



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD
DR. GAUDENCIO GONZÁLEZ GARZA.

CENTRO MEDICO NACIONAL "LA RAZA"

**CELULAS DENDRITICAS Y LINFOCITOS T CITOXICOS EN PACIENTES PEDIATRICOS CON
LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA EN DIFERENTES ETAPAS DE LA ENFERMEDAD**

TESIS DE POSTGRADO
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE SUBESPECIALISTA EN :

HEMATOLOGIA PEDIATRICA

PRESENTA:

DRA. BERENICE SANCHEZ JARA

ASESORES DE TESIS

DRA. MARIA TERESA DUEÑAS GONZALEZ
DRA. ELVA JIMENEZ HERNANDEZ
DR. RAFAEL JIMENEZ FLORES

MÉXICO, D.F. 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

DEDICATORIA

A mi hijo, a quien nunca podré regresar el tiempo robado; Luis Manuel: eres el motor de mis esfuerzos, mi inspiración y mi motivo.

A mi hija, Silvia Angélica, por ser una nueva luz y esperanza en mi vida.

A mi Esposo, Alfonso: por tu amor, comprensión y compañía, por tu constante respaldo. Gracias por estar a mi lado.

A mis Padres, por dejar todo y apoyarme en este sueño, mi esfuerzo ha sido tan solo la mitad del suyo y siempre les estaré agradecida, sin ustedes no lo hubiera logrado.

A mis hermanos Enrique, Hugo y Ramón, que son la extensión de mi alma.

AGRADECIMIENTOS

A mis profesores, por darme su tiempo y brindarme sus enseñanzas.

A todos los niños a quienes he tenido la bendición de conocer, ustedes son mis mejores maestros y los llevo en mi corazón siempre.

A quienes hicieron posible la realización del presente trabajo, regalándome muchísimas horas de su valioso tiempo, muchas gracias Dra. Dueñas, Dra. Jiménez, Dr. Jiménez, Quím. Wendy Caldera, Dra. Berges, Dra. Espinoza, Dr. Martínez Amigón.

Y por supuesto a Dios, por darme esta vocación y la maravillosa oportunidad de seguir en ella.

INDICE

Resumen.....	5
Marco teórico.....	6
Justificación.....	12
Objetivo General.....	13
Objetivos Específicos.....	13
Hipótesis.....	15
Material y Métodos.....	16
Diseño.....	17
Análisis Estadístico.....	17
Resultados.....	18
Discusión.....	21
Conclusiones.....	24
Bibliografía.....	26
Cuadros y Figuras.....	28
Anexos.....	38

RESUMEN

CELULAS DENDRITICAS Y LINFOCITOS T CITOTOXICOS EN PACIENTES PEDIATRICOS CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA EN DIFERENTES ETAPAS DE LA ENFERMEDAD.

Introducción: Se ha observado que hay infiltración de células dendríticas en varios tipos de cánceres humanos; este hecho se correlaciona con un pronóstico favorable de la enfermedad, dado que las mismas podrían ser capaces de inducir y mantener una respuesta inmune apropiada y de inhibir el crecimiento tumoral. La causa de la infiltración aún no es clara; el hecho de encontrarse en íntimo contacto con las células neoplásicas sugiere una función captadora y presentadora de antígenos tumorales a las células efectoras de la respuesta inmune. Sin embargo, en algunos casos se ha observado que las células tumorales liberan sustancias inhibitoras que impiden la proliferación y la funcionalidad de las células dendríticas, por lo que el tumor escapa al control del sistema inmune, produciéndose la progresión del mismo.

Objetivo: Conocer la cantidad de células dendríticas y linfocitos T citotóxicos en niños con leucemia linfoblástica aguda en diferentes etapas de la enfermedad.

Material y Métodos: Se realizó un estudio transversal analítico, incluyendo pacientes con leucemia linfoblástica aguda (LLA), menores de 16 años al diagnóstico, tratados en el Servicio de Hematología Pediátrica del Centro Médico Nacional La Raza IMSS. Se cuantificaron las células dendríticas y linfocitos T citotóxicos mediante anticuerpos monoclonales por citometría de flujo en sangre venosa periférica y médula ósea, en pacientes con LLA de novo, recaída y en vigilancia.

Análisis estadístico: Las variables cualitativas se resumieron mediante porcentajes y números absolutos, las cuantitativas sin distribución normal mediante mediana, cuartiles y valores mínimo y máximo, y pruebas de U de Mann-Witney y Kruscal Wallis; y para la correlación prueba no paramétrica "r" de Spearman y comparación entre grupos por la prueba de long-rank, considerándose P estadísticamente significativa <0.05 . Los resultados se presentan en cuadros y figuras.

Resultados: Las células dendríticas monocitoides y plasmocitoides se encontraron disminuidas tanto en porcentaje como en números absolutos, o incluso ausentes tanto en médula ósea como en sangre periférica en los pacientes con diagnóstico de Leucemia Linfoblástica aguda de novo y en recaída, para mostrar incremento en los pacientes del grupo de vigilancia que se tomó como grupo control, con diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.000$). Hubo correlación moderada entre la cantidad de CD8 y de células dendríticas en médula ósea de pacientes con actividad leucémica.

Conclusiones: Las células dendríticas se encuentran disminuidas tanto en médula ósea como en sangre periférica de pacientes con leucemia linfoblástica aguda en actividad y con valores cercanos a lo normal en el grupo de vigilancia, lo que demuestra que muy probablemente las células dendríticas juegan un importante papel para el control de la enfermedad.

Palabras clave:

Leucemia linfoblástica Aguda, Células Dendríticas, Linfocitos T Citotóxicos.

MARCO TEORICO

LEUCEMIA

La leucemia es una enfermedad maligna de la médula ósea (MO), caracterizada por la proliferación y crecimiento incontrolado de células sanguíneas. Se clasifican en agudas y crónicas; por el linaje celular en mieloide y linfoide, y dentro de la línea linfoide B o T. Las leucemias linfoides se originan por alteración clonal en los precursores de los linfocitos en la MO¹.

LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA

La Leucemia Linfoblástica aguda (LLA), es una enfermedad heterogénea; de acuerdo a la clasificación de la FAB existen 3 subtipos morfológicos: L1, L2 y L3, y con el desarrollo de anticuerpos monoclonales en la década de los años 80, se clasificó en B o T. Los antígenos de diferenciación celular, expresados en los blastos linfoides de la LLA, caracterizan el inmunofenotipo de la LLA de linaje T: CD7+, CD3+, y de linaje B: CD19+, CD22+, CD79+. Las LLA de linaje B ocupan el 85% de las leucemias linfoblásticas de la infancia y de linaje T solo el 15%, con características clínicas y pronóstico diferente^{1,2,3}.

CELULAS DENDRITICAS

Las células dendríticas (CD) se originan a partir de células de la médula ósea, de un progenitor común, que, bajo estímulos de determinadas citocinas pueden generar dos tipos de poblaciones precursoras, CD1a y CD14, las cuales maduran a CD de distintas características. La primera dará origen a células con gránulos de Birbeck, y los antígenos Lag y E-catherina, marcadores típicos de las células de Langerhans, y las segundas podrán diferenciarse a macrófagos o CD carentes de gránulos que expresan marcadores como; CD2, CD9 y CD68.

