiene una calidad dominante, indicando que puede resultar de la ganancia de una función de una proteína expresadas más que de la inactivación de un gen.

3.1.2.2.1- Bases Moleculares de la CIN.

Se está apenas empezando a explorar las bases moleculares, pero se ha propuesto que la CIN puede originarse simplemente de una estructura anormal y de las propiedades de

crecimiento de las células cancerígenas. Una explicación potencial involucra la mutación de la p53. Por ejemplo, células en cultivo algunas veces llegan a ser totalmente aneuploides al mismo tiempo que el gen p53 es inactivado, y el huso mitótico anormal; la detección en la fase G2/M del ciclo celular se da en células deficientes del p53. (34)

Aunque se ha visto esta asociación de las mutaciones del p53 al exacerbar la inestabilidad cromosómica, no es probable que sea su causa principal. Por otro lado se ha visto que en levaduras, la ruptura de genes que codifican proteínas del huso mitótico pueden conducir al CIN porque las células que son defectuosas en dichos genes, pueden completar su mitosis en la presencia de un cromosoma retrasado, originando una segregación anormal del cromosoma. Se cree que la incapacidad de inhibir la entrada en la fase S cuando la mitosis no puede ser completada por el daño al huso es la principal razón del defecto a este nivel. Otro ejemplo es el de la proteína *hMAD1* la cual se activa por la proteína del virus de la leucemia humana en células T tipo 1 (HTLV-1); este proceso de disparo inactiva el daño en el huso en las leucemias inducidas por virus. (34)

Otro tipo de daño se da a nivel del ADN, tales daños se pueden deber a errores realizados por polimerasas durante la replicación normal del ADN, por fuentes exógenas (por ejemplo radiación ionizante) o de genotoxinas endógenas (como radicales libres de oxígeno) o de una reparación incompleta. En el caso de las radiaciones ionizantes, se ha visto que aquellas radiaciones cuyas longitudes de onda sean $< 10^{-6}$ cm es carcinogénico (por ejemplo los rayos Ultravioleta, los rayos-X y los rayos- γ). El proceso de daño implica la dimerización de pirimidina y rompimiento de la cadena de ADN; además, la radiación puede inducir la formación de radicales libres de oxígeno, los cuales dañan al ADN, ARN y a las proteínas. De esta forma, el cromosoma que contiene el ADN dañado podría segregarse inadecuadamente debido a las cromátidas hermanas están aún conectadas al ADN o a las proteínas que se unen al ADN. Tales cromosomas también son susceptibles a alteraciones estructurales grandes por los huecos de una sola cadena o por las rupturas de la doble hélice del ADN. (34)

Varios genes involucrados en el daño al ADN a nivel puntual han sido implicados en la tumorigénesis humana, incluyendo la *ataxia telangiectasia mutada* (ATM), el gen relacionado a ATM *ATR*, los genes *BRCA1* Y *BRCA2*, los cuales interactúan con el homólogo Rad51, y el *p53*.

Otra causa potencial de aneuploidia involucra centrosomas anormales. Husos multipolares han sido algunas veces observados en cánceres humanos *in situ* y un número anormal de centrosomas, detectados con anticuerpos específicos, han sido observados en cánceres de pecho, pulmón, próstata, colon y cerebro. Las bases genéticas y moleculares del incremento del número de centrosomas aún no han sido bien definidas. Una posibilidad, sin embargo, relata el centrosoma anormal a una cinasa, aurora2/STK15, la cual está involucrada en la maduración del centrosoma y la formación del huso en *Drosophila*. Finalmente, la inactivación del *p53* puede conducir a la existencia de múltiples centrosomas en fibroblastos embrionarios de ratón.

De tal manera, CIN puede ser común en los cánceres precisamente porque hay muchos genes, que cuando mutan, pueden conducir a este fenotipo y proveer a la célula afectada con la inestabilidad requerida para desarrollar las alteraciones genéticas múltiples que conducen a la malignidad. (34)

3.1.2.3- Inestabilidad en translocaciones cromosómicas.

El primer patrón (complejo) es observado en muchos tumores sólidos, pero las translocaciones observadas en los tumores individuales aparecieron al azar y no están usualmente relacionados a las translocaciones observadas en otros tumores del mismo subtipo histológico. Grandes porciones de brazos de cromosomas son delecionados durante las recombinaciones que conducen a las translocaciones; estas deleciones son vistas como pérdidas de la heterozigocidad a nivel molecular.

La translocación compleja puede resultar en ganancia o pérdida de material cromosómico, tal como ocurre en CIN, también como en la generación de nuevos productos genéticos, y es probablemente que sea un componente importante de muchos tumores comunes. Sin embargo, la velocidad de dicha translocación en las células no puede ser medida.

Las base molecular para las translocaciones en los cánceres es desconocida. Sin embargo una posibilidad atractiva es que las translocaciones se dan en las células al entrar en mitosis, antes que los rompimientos de recombinación – promoción en la doble cadena (DSB's en inglés) sean reparados. Unos atractivos candidatos para regular tal inestabilidad en las translocaciones en los cánceres humanos son, por lo tanto, genes como el *ATM*, *ATR*, *BRCA1*, *BRCA2*, *p53* y otros componentes involucrados en la reparación de los DSB o en

los puntos de daño de ADN. No se conoce aún si las uniones en las translocaciones complejas resultan de una recombinación homóloga o no homóloga.

Un segundo patrón (simple) se caracteriza por rearrreglos distintivos de segmentos cromosómicos en enfermedades neoplásicas específicas. Esto se da comúnmente en las leucemias y linfomas y en un subtipo de sarcoma y otros tumores raros.

Los análisis moleculares han determinado que los puntos de rompimiento en muchas de las translocaciones y han mostrado que se dan usualmente con los mismos, relativamente, segmentos pequeños de ADN. Los rearrreglos conducen generalmente a la activación de un oncogen de su posición próxima a un fuerte promotor o su fusión con otro gen. Sin embargo, no hay evidencia de que sean resultado de una inestabilidad genética específica que promueva su desarrollo a una frecuencia más alta que en las células normales; por lo tanto, es un aspecto que requiere de más investigación para aclarar este punto. (34)

3.1.2.4- Inestabilidad en amplificación de genes.

La amplificación de oncogenes se da en un subsitio de cánceres crónicos de muchos órganos, y la amplificación de genes involucrados en el metabolismo o inactivación de fármacos representan una forma común para células cultivadas para adquirir resistencia a agentes quimioterapéuticos. Los mecanismos a través de los cuales se dan las amplificaciones son desconocidos considerablemente. Un potencial jugador en el proceso es p53, como amplificación se da más fácilmente cuando p53 está inactivado en células de mamíferos. Una teoría explica que no es la velocidad la que distingue a las células normales de las células cancerígenas, sino más bien la capacidad de las células cancerígenas de exhibir la amplificación genética para sobrevivir. En las células normales, la presencia de un amplicon (el segmento genético que es amplificado) puede señalar que el daño al ADN ha ocurrido, por lo que se inicia la apoptosis dependiente del p53. En la ausencia del p53 normal, las células con amplificaciones iniciales de un locus, pueden sobrevivir y acumular amplicones adicionales durante los siguientes ciclos de división celular. Este modelo se distinguiría como "inestabilidad de amplificación" de la CIN, en la cual la velocidad actual del cambio del número de cromosoma, más que la capacidad de las células para sobrevivir a tales cambios, es alterado.

Sin embargo, es importante distinguir la amplificación genética de otras formas de cambios genéticos (NIN, MIN y CIN) que se dan de manera temprana en los procesos neoplásicos, afectan diversos genes en cada célula y son, probablemente, esenciales para el desarrollo de mutaciones secuenciales que conduzcan a procesos neoplásicos. Aunque las amplificaciones pueden afectar la biología del tumor, afectan solamente a uno o a pocos genes en cada célula y, en general, se dan en forma tardía en la tumorigénesis.

3.2- Definición de Leucemia

Ahora bien, dentro de los cánceres, tenemos aquellos que se agrupan con el término de Leucemias. Etimológicamente hablando, el término de Leucemia fue descrito por Virchow en 1847; sus raíces son griegas (*λευκος*: blanco; *ηματος*: sangre) y quiere decir sangre blanca; al describir la enfermedad por primera vez, se encontró una elevada cantidad de células pertenecientes a la familia de los leucocitos circulando en sangre, por lo que se asoció esta patología posteriormente como el “cáncer de la sangre”. Actualmente la podemos definir como “una enfermedad neoplásica caracterizada por una proliferación anormal de las células hematopoyéticas”. (42)

3.3- Clasificación de los diferentes tipos de Leucemias.

3.3.1- Clasificación en base al tipo y grado de madurez celular.

Existen diferentes clases de Leucemias, cuya clasificación depende del tipo celular involucrado y de la madurez de la célula. Así pues, tenemos a dos grandes grupos cuya clasificación está en función del grado de madurez de las células involucradas:

LEUCEMIAS AGUDAS.- Son aquellas que se caracterizan por tener como tipo predominante de célula maligna proliferante una célula inmadura poco diferenciada conocida como “blasto”. El término Leucemia de “blastos” sería el más adecuado. (3)

LEUCEMIAS CRÓNICAS.- Son aquellas que se caracterizan básicamente en la identificación de leucocitos predominantemente maduros, aunque cabe mencionar en este momento que algunos tipos de Leucemias Crónicas pueden pasar por una fase de "conversión" hacia un proceso agudo. (3)

Los términos "agudo" y "crónico" se referían inicialmente al tiempo de vida que tenían los pacientes que sufrían alguna de estas clases de Leucemias. En antaño, los pacientes con Leucemias "agudas" vivían menos que aquellos con Leucemias "crónicas", situación que ha cambiado por completo merced al empleo de tratamientos cada vez más eficaces.

La siguiente clasificación se fundamenta en el tipo celular que está involucrado en el proceso:

LEUCEMIAS DEL TIPO CELULAR MIELOIDE Y MIELOCITICA.- Predominan en este tipo de Leucemias los leucocitos que pertenecen a la familia mieloide del proceso hematopoyético (células precursoras y células maduras respectivamente). (3)

LEUCEMIAS DEL TIPO CELULAR LINFOIDE Y LINFOCITICA.- Predominan las células que pertenecen a la clase linfoide del proceso hematopoyético (células precursoras y maduras respectivamente). (3)

3.3.2- Clasificación M.I.C. de las Leucemias Agudas.

A nivel internacional ha habido diversas clasificaciones de las Leucemias tomando como criterio los parámetros antes mencionados y otros más (como estudios citoquímicos). Entre ellas podemos mencionar aquellas propuestas por Galnick en 1977, Dabich en 1980 y Bennett en 1985. Pero en el caso de las Leucemias Agudas, la mejor clasificación que puede efectuarse es la clasificación MIC (morfológica, inmunológica y citogenética) que a continuación se detalla.

3.3.2.1- Clasificación morfológica.

“En 1976, fueron propuestos por un grupo internacional de investigadores (franceses, estadounidenses y británicos) los criterios para realizar la clasificación morfológica de las Leucemias Agudas, que las dividía en 9 tipos, tres de estirpe linfoide y 6 de estirpe mieloide. El desarrollo de esta clasificación franco-americano-británica (FAB) fue estimulado por la necesidad de un esquema que unificara los criterios morfológicos y sirviera para correlacionarlos con el pronóstico de la enfermedad. Algunos años más tarde y ante el cúmulo de información generada por el uso de inmunorreactivos para estudiar y clasificar a las células leucémicas, los mismos miembros del grupo FAB agregaron a esta clasificación inicial dos variedades más de Leucemia Mieloblástica (M0 y M7), las que estrictamente no pueden ser diagnosticadas sólo con bases puramente morfológicas, ya que requieren estudios adicionales para ser definidas. (3)

La tabla 1.1 describe los 11 tipos de Leucemias Agudas que en la actualidad reconoce el grupo FAB

Tabla 3.1 Clasificación morfológica de las leucemias agudas (3)

LEUCEMIAS AGUDAS LINFOBLÁSTICAS (LAL)	LEUCEMIAS AGUDAS MIELOBLÁSTICAS (LAM)
LA-L1: linfoblástica "típica"	LA-M0: mieloblástica diferenciada mínimamente
LA-L2: linfoblástica "atípica"	LA-M1: mieloblástica inmadura
LA-L3: parecida al linfoma de Burkitt	LA-M2: mieloblástica madura
	LA-M3: promielocítica granular
	LA-M4: mielomonoblástica
	LA-M5: monoblástica pura
	LA-M6: eritroleucemia
	LA-M7: megacarioblástica

3.3.2.2- Clasificación inmunológica.

“Los marcadores inmunológicos, al identificar las células a través de sus características antigénicas, han permitido en el estudio de las células hematopoyéticas: a) reconocer estirpes o tipos celulares que difícilmente pueden clasificarse mediante métodos morfológicos y citoquímicos convencionales; b) establecer subgrupos inmunológicos en poblaciones celulares normales y en su contraparte leucémica, y c) definir poblaciones celulares con propiedades biológicas específicas. Por lo tanto, mediante los métodos inmunológicos es posible reconocer antígenos (Ag) en la membrana o en el citoplasma de

las células, algunos de los cuales son específicos para diferentes poblaciones celulares específicas. En la tabla 1.2 se muestra la manera simplificada de realizar la asignación del fenotipo de las Leucemias Agudas de acuerdo con la expresión de los Ag u otros marcadores en células leucémicas. Cabe resaltar que solamente se hace mención de algunos marcadores representativos y que posteriormente en los próximos capítulos se detallará otros importantes marcadores que han sido útiles para la diferenciación y el diagnóstico entre las diferentes clases de Leucemias Agudas. (3)

Tabla 3.2 Clasificación inmunológica simplificada de las leucemias agudas (3)

PROÓSITO	LAL B	LAL T	LAM
Definición de línea	CD79a / CD19	CD3c / CD7	MPOc / CD13, CD33
Maduración	CD34 / TdT	CD34 / TdT	CD34 / CD15 / HLA DR

LAL B = Leucemia aguda linfoblástica B; LAL T = Leucemia aguda linfoblástica T; LAM = Leucemia aguda mieloblástica; CD = Grupo de diferenciación (Cluster differentiation); MPOc = Mieloperoxidasa citoplásmica identificada por anticuerpo monoclonal; TdT = Transferasa de desoxinucleótidos terminales identificada por anticuerpo monoclonal.

3.3.2.3- Clasificación citogenética.

En muchos casos de Leucemias Agudas se encuentran alteraciones cromosómicas (en la Leucemia Mieloide Aguda ocurren más del 50% de los enfermos). De las alteraciones únicas en LMA, pueden señalarse:

- t(4;11) (q21;q23) en la LMA – M4 (mielomonoblástica)
- t(8;21) (q22.1;q22.3) en la LMA – M2 (mieloblástica con maduración); produce un gen quimérico AML1/ETO (Leucemia Mieloide Aguda/Ocho Veintiuno)
- t(15;17) (q22;q11.2) en la LMA – M3 (promielocítica); produce un gen quimérico (PML/RAR- α ; leucemia promielocítica/receptor alfa del ácido retinoico).
- inv(16) (p13.2q22) en la LMA – M4Eo (mielomonoblástica con eosinofilia)

Los primeros tres eventos son denominados como *translocaciones* y se producen por un intercambio de partes de 2 cromosomas sin pérdida visible de material cromosómico (translocación recíproca balanceada); el último evento es denominado como *inversión* y puede ser imaginada como una sección de un cromosoma que está siendo tomada y girada 180° y vuelto a insertar en su posición original. (44)

En las Leucemia Linfoblástica Aguda, una alteración cromosómica frecuente es el cromosoma Filadelfia : $t(9q+; 22q-)$ ($q34.1;q11.2$), que produce también un gen quimérico llamado BCR/ABL (Grupo de región de punto de rompimiento/Abelson) que codifica la síntesis de la proteína p190, con actividad de tirosin-cinasa. El cromosoma Filadelfia aparece en 2% de los enfermos de la LLA infantil e incluso en 25% de los casos adultos. El gen MLL (Leucemia de Linaje Mixto) ($11q23$) se localiza en el cromosoma 11 y se encuentra frecuentemente alterado en LLA y LMA, especialmente en la LMA secundaria al empleo de fármacos inhibidores de la topoisomerasa II y en algunas LLA en células B; se asocia a un pronóstico sombrío. (3)

3.3.3- Clasificación de las Leucemias Crónicas.

En México, podemos mencionar a tres de importancia: Leucemia Mielocítica Crónica (LMC), Leucemia Linfocítica Crónica (LLC) y Leucemia de Células Pilosas (LCP).

3.3.3.1- Leucemia Mielocítica Crónica.

Consiste en una proliferación neoplásica predominantemente de la serie granulocítica; sin embargo, se observan alteraciones en la serie roja y en las plaquetas, lo cual indica que el origen de la entidad parte de la célula madre o pluripotencial (stem cell en inglés). Esta enfermedad se ha relacionado con una anomalía cromosómica (translocación del cromosoma 22 al 9; $t(9q+; 22q-)$ que se denomina cromosoma Filadelfia (CrPh1), la cual se observa en más del 90% de los pacientes.

La LMC se puede clasificar en forma clínica en:

- Típica (CrPh1 presente)
- Atípica (CrPh1 ausente)
- Variedad juvenil (atípica del niño)

También ocasionalmente se pueden observar leucemias en las que predomina alguna célula madura, y existen al menos 4 subtipos:

- Leucemia eosinofílica crónica
- Leucemia basofílica crónica

- Leucemia monocítica crónica
- Leucemia neutrofílica crónica

3.3.3.2- Leucemia Linfocítica Crónica.

Es una neoplasia hematológica que se caracteriza por proliferación y acumulación de linfocitos de aspecto relativamente maduro o normal. Esta Leucemia se origina, en 90% de los casos, en linfocitos B; en México se observa con alguna frecuencia, probablemente ocupa el último lugar, solo antes que la Leucemia de las Células Pilosas. La enfermedad aparece de manera típica en individuos mayores de 50 años, es infrecuente en extremo en adultos menores de 35 años y muy excepcional en niños. La enfermedad es de curso indolente y en muchas ocasiones, el paciente fallece sin haberse realizado el diagnóstico de la LLC.

El 50% de los enfermos presentan alteraciones cromosómicas, la anomalía más frecuente es la **trisomía 12** y la adición de material genético al brazo largo del cromosoma 14 (**14q+**). En la siguiente tabla, se enmarcan los estudios clínicos de Binet de la LLC, los cuales son aceptados en el ámbito internacional:

Tabla 3.3 Estudios Clínicos de Binet de la Leucemia Linfocítica Crónica. (3)

ESTUDIO	CRITERIOS	SUPERVIVENCIA MEDIANA (AÑOS)
A	Ausencia de anemia y trombocitopenia. Menos de 3 áreas "linfoides" invadidas	>10
B	Ausencia de anemia y trombocitopenia, Tres o más áreas "linfoides" invadidas	5
C	Anemia (Hemoglobina <10g/dL) y/o trombocitopenia (plaquetas <100x10 ⁹ / L)	2

3.3.3.3- Leucemia de las Células Pilosas.

Es una enfermedad linfoproliferativa que se origina en los linfocitos B. Las células leucémicas se caracterizan por tener prolongaciones en el citoplasma ("pelos"). La enfermedad es poco frecuente en México y predomina en el norte del país, la entidad es indolente y predomina en varones (5-8 a 1). (3)

3.3.4- Clasificación de las malignidades hematológicas en base al Diagnóstico con Biología Molecular.

La clasificación de las Leucemias referida anteriormente, se sigue aplicando en la actualidad en muchas partes del mundo y en base a ella, se logra aplicar el tratamiento adecuado para el mejoramiento o en su caso, curación del paciente; pero gracias a los avances que han surgido en la ciencia y tecnología, específicamente hablando a nivel de las técnicas de Biología Molecular, se ha propuesto una nueva clasificación de todas las diferentes clases de leucemias y otros desórdenes y malignidades hematológicas, a partir de la distinción entre los tumores de linfocitos y las malignidades mieloides; por medio de marcadores fenotípicos y genotípicos que se pueden detectar con las nuevas herramientas que se disponen a nivel de diagnóstico en Biología Molecular y también, como parte de esta nueva propuesta de clasificación de las malignidades hematológicas, cabe resaltar que la clínica y los primeros métodos y técnicas de diagnóstico son en su mayoría, de utilidad para agrupar y diferenciar las clases de leucemias que padece el hombre.

De este modo, tenemos a los siguientes grupos.

3.3.4.1- Desórdenes mieloproliferativos.

Este término fue acuñado por *Dameshek* en el año 1951, describe un grupo de padecimientos causados por proliferación autónoma, irrestricta de 1 o más tipos de elementos celulares (precursores hematopoyéticos) en la médula ósea. Generalmente se exhibe en sangre periférica un aumento de eritrocitos, leucocitos y plaquetas. Aunque la alteración de las tres líneas celulares es peculiar de estos trastornos, en general, una línea se afecta más que las otras. (27, 37)

La clasificación de dichos desórdenes, se muestra de la siguiente forma:

I.- Desórdenes mieloproliferativos crónicos.

- **Leucemia Mielocítica Crónica (LMC)**
- Policitemia Rubra Vera, Mielofibrosis, Trombocitopenia esencial.

II.- Síndromes mielodisplásicos/mieloproliferativos.

- **Leucemia Mielomonocítica Crónica (LMMC)**
- Mielofibrosis Aguda
- Síndrome mielodisplásico
 - * Anemia Refractaria
 - * Anemia Refractaria con sideroblastos en anillo
 - * Anemia Refractaria con exceso de blastos
 - * Anemia Refractaria con exceso de blastos en transformación

III.- Leucemia Mieloide Aguda (LMA)

IV.- Linfohistiocitosis Eritrofagocítica Familiar

V.- Histiocitosis en Células de Langerhans

3.3.4.2- Desórdenes linfoproliferativos.

Es un grupo de padecimientos los cuales quedan clasificados usando el criterio de la asociación REAL (Linfoma Revisado por Europeos y Americanos). Esta clasificación define un número de entidades clínico – patológicas basado en la etapa de diferenciación de células tumorales así como por su apariencia morfológica y la expresión de marcadores celulares específicos, la presencia de anormalidades genéticas en las células y por características clínicas. (27, 37)

La clasificación de estos desórdenes se presenta a continuación.

I.- Leucemias Linfoblásticas

- **Precusores de células B (Leucemia Linfoblástica Aguda común [LLA-c]; Leucemia Linfoblástica Aguda pre-B [LLA-preB]; Leucemia Linfoblástica Aguda pre-pre B [LLA pre-pre B])**
- **Precursoras de células T**
- **Leucemia Aguda de linaje bifenotípico**

II.- Tumores de células B maduras (en sangre periférica)

- **Leucemia Linfocítica Crónica (LLC)**
- **Leucemia Linfocítica Crónica Atípica**
- **Linfoma de Células Mantle**
- **Leucemia Prolinfocítica B**
- **Linfoma de zona marginal**
- **Transformación de Células grandes de Leucemia Linfocítica Crónica**
- **Linfoma Folicular**
- **Linfoma de Burkitt no endémica**
- **Linfoma difuso de células B grandes**
- **Mieloma, Plasmacitoma y Mieloma y Gamapatía Monoclonal de Significado Incierto (MGUS en inglés)**
- **Leucemia de Células Pilosas**

III.- Tumores de Células T maduras (en sangre periférica)

- **Leucemia Prolinfocítica T**
- **Linfocitosis Granular Grande**
- **Micosis fungoides/Síndrome de Sezary**
- **Papulosis linfomatoide y linfoma anaplásica cutánea CD30+**
- **Leucemia/Linfoma de células T adultas**
- **Linfomas de células T ganglionar**

IV.- Linfoma de Hodgkin

3.4- Etiología de las diferentes clases de Leucemias.

A pesar de que durante gran parte del siglo XX, los científicos y clínicos se dedicaron a buscar y entender las causas que originan las leucemias, puede decirse que en algunas de ellas es poco entendido o incomprendido completamente la razón (es) por lo que se desencadena (n) las diferentes clases de Leucemias. Sin embargo, se ha logrado caracterizar rutas bioquímicas, genéticas, cromosómicas, entre otras, las cuales se han visto alteradas o interrumpidas y se han asociado con la aparición de la entidad patológica. Así, se ha encontrado lo siguiente para cada clase de Leucemia:

3.4.1- Etiología de la Leucemia Linfoblástica Aguda en niños.

Se ha encontrado que se da por una alteración genética de una célula hematopoyética. Se asocia dicha alteración con ciertas anomalías genéticas como los síndromes de Down, Bloom, Klinefelter; la anemia de Fanconi y ataxia telangiectasia. En algunos casos, está asociado con mutaciones adquiridas o heredadas del gen *p53* y por la exposición de radiaciones ionizantes. (42, 46)

3.4.2- Etiología de la Leucemia Linfoblástica Aguda en adultos.

Al igual que en el caso de los infantes, parecen ser las mismas razones las que afectan a los adultos la LLA, pero además, se ha asociado otras condiciones hereditarias como: Agamaglobulinemia (Bruton), Wiskott-Aldrich severo combinado, deficiencia de Adenosin-desaminasa. También la predisposición familiar pesa en este aspecto y podemos mencionar las siguientes entidades: Síndrome de Schwachman, la expresión de leucemias entre hermanos y familiares. Agentes virales se han asociado con la aparición de esta clase de leucemia como el Virus de Eipsten-Barr, el Virus de la Leucemia de Células T Humana tipo 1, en algunos casos el virus del Sarampión y factores ambientales como fármacos, tabacos, tintes de pelo. La característica principal es que todos estos factores inducen a la formación de un estado de aneuploidía en las células involucradas. (42, 46)

3.4.3- Etiología de la Leucemia Mieloblástica Aguda.

Esta clase de Leucemia en particular está dada por una serie de factores múltiples que originan su aparición. Tenemos así la exposición de agentes quimioterapéuticos como los agentes alquilantes (ciclofosfamida, nitrosoureas, clorambucil); a los agentes tóxicos (benceno, tabaco, cloranfenicol, fenilbutazona, epipodofilotoxinas como etoposida y teniposida; a la radiación militar, industrial, diagnóstica y terapéutica; a ciertas anormalidades congénitas como el Síndrome de Bloom, Down, anemia de Fanconi y a ciertas enfermedades previas en la médula ósea como la Hemoglobinuria Paroxística Nocturna, síndromes mielodisplásicos y mieloproliferativos (Leucemia Mielocítica Crónica, Policitemia Vera, Trombocitopenia esencial y metaplasia mioide agnoscica. (45, 46)

3.4.4- Etiología de la Leucemia Linfocítica Crónica.

En esta entidad, parece tener importancia los factores genéticos, edad, sexo y los defectos inmunitarios heredados o adquiridos. La exposición a radiación ionizante y a los agentes químicos quizá no tenga un papel relevante. En estudios recientes se considera que la infección con el HTLV-1 puede tener relación con la LLC. Aunque se sabe que el virus infecta principalmente a las células T, también lo hace con las células B; sin embargo, en estas últimas no induce aumento de su proliferación como lo hace con las células T. Los factores genéticos se evidencian por la presentación de la forma familiar de la leucemia y por la frecuencia mayor con la que ocurre la neoplasia en los familiares de los pacientes con LLC. Las anomalías cromosómicas comunes son la trisomía 12 y la 14q+; esta última es otro marcador de mal pronóstico. El oncogen *bcl-1* se ha detectado en las células de LLC y se localiza en el punto de rotura de la translocación t(11;14). (45, 46)

3.4.5- Etiología de la Leucemia Mielocítica Crónica.

En 1845, Craige, Bennetty y Virchow describieron el padecimiento al notar el aspecto "purulento" de la sangre de estos enfermos. La etiología de la LMC es desconocida en la mayoría de los casos; sin embargo, los riesgos de desarrollar LMC es más alto a la exposición de la radiación (claro ejemplo se mostró con los sobrevivientes de las explosiones atómicas en Hiroshima y Nagasaki). No se ha asociado con algún agente etiológico oncológico o viral, pero se reportó un caso donde después de un trasplante de médula ósea, las células residuales del donador que expresaron el cromosoma Filadelfia, posiblemente transfirieron material genético a las células del receptor y este paciente presentó la entidad patológica. (45, 46)

3.4.6- Etiología de la Leucemia de las Células Pilosas.

La etiología de la LCP se desconoce. La exposición al benceno, insecticidas organofosforados u otros solventes pueden estar asociados con el desarrollo de la enfermedad, pero no ha sido confirmado. La exposición a la radiación, químicos agrícolas, hollín y previa mononucleosis infecciosa han sido sugeridos como asociaciones etiológicas; sin embargo, una relación causal no ha sido establecida definitivamente. (2, 45, 46)

3.5- Rasgos generales sobre la patogenia de las Leucemias.

El común denominador en la patología de las leucemias es la remoción parcial o completa de la hematopoyesis normal en la médula ósea por el clona de células hematopoyéticas neoplásicas alteradas genéticamente. Este crecimiento ventajoso resulta en anemia, fagocitopenia, trombocitopenia e infiltrados leucémicos. Todas las leucemias tienden a infiltrarse en hígado, bazo y ganglios linfáticos, pero suelen infiltrarse también en riñón, gónadas, hueso, articulaciones y amígdalas.

La forma en que se desarrollan las leucemias y los eventos que desencadenan estos procesos cancerígenos, en diversos casos, es poco entendido o comprendido; pero a pesar de esta situación, se han realizado una serie de estudios que han tratado de explicar el

origen de las leucemias, o por lo menos, han explicado de manera parcial, la patogenia de las diferentes clases de Leucemias.

De este modo, se tienen las siguientes explicaciones que se han encontrado o descubierto y que tienen relación con la patogenia de las Leucemias:

3.5.1- Patogenia de la Leucemia Linfoblástica Aguda.

Existen alteraciones genéticas, como en otros casos de malignidades, incluyen la pérdida de genes supresores de tumores y la mutación de oncogenes. Las translocaciones cromosómicas en las leucemias agudas afectan muy frecuentemente a los genes que codifican los factores de transcripción, las proteínas regulatorias críticas que controlan el desarrollo de las células sanguíneas. La translocación puede afectar a la célula por uno de los dos siguientes mecanismos: *la juxtaposición de una unidad de transcripción intacta de un cromosoma a un elemento más alto de un gen en otro cromosoma*, o por *la formación de la fusión de proteínas quiméricas*. En la LLA, la unidad de transcripción esta translocada frecuentemente dentro de la vecindad de genes que codifican cadenas discretas de moléculas de inmunoglobulinas o de receptores de linfocitos T, dando origen a una expresión inadecuada del gen translocado. Por ejemplo, en la t(8;14) en la LLA de células B, el proto-oncogen *MYC* se transloca dentro del locus *IgH*, conduciendo a la expresión inapropiada de *MYC*. Sin embargo, el producto del gen *MYC* es idéntico al "tipo original". En general, las translocaciones involucradas en las LLA de linfocitos T están caracterizadas por la expresión no regulada de un gen. Alternativamente, las translocaciones cromosómicas pueden interrumpir dos genes dentro de su secuencia de codificación, conduciendo a la creación de una proteína de fusión quimérica. Por ejemplo, en t(9;22) tanto en la LLA como en la Leucemia Mielocítica Crónica (LMC), resulta en la formación de una proteína de fusión quimérica *BRC-ABL*, la cual codifica una proteína citoplasmática que contiene el dominio activado *ABL* del tipo tirosinasa. En general, las translocaciones en las LLA de células B [con excepción de la t(8;14) y la t(5;14) (q31;q32)] originan proteínas de fusión quimérica. En la siguiente tabla se muestra la clasificación por función de los oncogenes y de las conexiones de las translocaciones en la LLA. (2)

Tabla 3.4 Clasificación por función de los oncogenes en las conexiones de translocaciones en LLA (2)

GEN	LOCALIZACIÓN	TRANSLOCACIÓN	CONSECUENCIA DE LA TRANSLOCACIÓN	INMUNOFENOTIPO
Factores de transcripción				
HOX11	10q24	t(7;10), t(10;14)	Expresión regulada	no Linaje T
LYL1	19p23	t(7;19)	Expresión regulada	no Linaje T
RBTN1	11p15	t(11;14)	Expresión regulada	no Linaje T
RBTN2	11p13	t(11;14)	Expresión regulada	no Linaje T
TAL1 (SCL)	1p32	t(1;14)	Expresión regulada	no Linaje T
TAL2	9q32	t(7;9)	Expresión regulada	no Linaje T
MYC	8q24	t(8;14)	Expresión regulada	LLA T y B
AML1	21q22	t(12;21)	Proteína de fusión	Linaje B
TEL	12p12	t(12;21)	Proteína de fusión	Linaje B
E2A	1q23	t(1;19)	Proteína de fusión	Pre-B
PBX1	19p13	t(1;19)	Proteína de fusión	Pre-B
MLL	11q23	t(4;11), t(11;19)	Proteína de fusión	B, mieloides-B
Familia SRC (Proteínas Tirosinasa)				
LCK	1p34	t(1;7)	Expresión regulada	no Linaje T
ABL	9q34	t(9;22)	Proteína de fusión	Linaje B
Proteínas serinasa				
BRC	22q11	t(9;22)	Proteína de fusión	Linaje B
Factor de crecimiento				
IL3	5q31	t(5;14)	Expresión regulada	no LLA Pre B
Receptor de superficie celular				
TANI	9q34	t(7;9)	Expresión regulada	no Linaje T
Regulador del ciclo celular				
CDKN2	9p21	del(9p), t(9p)	Pérdida expresión	de Linajes T y B

3.5.2- Patogenia de la Leucemia Mieloblástica Aguda.

Se cree que la Leucemia Aguda sea un desorden clonal, lo que significa que todas las células que aparecen malignas, descienden de una sola célula progenitora. Las evidencias del origen clonal de la Leucemia Aguda se originaron de la detección de la homocigocidad para la isoenzima *glucosa-6-fosfato deshidrogenasa* (G6PD) en células leucémicas obtenidas de mujeres conocidas para ser heterocigotas para la expresión de la isoenzima G6PD ligado al cromosoma X. En general, hay dos tipos de lesiones en las Leucemias: Una categoría involucra la *activación genes promotores de crecimiento (proto-onco)*. En otro tipo incluye la *interrupción o falta de expresión de genes supresores de crecimiento o de inducción a la diferenciación (ejemplo, genes supresores de tumores)*. Ejemplos de proto-oncogenes activados que han sido descritos en la LMA en humanos incluyen alteraciones de uno de los tres miembros de la familia de genes *ras*, proteínas de unión a proteínas G de 21 kDa involucradas en la señal de transducción de crecimiento. Del 10 al 30% de los pacientes con LMA tienen anomalías en uno de estos tres genes *ras*. Los mieloblastos que expresan niveles significantes de ciertos proto-oncogenes asociados a la proliferación nuclear a la unión de ADN (ejemplo, *c-myc*, *c-myb*), el proto-oncogen del ligando de la trombopoyetina *c-mpl*, o el proto-oncogen antiapoptótico *bcl-2*, puede cada uno estar asociado a una respuesta menos favorable a la terapia. La expresión reducida de genes supresores de tumores tales como el *p53* o el *Rb* (ejemplo, retinoblastoma) han sido también correlacionados con un pobre pronóstico. Las translocaciones citogenéticas balanceadas son encontradas comúnmente en los blastos de los pacientes con LMA. El ARNm nuevo y las proteínas surgidas por la fusión de partes de genes sobre diferentes cromosomas son el resultado de tales translocaciones y pueden ser esenciales en el desarrollo de la Leucemia, como lo es en los ejemplos de las *t(15;17) (q22;q21)* en la Leucemia Promielocítica Aguda y de la *t(8;21) (q22;q22)* la cual está asociada a la LMA M2. (2)

3.5.3- Patogenia de la Leucemia Linfocítica Crónica.

Las células LLC expresan antígenos pan-B (ejemplo, moléculas HLA clase II, CD19, CD 20) así también como antígenos de activación (CD23, CD25, CD71, B5, B7), pero no expresan los antígenos de diferenciación terminal que expresan las células plasmáticas. Este inmunofenotipo sustenta la hipótesis de que la célula LLC B es un linfocito B activado, lo cual significa que las células pueden ser activadas sin división pero no sugiere que estén en un estado de proliferación activa. Las células LLC B han sido reportadas también que expresan otros antígenos más característicos de células Plasmáticas, monocitos o células mieloides. Las implicaciones biológicas de estas observaciones permanecen para que sean determinadas. Un rasgo característico de las células LLC B es la expresión del CD5. Se cree que las células CD5 en LLC representan una subclona menor de linfocitos normales, la cual experimenta una transformación maligna a través de un proceso desconocido. Los factores de crecimiento que han sido involucrados en la proliferación desordenada y la diferenciación de células B en LLC incluyen al **factor de necrosis tumoral (TNF), interleucinas 2, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13** y otros factores de crecimiento de linfocitos B. Una de las características clínicas de la LLC es la presencia de procesos autoinmunes y una reciente teoría es que la LLC de células B es una proliferación monoclonal de anérgicas CD5+, linfocitos B autorreactivos dedicados a la producción de autoanticuerpos polirreactivos naturales. Por otro lado, se ha visto que la relación del gen antiapoptótico BCL-2 al gen proapoptótico BAX está incrementada en las células LLC, lo cual favorece la supervivencia celular. (2)

3.5.4- Patogenia de la Leucemia Mielocítica Crónica.

La Leucemia Mielocítica Crónica (LMC) es un desorden hematopoyético clonal debido a un defecto genético adquirido en la célula tallo (stem cell) pluripotencial. Como un resultado, la hematopoyesis normal es gradualmente desplazada por una proliferación incrementada de células diferenciadas con características de expansión de elementos mieloides. La leucemia fue reconocida primero en 1840, pero la LMC fue claramente distinguida de otros tipos de leucemias solamente con la llegada de tinciones panópticas de

frotis sanguíneos al final del siglo XIX. En 1960, el cromosoma Filadelfia (Ph) fue descubierto en las células LMC por lo que la LMC fue la primera neoplasia humana al ser caracterizada por un consistente marcador citogenético. En 1973 el cromosoma Ph se mostró como el resultado de una translocación recíproca balanceada que involucra a los cromosomas 9 y 22. En la década de los 80's, se caracterizó al gen quimérico *BRC-ABL* formado como el resultado de la translocación Ph. Ahora se piensa que juega un papel central en la patogénesis de la fase crónica de la LMC. El mecanismo oncogénico del gen *BCR-ABL* es un área de intensa investigación. La presencia de la proteína *BCR-ABL* como producto en LMC una evidencia circunstancial congénita por su papel en la patogénesis de la enfermedad. Dicho gen ha sido encontrado en células hematopoyéticas muy primitivas, por lo que sugiere la participación de una célula tallo pluripotencial en el desarrollo de la oncogénesis. Se ha demostrado que la función *ABL* es primordialmente la de fosforilar residuos de tirosina propios de la proteína quimérica y de otras proteínas. La función del *BCR* es debatible. El gen codifica una serina-treoninasa, pero no se ha determinado de manera clara su papel en el desarrollo de la Leucemia. El complejo *BCR-ABL* forma un complejo con el complejo molecular GRB-2/SOS, el cual juega un papel importante en el sistema intracelular del segundo mensajero por debajo del punto *RAS*. La interrupción de esta ruta puede conducir a la activación constitutiva de *RAS* por lo que se origina una expansión inapropiada del compartimento de la célula progenitora. Se cree también que el gen *BCR-ABL* se opone a la apoptosis celular. Esta teoría esta basada en la evidencia de la activación de *ABL* puede inhibir la apoptosis por sí mismo y también se piensa que el gen causa adhesión defectuosa entre célula-células progenitoras y células del estroma en médula ósea, por lo que la célula progenitora puede escapar de los mecanismos de regulación fisiológica proporcionados por las células del estroma y proliferar de manera semiautónoma. Hay una evidencia de que la longitud del telómero es mas corta en las células LMC y la actividad telomerasa se incrementa en etapas avanzadas de la enfermedad. Pero a pesar de todos estos estudios y descubrimientos descritos, el mecanismo exacto por el cual la expresión del gen *BCR-ABL* en una célula hematopoyética pluripotencial resulta en la proliferación preferencial y en la diferenciación de los progenitores mieloides permanece en un misterio. (2, 42)

4- INICIOS DEL DIAGNOSTICO DE LAS DIFERENTES CLASES DE LEUCEMIAS

En el presente trabajo se ha hecho mención sobre los primeros registros que se realizaron a nivel clínico sobre esta enfermedad, esto fue a partir del año de 1847, cuando Virchow describe por primera vez a la enfermedad que denominó *Leucemia* en todos aquellos pacientes que presentaban como característica principal una consistencia "purulenta" de la sangre de dichas personas. (42)

Este aspecto es consecuencia de la leucocitosis que ocurre en las Leucemias y con el posterior estudio de la sangre a nivel microscópico y claro, con el desarrollo de las técnicas tintoriales que permitiera diferenciar cada elemento celular de la sangre, el avance en el estudio y caracterización de las diferentes clases de leucemia fue dándose en forma gradual. Con lo primero que se contó para el diagnóstico en primer lugar, fue con el desarrollo de la clínica que el médico realizaba a los pacientes, es decir, la descripción de signos y síntomas que el paciente presentaba y describía, esto fue fundamental para caracterizar las diferentes clases de Leucemias, ya que con los avances que se tenían a nivel de laboratorio clínico, en el aspecto del conteo celular en la sangre (cuenta de eritrocitos y de leucocitos en un volumen de sangre dado) y las técnicas de tinción de la sangre, se logró especificar que las Leucemias son un grupo de neoplasias y que podían ser clasificadas de acuerdo a la rapidez en que se presentaban (aguda o crónica) y el tipo celular que predominaba (blastos o células maduras de la familia mielóide o linfóide).

También fue decisivo el empleo de las técnicas quirúrgicas, y hablando de manera muy particular, la realización de las biopsias de médula ósea (tejido hematopoyético como actualmente se sugiere para la terminología del compartimento que origina la hematopoyesis). Se entiende por **biopsia** como la técnica quirúrgica en la cual se sustrae parte del tejido (muestra) a analizar y observar las características morfológicas que nos ayuda a determinar el diagnóstico de la anormalidad. (6)

En base a estos criterios, se hablará sobre las primeras herramientas que se contaron a finales del siglo XIX, en todo el siglo XX y que a principios del siglo XXI, siguen usándose para el diagnóstico de las diferentes clases de Leucemias.

4.1- Datos de Laboratorio y Clínica de las diferentes clases de Leucemias

Desde al principio de la caracterización de las diferentes clases de Leucemia se contó con la determinación del cuadro clínico del paciente por parte del médico para establecer la naturaleza de la enfermedad y con el desarrollo de los avances tecnológicos y científicos a nivel de laboratorio, la clínica se vio fortalecida para el diagnóstico de los diferentes tipos de Leucemias que existen. Como se reportó anteriormente, la primera clasificación de las Leucemias se basó en el tiempo en que se presentaba, desarrollaba y desencadenaba la enfermedad, así pues, tenemos que se establecieron las Leucemias de tipo aguda, eran aquellas cuya desarrollo y fase final se presentaban en muy poco tiempo y las personas que la padecían tenían un tiempo de vida muy corto; y las Leucemias del tipo crónica eran aquellas en las cuales los pacientes tenían una mayor esperanza de tiempo de vida, ya que se desarrollaban con menor velocidad con respecto a las Leucemias Agudas. Cabe aclarar ahora que actualmente esto ya no se aplica ya que se dan muchos casos en que pacientes que padecen las Leucemias de tipo "crónicas" pueden morir más rápidamente que aquellos que padecen de las Leucemias Agudas a diferencia de que estos últimos están recibiendo el tratamiento adecuado y los primeros no. Ahora en nuestro días, la denominación aguda y crónica se aplica principalmente al estado de maduración del linaje celular que está predominando. Se considera que en las Leucemias Agudas predominan las células inmaduras o blastos y que en las Leucemias Crónicas predominan las células maduras, aunque en éstas últimas, como se verá más adelante, tienden a tener una fase de conversión a las del tipo agudas.

Tenemos a continuación, la descripción de la clínica de las diferentes clases de Leucemias:

4.1.1- Cuadro Clínico de las Leucemias Agudas.

En niños, el cuadro clínico puede imitar o parecerse a otras enfermedades como artritis reumatoide, fiebre, nefritis, meningitis y aún a hiperparatiroidismo. En raros casos de Leucemia Linfoblástica Aguda, se ha presentado anemia aplásica, hipereosinofilia, nódulos pulmonares, necrosis en médula ósea, efusión pericárdica, hipoglicemia, nódulos en la piel y neutropenia cíclica. Hay mayor probabilidad de infiltración en hígado, bazo y ganglios

linfáticos que en los adultos. Se ha visto que casi 2/3 partes de los pacientes con LLA padecen hepatoesplenomegalia y la mitad con linfadenopatía son asintomáticos. La adenopatía para traqueal y mediastinal puede originar síntomas respiratorios de leves a severos. Con respecto a los riñones, la LLA puede originar en presentación de película de hematuria, hipertensión y falla renal asociado a nefromegalia. En niños y en infantes que padecen Leucemia Mieloide Aguda del tipo M0 (según la FAB), es común que presenten infiltrados en los pulmones. A nivel de meninges, puede originar dolor de cabeza, emesis y papiledema al momento del diagnóstico. En el Sistema Nervioso Central se distinguen 3 grados o grupos de Leucemias: SNC0, SNC2 y SNC3. También en los niños se puede dar la Leucemia testicular. En el caso de la LLA en adultos presentan de forma aguda signos y síntomas atribuibles al desplazamiento en médula ósea con la clona leucémica y menos frecuente con la proliferación en sitios extramedulares que conducen a la identificación de la disfunción del órgano. Dentro de los síntomas no específicos tenemos: anemia hipoproducida, fatiga, debilidad, palidez, taquicardia y dolor en el pecho; infección o fiebre y también la hemorragia es común. Se encuentra también la leucemia a nivel del SNC, linfadenopatía, esplenomegalia, hepatomegalia, masa mediastinal, Leucemia en pleura, hueso, pericardio, retina y, en menor proporción, en piel, pulmón. Riñón, testículos y amígdalas. Ahora en el caso de las Leucemias Mieloblásticas Agudas, incluye síntomas asociados al desplazamiento de la médula ósea como palidez, fatiga, sangrado, contusión (debido a la trombocitopenia, se nota especialmente en piel y mucosas), fiebre e infección. Las presentaciones extramedulares pueden ocurrir en aproximadamente el 5% de los casos de LMA y muy comúnmente involucra la piel. Así pues, en forma general, los pacientes que sufren Leucemias Agudas se presentan con síndromes hemorrágico, anémico o infiltrativo, aisladamente o en combinación. La hemorragia puede deberse a la trombocitopenia por invasión leucémica de médula ósea o a la coagulopatía por consumo, como ocurre en el caso de la LMA del tipo M3. La anemia se debe también a la invasión tumoral de la médula ósea y habitualmente, es más grave en la LLA. El síndrome infiltrativo supone crecimiento de ganglios, bazo o hígado; las leucemias con componente monoblástico infiltran las encías con mayor frecuencia que las LLA. La expansión de la cavidad medular por la proliferación celular monoclonal puede causar dolores óseos. La LLA de células T con frecuencia generan crecimiento en el timo. (45, 46)

4.1.2- Cuadro Clínico de la Leucemia Mielocítica Crónica.

La LMC presenta tres fases: **a) Fase Crónica.**- Cursa en forma subclínica durante meses o años (en promedio 6 años, tiempo que transcurre entre la aparición de la primera célula Filadelfia (Ph) + y la aparición de cifras leucocitarias $> 100 \times 10^9$ células / L. Cuando el recuento leucocitario se eleva por arriba de 50×10^9 células / L aparecen síntomas como fatiga, malestar general, pérdida de peso, diaforesis nocturna, dolores óseos y sensación de plenitud en hipocondrio izquierdo. En esta etapa es característico la presencia de *esplenomegalia*. Puede ocasionalmente acompañarse de datos clínicos de síndrome anémico, hemorragiparo o trombótico. **b) Fase Acelerada.**- Durante esta fase hay algunos datos clínicos que sugieren la transformación de la fase crónica en la tercera fase o blástica. Estos datos generales se pueden aplicar sólo a pacientes en tratamiento e incluyen fiebre sin causa aparente, mayor síndrome anémico o trombohemorrágico, crecimiento progresivo del bazo o aparición de crecimientos ganglionares e **c) Fase blástica.**- El paso a la fase blástica ocurre de 2 – 6 años después del diagnóstico (en promedio de 3 – 3.5 años). Los datos clínicos son heterogéneos y similares a los del inicio, pero con mayor gravedad: fiebre, diaforesis nocturna, dolores óseos, mialgias y artralgias, anorexia, fatiga, pérdida de peso y depresión. Se hacen más aparentes el síndrome anémico, hemorragiparo e infecciones, así como linfadenopatía y en algunos casos, signos de invasión meníngea. Sin embargo, en raros casos, el paciente puede entrar a la fase blástica totalmente asintomático. (45, 46)

4.1.3- Cuadro Clínico de la Leucemia Linfocítica Crónica.

Presentan linfocitosis los pacientes y en base a la observación y a estudios realizados, se ha establecido un sistema de etapas donde se observan las características clínicas; en base al criterio de Rai:

Tabla 4.1 Características clínicas de la LLC según Rai (3)

ETAPA	RIESGO DE GRUPO	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	SOBREVIVENCIA PROMEDIO EN AÑOS
0	Bajo Riesgo	Linfocitosis en sangre y médula ósea solamente.	> 10
I	Riesgo intermedio	Linfocitosis+ linfadenopatía+ esplenomegalia+hepatomegalia.	7
II	Riesgo intermedio	Linfocitosis+ linfadenopatía+ esplenomegalia+hepatomegalia.	7
III	Alto riesgo	Linfocitosis+ anemia+ trombocitopenia	
IV	Alto riesgo	Linfocitosis+ anemia+ trombocitopenia	

También son muy usados la clasificación de Binet para la LLC que ya fueron mencionadas en el capítulo I y a continuación se muestran de nuevo:

Tabla 4.2 Estudios Clínicos de Binet de la Leucemia Linfocítica Crónica. (3)

ESTUDIO	CRITERIOS	SUPERVIVENCIA MEDIANA (AÑOS)
A	Ausencia de anemia y trombocitopenia. Menos de 3 áreas "linfoides" invadidas	>10
B	Ausencia de anemia y trombocitopenia, Tres o más áreas "linfoides" invadidas	5
C	Anemia (Hemoglobina < 10g/dL) y/o trombocitopenia (plaquetas < 100x10 ⁹ /L)	2

También del 10 – 15% de los pacientes evolucionan a enfermedades linfoproliferativas más agresivas (como el síndrome de Richter). También presentan incrementos en linfadenopatía, hepatosplenomegalia, fiebre, dolor abdominal, pérdida de peso y anemia progresiva y trombocitopenia con un rápido incremento en la cuenta de linfocitos en sangre periférica. Se observan procesos de autoinmunidad en el 20% de los casos (anemia autoinmune) y otras afecciones como la disminución de las Inmunoglobulinas y una tendencia a desarrollar complicaciones infecciosas. (37, 45, 46)

Con respecto a los datos que aporta el laboratorio clínico, tenemos lo siguiente para cada clase de Leucemia:

4.1.4- Datos del Laboratorio de las Leucemias Agudas.

La marca característica de la leucemia aguda es la combinación de pancitopenia con blastos circulantes. Sin embargo, es posible que no haya blastos en el frotis de sangre periférica hasta en un 10% de los casos (leucemia aleucémica). Puede haber diversas anomalías de laboratorio. Es posible observar hiperuricemia, hiponatremia e hipokalemia. La enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH) puede verse incrementada su actividad como consecuencia del recambio celular; si hay coagulación intravascular diseminada, se reduce la concentración de fibrinógeno, se prolonga el tiempo de Protrombina y hay productos de degradación de la fibrina. Los pacientes con LLA (en especial de células T) pueden tener una masa mediastínica visible en radiografía de tórax. Los enfermos con leucemia meníngea tendrán blastos en el líquido cefalorraquídeo. Se observa en casi el 5% de los casos en el momento del diagnóstico y es más común en los tipos monocíticos de la LMA. Se presenta la hiperleucocitosis, en la que una cifra notable elevada de blastos circulantes (por lo general mayor de 200,000 células / μ L de sangre y representan del 15 al 95% de los leucocitos totales) origina deterioro de la circulación. Es muy común que se den infecciones por la neutropenia (500 hasta 100 neutrófilos / μ L de sangre) y también los procesos hemorrágicos se asocian con la trombocitopenia presentada (conteo plaquetario $< 20 \times 10^9$ plaquetas / L). Como se verá posteriormente, los pacientes con la variedad mieloide aguda pueden tener gránulos visibles en los blastos. El bastoncillo de Auer es una inclusión eosinofílica en aguja en el citoplasma y es patognomónico de la LMA. (37, 45, 46)

4.1.5- Datos del Laboratorio de la Leucemia Mielocítica Crónica.

La característica de la LMC es una leucocitosis; la cifra promedio de leucocitos al diagnosticarse es de 150,000 / μ L de sangre. La sangre periférica es característica: la serie mieloide está desviada a la izquierda con predominio de formas maduras y células por lo general presentes en proporción con su grado de maduración. Al presentarse los pacientes por lo general no tienen anemia; la morfología de los eritrocitos es normal y rara vez se ven eritrocitos nucleados. La cuenta de plaquetas puede ser normal o elevada (en ocasiones hasta valores muy altos). La cantidad de fosfatasa alcalina leucocitaria es invariablemente

baja y es un signo de anomalías cualitativas en los neutrófilos. Los valores de vitamina B₁₂ están muy elevados por aumento de la secreción de transcobalamina III. Las concentraciones de ácido úrico pueden ser altas; el nivel sérico de la muramidasa también aumenta. Como se verá posteriormente, en los estudios citogenéticos el cromosoma Filadelfia está presente casi de manera invariable. Con la progresión a la fase acelerada y blástica, ocurren anemia y trombocitopenia progresivas; además aumenta el porcentaje de blastos en sangre y en médula ósea. Durante la fase acelerada se puede presentar lo siguiente: anemia (Hb<8.0g/dL), leucocitosis (>100x10⁹/L), trombocitopenia o trombocitosis y durante la fase blástica existe >30% de blastos y/o promielocitos en sangre o en médula ósea. (37, 45, 46)

4.1.6- Datos del Laboratorio de la Leucemia Linfocítica Crónica.

La marca característica de la LLC es la linfocitosis aislada. La cuenta de leucocitos suele ser mayor de 20,000/μL de sangre y puede estar muy elevada. Por lo general, 75 a 98% de las células circulantes son linfocitos. Los linfocitos aparecen pequeños y "maduros", con cromatina nuclear condensada y morfológicamente indiferenciables de linfocitos pequeños normales. El hematocrito y la cuenta de plaquetas suelen ser normales al presentarse la enfermedad; pero después se puede presentar un decremento en la cuenta de plaquetas y la hemoglobina o hematocrito son consistentes con la anemia y, en la mitad de los pacientes, hay hipogammaglobulinemia y esto es más común a medida que avanza la enfermedad; en algunos casos, se encuentra en suero una pequeña cantidad de paraproteína IgM. (37, 45, 46)

4.1.7- Datos del Laboratorio de la Leucemia de las Células Pilosas.

La LCP se caracteriza por pancitopenia; la anemia es casi universal, y el 75% de los pacientes tienen trombocitopenia y neutropenia. Las células Pilosas suelen hallarse en pequeños números en frotis de sangre periférica y tienen un aspecto característico con múltiples salientes citoplasmáticas. Posteriormente se verá que las células Pilosas tienen un patrón de tinción histoquímica característico con fosfatasa ácida resistente al tartrato.

4.2- Empleo de la Histología

El estudio de la Histología implicó principalmente dos eventos históricos: el desarrollo y perfeccionamiento del microscopio óptico y el desarrollo de las técnicas tintoriales para observar los diferentes tipos de tejido. Sin duda a finales del siglo XIX y a principios del siglo XX estos acontecimientos se complementaron para establecer en gran medida la clasificación morfológica actual que existe de las diferentes clases de Leucemias; pero es menester hablar primero sobre el objeto de estudio por parte de la histología, particularmente hablando del tejido en donde se desarrollan las Leucemias, y para esto, se describirá la obtención de las muestras de tejido a analizar: médula ósea y sangre periférica, ya que a partir de ellas, se realizan tinciones de estos tejidos para su observación en el microscopio y llevar a cabo la caracterización morfológica de las diferentes clases de Leucemias.

4.2.1- Biopsia de Médula Osea.

Es primariamente, la técnica de diagnóstico más realizada antes del tratamiento. Su valor diagnóstico en anomalías de eritrocitos, leucocitos, plaquetas y células reticulares y su almacenaje también como en enfermedades de células plasmáticas es bien conocido. En pacientes con Linfomas, Leucemias o Mielomas, la biopsia de médula ósea no es solamente una prueba de diagnóstico, sino que también significa la historia natural, la guía y evaluación de la terapia. La biopsia de médula ósea es importante también como ayuda en el diagnóstico de enfermedades que son consideradas no hematológicas (anomalías inmunológicas, toxicidad por plomo, por ejemplo) y como origen de material de cultivo celular. (6)

Colección de la muestra. La médula ósea se obtiene usualmente del esternón o de las crestas ilíacas anterior o posterior en los adultos y algunas veces de la tibia y de la espina dorsal en los bebés. Solamente una pequeña muestra se obtiene de estos últimos dos lugares. Debido al peligro para el paciente y la tendencia del practicante de usar la médula más que las técnicas de aspiración, la cresta ilíaca es sustituida por la biopsia esternal. Lo

que es más, la aspiración es más doloroso que llegar hasta la médula. Las muestras de médula del esternón, cresta ilíaca y de la espina vertebral posterior son esencialmente similares, excepto en aquellos pacientes en fases tempranas en donde en el esternón se puede encontrar normal o hiperactiva y en la cresta ilíaca se puede encontrar una médula aplásica. La mejor área para realizar la biopsia quirúrgica es el esternón, a menos de que una lesión específica sea identificada y sea recomendable realizarla en otra área. (6)

4.2.2- Obtención de Sangre Periférica.

La sangre periférica es la muestra en la cual se ve el grado de avance de las diferentes clases de Leucemias, ya que si los blastos han llegado a la circulación, significa que ya han rebasado la capacidad de volumen del compartimento en donde se origina la hematopoyésis, es sin duda la muestra biológica más fácil de obtener, con un grado de traumatismo mínimo y cuya información es importante para la diferenciación de las Leucemias.

Colección de la muestra. Se realiza mediante una punción venosa o arterial, aunque se prefiere la primera debido a su gran facilidad para obtenerla, generalmente se obtiene de las venas que cruzan toda la extensión del brazo (extremidades superiores), las cuales son las venas cefálica, basilica y cubital, a nivel del pliegue del codo, con un sistema de vacío o con el uso de jeringa se obtiene la muestra sanguínea sin necesidad de utilizar anestesia o procesos sofisticados de asepsia. Es necesario el uso de un anticoagulante para realizar la tinción sobre la preparación de sangre completa.

4.2.3- Preparación y Fijación de una extensión de médula ósea y sanguínea.

Los frotis se pueden hacer sobre portaobjetos o cubreobjetos, aunque es más recomendable usar portaobjetos. Un método muy empleado es el denominado de la cuña, la cual consiste en colocar una gota de sangre de 2 a 3 mm de diámetro (o en el caso del aspirado o biopsia de médula ósea se extiende sobre el portaobjetos) aproximadamente a 1 cm del extremo de un portaobjetos limpio y sin polvo, situado sobre una mesa o superficie plana. Con el pulgar e índice de la mano derecha sostener un segundo portaobjetos (extensor) contra la

superficie del primero a un ángulo de 30 a 45° y deslizarlo en retroceso contra la gota de sangre hasta que se establece contacto. Permitir que la sangre se difunda y cubra el ángulo entre los dos portaobjetos. Empujar el portaobjetos extensor hacia delante con rapidez moderada hasta que toda la sangre se haya extendido en una película de mediano espesor. El portaobjetos extensor debe ser algo más estrecho que el primero para examinar fácilmente los bordes con el microscopio. No se debe cubrir toda la superficie del portaobjetos; una extensión buena comprende una porción gruesa y una delgada, con una transición gradual entre ambas; su aspecto a de ser liso y nivelado, sin ondulaciones resaltes ni poros. Cuanto más rápidamente la película se seca al aire, mejor se obtiene la extensión de las células sobre el portaobjetos.

Una vez que ya tengas extendido nuestra muestra, se procede a fijarla; existen diversas sustancias con la capacidad de realizar la extensión, entre ellas está el metanol (el solvente más usados en las tinciones de la sangre y que está incluido en muchas de estas tinciones) y el formaldehído (en el caso de las extensiones de médula ósea). (17)

Existen diversas tinciones útiles para la observación de muestras de médula ósea y sangre; pero las más usadas son las siguientes: **Romanowsky** y **Wright** que a continuación se describirá su metodología.

4.2.4- Teoría y tinción de Romanowsky – Giemsa.

Las tinciones tradicionales para la sangre y tejido hematopoyético contienen dos o tres colorantes tiazina (azul de metileno y sus productos de oxidación) y eosina, disueltos usualmente en metanol y glicerol. Estos últimos ayudan a estabilizar la solución stock; y puede ser sustituido por hidrocloreto de dietilamina, el cual no incrementa la viscosidad. Estas mezclas son conocidas generalmente como “**tinciones Romanowsky-Giemsa**”, después de que los hematólogos ruso y alemán describieron sus propiedades en 1891. Se conoce ahora que las propiedades de las tinciones de Romanowsky-Giemsa son atribuibles al *azure B* y a la *eosina*. Las diferentes células de la extensión sanguínea o de la médula ósea se identifican por virtud de los colores impartidos a los núcleos, citoplasma y gránulos citoplasmáticos de las células. Los *eritrocitos* se colorean por los aniones de la eosina, con intensidad proporcional a su concentración de hemoglobina intracelular; los *reticulocitos*

también contienen material teñido por los colorantes catiónicos, representando los remanentes de los núcleos de las células. Los *leucocitos* tienen núcleos púrpuras (no azul) y citoplasma lila-azul. Los gránulos en el interior del citoplasma son rojos en eosinófilos, azul en basófilos y púrpuras en neutrófilos. Objetos anormales como las células leucémicas y parásitos como la malaria también tienen propiedades tintoriales características.

Método estandarizado.- Este método es aprobado por el Comité Internacional para la Estandarización en Hematología:

Soluciones Stock

1. Mezcla de colorantes

Combine las siguientes 2 diluciones:

Tiocianato de azure B: 1.0 g

Disolver en

Dimetilsulfóxido (DMSO): 133 ml

Sal de eosina Y disódica: 0.33 g

Disolver en

Metanol: 200 ml

Esta solución stock se almacena en botellas ámbar a temperatura ambiente. SE guarda alrededor de 6 meses y no debe ser usada si contiene precipitados. El tiempo de vida puede ser prolongado si se adiciona una cuantas gotas de HCl 1.0 M hasta que el pH se ajuste a 4.

2. Buffer

Idealmente, usar un buffer de HEPES 0.03M, pH 6.5, pero un buffer de fosfatos 0.033 M a pH 6.8 es satisfactorio.

3. Solución de tinción

Solución 1 (Colorantes): 2 ml (Mezclar cuando sea necesario)

Solución 2 (Buffer): 30 ml (Usar una vez y descartar)

Procedimiento:

- Hacer las extensiones de sangre o médula ósea y fijar por inmersión en el metanol o en la solución stock de colorantes por 5 minutos.
- Sumerja el frotis en la solución de tinción en una jarra coplin o en un vaso similar: 25 minutos para extensiones de sangre y 35 minutos para extensiones de médula ósea.
- Lave en buffer por 1 minuto.

- Enjuague brevemente en agua.
- Escurrir y deje que seque. Se puede aplicar un cubreobjetos.

4.2.5- Teoría y tinción de Wright.

La tinción de Wright está compuesta por azul de metileno oxidado y azules de eosina, generalmente tiene la presentación de polvo y se disuelve en metanol (solución final al 0.15%). Agite bien y deje en reposo por 2 días o más. Filtre. Las tapas que cubran la botella contenedora no deben tener metales ya que causan deterioro en la tinción. Una solución buffer de pH 6.4-6.8 se requiere también (buffer de fosfatos).

Procedimiento:

1. Colocar el frotis en posición horizontal.
2. Sumerja el frotis con la solución stock de Wright, espere 1 minuto. El solvente fija las células del frotis.
3. Adicione la solución buffer en suficiente cantidad para diluir la tinción dos o tres veces, dejar por 3 minutos.
4. Lavar la tinción con solución buffer o agua de la llave si es satisfactorio. Asegúrese de que la parte brillante del material insoluble no se deposite en el portaobjetos.
5. Alce el portaobjetos y termine de escurrir y secar.
6. Limpie y cubra si requiere preservarlo.

Resultados:

Los *eritrocitos* se ven rosas; los núcleos de los *leucocitos* son de púrpura fuerte; el citoplasma de los leucocitos agranulares de ven de azul pálido a lila; los gránulos de los *basófilos* se ven de azul oscuro; los gránulos de los *neutrófilos* se ven púrpuras; los gránulos de los *eosinófilos* van de rojo a naranja y las *plaquetas* van de azul a púrpura.

(32)

En las siguientes preparaciones de aspirados de médula ósea con tinción de Giemsa y Wright, se observarán algunas características primordiales que hacen diferenciar los tipos de Leucemia enmarcadas en cada ejemplo.

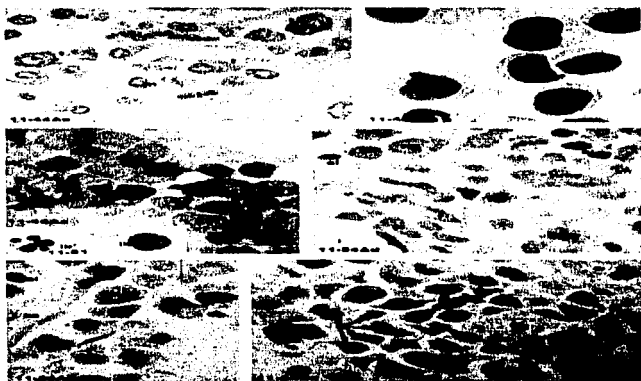


Figura 4.1.-En este caso tenemos un paciente que padece Leucemia Linfoblástica Aguda. Es una muestra de un individuo de 5 años de edad, a quien se le sustrajo un aspirado de médula ósea y se observan las siguientes características morfológicas: lumen de la arteriola (l), fibroblasto (f), promielocito neutrófilico (np), célula plasmática (p), linfoblastos(lb), arteriola (ar). (6)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

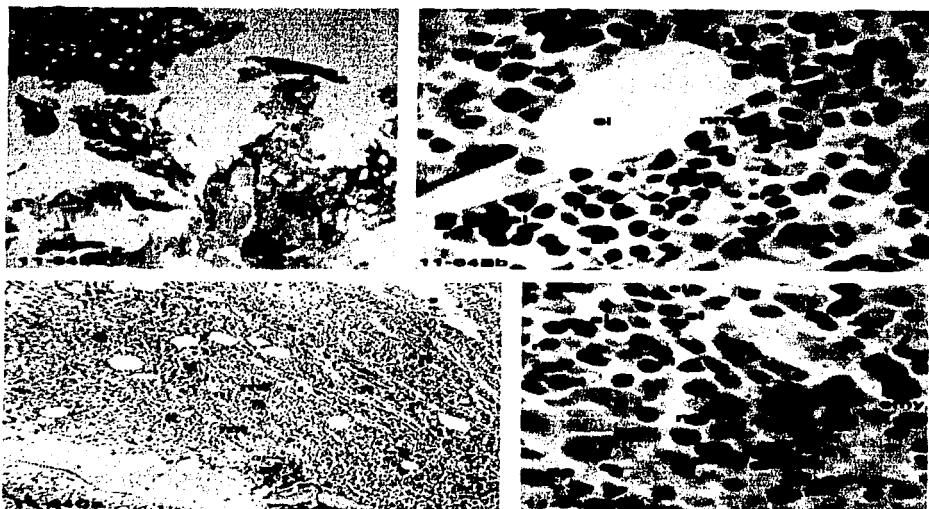


Figura 4.2.-En este otro caso tenemos un paciente que padece Leucemia Linfocítica Crónica de 49 años y en los siguientes esquemas mostrados a continuación se observa lo siguiente: 11.64Ba: Se muestra un aspirado de médula ósea muy hiper celular por un incremento del tejido linfático(lt), con tejido mieloide (mt). 11.64Bb: Tejido mieloide con pequeños linfocitos (sl), sinusoide (si), célula reticular ®, eritroblastos policromatofilicos (pe), normoblastos (n), célula endotelial (e) y mielocito neutrofilico (nmy), metamielocito (nme) y granulocito (ng) y granulocito eosinofilico (eg). (6)



Figura 4.3.-En este frotis se observa un frotis de sangre periférica teñido con tinción de Wright, mostrando las células que se presentan en una persona normal; en donde **A** muestra eritrocitos; **B** muestra a un linfocito grande; **C** muestra a dos neutrófilos segmentados; **D** señala a un eosinófilo; **E** muestra a un monocito; **F** señala a los trombocitos o plaquetas; **G** muestra a un linfocito; **H** señala a un neutrófilo en banda e **I** muestra a un basófilo. (6)

4.2.6- Clasificación morfológica de la FAB (Grupo Franco-Americano-Británica) de las Leucemias Agudas.

Un grupo cooperativo franco-americano-británico (FAB) ha publicado unas propuestas de clasificación de las Leucemias Agudas (Bennett, 1976) y ha revisado los criterios para la clasificación de la Leucemia Mieloblástica Aguda y la Leucemia Linfoblástica Aguda. La clasificación se basa en la morfología de las células, en las extensiones de sangre y médula ósea teñidas mediante tinción de Romanowsky y, así mismo, en ciertas reacciones citoquímicas suplementarias o niveles séricos de lisozimas. Esta clasificación exige la necesidad de extensiones de sangre y médula basadas en técnicas excelentes y la necesidad de cautela antes de diagnosticar la leucemia a partir de muestras medulares hipocelulares. (17)

El grupo FAB (Bennett, 1982) caracteriza dos tipos de células blásticas: ambas poseen un núcleo central con cromatina fina no condensada y nucleólos prominentes (habitualmente entre tres a cinco). Los blastos de tipo I carecen de gránulos citoplasmáticos, pero los blastos de tipo II poseen un pequeño número de gránulos primarios (azurófilos). A continuación se revisarán los criterios seguidos para definir los subtipos de cada una de las Leucemias Agudas.

4.2.6.1- Leucemia Mieloblástica Aguda.