También se ha considerado que el monocito sanguíneo bajo el estímulo de GM-CSF e IL-4 puede dar origen a CD inmaduras.⁴

Las CD se encuentran presentes en los órganos linfoides periféricos donde maduran hasta convertirse en eficientes Células Presentadoras de Antígeno (APC). En ocasiones se les denomina de acuerdo al tejido y zona donde se encuentran.⁵

En el bazo son numerosas en la periferia del área de linfocitos T. En los centros germinales de los folículos secundarios de las áreas de linfocitos B, son CD denominadas foliculares dendríticas, al igual que en los nódulos linfáticos, estas células foliculares dendríticas forman parte integral del

microambiente del folículo. También están presentes en el timo, sobre todo en la región medular. Las CD denominadas interdigitantes disponen de pocos fagosomas y lisosomas y no hacen endocitosis in vivo, expresan altos niveles de CD83 y dos proteínas intracelulares llamadas p55 y S100.^{5,6}

Una vez que las CD que se encuentran en los tejidos periféricos han fagocitado, migran a los nódulos linfáticos a través de la linfa donde se encuentran como células veladas. En la zona T del nódulo, las CD interdigitantes activan las células T específicas de antígeno. Durante su migración ocurre un proceso de maduración que involucra la pérdida de la capacidad fagocítica y aumenta sus propiedades estimuladoras para linfocitos T CD4+ y T CD8+ vírgenes. En sangre periférica en condiciones normales las CD son muy escasas ya que representan menos del 2% de las células mononucleadas.⁵

TIPOS DE CELULAS DENDRITICAS

Se han identificado dos subpoblaciones de CD, ambas son positivas para el MHC clase II y negativas para antígenos específicos de línea : CD3, CD14, CD16, CD19; pero se pueden reconocer CD maduras con la expresión de CD11c+ CD83+, CD40+, CD80+, CD86+ ó CD inmaduras con la expresión de CD11c- CD1a+, CD83-, CD40+, CD80+, CD86+ (7, 8), o también las han clasificado como CD monocitoides (CDm) con la expresión de CD11+ y CD plasmocitoides (CDp) con la expresión de CD123+ y CD11-.^{9,10,11}

MOLECULAS DE SUPERFICIE

Las moléculas de superficie contribuyen a la función de las CD tanto en la unión célula-célula como en la señalización. La primera característica significativa es que las CD no tiene marcadores únicos: las distintas poblaciones de CD presentan una marcada heterogeneidad en la expresión de sus moléculas de superficie y distintas moléculas de adhesión de acuerdo a su entorno.

La función presentadora de antígeno esta asociada con un alto nivel de DEC-205, una proteína de membrana homóloga al receptor de manosa del macrófago, que es capaz de unirse a carbohidratos y mediar la endocitosis.⁶

FUNCION

El papel de las CD es presentar antígenos e inducir a los linfocitos a iniciar la respuesta inmune. La activación del linfocito T da origen a dos procesos: proliferación celular y diferenciación a las células efectoras. Las células diferenciadas son altamente especializadas. Las CD de tejidos normales, todavía

inmaduras, pueden capturar y procesar antígenos eficientemente, pero activan débilmente a los linfocitos T.⁵

Después de un proceso infeccioso, toxicidad o necrosis, las CD inician su maduración. Esto implica grandes cambios en sus propiedades reduciéndose notoriamente la capacidad de capturar antígenos y aumentando la expresión de moléculas de superficie con lo que adquieren la posibilidad de activar los linfocitos T. La activación de las APC para iniciar su papel de inductor es rápida y puede ser ejercida por el mismo inmunógeno o por un adyuvante. Sin embargo, las citocinas producidas por los linfocitos T (IFN- γ , GM-CSF, TNF α) son los que mejor activan a las APC. La maduración se completa después de la interacción con linfocitos T y se caracteriza por la disminución de su capacidad fagocítica y la síntesis de citocinas como TNF-, IL-1.^{11, 12.}

Cuando las APC están activadas expresan mayor cantidad de moléculas de clase I y II del MHC, receptores para Células Foliculares y moléculas de adhesión (coestimuladoras). El linfocito T se estimula a través de la unión de sus receptores específicos con péptidos antigénicos procesados por las APC. Esta interacción produce la inmunidad específica para este péptido en particular. Los linfocitos T requieren de dos tipos de señales para iniciar esta respuesta. La primera señal es la producida por la unión del receptor complejo TCR/CD3, con péptidos antigénicos unidos a la molécula de clase II del MHC de una APC. La segunda señal, coestimuladora, no involucra al antígeno y está dada por las moléculas de adhesión presentes en las APC profesionales que pueden ser CD, macrófagos, o Linfocitos B activados que expresen moléculas de clase II del MHC.

Los linfocitos T no pueden responder sin estas señales: cuando son activados por el antígeno, pero no reciben el estímulo de la señal coestimuladora, se vuelven inactivos, alcanzando un estado de tolerancia inmunológica específica para ese antígeno.

Los linfocitos T colaboradores, producen citocinas que también son capaces de actuar como la segunda señal. El INF- α puede inducir la expresión de moléculas de clase II del MHC, en una gran variedad de células epiteliales o endoteliales, que habitualmente no la expresan, por lo que, de ese modo, podrían actuar como APC no profesionales. Las células de Langerhans, localizadas en la epidermis suprabasal, representan una de las principales APC involucradas en el procesamiento y presentación de antígenos a los linfocitos T, que puede ser completo o como péptidos, mientras que otras CD, sólo pueden presentar antígenos procesados.⁶

CÉLULAS DENDRÍTICAS Y CÁNCER

Se ha observado en varios tipos de cánceres humanos que están infiltrados por CD; el carcinoma broncogénico, el adenocarcinoma gástrico y de colon, el carcinoma nasofaríngeo, el carcinoma papilar de tiroides, el carcinoma laríngeo, el carcinoma de cuello uterino, el carcinoma de riñón, el carcinoma de esófago y el melanoma de piel constituyen algunos ejemplos. Clásicamente se ha correlacionado este hecho con un pronóstico favorable de la enfermedad, dado que las CD podrían ser capaces de inducir y mantener una respuesta inmune apropiada capaz de inhibir el crecimiento tumoral y la posibilidad de dar metástasis. Aunque el motivo de la infiltración en los tumores por las CD aún no está claro, el hecho de encontrarse en íntimo contacto con las células neoplásicas sugiere una función captadora y presentadora de antígenos tumorales a las células efectoras de la respuesta inmune. No obstante, se ha demostrado que en algunos casos, las células tumorales presentan péptidos sintetizados por ellas mismas en el contexto de las moléculas de clase I del MHC, estimulando directamente a los linfocitos CD8. Sin embargo, en algunos casos se ha observado que las células tumorales liberan sustancias inhibitoras que impiden la funcionalidad de las CD, por lo que el tumor escapa al control del sistema inmune, produciéndose la progresión del mismo. Esto se observa en el carcinoma de células renales, donde a pesar de encontrarse un importante infiltrado de CD, los bajos niveles de moléculas coestimuladoras en estas células inducirían una tolerancia al tumor. Este hecho además se ha relacionado con la elaboración por parte de las células tumorales de IL-10 que actúa como una molécula supresora de la función de CD57.¹²

Actualmente se ha identificado una subpoblación de CD que expresa CD8+, localizada en las áreas centrales y periféricas de tumores junto con células inflamatorias y linfocitos T. Estas CD pueden producir lisis de clones de linfocitos T específicos para antígenos tumorales, mecanismo que explicaría la progresión de ciertos tumores a pesar de estar densamente infiltrados por CD⁶

En lesiones pre-neoplásicas, como las displasias de cuello uterino, el número de CD intraepiteliales está en relación directa con el grado de maduración epitelial, y en los carcinomas 'in situ' se ha observado una marcada depleción de células de Langerhans con respecto a controles normales^{6,13}

La generación de inmunidad contra el cáncer requiere de la participación de APC que reconozcan el tumor así como el proceso y presentación de antígenos a los linfocitos T. Las CD son las encargadas de iniciar y coordinar la respuesta en contra del desarrollo de tumores, sin embargo, este control ocasionalmente falla por mecanismos como la delección de los Linfocitos T citotóxicos específicos de tumor, o la inhibición celular; se ha sugerido también la incapacidad del tumor para estimular a las CD, contribuyendo esto a la evasión inmune¹¹.