La mayor parte de subtipos de LMA requiere al menos el 30% de las células nucleadas sean blastos y otro hallazgo de utilidad en el diagnóstico de LMA es la presencia de **bastones de Auer**, que confirma el diagnóstico de LMA o de anemia refractaria con exceso de blastos en transformación. Con la tinción de Romanowsky, los bastones de Auer son inclusiones lineales o fusiformes de color rojo púrpura en los mieloblastos o promielocitos. Con menos frecuencia se observan en neutrófilos más maduros. Los bastones de Auer son derivados de gránulos azurófilos y se tifen positivamente con Sudán Negro B, Mieloperoxidasa, Cloroacetatoesterasa y Fosfatasa ácida (pruebas citoquímicas las cuales se describirán en el siguiente capítulo). De este modo, en la actualidad, la FAB ha descrito 8 subtipos de LMA:

- Leucemia Mieloblástica Aguda indiferenciada o M0.- La primera clasificación de la FAB en 1976 no la contemplaba debido a que los blastos son completamente indiferenciados por morfología y por las pruebas citoquímicas, por esta razón no fue tomada en cuenta este subtipo; pero con el advenimiento del uso de los anticuerpos monoclonales y la citometría de flujo, se determinó su inmunofenotipificación, probando que poseían los blastos de este subtipo de LMA antígenos del linaje mielóide y carecían antígenos de linaje linfóide; además, con el empleo de la inmunocitoquímica, se determinó que poseen actividad de Mieloperoxidasa citoplasmática, la cual para el diagnóstico de esta subtipo de LMA, menos de 3% de los blastos son positivos a la actividad de dicha enzima. (17, 26, 27)
- Leucemia Mieloblástica Aguda o M1.- En este subtipo de LMA los mieloblastos (tipo I y II) deben representar al menos el 90% de las Células No Eritroides (CNE) de la médula ósea y se observan menos del 10% de granulocitos y monocitos en maduración. Dado que el subtipo M1 puede confundirse con la Leucemia Linfoblástica Aguda, especialmente con el subtipo L2, las reacciones de tinción citoquímica son de utilidad para el diagnóstico correcto (de las cuales se hablarán en el siguiente capítulo). Al menos el 3% de blastos deben teñirse para la Mieloperoxidasa (MPO) o bien para el Sudán Negro B (SNB). La tinción positiva para la cloroacetatoesterasa (CAE) también puede utilizarse en el diagnóstico de M1; no obstante, tiende a ser menos sensible que los dos métodos de tinción precedentes. (17, 26, 27)
- Leucemia Mieloblástica aguda con maduración o M2.- Aquí los mieloblastos representan del 30 al 89% de las células no eritroides de la médula, los granulocitos desde los promielocitos a los neutrófilos son más del 10% de las CNE y los monocitos y sus células precursoras representan menos del 20% de las CNE. En este subtipo, la mayor parte de blastos (habitualmente más del 85%) se tiñen con MPO, SNB y CAE. Además menos del 20% de los blastos se tiñen difusa o intensamente con α -Nafilacetato-esterasa (ANAE) o α -Nafilbutirato-esterasa (ANBE). Los niveles séricos de lisosima se encuentran dentro de los límites normales. (17, 26, 27)
- Leucemia promielocítica aguda o M3.- En el caso de la LPA hipergranular M3, en la médula ósea existe un predominio de promielocitos, en lugar de mieloblastos. Los gránulos azurófilos son abundantes y se tiñen intensamente. En casi todos los casos se

encuentran bastones de Auer, y a menudo éstos son múltiples (10 o más) en una célula determinada. Una variante de la M3 es la Leucemia promielocítica hipogranular o microgranular (M3V), en la cual los gránulos citoplasmáticos parecen escasos o nulos a la microscopía óptica y numerosos, pero más pequeños, con microscopía electrónica. Las tinciones citoquímicas son un poco menos positivas que en la variante hipergranular M3. En la variante microgranular M3V, las células con bastones de Auer y los promielocitos hipergranulares sólo se encuentran en número reducido. Los núcleos de la mayor parte de células leucémicas son bilobulados o reniformes, y es frecuente la confusión con una Leucemia monocítica atípica. En la LPA, más del 85% de las células leucémicas se tiñen con MPO, SNB y CAE. En un 25% de los casos, más del 20% de las células leucémicas se tiñen intensa y difusamente con la ANAE. Los precursores eritroides y de megacariocitos no muestran anomalías significativas. (17, 26, 27)

- Leucemia mielomonocítica aguda o M4.- En la médula ósea de los pacientes con la LMMA M4, los mieloblastos constituyen más del 30% de las células totales de la médula. La suma de los monoblastos, promonocitos y monocitos es mayor del 20%, pero menor del 80% de las CNE. Si estos hallazgos de la médula ósea se acompañan de monocitosis en sangre periférica ($5 \times 10^9/L$ o más), se confirma el diagnóstico de M4. Sin embargo, si el recuento de monocitos es $< 5 \times 10^9/L$, se requieren determinaciones adicionales de laboratorio, por ejemplo, lisozima sérica tres veces mayor de lo normal o un 20% o más de blastos que se tiñen con ANAE o ANBE. En un pequeño porcentaje de casos de LMA M4 existe una eosinofilia ligera a moderada (1 a 33%). Esta variante es denominada Leucemia mielomonocítica aguda con eosinofilia (M4Eo). En casos raros, la eosinofilia puede ser muy pronunciada, pero la mayoría de veces representa el 5% de CNE. Muchos de estos eosinófilos presentan gránulos basófilos anormalmente grandes mezclados con normales. Cuando se tiñen con ácido peryódico de Schiff (PAS), los propios gránulos eosinófilos son positivos, mientras que los eosinófilos normales demuestran una tinción intergranular. Otra característica distintiva es la tinción positiva de estos eosinófilos anormales con CAE, una característica que no se encuentra presente en los eosinófilos normales. Para identificar todos los eosinófilos, a menudo resulta de utilidad una contratinción con clorazol rosado. En la LMMA M4, la tinción de las células leucémicas con MPO, SNB, CAE y PAS es variable. Sin embargo, en

muchos casos, las células leucémicas manifiestan una tinción difusa e intensa con ANAE o ANBE. En casos infrecuentes, estas esterasas específicas no pueden demostrarse y el diagnóstico debe llevarse a cabo únicamente con la tinción de Romanowsky. (17, 26, 27, 46)

- Leucemia monocítica aguda o M5.- El diagnóstico depende de si el 80% o más de CNE de la médula son monoblastos, promonocitos o monocitos. Se reconocen dos subtipos: el subtipo poco diferenciado (predominantemente monoblástico, M5A) se caracteriza por grandes blastos que representan el 80% o más de células monocíticas de la médula, mientras que el tipo diferenciado (M5B) posee pocos monoblastos (< 80% de las células monocíticas de la médula) y más promonocitos y monocitos, los cuales son displásicos. Los granulocitos representan < 20% de las células. La ANAE y ANBE tiñen las células leucémicas de manera difusa e intensa (80% o más de células leucémicas). En ocasiones, las células leucémicas no se tiñen con la esterasa inespecífica, y el diagnóstico debe llevarse a cabo mediante la tinción de Romanowsky o técnicas inmunofenotípicas. Esto ocurre especialmente en las Leucemias monoblásticas (M5A). (17, 26, 27)
- Eritroleucemia aguda o M6.- El diagnóstico se establece cuando más del 80% de células nucleadas de la médula ósea son eritroblastos y el 30% o más de las no eritroides, mieloblastos. Las anomalías morfológicas de los eritroblastos a menudo son pronunciadas, con características megaloblásticas atípicas, formas nucleares extrañas y formas gigantes multinucleares. El citoplasma puede contener pseudópodos y/o vacuolas, en especial en los proeritroblastos y eritroblastos basófilos. En muy raras ocasiones prácticamente no existe afectación granulocítica en el proceso neoplásico y predominan eritroblastos primitivos (entidad llamada *mielosis eritémica*). En la mayoría de casos existe una mezcla de precursores eritroides y mieloblastos en proporción variable. En la actualidad, el término eritroleucemia (M6) incluye ambos subtipos. En algunos casos de M6, las células eritroides pueden mostrar una intensa positividad de PAS del citoplasma. Ésta es granular en los estados precoces de precursores eritroides y difusa en los estados tardíos. Los precursores eritroides son PAS-negativos en los individuos normales y en la mayoría de las enfermedades, incluyendo la anemia megaloblástica nutricional. No obstante, son positivos en la anemia ferrópica, en la

talasemia y en la anemia refractaria con sideroblastos en anillo. En la eritroleucemia, los mieloblastos suelen teñirse con el SNB, la MPO y la CAE. A menudo es evidente un componente monocítico positivo a esterasa inespecífica. A veces, los precursores eritroides neoplásicos son también positivos para la ANAE y la ANBE. (9, 17, 26, 27, 46)

- Leucemia megacariocítica aguda o M7.- Al principio de la clasificación de la FAB, al igual que M0, este subtipo de Leucemia no se le consideró porque no se contaba con las herramientas de diagnóstico para su identificación y diferenciación; hasta que se pudo demostrar que su diagnóstico depende de que el infiltrado de células blásticas represente el 30% o más de las células nucleadas de la médula ósea, y como un mínimo el 30% de estos blastos deben ser megacarioblastos. Las células blásticas demuestran su linaje megacariocítico con la técnica de peroxidasa plaquetaria o mediante métodos inmunofenotípicos utilizando anticuerpos monoclonales frente a las glucoproteínas plaquetarias Ib o IIb/IIIa. Los blastos de la M7 a menudo se cuentan como indiferenciados de acuerdo con la clasificación FAB. Los megacarioblastos son muy polimorfos; algunos blastos estimulan los linfoblastos, tanto las formas L1 como L2 de la LLA, y otros blastos son de mayor tamaño y tienen pseudópodos o proyecciones citoplasmáticas filamentosas. El citoplasma suele ser azul claro y puede poseer o no gránulos. Los núcleos a menudo contienen de uno a tres nucleólos. En sangre periférica suele haber pancitopenia con leucopenia y anemia marcadas. En ocasiones están presentes en la sangre fragmentos megacariocíticos. La médula presenta mielofibrosis pronunciada, lo que comporta a menudo intentos inútiles de obtener extensiones de aspirados medulares. Los megacarioblastos no se tiñen con SNB, MPO, CAE ni ANBE, pero la ANAE puede ser positiva. La reacción de PAS muestra tinción granular difusa y periférica (a menudo en bloques de gran tamaño). (17, 26, 27)

4.2.6.2- Leucemia Linfoblástica Aguda.

El grupo FAB ha definido tres subtipos de Leucemia Linfoblástica Aguda: L1, L2 y L3. En la primera clasificación, en 1976, la subdivisión se basaba en la morfología de los linfoblastos en la médula ósea; las características citológicas usadas para valorar la morfología de los blastos son: tamaño celular, cromatina nuclear, forma nuclear, nucleólos, cantidad de citoplasma, carga basófila de citoplasma y vacuolización citoplasmática. En la tabla 2.3 se muestra los criterios mencionados anteriormente de la FAB para clasificar a las LLA. (27, 37)

Tabla 4.3 Criterios del grupo FAB para los subtipos de LLA (37)

CARACTERÍSTICAS CITOLÓGICAS	11	12	13
Tamaño Celular	Predominan las células pequeñas	Grande, tamaño heterogéneo	Grande y homogéneo
Cromatina nuclear	Homogéneo en todos los casos	Variable-heterogéneo en todos los casos	Puntilleo fino y homogéneo
Forma nuclear	Regular, en ocasiones hendidas o indentada	Irregular, hendidas e indentado es común	Regular, oval a redondo
Nucleólos	No visibles o pequeño y no discernible	Existe uno o más, a menudo grandes	Destacado(s); uno o más vesiculares (1-3)
Cantidad de citoplasma	Escasa	Variable, a menudo abundante moderada	Abundante moderada
Basofilia de citoplasma	Ligera a moderada, en raras ocasiones intensa	Variable; intensa en algunas células	Muy intensa
Vacuolación citoplasmática	Variable	Variable	A menudo importante

En forma general, en el tipo L1 el linfoblasto se caracteriza por un cociente núcleo/citoplasma elevado. Los núcleos son regulares y no se encuentran indentados ni torsionados. El patrón de cromatina es fino y uniforme. Por lo general sólo se observan uno o dos nucleólos. El citoplasma es escaso, de color azul pálido y homogéneo, generalmente sin gránulos. El tipo L1 presenta características homogéneas y es la forma más frecuente de leucemia en niños. En el L2 predomina una célula más grande y suele haber una mayor variación de las características citológicas inter e intraindividuales. Es menos frecuente en niños y suele ser el tipo habitual de LLA del adulto. El tipo L3 es la LLA de **Burkitt** (porque los linfoblastos se parecen a aquellas vistas en el linfoma de Burkitt). Las células son grandes y uniformes, con un núcleo redondo u ovalado, nucleólos prominentes y un citoplasma muy basófilo que contiene vacuolas.

La precisión de diagnóstico de las variantes L1 y L2 ha mejorado al emplear un sistema de puntuación (establecida por Bennett en 1981). En este sistema, el cociente nuclear/citoplasmático, el número y prominencia de los nucleólos, la forma del núcleo y el tamaño celular son las características que distinguen las variables L1 y L2. La puntuación total puede ser de -4 a +2. Una escala de 0 a +2 clasifica a LLA como L1, en tanto que una puntuación de -1 a -4 clasifica a LLA como L2. A cada característica se le puede asignar una puntuación positiva, negativa o sin valor. Las categorías y normas para la puntuación son:

1. Proporción núcleo /citoplasma:

Puntuación positiva: Si 75% o más células tienen una proporción N/C alta.

Puntuación negativa: Si 25% o más células tienen proporción N/C baja.

Sin puntuación: Si las células no entran en ninguno de los dos grupos anteriores

2. Nucleólos:

Puntuación positiva: Si 75% o más células tienen nucleólos pequeños poco definidos

Puntuación negativa: Si 25% o más células tienen nucleólos destacados, claramente definidos.

Sin puntuación: Si las células no cumplen con las características anteriores

3. Membrana nuclear (sólo es posible puntuación negativa o sin puntuación):

Puntuación negativa: Si 25% o más células tienen membrana nuclear irregular

Sin puntuación: Si la membrana es regular o se muestra irregular en menos del 25% de las células.

4. Tamaño celular (sólo es posible puntuación negativa o sin ella):

Puntuación negativa: Si 50% o más células son grandes (por lo menos, dos veces al tamaño de un linfocito pequeño).

Sin puntuación: Si las células no cubren el criterio anterior.

En la siguiente tabla se muestra en forma resumida el sistema de puntuación FAB:

Tabla 4.4 Sistema de puntuación FAB para las variantes L1 y L2

critérios	puntuación
Cociente *N/C elevado \geq 75% de células	+
Cociente *N/C bajo \geq 25% de células	-
Nucleólos: 0-1 (pequeños) \geq 75% de células	+
Nucleólos: 1 o más (prominentes) \geq 25% de células	-
Membrana nuclear irregular \geq 25% de células	-
Células grandes > 50% de células	-

* Cociente nuclear citoplasmático

Con respecto a las pruebas citoquímicas, los blastos son negativos para el SNB, la peroxidasa y el naftol-ASD-cloroacetatocsterasa. El diagnóstico de LLA no se puede realizar con certeza hasta no haber aplicado SNB o peroxidasa, comprobando que los blastos son negativos. Algunos casos de L2 presentan gránulos azurófilos, pero son SNB y peroxidasa-negativos. La reacción de fosfatasa ácida es moderada a intensamente positiva en los blastos de un 20% de los casos de LLA. La tinción de PAS suele mostrar bloques toscos de material en al menos algunos linfoblastos. (37)

4.2.7- Morfología de la Leucemia Mielocítica Crónica.

La médula aparece muy hiper celular debido principalmente a la proliferación granulocítica, que está representada en todas las fases. Los blastos vistos en las fases acelerada y blástica no entran en el criterio de FAB. Alrededor del 70% de los casos en transformación blástica tienen un fenotipo mieloblástico, 20% tienen un fenotipo linfoblasto y el 10% un fenotipo mezclado. Los precursores de los eosinófilos y basófilos pueden aumentar, mientras que los normoblastos tienden a disminuir. A menudo resulta difícil aspirar la médula a causa de la densidad del concentrado celular o (especialmente en etapas más adelantadas de la enfermedad) como consecuencia del mayor nivel de reticulina, que puede demostrarse en la biopsia medular. En una minoría de pacientes se detectan macrófagos cargados de pigmento azul (histiocitos de color azul marino) o macrófagos indistinguibles de las células de Gaucher. En sangre periférica, la basofilia constituye una observación habitual, se aprecia un amplio espectro de células granulocíticas, desde algunos mieloblastos hasta los neutrófilos maduros. Los mieloblastos representan menos del 10% de las células; existen

dos picos: los mielocitos y los neutrófilos superan ambos los otros tipos celulares. El porcentaje de mielocitos neutrófilos aumenta al elevarse el recuento leucocitario total. Por otra parte, casi siempre se presenta eosinofilia, conjuntamente con mielocitos eosinófilos. Los monocitos también aumentan de forma absoluta en la mayoría de los pacientes, los cuales presentan anemia en el momento del diagnóstico, mientras que en otros aparece durante la enfermedad como resultado de la menor producción de glóbulos rojos. Los eritrocitos son normocrómicos y normocíticos, y pueden detectarse algunos normoblastos. (2, 3, 26, 27, 28, 37)

4.2.8- Morfología de la Leucemia Linfocítica Crónica.

En médula, el síntoma precoz más común es una ligera o moderada linfocitosis. Teniendo en cuenta que los linfocitos son morfológicamente normales, el examen de material medular puede ser equivoco. Entonces resulta a veces útil el examen de cortes histológicos de las partículas aspiradas o del material de biopsia. Existen zonas de linfocitos de pequeños o mediano tamaño con márgenes poco definidos; los linfocitos infiltran los tejidos hematopoyéticos adyacentes. El grado de infiltración linfocitaria se correlaciona con la supervivencia del paciente. El compromiso nodular o en placas de la médula ósea por linfocitos neoplásicos se asocia con un resultado relativamente bueno. No obstante, la infiltración difusa de la médula ósea suele correlacionarse con un mal pronóstico. En sangre, del total de leucocitos contados, 80 a 90% son linfocitos pequeños, de aspecto siempre igual, y generalmente parecen normales. La cromatina nuclear puede estar toscamente condensada y más separada por paracromatina que los linfocitos normales o, en algunos casos, la cromatina está menos condensada de lo normal. Algunos nucleólos son evidentes en muchos de los linfocitos. La variedad de tamaño es mínima. El citoplasma está en cantidad de moderada a pequeña. En una minoría de pacientes hay un pequeña proporción de linfocitos inmaduros. De ordinario, éstos son prolinfocitos o linfocitos reticulares (linfocitos transformados). (2, 3, 45, 46)

4.1.7- Morfología de la Leucemia de Células Pilosas.

Morfológicamente, las células tienen un tamaño medio (10 a 20 μm de diámetro), con núcleos entre redondos y ovalados, aunque muchos presentan una forma acampanada o mellada. El perfil de la cromatina en general presenta un aspecto uniforme reticular, mientras que los nucleólos son pequeños e insignificantes. En algunas células, la cromatina aparece más condensada, de forma semejante a la de un linfocito. La cantidad de citoplasma es moderada, y éste presenta numerosas proyecciones parecidas a pelos y bordes deshilachados, adoptando un color gris con el colorante de Wright.

Citoquímicamente, estas células contienen fosfatasa ácida resistente a la inhibición por el tartrato, lo cual contrasta con las isoenzimas de la fosfatasa ácida presentes en otras células hemáticas. (3, 19, 45)



Figura 4.4.- En la imagen etiquetada como LMA (Leucemia Micloblástica Aguda) M1 en el lado izquierdo se observa micloblastos con núcleo excéntrico típico, los bastones de Auer son visible y a la derecha se observan los bastones de Auer teñidos con SNB. En la imagen marcada como LMA-M2 en el lado izquierdo se observan micloblastos típicos con núcleos excéntricos y granulocitos displásicos madurando en todas las etapas de desarrollo; mientras en la parte izquierda se observa positividad con SNB, siendo más fuerte en metamielocitos displásicos. En el recuadro se observa con CAE granulocitos en maduración. (27)

AML-M3



Figura 4.5.- Esta imagen marcada como LMA (Leucemia Mieloblástica Aguda) M3, muestra en su parte izquierda promielocitos hipergranulares y un contenido variable de gránulos y múltiples bastones de Auer visibles en la extrema izquierda; en la parte central se muestra una fuerte positividad con la tinción de SNB y en la parte derecha se observa una positividad con CAE (en azul) y en el recuadro se observa una positividad atípica con ANAE vista en 1% de los casos de M3. (27)

AML-M3v

AML-M4

AML-M5



Figura 4.6.- En la parte lateral izquierda se muestran típicos núcleos bilobulados y citoplasma basofílicos empaquetados con gránulos tan pequeños para observarse por microscopía de luz, pero el cual da reacción típica citoquímica M3. En la parte central se observa una población mezclada de mieloblastos y monoblastos. En el recuadro se observan gránulos cloroacetato esterasa positivo (azul), monocitos ANAE-positivo (verde/café). En la región lateral derecha, en su parte izquierda se muestran grandes monoblastos con núcleos centrales y abundante citoplasma, y en la parte derecha se observan monoblastos ANAE positivos (café), y un mielocito azul cloroacetato esterasa positivo. (27)

AML-M6



Figura 4.7.- En la imagen titulada LMA M6, en la parte izquierda se muestra una diseritropoyesis marcada ($> 50\%$ de las células) con granulocitos displásicos y en la derecha se observan normoblastos gigantes tardíos multinucleados y en la extrema derecha se observa una tinción con PAS con proeritroblastos granulares y normoblastos homogéneos. (27)

AML-M7

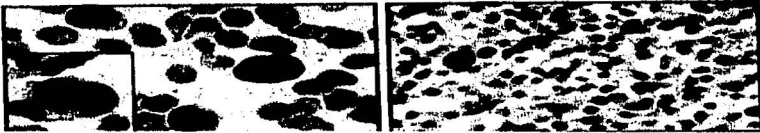


Figura 4.8.- En la imagen se muestran frotis de un caso con LMA M7, en la parte izquierda se muestra megacarioblastos/micromegacariocitos en un aspirado de la médula ósea y en la parte izquierda se muestra una biopsia de trefina mostrando fibrosis, blastocitos y pequeños megacariocitos atípicos. (27)

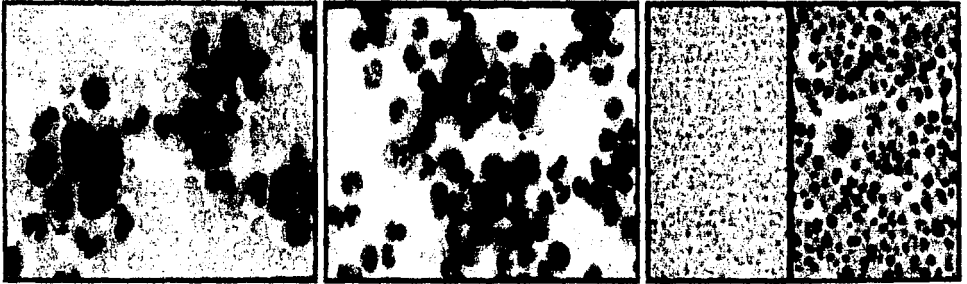


Figura 4.9.-Esta imagen muestra en su lado izquierdo un frotis de sangre periférica de un paciente con Leucemia Mielocítica Crónica (LMC) en fase crónica; en la parte central se muestra un aspirado de médula ósea en la misma fase de la LMC y en la parte derecha se muestra una tinción con Hematoxilina & Eosina de la médula ósea de la misma entidad (LMC en fase crónica) y la reticulina normal. (27)



Figura 4.10.- Se muestran frotis de un paciente con Leucemia Linfocítica Crónica (LLC), cuyas células muestran un borde delgado de citoplasma y una biopsia de trefina de médula ósea mostrando una extensiva infiltración de células LLC. (27)

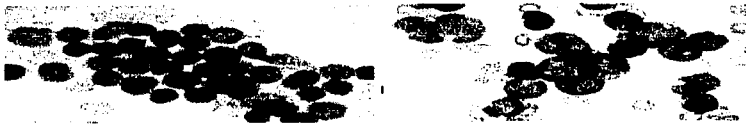


Figura 4.11.- Muestra imágenes de médula ósea de paciente con Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA); en la izquierda se observa una completa sustitución por blastos de tamaño pequeño a mediano con escaso citoplasma y núcleos con cromatina densa, pertenece a la clasificación L1 de FAB y en la derecha tenemos una muestra de médula ósea de LLA con blastos pleiomórficos con cantidades variables de citoplasma, núcleos torcidos en forma irregular y nucleólos múltiples indistintos; pertenece a la clasificación L2 de FAB. (27)



Figura 4.12.- Se muestra un frotis de sangre periférica de LLA con grandes blastos de núcleos enrollados y citoplasma basófilo. (27)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.3- La Citogenética en el Diagnóstico de las diferentes clases de Leucemias.

La Citogenética la podemos definir como una rama de la Genética que se dedica al estudio de la relación existente entre el aspecto microscópico de los cromosomas y el modo de conducirse durante la división celular, con el genotipo y el fenotipo que presenta el individuo. Es un área de la ciencia relativamente nueva, surge aproximadamente en el año de 1956 como una ciencia híbrida que intenta correlacionar los eventos celulares que involucran a los cromosomas con los eventos génicos. Su relación con el diagnóstico de las Leucemias empezó en 1960, cuando se descubrió el cromosoma Filadelfia (Ph) en las células con Leucemia Micelocítica Crónica, por lo que la LMC fue la primera neoplasia humana al ser caracterizada por un marcador citogenético consistente. En 1973 se demostró que el cromosoma Filadelfia es el resultado de una translocación recíproca balanceada que involucra a los cromosomas 9 y 22. (12)

Estos eventos históricos se dieron gracias a que se desarrollaron una serie de técnicas que permitieron la observación de los cromosomas a nivel microscópico y, las alteraciones observadas, relacionarlas con el cuadro clínico que presentaba el paciente. Para la identificación del cromosoma Ph, fue necesario el desarrollo de lo que denominamos **cariotipo** de células y el cariotipo se define como al conjunto de cromosomas de una célula de una especie determinada, que se puede identificar por el número y morfología de cada uno de los cromosomas. También se define como el arreglo sistemático de los cromosomas en grupos de pares homólogos de acuerdo a su tamaño y localización del centrómero. El término cariotipo puede referirse a una célula individual o única. Para que dos cariotipos sean iguales no solo basta que tengan el mismo número cromosómico, sino que cada uno de un conjunto sea idéntico al del otro. (43)

Para poder realizar un cariotipo, primero se debe realizar una serie de preparaciones cromosómicas que nos permitan obtener y observar a los cromosomas en estudio. Dicho estudio puede llevarse a cabo en forma directa en células de multiplicación activa como las de la médula ósea, o en condiciones patológicas en las células neoplásicas. También pueden observarse los cromosomas en meiosis obtenidos directamente de una biopsia gonadal o de una muestra de líquido seminal. Sin embargo, los procedimientos más frecuentemente empleados recurren a las técnicas de *cultivo celular in vitro*.

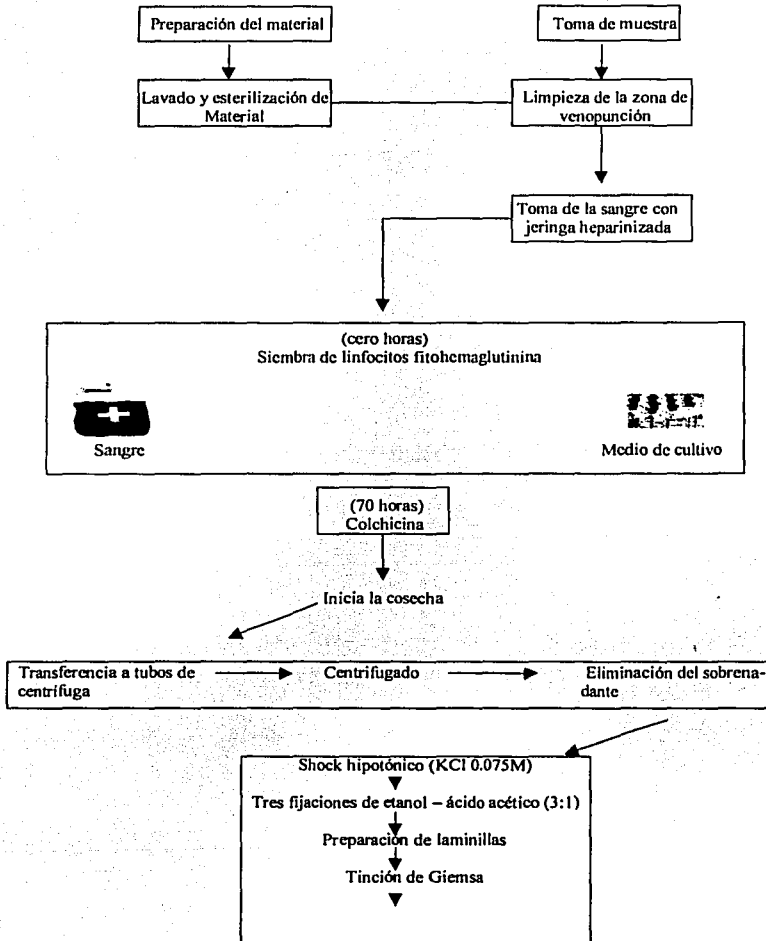
Las células vivas más fácilmente accesibles son las obtenidas mediante una punción venosa de sangre periférica. Pero también puede cultivarse *in vitro* fibroblastos tomados de biopsia de piel, de gónadas, de aponeurosis o de cualquier otro sitio. Para el caso del estudio de las Leucemias, las células a elegir son los linfocitos de sangre periférica, porque presenta ventajas como: la facilidad para la toma de muestra, se puede repetir tantas veces como sea necesario, el tiempo de cultivo es relativamente corto y se obtiene una población bastante adecuada de linfocitos en metafase (fase de la mitosis en la cual se observan mejor los cromosomas). Para tener éxito en la obtención de cromosomas es imprescindible tomar en cuenta el lavado y esterilización del material, los medios de cultivos utilizados, el control de la temperatura, el pH y las condiciones de esterilidad en que se deben obtener las muestras. (12)

4.3.1- Preparaciones cromosómicas.

En resumen, el procedimiento a seguir en linfocitos, consiste en mezclar sangre venosa heparinizada con un medio de cultivo adecuado cuya función es la de servir como fuentes de nutrientes para el crecimiento de las células. En condiciones normales, los linfocitos no se multiplican en sangre periférica. Sin embargo, *in vitro* se logra su transformación blástica y, por consiguiente, su división celular, adicionando al medio de cultivo un agente mitógeno, siendo el más empleado la *fitohemaglutinina*, obtenida de un extracto de *Phaseolus vulgaris* (frijol). Este agente induce la transformación de linfocitos a linfoblastos, estimula la síntesis de ARN una hora después de su adición al medio de cultivo y de ADN 24 horas después; actuando sobre la membrana celular produce leucoaglutinación. Tanto la aglutinación como la actividad mitogénica son destruidas al mantener las células a 56°C por 30 minutos. Las células estimuladas con la fitohemaglutinina se mantienen en un medio de cultivo enriquecido con proteínas, aminoácidos y vitaminas, a 37°C durante 72 horas. Para obtener una mayor cantidad de células detenidas en metafase se agrega colchicina, el cual es un alcaloide que impide la formación del huso acromático. También se emplean soluciones hipotónicas que permiten la dispersión adecuada de los cromosomas cuando caen sobre las laminillas, mejorando la calidad de la preparación. Por último, se fijan los cromosomas con una solución de alcohol y ácido acético cuya función es conservar la estructura del cromosoma de la manera más

fidedigna posible. Para teñir a los cromosomas se pueden utilizar diferentes colorantes, pero el más utilizado para un cariotipo ordinario (sin bandas) es el de Giemsa.

En el siguiente diagrama de flujo se muestra los pasos a seguir para la obtención de preparaciones cromosómicas.





Observación al microscopio
10x 45x 100x

Diagrama de flujo para la realización de preparaciones cromosómicas

La posición del centrómero y la longitud total del cromosoma son los parámetros más importantes que se toman en cuenta para el arreglo de los cromosomas en pares homólogos y grupos del cariotipo, por lo tanto, existen 3 medidas importantes que son *la longitud cromosómica relativa, el índice de brazo y el índice centromérico*. Algunas otras características como la presencia de satélites (constricción secundaria en los cromosomas acrocéntricos donde se localizan los genes que codifican para el ARNr, culminando en dichos apéndices o satélites) o de constricciones secundarias auxilian en la clasificación de los pares cromosómicos. Sin embargo la clasificación correcta deberá realizarse con alguna de las técnicas de bandeo (las cuales se explicarán posteriormente). (12, 44)

4.3.2- Técnicas de bandeo.

El análisis cromosómico es uno de los aspectos integrales de la Citogenética y estudia la relación que existe entre el aspecto microscópico de los cromosomas y el fenotipo de cada persona, el cual es la expresión de los genes en los rasgos físicos, bioquímicos o fisiológicos del individuo. Fue hasta la década de los 70's que fue posible identificar con precisión cada uno de los pares cromosómicos que constituyen el cariotipo humano, gracias al desarrollo de los procedimientos que se conocen como técnicas de bandeo. Los cromosomas no aparecen uniformemente teñidos como en la técnica de rutina con Giemsa, sino que se observan una serie de elementos denominados *bandas* y una banda se define como la porción de un cromosoma que se distingue claramente de los segmentos adyacentes, porque se observa clara u oscura, o fluorescente y no fluorescente, con los distintos métodos de bandas. Los cromosomas aparecen entonces formados por una serie continua de bandas claras y oscuras. (44)

El primer patrón de bandeo cromosómico fue el desarrollado por Tomjohn Cassperson y colaboradores, los cuales utilizaron mostaza de quinicrina, que es un fluorocromo con especial afinidad a las uniones A=T. A este sistema de bandeo origina las bandas

denominadas **Q**; sin embargo, debido al alto costo de las técnicas fluorescentes se desarrolló otra técnica de bandeado que tiene un patrón similar al bandeado **Q** sin los inconvenientes de la fluorescencia. Tal procedimiento produce un patrón de bandas llamadas **G**. El patrón de bandas **G** se logra con un tratamiento previo de las preparaciones cromosómicas con enzimas proteolíticas como la tripsina o la quimiotripsina, o bien por desnaturalización en soluciones amortiguadoras, o por calor; seguidas todas por la coloración con Giemsa. El resultado es la aparición de bandas claras y oscuras a lo largo del cromosoma que reciben el nombre de bandas **G** por el colorante empleado.

La importancia de los diferentes procedimientos de bandeado cromosómico es que permiten identificar cada uno de los cromosomas, así como la pérdida o ganancia de segmentos del material genético de 4000 KB o más grandes. Existen otras técnicas que permiten poner de manifiesto otras regiones cromosómicas, como por ejemplo las bandas **NOR's** ponen de manifiesto las regiones organizadoras del nucleolo que contienen genes de ARN ribosomal localizados en los satélites de los cromosomas acrocéntricos. Las bandas **R** tiñen las bandas de cromosomas de manera opuesta a las observadas con las bandas **G** (sigue un patrón negativo), de tal manera que ponen de manifiesto las regiones eucromáticas y es muy útil cuando se sospecha que los telómeros participan en alguna anomalía. La técnica de bandas **C** produce una tinción selectiva de la heterocromatina constitutiva la cual corresponde al ADN satélite o altamente repetitivo. En los cromosomas humanos la heterocromatina se localiza preferentemente en las regiones centroméricas, de aquí el nombre de bandas **C**; también se localiza en las constricciones secundarias, en los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos y en la porción distal del brazo corto del cromosoma **Y**. (44)

Otra técnica usada desde hace algunos años, es la que pone de manifiesto el intercambio entre los segmentos de cromátidas hermanas (**ICH**). Se utiliza 5-Bromo-desoxiuridina, la cual se incorpora en el ADN de las células sustituyendo a la timina y permite contar el número de intercambios entre dos cromátidas hermanas. Actualmente existe otra técnica citogenética que permite investigar directamente la ubicación de los genes en un cromosoma y diagnosticar anomalías citogenéticas que antes pasaban inadvertidas. Esta técnica es la hibridización *in situ* con fluorescencia (**FISH**); en ella se emplean sondas apropiadas marcadas con una sustancia radiactiva o fluorescente que tienen una secuencia

de bases complementaria a la de un gen en particular y se aplican en condiciones que permiten la hibridación con la región genómica específica, sobre una preparación cromosómica. De esta última técnica se hablará más ampliamente en el siguiente capítulo. (32, 43)

A continuación se describen las técnicas de bandeó que se mencionaron anteriormente:

4.3.2.1- Bandas Q – Método de Caspersson y colaboradores.