Es relevante que la estructura de muchos de los antígenos tumorales conocidos son idénticos o muy parecidos a los antígenos propios del paciente lo cual puede condicionar tolerancia ¹⁴

Recientemente se han reportado efectos inhibitorios del tumor hacia la maduración y diferenciación de las CD, lo cual juega un papel crucial en la falla de la respuesta sistémica ante la presencia del tumor. Varios factores derivados del tumor como: factor de crecimiento derivado del endotelio, Interleucinas, factor estimulante de colonias de Macrófagos, afectan la diferenciación de las CD a partir de progenitores *in vitro* e *in vivo*. Esto reduce frecuentemente la cuenta de CD encontradas en sangre periférica en pacientes con cáncer. ^{11, 15} J. Vakkila y Cols. publicaron en el 2004 los resultados de la determinación de CDp y CDm en 19 pacientes pediátricos con diversos tipos de cáncer al momento de su diagnóstico, excluyéndose aquellos pacientes con neoplasias hematológicas, y los compararon con un grupo control, encontrando en los primeros una reducción significativa en la cantidad de CDm y, una correlación positiva entre el incremento de las CDp y un pobre pronóstico ¹⁶. Sin embargo en un estudio realizado en el Departamento de Trasplante de Médula Ósea, Oncología y Hematología de la Universidad Médica de Wroclaw Polonia, en pacientes pediátricos con los diagnósticos de: Leucemia Linfoblástica Aguda, Leucemia Mieloide Aguda, Linfoma no Hodgkin, Enfermedad de Hodgkin, y tumores sólidos, reportan un incremento en los niveles de CD en sangre periférica al momento del diagnóstico, recaída o progresión de la enfermedad en comparación con el grupo control, refieren además que encontraron correlación positiva con la cantidad de linfocitos T citotóxicos, lo que sugiere que también en las neoplasias hematológicas hay un incremento de las CD y LT citotóxicos pero probablemente no funcionales. ¹⁷

Se han intentado varias estrategias para incrementar el reconocimiento de las CD hacia las células leucémicas y tumores. Una estrategia prometedora es la diferenciación de células tumorales a CD y de éstas a APC funcionales. Tales células además de ser funcionales expresan los antígenos tumorales. Existen estudios que han demostrado la diferenciación de blastos de leucemia mieloide aguda o crónica a CD⁸. En un estudio realizado por Mohamad Mohty y Cols. en Marseille Francia entre 1993 al 2000 demuestran la generación de CD a partir de linfocitos B y células leucémicas B en presencia de IL-4 y CD40L, estas células tienen un fenotipo de APC maduras y pueden inducir una respuesta proliferativa potente en las células T CD4+. Lo que resulta prometedor para el desarrollo de la inmunoterapia ¹⁸

Con base al estudio de Mami y Cols. quienes reportaron reducción en CD en pacientes adultos y pediátricos con LLA de células pre B, Maecker y Cols. en 2006 analizaron las CD en sangre periférica en 55 pacientes pediátricos con LLA al momento del diagnóstico, comparando los resultados con

controles sanos, mediante citometría de flujo, encontrando las CD marcadamente disminuidas en niños con LLA de células pre B pero elevadas en pacientes con LLA de precursores T. En los controles se encontró una media de CDm de 20/ μ l y CDp de 16/ μ l, contrastando con la cifra de los pacientes con LLA pre B de 2.2 CDm/ μ l y 0.5 CDp/ μ l de SP. Los pacientes con LLA de células T mostraron niveles significativamente elevados con una media de 98 CDm/ μ l y 28 CDp/ μ l, observándose una correlación positiva con la cantidad de neutrófilos y monocitos. Los pacientes con LLA de células B con expresión aberrante de marcadores mieloides (CD13, CD33 y MPO) presentaron menor cantidad de CDm. Concluyen que la cantidad de CDm esta normal o aumentada en pacientes con LLA de células T ya que estos precursores expresan MHC y moléculas coestimuladoras que se encuentran disminuidas en pacientes con LLA de células B.¹⁹

Con el sustento previo se planteó conocer la cantidad de CD y Linfocitos T citotóxicos en sangre periférica y médula ósea de pacientes pediátricos con LLA en diferentes etapas de la enfermedad y buscar una correlación entre ambos tipos de células.

JUSTIFICACION

La generación de inmunidad contra el cáncer requiere de la participación de APC que reconozcan el tumor así como el proceso y presentación de antígenos a los linfocitos T. Las CD son las encargadas de iniciar y coordinar la respuesta en contra del desarrollo de tumores, sin embargo, este control ocasionalmente falla por mecanismos como la delección de los Linfocitos T citotóxicos específicos de tumor, o la inhibición celular; se ha sugerido también la incapacidad del tumor para estimular a las CD, contribuyendo esto a la evasión inmune. Existen varios estudios a nivel internacional principalmente en tumores sólidos pero se conoce poco en neoplasias hematológicas sobre todo en leucemias agudas de niños con relación a la presencia y el comportamiento de las CD, por lo que consideramos que el realizar un estudio en nuestra población pediátrica con leucemia linfoblástica aguda aportará conocimiento en las diferentes etapas de la enfermedad que podrá servir de base para otros estudios hasta los de diferenciación a APC funcionales e inmunoterapia.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

1. Conocer cual es la cantidad de células dendríticas y linfocitos T citotóxicos en niños con leucemia linfoblástica aguda en diferentes etapas de la enfermedad.
2. Comparar la cantidad de células dendríticas y linfocitos T citotóxicos de niños con leucemia linfoblástica aguda con y sin actividad leucémica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.1 Conocer cual es la cantidad de células dendríticas en sangre periférica y/o médula ósea en niños con leucemia linfoblástica aguda al momento del diagnóstico.
- 1.2 Conocer cual es la cantidad de células dendríticas en sangre periférica y/o médula ósea en niños con leucemia linfoblástica aguda en fase de vigilancia, tres años posterior al logro de remisión completa.
- 1.3 Conocer cual es la cantidad de células dendríticas en sangre periférica y/o médula ósea en niños con leucemia linfoblástica aguda durante una recaída.
- 1.4 Conocer cual es la cantidad de linfocitos T citotóxicos en sangre periférica y/o médula ósea en niños con leucemia linfoblástica aguda al momento del diagnóstico.
- 1.5 Conocer cual es la cantidad de linfocitos T citotóxicos en sangre periférica y/o médula ósea en niños con leucemia linfoblástica aguda en fase de mantenimiento, tres años posterior al logro de remisión completa.
- 1.6 Conocer cual es la cantidad de linfocitos T citotóxicos en sangre periférica y/o médula ósea en niños con leucemia linfoblástica aguda durante una recaída.
- 2.1 Conocer cual es la cantidad de células dendríticas en sangre periférica y/o médula ósea en niños con leucemia linfoblástica aguda en actividad de la enfermedad.
- 2.2 Conocer cual es la cantidad de células dendríticas en sangre periférica y/o médula ósea en niños con leucemia linfoblástica aguda sin actividad de la enfermedad.
- 2.3 Conocer cual es la cantidad de linfocitos T citotóxicos en sangre periférica y/o médula ósea en niños con leucemia linfoblástica aguda en actividad de la enfermedad.

- 2.4 Conocer cual es la cantidad de linfocitos T citotóxicos en sangre periférica y/o médula ósea en niños con leucemia linfoblástica aguda sin actividad de la enfermedad.
- 2.5 Comparar la cantidad de células dendríticas en sangre periférica y/o médula ósea en niños con leucemia linfoblástica aguda con y sin actividad de la enfermedad.
- 2.6 Comparar la cantidad de linfocitos T citotóxicos en sangre periférica y/o médula ósea en niños con leucemia linfoblástica aguda con y sin actividad de la enfermedad.

HIPOTESIS

HI

La cantidad de células dendríticas y linfocitos T citotóxicos de niños con leucemia linfoblástica aguda con actividad leucémica es menor que en los que no presentan actividad.