1. Colocar las preparaciones cromosómicas por 20 minutos en una solución de mostaza de quinacrina preparada en solución amortiguadora fosfato-ácido cítrico a pH 7.0, a una concentración de 50 µg/ml.
2. Lavar con la solución amortiguadora.
3. Montar en la solución amortiguadora a pH 7.0.
4. Observar con epifluorescencia

4.3.2.2- Bandas G – Método Seabright.

1. Utilizar laminillas de por lo menos 24 horas de preparadas.
2. Tratar las preparaciones con la solución de tripsina al 0.025% a 37°C en baño María, por 1 o 2 minutos, controlando según su actividad de la tripsina.
3. Lavar en solución salina isotónica.
4. Teñir con Giemsa en amortiguador de fosfatos a pH 6.8 durante 2 a 5 minutos controlando bajo el microscopio.
5. Lavar con agua desionizada y secar al aire.

4.3.2.3- Bandas C – Método de Salamanca y Armendares.

Con este procedimiento se tiñen intensamente los centrómeros, las constricciones secundarias de los cromosomas 1, 9 y 16, los brazos cortos, los satélites de los cromosomas acrocéntricos y la porción distal del brazo largo del cromosoma Y, por lo que pone de manifiesto la localización de la heterocromatina constitutiva.

1. Tratar las laminillas con HCl 0.2 N, a temperatura ambiente, durante 30 minutos.
2. Lavar con agua desionizada (contenido máximo de sales 2 ppm).

3. Tratar las laminillas con una solución de hidróxido de bario $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 0.07 N, calentada a 37-40°C durante 5 a 10 minutos. El calor aumenta la solubilidad del $\text{Ba}(\text{OH})_2$. Mayor calentamiento daña los cromosomas.
4. Lavar con agua desionizada.
5. Incubar las laminillas en solución salina de citrato de sodio (NaCl 0.3 M y citrato de sodio 0.03 M), a 65°C, durante 2 horas.
6. Lavar con agua desionizada.
7. Teñir con Giemsa al 2% en solución amortiguadora fosfato de Sorensen a pH 6.8 (Na_2HPO_4 0.025 M y KH_2PO_4 0.025 M) de 10 a 60 minutos controlando la tinción al microscopio.
8. Lavar con agua desionizada.
9. Secar al aire.
10. Montar con resina y observar al microscopio.

4.3.2.4- Organizadores nucleolares (NOR) – Método de Goodpasture y Bloom.

1. Cubrir las preparaciones con una solución acuosa de AgNO_3 al 50%, cubrirlas con un cubreobjetos y colocarlas en la estufa de 50 a 60°C durante 15 minutos, en baño María.
2. Lavar con agua bidestilada.
3. Colocar 4 gotas de solución amoniacal de plata disolviendo 4 g de AgNO_3 en 5 ml de agua bidestilada más 5 ml de NH_4OH concentrado.
4. Añadir 4 gotas de la solución reveladora de formaldehído al 3%. Se neutraliza primero la solución a pH 7.0 con cristales de acetato de sodio y luego se ajusta a pH 4.5 con ácido fórmico antes de su empleo.
5. Colocar cubreobjetos y controlar la reacción en el microscopio con contraste de fases. La coloración se alcanza en 1 a 5 minutos.
6. Lavar con agua bidestilada y observar con contraste de fases.

4.3.2.5- Bandas R – Naranja de acridina. Método de Verma y Lubs

1. Colocar las preparaciones en una solución amortiguadora fosfato a pH 6.5 a 85°C en baño María, por 20 a 25 minutos.
2. Colorear con naranja de acridina, al 0.01% en la solución amortiguadora a pH 6.5, durante 4 a 6 minutos.
3. Lavar con la solución amortiguadora y montar en la misma solución.
4. Observar con epifluorescencia.

4.3.3- Interpretación de las técnicas de bandedo.

Se ha desarrollado un código para describir las técnicas de bandas, el cual consta de tres letras: la primera indica el tipo de bandas; la segunda, la técnica por la que se obtienen; y la tercera, el colorante empleado.

Un *marcador* cromosómico se define como un hallazgo morfológico consistente y distintivo que es útil para identificar un cromosoma. Los marcadores incluyen las porciones teloméricas o extremos de los cromosomas, los centrómeros y ciertas bandas. Una *región* se define como el área de un cromosoma comprendida entre dos marcadores sucesivos. (44)

Para designar los brazos, las regiones y las bandas de un cromosoma, se tiene el siguiente sistema: *p* designa el brazo corto; *q* designa el brazo largo.

Las regiones y las bandas se numeran consecutivamente desde el centrómero a lo largo de cada uno de los brazos del cromosoma. Así, las dos regiones adyacentes al centrómero son la región 1 en cada brazo, la siguiente será la 2, y así sucesivamente. La banda utilizada como marcador se considera que pertenece enteramente a la región distal y por consiguiente lleva el número 1 en las bandas de esa región.

Para designar una banda particular se requieren 4 parámetros: *el número de cromosoma, el brazo, la región y la banda en esa región*, y se escriben sin espaciarlos y sin puntuación. Así por ejemplo, 1p35 indica el cromosoma número 1, su brazo corto, la región 3 y la banda 5. Con el aumento del número de bandas que se obtienen con las técnicas de alta resolución, las bandas se dividen en sub-bandas, según la distancia relativa que hay desde el punto que se desea señalar hasta el límite proximal de esa banda. Así, por ejemplo, si nos

referimos al límite proximal de la banda 1p22, escribimos 1p2200, pero si se desea indicar un número que está a 6/10 de este límite se escribirá 1p2206. (44)

Los signos + o -, si se colocan antes del cromosoma, indican que todo ese cromosoma está de más o se ha perdido; cuando los signos + o - se colocan después del cromosoma, indican aumento o disminución del tamaño de ese cromosoma.

4.3.3.1- Realización de un ideograma.

Para el estudio de las preparaciones cromosómicas es necesario el establecimiento del cariotipo de la persona por medio de un *ideograma*, ésta es una representación gráfica de la morfología de los cromosomas de una especie y se dice que es una caracterización citogenética más amplia. Para realizarla se hace lo siguiente:

- Se toma una microfotografía del cariotipo de una célula donde se vean individualizados los cromosomas con sus cromátidas.
- Se cuentan el número de cromosomas.
- Se recortan las imágenes fotografiadas de todos y cada uno de los cromosomas, dando un cierto margen a la figura, nunca por el contorno.
- Se agrupan por pares los cromosomas homólogos. Si los hay, los cromosomas sexuales se separan.
- Se colocan provisionalmente sobre una cartulina los pares de cromosomas, vertical y paralelamente, según su longitud total y en orden de mayor a menor tamaño.
- Una vez ordenado así, se orientan los cromosomas que no sean exactamente metacéntricos con los brazos largos hacia abajo.
- Se reubican los cromosomas ya ordenados sobre una línea recta imaginaria según dos criterios. En el primer criterio, se colocan los cromosomas alineados sobre la línea que pasa por los centrómeros. Y el segundo criterio, los cromosomas se alinean de manera tal que el extremo inferior de los brazos cromosómicos quede por encima de la línea.
- Se ordenan por grupos.
- Se procede a numerarlos. El número más pequeño para el cromosoma más grande y viceversa.
- Se señalan los cromosomas sexuales.

- Por último se fijan definitivamente todos los cromosomas en la cartulina.

Como se mencionó en los últimos 4 puntos anteriores, a partir de que se tienen las microfotografías, se procede a ordenar los cromosomas siguiendo el siguiente criterio: *Se ordenan por pares homólogos y en orden decreciente de longitud. Se numeran del 1 al 22 a partir del par de mayor tamaño y se clasifican en 7 grupos designados con las letras del alfabeto. Los cromosomas sexuales se colocan a parte y se indica cual es el cromosoma X y cual el Y.*

Se debe tomar en cuenta que a pesar de que cada par cromosómico está localizado en un lugar y con un número cromosómico definido, en realidad solo 6 de los 22 pares cromosómicos pueden ser identificados individualmente por su forma y tamaño relativos, éstos cromosomas son: pares **1, 2, 3, 16, 17, 18** y **ocasionalmente el cromosoma Y**. Todos los demás pares se indican como grupos. (12)

En la siguiente tabla se muestra los 8 grupos que constituyen a un cariotipo y el número de par de cromosomas los cuales forman parte de ellos.

Tabla 4.5 Relación entre los grupos de cromosomas con sus correspondientes pares (12)

GRUPOS DE CROMOSOMAS	pares de cromosomas
A	1, 2 y 3
B	4 y 5
C	6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12
D	13, 14 y 15
E	16, 17 y 18
F	19 y 20
G	21 y 22
Cromosomas Sexuales	XX o XY

4.3.4- Alteraciones citogenéticas en las diferentes clases de Leucemias.

Una vez realizado el cariotipo del paciente, se pueden definir las alteraciones estructurales de los cromosomas que tienen relación con la expresión de las diferentes clases de Leucemias.

Dentro de las alteraciones estructurales más frecuentes que se presentan en las diferentes clases de Leucemias son:

- **Translocación:** Es una alteración estructural en la cual se da un intercambio de segmentos entre cromosomas. La translocación puede ser recíproca o no, y puede involucrar cromosomas homólogos o no homólogos. (44)
- **Inversión:** Se produce cuando un segmento cromosómico rota 180° sobre sí mismo y se coloca nuevamente en el cromosoma en forma invertida, quedando la secuencia de genes alterada. La inversión puede ser paracéntrica si el segmento invertido no incluye el centrómero, o pericéntrica si el centrómero queda incluido. (44)
- **Delección:** Es cuando un cromosoma pierde un segmento de su estructura y por lo tanto, material genético se pierde. (44)
- **Trisomía:** Es la presencia de un cromosoma adicional. (44)

A continuación se describirán las alteraciones citogenéticas que se presentan en las diferentes clases de Leucemias.

4.3.4.1- Leucemia Linfoblástica Aguda.

La hiperploidia (número de cromosomas mayor al diploide) es común. Un número de translocaciones balanceadas han sido identificadas:

t(12;21)- Translocación que incluye los cromosomas 12 y 21, es la más común en LLA (30% de los casos). Resulta en la fusión entre los genes *TEL-AML*.

t(9;22)- Es la más común en adultos y está asociado con un muy mal pronóstico.

t(4;11q23)- Esta translocación resulta de la fusión genética de *MLL-AF4*. Se asocia con un pobre pronóstico.

t(1;19)- Es el resultado de la formación de la fusión genética *E2A-PBX*.

TAL.- Es una disregulación la cual es la anomalía genética más común en LLA en linfocitos T y puede ocurrir como resultado de la **t(1;14)** o más comúnmente debido a las deleciones en el cromosoma **1p32**. (2, 27)

4.3.4.2- Leucemia Linfocítica Crónica.

La **Trisomía 12** se da casi exclusivamente en casos con fenotipo y morfología atípicos y se da **14q+**. En casos afectados solamente una proporción de células muestran la anomalía. Se dan **deleciones de 11q, 13q12 y 13q14** con relativa frecuencia. Se desconoce el significado patológico de estas anomalías. (2, 27)

4.3.4.3- Leucemia Mieloblástica Aguda.

Un cariotipo anormal es encontrado en 50-60% de los casos de LMA en la presentación de la misma. Se presentan **t(15;17)** en la Leucemia promielocítica aguda o LMA-M3, **t(8;21)** se da en la mayoría de los casos en la LMA-M2, pero el 10-15% son LMA-M1 y la **inv/del/t(16)** entra en el criterio para la LMA-M4Eo, según FAB; sin embargo, las células distintivas y la anomalía cromosómica se da en casos que son claramente LMA-M2. (2, 27)

4.3.4.4- Leucemia Mielocítica Crónica.

Esta enfermedad se ha relacionado con una anomalía cromosómica (translocación del cromosoma 22 al 9; **t(9q+; 22q-)** que se denomina cromosoma Filadelfia (C-Ph1), la cual se observa en más del 90% de los pacientes y va acompañado por la presencia de un gen quimérico denominado **BCR-ABL**. (2, 27)

En la siguiente figura se muestra el cariotipo de un paciente en donde se demuestra la presencia del cromosoma Filadelfia en la Leucemia Mielocítica Crónica.

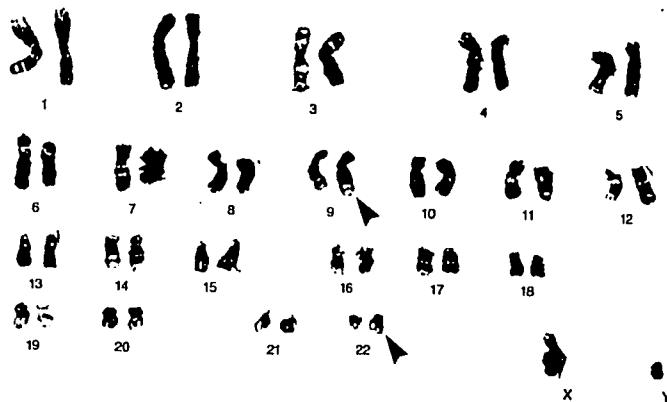


Figure 7. Philadelphia chromosome.

Figura 4.13 Presencia del cromosoma Filadelfia. (11)

5- DIAGNÓSTICO DE LAS DIFERENTES CLASES DE LEUCEMIAS DESDE LOS AÑOS 70'S DEL SIGLO XX HASTA LOS INICIOS DEL SIGLO XXI

En el capítulo anterior, de manera cronológica se describieron las técnicas y procedimientos que se desarrollaron para el diagnóstico de las diferentes clases de leucemia en el tiempo que abarcó los últimos años del siglo XIX hasta la década de los 60's del siglo XX. La división cronológica que se hace en el presente capítulo se basa en el hecho que a partir de los años 70's. se empezaron a desarrollar técnicas complementarias en la identificación de las células leucémicas para favorecer el diagnóstico con la Histología y Citología. Cabe resaltar que los avances que se tuvieron en el área de la Citogenética se desarrollaron precisamente en una época intermedia entre el empleo de la Clínica e Histología y la aplicación de las técnicas complementarias que a continuación se describirán en el presente capítulo.

Para comenzar, se describirán las técnicas denominadas Citoquímicas, las cuales fueron (y son aún) de gran utilidad para la diferenciación y diagnóstico, principalmente, de las Leucemias agudas y cuya utilización empieza a ser aplicada durante los inicios de la década de los 70's del siglo XX.

5.1- Empleo de las técnicas citoquímicas.

Citoquímica en Hematología se refiere a los métodos de tinción usados para identificar la composición química de las sin alterar en forma significativa su morfología. La mayor parte de los marcadores citoquímicos celulares representa a los organelos que contienen enzimas y otras proteínas. Algunas de éstas son específicas de ciertos tipos celulares. Las células se incuban con substratos que reaccionan con constituyentes celulares determinados. Si el constituyente específico está presente en la célula, su reacción con el substrato se confirma por la formación de un producto coloreado dentro de la célula. Las células se valoran en frotis sanguíneos con un microscopio de luz ordinario, aunque en ocasiones es necesario el microscopio para identificar reaccionar muy débiles a nivel subcelular. Los resultados de estas reacciones en condiciones normales y estados patológicos se conocen. La citoquímica es útil en particular para determinar a cuál línea celular pertenecen los blastos en la

leucemia aguda, sobre todo cuando la diferenciación morfológica en frotis teñidos por Romanowsky, es posible.

Las reacciones de tinción citoquímica son de dos tipos: enzimáticas y no enzimáticas. El grupo enzimático incluye tinción para Peroxidasa, Esterasas y Fosfatasas ácida y alcalina. Las tinciones no enzimáticas son el Sudan Negro B para lípidos, el ácido peryódico de Schiff para carbohidratos y el azul de toluidina. (37)

La reacción más útil es la tinción para Mieloperoxidasa, que se emplea para diferenciar blastos de la línea mieloide de linfoblastos. La tinción es positiva en células que derivan de la línea mieloide y negativa en células linfoides. Los resultados de la tinción con Sudan Negro B correlacionan en forma estrecha con los de la tinción para Mieloperoxidasa. Por esta razón, algunos laboratorios emplean una u otra, pero no las dos. La otra reacción principal es la de esterazas no específicas, usando acetato de α -naftilo o butirato de α -naftilo como sustrato. Se usa en forma primaria para diferenciar las Leucemias granulocíticas de aquellas que tienen origen monocítico. En los monocitos, la esterasa inespecífica muestra una reacción positiva fuerte que es inhibida por el fluoruro de sodio. Una reacción negativa o débil que no es inhibida con fluoruro de sodio, es típica de mieloblastos o de otras células de la serie granulocítica.

5.1.1- Tinción de Peroxidasa.

Las peroxidazas son enzimas que catalizan la oxidación de sustancias por el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La peroxidasa está presente en los gránulos azurófilos primarios de los neutrófilos, y en los eosinófilos y monocitos. No se encuentra actividad alguna en eritrocitos ni en linfocitos. La reacción de tinción en las células mieloblásticas generalmente se incrementa conforme al grado de maduración de la célula, con la mayor actividad presente en los neutrófilos. Los eosinófilos también mostrarán una intensa tinción de peroxidasa. La reacción positiva en los monocitos está limitada a la tinción granular fina a través de la célula. Para demostrar la actividad de peroxidasa en citoquímica, se emplea un sustrato indicador que formará un producto coloreado cuando se oxida:



En el pasado se empleaba bencidina o uno de sus derivados como sustrato, pero debido a la carcinogenicidad de estas sustancias, en la actualidad se usa uno de los siguientes sustratos: p-fenilendiamina con un pirocatecol, 3-amino-9-etilcarbazol, 2,7-fluorendiamina, α -naftol-pironina o α -toluidina. (9)

El procedimiento que a continuación se describe emplea como sustrato el 3-amino-9-etilcarbazol.

- *Preparar el frotis sanguíneo o de médula ósea y dejar que se seque al aire.
- *Colocar las extensiones en una jarra coplin que contenga acetona-formalina buffereado con fosfatos (pH 6.6 a 6.8) por 30 segundos a temperatura ambiente.
- *Lavar las extensiones bajo un chorro ligero de agua.
- *Colocar las extensiones en una jarra coplin que contenga la mezcla de tinción por 12 minutos.
- *Lavar las extensiones bajo un chorro ligero de agua.
- *Contrateñir las extensiones en una jarra coplin que contenga hematoxilina de Mayer por 5 minutos.
- *Lavar las extensiones bajo un chorro ligero de agua.
- *Dejar las extensiones al aire para que se sequen e inmediatamente cubrirlas con un medio de montura gelatina glicerol para prevenir que la tinción se palidezca.
- *Examinar las extensiones microscópicamente, usando el objetivo 100X con aceite de inmersión. La presencia de peroxidasa es indicado por depósitos rojizos-café presentes en el citoplasma de los granulocitos y monocitos. El citoplasma de los neutrófilos está lleno de estos gránulos rojizos-café. Los monocitos muestran de pequeño a moderado número de los gránulos. Los eosinófilos exhiben gránulos teñidos obscuramente, mientras que los basófilos y linfocitos no se tiñen. Los micloblastos más inmaduros pueden dar una reacción negativa.

Se piensa que la actividad enzimática en los eosinófilos es diferente que en los neutrófilos, debido a que la peroxidasa eosinofílica retiene su actividad en un ambiente ácido y en presencia de cianuro, en tanto que no ocurre así en los neutrófilos. Aunque la

peroxidasa existe en promielocitos, mielocitos, metamielocitos, bandas y neutrófilos, la única actividad valorada en los frotis es la que ocurre en los blastos. La reacción positiva en los neutrófilos sirve como un control positivo. La peroxidasa puede demostrarse en células Pilosas, megacariocitos y plaquetas por microscopía electrónica, pero no por métodos convencionales con microscopio de luz.

5.1.2- Tinción de Cloroacetato esterasa (CAE).

El cloroacetato de naftol AS-D es el sustrato específico requerido por las esterasas presentes en los neutrófilos. Los blastos en las Leucemias Mieloblásticas Agudas con un componente granulocítico darán resultado positivo, en tanto que los que poseen un componente monocítico puro, serán negativos. Los bastoncillos de Auer dan reacción positiva. Ninguna actividad se observa en linfocitos, células plasmáticas, megacariocitos, eosinófilos ni en formas inmaduras de eritrocitos. El principio de la reacción se basa en que las cloroacetato esterasas presentes en las células granulocíticas hidrolizarán un sustrato (naftol AS-D cloroacetato) para liberar naftol, el cual entonces se combina con azul rápido BB para formar un precipitado azul en o cerca del sitio de la actividad enzimática. A continuación se detalla el procedimiento. (9, 17, 37)

- *Preparar extensiones de sangre o médula ósea de pacientes y de controles normales y dejar secar al aire.
 - *Fijar las extensiones en una jarra coplin que contenga acetona formalina fija buferada con fosfatos (pH 6.6 a 6.8) por 30 a 60 segundos.
 - *Lavar las extensiones en 3 cambios de agua destilada.
 - *Dejar que las extensiones se sequen al aire por 10 a 30 minutos mientras se prepara la mezcla de incubación.
 - *Colocar las extensiones en una jarra coplin que contenga la mezcla de incubación por 20 minutos.
 - *Lavar las extensiones en 3 cambios de agua destilada.
- Contrateñir al colocar las extensiones en una jarra coplin que contenga verde de metilo al 1% por 1 a 2 minutos.

*Lavar las extensiones con un chorro de agua.

*Examinar las extensiones microscópicamente usando el objetivo de 100X con aceite de inmersión. La actividad del cloroacetato esterasa se mostrará como gránulos teñidos de azul en células granulocíticas. Los basófilos mostraran de una pequeña a nula actividad. Los granulocitos, incluyendo promielcitos, mostrarán una muy fuerte actividad, así como muchos, pero no todos, micloblastos. Los monocitos mostraran de una pequeña a nula actividad. Los linfocitos, eosinófilos, células plasmáticas, megacariocitos ni eritroblastos no muestran actividad.

5.1.3- Tinción de Esterasas inespecíficas Acetato o Butirato de α -naftilo (ANAE y ANBE).

Como en el caso anterior, las esterasas son enzimas capaces de hidrolizar a los ésteres alifáticos y aromáticos. Estas enzimas pueden subdividirse en específicas (como en el caso anterior CAE) e inespecíficas, de acuerdo con sus preferencias por substratos. Las esterasas leucocitarias separan los derivados naftoles de sus ésteres. El naftol liberado se acopla con un colorante diazonio adecuado, para dar un azocolorante insoluble.

Derivado naftólico $\xrightarrow{\text{Esterasa}}$ Naftol libre

Naftol libre + Sal diazonio \longrightarrow Compuesto azoado de color intenso

Los substratos de acetato y butirato de α -naftilo son hidrolizados por esterasas con un amplio espectro de actividad. Estas esterasas inespecíficas se emplean como marcador particular de los monocitos. Por tanto, los blastos en Leucemias Agudas con un componente monocítico (M4 y M5) darán reacción positiva, pero Leucemias Mieloblásticas Agudas con un componente granulocítico puro (M1 y M2) serán negativas o positivas débiles. La actividad de los monocitos se puede inhibir por fluoruro de sodio, no así la actividad de los granulocitos. Los eritroblastos presentes en la eritroleucemia (M6) y en el síndrome de DiGuglielmo pueden teñirse positivamente para esterasas no específicas. Algunos linfocitos muestran actividad de esterasa inespecifica. La actividad positiva como puntilleo en el citoplasma de algunos linfocitos

maduros se confirma por estudios inmunológicos para identificar linfocitos T cooperadores. Células Pílosas, células plasmáticas y megaloblastos son positivas también. Para ayudar a la diferenciación de estas células, de los monocitos, deberá incorporarse fluoruro de sodio a la tinción de esterasa inespecífica. Megacariocitos y plaquetas dan reacción positiva con acetato de α -naftilo (ANAE), son sensibles en forma moderada al fluoruro de sodio y su reacción es negativa al butirato de α -naftilo. (9, 32, 37)

El principio para la reacción con ANAE se basa en que las enzimas hidrolizarán el acetato de α -naftilo, para liberar un compuesto naftílico, el cual se combina con pararosanilina para producir un precipitado rojo en o cerca del sitio de la actividad enzimática. El procedimiento para medir ANAE es el siguiente.

*Preparar extensiones de sangre o médula ósea y dejar que se sequen al aire. Por lo menos 2 extensiones deben ser preparados por cada paciente y un control normal. Etiquetar una extensión del paciente y un control normal como A y la segunda extensión como B.

*Fijar las extensiones en una jarra coplin que contenga acetona formalina bufereada con fosfato por 30 a 60 segundos.

*Lavar las extensiones en tres cambios de agua destilada.

*Deje que las extensiones se sequen al aire por 10 a 30 minutos mientras realiza la mezcla de incubación.

*Colocar por el lado apropiado la extensión para cada paciente y un control normal dentro de la jarra coplin que contiene la mezcla de incubación A (pararosanilina, nitrito de sodio y acetato de α -naftilo sin fluoruro) y en una segunda jarra que contenga la mezcla de incubación B (incluye el fluoruro). Incubar las extensiones a temperatura ambiente por 60 minutos.

*Lavar las extensiones en tres cambios de agua destilada.

*Contrateñir al colocar las extensiones en una jarra coplin que contenga verde de metilo al 1% por 1 a 2 minutos.

*Lavar las extensiones con un chorro de agua.

*Dejar que las extensiones se sequen al aire y cubrirlas.

*Examinar las extensiones microscópicamente usando el objetivo de 100X. La actividad de esterasa no específica se indicará por la presencia de gránulos teñidos de rojo oscuro en el citoplasma de la célula. Aquellas extensiones de la mezcla de incubación A (sin fluoruro) mostrarán una fuerte actividad esterasa en el citoplasma de monocitos, macrófagos, megacariocitos y plaquetas. Habrá también tinción positiva en algunos linfocitos T y células plasmáticas. Los granulocitos inmaduros y eritroblastos normales mostrarán una actividad esterasa inespecífica muy débil o nula. Con el fluoruro, la tinción de actividad de esterasa inespecífica está inhibida en los monocitos, macrófagos, megacariocitos y plaquetas.

5.1.4- Tinción de Fosfatasa Alcalina Leucocitaria (FAL).

La fosfatasa alcalina es una enzima que libera fosfatos de fosfomonoésteres a pH alcalino. La actividad de la FAL se concentra en el citoplasma y en los gránulos secundarios de los neutrófilos y las formas en banda y en algunas veces, en menor grado en ciertos linfocitos B. La valoración semicuantitativa de la actividad es útil en la diferenciación de una reacción leucemoide (actividad de la FAL incrementada) de una Leucemia Mielocítica Crónica (se decrece la actividad). El principio de la tinción radica en que las extensiones se fijan en acetona amortiguada con citrato. Cuando se coloca en la solución de incubación que contiene fosfato de naftol AS-MX y azul rápido RR, la fosfatasa alcalina presente en los leucocitos libera el naftol AS-MX, el cual se acopla al azul rápido RR para formar un compuesto azul insoluble (en el sitio de la actividad de la FAL) en proporción de la cantidad de enzima presente. Las extensiones se contrañen. El grado de reactividad se determina al evaluar 100 neutrófilos de acuerdo a la cantidad de colorante precipitado presente. (9, 32) A continuación se describe el procedimiento a seguir:

*Preparar la solución de tinción inmediatamente antes de usar:

- a) Disolver el contenido de una cápsula de azul rápido RR en 48 ml de agua destilada.
- b) Adicionar 2 ml de solución alcalina de fosfato de naftol AS-MX y mezclar.
- c) Colocar la tintura en una jarra coplin. Desechar la tintura después de usar.

*Después de la colecta, colocar las extensiones de sangre secadas en aire en una jarra coplin que contenga acetona amortiguada con citrato por 30 segundos.

*Cuidadosamente enjuague las extensiones con un chorro de agua destilada por 45 segundos. No permita que las extensiones se sequen.

*Coloque las extensiones en la solución de tinción por 30 minutos a temperatura ambiente.

*Lave las extensiones en agua destilada por 2 minutos. No permita que las extensiones se sequen.

*Contrateñir con hematoxilina de Mayer por 10 minutos. Enjuague las extensiones con agua destilada por 3 minutos.

*Examinar las extensiones microscópicamente en un área relativamente delgada de la extensión usando el objetivo de 100X (con aceite de inmersión). Contar 100 neutrófilos consecutivos (y en forma de banda) y evalúe cada uno de 0 a 4+ en base a la apariencia (cantidad e intensidad) del colorante precipitado en la célula. El citoplasma de las células será descolorido a un azul pálido.

0 = Incoloro; 1+ = Gránulos ocasionales difusos; 2+ = Difuso con un número moderado de gránulos; 3+ = Positiva fuerte con numerosos gránulos y 4+ = Positiva muy fuerte con gránulos confluentes, oscuros. La suma de la escala es la totalidad de FAL. Cada laboratorio deberá establecer su propia escala normal. La variación posible es de 0 a 400. La media normal oscila de 48 a 68. Un valor mayor de 160 se considera elevado por lo general y menor de 13 disminuido.

5.1.5- Tinción de Fosfatasa Ácida (con resistencia al Tartrato).

La fosfatasa ácida hidroliza a los ésteres de monofosfato en un medio ácido. La fosfatasa ácida existe en la mayor parte de las células humanas. Es un constituyente de los lisosomas. En las células sanguíneas hay 7 isoenzimas diferentes: 0, 1, 2, 3, 3b, 4, 5. Normalmente, la actividad de la fosfatasa ácida está presente en los mielocitos, linfocitos, células plasmáticas, monocitos y plaquetas. En esta tinción la actividad de la enzima se indica por un precipitado rojo. En presencia de L(+) ácido tartárico, se inhibe la actividad de la enzima en las células antes mencionadas y se tñen de manera negativa. Sin embargo, la isoenzima 5 (una pirofosfatasa presente en grandes cantidades en las células pilosas de la leucemia del mismo nombre) es resistente al L(+) ácido tartárico, y mostrará una respuesta positiva en

presencia de este reactivo. Raramente los linfocitos en la Leucemia Linfocítica Crónica y en el Linfosarcoma puede mostrar una menor resistencia al L(+) ácido tartárico y, por lo tanto, teñirse finamente de manera positiva. El principio se basa en que la fosfatasa ácida presente en las células hidroliza el ácido fosfórico naftol AS-BI en la mezcla de incubación liberando el naftol insoluble, el cual se acopla al pararosanilina, originando un precipitado de color rojo en el sitio de la actividad de la enzima. En presencia de L(+) ácido tartárico la actividad de mucha de la fosfatasa ácida es inhibida. La excepción es la isoenzima 5 (presente en la Leucemia de la Células Pilosas), la cual es resistente al L(+) ácido tartárico. A continuación se describe el procedimiento. (9)

*Preparar extensiones delgadas de sangre o médula ósea y permita que se sequen al aire. Por lo menos dos extensiones deben ser preparados para cada paciente y el control normal. Etiquetar una extensión como I y el control normal, y la otra como II.

*Colocar los portaobjetos en una jarra coplin que contenga acetona formalina amortiguada con fosfatos por 30 segundos.

*Lavar las extensiones en 3 cambios de agua destilada.

*Colocar los portaobjetos etiquetados para cada paciente y el control normal en la apropiada jarra coplin que contenga la mezcla de incubación I (nitrito de sodio, pararosanilina, ácido fosfórico naftol AS-BI) –preincubado a 37°C- y dentro de una jarra coplin que contenga la mezcla de incubación II (contiene el L(+) ácido tartárico) -precalentada a 37°C-. Incubar las extensiones a 37°C por 60 minutos. (Asegúrese de que el nivel del agua en el baño María esté por encima del nivel del líquido de la jarra coplin).

*Lavar las extensiones con 2 cambios de agua destilada.

*Colocar las extensiones dentro de una jarra coplin que contenga verde de metilo al 1% por 2 minutos.

*Lavar las extensiones rápidamente con un chorro de agua.

*Dejar que las extensiones se sequen al aire, montar y cubrir con un medio PVP.

*Examinar las extensiones microscópicamente usando el objetivo de 100X (con aceite de inmersión). Aquellas extensiones de la mezcla de incubación I debieran

mostrar actividad de fosfatasa ácida en el citoplasma de los leucocitos y plaquetas (variando los grados de tinción roja). Las extensiones de la mezcla de incubación II no deben mostrar actividad de la enzima o solamente una mínima cantidad de tinción roja. Las células pilosas exhiben tinción roja positiva de ambas mezclas de incubación.

5.1.6- Reacción del Ácido Periódico de Schiff (PAS).

La tinción de ácido periódico – Schiff ayuda en el diagnóstico de algunas Leucemias Linfoblásticas Agudas y ciertos subtipos de Leucemias Mieloblásticas Agudas, y también puede ser útil para distinguir la enfermedad de DiGuglielmo. Esta tinción indica la presencia de mucoproteínas, glicoproteínas y carbohidratos de elevado peso molecular. En las células sanguíneas el glucógeno es lo que se tiñe primariamente de manera positiva. El ácido periódico es un oxidante que rompe los enlaces C – C de los grupos CHO-CHOH para formar aldehídos (CHO). El reactivo de Schiff (fucsina – ácido sulfuroso) reacciona entonces con los aldehídos para producir un compuesto precipitado de color rojo. Normalmente, casi todas las células sanguíneas, exceptuando los eritroblastos,, muestran tinción positiva. La intensidad y patrón de la tinción variará según el tipo celular. Puede ser difusa, granular o una mezcla de los dos. Los granulocitos muestran normalmente un patrón de tinción difuso, mientras que la tinción en los linfocitos tiene un patrón granular. Los granulocitos muestran una reacción positiva en todas las etapas de desarrollo, los neutrófilos maduros reaccionan más fuertemente. Los mielocitos y mieloblastos contienen gránulos teñidos con poca positividad. Los gránulos eosinófilos no toman la tinción, pero el citoplasma se tiñe positivamente. Los linfocitos contienen pocos gránulos teñidos fina o toscamente de manera positiva. Los gránulos de los monocitos exhiben una pequeña cantidad de positividad y los eritrocitos nucleados generalmente no muestran gránulos teñidos positivamente. Las plaquetas se tiñen profundamente. En estados patológicos, la reacción de tinción de PAS diferirá de lo normal y esto es de valor diagnóstico. En la Leucemia Linfocítica Crónica, linfosarcoma y en la enfermedad de Hodgkin, los linfocitos contienen un número incrementado de gránulos teñidos positivamente. En la eritroleucemia (enfermedad de DiGuglielmo) y en la talasemia, las células rojas nucleadas algunas veces

muestran una reacción positiva. Algunas de estas células se han encontrado en anemias deficientes de Hierro, en algunas anemias hemolíticas, perniciosas, aplásicas y policitemia (9, 32). El procedimiento consiste en los siguientes puntos:

- *Fijar las extensiones en una jarra Coplin que contenga formalina alcohólica por 10 minutos.
- *Lavar las extensiones con un chorro de agua por 15 minutos.
- *Colocar las extensiones en una jarra Coplin que contenga ácido periódico por 20 minutos.
- *Lavar las extensiones con un chorro de agua por 5 minutos.
- *Ecurrir las extensiones y colocarlas en una jarra Coplin que contenga reactivo de Schiff por 30 minutos.
- *Enjuagar las extensiones con agua corriente y luego lavar en agua destilada por 5 minutos.
- *Contrateñir las extensiones en una jarra Coplin que contenga hematoxilina de Mayer por 5 minutos.
- *Enjuagar las extensiones con agua corriente por 15 minutos. Dejar escurrir y secar y posteriormente cubrir las extensiones.
- *Examinar las extensiones microscópicamente, usando el objetivo de 100X (con aceite de inmersión). El glucógeno presente en las células se teñirán con color púrpura rojo brillante.

5.1.7- Tinción con Sudan Negro B (SNB).

El Sudan Negro B tinte varios lípidos como grasa neutras, fosfolípidos y esteroides. Es un colorante lipofílico que abandona su solvente y se concentra en el lípido intracelular. Como una tinción, es muchas veces empleado para distinguir Leucemias Mieloblástica Aguda y mielomonocítica de la Leucemia Linfoblástica Aguda. Los gránulos de los linfocitos no se tiñen. Las células mielogénicas muestran una tinción tosca en sus gránulos con tinción ligera en los mieloblastos. La intensidad de la tinción incrementa con la madurez de la célula. Los bastones de Auer se teñirán intensamente. Los monocitos muestran una tinción

positiva de los gránulos finamente dispersos. Esta tinción es similar a la tinción peroxidasa en los tipos de células los cuales se tiñen positivamente. Es muy similar en sensibilidad a la tinción de peroxidasa, pero es más sensible que la tinción de clororacetato esterasa en la tinción de mieloblastos. En ocasiones, las vacuolas citoplasmáticas de los linfoblastos de la Leucemia Linfoblástica Aguda L3 pueden dar tinción positiva con el SNB (9, 32). A continuación se describe el procedimiento:

*Colocar papel filtro despedazado en la base de una jarra Coplin y humedecer con formaldehído al 37%.

*Colocar extensiones secas en la jarra Coplin y cubrir. Dejar que las extensiones se fijen en el vapor por 10 minutos. Lavar cuidadosamente con agua corriente y deje que el exceso del agua se escurra de la extensión.

*Colocar las extensiones en una jarra Coplin que contenga una solución de tinción de Negro Sudan B por 30 minutos (el tiempo puede ser variable según la edad de la solución tinción).

*Enjuagar cada frotis con alcohol etílico al 70% solo para remover el exceso de tinción.

*Lavar las extensiones cuidadosamente con agua corriente por 2 minutos.

*Colocar las extensiones en una jarra Coplin que contenga rojo neutro al 1% y contrateñir por 10 minutos.

*Lavar los frotis con agua cuidadosamente, secar al aire y cubrir con un medio PVP.

*Examinar las extensiones microscópicamente, usando el objetivo 100X (con aceite de inmersión). Los neutrófilos y eosinófilos se teñirán positivamente. Los gránulos de los eosinófilos generalmente se teñirán fuertemente alrededor de los gránulos pero permanecerá una cierta área sin teñir. Los monocitos mostrarán una tinción positiva dispersa. Los gránulos de los linfocitos, plaquetas y eritrocitos permanecen sin teñirse.

5.1.8- Tinción con azul de toluidina.

Es un colorante alcalino que reacciona con mucopolisacáridos para formar gránulos metacromáticos. La reacción positiva es específica para basófilos y células cebadas. No obstante, la reacción negativa no descartará la presencia de neoplasias de estas células, debido a que el ácido mucopolisacárido puede ser escaso o nulo en trastornos neoplásicos.

(37)

En base a las técnicas descritas anteriormente, podemos mencionar en el siguiente cuadro los resultados de las reacciones citoquímicas en las células sanguíneas sanas y en los blastos de la leucemia aguda, los cuales son parte del criterio para clasificar las Leucemias agudas en base al criterio de FAB, discutido en el capítulo anterior.

Tabla 5.1. - Reacciones citoquímicas en las células sanguíneas y en los blastos de la Leucemia Aguda (17)

	PEROXIDA SA; NEGRO SUDAN B	α - NAFTILA- CETATO ESTERASA	α - NAFTILBU TIRATO ESTERASA	NAFTOL- ASD- CLOROACE TATOESTE RASA	ACIDO PERYODI- CO SCHIFF	FOSFATA- SA ÁCIDA
Promielocito	+/++	-/±	-	+/++	±/+	+/++
Neutrófilo	++	-/±	-	+/++	+++	+
Monocito	-/±	+++	+/+++	-/±	±	++
Linfocito	-	-/± ^a	-/± ^a	-	-/+	-/++
Eritroblasto	-	-/± ^b	-	-	-	±/-
Megacariocito	-	+++	±	-	++	++
LLA	-	-/± ^c	-	-	+/++ ^d	-/± ^c
LMA (M1)	+	-	-	+	+	-
LMA (M2)	++	-/±	-/±	++	+	+
LPA (M3)	+++	-/+++	-	+++	±/++	++
LMMA (M4)	++	+/+++	++	++	-/++	++
LMOA (M5)	-/±	+++	+++	-/±	++	+
EL (M6)	-	++	+	-	++	-
LMeg (M7)	-	+	-/±	-	++	+
LMA (M0)	-	-	-	-	-	-

- = negativo; ± = células débiles o poco positivas; + = moderada; ++ = moderadamente intensa; +++ = intensamente positiva (la mayoría de las células). LLA = Leucemia Linfoblástica Aguda; LMA (M1) = Leucemia Mieloblástica Aguda; LMA (M2) = LMA con maduración; LPA (M3) = Leucemia Promielocítica Aguda; LMMA (M4) = Leucemia Mielomonocítica Aguda; LMOA (M5) = Leucemia Monocítica Aguda; EL (M6) = Eritroleucemia Aguda; Lmeg (M7) = Leucemia Megacariocítica Aguda; LMA (M0) = Leucemia indiferenciada Aguda. a.- La positividad es focal, no difusa, b.- En la eritroleucemia y en algunos defectos de maduración eritroides, la positividad es intensa, c.- Positividad citoplasmática focal en una pequeña proporción de LLA, d.- Típicos bloques gruesos. Desde M1 a M5, las reacciones citoquímicas para las

esterasas se aplican a todos los mononucleares, no eritroides y no linfoides. En M6, las reacciones citoquímicas citadas en la tabla se aplican a los eritroblastos y no a los mieloblastos que también existen y probablemente son positivos al Sudan Negro B o Peroxidasa.

5.2- Empleo de los Anticuerpos Monoclonales para identificar marcadores de membrana.

Sin duda alguna, un evento importante que marcó la pauta en el desarrollo de las técnicas más avanzadas y específicas para el diagnóstico de las diferentes clases de Leucemias, fue el empleo de las moléculas que son capaces de reconocer estructuras bioquímicas que se les ha asociado con la presencia de un cierto tipo de leucemia. Dichas moléculas son los **anticuerpos**. Los anticuerpos son moléculas de naturaleza glucoproteínica, producidos por los linfocitos B que han sido activados por la presencia de un **antígeno** (región o determinante de toda sustancia capaz de estimular y originar una respuesta inmunológica específica) y que se diferencian a células plasmáticas. Los anticuerpos siempre inician sus efectos biológicos al unirse a los antígenos y dichos efectos son aprovechados para evidenciar la presencia de un marcador biológico que se asocia a una clase de leucemia. (1, 31)

Es importante mencionar que primero fue necesario describir las características estructurales de los anticuerpos, aspecto que llevó más de 70 años del siglo pasado y en esto han participado muchos laboratorios. Los primeros estudios fueron llevados a cabo con mezclas naturales de anticuerpos presentes en la sangre de individuos inmunizados. La sangre contiene muchos anticuerpos de especificidad diferente, cada uno procedente de una determinada clona de linfocitos B y cada uno con un reconocimiento diferente para cada antígeno. Sin embargo, los anticuerpos son lo suficientemente parecidos entre sí que Michael Heidelberger y colaboradores fueron capaces de purificar mezclas de anticuerpos a partir de otros componentes de la sangre, sentando de este modo las bases para posteriores estudios estructurales. Trabajando con esta mezcla, los inmunólogos fueron capaces de deducir la estructura de los anticuerpos. A pesar de ello, la heterogeneidad molecular de estos anticuerpos **policlonales** (anticuerpos producidos por múltiples clones de linfocitos B) interfirió con un análisis más detallado de la estructura de los anticuerpos, como fue la determinación de la secuencia de aminoácidos. La clave metodológica que supuso un gran avance en este intento fue el descubrimiento de que pacientes o animales con mieloma múltiple, un tumor **monoclonal** de células plasmáticas secretoras de anticuerpos, tenían con

frecuencia en su sangre u orina niveles altos de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos bioquímicamente idénticos, lo que proporcionó una fuente de anticuerpos individuales con una especificidad (aunque generalmente desconocida). En 1975, Georges Kohler y Cesar Milstein describieron un método para inmortalizar células secretoras de anticuerpos a partir de un animal inmunizado, permitiendo la selección de **anticuerpos monoclonales** individuales con una especificidad predeterminada. (1)

A grandes rasgos, la estructura de un anticuerpo o inmunoglobulina (porque comprende la fracción y de las globulinas) consiste de una proteína en forma de Y la cual consiste de dos cadenas "pesadas" de 50 kDa de peso molecular cada una y dos cadenas "ligeras" de aproximadamente 25 kDa peso molecular cada una. Las cadenas ligeras se unen a las cadenas pesadas por puentes disulfuro [-S - S-], y las dos cadenas pesadas se unen por uniones disulfuro para crear una estructura de 150 kDa. Las Inmunoglobulinas de las clases G, D y E (IgG, IgD e IgE) tienen esta estructura básica de 4 cadenas. La inmunoglobulina A (IgA) es un dímero de dos unidades o monómeros de 150 kDa unidas una con otra, mientras que la inmunoglobulina M (IgM) es una molécula pentamérica. La región responsable para el reconocimiento y la unión al antígeno marcador es el fragmento de unión al antígeno o **región Fab** y contiene las regiones hipervariables de las dos cadenas ligeras y pesadas (en la región hipervariable radica la heterogeneidad de todos los anticuerpos, ya que la variabilidad de la secuencia de aminoácidos en dichas regiones es lo que hace ser diferente a cada anticuerpo producido). El resto de la molécula de la inmunoglobulina está relativamente conservada en la estructura de la secuencia de aminoácidos, y es similar a las otras moléculas de anticuerpos de la misma clase, y es conocido como el fragmento cristizable o **región Fc**, y es responsable para la señalización celular después de que el anticuerpo se haya unido a su marcador. (1, 11)

Al describirse las características estructurales de los anticuerpos, su uso en diferentes renglones de la ciencia ha marcado un gran avance en el desarrollo de técnicas de diagnóstico más precisas y exactas de las diferentes clases de Leucemias, pero para ello, es necesario comentar cómo ha sido el desarrollo de los anticuerpos monoclonales que han sido utilizados para identificar marcadores de membrana específicos que se expresan en las diferentes clases de Leucemias. En ambos aspectos, se detallará el desarrollo del estudio de la relación antígeno - anticuerpo para el diagnóstico de las diferentes clases de Leucemias.

5.2.1- Hibridomas y Anticuerpos Monoclonales.

La técnica de producción de cantidades casi ilimitadas de anticuerpos específicos frente a un determinante antigénico determinado ha revolucionado la Inmunología y ha tenido un extraordinario impacto sobre la investigación que se realiza en diferentes campos. Esta técnica se basa en el hecho de que cada linfocito B produce anticuerpos con una única especificidad. Por lo tanto, cada tumor monoclonal derivado de un linfocito B, conocido como **mieloma**, produce sólo un anticuerpo. Estos tumores aparecen espontáneamente en los hombres y se pueden inducir experimentalmente en ratones por medio de diferentes tratamientos. Existe el problema de que la mayor parte de los mielomas secretan anticuerpos con especificidades desconocidas, ya que el proceso de transformación que origina estos tumores afecta a los linfocitos B de forma aleatoria y no es posible predecir la especificidad de una clona cualquiera de linfocitos B transformado de forma aleatoria. Se han realizado muchos intentos para producir anticuerpos homogéneos o monoclonales de especificidad conocida. Como los linfocitos B normales no pueden crecer indefinidamente, estos intentos se centraron en la inmortalización de las células B que producen un anticuerpo conocido. La primera técnica, ahora de uso generalizado, para realizar esto fue descrita por Georges Kohler y Cesar Milstein en 1975. El método implica la fusión de células o *hibridación* celular somática entre un linfocito B normal productora de anticuerpos y una línea de mieloma, y posteriormente la selección de las células fusionadas que secretan anticuerpos de la especificidad deseada derivadas del linfocito B normal. Las líneas celulares derivadas de esta fusión, inmortalizadas y productoras de anticuerpos se llaman **hibridomas**, y los anticuerpos que producen se denominan **anticuerpos monoclonales**. (1)

El éxito de esta técnica depende del desarrollo de líneas celulares de mieloma cultivadas que crecerían en un medio de cultivo normal, pero no en un medio "selectivo" porque carecen del gen(es) funcional(es) necesario(s) para la síntesis del ADN en este medio de cultivo. La fusión de células normales con estas células de mieloma defectuosas proporcionaría el gen(s) necesario(s) por parte de las células normales, de forma que sólo los híbridos celulares somáticos continuarían creciendo en el medio selectivo. Además, los

genes de las células de mieloma hacen a estos híbridos inmortales. Las líneas celulares que pueden usarse como parejas para la fusión, se crean induciendo defectos en las vías de síntesis de los nucleótidos. Las células animales normales sintetizan nucleótidos purínicos y timidilato *de novo* a partir de fosforribosil pirofosfato y uridilato, respectivamente, en varios pasos, uno de los cuales implica la transferencia de un grupo metilo o formilo desde el tetrahidrolato activado. Los fármacos antifolato como la aminopterina, bloquean la reactivación del tetrahidrolato inhibiendo así la síntesis de purina y timidilato. Como estos son componentes necesarios del ADN, la aminopterina bloquea la síntesis *de novo* de ADN. Las células tratadas con aminopterina pueden utilizar una línea de "salvamento" en la cual la purina se sintetiza a partir de hipoxantina que se aporta exógenamente y utilizando la enzima hipoxantina - guanosina fosforribosiltransferasa (HGPRT), y el timidilato se sintetiza a partir de timidina gracias a la enzima timidina cinasa (TK). Por lo tanto, las células crecen normalmente en presencia de aminopterina si el medio de cultivo está enriquecido con hipoxantina y timidina (conocido como medio HAT). Las líneas celulares, sin embargo, pueden carecer de la HGPRT si se mutan y se seleccionan con tioguanina o azaguanina, que son análogos de los metabolitos normales que son sustrato de la HGPRT pero que dan lugar a purinas no funcionales. Igualmente, las células que pueden carecer de TK por mutagénesis y selección con bromodesoxiuridina, que es metabolizada por la TK para formar un producto letal fotosensible. Estas células HGPRT o TK negativas no pueden utilizar la vía de "salvamento" y, por lo tanto, morirán en el medio HAT. Si las células normales se fusionan con células HGPRT (-) o TK (-), las células normales proporcionan la(s) enzima(s) necesaria(s) de forma que los híbridos sintetizan ADN y crecen en medio HAT. (1)

Este principio se aplicó a la generación de hibridomas productores de anticuerpos en primer lugar por el desarrollo de líneas de mieloma HGPRT (-) y/o TK (-). Las líneas de mieloma son las mejores parejas para la fusión con linfocitos B, ya que células semejantes tienden a fusionarse y formar híbridos estables más eficazmente que con células que no son semejantes. Kohler y Milstein fusionaron una línea de mieloma de ratón HGPRT (-) con linfocitos B normales de ratón inmunizados con un antígeno conocido, utilizando el virus Sendai, que expresa una proteína de envoltura ("proteína de fusión") que fusiona células que están juntas. Los híbridos se seleccionaron por su crecimiento en el medio HAT; en

estas condiciones, las células de mieloma no fusionadas morirían porque no podían utilizar la vía de "salvamento", y los linfocitos B no podían sobrevivir más de 1 a 2 semanas porque no estaban inmortalizadas, por lo tanto sólo crecían los híbridos. Avances más recientes en esta técnica básica incluyen el uso de líneas de mieloma que no producen su propia Ig y el uso de polietilenglicol en lugar del virus Sendai como agente de fusión para simplificar la técnica. (1)

Las células fusionadas se cultivan a una concentración a la cual se espera que cada pocillo de cultivo contenga sólo una célula de hibridoma. Se analiza el sobrenadante del cultivo de cada pocillo en el que se detecta crecimiento celular para comprobar la presencia de anticuerpos que reaccionan frente al antígeno utilizado en la inmunización. El método de detección depende del antígeno usado. Para los antígenos solubles, la técnica habitual es el Radioinmunoensayo o RIA y el Inmunoensayo ligado a enzimas o ELISA; y para los antígenos de superficie celular pueden utilizarse una gran variedad de análisis para unir anticuerpos a las células viables (técnicas que se discutirán posteriormente en el presente capítulo). Una vez que se identifican los pocillos positivos (es decir, pocillo que contiene los hibridomas productores del anticuerpo deseado), se clonan las células en agar semisólido o por dilución límite, y las clonas productoras del anticuerpo se aíslan nuevamente mediante otro método de detección. Estos hibridomas clonados producen anticuerpos monoclonales con la especificidad deseada. Los hibridomas se pueden hacer crecer en grandes volúmenes como tumores ascíticos en ratones singénicos para producir grandes cantidades de anticuerpos monoclonales.

Dos características de esta hibridación celular somática la hacen extremadamente valiosa. En primer lugar, es el mejor método para producir un anticuerpo monoclonal frente a un determinante antigénico conocido. En segundo lugar, se puede utilizar para identificar antígenos desconocidos presentes en una mezcla debido a que cada hibridoma es específico para solo un determinante antigénico. Por ejemplo, si se unen a la superficie de una determinada célula, cada clona del hibridoma secretará un anticuerpo específico frente a sólo un determinante antigénico de esa superficie. Estos anticuerpos monoclonales se pueden utilizar para purificar diferentes moléculas de la superficie celular (por medio de la inmunoprecipitación, por ejemplo), algunas de las cuales pueden ser moléculas conocidas y

otras que pudieron no haber sido identificadas previamente. Algunas de las aplicaciones más comunes de los hibridomas y de los anticuerpos monoclonales son las siguientes:

- *Identificación de los marcadores fenotípicos únicos de un tipo celular particular.* La base para la clasificación moderna de los linfocitos y de los fagocitos mononucleares es la unión de anticuerpos monoclonales específicos de población. Estos se han utilizado para definir los “grupos de diferenciación” o CD, de varios tipos celulares (marcadores de membrana).
- *Inmunodiagnóstico.* El diagnóstico de muchas enfermedades infecciosas y sistémicas se basa en la detección de antígenos específicos y/o anticuerpos en la circulación o en los tejidos, utilizando anticuerpos monoclonales en los inmunoanálisis.
- *Diagnóstico y tratamiento de tumores.* Los anticuerpos monoclonales específicos de tumores se usan para la detección de estos tumores mediante técnicas de imagen y para inmunoterapia de los tumores *in vivo*.
- *Análisis funcional de la superficie celular y moléculas secretadas.* En investigación inmunológica, los anticuerpos monoclonales que se unen a moléculas de superficie celular y estimulan o inhiben ciertas funciones celulares, son herramientas de gran valor para definir las funciones de las moléculas de superficie, incluidos los receptores de los antígenos. Los anticuerpos que neutralizan las citocinas, se utilizan de forma rutinaria para detectar la presencia y funciones de estas hormonas proteicas *in vitro* e *in vivo*.

En el momento actual, los hibridomas se suelen producir fusionando mielomas de ratón sensibles al medio HAT con linfocitos B de ratón, rata o hámsters. El mismo principio se usa para generar hibridomas de linfocitos T de ratón, fusionando linfocitos T con una línea tumoral derivada de linfocitos T sensibles al medio HAT. Se están realizando intentos para generar anticuerpos monoclonales humanos, fundamentalmente para su administración a pacientes, desarrollando líneas de mieloma humano como parejas para la fusión (una regla general es que la estabilidad de los híbridos es baja si se fusionan células de especies alejadas en la escala evolutiva, y esto podría explicar por qué los linfocitos B humanos no son eficaces para formar hibridomas con líneas de mieloma de ratón). (1)

5.2.2- Marcadores de membrana.

Con la generación de los anticuerpos monoclonales, fue posible desarrollar una serie de técnicas y metodologías capaces de identificar líneas celulares específicas de las diferentes clases de Leucemias, así como para las demás aplicaciones que se mencionaron anteriormente. Identificar el fenotipo de las células que se desarrollan en los diferentes tipos de Leucemias, fue un paso que sin lugar a dudas, se realizó a la par que el desarrollo de los anticuerpos monoclonales, ya que como se discutió anteriormente, es necesario la presencia del antígeno puro para generar la activación de linfocitos B capaces de reconocer al antígeno que iniciará la respuesta inmune en el animal estimulado. Los inicios de la identificación de marcadores específicos comenzaron con la producción de anticuerpos que reconocieran selectivamente diferentes subpoblaciones. Esto se hizo al principio produciendo "aloanticuerpos" (es decir, anticuerpos que pueden reconocer formas alélicas de proteínas de la superficie celular) inmunizando cepas de ratones con linfocitos de otras cepas. Esta técnicas tuvieron un gran éxito y condujeron al desarrollo de anticuerpos capaces de reaccionar con linfocitos T murinas (anticuerpos anti-Thy-1) e incluso contra subpoblaciones funcionalmente diferentes de linfocitos T (anticuerpos anti-Lyt-1 y anti-Lyt-2). Las limitaciones de estos inicios, sin embargo, son obvias ya que sólo es útil para proteínas de superficie que existan en formas alélicas. Otros abordajes que tuvieron algún éxito, pero que adolecían de importantes limitaciones, incluían la búsqueda de autoanticuerpos específicos frente a los linfocitos en pacientes con enfermedades autoinmunitarias. La llegada de la tecnología de los hibridomas dio un gran empuje a dichos análisis, y el desarrollo más particular fue la producción de anticuerpos monoclonales que reaccionaban específica y selectivamente con poblaciones definidas de linfocitos y de otros leucocitos, primero humanos y posteriormente de otras muchas especies. (1)

5.2.2.1- Marcadores fenotípicos de las diferentes clases de Leucemias.

Las moléculas de superficie celular reconocidas por anticuerpos monoclonales se llaman antígenos, ya que se pueden generar anticuerpos contra ellos; o también son denominados marcadores, ya que son útiles para identificar y discriminar diferentes poblaciones celulares (marcas). Estos marcadores pueden agruparse en varias categorías: algunas son específicas para células de una determinada estirpe o línea de maduración, y la expresión de otras varía según el estado de activación o diferenciación de las propias células. Análisis bioquímicos de las proteínas de la superficie celular reconocidas por diferentes anticuerpos monoclonales en la misma especie o incluso en especies diferentes, demostraron que en muchos casos estos anticuerpos eran específicos para las mismas proteínas celulares conservadas a lo largo de la evolución. Surgió una gran confusión porque estos marcadores de superficie fueron denominados en un principio según los anticuerpos frente a los cuales reaccionaban. Para resolver este dilema, se adoptó un sistema de nomenclatura uniforme, inicialmente aplicado a los leucocitos humanos. Según este sistema, un marcador de superficie que identifica una estirpe o una fase determinada de diferenciación y que tiene una estructura definida y reconocida por un grupo de anticuerpos monoclonales, se le denomina miembro de un *grupo de diferenciación (cluster of differentiation CD* en inglés). De este modo, todos los antígenos leucocitarios de superficie cuyas estructuras están definidas tienen una designación CD (p. ej. CD1, CD2).

Aunque esta nomenclatura se utilizó originalmente para antígenos leucocitarios humanos, ahora es normal referirse a marcadores homólogos en otras especies y células diferentes de los leucocitos con la misma designación CD. Las dos funciones más frecuentes atribuidas a distintos antígenos CD son: 1) promover las interacciones y la adhesión celular y, 2) transmitir las señales que conducen a la activación de las diferentes clases de células leucocitarias. (1)

De manera muy breve, y en base a las técnicas que a continuación se describirán, se muestra solamente una pequeña representación de los marcadores fenotípicos que se han logrado identificar para cada clase de leucemia y dichos marcadores forman parte de la designación de los CD's (aunque cabe aclarar que las moléculas CD no son los únicos

marcadores que expresan las células, la existencia de otro tipo de moléculas fenotípicas se expresará en el siguiente capítulo):

5.2.2.1.1- Leucemia Linfoblástica Aguda.

Las células leucémicas de esta clase, en sus diferentes subtipos que existen, expresan **CD10** (llamado también **CALLA**; encefalinasa o endopeptidasa neutral, la cual es una metalopeptidasa dependiente de Zinc y puede actuar para limitar la actividad de las hormonas peptídicas. Posiblemente tenga un papel en el desarrollo de los linfocitos B) y **CD19** (también llamado **B4**, participa en la regulación de la activación de 1 linfocito B y en la proliferación en el desarrollo de la respuesta inmune humoral; forma parte del complejo de la señal de transducción que incluye a **TAPA-1 -CD81-, CD21 y Leu-13**). (27, 38)

5.2.2.1.2- Leucemia Linfocítica Crónica.

En esta clase de leucemia las células cancerígenas expresan **CD20** (llamada también **B1 o Bp35**, actúa posiblemente en la activación, regulación y proliferación de los linfocitos B y en el canal iónico de Calcio), **CD22** (Regula la adhesión a eritrocitos, linfocitos T y B, monocitos y neutrófilos), **CD5** (conocido también como **Leu-1 y Ly-1**, posiblemente actúe como molécula de adhesión, pero los linfocitos B **CD5+** se implican en enfermedades autoinmunes), **CD19** y **CD23** (Es un receptor de la Fce de baja afinidad y se une al **CD21** y tiene un papel en la activación del linfocito B, puede prevenir la apoptosis del centro germinal de los linfocitos B). (27)

5.2.2.1.3- Leucemia de las Células Pilosas.

Expresan **CD11c** (otros nombres **p150,95** o cadena α del **CR4**, es una molécula de adhesión, posiblemente interactúa en fagocitosis de partículas recubiertas por **iC3b - opsonizadas**), **CD22** y **CD25** (Forma complejos con el receptor de **IL-2 β yc**, de alta afinidad e induce la activación de linfocitos T y B, timocitos, células NK y macrófagos). (27)

5.2.2.1.4- Leucemia Mieloblástica Aguda.

Los blastos mieloides expresan combinaciones de **CD34** (marcador en etapas muy tempranas de precursores de células formadoras de colonias en médula ósea), **CD13** (es una aminopeptidasa, posiblemente participa durante el estallido respiratorio), **CD117** (llamado también c-Kit o SCF-R –receptor del factor de la célula madre –; participa como señal de transducción, en la diferenciación celular y en la regulación de la adhesión), **CD14** (llamado Mo2, es el receptor para LPS), **CD15** (llamado Lewis^x, en forma sialil es ligando de selectina) y **CD42b** (molécula de adhesión plaquetaria e identifica la línea megacariocítica). (16, 27)

5.2.2.1.5- Leucemia Mielocítica Crónica.

Alrededor del 70% de los casos en transformación blástica tienen un fenotipo mieloblástico: **CD13** y **CD33** (se desconoce su función), el 20% tienen fenotipo de linfoblasto: **CD10**, **CD19** y **CD22** y el 10% tiene un fenotipo mezclado. (27)

De esta manera, tenemos la generación de anticuerpos monoclonales contra cada uno de los marcadores de superficie (los CD's y muchos otros más) que se han logrado identificar y que permiten la diferenciación de cada una de las clases de Leucemias que existen. El principio entonces es muy sencillo, se genera en condiciones *in vitro* la reacción antígeno – anticuerpo, la cual se hace evidente de diversas formas, y a continuación, se describirán diferentes técnicas que emplean como principio básico la generación de la reacción antígeno – anticuerpo.

5.3- Empleo de la Inmunocitoquímica

Por definición, se entiende como Inmunocitoquímica a la demostración de antígenos en secciones de tejido o extensiones por el uso de interacciones inmunológicas específicas (anticuerpo – antígeno), culminando en la adhesión de un marcador visible al antígeno. El marcador visual puede ser un colorante fluorescente, metal coloidal, hapteno, marcador radiactivo o más comúnmente una enzima para la microscopía de luz. (31)

Y para comenzar con los marcadores más usados en Inmunocitoquímica, se describen a continuación los métodos que se basan en la interacción Biotina – Avidina.

5.3.1- Métodos Biotina – Avidina.

La Biotina, un metabolito de muchos tipos de microorganismos, es una vitamina hidrosoluble que forma la coenzima o el grupo prostético de diferentes enzimas que transfieren grupos carboxílicos. La Avidina es una glicoproteína básica (peso molecular 68 KDa) del huevo blanco. Cada molécula consta de cuatro subunidades idénticas, cada una capaz de unirse a una molécula de Biotina. Dicha unión tiene una alta afinidad, se cree que la unión es no covalente, por lo que la unión ocurre rápidamente y es reversible solamente en condiciones extremas, como una acidez extrema y una solución acuosa concentrada de guanidina a 6 M. La Biotina puede ser conjugada a una gran variedad de moléculas biológicas, incluyendo a los anticuerpos, y muchas moléculas de Biotina pueden ser adheridas a una sola molécula proteínica. La proteína **biotinilada** (término que describe la unión de la Biotina con la molécula de proteína) puede entonces unirse a más de una molécula de avidina (31, 32). El proceso de biotinización implica a grandes rasgos los siguientes pasos: a) *Equilibrar la proteína (molécula de IgG) y la enzima en un buffer de bicarbonato usando la columna de Sephadex G-25 o por diálisis;* b) *Ajustar la concentración de cada proteína a 1 mg/ml en el buffer de bicarbonato;* c) *Disolver 1 mg de éster de Biotina en 1 ml de DMSO justo antes de usar;* d) *Adicionar 75 µl de la solución de Biotina por cada 1ml de la solución protéica;* e) *Mezclar inmediatamente y rotar por 4 h a temperatura ambiente y* f) *Reequilibrar la columna con 0.1 M de buffer Tris-HCl, pH 7.4, y un buffer de intercambio de las dos muestras en esta columna (o dializar contra este*

buffer). La molécula de Biotina es lo suficientemente pequeña como para no interferir con la actividad biológica de la macromolécula que marca, y su reactividad con la avidina es invariable. Los primeros métodos que hicieron el uso de la Biotina y la avidina para la detección inmunohistoquímica de antígenos (Guesdon, Ternynck y Avrameas, 1979) consistieron en tres o cuatro pasos, separados por lavadas en PBS:

- Aplicación de un antisuero primario (por ejemplo, un anticuerpo de conejo para el antígeno en el tejido).
- Aplicación de un antisuero secundario biotilado (por ejemplo, una IgG biotilada de cabra anti-conejo).
- Aplicación de una solución de avidina que ha sido conjugada covalentemente con un fluorocromo o una enzima histoquímicamente demostrable como la peroxidasa de rábano picante. La actividad de la enzima se detecta por la capacidad de utilizar el peróxido de hidrógeno y evidenciar dicha actividad con una reacción de oxidoreducción de un agente químico colorimétrico (tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobenzidina -DAB-).

5.3.1.1- Conjugación de la Peroxidasa a anticuerpos.

En este momento es importante mencionar uno de los métodos más usados para *conjuguar la peroxidasa de rábano con los anticuerpos*. Dicho método emplea al reactivo de unión cruzada heterobifuncional denominado *N-succinimidil-3-(2-piridiltio) propionato* (conocido como SPDP). Este reactivo puede ser copulado tanto a anticuerpos y enzimas a través de grupos amino libres en las proteínas. Los grupos resultantes anticuerpo - piridiltioles pueden ser reducidos a grupos tioles y los puentes disulfuro unidos a los grupos enzima - piridiltiol con la liberación de la 2-piridinetiona.

A continuación se describe el método para realizar la conjugación usando SPDP. (31)

- Disolver 3 mg de SPDP en 0.3 ml de metanol. Esta solución debe ser al instante de usarse.

Realizar los procedimientos A y B al mismo tiempo.

A

- Adicionar 50 μ l de una solución SPDP a la peroxidasa de rábano (a una concentración de 1 mg/ml en buffer acoplante (0.2 M de fosfatos-salino, pH 7.5)
- Rotar cuidadosamente por 1 h a temperatura ambiente.
- Separar la enzima marcada en una columna de intercambio-buffer Sephadex G-25 equilibrada con buffer acoplante.

B

- Adicionar 8 μ l de solución SPDP al anticuerpos (1 mg en buffer acoplante).
- Rotar por 1 h a temperatura ambiente.
- Separar el anticuerpo marcado en una columna de intercambio-buffer Sephadex G-25 equilibrada con buffer acoplante.
- Medir el volumen de la solución de anticuerpo y adicionar dithiothreitol 1 M a una concentración final de 50 mM.
- Incubar a temperatura ambiente por 15 minutos.
- Requilar una de las columnas Sephadex G-25 con buffer acoplante.
- Remover el dithiothreitol al pasarlo bajo la columna de intercambio-buffer Sephadex equilibrado con el buffer acoplante.
- Mezclar la enzima marcada con el anticuerpo marcado y reducido.
- Rotar cuidadosamente por 5 – 8 h.
- Medir el volumen y alquilar cualquier grupo tiol remanente al adicionar iodoacetamida a una concentración final de 30 mM.
- Incubar a temperatura ambiente por 15 min.
- Separar la proteína pasándola bajo la columna de intercambio-buffer Sephadex en buffer acoplante. Almacenar a 4°C con albúmina sérica bovina 1% p/v.

5.3.1.2- Complejo Avidina-Biotina.

Se logró una mayor sensibilidad al usar un agente de detección preparado de manera reciente denomina el **complejo avidina-biotina (ABC)**. Este complejo se realiza al mezclar una solución de avidina con una de la enzima peroxidasa de rábano biotinilada (método introducido por Hsu *et al.*, 1981), este complejo es una enorme molécula de líneas cruzadas que contiene mucho más de tres moléculas de peroxidasa de rábano por un sitio libre de unión a la Biotina (32). Para realizar el método ABC se requiere PBS, los antisueros primario y secundario biotinilado, solución de avidina [10 µg/ml], solución de peroxidasa de rábano biotinilado [2.5 µg/ml], el reactivo ABC que resulta de la combinación de la avidina y la peroxidasa biotinilada, reactivos para la demostración de la actividad peroxidasa (método DAB-H₂ O₂) y un colorante capaz de contrateñir. El procedimiento es como sigue:

- Incubar la preparación en el adecuado antisuero primario diluido. El intervalo de dilución puede variar entre 1: 200 y 1: 6400. Se prefieren incubaciones prolongadas a 4°C que incubaciones cortas a altas temperaturas.
- Lavar en 3 cambios de PBS.
- Incubar en el antisuero secundario biotinilado. Una dilución 1:10 a 1:40, por 30-60 minutos a temperatura ambiente es usual, aunque se puede hacer a 4°C de 12 a 48 horas.
- Lavar en 3 cambios de PBS. De 15 – 20 minutos antes de mover las secciones fuera del último lavado, hacer la solución de trabajo ABC.
- Incubar las secciones en la solución de trabajo ABC por 60 minutos a temperatura ambiente.
- Demostrar la actividad peroxidasa por el método DAB- H₂ O₂.
- Lavar en agua y contrateñir.