HO

La cantidad de células dendríticas y linfocitos T citotóxicos de niños con leucemia linfoblástica aguda con y sin actividad leucémica es similar.

PACIENTES, MATERIAL Y METODOS

Una vez que se autorizó el protocolo por el comité Local de Investigación en Salud de esta UMAE con el número R-2008-3502-6, se inició un estudio transversal analítico durante el periodo comprendido del 01 Abril de 2008 al 27 de enero de 2009 en el Servicio de Hematología Pediátrica del Centro Médico Nacional La Raza IMSS. Se incluyeron pacientes con Leucemia Linfoblástica aguda, menores de 16 años al diagnóstico, independientemente de su género y en las siguientes etapas de la enfermedad: LLA de novo, recaída y pacientes en vigilancia con mínimo de tres años de remisión completa continua que se tomaron como grupo control, de acuerdo con los criterios clínicos y hematológicos establecidos (anexo No. 1).

Se realizó aspirado de médula ósea (AMO) de pacientes pediátricos con datos clínicos y paraclínicos sugestivos de Leucemia Linfoblástica Aguda. (anexo No. 2).

A los pacientes con el diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda, se les tomó como parte de los estudios de diagnóstico, muestra sanguínea venosa periférica, mediante punción para los siguientes estudios: Biometría Hemática Completa, Química sanguínea con urea, creatinina y electrolitos séricos (Na, K, Ca, P), Pruebas de funcionamiento hepático: AST, ALT, DHL, ácido úrico, policultivos, serología viral para hepatitis B, hepatitis C, VIH, CMV, EB, y Toxoplasma.

Todos los estudios anteriores se realizan rutinariamente a todo paciente como parte del protocolo de estudio para integrar el diagnóstico, ya sea de novo, recaída o de remisión; para la cuantificación de células dendríticas y linfocitos T citotóxicos, la muestra se obtuvo en la misma punción de los estudios de rutina.

El diagnóstico de LLA B o T se estableció con blastos del 25% o mayor, morfología linfoide de acuerdo con los criterios de la FAB e inmunofenotipo (anexo No. 3 y 4) en el AMO. La muestra de MO y sangre periférica (SP), se marcó con anticuerpos monoclonales específicos para células dendríticas y linfocitos T citotóxicos y se procesó mediante citometría de flujo en el área de Hematología Especial del Laboratorio del CMN La Raza Hospital General. La cantidad de CD, se cuantificó en 10 000 eventos, se presentó en porcentaje y total de eventos. La cantidad de CD8 se midió en porcentaje de 10 000 eventos en MO y en total/ μ l en SP (anexo No. 4).

DISEÑO

Transversal analítico

ANALISIS ESTADISTICO

Las variables cualitativas se resumieron mediante porcentajes y números absolutos, las cuantitativas sin distribución normal mediante medianas, cuarteles, valores mínimo, máximo, y pruebas de U de Mann-Witney y Kruscal Wallis; para la correlación bivariada, prueba no paramétrica “r” de Spearman y comparación entre grupos por la prueba de long-rank, considerándose P estadísticamente significativa <0.05 .

Los datos se presentan en cuadros y figuras.

RESULTADOS

Se incluyeron 39 pacientes, de los cuales 27 fueron del sexo masculino (69%) y 12 del sexo femenino (31%); 19 pacientes con diagnóstico de novo, 8 pacientes en recaída y 12 en Vigilancia por lo menos con 3 años de remisión completa continua, tomados como grupo control.

Las características clínicas y de laboratorio de los pacientes fueron acordes al estadio de la enfermedad en que se encontraron a la toma de la muestra (cuadro No. 1 y 2).

La mediana de edad del grupo general fue de 8 años con un mínimo de 1 año y máximo de 15 años. En todos los grupos estudiados hay predominancia del género masculino, con una razón Hombre:Mujer de 2.4:1. Como era de esperarse, los pacientes de menor edad fueron ubicados al diagnóstico, y los de mayor edad en vigilancia. El diagnóstico morfológico predominante fue el subtipo L1 de la FAB, y la clasificación inmunológica de células B en el 95% de los pacientes

En el grupo general se encontró disminución de los valores de las CD tanto en MO como en SP, especialmente las CDp. (cuadro No.3)

Del grupo de 19 pacientes con diagnóstico de novo la mediana de edad fue de 5 años con un mínimo de 1 año y un máximo de 15 años. Las alteraciones más constantes encontradas en la biometría hemática fueron: pancitopenia con presencia de blastos en sangre periférica. Doce (63%) de los pacientes fueron de alto riesgo por uno o más de los siguientes criterios: Edad igual o mayor a 10 años, hiperleucocitosis, inmunofenotipo T, masa mediastinal, falta de respuesta a prednisona, infiltración inicial a sistema nervioso central y cromosoma Filadelfia (en 2 pacientes).

De los 8 pacientes en recaída la mediana de edad fue de 8 años con un mínimo de 2 y máximo de 13 años. Se documentó en todos infiltración a médula ósea, con la siguiente distribución: recaída a médula ósea aislada: 5 pacientes, recaída a médula ósea y sistema nervioso central: 2 pacientes, recaída a médula ósea y testículo: 1 paciente. Cuatro de ellos (50%) fueron de alto riesgo al diagnóstico inicial. En cuanto a la biometría hemática de este grupo, la alteración principalmente encontrada fue trombocitopenia, ninguno reporto blastos en sangre periférica. En este grupo se encontró la menor cantidad de células dendríticas tanto en MO como en SP. (cuadro No.3).

El grupo control fue conformado por 12 pacientes en vigilancia, 3 de ellos fueron de alto riesgo al diagnóstico inicial; con mediana de edad de 9.5 años, mínimo 1 año y máximo 16 años; mediana y la moda de remisión completa continua de 3 años, con un mínimo de 3 años y máximo de 13 años. La biometría hemática de estos pacientes dentro de parámetros normales. En este grupo se encontró incremento en la cantidad de CDm y CDp así como de LTCD8 tanto en M.O. como en S.P. con respecto a los dos grupos anteriores, y con valores similares a los reportados en la literatura de sangre periférica en niños sanos. (cuadro No.3)

En la cuantificación y resultados de las CD) y Linfocitos T CD8 en MO y SP de los pacientes por grupo de estudio, encontramos que las CDm y las CDp estuvieron disminuidas tanto en porcentaje como en números absolutos, o incluso ausentes en ambos compartimientos en los pacientes con diagnóstico de novo y en recaída, para mostrar incremento en los pacientes del grupo de Vigilancia, con diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.000$). (figura 1-6) (cuadro No. 3).

La cantidad de LT citotóxico se encontraron disminuidos en MO y SP al diagnóstico de novo y en recaída, y con valores mayores en los pacientes en vigilancia. En el grupo general la correlación entre las cantidades de CD8 con las subvariedades de CD fue: para CDm en MO: $r=0.584$ ($P=0.003$) (figura No.7) y en sangre periférica $r=0.121$ ($P=0.556$); y para CDp en MO: $r=0.545$ ($P=0.007$) (figura No.8). Para CDp en SP: $r=0.196$ ($P=0.338$), teniendo correlación moderada de CD8/CDm y CD8/CDp solo en MO. Este mismo cálculo se realizó en cada grupo estudiado sin encontrarse correlación.

Se dividió a los pacientes en dos grupos, uno con actividad leucémica incluyendo a los diagnóstico de novo y recaída y el otro sin actividad leucémica (grupo de vigilancia) encontrándose en el grupo con actividad leucémica CD disminuidas o ausentes tanto en MO y SP, con cifras mayores en los pacientes sin actividad leucémica (grupo control) mostrando diferencia estadísticamente significativa ($P=0.000$) (cuadro No. 4) (figura No.9-11). En el grupo con actividad se encontró correlación moderada entre CDp y CD8 en médula ósea (figura No.12), con $r=0.666$ y $p=0.003$, no así en sangre periférica.