Lo que se mostró anteriormente, tiene aplicación en tejidos, en la inmunocitoquímica se emplean las células, como es el caso en aquellas que aparecen en las biopsias de médula ósea, y en lugar de antisueros se emplean anticuerpos monoclonales dirigidos a

marcadores de membrana específicos de las diferentes clases de leucemia, ejemplos claros se muestran en la demostración de marcadores en células de médula ósea tratadas con resina de metil metacriato modificada, como el CD20, la transferasa de desoxinucleótidos terminales (Tdt) y la molécula MIB-1.

Sin embargo, la avidina tiene dos desventajas diferentes cuando se usa en los sistemas de detección inmunocitoquímicos. La avidina tiene un punto isoeléctrico alto, de aproximadamente de 10 y por lo tanto, está cargada positivamente a un pH neutro. Como consecuencia, se une a estructuras cargadas negativamente no específicas como los núcleos. La segunda desventaja es que la avidina es una glicoproteína y reacciona con moléculas como las lectinas a través de los carbohidratos.

Estos dos problemas se resuelven con la sustitución de la avidina por la *estreptavidina*. La estreptavidina (PM 60Kda) es una proteína aislada de la bacteria *Streptomyces avidinii*, y como la avidina, tiene 4 sitios de unión altamente afines a la Biotina. La estreptavidina tiene un punto isoeléctrico cercano al pH neutro, y por lo tanto, posee pocos grupos cargados fuertemente cerca del pH neutro en el cual se trabaja en el sistema de detección inmunocitoquímico. Además la estreptavidina no es una glicoproteína y por lo tanto, no se une a las lectinas y estas propiedades la hacen más deseable que la avidina. Lo más sofisticado y extensión sensible de la técnica de estreptavidina-biotina emplea complejos preformados. La estreptavidina y la peroxidasa de rábano biotinilada simplemente son mezclados a las concentraciones apropiadas por lo menos 30 minutos a temperatura ambiente para formar el complejo. El complejo preformado es entonces adherido al anticuerpo biotinilado. Un control cuidadoso estequiométrico garantiza que algunos sitios de unión permanezcan libres para unirse con el anticuerpo biotinilado. Esto permite que el complejo pre-formado se una y provea una muy alta señalización al sitio de unión al antígeno. El inconveniente principal es que la estreptavidina es aproximadamente 10 veces más cara que la avidina.

5.3.1.3- Amplificación de la señalización con Tiramida.

El uso de la Tiramida biotilada para amplificar las reacciones inmunocitoquímicas en secciones de tejidos fue descrito primero por Adams *et al.* (1992). La técnica requiere un apropiado procedimiento de pre-tratamiento y una óptima recuperación antigénica, seguido de un método ABC convencional. Después de una capa inicial de Estreptavidina/Peroxidasa de rábano, el paso de la Tiramida biotilada se lleva a cabo. La Peroxidasa de rábano en presencia de peróxido de hidrógeno cataliza la formación del reactivo de la Tiramida biotilada. Esta tiramida biotilada se une covalentemente a proteínas vía electrónica rica en residuos de aminoácidos como el Triptófano y la Tirosina, resultando en la deposición de la Biotina al sitio de reacción. La deposición de la Biotina se restringe al sitio de reacción de la peroxidasa de rábano (en la forma EstrABC/PR) es solamente presente en el sitio antigénico. La subsecuente aplicación de estreptavidina marcada se une a la Biotina depositada nuevamente. La estreptavidina puede ser marcada con una enzima (ejemplo la peroxidasa) o con fluoró cromos apropiados. Si la enzima que marcó a la estreptavidina es usada, la reacción puede ser visualizada con el cromógeno deseado (ejemplo diaminobenzidina). Esta técnica ha sido usada tanto para Inmunocitoquímica como para la detección de sondas por hibridización *in situ*, y representa un avance significativo en la detección de antígenos. (27)

Dentro de las ventajas que proporciona esta técnica tenemos que permite el uso de anticuerpos primarios diluidos de manera considerada; permite el empleo de periodos cortos de incubación; provee la amplificación de señales o marcadores débiles como el **CD5**, **CD23** y la **Ciclina D1** y permite la demostración de anticuerpos que previamente no reaccionaron en las secciones con parafina como en el caso del **CD2**, **CD4** y el **CD10**.

Como desventajas tenemos que se incrementa el número de pasos; puede tender a altos niveles de retroceso – especialmente en tejidos ricos en Biotina endógena y además es un procedimiento caro.

A continuación se describe la preparación de la Tiramida biotilada:

- Solución Stock: Sulfó-NSH-LC de Biotina (100 mg)
40 ml de buffer de boratos a pH 8.0
Hidrocloruro de Tiramida (30 mg)

Mezclar cuidadosamente a temperatura ambiente hasta que la solución esté completamente disuelta. Filtrar a través de un filtro de membrana de 0.45 μm

- Solución stock (25 μl)
0.05 M de TBS pH 7.6 (1ml)
Alicuotar y almacenar a -20°C

Permita que se descongele. Inmediatamente antes de usar adicione 4 μl de peróxido de hidrógeno por 1 ml de alicuota. (31)

5.3.2- Técnica de la Fosfatasa alcalina – anti Fosfatasa alcalina (APAAP).

La técnica de APAAP es un método indirecto el cual utiliza un complejo inmune cíclico enzima anti-enzima compuesto de 3 moléculas de enzimas (fosfatasa alcalina) y dos moléculas de anticuerpos. La técnica puede ser visualizada al usar un colorante azul (azul rápido BBN) o un colorante rojo (rojo rápido TR). La técnica APAAP puede ser usada como una alternativa a las técnicas de peroxidasa y es particularmente útil para las técnicas de doble marcaje y para la demostración antigénica en extensiones ricas en peroxidasa endógena activa, como en muestras de sangre periférica y aspirado de médula ósea (27). Para realizar la conjugación de anticuerpos con la fosfatasa alcalina se consideran los siguientes pasos:

(Si la fosfatasa alcalina se suministró como un precipitado de sulfato de amonio, debe ser removida la sal primero por diálisis)

- Colocar 5 mg de fosfatasa alcalina en un tubo prueba, centrifugar y desechar sobrenadante.
- Adicionar 2 mg de la fracción IgG del suero (concentración mínima inicial de 2 mg/ml en PBS) a la enzima unida.
- Dializar toda la noche a 4°C contra PBS.
- Ajustar a 1.5 ml con PBS.
- Adicionar 10 μl de glutaraldehído al 25% v/v. Mezclar y dejar reposar por 2 h a temperatura ambiente.
- Dializar exhaustivamente contra PBS; 5 cambios de un litro a 4°C .

- Dializar por 8 h contra dos cambios de buffer Tris – HCl 0.1M pH 7.4.
- Ajustar a un volumen de 4 ml con el buffer Tris – HCl que contenga albúmina sérica bovina al 1% y azida de sodio al 0.02%.

5.4- Empleo de Marcadores Fluorescentes para Anticuerpos y de Sondas Moleculares con aplicación en Citometría de Flujo.

Los fluorocromos son esencialmente colorantes los cuales aceptan energía de luz a una longitud de onda dada y la reemiten a una longitud de onda más alta. Estos dos procesos son llamados *excitación* y *emisión*. El proceso de emisión que sigue es extremadamente rápido, comúnmente en el orden de los nano segundos (10^{-9} seg.), y es conocido como **fluorescencia**.

Las dos fuentes de excitación más comunes en Citometría de flujo actualmente son el láser de argón iónico a 488 nm y el láser de helio – neón a 633nm, y cualquier reactivo fluorocromo usado en Citometría de flujo debe tener longitudes de onda de excitación que cercanamente coincida con alguno de estos láseres. Citómetros de flujo más sofisticados pueden también usar láser UV. Por el empleo de una serie de filtros, y dependiendo del arreglo de los láseres colocados, los citómetros de flujo modernos pueden detectar las emisiones de luz de varios diferentes tipos de fluorocromos.

Así pues es necesario mencionar una definición de **Citometría de flujo** y esto es una *medición multiparamétrica cuantitativa de las características químicas y físicas de células en una suspensión líquida*. Un *citómetro de flujo* es un instrumento que detecta y mide la cantidad de colorante fluorescente sobre partículas, y básicamente consiste de uno o más láseres para suministrar energía de excitación, y una serie de filtros y detectores para medir las emisiones fluorescentes resultantes. (I, II)

Estos conceptos son útiles para su aplicación en el marcaje de superficie y la separación celular, de la siguiente forma: Los anticuerpos se utilizan muy a menudo para caracterizar, identificar y separar poblaciones celulares. En estos métodos, el anticuerpo puede marcarse con fluorescencia. En el caso de los marcadores fluorescentes, la cantidad de anticuerpo unido a cada célula individual de una población, se mide haciendo pasar a través de un fluorímetro una a una las células en suspensión. Esta capacidad de analizar células

individuales compensa el hecho de que la intensidad de fluorescencia es siempre una cantidad arbitraria y que, al contrario que la radiactividad y la absorbancia, no se puede relacionar con un número absoluto de moléculas, excepto por comparación con estándares conocidos. Las células que fluyen pueden ser separadas mediante campos electromagnéticos cuya dirección y fuerza varían según la intensidad medida de la señal fluorescente, permitiendo de este modo separar las poblaciones celulares según el anticuerpo unido a su superficie. El instrumento que realiza esta tarea se llama *clasificador celular mediante Citometría de flujo (FACS, del inglés, fluorescence-activated cell sorter)*. Los FACS modernos permiten de forma rutinaria detectar 3 o más señales de fluorescencia distintas, lo que hace posible el análisis o separación de células según cualquier combinación especificada de patrones de anticuerpos de superficie. Puede hacerse una forma de separación más rápida pero menos rigurosa, permitiendo que las células se unan a anticuerpos unidos a su vez a placas ("panning") o esferas magnéticas. (1, 6, 11)

Este es el fundamento básico del funcionamiento de la Citometría de flujo, lo siguiente es explicar características más detalladas de las partes que constituyen a esta técnica, como es el caso que a continuación se explica con los marcadores fluorescentes.

Para el diagnóstico y aplicaciones en investigación en muchos centros internacionales, se usan citómetros de 3 colores (equipados con argón iónico) y de 4 colores (equipados con argón iónico y helio - neón). Las investigaciones a 3 colores usan anticuerpos acoplados a los fluorocromos isotiocianato de fluoresceína (FITC), R-ficoeritrina (R-PE), y R-PE:cianina-5 (PE: Cy5), con un cuarto fluorocromo conjugado - alofocianina (APC), usado en investigaciones especiales de 4 colores tales como en la detección de la enfermedad residual y en análisis de raros eventos. (27)

La R-PE se extrae de una alga marina roja *Corallina officinalis* y la APC se extrae de la cianobacteria *Anabaena flos-aquae* (purificándola por comatografías de intercambio iónico y gel filtración). El R-PE: Cy5 se produce químicamente acoplado el colorante cianina "Cy5:18" a la R-PE. El FITC se obtiene comercialmente.

5.4.1- FITC.

Es un colorante de bajo peso molecular amarillo-verde el cual se acopla a proteínas por medio de una reacción con grupos Aminos primarios a elevados pH. FITC se excita a 488nm, cercano a su máximo de absorción a 494 nm, y produce una emisión de fluorescencia máxima alrededor de los 520 nm. Debido a su gran diferencia en peso molecular entre el FITC (389 Da) y las inmunoglobulinas (150 Kda), un procedimiento simple de filtración en gel es suficiente para separar el colorante libre (el que no se acopló) del anticuerpo marcado con el FITC. Recientemente se ha desarrollado un colorante más brillante y fotosensible alternativo al FITC, llamado Alexa®488, con excitación similar (494 nm) y emisión (519 nm) máxima al FITC. Se ha visto que este colorante es 6 veces más brillante que el FITC en algunos casos.

5.4.2- Ficobiliproteínas.

Las ficobiliproteínas son pigmentos "antena" usados por algunas clases de plantas para incrementar la eficiencia de la fotosíntesis al coleccionar energía de la luz solar a longitudes de onda sobre la cual la clorofila absorbe pobremente.

La clorofila absorbe a lo más entre 430-440 nm y otra vez a 670 nm. Las ficobiliproteínas demuestran una absorción máxima entre 470 nm y 650 nm, y transmiten la energía de luz absorbida a estas longitudes de onda a la clorofila a 670 nm.

Este arreglo de pigmentos antena ficobiliproteínas y la clorofila se encuentran en los ficobilisomas y permite que la energía de luz cruce mucho del espectro visible para ser usado en la fotosíntesis. Esto es particularmente importante en el medio marino donde la transmitancia máxima del agua marina es aproximadamente de 500 nm, fuera del intervalo de longitudes de onda óptimas para la clorofila.

Las ficobiliproteínas son relativamente grandes, y contienen múltiples grupos prostéticos cromóforos, los cuales son los responsables de las propiedades fluorescentes de estas proteínas, y generalmente resultan en fluorocromos de muy alta eficiencia, comúnmente excede en el 90% de la energía de luz absorbida transferida a la clorofila. (27)

5.4.3- R-Ficoeritrina.

R-PE – R simboliza su origen de alga roja – es una proteína colorida anaranjado rojo brillante, con un peso molecular de 250 kDa y contiene 34 grupos prostéticos cromóforos. Con una absorción máxima a 492 y 565 nm y es excitable a los 488nm con láser argón iónico, y tiene una emisión máxima cerca de los 578 nm. Durante su purificación, solamente la mayor proteína contaminante es la R-ficocianina, la cual tiene propiedades cromatográficas disímiles a la R-PE. (27, 32)

5.4.4- Aloficocianina.

APC es una proteína de color azul-turquesa de peso molecular de 110 kDa y contiene 6 grupos prostéticos cromóforos. Su absorción máxima es de 650 nm, y su emisión máxima es de 660 nm. APC se excita a los 633 nm con el láser helio – neón. Como en el caso de la R-PE, la principal proteína contaminante es la C-ficocianina, junto con la clorofila; la C-ficocianina tiene propiedades cromatográficas similares a APC, con lo que complica significativamente el proceso de purificación. (27, 32)

5.4.5- R-PE: Cy5.

PE: Cy5 es un colorante tandem la cual consiste de la R-PE covalentemente acoplado al colorante sintético sulfoindocianina Cianina-5.18 (abreviado como Cy5). Con propiedades de absorción y emisión similares a la APC, Cy5 absorbe la energía de luz emitida por la R-PE después de la excitación a los 488 nm con láser argón iónico, y reemite a 677 nm, un *cambio de Stock* (es la diferencia en longitud de onda entre la excitación y emisión máxima de un fluorocromo) cerca de 180 nm. La eficiencia de marcaje óptimo para usarse en Citometría de flujo está entre 5 a 8 moléculas de Cy5 por molécula de ficoeritrina. Una relación por debajo de 4:1, hay insuficiencia en Cy5 para absorber todas las emisiones fotónicas de la ficoeritrina, por lo que la energía de luz a los 578 nm comienza a escapar del complejo. Esta fuga de emisión puede comprometer el rendimiento de un reactivo marcado con PE: Cy5 si se usa en combinación con un reactivo marcado con ficoeritrina.

La siguiente tabla muestra las características de fluorocromos usados en Citometría de flujo, en grupos de excitación de longitud de onda.

Tabla 5.2 Características de fluorocromos usados en Citometría de flujo (27)

<i>sonda</i>	<i>EX (nm)</i>	<i>EM (nm)</i>	<i>pm (DA)</i>	<i>notas</i>
<i>REACTIVOS Y SONDAS CONJUGADAS</i>				
Hidroxycumarina	325	386	331	Succinimidil éster
Aminocumarina	350	445	330	Succinimidil éster
Metoxicumarina	360	410	317	Succinimidil éster
Azul Cascada	375; 400	423	596	Hidratada
Amarillo Lucifer	425	528		
NBD	466	539	294	NBD-X
R-Ficoeritrina	480; 565	578	240,000	
Conjugados PE-Cy5	480; 565; 650	670		Aka Cicromo, R670, Tri-Color, Rojo quantum
Conjugados PE-Cy7	480; 565; 743	767		
Rojo 613	480; 565	613		PE-Rojo Texas
Fluoresceína	495	519	389	FITC; pH sensible
BODIPY-FL	503	512		
Cy3	512; 552	565; 615		
TRITC	547	572	444	TRITC
X-Rodamina	570	576	548	XRITC
Lisamina	570	590		
Rodamina B				
PerCP	490	675		Peridina clorofil proteína
Rojo Texas	589	615	625	Sulfonil cloruro
Cy5	625-650	670		
Cy7	743	767	1,001	
Alfofocianina	650	660	104,000	
TruRed	490; 675	695		Conjugado PerCP-Cy5.5
Conjugados APC-Cy7	650; 755	767		PharRed
<i>SONDAS DE ACIDOS NUCLEICOS</i>				
Hoechst 33342	343	483	616	Selectivo AT
DAPI	345	455		Selectivo AT
Hoechst 33258	345	478	624	Selectivo AT
Azul SYTOX	431	480	≈400	ADN
Cromomicina A3	445	575		Selectivo CG
Mithramicina	445	575		
YOYO-1	491	509	1270.65	
Verde SYTOX	504	523	≈600	ADN
Naranja SYTOX	547	570	≈500	ADN
Bromuro de etidio	493	620	394.31	
7-AAD	546	647		7-aminoactinomicina D, selectivo CG
Naranja de acridina	503	530/640		ADN/ARN
TOTO-1, TO-	509	533		Tinción vital,

PRO-1				TOTO: Dímero de cianina, TO-PRO: Monómero de cianina
Naranja de tiazol	510	530		
Yoduro de propidio	536	617	668.4	
TOTO-3, TO-PRO-3	642	661		
LDS 751	543; 590	712; 607	471.98	ADN (543ex/712em), ARN (590 ex/607em)
SONDAS DE FUNCIÓN CELULAR				
Indo-1	361/330	490/405	1,010	Éster AM. Bajo/alto Ca **
Fluo-3	506	526	855	Éster AM. pH>6
DCFH1	505	535	529	2'7'Diclorodihidro fluoresceína, forma oxidada
DHR	505	534	346	Dihidrorodamina 123, forma oxidada, catálisis ligera de oxidación
SNARF	548/579	587/635		pH 6/9
PROTEÍNAS FLUORESCENTES				
Y66F	360	508		
Y66H	360	442		
EBFP	380	440		Quantum alcanza 0.18
Wild Type	396; 475	508; 503		
GFPuv	385	508		
ECFP	434	477		Quantum alcanza 0.40
Y66W	436	485		
S65A	471	504		
S65C	479	507		
S65L	484	510		
EGFP	489	508		Quantum alcanza 0.60
EYFP	514	527		Quantum alcanza 0.61
DsRed	558	583		Quantum alcanza 0.29
OTRAS SONDAS				
Monoclorobimano	380	461	226	Sonda de Glutación
Calcéina	496	517	623	pH>5

Legendas: EX = pico de la longitud de onda de excitación; EM = pico de la longitud de onda de emisión; PM = Peso molecular.

5.4.6- Citómetro de Flujo.

Después de haber revisado los marcadores fluorescentes más usados en Citometría de flujo, es importante revisar cómo está constituido un citómetro de flujo y las propiedades que mide. Se puede realizar una analogía entre un citómetro de flujo y un microscopio para el mejor entendimiento del funcionamiento del citómetro. Muchos microscopios tienen los siguientes componentes:

- Una *fente de luz*. Un microscopio típico usa un foco para iluminar a las células. En el citómetro de flujo, la fuente de luz en ocasiones es un láser. Los láseres son usados porque proveen un haz de luz monocromática muy concentrada e intensa. El carácter monocromático de la luz es especialmente importante para hacer las mediciones fluorescentes.
- La *platina*. En un microscopio, la platina es movable para permitir el paso de las células en el campo visual de la lente de un objetivo. En el citómetro de flujo, las células están en una suspensión líquida. El líquido fluye en respuesta a una presión de aire, por delante una lente de un objetivo, por lo que lleva a las células al campo visual.
- Las *lentes*. Tanto en el microscopio como en el citómetro de flujo, las lentes colectan la luz de las células.
- Los *filtros*. Algunos microscopios tienen filtros para seleccionar aquellas características de la luz que sean las más importantes para el observador. Esto es particularmente cierto en los microscopios fluorescentes. En la fluorescencia, las moléculas de los colorantes son excitadas por la luz de una longitud de onda dada (o "color"), los cuales entonces producen una luz emitida a una longitud de onda mayor. Los filtros remueven la luz de excitación para dejar que la luz de emisión sea vista o medida.
- Los *detectores*. En un microscopio, el detector de la luz es uno mismo, el observador. El citómetro de flujo usa detectores de luz altamente sensibles llamados tubos fotomultiplicadores, o "PMT's". Los detectores deben ser capaces de medir los breves destellos de luz emitida de las células que se están moviendo a la hora de que pasan por el campo visual de la lente del objetivo a velocidades que rebasan varios miles de células por segundo. (21)

Muchos citómetro de flujo pueden medir dos tipos de luz de las células:

- *Dispersión de la luz* (del inglés Light Scatter).- La dispersión de la luz es la interacción de la luz y la materia. Todos los materiales, incluyendo las células, dispersarán la luz. (La dispersión de la luz nos permite ver los objetos) Está compuesta a grandes rasgos de la luz que se refleja y se refracta. La posición de la cual uno ve un objeto algunas veces determina lo que podamos decir de él. En el citómetro de flujo, los detectores de la dispersión de la luz están usualmente localizados en el lado opuesto al láser (relativo a la célula). Y a un lado del láser, en línea con la intersección flujo del líquido/haz del láser. Las mediciones hechas por estos detectores son llamadas dispersión de la luz delantera (del inglés Forward Light Scatter) y dispersión de la luz lateral (del inglés Side Light Scatter). La dispersión de la luz delantera provee cierta información en el tamaño relativo de células individuales, mientras que la dispersión de la luz lateral provee cierta información sobre la granularidad relativa de células individuales. Son usados en combinación para distinguir las diferentes y principales categorías de leucocitos en sangre completa de mamíferos, pero también son útiles en innumerables ensayos.
- *Fluorescencia*.- La fluorescencia, como ya se mencionó anteriormente, es la propiedad de una molécula de absorber luz de una longitud de onda particular y reemitirla a una longitud de onda mayor. El cambio de longitud de onda relata una pérdida de energía que se da en el proceso. Esta es una característica que hace a la fluorescencia extremadamente útil: los filtros pueden ser usados para excluir la luz de excitación de la luz del detector o del observador. Por lo que solamente la luz medida o vista se origina de las moléculas fluorescentes. La interferencia por dispersiones de luz anteriores en los detectores es extremadamente baja. Hay muchos marcadores fluorescentes, como ya se citó anteriormente, que son usados en Citometría de flujo. Estos se unen a una variedad de componentes citoquímicos, como los ácidos nucleicos, proteínas, receptores nucleares y citoplasmáticos y a marcadores específicos de superficie celular, entre otras más. Una propiedad importante de un marcador fluorescente lo cual determina su potencial para su uso en los ensayos de Citometría de flujo es la longitud de onda de excitación: se debe relacionar las longitudes de onda disponibles con el de la fuente de luz.

De forma descriptiva, un citómetro de flujo funciona de la siguiente manera: Un tanque en el fondo supe un buffer el cual lleva las células a través del instrumento, mientras un segundo tanque colecta todo el fluido de desecho. El propósito del fluido acarreador (usualmente llamado fluido de vaina, en inglés sheat fluid) es conducir la suspensión celular por fuera por lo que las células pasan en una sola fila a través del haz de láser. (19, 20, 22, 23)

El láser a la izquierda y enfrente, ilumina a las células que fluyen en forma ascendente del tubo de prueba con un haz azul. El dispersor de luz delantero se colecta por unos lentes en línea con el haz de láser (el haz de láser por sí mismo se bloquea por una pequeña barra opaca) y se refleja sobre un detector de luz. El dispersor de luz lateral y la fluorescencia se colectan por unos lentes colocados a un ángulo diestro al haz de láser. Este instrumento puede medir 3 colores de la fluorescencia en las regiones verde, anaranjado y rojo del espectro. Los colores son separados por filtros que tanto reflejan o transmiten solamente la longitud de onda deseada a los detectores apropiados. (21, 27)

Finalmente, todas las señales electrónicas de los detectores son pasadas a una computadora, la cual los registra y muestra los resultados. Debido a que todas las mediciones son hechas a cada célula en forma simultánea, las correlaciones entre ellas pueden ser determinadas. Y una medición puede ser usada para seleccionar un subtipo de células para estudiar otra medición. En esta forma, podemos examinar la fluorescencia verde solamente de grandes células (identificadas por un alto dispersor de luz delantero), por ejemplo. (21)

Como es de suponer, los anticuerpos monoclonales pueden marcarse con las sustancias fluorescentes y entonces realizar una inmunofenotipificación en base a la Citometría de flujo. En diversos estudio es importante realizar inmunofenotipificaciones para determinar el tipo celular con la que se está trabajando. Por ejemplo, en estudios para caracterizar células leucémicas CD3+ en muestras de pacientes con Leucemia Mielocítica Crónica, se basan en un análisis FACS, la cual consiste de los siguientes pasos:

- Separación de las células mononucleares de las muestras sanguíneas por medio de densidad centrifugación por Ficoll-Hypaque.
- Las poblaciones celulares resultantes se incuban por 10 minutos a 4°C con solución salina balanceada de Hanks (HBSS), conteniendo suero humano al 5% previo a la

adición de anticuerpos CD3+ antihumana marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) en una relación 1:50.

- Las células se incubaron a 4°C por otros 30 minutos y finalmente lavadas dos veces con HBSS/2% SFC; 1 µg/ml de yoduro de propidio se adicionó al segundo lavado para permitir la discriminación de células muertas antes del análisis.
- La adquisición y análisis de las células se realizan en un citómetro (FACSort) usando un software (LYSIS II de Becton Dickinson)

De este modo, podemos mostrar en las siguientes figuras, resultados de Citometría de flujo que caracterizan a las diferentes clases de Leucemias.

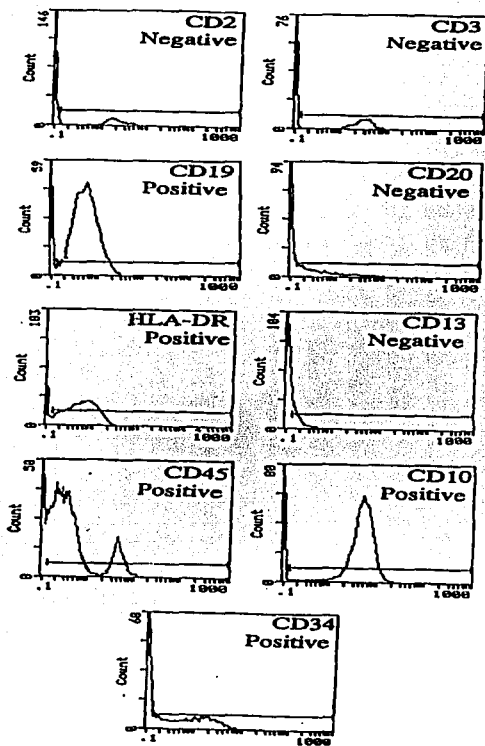


Figure 1. Pre-B cell acute lymphoblastic leukemia.

Figura 5.1 Se observan los resultados de marcadores de membrana característicos de la Leucemia Linfoblástica Aguda del tipo pre-B, en la cual claramente se evidencia la positividad a CD19, CD45, CD10 y a las moléculas de histocompatibilidad clase II (HLA-DR). En cambio, son negativas a CD34, CD2, CD3, CD13 y CD20. (//)

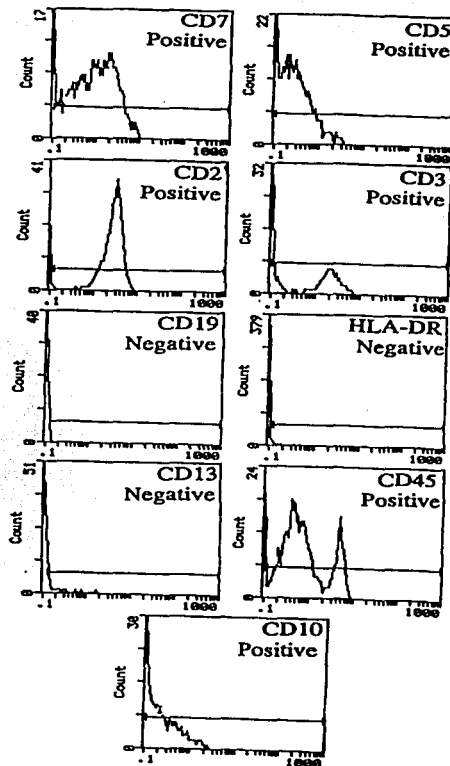


Figure 2. T cell acute lymphocytic leukemia (T-ALL).

Figura 5.2 Se observan los marcadores que dan positividad a la Leucemia Linfocítica Aguda de las células T, como son el CD10, CD45, CD2, CD3, CD5 y CD7. Las moléculas ausentes son CD13, CD19 y HLA-DR. (11)

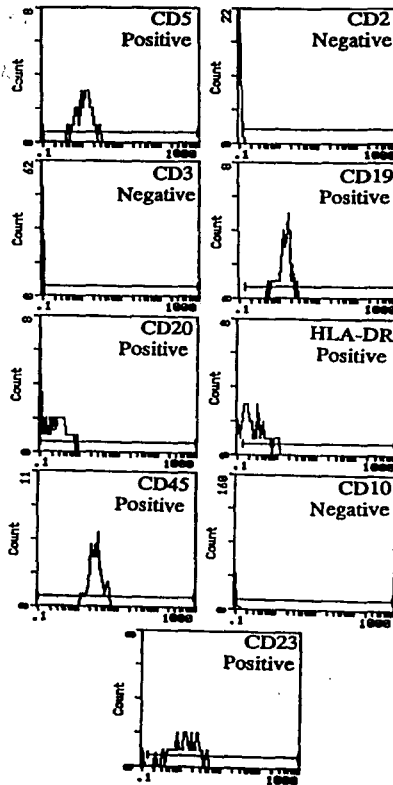


Figure 5. B cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL).

Figura 5.3 Los marcadores presentes en células características de la Leucemia Linfocítica Crónica de los linfocitos B son CD5, CD19, CD20, CD23, CD45 y HLA-DR. Carecen de CD2, CD3 y CD10. (11)

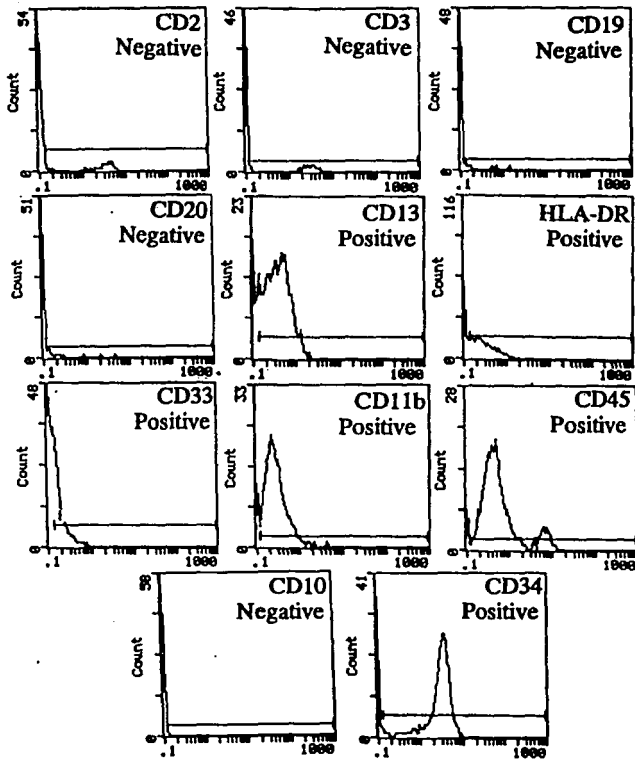


Figure 6. Acute myeloid leukemia (AML).

Figura 5.4 Como último caso tenemos las moléculas expresadas en las diferentes clases de células que se presentan en la Leucemia Mieloblástica Aguda: CD11b, CD13, CD33, CD34, CD45 y HLA-DR; en cambio, son negativas para CD2, CD3, CD10, CD19 y CD20. (11)

5.5- Empleo de la Inmunofluorescencia.

Se entiende por Inmunofluorescencia como una técnica que emplea anticuerpos marcados con sustancias fluorescentes para evidenciar la presencia de antígenos o marcadores de superficie de membrana o moléculas intracitoplasmáticas. En gran medida el fenómeno de la fluorescencia se explicó en el texto anterior de Citometría de flujo, pero en este apartado revisaremos que la Inmunofluorescencia es una herramienta adicional para el diagnóstico de las diferentes clases de Leucemias. La Inmunofluorescencia abarca básicamente la *técnica del anticuerpo fluorescente*. Este es un método inmunofluorescente en la cual el anticuerpo marcado con un fluorocromo como el FITC se usa para identificar antígenos en tejidos o células cuando se examinan por luz ultravioleta usado en microscopía de fluorescencia. (36)

Además de la técnica directa, los antígenos en secciones de tejido tratados con anticuerpos sin marcar pueden ser contrateñidos con antiinmunoglobulinas marcadas con fluoresceína para localizar antígenos en tejidos por el método de Inmunofluorescencia indirecta. La técnica del anticuerpo fluorescente indirecta es un método para identificar anticuerpos o antígenos usando un anticuerpo marcado con un fluorocromo el cual se combina con un anticuerpo intermediario o un antígeno más que directamente con el anticuerpo o antígeno que está siendo buscado. La técnica indirecta tiene una mayor sensibilidad que las técnicas de anticuerpo con fluorescencia directa. Algunas veces es referido como el método de sándwich o de doble capa.

Para realizar el marcado de los anticuerpos, se procede de la siguiente manera:

- Separar la fracción globulínica del suero inmune por precipitación con un volumen igual de solución saturada de sulfato de amonio 40%, pH 7.2. Conviene añadir la solución salina sobre el suero, en un tiempo de 2 a 3 minutos, con un mantenimiento constante de la agitación por una hora, mediante el empleo de un agitador magnético.
- Centrifugar a 5000 r.p.m. durante 3 minutos, desechar el sobrenadante y redissolver el precipitado en agua destilada, en un volumen igual a la mitad inicial. Reprecipitar con sulfato de amonio y disolver el precipitado en iguales condiciones a las indicadas en la primera precipitación.

- Colocar el precipitado en un tubo celofán y dializar frente a solución salina tamponada (buffer de carbonatos 0.25 M pH 9.0) hasta reacción negativa de sulfatos en el líquido de diálisis, usando solución de cloruro de bario al 5% como reactivo indicador. La diálisis debe hacerse a 4°C, con agitación constante (agitador magnético), recambiando la solución salina cada 4 h.
- Finalizada la diálisis, se valoran las proteínas totales y ajustarlas a una concentración de 20 mg/ml.
- Adicionar 0.05 mg de FITC por mg de proteína total. Para la marcación se diluye la solución proteica en solución salina tamponada hasta la concentración indicada y se lleva a pH 9-9.5. Las globulinas colocadas en un vaso de precipitación son llevadas a heladera (4°C) y se las agita con agitador magnético. Se añade la fluoresceína en pequeñas cantidades, no efectuando nuevos agregados hasta disolución del anterior, operación que lleva de 3 a 4 horas. La agitación debe continuar toda la noche.
- La eliminación de la fluoresceína no conjugada puede hacerse dializando la solución de globulinas frente a solución salina tamponada o filtrando por una columna de Sephadex G-25. En este caso una columna de 1 x 30 cm que contenga 5 g de Sephadex resulta útil para la purificación de 5-8 ml de solución conjugada. Como eluyente se usa solución salina tamponada.
- Todo conjugado debe ser evaluado antes de su uso para determinar la intensidad de la tinción específica y la presencia y la cantidad de fondo o tinción inespecífica. Ellos se determinan mediante reacciones de inmunofluorescencia frente a patrones conocidos. Un exceso de tinción inespecífica puede resolverse a veces por simple dilución de conjugado. En otras, es necesario adsorber con polvo de tejidos, generalmente de hígado. La cantidad a utilizar es aproximadamente 100 mg por ml de conjugado a adsorber. La adsorción se hace a 4 - 5°C durante una hora, y después se separa el sobrenadante por centrifugación. Generalmente con dos adsorciones se consigue el efecto deseado.

5.5.1- Inmunofluorescencia directa.

Para realizar la Inmunofluorescencia por el método directo, se emplea el anticuerpo específico marcado con el fluorocromo, y se siguen los siguientes pasos:

- Sobre portaobjetos limpios y desengrasados hacer las impresiones del material a analizar, dejando secar a temperatura ambiente (aproximadamente 30 minutos).
- Introducirlos en un vaso de Coplin con acetona fría y dejarlos en heladera por un tiempo que puede variar entre 1 y 4 horas según el material a fijar.
- Para la tinción, escurrir los portaobjetos y dejar que tomen la temperatura ambiente. Cubrirlos con el anticuerpo marcado con el fluorocromo, previamente diluido según su título y dejarlos en cámara húmeda 30-60 min. a 37°C.
- Lavar con abundante solución salina tamponada para eliminar el fluorocromo no fijado, enjuagar rápidamente con agua destilada, dejar escurrir y secar.
- Para la observación microscópica, montar previamente con glicerina tamponada.

5.5.2- Inmunofluorescencia indirecta.

El método indirecto consiste en que se hace actuar un anticuerpo sin marca sobre el antígeno y sobre el complejo formado antigamaglobulina (contra la gama globulina de la especie animal de la que proviene el anticuerpo sin marca) conjugada con FITC. Tiene la ventaja de no necesitar un anticuerpo marcado para cada antígeno.

- Las impresiones del material antigénico sobre los portaobjetos se preparan de manera similar al método directo.
- Se cubren con el anticuerpo no marcado y se dejan en cámara húmeda a 37°C durante 30-60 minutos. Se lavan con solución salina tamponada.
- Se cubren con la antigamaglobulina marcada con el FITC y se dejan en cámara húmeda 30-60 minutos a 37°C. Se lavan con abundante solución salina tamponada y se enjuagan con agua destilada.
- Se dejan escurrir y secar y, previamente a la observación microscópica, se los monta en glicerina tamponada.

Esta técnica es de relevante importancia porque se puede realizar inmunofenotipificaciones de las células leucémicas (15). Diversos investigadores han correlacionado el empleo de la Inmunofluorescencia con el diagnóstico de diversas clases de Leucemias. Un ejemplo es el diagnóstico de la Leucemia Promielocítica Aguda o LMA M3, en donde actualmente una de las metodologías más usadas es la inmunofenotipificación por Inmunofluorescencia indirecta; usando FITC y Ficoeritrina conjugada a F(ab)₂ IgG de cabra antirratón como reactivo secundario, con un panel de anticuerpos monoclonales purificados de ratón dirigidos contra antígenos de diferenciación de leucocitos humanos relevantes como CD34, HLA-DR, CD7, CD5, CD2, CD3, CD15, CD10, CD19, CD11b, CD13, CD14, CD33 y CD9. En este caso hay positividad en las siguientes moléculas: CD2, CD34, CD33, CD13 y CD9 principalmente. (15, 16)

Otro caso muy aplicado es la detección de la proteína PML expresada en estas mismas células pertenecientes a la M3; actualmente el anticuerpo monoclonal (MoAb) PG-M3, dirigido contra un epítipo amino terminal que es compartido por todas las isoformas conocidas de PML y PML- RAR α , y es muy conveniente para el uso diagnóstico. Dicho anticuerpo por medio de la Inmunofluorescencia detecta la localización de la proteína LPM dentro de 5 a 20 partículas discretas nucleares (llamadas "cuerpos nucleares"). (16, 19, 20, 24)

5.6- Empleo de la Hibridación por Fluorescencia *In situ* y de la Hibridación Comparativa Genómica

La Hibridación por fluorescencia *in situ* (del inglés Fluorescence In Situ Hybridization FISH) es una técnica que directamente identifica una región específica del ADN o ARN en una célula. El ADN en células o tejido fijado sobre portaobjetos de vidrio debe ser desnaturalizado con formamida antes de la hibridación con una sonda de ADN o ARN radiomarcada o biotinilada que es complementaria al ARNm del tejido que se está buscando. Para probar que la sonda se ha hibridado a su cadena complementaria en el tejido o en la célula bajo estudio debe ser autoradiografiada o por sondas marcadas por enzimas dependiendo de la técnica que está siendo usada. (27)

La FISH posee una serie de ventajas y desventajas que la hacen ser una técnica que dependiendo de las necesidades de la investigación, se puede emplear de manera efectiva:

- La técnica directa *in situ* es relativamente rápida y sensible
- No se necesita de cultivo celular
- Resulta más fácil de interpretar que un cariotipo
- Se puede combinar la FISH con la Inmunotinción
- FISH solamente proveerá información acerca de la sonda que está siendo evaluada, per otras aberraciones no serán detectadas.

De manera muy breve, se detalla cómo es la técnica de FISH:

- Las células en interfase se obtienen directamente de sangre, médula ósea, biopsia de ganglios linfáticos, líquido cefalorraquídeo, efusiones pleurales y núcleos en interfase que pueden ser extraídos de tejidos fijados en parafina.
- Preparar citocentrífugas de portaobjetos o usar extensiones. Las muestras están listas para usarse inmediatamente, o pueden ser almacenadas a temperatura ambiente previo a su uso.
- Fijar las extensiones en metanol.
- Tratar previamente con buffer de citrato de sodio 2X (CSS).
- Deshidratar en series de etanol.
- Desnaturalizar en formamida y en solución CSS.
- Deshidratar.
- Hibridizar por 1 a 72 horas (dependiendo de la sonda).
- Después de la hibridación, lavar con baja solución de sales.
- Realizar la detección del hapteno por vía avidina-FITC o anti-digoxigenina rodamina.
- Lavar en solución PBS.
- Visualizar usando microscopio fluorescente.

Muchas sondas pueden tomar por lo menos 1 día de trabajo. Existen diversos ejemplos del uso de la FISH para el diagnóstico de diversas enfermedades hematopoyéticas. Se puede detectar la translocación t(11;14)(q13;q32) en aspirados de médula ósea de las células del linfoma de mantle. Las sondas cósmidas para el gen *bcl-1* (11q13) son marcadas con

digoxigenina y detectadas con anti-digoxina rodamina. La sonda cósmida para el gen IgH (14q32) es marcada con biotina y detectada con avidina-FITC.

Esta técnica ha sido últimamente utilizada en el estudio del gen *BCR/ABL* por medio de FISH en casos de Leucemia Mielocítica Crónica y en casos de la presencia del cromosoma Filadelfia (Ph+) en Leucemias Linfoblásticas Agudas, marcando una deleción de la región 5' del gen *ABL* y la región 3' del gen *BCR* sobre el cromosoma 9q+. Por ejemplo, para realizar este estudio, se dispuso de sondas comercialmente adquiribles de doble señal fusión D-FISH *BCR/ABL*. La sonda *ABL* marcada con FITC (señal verde) es de aproximadamente 600 Kb, se extiende de un área bien centromérica del gen de la argininosuccinato sintetasa (ASS) al último exón telomérico del *ABL*; abarcando una región de punto de rompimiento (bpr en inglés) de 200 Kb en el gen *ABL*. La sonda *BCR*, directamente marcada con Rojo Texas (señal roja) es de aproximadamente 500 Kb, comenzando en la región 5' del primer exón *BCR*, extendiéndose a los comunes puntos de rompimiento tanto en el mayor y menor bcr y se extiende bien más allá del último exón. También se hace un análisis de FISH para la alteración inv(16), usando la sonda de color dual Vysis LSI CBF3. La sonda Vysis LSI CBF3 es una mezcla de una sonda 5' CBF3 directamente marcada con un fluoróforo Rojo Espectro y una sonda 3' CBF3 directamente marcada con un fluoróforo Verde Espectro. La sonda 5' CBF3 es de aproximadamente 170 Kb en tamaño y está ubicada teloméricamente al punto de rompimiento inv(16) y ni otra sonda se extiende sobre el punto de rompimiento. La sonda Vysis LSI MLL consiste de una porción centromérica de 350 Kb de la región genética de punto de rompimiento MLL marcado con Verde Espectro y una porción de 190 Kb que está muy telomérica de la región del punto de rompimiento y está marcada con Naranja Espectro. El análisis de FISH para la LMA M3 se realiza con la sonda de translocación Vysis LSI PML/RARA. La sonda LSI PML es de aproximadamente 180 Kb e hibridiza al cromosoma 15q22, y la sonda LSI RARA que hibridiza al cromosoma 17q12 es de aproximadamente 400 Kb de tamaño. El análisis de FISH en pacientes con LMA M2 se realiza usando la sonda dual de fusión ADN Vysis LSI ETO/AML1. La sonda ETO (Naranja Espectro) que hibridiza a la banda del cromosoma 8q22 es de 480 Kb, y la sonda AML1 (Verde espectro) que hibridiza al cromosoma 22q22 es de 1.3 Mb. Para considerar una deleción, se deben considerar por lo menos 10 células anormales en metafase. (10)

5.6.1- Hibridación Comparativa Genómica

La Hibridación Comparativa Genómica (CGH) es un ensayo competitivo de FISH que puede demostrar potencialmente todas las regiones de amplificación y deleción en el genoma (27). La CGH no requiere de un conocimiento previo de aberraciones genéticas y no requiere de células en metafase. Dentro de las ventajas y desventajas que presenta la CGH tenemos:

- Permite el análisis del genoma total en un solo experimento.
- No requiere de metafases de células tumorales de interés.
- Puede realizarse en pequeños números de células purificadas.
- Se requiere una pequeña cantidad de ADN (200 a 500 ng), por lo tanto la CGH es aplicable a material archivado.
- No puede detectar translocaciones balanceadas.
- Células normales contaminantes reducen la sensibilidad, por lo menos en un 50% de las células tumorales necesarias. La sensibilidad para pequeñas amplificaciones y deleciones es pobre.
- Técnicamente es demandante y de una labor intensa.

En forma general, se describe la técnica de HCG:

- Se extrae el ADN de muestras tumorales y normales usando la técnica estándar de fenol/cloroformo.
- Posteriormente se usa la técnica de translación Nick para marcar directamente al ADN con los siguientes compuestos fluorescentes: Rojo Espectro (células normales) y Verde Espectro (células tumorales).
- 200 ng de ADN normal marcado con rojo y ADN tumoral marcado por verde se mezclan juntos en un exceso de ADN Cot-1 sin marcar y disuelto con solución formamida.
- El ADN marcado y las extensiones en metafase normal se combinan y desnaturalizan a 75°C por 5 min., entonces se hibridizan por 72 horas a 37°C, lavados y teñidos en DAPI.

- Imágenes de colores secuenciales se toman al capturar imagen usando una cámara unida al microscopio fluorescente ajustado con filtros de paso de banda angosta para fluoresceína (verde), rodamina (rojo) y DAPI (azul).
- Los cromosomas invertidos y bandeados con DAPI son cariotipados y las relaciones de la fluorescencia verde a roja se determina un software de análisis de imagen.
- Las secuencias de ADN que están sobre – representadas en el tumor muestran una relación alta de verde a rojo, como por ejemplo se da en las amplificaciones.
- Secuencias de ADN que están poco representadas en el tumor muestran una relación baja de verde a rojo, como en las deleciones.

5.7- Empleo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa y su variante con Transcriptasa Reversa

El término “Reacción en Cadena de la Polimerasa” (Polymerase Chain Reaction, PCR en inglés) se aplica al proceso bioquímico *in vitro* en la cual las cadenas individuales del ADN molde o blanco son duplicadas por la enzima ADN polimerasa en cada uno de los ciclos (generalmente entre 20 y 30) que integran la reacción, al final de cada uno de dichos ciclos, las nuevas cadenas vuelven a ser duplicadas por la misma enzima, lográndose una producción exponencial de millones de copias del gen o segmento de ADN específico sometido al proceso. (4)

La PCR fue creada por Kary B. Mullis a partir de 1979, trabajando para Cetus Corporation; originalmente trabajó en la síntesis de oligonucleótidos para secuenciar moléculas de ADN, pero ideó una forma de secuenciar el ADN empleando una enzima capaz de adicionar didesoxinucleótidos trifosfatados marcados radiactivamente para conocer entonces la secuencia del ADN plantilla, pero una noche de Viernes en Abril en 1983, pensó que con este método podía obtener miles de copias de un fragmento flanqueado por oligonucleótidos que servirían de límite para comenzar y terminar el proceso de duplicación de la ADN polimerasa. Fue de este modo que nace la PCR y con el tiempo se ha ido mejorando e inclusive, innovando nuevos métodos que complementan la eficiencia del proceso. (39)

5.7.1- Diseño de la PCR.

En general, los componentes requeridos para una PCR son: ADN, iniciadores (oligonucleótidos) específicos que flanqueen el gen o segmento que actúa como blanco para la amplificación, mezcla de desoxinucleótidos trifosfatados (dNTP's), solución amortiguadora de reacción y ADN polimerasa.

Cada uno de los ciclos de la reacción consta de 3 pasos determinados por temperaturas y tiempos específicos:

- Desnaturalización (92-98°C, 30-90 segundos), en el cual se separan o desnaturalizan las dos cadenas complementarias del ADN blanco.
- Alineamiento (50-60°C, 30-60 segundos), en el que se realiza el apareamiento específico entre los iniciadores y las cadenas simples del segmento de ADN blanco desnaturalizado.
- Extensión (70-74°C, 30-90 segundos), en donde la ADN polimerasa extiende la longitud de los iniciadores apareados al ADN blanco, al ir polimerizando los desoxinucleótidos libres, resultando en nuevas cadenas complementarias a las dos cadenas sencillas presentes al inicio de la reacción.

El ciclo siguiente se inicia en el mismo tubo, con los mismos componentes de la mezcla de reacción, pero ahora contiene el doble de cadenas sencillas de ADN blanco que el anterior y finaliza convirtiendo éstas en cadenas dobles. Con la sucesión de ciclos se logra una síntesis exponencial (2^{17}) del segmento de ADN blanco, cuyo tamaño se define desde los primeros ciclos de la reacción. La longitud del segmento amplificado por la PCR es el resultado de la suma de la longitud de los dos iniciadores más la distancia del ADN blanco flanqueado por éstos. (4)

Si se desea poner en marcha esta tecnología, deben adquirirse los materiales y equipos enlistados a continuación:

- Microcentrífuga
- Micropipetas
- Congelador de -20°C
- Balanza analítica

- Termociclador
- Fuente de poder
- Espectrofotómetro
- Tubos para microcentrifuga
- Guantes y tapabocas estériles
- Puntillas con filtro para micropipetas (opcional)
- Cámaras de electroforesis
- Transiluminador de luz UV
- Campana de flujo laminar

Para el montaje de la reacción se requiere:

- ADN polimerasa Taq
- Aceite mineral
- Mezcla de desoxinucleótidos
- Agua destilada ultrapura
- Amortiguador de la reacción
- Oligonucleótidos iniciadores
- Cloruro de magnesio

Y para el análisis del producto amplificado se requiere:

- Bromuro de etidio
- Azul de bromofenol
- Xilenciano
- Agarosa
- Trizma base
- Acido bórico
- Agua destilada

Además es importante estandarizar las cantidades, volúmenes, concentraciones o actividades de cada uno de los componentes de la reacción para optimizarla:

- Oligonucleótidos: 0.05-1 μM /100 μl de reacción
- ADN blanco: 300 ng a 1 μg de ADN genómico humano o de 25-100 ng de genes clonados en plásmidos
- ADN polimerasa Taq: 1-2.5 U/100 μl de reacción
- MgCl_2 y dNTP's: 0.5-2.5 mM y de 20-200 μM respectivamente.

De los puntos anteriores, es importante definir algunas particularidades importantes:

La secuencia de los **oligonucleótidos iniciadores** es responsable de la amplificación específica del fragmento deseado, y para su diseño es indispensable conocer la secuencia del ADN blanco. Al ser éste uno de los parámetros más importantes que determina la especificidad de la PCR, su elección y diseño debe ser muy cuidadoso. Idealmente se debe usar la concentración indicada anteriormente de oligonucleótidos por cada 100 μl de reacción; el uso de concentraciones mayores favorece la amplificación de regiones inespecíficas y la formación de dímeros de oligonucleótidos.

La PCR es tan sensible que la amplificación puede hacerse a partir de **una sola molécula de ADN**. Genes de una sola copia en el genoma pueden ser fácilmente amplificados. La concentración de ADN blanco en la reacción depende de la fuente utilizada, e idealmente se requieren aproximadamente 10^3 copias de ADN blanco, esto es, la concentración indicada anteriormente tanto en el caso del genoma humano como para el caso de genes clonados en plásmidos. Alternativamente, cantidades menores de ADN pueden utilizarse en la amplificación de genes que existen en varias copias en el ADN plantilla, o mayores cantidades cuando se utiliza el mismo par de oligonucleótidos para amplificar varios genes pertenecientes a una misma familia.

De las enzimas **ADN polimerasas** termoestables actualmente utilizadas para la PCR, la ADN polimerasa Taq es la más usada por su fácil estandarización y menor costo. Esta enzima tiene actividad de ADN polimerasa, de exonucleasa 3' a 5' (correctora de prueba) y

de exonucleasa 5' a 3'. Su índice de error de incorporación es de 1 en 4×10^4 bases y simplifica sin dificultad segmentos de hasta 3,000 pb. Para establecer la cantidad mínima de enzima requerida para una amplificación exitosa y generar cantidades óptimas del producto, deben realizarse titulaciones en gamas que van de 0.5 a 5 U por reacción. Esta medida, además de ser económica, se utiliza para probar una enzima recién adquirida y disminuye la amplificación inespecífica que evidencia la presencia de barridos al analizar el producto amplificado en un gel.

La concentración de **iones magnesio** en la PCR es también determinante en la especificidad de la reacción. Concentraciones muy altas conducen a una baja especificidad, mientras que las concentraciones mínimas necesarias disminuyen el índice de incorporaciones erróneas de nucleótidos, por lo que se recomienda optimar la concentración de $MgCl_2$ en cada reacción. Si se disminuye demasiado la concentración de $MgCl_2$, la actividad de la enzima decae al grado de que algunas veces la amplificación es nula. Las concentraciones mínimas necesarias de dNTP's disminuyen el índice de incorporaciones erróneas de nucleótidos, mientras que concentraciones muy altas disminuyen la especificidad de la reacción, por lo que la concentración de dNTP's también debe optimarse. Concentraciones entre 20 y 200 μM proporcionan resultados óptimos, debiéndose igualar la concentración de cada uno de los cuatro dNTP's en concentraciones equimolares.

Teóricamente, en condiciones óptimas el nivel de amplificación del ADN en la PCR aumenta en forma exponencial con cada ciclo; sin embargo, en la práctica, después de determinado **números de ciclos**, la amplificación se detiene gradualmente. Entra primero a un fase lineal y luego a una estacionaria, a la que se denomina fase de "meseta", siendo ésta debida al agotamiento de la actividad enzimática y a la insuficiencia para llevar a cabo la extensión del número masivo de complejos ADN blanco – oligonucleótidos, presentes en los ciclos que anteceden a este fenómeno. Esto puede evitarse si se aumenta el tiempo de extensión en los últimos ciclos de la reacción o la cantidad de la enzima, aunque lo recomendable es ajustar el número de ciclos de tal manera que la amplificación se realice al obtenerse los niveles máximos de amplificación en una reacción en una reacción que presente comportamiento lineal. El número de ciclos promedio oscila entre 20 y 30, dependiendo de la cantidad de ADN inicial.

Cuando la **temperatura de alineamiento** es muy baja, existe la mayor probabilidad de que los oligonucleótidos se apareen a regiones no específicas del ADN blanco y pueden también ser extendidos toda vez que la polimerasa Taq posee actividad aún a bajas temperaturas. Utilizando temperaturas de hibridación entre 55 a 65°C se reducen grandemente los sucesos de apareamiento inespecífico. Para calcular la temperatura óptima de alineamiento para un par de oligonucleótidos dado, pueden utilizarse varias fórmulas empíricas. Una es adicionando 2°C por cada Adenina y Timina presentes en el oligonucleótido, y 4°C por cada Guanina y Citosina, y restando 5°C del resultado. (4)

5.7.2- Transcriptasa Reversa de la PCR.

La obtención de millones de copias de genes de interés por medio de la PCR, tiene una gran variedad de aplicaciones y en el área de diagnóstico de las diferentes clases de Leucemias, es de una gran utilidad no solamente para la identificación de las células leucémicas, sino también para dar seguimiento al tratamiento seguido y a la presencia de la enfermedad mínima residual de la leucemia, aspecto que permite realizar la evaluación clínica al paciente y determinar su grado de avance. Pero no solamente se puede realizar el análisis de ADN, sino que es posible amplificar la molécula que realiza la "mensajería" entre el núcleo de la célula y los ribosomas, para dictar lo que habrá de sintetizarse gracias a la expresión de los genes; nos referimos al **ARN mensajero (ARNm)**. Esta molécula es el resultado de la transcripción de los genes y su presencia indica el resultado de un estímulo recibido por la célula, que dependiendo del gen que se esté expresando, el material genético de la célula transcribirá información (por medio del ARNm) para que sea traducida en los ribosomas y se de la síntesis de proteínas correspondiente al estímulo recibido y originar una respuesta. Comprender estos procesos complejos implica dilucidar la patogénesis del cáncer leucémico. Actualmente existe una variante de la PCR capaz de detectar y utilizar como molécula molde al ARNm, dicha variante se denomina **Transcriptasa Reversa de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)**. En la RT-PCR, es importante realizar la extracción del ARNm, porque no es una molécula muy estable y puede ser fácilmente degradada por ARN^{asas} presentes, por ejemplo, en el sudor, lágrimas y saliva humanas, así pues es importante realizar un proceso de extracción adecuado. El paso siguiente es realizar

el proceso denominado *transcripción inversa*, el cual consiste en la obtención de ADN complementario (ADNc), utilizando como molde al ARNm por medio de la enzima **Transcriptasa inversa**, como la Transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV-RT) e inclusive la misma Taq polimerasa posee actividad de Transcriptasa inversa. Una vez que se obtiene el ADNc, se le somete a esta molécula a un proceso de PCR. El conjunto de ambos métodos se denomina RT-PCR y actualmente a nivel de investigación como en el diagnóstico clínico, es una de las técnicas de reciente uso y con una importancia en ascenso por su aplicación en el diagnóstico y en el seguimiento del tratamiento y evolución de la enfermedad. (8, 13, 41)

Dentro de los reactivos y equipos usados en la RT-PCR tenemos:

- Buffer PCR 10X: Tris-HCl 100 mM, pH 8.3, MgCl₂ 15 mM, KCl 500 mM. Alicuotar y almacenar a -20°C.
- Rnasina: 40,000 U/ml. Almacenar a -20°C.
- Mezcla de dNTP's: combinar 10 mM dATP, dGTP, dCTP y dTTP. Diluir a 0.5 mM cada uno y almacenar a -20°C.
- AMV-RT, 20 U/μl, almacenar a -20°C.
- Oligonucleótidos correspondientes para detectar genes implicados como marcadores en las diferentes clases de Leucemias.
- Aceite mineral.
- Termociclador programable.
- Tubos de reacción Eppendorf de 0.5 ml.

Para realizar la reacción de RT-PCR, se lleva a 50 μl de mezcla de reacción, el cual contiene buffer 1X PCR, dNTP's 40 mM, oligonucleótidos de polaridad negativa 1 mM, Rnasina 10 U, Transcriptasa inversa 10 U y 1 - 5 μl de ARNm purificado. Mezclar por 5 segundos en un vortex y centrifugar brevemente. La reacción se realiza por 1 hora a 42 °C. Alicuotar la mezcla de reactivo a 1 μl por tubo. Cada alicuota est estable por varios meses a -70°C.

Y para realizar la PCR se estandariza las cantidades empleadas de cada uno de los constituyentes de la reacción, en función del tipo de método empleado, más la mezcla de reacción de la RT.

5.7.2.1- Detección de la LPA por RT-PCR.

En el caso de la detección de la **Leucemia Promielocítica Aguda (LMA-M3)**, se ha estandarizado un proceso de extracción de ARN y realización de la RT-PCR para estudio del transcrito PML-RARA, el cual origina una proteína quimérica importante en la patogenia de la LPA:

La extracción de ARN fue por ultracentrifugación de un lisado de tiocianato de guanidinio a través de una solución de cloruro de cesio como se describe. Los sedimentos fueron resuspendidos en 200 μL de dietilpircarbonato (DEPC)-agua titriada, extraído dos veces con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), una vez con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), precipitado con etanol, lavado dos veces con etanol al 70% y redisoluto en 100-150 μL DEPC-dH₂O. Si la pastilla de ARN fuera pequeña, 100 μg de ARNt de levadura (sigma) es adicionado para la precipitación para mejorar la recuperación. El ARN fue almacenado a -40°C antes de realizar la transcripción reversa. (8)

La transcripción reversa y PCR. La transcripción reversa fue realizada con 1 μg del ARN total (o una décima parte del total del volumen de muestra si el rendimiento fuese bajo) después de calentarla a 65°C por 3 minutos. La transcripción reversa fue realizada con 10 unidades de Transcriptasa reversa de AMV en el buffer del productor con 10 unidades de RNAsina y por cada dNTP a una concentración de 1 mM en un volumen final de 20 μL . En los primeros experimentos se utilizaron primers o iniciadores a partir de 10 pmoles de primers genes-específicos (RARA o PML) y en los siguientes experimentos con 0.5 μg de un 17 meroligo-dT. Las muestras fueron incubadas a 42°C en 1 hora y a 52°C por 30 minutos, entonces se diluyó con 0.5 ml de TE y alícuotas de 10 μL se utilizaron para la amplificación en PCR. 4 reacciones de PCR se realizaron para cada muestra: la amplificación control de ADNc de RARA normal y PML normal y amplificaciones diagnóstico de ADNc de fusión de PML-RARA y RARA-PML. Las reacciones tenían 10 μL de ADNc pool (en la primera ronda), 5 μL de buffer PCR 10X Promega, para cada dNTP 100 μM , 20 pmol de cada iniciador externo 20mer, 1 unidad de *Taq* polimerasa Promega y dH₂O a 50 μL . Las reacciones se cubrieron con 30 μL de parafina líquida. 40 ciclos se corrieron de 1 minuto a 95°C para desnaturalizar las muestras, 1 minuto a 55°C para alinear los iniciadores y 1 minuto a 72°C para la extensión. Una extensión final de 10

minutos a 72°C se realizó. Una alícuota de 1 µL del producto se usó como la planilla de inicio para una segunda ronda de 40 ciclos usando las mismas condiciones pero con iniciadores internos. Se tomaron cuidados para minimizar los falsos positivos. Las muestras fueron separadas por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% con un marcador de 100 pb, los productos de PCR fueron subclonados dentro del sitio *EcoRV* de pBluescript, usando el método ddT-tailing. Los datos de secuencia se obtuvieron usando el kit de secuencia. Los tamaños predichos de las proteínas de fusión PML-RARA son estimados teóricos y no han sido confirmados por un análisis de Western. (22, 28, 30)

Se ha demostrado que el análisis de RT-PCR de la fusión génica PML/RAR α derivada de la t(15;17) puede ser capaz de detectar las células leucémicas residuales durante la remisión en pacientes APL.

Varios descubrimientos indican que la conversión a positividad de PCR después de la consolidación es casi uniformemente seguido por recaída hematológica, promete una terapia de salvación con anticipación a la hora de la recurrencia de enfermedad mínima.

RT-PCR de PML/RAR α . El RNA total fue extracto por el método de Chomezynsky y Sacchi. Para ensayar la integridad de ARN, las muestras fueron corridas después de la extracción en un minigel de formaldehído. La amplificación del gen híbrido PML/RAR α por RT-PCR fue realizado como se reportó anteriormente, con dos modificaciones: la temperatura de alineamiento fue elevada a 56°C e, iniciando desde Abril de 1996, la enzima Amplitaq Gold fue usada como Taq polimerasa. En adición a la amplificación del gen híbrido en RNA de pacientes, cada experimento de RT-PCR incluyó la coamplificación de: (1) RNA de la línea celular NB4 como control positivo; (2) todos los reactivos mas agua y sin RNA como control negativo; y (3) fragmentos de ADNc que contengan exones 2 y 3 de RAR α obtenidos de los mismos pacientes bajo análisis (control interno) para además verificar la integridad del ARN y probar la eficiencia del paso RT.

La sensibilidad del ensayo RT-PCR fue determinado por amplificar serialmente mezclas de ARN diluido de una muestra diagnóstico con 100% de blastos y la línea mieloides GF-D8 t(15;17) negativa, como se reporta. El transcrito PML/RAR α aún fue detectable en la presencia en la presencia de 0.1 ng totales de ARN, esto da una dilución final de 10⁴. (8)

La remisión hematológica fue definida como una celularidad normal de médula ósea con menos del 5% de promielocitos leucémicos y la normalización de la cuenta en sangre

periférica. La negatividad en PCR fue definida como la ausencia, sobre el gel de electroforesis teñido con bromuro de etidio, de la amplificación de bandas específicas de PML/RAR α detectadas en el diagnóstico, en la presencia de la integridad de ARN como se evaluó por visualización en minigel, y la amplificación exitosa del control interno. La positividad de la PCR en los estudios posteriores se definió como en la reaparición en el gel teñido con bromuro de etidio de la misma banda de amplificación detectada en el diagnóstico.

5.7.3- PCR de Tiempo Real.

Otra variante importante que ha surgido es la **PCR de tiempo real**. Esta PCR es un método que ha sido desarrollado para dirigir las deficiencias de la estrategia tradicional cuantitativa de la PCR. Este método explota la actividad nucleasa 5'-3' asociada con la Taq polimerasa y usa una sonda específica de ADN marcada fluorogénicamente. Esta sonda está diseñada para alinearse entre la parte delantera e inversa del oligonucleótido usado para la amplificación de la PCR. La actividad nucleasa de la Taq polimerasa rompe la sonda marcada durante la etapa de extensión de la amplificación de la PCR, produciendo una señal fluorescente que puede ser detectada en solución. La cantidad de fluorescencia producida en una reacción por este método es proporcional al número de ADN blanco de inicio durante la fase temprana de amplificación. Cuando esta reacción se realiza en un Termociclador combinado con un detector de secuencia tal como el PE Biosystems 7700, un ensayo cuantitativo de entrada del número de copias de ADN blanco puede ser hecho en el tubo. Este método elimina la necesidad de procesar la muestra post-PCR y reduce el potencial de formación de falsos positivos. Esta técnica ha sido empleada en la evaluación de la enfermedad residual de la Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA). (14, 41)

5.7.4- Aplicaciones de las técnicas basadas en PCR para el estudio de las malignidades hematológicas.

Como ya se ha mencionado anteriormente, tanto el ADN como el ARNm se pueden usar como blancos para los procesos de PCR. En la PCR, el ADN puede ser usado para demostrar **rearrreglos genéticos en el receptor de los linfocitos T (TCR) y en las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (IgH)**. Estos representan marcadores clonales únicos, y las técnicas de PCR pueden ser usadas para demostrar la clonalidad en los desórdenes linfoproliferativos. Adicionalmente, estas técnicas pueden ser usadas para detectar muy bajos niveles de la enfermedad, también llamado estudios de enfermedad mínima residual (MRD en inglés). (14)

Translocaciones cromosómicas son eventos comunes genéticos en la leucemia y linfoma y resultan en la desregulación de un protooncogen o alternativamente la formación de un gen de fusión quimérico. Muchas de estas translocaciones son demostrables por PCR y por su variante RT-PCR y pueden ser aplicados en el diagnóstico de rutina así también como en el ensayo de MRD. (33, 35)

Estudios de rearrreglos genéticos en la cadena pesada de las Inmunoglobulinas (IgH) en los desórdenes linfoproliferativos en linfocitos B

Los rearrreglos clonales en la IgH pueden ser detectados por un número de estrategias basadas en PCR (como es el caso de la Leucemia Linfoblástica Aguda). Son fáciles de realizar y pueden ser aplicados a extensiones de médula ósea y en muestras fijadas en parafina y en diversos tejidos frescos (médula ósea, sangre y otros tejidos).

La capacidad de demostrar el rearrreglo clonal de IgH varía entre el desorden linfoproliferativo y también de la estrategia empleada de PCR. Por la parte final se marca el iniciador o "primer" JH con un fluorocromo y se analizan los productos con un analizador de fragmentos automatizados equipado con un software "genescanning" o registro de genes. Rearreglos clonales definitivos son detectados rutinariamente en un 93% de las LLA en linfocitos B y en un 75% de los casos de mieloma. (20, 25, 27, 29)

5.7.4.1- Aplicación de las técnicas de PCR en la IgH.

La enfermedad mínima residual se refiere a la presencia de clonas de células en la médula ósea por debajo del nivel de detección de los ensayos morfológicos estándares. En el caso de la LLA, tradicionalmente ha involucrado la secuenciación de rearrreglos en la IgH y la generación de iniciadores oligonucleótidos alelo – específicos (ASO). Esta técnica es altamente sensible ya que es capaz de detectar una célula leucémica en aproximadamente 100,000 células normales (0.001%). A pesar de su sensibilidad, las técnicas ASO tienen varias desventajas: consumen mucho tiempo, se realiza una labor intensa y es muy cara. El ensamblaje de los genes IgH de sus regiones constituyentes *variable* (V_H), diversidad (D_H) y de unión (J_H) crean un ADN blanco que es complejo y único para cada paciente. De ahí que la generación de ASO sea un proceso muy largo y caro. La PCR IgH fluorescente es una técnica que idealmente se adapta al monitoreo rutinario de pacientes. (27)

5.7.4.2- Estudios de rearrreglos genéticos en el receptor de los linfocitos T (TCR) en los desordenes linfoproliferativos.

El receptor para los antígenos en la mayoría de los linfocitos T maduros consiste de dos cadenas polipeptídicas, denominadas cadenas alfa (α) y beta (β), las cuales están unidas por puentes disulfuros y están asociadas al CD3. Una pequeña población de linfocitos T maduros expresan un diferente TCR heterodímero en asociación con el CD3. Este está compuesto por dos cadenas polipeptídicas denominadas gamma (γ) y delta (δ), las cuales tienen un grado de homología con las cadenas β y α respectivamente.

Regularmente se usa la PCR en el TCR γ para evaluar la clonalidad en los desórdenes de linfocitos T. Este es el locus más apropiado para examinar, las expansiones de linfocitos T inmaduros pueden no haber experimentado la recombinación $\alpha\beta$, mientras que el gen δ se suprime durante la recombinación genética. Los rearrreglos clonales son visualizados comúnmente con la tinción de bromuro de etidio seguido de una electroforesis en gel con poliacrilamida (PAGE). Para evaluar la clonalidad, los rearrreglos en TCR γ son demostrables en un 70% de los pacientes con desordenes linfoproliferativos en linfocitos T.