Se encontró una mayor cantidad de CD en el grupo de pacientes que presentaron marcador mieloides aberrante en comparación con lo que no lo presentaron, observado mediante las medianas de los grupos pero sin diferencia estadísticamente significativa.

Hasta la fecha de revisión (27-Ene-2009) el estado de los pacientes es el siguiente: Del grupo de pacientes con diagnóstico de novo; 16 de 19 pacientes se encuentran en Remisión Completa recibiendo quimioterapia, 2 de estos se les detectó cromosoma Filadelfia, tres fallecieron: uno con falla a tratamiento, uno por complicaciones de Bronconeumonía y otro por Hemoneumotórax posterior a procedimiento de pericardiocentesis. De los pacientes con recaída 5 de 8 fallecieron con actividad de la enfermedad; uno por hemorragia pulmonar durante la fase de mielosupresión secundaria a la quimioterapia de consolidación; sobreviven dos pacientes: uno en remisión completa con quimioterapia y otro con actividad de leucemia con cuidados paliativos. Todos los pacientes del grupo control permanecen en remisión completa y vigilancia.

La mediana de supervivencia global del grupo general en días fue de 301, con un mínimo de 40 y máximo de 5140.

La mediana de Supervivencia Global en días en el grupo de diagnóstico de novo fue de 179, con un mínimo de 40 y máximo de 301.

La mediana de la supervivencia Libre de Recaída fue de 685 días con un mínimo de 274 y máximo 1035.

La mediana de Supervivencia Global del grupo control fue de 1442 días, con un mínimo de 1063 y un máximo de 5140.

DISCUSIÓN

Las CD juegan un papel muy importante en la generación de inmunidad antitumor, varios estudios ^{13, 15-17,19} han demostrado anomalías tanto numéricas como funcionales de las CD en pacientes con cáncer, en particular en las leucemias agudas ^{17,19}. Entre los defectos funcionales hay disminución de la expresión de MHC y moléculas coestimuladoras, disfunción de linfocitos T y acumulación de CD inmaduras en pacientes con cáncer. Así, en pacientes con LLA se ha visto una respuesta inmune antitumor muy pobre. Todavía hay controversias en los diferentes estudios reportados, así como insuficiencia en cantidad de los mismos, en algunos de ellos con falta de homogeneidad en la muestra estudiada incluyendo varios tipos de neoplasias, por lo que se consideró de importancia realizar un estudio en población pediátrica con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda en diferentes etapas de la enfermedad para conocer la cantidad de CD y linfocitos citotóxicos en MO y SP.

En este estudio encontramos mayor cantidad de CD en los pacientes en vigilancia considerados como grupos control, al compararlos con los pacientes en actividad leucémica ya sea al diagnóstico o en recaída, con cifras similares a las reportadas por Vakkila J y cols¹⁶ en niños sanos con edades comparables a las de los nuestros pacientes (<16años), aunque con predominio de adolescentes en nuestro grupo. (cuadro No.3).

En pacientes con LLA de novo y recaída, encontramos disminución de las CD en MO y SP (figuras No. 1-6), lo cual pudiera ser secundario al efecto inhibitorio de las células tumorales sobre las células normales de la médula ósea, o bien, esta reducción pudo haber ocurrido previo a la neoplasia, permitiendo así su desarrollo. De acuerdo al reporte de Maecker y cols¹⁹ la disminución de CD no podría ser explicada por mera disfunción de la MO propia de la infiltración por células leucémicas, ya que la reducción de CD es independiente, lo cual apoya mediante sus hallazgos de correlación positiva entre CDm con neutrófilos y monocitos en paciente con LLA T y una ligera tendencia de correlación negativa con las CDp; en pacientes con LLA B encontró ligera tendencia para una correlación negativa entre CDm con neutrófilos y monocitos y sin correlación para CDp. En nuestro estudio no se realizó correlación con las células sanguíneas mencionadas.

En cuanto a los pacientes pediátricos hay reportes de la cantidad de CD en diferentes tumores, incluyendo leucemias, con controversia en los resultados, ya que algunos estudios reportan reducción de las CD y otros incremento en las mismas ^{16,17}. Nuestros resultados son similares a los encontrados

por otros autores^{13, 16, 19} con relación a la reducida cantidad de CD (cuadro No.3), a diferencia del estudio de Weclawek-Tompol J y cols donde, en niños con diferentes tipos de cáncer, incluyendo leucemia linfoblástica aguda tuvieron incremento en la cantidad de CD en SP y correlación positiva de las mismas con los linfocitos citotóxicos.¹⁷

Al analizar los grupos con y sin actividad leucémica de nuestra población, se hace mas evidente la escasez de las CD en pacientes al diagnostico de novo y al momento de la recaída, y contrastan con una mayor cantidad de estas células en el grupo sin actividad leucémica (figuras No.9-11) que se presenta con valores de las CDm similares, y una cantidad de CDp discretamente menores a las del grupo de pacientes sanos (cuadro No.4), lo que podría ser explicado a que nuestro grupo control esta conformado por niños que estuvieron expuestos por lo menos durante dos años a quimioterapia intensiva y en su mayoría son adolescentes, etapa en la cual las CDp en SP en población sana, son más bajas con respecto a grupos de menor edad¹⁶, mientras que las CDm muestran estabilidad en sus cifras en las diferentes etapas de la niñez, según lo reportado en el estudio de Teig y Cols⁹ (cuadro No.5), esto es debido a que a mayor edad, la localización de las CDp predomina en piel y mucosas donde juegan un papel importante en la fisiopatología en especial de las infecciones.

En nuestro análisis de correlación entre CD8 con CDm y CDp tanto en MO como en SP, se encontró solamente correlación moderada en MO entre CD8/ CDm (figura No.7) y CD8/CDp (figura No.8), lo cual se hizo más evidente con las CDp cuando se analizo la correlación en el grupo de actividad leucémica (figura No.12), similar a lo reportado en SP en el estudio de Weclawek-Tompol J y cols pero diferente en cuanto a que ellos encontraron una cantidad aumentada de CD en una población heterogénea de pacientes con LLA y otras neoplasias con relación a controles sanos¹⁷; en contraste nosotros no encontramos correlación en SP en una población homogénea.

Los linfocitos citotóxicos producen FEC-GM que favorece la diferenciación de CD a la subvariedad monocitoide, esperando una correlación entre ambas, lo que sucedió en el grupo general de nuestro estudio. Por otro lado las CDp producen indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO) que es una enzima que cataboliza el triptófano que normalmente se encarga de la proliferación de los linfocitos citotóxicos, protegiendo así al tumor del ataque por estas células, lo que daría como resultado una correlación negativa entre las CDp y CD8¹⁶; lo que no encontramos en los pacientes con actividad leucémica en nuestro estudio, sin que tampoco hallamos profundizado en esta etapa de investigación en la función de las células.

Hubo diferencia entre la cantidad de CDm y CDp con mayor cantidad en los pacientes que mostraron marcadores mieloides aberrantes (CD13,CD15) en LLA pre-B de Novo vs aquellos sin expresión de los mismos, pero sin diferencia estadísticamente significativa; a diferencia de lo reportado por Maecker y cols en su estudio de 55 niños con LLA; 38 de estirpe pre-B; los que presentaron expresión de marcador mieloides aberrante (CD13, CC33 y MPO) tenían menor cantidad que aquellos sin marcador mieloides, ellos sugieren que probablemente se deba a mayor inmadurez de las células leucémicas con producción de sustancias inhibitorias de las CD. Será necesario aumentar el tamaño de la muestra en nuestro estudio para ver si se conserva esta tendencia.