En el caso de la evaluación de la MRD en LLA, el rearreglo clonal es demostrable en el 90% de los casos de esta clase de Leucemia con linaje de linfocito T. (27)

La PCR tiene diversas aplicaciones en el campo de diagnóstico en las diferentes clases de Leucemias, de este modo tenemos la siguiente lista de las anomalías que son detectadas mediante diversas estrategias de PCR:

- **Translocación t(14;18) (q32 q21).** Desregulación del gen BCL2.
- **Translocación t(9;22) (q34q11).** Cromosoma Filadelfia, se forma la proteína de fusión BCR/ABL. Detección por RT-PCR.
- **Translocación t(15;17).** Se puede demostrar por RT-PCR los productos genéticos PML/RARA derivado del cromosoma 15 y RARA/PML derivado del cromosoma 17 en la Leucemia Promielocítica Aguda (LMA-M3).
- **Translocación t(8;21) (q22.1;q22.3)** en la LMA – M2 (mieloblástica con maduración); produce un gen quimérico AML1/ETO (Leucemia Mieloide Aguda/Ocho Veintiuno), el cual es amplificado a partir del cromosoma 8 por medio de la PCR con iniciadores “encajados o anidados” (nested primers en inglés).
- **Inversión inv(16) (p13.2q22)** en la LMA – M4Eo (mielomonoblástica con eosinofilia). Se amplifica los genes 5'CBFβ - 3'MYH11, resultando cuatro posibles transcritos quiméricos (A-D).
- **Translocación t(12;21) (p13;q22)** ha sido descrita recientemente en la Leucemia Linfoblástica Aguda, resultado de la fusión genética entre los genes AML1/CBFα y TEL. Se ha demostrado en 16-26% de los niños con LLA con la RT-PCR. La translocación se encuentra exclusivamente en pacientes con inmunofenotipo de LLA común (LLA-c), presentes en edades entre 1-10 años.

6- PERSPECTIVAS Y TRASCENDENCIA DEL DIAGNOSTICO DE LAS DIFERENTES CLASES DE LEUCEMIAS

En el primer capítulo del presente trabajo, se comentó sobre la clasificación de las malignidades hematológicas en base a las herramientas actuales de diagnóstico como la Biología Molecular, Inmunofluorescencia y el empleo de los Anticuerpos Monoclonales. Todos los métodos y técnicas descritas en los capítulos II y III, han servido a lo largo del tiempo en el estudio, entendimiento y lo más importante, el diagnóstico y diferenciación de todas las clases de leucemia que actualmente se conocen (principios del siglo XXI d. de C.), con el fin de proporcionar, en teoría, el adecuado tratamiento para lograr la remisión o cura completa del paciente.

En base a los métodos y técnicas discutidos anteriormente, se pueden integrar los elementos de diagnóstico para cada uno de los diferentes tipos de Leucemias que actualmente se han identificado, de la siguiente forma:

6.1- Leucemia Linfoblástica Aguda.

Imunofenotipo

La LLA se deriva de linfocitos precursores que están experimentando rearreglo genético en el receptor de antígenos (Ig y TCR). En base a las técnicas inmunofenotípicas, se clasifica de la siguiente manera:

LLA precursores de linfocitos B.- El precursor natural de las células se establece al demostrar la falta de Ig superficial, la presencia de **Transferasa de desoxinucleótidos terminales (Tdt)** nuclear y algunas veces la expresión de **CD34**. La subclasificación es como sigue:

- LLA pre-pre-B: Muchos expresan **CD19**, **CD34** y **Tdt**, y carecen de **CD10**, miceloperoxidasa y de la cadena μ pesada citoplasmática.
- LLA pre-B: Muchos expresan **CD19**, **CD10**, **Tdt** y presentan la **cadena pesada μ citoplasmática**.
- LLA común: Muchos expresan **CD10**, **CD19** y **Tdt**; presentan la cadena μ < 20% de los blastos en citoplasma y carecen en la superficie de dicha cadena.

- Los blastos de todos los subgrupos presentan **CD22** y **CD79b** en el citoplasma.

LLA precursores de linfocitos T.- El precursor natural de las células se establece demostrando **Tdt** y **CD34** y la falta en la superficie de TCR/CD3. El linaje de linfocitos T se demuestra por la expresión de **CD7** y/o **CD1a**. La expresión de los otros marcadores pan-células T es variable.

Leucemia Aguda de linaje bifenotípico.- Debe tener una combinación de marcadores de linaje definido: **CD3/TCR** citoplasmática, **Ig** citoplasmática/**CD79**, **CD22** y **Mieloperoxidasa**. (27)

Citogenética

La hiperploidia es común. Un número de translocaciones balanceadas ha sido identificada en la LLA:

- **t(12;21), t(9;22), t(4;11q23), t(1;19)**. (33)

Citoquímica

La prueba de **Mieloperoxidasa** es **positiva**, rasgo distintivo entre la Leucemia Mieloide Aguda M1 y la Leucemia Linfoblástica Aguda L2, la prueba de Sudan Negro B es ocasionalmente positiva. Los linfoblastos con bloques grandes de **reactividad PAS**, el 11% de los casos de LLA son positivos fuertemente; también dan **positivo a la prueba de Fosfatasa ácida** en la LLA de células T. (17)

6.2- Leucemia Linfocítica Crónica.

Inmunofenotipo

- Hay expresión débil de sIg (característica representativa de la LLC). Expresan **IgD+** y/o **IgM+** en la mayoría de los casos.
- Las células también expresan **CD20** y **CD22** a un nivel más bajo que los otros desordenes linfoproliferativos de linfocitos B.
- Expresan **CD5**, **CD19** y **CD23**. No expresan **CD11a**, **FMC7**, **CD10** ni **CD38**.
- Los genes de Ig muestran evidencia de hipermutación somática en aproximadamente 50% de los casos.

- Alrededor del 30% de los casos tienen un fenotipo atípico. Estos casos pueden tener una expresión fuerte de sIg, la ausencia de CD23 y la expresión de **CD11a**, **FMC7** y **CD38**. Estos casos tienen algunas veces características morfológicas atípicas.
- La LLC atípica consiste de la presencia de **CD5+** y **CD23-/Linfoma de Células Mantle**, en espera de los resultados de FISH para t(11;14). La clase combinada de LLC (ej. de aquellas que expresan IgG de superficie más que sIgD), debe ser reportado como de significado indeterminado. Los casos con fenotipo de células Mantle, pero ninguna evidencia de t(11;14) deben ser considerados como LLC-B atípica.
- Transformación de células grandes de LLC.- Este término debe ser usado cuando hay evidencia de LLC preexistente y reubicación parcial o completa de ganglios linfáticos y/o aspirado de médula ósea por capas cohesivas de linfocitos B grandes.
- Leucemia Prolinfocítica B.- Este término debe ser usado solamente para desordenes de linfocitos B con fuerte expresión de sIg/CD79b, FMC7 y la ausencia de CD5 y prolinfocitos mayores al 54% en el sitio clínico aprobado. Debe ser claramente distinguido de casos de LLC con números incrementados de células nucleoladas (prolinfocitos).
- Leucemia de células Pilosas.- El diagnóstico de la LCP requiere células con morfología típica en sangre y médula ósea. La inmunofenotipificación incluye **Ig clonal con CD11c**, **CD25**, **CD103** y una fuerte expresión de **CD22**. El término LCP-v se usa para casos morfológicamente típicos que carecen de CD25. En la biopsia de médula ósea las células tienen un patrón intersticial/difuso que está asociado con congestión vascular y depleción de células mielóide. (27)

Tumores de Linfocitos T maduros

- Leucemia prolinfocítica T.- Este diagnóstico requiere una linfocitosis de linfocitos T con expresión de superficie de **CD2**, **CD3**, **CD5** y **CD7**. Casi cada caso será **CD4+**. **CD1a**, **CD34** y **Tdt** deben ser negativos. La cuenta de linfocitos T debe estar establecida en el reporte clínico. Todos los casos deben tener estudios de rearrreglos genéticos en TCR.
- Leucemia/Linfoma de linfocitos T-adultos.- Este diagnóstico se usa solamente para Leucemia de linfocitos T con **CD4+**, **CD25+**, asociada con anticuerpos HTLV-1. (27)

Citogenética

Se da en ocasiones la **Trisomía 12** y las **deleciones en 11q, 13q12 y 13q14** son relativamente frecuente. (27)

6.3- Leucemia Mieloblástica Aguda.

En el caso de la LMA, se deben tomar en cuenta las siguientes características:

- Una cuenta de blastos > 20% o > 5% de blastos en pacientes con translocaciones balanceadas. Esto se aplica para casos de novo en enfermedades mieloproliferativas (EMP) y en síndromes displásicos.
- El linaje mielóide se demuestra por una combinación de citoquímica y marcadores de superficie.

De acuerdo con los nuevos avances, ahora se sugiere lo siguiente que la subclasificación de la LMA dependa (en este orden de prioridad):

- De la presencia de translocaciones balanceadas específicas.
- Un historial documentado de EMP y Síndrome mielodisplásico.
- Un historial de quimio/radioterapia
- Evidencia morfológica de displasia en tres linajes.
- Morfología y fenotipos de blastos:
 1. Médula ósea.- Inmunofenotipo mielóide: **CD34+**, **Mieloperoxidasa por inmunocitoquímica**. Para linaje linfóide debe ser negativo como un tipo de marcador específico.
 2. Monocítico.- Deben demostrar dos de los siguientes marcadores: **HLA-DR, CD14+, ANAE o características morfológicas de monocitos/monoblastos**. M5 no será subdividida en A ni en B.
 3. Megacarioblástico.- Los marcadores deben mostrar marcadores de superficie de megacariocitos por citometría de flujo y confirmado por inmunocitoquímica.
 4. Eritroleucemia.- El criterio de la clasificación de FAB será aplicado.

La expresión aberrante de antígenos reportados será ligado a translocaciones balanceadas y en la LMA tenemos:

- **CD19/t(8;21)**
- **CD2/inv/16**
- **CD2+/HLA-DR(-)**
- **CD9/t(15;17)**

La LMA deberá estar clasificada en cuatro subgrupos:

- **LMA con translocaciones balanceadas.**- Incluirá las anomalías t(8;21), inv(16), 11q23 demostrada por PCR o Citogenética y la t(15;17) demostrada por tinción inmunofluorescente anti-PML, PCR o Citogenética. Si el resultado de PCR/Citogenética es conocido como reporte de LMA con presencia de anomalía cromosómica, de otro modo se corregirá el reporte cuando se obtengan los resultados. El término de LPA se usará para definir t(15;17) y otras anomalías asociadas a LPA que integran aproximadamente el 1% de este grupo.
- **LMA con características relacionadas a mielodisplasia.**- Este diagnóstico será hecho cuando haya una historia definitiva previa de Síndrome mielodisplásico o características displásicas definitivas en células que no sean blastos.
- **LMA NOS/inespecificado.**- La subclasificación de FAB de M0 a M7 será aplicado.
- **LMA relacionado a la terapia.**- Los pacientes tendrán un historial de quimio o radioterapia, será subdividido en relación a: **agentes alquilantes, inhibidores de la topoisomerasa II** y otros. (16, 27)

Citoquímica

- **Mieloperoxidasa (MPO)** identifica tanto a blastos como a células mieloides. Los bastones de Auer son detectados tan frecuentemente como en la tinción de Romanowsky. Los neutrófilos displásicos pueden ser negativos. Los gránulos eosinofílicos son siempre (+). Monoblastos y Promonocitos pueden ser (-). El Sudan Negro B da idénticos resultados.
- **Cloroacetato Esterasa (CAE)** identifica especialmente células de linaje de granulocitos, de la etapa temprana de promielocito a neutrófilo maduro.

- **α -Naftil Acetato Esterasa (ANAE)** tiñe monocitos y megacariocitos en todas las etapas de maduración.
- **Azul de toluidina** tiñe los gránulos de basófilos y mastocitos.
- **La tinción de Acido Peryódico Schiff (PAS)** tiñe muchos tipos de células. No es específico de algún linaje, pero el patrón de tinción puede ser útil. (9, 17, 32, 37)

Citometría de flujo

- Los blastos mieloides expresan combinaciones de **CD34, CD13, CD117, HLA-DR, CD14 y CD15**. La **Glicoforina y CD42b** identifican a los blastos de las líneas eritroide y megacariocítica respectivamente.
- Es esencial separar LMA indiferenciada de la LLA. Se puede necesitar un complemento con la tinción APAAP para el inmunoreactivo de MPO citoplasmática.
- Es esencial para el diagnóstico de Leucemias bifenotípicas y detectar la expresión aberrante (promiscua) de antígenos.
- Puede identificar en pacientes fenotipos celulares únicos específicos de blastos.
- Puede identificar blastos de megacariocitos, eritrocitos, monocitos y granulocitos.
- Puede identificar contaminación leucémica de remisión de cultivos de médula ósea.
- Puede identificar recaídas tempranas. (27)

Inmunohistoquímica/Inmunofluorescencia

- APAAP tiñendo para MPOc, CD3c y CD79c debe hacerse en todos los casos de Leucemia aguda indiferenciada.
- Tinción con Inmunofluorescencia para la proteína nuclear PML debe hacerse en todos los casos de sospecha de LPA. Un patrón de micropartículas es diagnóstico de LPA. (32, 47)

Citogenética

- **LMA con t(8;21).**- La morfología y citoquímica de LMA t(8;21) es característica. Los blastos son de tamaño variable, pero tienen citoplasma basófilo, una región de Golgi prominente el cual colinda uno idéntico en el núcleo; bastones de Auer largos presentes en número variable; la mayoría de los casos son LMA-M2, pero el 10-15% son M1.
- **LPA y t(15;17).**- La maduración de células a la etapa de promielocitos es confirmado con tinción fuerte de CAE, la cual puede teñir los bastones de Auer; en la forma clásica la mayoría de las células son granulares, promielocitos hipergranulares; la forma variante hipogranular (microgranular) muestra los mismos núcleos bilobulado característico, pero el citoplasma aparece agranular y basófilo debido a que los gránulos presentes son muy pequeños para ser vistos por microscopio de luz.
- **Inv/del/t(16).**- Este subtipo de LMA se caracteriza por grandes células distintivas con gránulos inusuales; los núcleos en esta célula son grandes y monocitoides; en muchos casos entra en el criterio para LMA-M4 y por eso FAB la llama M4Eo; más eosinófilos maduros pierden los gránulos púrpuras y pueden aparecer bastantes normales; usualmente hay granulocitos severos y displasia en monocitos; pero la displasia en los tres linajes no es vista. (43, 44)

Genética Molecular

- Las tres principales translocaciones de buen pronóstico son detectados por RT-PCR, el cual puede ser usado por arriba del 40% de más casos que son encontrados por metafase en citogenética.
- Todas las translocaciones con genes con puntos de rompimiento son teóricamente detectados por RT-PCR.
- La PCR "tiempo real múltiple" puede estar disponible para el diagnóstico de rutina. (8, 13)
- RT-PCR es usado para monitorear velocidad de respuesta al tratamiento y puede ser predictivo para recaídas. (35)

6.4- Leucemia Mielocítica Crónica.

Imunofenotipo

Los blastos vistos en las fases acelerada y blástica no entran en el criterio de FAB. Alrededor del 70% de los casos en transformación blástica tienen un fenotipo mieloblástico (CD13+, CD33+ y algunas veces marcadores eritroides y de megacariocitos), 20% tienen fenotipo de linfoblasto (Tdt, CD10+, CD19+ y CD22+) y el 10% un fenotipo mezclado. (10, 27)

Citogenética

La demostración del cromosoma Ph se realiza usando las técnicas citogenéticas estándares en células leucémicas en metafase. La frecuencia del cromosoma Ph en muestras de médula ósea refleja el grado de sustitución en médula ósea por la clona leucémica. La técnica de FISH se usa para confirmar la presencia del gen BCR-ABL en el cromosoma Ph 22 (raramente en el cromosoma 9) y es particularmente útil en los casos de LMC Ph(-) y en los casos con translocaciones complejas. (38)

Biología Molecular

Análisis de Southern y Western blot se usan también para demostrar BCR-ABL. RT-PCR es especialmente útil en la detección de BCR-ABL para el análisis de la enfermedad mínima residual. (41)

6.4.1- Leucemia Mielomonocítica Crónica (LMMC).

La médula ósea mostrará una combinación de las características vistas en la EMP y en el SMD con una cuenta incrementada de monocitos periféricos ($>1 \times 10^9$ células/L en ausencia de otra causa). Una monocitosis puede ser vista en médula ósea, pero no siempre está presente. La t(9;22) no debe estar presente. (27)

6.4.2- Leucemia Mielocítica Crónica juvenil.

Usualmente se da en personas ≤ 5 años, predominante en hombres. No está asociado con el cromosoma Ph y produce cuentas más bajas de leucocitos que en la LMC Ph(+). Hay usualmente una monocitosis y casi siempre una trombocitopenia. Altos niveles de Hemoglobina fetal son comunes. En el 80% de los casos carecen anomalías genéticas identificables.

Como se ha visto a lo largo del presente trabajo, se han descrito mucho subtipos de Leucemias, que se han diferenciado gracias al apoyo de las herramientas de diagnóstico que se han desarrollado a lo largo de la Historia y las que actualmente tenemos, en un sentido esto es muy importante porque permitirá comprender el desarrollo de cada uno de estas patologías al identificar que clases de moléculas y células se expresan y nacen como parte del proceso patogénico de las enfermedades. Lamentablemente, el área de tratamiento no va a la par que el desarrollo diagnóstico. Esto significa que en la actualidad no existe un tratamiento específico para cada uno de los subtipos de Leucemias que se describieron (más recientemente) y que en muchos casos la quimioterapia y radioterapia combaten en forma general, a diversos tipos de clases de Leucemias.

Sin duda, este es el gran reto para la Ciencias Biomédicas, ya que si en un futuro contamos herramientas de diagnóstico y tratamiento correspondientes para cada subtipo de Leucemia que afecta al humano; se darán pasos agigantados para, en primer lugar, la **prevención** de las enfermedades leucémicas, ya que con las técnicas que contamos actualmente, son capaces de detectar moléculas que son indicadoras de desarrollo de un proceso leucémico, después, el **diagnóstico/tratamiento** de las diferentes clases de Leucemias, ya que una adecuada y certera detección de la enfermedad conllevaría a la elección del tratamiento adecuado o el más adecuado posible para radicar o por lo menos, mantener en remisión la enfermedad sin recaídas para prolongar el mayor tiempo posible de vida a los pacientes. Por último, con estas técnicas de diagnóstico también se puede realizar un **seguimiento** de la evolución del paciente con respecto al tratamiento que esta recibiendo, ya que se rastrea la presencia de la enfermedad mínima residual y de este modo se puede ir controlando la evolución del paciente para que no se den recaídas e ir en pro de la salud y prolongación máxima de la vida del paciente.

6.5- Papel del Químico Farmacéutico Biólogo en el desarrollo y establecimiento del Diagnóstico de las diferentes clases de Leucemias.

La formación académica del Químico Farmacéutico Biólogo (Q.F.B.) le permite desarrollar y aplicar sus conocimientos en el área diagnóstica de diferentes entidades patológicas; el cáncer como enfermedad que afecta al humano, es una entidad altamente compleja que requiere el desarrollo y mejoramiento de técnicas de diagnóstico e innovación en el tratamiento y terapia para detectar, controlar la evolución de la enfermedad y si es posible, curarla en forma definitiva.

Para llevar a cabo esta meta, se requiere de la participación de muchos profesionistas dedicados al área de la Salud, quienes tienen que interactuar de manera dinámica y constante para conseguir el bienestar y la salud del paciente.

El Q.F.B. es el profesionista del área de la Salud capaz de realizar, analizar, crear e innovar técnicas de diagnóstico de entidades patológicas, preferentemente perfilado en el área humana, aplicadas dentro del Laboratorio de Análisis Clínicos; además, es capaz de participar en el desarrollo de la Investigación Biomédica para desarrollar proyectos científicos que permitan el entendimiento de los mecanismos que originan e interfieren en la evolución y desarrollo de las diferentes patogenicias que originan las enfermedades que afectan al humano.

Con este perfil de conocimientos, el Q.F.B. juega un papel importante en la detección, a nivel del Laboratorio Clínico, de las diferentes clases de Leucemias; aspecto relevante para apoyar y complementar el trabajo realizado por la parte Clínica, ya que los médicos al contar con la información proporcionada del Laboratorio, les permite tener bases para llevar a cabo toma de decisiones que involucra la elección del tratamiento o terapia más adecuada para el paciente e ir vigilando la evolución que va teniendo el paciente contra la enfermedad.

Por último, cabe mencionar que la Medicina debe ser **preventiva** más que curativa; considerando este enunciado, las técnicas y métodos de diagnóstico clínico y experimentales son de suma importancia para evitar un desarrollo mayor de las Leucemias y que en etapas tempranas de dichas enfermedades, sea más fácil su manejo y tratamiento

para lograr el objetivo principal de todos los profesionistas que participamos en las áreas clínica, biomédica e investigación científica: la Salud de los pacientes.

7- CONCLUSIONES

La presente revisión ha enmarcado la historia del área de diagnóstico de las diferentes clases de Leucemias y es importante mencionar que en apenas un poco más de un siglo de tiempo, se han logrado avances verdaderamente trascendentales para, en primer lugar, identificar y catalogar esta enfermedad, en segundo lugar, diferenciar que hay varios tipos y subtipos pertenecientes a la Leucemia y por último, que las herramientas de diagnóstico han colaborado para el desarrollo y elección de tratamientos y terapias más adecuadas para conseguir la cura, o por lo menos, la prolongación máxima de la vida de los pacientes.

Las técnicas de diagnóstico abarcan, como hemos visto, los signos y síntomas que muestra el paciente, el análisis de muestras corporales como la sangre y biopsias de tejidos como médula ósea (células hematopoyéticas), ganglios linfáticos, entre otros, mediante la observación con el microscopio óptico. La relación entre la sintomatología presentada por los pacientes y las anomalías encontradas en las muestras analizadas fue la primera conexión entre las herramientas de diagnóstico para lograr la identificación y diferenciación de la enfermedad. Posteriormente, se dieron avances significativos en técnicas histológicas que permitieron una diferenciación mayor del tipo de células que se presentaban en pacientes con sintomatologías características de las Leucemias y el estudio morfológico fue ampliamente útil para marcar el criterio de la clasificación de las diferentes clases de Leucemias (aún en la actualidad dicho criterio sigue teniendo vigencia). Con el advenimiento del desarrollo de las técnicas citogenéticas se logró asociar aberraciones genéticas que tenían que ver con la expresión fenotípica de algunas clases de Leucemias y, al mismo tiempo, el análisis citoquímico de las células leucémicas permitió contar con los primeros marcadores a nivel celular para identificar de manera más nítida y detallada las células que se presentaban en cada clase de leucemia. Un "parte aguas" en las técnicas de diagnóstico fue el desarrollo de los anticuerpos poli y monoclonales, los cuales se utilizaron para identificar, de manera todavía más específica, marcadores a nivel de membrana celular, que permitían una diferenciación más fina de las células. Así entonces se desarrollaron técnicas relacionadas con el uso de los anticuerpos, por ejemplo, la Inmunocitoquímica y la Inmunofluorescencia.

Posteriormente, no solamente se aprovechó el análisis fenotípico de las células leucémicas, sino que se empezó a investigar el genotipo participante en el desarrollo de las diferentes

clases de Leucemias y entonces la ciencia empezó a enfocarse en los genes que controlaban la expresión y regulación del desarrollo de las Leucemias, así la Biología Molecular permitió a que se dieran los avances más significativos y poderosos que en la actualidad contamos.

La Biología Molecular es una herramienta que ha permitido el análisis de genes y de los productos de la traducción de dichos genes (proteínas o enzimas, por ejemplo) que parcialmente, se ha dilucidado su participación en la patogenia o en la identificación y diferenciación de las diferentes clases de Leucemias. Este aspecto es de gran relevancia, porque ha permitido entender el origen del desarrollo ciertos tipos de Leucemias, en otros casos, ha permitido identificar ciertos marcadores como genes quiméricos y sus respectivas proteínas quiméricas que están asociados a otras clases de Leucemias. Es decir, que cada vez se está profundizando y especializando en el área diagnóstica de las diferentes clases de Leucemias.

Es importante señalar, como se hizo en cada técnica revisada en el presente trabajo, que cada herramienta de diagnóstico tiene una serie de ventajas y desventajas en cuanto a sensibilidad, especificidad, realización y costos; y que la ejecución de las técnicas discutidas en el presente trabajo depende en gran medida, de la disponibilidad económica de cada centro de investigación o laboratorio clínico.

Cada método analizado en el presente trabajo, tiene información que en su conjunto, aporta un diagnóstico preciso y certero de cada una de las clases de Leucemias, los inconvenientes se presentan cuando un Laboratorio Clínico no cuenta con todos ellos y solamente disponga de ciertos equipos y áreas, por ejemplo, el uso de los datos del Laboratorio o en la Histología, junto con la Historia Clínica involucrando signos y síntomas; porque el diagnóstico, en ocasiones, no es certero. Como se vio en la clasificación más reciente de los trastornos hematopoyéticos, existen diversas variantes en un mismo tipo de Leucemia, las cuales no pueden ser diagnosticadas con las técnicas convencionales de Laboratorio o con el uso de la Histología o la Clínica. Por eso es importante tratar de contar con todas las técnicas discutidas en el presente trabajo para la identificación precisa del tipo de Leucemia. En conclusión, esta revisión permite poner en claro lo que se ha realizado desde finales del siglo XIX hasta principios del siglo XXI en el área de diagnóstico de las diferentes clases de Leucemias.

Los avances científicos y tecnológicos que se dieron durante el transcurso del siglo XX, permitieron realizar un análisis profundo de las células leucémicas, de tal manera, que se logró identificar marcadores bioquímicos y moleculares específicos de cada tipo de Leucemia, y es más, se logró hacer una diferenciación mayor con respecto a los primeros criterios que contó el área clínica para identificar las diversas clases de Leucemias.

También se ha logrado realizar un análisis genotípico de las células leucémicas y gracias a esto, se ha podido comprender (parcialmente) la naturaleza de estos procesos cancerígenos, independientemente de que a nivel diagnóstico, la diferenciación de los tipos de Leucemias se puede llevar a cabo a nivel genético; aspecto que sin lugar a dudas, permite una exactitud extraordinaria para la identificación de las Leucemias.

Desafortunadamente, el grado de avance que se ha tenido a nivel diagnóstico, no ha sido acompañado de igual forma con los avances en tratamientos terapéuticos de las Leucemias, y en la práctica, se ha visto que las alternativas que existen para tratar los diferentes tipos de Leucemias, se tienen que aplicar en algunas ocasiones, con el mismo criterio para diferentes clases de Leucemias, debido a que no existe un tratamiento específico para cada clase de Leucemia identificada; esto origina que tratamientos como la quimioterapia o radioterapia se usen en un amplio espectro de diferentes clases de Leucemias.

Esto indica que en algunas ocasiones, no es de gran utilidad realizar un diagnóstico tan exacto. si no se cuenta con un tratamiento igualmente específico para la clase de Leucemia que se identifica. Por lo que una tarea importante para el sector científico y clínico, será el hecho de buscar y probar nuevas alternativas terapéuticas, con la capacidad de combatir con eficiencia, las diferentes clases de Leucemias e intentar establecer un programa terapéutico con similar especificidad que a tenido el área diagnóstica para realizar la identificación de los diferentes tipos de Leucemias.

Falta mucho por hacer y averiguar, este punto es una tarea y responsabilidad que los profesionistas actuales y futuros deben y deberán asumir. El Químico Farmacéutico Biólogo cuenta con los conocimientos básicos para seguir apoyando el desarrollo del Diagnóstico en el Laboratorio Clínico de los diferentes tipos de Leucemias y de esta forma, apoyar al sector médico para el manejo adecuado de la enfermedad y lograr, en forma conjunta, la Salud del paciente.

8- REFERENCIAS

1. Abbas A.K., Lichtman A.H., Pober J.S. (1999). **Inmunología Celular y Molecular**. 3ª. Edición, Editorial Interamericana McGraw-Hill, España, pp. 22, 39-52, 64-68.
2. Abeloff M. (2000). **Clinical Oncology**. 2ª. Edición, Editorial Churchill Livingstone, EEUU, pp. 8-11, 2402-2408, 2451-2462, 2490-2496, 2536-2540, 2564-2567, 2579-2582.
3. Argüelles R.G. (1998). **Fundamentos de Hematología**. 2ª. Edición, Editorial Médica Panamericana, México D.F., pp. 180-208.
4. Barrera Saldaña A.H., Ortiz L.R. Reacción en Cadena de la Polimerasa. Una nueva época dorada en la Biología Molecular. Ciencia y Desarrollo, Volumen 5, Diciembre 1993, pp. 50-60.
5. Barthe C., Mahon F.X. Expression of Interferon - α (IFN α) Receptor 2c at Diagnosis is associated with Cytogenetic Response in (IFN α) treated Chronic Myeloid Leukemia. Blood, Volume 97, Número 11, Junio 1, 2001, pp. 3568-3573.
6. Block M. (1976). **Text – Atlas of Hematology**. Editorial Lea & Febiger, EEUU, pp. 5-6, 390-430.
7. Boggs D., Winkelstein A. (1985). **El Leucocito**. Editorial El Manual Moderno. México D.F., pp. 7-27.
8. Borrow J., Goddard D.A. Diagnosis of Acute Promyelocytic Leukemia by RT-PCR: Detection of PML RARA and RARA-PML fusion Transcripts. British Journal of Haematology, Volumen 82. 1992, pp. 529-540.
9. Brown B.A. (1993). **Hematology, Principles and Procedures**. 6ª. Edición, Editorial Lea & Febiger, EEUU, pp. 127-141.
10. Brümendorf T., Holyoake T. Prognostic implications of differences in Telomere length between normal and malignant cells from patients with Chronic Myeloid Leukemia measured by Flow Cytometry. Blood, Volumen 95, Número 6, Marzo 15, 2000, pp. 1883-1890.
11. Cruse J.M., Lewis R.E. (1999). **Atlas of Immunology**. Editorial CRC Press, EEUU, pp. 419-426, 431-433.

12. Díaz Barriga A.S., Bonilla S.R. (2001). **Técnicas Básicas en Citogenética (Elaboración y análisis de cariotipos)**. Editorial U.N.A.M., México, pp. 19-38, 45-52.
13. Diverio D, Rossi V. *Early Detection of Relapse by Prospective Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction Analysis of the PLM/RAR α Fusion Gene in Patients with Acute Promyelocytic Leukemia Enrolled in the GIMEMA-AIEOP Multicenter "AIDA" Trial.* Blood, Volumen 92, Número 3, Agosto 1, 1998, pp. 784-789.
14. Donovan W.J., Ladetto M. *Immunoglobulin Heavy-Chain Consensus Probes for Real Time PCR Quantification of Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia.* Blood, Volumen 95, Número 8, Abril 15, 2000, pp. 2651-2658.
15. Dyck A.J., Warrell P.R. *Rapid Diagnosis of Acute Promyelocytic Leukemia by Immunohistochemical Localization of PML/RAR- α Protein.* Blood, Volumen 86, Número 3, Agosto 1, 1995, pp. 862-867.
16. Guglielmi C., Martelli M.P. *Immunophenotype of adult and childhood Acute Promyelocytic Leukemia: Correlation with Morphology, Type of PML Gene Breakpoint and Clinical Outcome. A cooperative Italian study on 196 cases.* British Journal of Haematology, Volumen 102, 1998, pp. 1035-1041.
17. Henry J.B. (1993). **Diagnóstico y Tratamiento Clínico por el Laboratorio.** 9ª. Edición, Editorial Salvat, España, pp. 713-726.
18. <http://aids.med.nagoya-u.ac.jp/atlas/doc/nodc52.html> 08/Feb/2001
19. http://cancernet.nci.nih.gov/wyntk_pubs/leukemia.htm 20/Feb/2001
20. <http://imsdd.mcb.uni-bonn.de/Cancernet/spanish/201029.html> 08/Feb/2001
21. <http://molcelb2.unimaas.nl/fcn/flowcyt.html> 20/Feb/2001
22. <http://pingu.salk.edu/fcn/protocols/wholeblood.html> 19/Abr/2001
23. <http://stem.utmb.edu> 17/Abr/2001
24. http://www.asco.org/prof/mc/html/99abstracts/tbl/m_2443.htm 25/Abr/2001
25. <http://www.biotech.ufl.edu> 15/Feb/2001
26. <http://www.fpnotebook.com/HEM92.htm> 08/Feb/2001
27. <http://www.hmds.org.uk> 22/Feb/2001
28. <http://www.leukemia.org/CMS/body.cgi.../q&action=static&v=PF&pageID=38> 08/Feb/2001
29. <http://www.medical-library.org/journals3/leukemia.htm> 08/Feb/2001

30. http://www3.mdanderson.org/~oncolog/11_Test.html 20/Feb/2001
31. Hudson L., Hay F. (1989). **Practical Immunology**. 3ª. Edición, Editorial Blackwell Scientific Publications. Gran Bretaña, pp. 34-49.
32. Kiernan J. (1990). **Histological & Histochemical Methods**. 2ª. Edición, Editorial Pergamon Press, Gran Bretaña, pp. 92, 182, 186, 207-208, 281-286, 333, 349-350.
33. Kolomietz E., Al-Maghrabi J. *Primary chromosomal rearrangements of Leukemia are frequently accompanied by extensive submicroscopic deletions and may lead to altered prognosis.* Blood, Volumen 97, Número 11, Junio 1, 2001, pp. 3581-3588.
34. Lengauer C., Kinzler W.K., Vogelstein B. *Genetic Instabilities in Human Cancers.* Nature, Volumen 396, Diciembre, 17, 1998, pp. 643-650.
35. Lo Coco F., Diverio D. *Genetic Diagnosis and Molecular Monitoring in the Management of Acute Promyelocytic Leukemia.* Blood, Volumen 94, Número 1, Julio 1, 1999, pp. 12-22.
36. Margni R. (1996). **Inmunología e Inmunquímica, Fundamentos**. 5ª. Edición, Editorial Médica Panamericana, México D.F., pp. 723-725.
37. McKenzie S. (1991). **Hematología Clínica**. Editorial El Manual Moderno, México D.F., pp. 283-292, 306-308, 314-327, 331-365.
38. Migliazza A., Bosch F. *Nucleotide Sequence, Transcription Map, and Mutation Analysis of the 13q14 chromosomal region deleted in B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia.* Blood, Volumen 97, Número 7, Abril 1, 2001, pp. 2098-2104.
39. Mullis K.B. *The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction.* Scientific American, Volumen 262, Abril 1990, pp. 36-43.
40. Pandolfi P.P. *Oncogenes and tumor suppressors in the molecular pathogenesis of Acute Promyelocytic Leukemia.* Human Molecular Genetics, Volumen 10, Número 7, 2001, pp. 769-775.
41. Preudhomme C., Revillion F. *Detection of BCR-ABL Transcripts in Chronic Myeloid Leukemia using a Real Time Quantitative RT-PCR Assay.* Leukemia, Volumen 13, Número 6, Junio 1999, pp. 957-964.
42. Price S., Wilson L. (1992). **Pathophysiology, Clinical Concepts of Disease Processes**. 4ª. Edición, Editorial Mosby Year Book, EEUU, pp. 192-201.

43. Rooney D.E., Czepulkowski B.H. (1992). **Human Cytogenetics, A Practical Approach**. Editorial Oxford University Press, EEUU, pp. 16-19.
44. Salamanca F. (1990). **Citogenética Humana**. Editorial Médica Panamericana, México D.F., pp. 35-40, 120-125.
45. Tierney L. (1997). **Diagnóstico Clínico y Tratamiento**. Editorial El Manual Moderno, México D.F., pp. 464-472.
46. Uribe E. (1995). **Tratado de Medicina Interna**. 2ª. Edición, Editorial Médica Panamericana, volumen 2, México D.F., pp. 1222-1231.
47. Weiss L. (1976). **Histology**. 4ª. Edición, Editorial McGraw-Hill, EEUU, pp. 437-439.