En nuestro estudio encontramos que las células dendríticas tanto monocitoides como plasmocitoides se encuentran disminuidas en los pacientes con leucemia linfoblástica aguda, y en cantidad similar a lo normal en los de vigilancia; contrastando con los resultados de incremento de estas células en los pacientes que presentan marcador mieloides con relación a los que no lo tienen. De acuerdo a lo anterior podemos concluir que continúa la controversia entre y con los resultados reportados en la literatura, por lo que será necesario aumentar el tamaño de la muestra para poder sacar conclusiones definitivas, además de continuar con el estudio en paralelo que se está realizando sobre función de las células dendríticas en este mismo grupo de pacientes.

CONCLUSIONES

La cantidad de células dendríticas en médula ósea y sangre periférica de niños con Leucemia Linfoblástica Aguda al diagnóstico se encuentra disminuida

La cantidad de células dendríticas en médula ósea y sangre periférica de niños con Leucemia Linfoblástica Aguda en recaída se encuentra disminuida

Las cantidades de células dendríticas en médula ósea y sangre periférica de niños con Leucemia Linfoblástica Aguda en vigilancia son similares a controles sanos.

Hay cantidades superiores células dendríticas en médula ósea y sangre periférica de niños con Leucemia Linfoblástica Aguda sin actividad que en los que tienen actividad leucémica.

La cantidad de Linfocitos T Citotóxicos en Médula ósea en niños con Leucemia Linfoblástica Aguda en actividad se encuentra disminuida

La cantidad de Linfocitos T Citotóxicos en Sangre periférica niños con Leucemia Linfoblástica Aguda en actividad es similar a los controles.

Hay correlación moderada entre la cantidad de Células Dendríticas monocitoides y Linocitos T citotóxicos en médula ósea en el total de los pacientes estudiados con Leucemia Linfoblástica aguda.

Hay correlación moderada entre la cantidad de Células Dendríticas plasmocitoides y Linocitos T citotóxicos en médula ósea en el total de los pacientes estudiados con Leucemia Linfoblástica aguda en diferentes etapas de la enfermedad

Hay correlación moderada entre la cantidad de Células Dendríticas plasmocitoides y Linfocitos T citotóxicos en médula ósea de los pacientes con Leucemia Linfoblástica aguda en actividad.

No hay correlación entre la cantidad de células dendríticas y los linfocitos T citotóxicos en sangre periférica en pacientes con Leucemia Linfoblástica aguda al diagnóstico, recaída y vigilancia.

Hay mayor cantidad de células dendríticas en médula ósea y sangre periférica de pacientes con diagnóstico de Leucemia linfoblástica aguda de células B con marcadores mieloides aberrantes que en los que no los presentan.

Es necesario aumentar el tamaño de la muestra para obtener conclusiones definitivas.

BIBLIOGRAFIA

1. Ching-Hon Pui. Leucemia Linfoblástica Aguda; en Hematología de Williams.2005, Vol 2, Capítulo 97, Editorial Marban: 1441-1555.
2. Riley RS, Massey D, Jackson-Cook C, Idow M, Romagnolib G. Immunophenotypic analysis of acute lymphocytic. Hematol Oncol Clin Nort Am. Abril 2002; 16(2): 245-99.
3. Cox C.V., Roger S., Oakhill S., Pamphilon D.H., Nicholas J. Blair G.A., Characterization of acute lymphoblastic leukemia progenitor cells. Blood, Nov 2004(104): 2919 - 2925.
4. Roitt; Brostoff; Male. Introducción a la respuesta inmune, en Immunology, 2000, Quinta Edición, Editorial Mosby, Pág.1-7
5. Cuellar A, Sifuentes C, Gómez A. González J.M. Biología de las células dendríticas humanas, Revista de la Facultad de Ciencias Pontificia, Universidad Javeriana 2004 Vol. 9(1): 5-12.
6. Coronado S, Laguensa G, Spinelli O., Células dendríticas y su papel el patología. Medicina 1997. Vol. 58(2): 204-18.
7. Scimone M.L., Lutzky, Zittermann M, Maffia P, Janssic C, Buzzolla F, Et al. Migration of polimorphonuclear leucocytes is influenced by dendritics cells. Immunology 2005, Vol. 114: 375-385.
8. Doherty U.O., Peng M. Gezelter S, Swigard WJ, Betjes M, Bhardwa J, a et al. Human body contains two subsets of dendritic cells, one immunological mature and the other immature. Immunology 1944, Vol 82: 487-93
9. Teig N, Moses D., Gieseler D and Schauer . Age-Related Changes in human Blood Dendritic Cell Subpopulations. Scand J Immunol 2002 Vol 55: 453-57.
10. Fearnley D.B., Whyte L.F., Carnoutsos S.S., Cook AH. Monitoring Human Blood Dendritic Cell Numbers in Normal Individuals and in Stem Cell Transplantation. Blood 1999, Vol 93(2) 728-36.
11. Francesc E, Matteus N. Lowdell M, Navarrete C. Identification of both myeloide CD11c+ y Linfoide CD11nc- dentritic cell subsets in cord blood. British Journal of Hematology 2001, 120: 925-31.
12. Hoffman TK, Muller – Berghaus, Ferris R, Jonhson JR, Torkus WJ, Whiteside. Alterations in the Frequency of Dendritic Cell subsets in the peripheral Circulation of patients with Squamos Cell Carcinoma of the Head and Neck. Clinical Cancer Research 2002. Vol 118: 1787-93.

13. Almand B, Resser J, Lindman SN, Joseph I, Nadaf S. Clinical significance of Defective Dendritic Cell Differentiation in cancer. *Clinical Cancer Research* 2000, Vol 6:1755-66.
14. Reid C.D.L., Dendritic cells and immunotherapy for malignant disease. *British Journal of Haematology* 2001. Vol 112: 874-87.
15. Pinzon A.C., Christopher S.K., Laherty Richard, Maxwell T, Walker D, Gardnier R.A., A population of HLA-DR+ immature cells accumulates in the bloods dendritic cell compartment of patients with diferents types of cancer. *Neoplasia* 2005, Vol. 7(12):1112-22.
16. Vakkila J, Thomson A.W., Vettenraya K., Sariola H, Pihkala S., Dendritic Cell subsets in childhood and children with cancer: relation to age and disease prognosis. *Clinical and Experimental Immunology* 2004, 135: 455-62.
17. Weclawek-Tompol J., Chybicka A., Rybka B., Nooworolska-Sauren D., Ryzcan R. Dendritic cells in child neoplastic disease. *Przegl Lek* 2003, Vol 60(5):41-53.
18. Mohty M., Isnardon D., Charbonnier A., Lafage-Pochitaloff., Merlin M., Sainty D., Generation of potent th1 responds from patients with lymphoid malignancies after differentiation of B lymphocytes into dendritic-like cells. *Internatonal Immunology* 2002, Vol 14(7): 741-50.
19. Maecker B, Mougiakakos D, Zimmermman M, Behrens M, Schrauder A, Schrappe M, Welte K, Klein C. Dendritic cell deficiencies in pediatric acute lymphoblastic leukemia patients. *Leukemia* 2006, Vol 20: 645'649.

CUADRO No. 1**CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS PACIENTES**

MEDIANA DE EDAD EN AÑOS		
Al diagnostico	8	
A la toma de células dendríticas	8	
TOTAL	39	
	N	%
GENERO		
Masculino	27	69.2
Femenino	12	30.7
DIAGNOSTICO MORFOLOGICO		
L1	35	89.7
L2	4	10.2
DIAGNOSTICO INMUNOLOGICO		
Células B	38	97.4
Células T	1	2.5
RIESGO AL DIAGNOSTICO		
Alto	19	48.7
Estándar	20	51.2
BIOMETRIA HEMATICA	Mediana	Mínimo-Máximo
Hemoglobina gr/dl	10.8	6-16.3
Hematocrito %	31.3	17.3-47.8
Leucocitos/ μ l	7359	1080-432000
Neutrófilos/ μ l	2340	0-11718
Blastos/ μ l	0	0-241775
Plaquetas/ μ l	86000	6000-359000
MEDIANA DE SUPERVIVENCIA GLOBAL	301	

CUADRO No. 2
CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS PACIENTES POR GRUPO DE ESTUDIO

	DIAGNOSTICO INICIAL		RECAIDA		VIGILANCIA	
MEDIANA DE EDAD EN AÑOS						
Al diagnostico	5		6.5		8.5	
A la toma de células dendríticas	5		8		9.5	
TOTAL	19		8		12	
	N	%	N	%	N	%
GENERO						
Masculino	18	94.7	5	62.5	8	66.6
Femenino	1	5.2	3	37	4	33.3
DIAGNOSTICO FAB						
L1	18	94.7	7	87.5	10	83.3
L2	1	5.2	1	12.5	2	16.6
DIAGNOSTICO INMUNOLOGICO						
Células B	18	94.7	8	100	12	100
Células T	1	5.2	0	0	0	0
RIESGO AL DIAGNOSTICO						
Alto	12	63.1	4	50	3	25
Estándar	7	36.8	4	50	9	75
BIOMETRIA HEMATICA	Mediana	Min-Max	Mediana	Min-Max	Mediana	Min-Max
Hemoglobina gr/dl	8.1	6-11	12.5	6.3-12.5	14.2	12.7-16.3
Hematocrito %	26.5	17.3-31.3	37.5	18.7-37.5	42.3	36.2-47.8
Leucocitos/μl	1114	1080-432000	1113	7110-11130	6695	2900-8200
Neutrófilos/μl	532	0-11718	3518	7-9877	2980	1102-4140
Blastos/μl	3111	0-241775	0	0	0	0
Plaquetas/μl	26000	6000-359000	74000	15000-74000	238000	170000-295000
SUPERVIVENCIA GLOBAL EN DIAS MEDIANA	179		685		1442	

CUADRO No. 3

**CELULAS DENDRITICAS Y LINFOCITOS T CD8 EN MEDULA OSEA Y SANGRE
PERIFERICA DE NIÑOS EN DIFERENTES ESTADIOS DE LEUCEMIA LINFOBLASTICA
AGUDA**

	DIAGNOSTICO		RECAIDA		VIGILANCIA		*CONTROL SANOS:	
	%	µl	%	µl	%	µl	%	µl
CDm MO	0.02	~ 0	0.02	~ 0	0.245	104	0.27	20.1
min-max	0-0.11	0	0.10-0.46	0	0.11-0.64	23-336		
CDm SP	0	0.5	0.015	1.2	0.25	17		
min-max	0	0-0.27	0-0.76	0-995	0.1-0.52	8.2-39		
CDp MO	0	0	0	0	0.3	92.3	0.15	9.8
min-max	0	0	0-0.1	0	0.15-0.54	61-339		
CDP SP	0	0	0	0	0.09	6.6		
min-max	0-0.26	0-345	0	0-13.1	0.06-0.17	3.9-12.8		
CD8 MO	4.9	490	5.5	555	9.5	1425		
(min-max)	0.7-9.6	70-860	2.5-8.6	250-860	5.5-14.2	383-4854		
CD8 SP	15	531.5	20	822.7	23.5	726		
(min-max)	10-28	61-860	2.8-53.1	168-3384	10-64.1	726-2783		

P:< 0.000

CDm: Células Dendríticas monocitoides

CDp: Células Dendríticas plasmocitoides

* Vakkila J, Thomson A.W., Vettenraya K., Sariola H, Pihkala S., Dendritic Cell subsets in childhood and children with cancer: relation to age and disease prognosis. Clinical and Experimental Immunology 2004, 135: 455-62.

CUADRO No 4

CELULAS DENDRITICAS Y LINFOCITOS CD8 EN SANGRE PERIFERICA Y MEDULA OSEA DE PACIENTES CON DIAGNOSTICO DE LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA CON Y SIN ACTIVIDAD DE LA ENFERMEDAD

CELULAS DENDRITICAS/μl	CON ACTIVIDAD	SIN ACTIVIDAD	P
CDm MO	0	104	0.000
CDm SP	0.85	17	0.000
CDp MO	0	92.3	0.00
CDp SP	0	6.6	0.00
CD8 MO	490	1425	0.009
CD8 SP	699	726	0.438

CUADRO No 5

CELULAS DENDRITICAS REPORTADAS POR DIFERENTES AUTORES EN SANGRE PERIFERICA/ μ l DE NIÑOS CON LLA Y CONTROLES SANOS.

AUTOR	CDm/μl control	CDm/μl en LLA	CDp/μl control	CDp/μl LLA
Teign y Cols.	12		<1 ^a : 20 >1 ^a : 8	
Maecker y Cols.	20	2.2	16	0.5
Vakkila y Cols.	20.1		9.8	
CMN LA RAZA IMSS	17	0.85	6.6	0

FIGURA No.1 CDm / μ l EN MÉDULA ÓSEA A LA TOMA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS

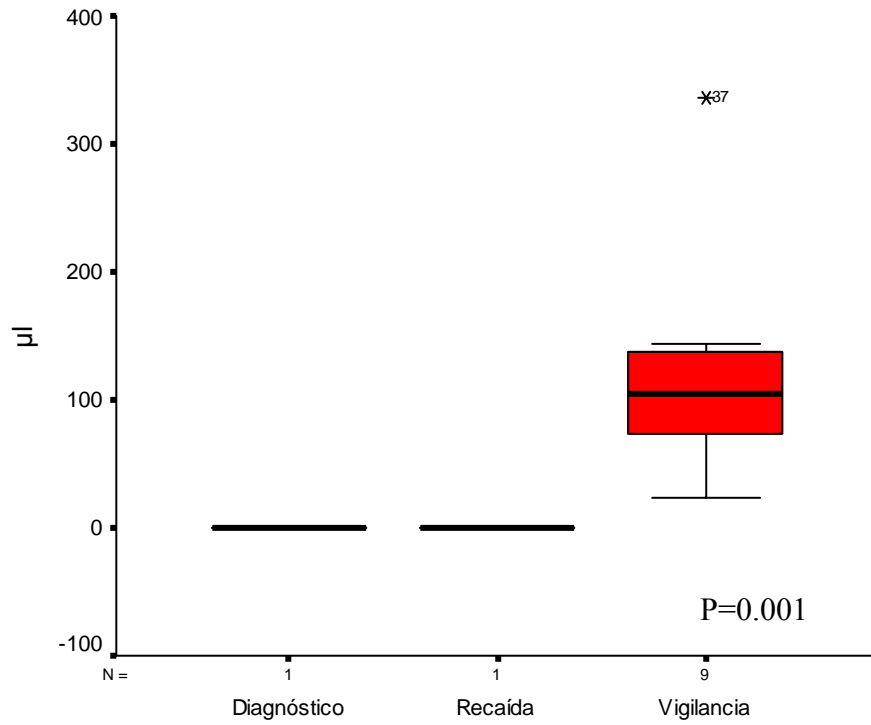


FIGURA No. 2 CDm/ μ l EN SANGRE PERIFERICA A LA TOMA DE CELULAS DENDRITICAS

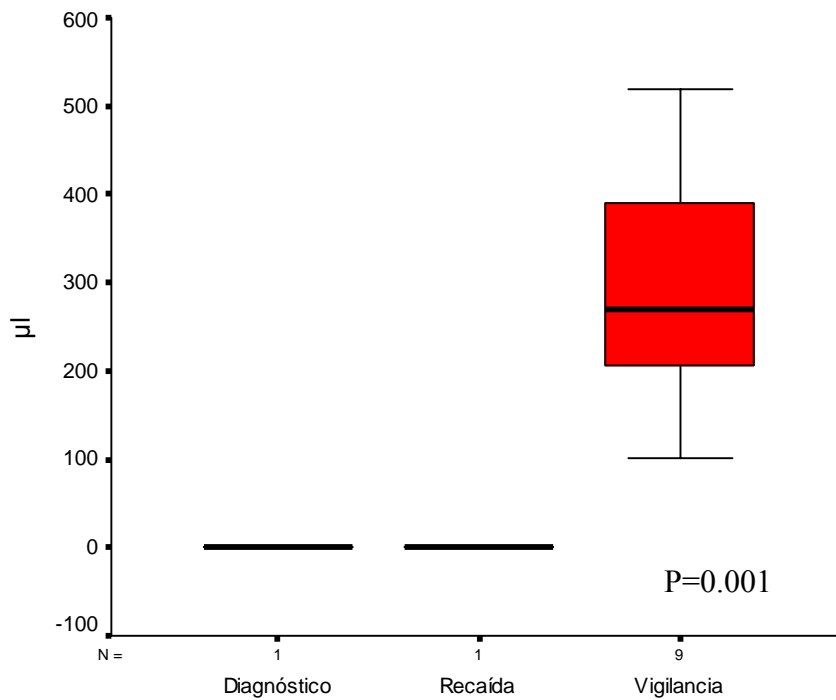


FIGURA No. 3 CDp / μ l EN MÉDULA ÓSEA A LA TOMA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS

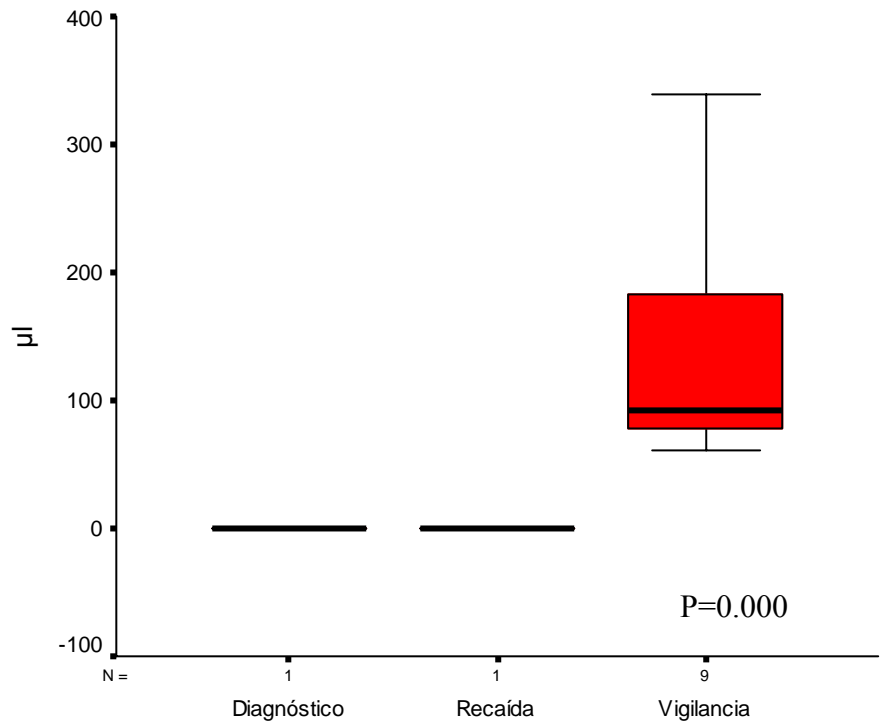


FIGURA No. 4 CDp/ μ l EN SANGRE PERIFERICA A LA TOMA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS

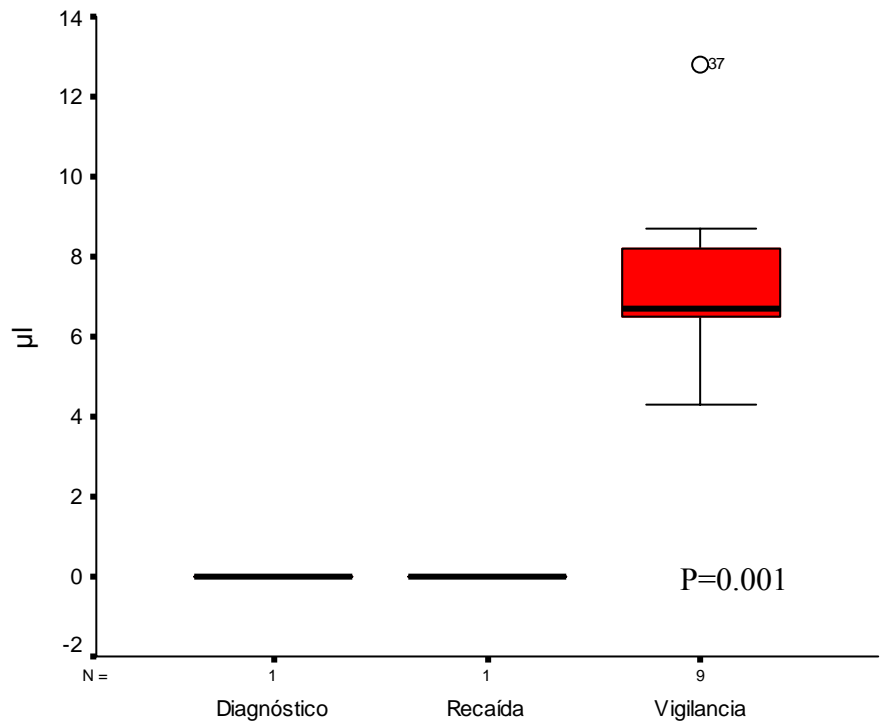


FIGURA No. 5 TOTAL DE LINFOCITOS CD8 EN MEDULA OSEA A LA TOMA DE CELULAS DENDRITICAS

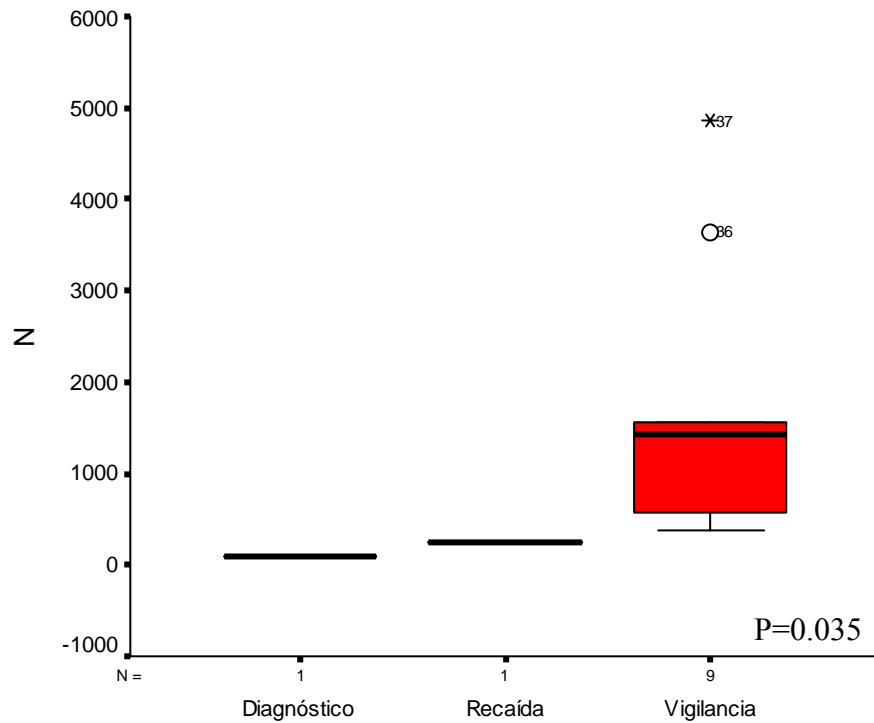


FIGURA No. 6. LINFOCITOS CD8 EN SANGRE PERIFERICA A LA TOMA DE CELULAS DENDRITICAS

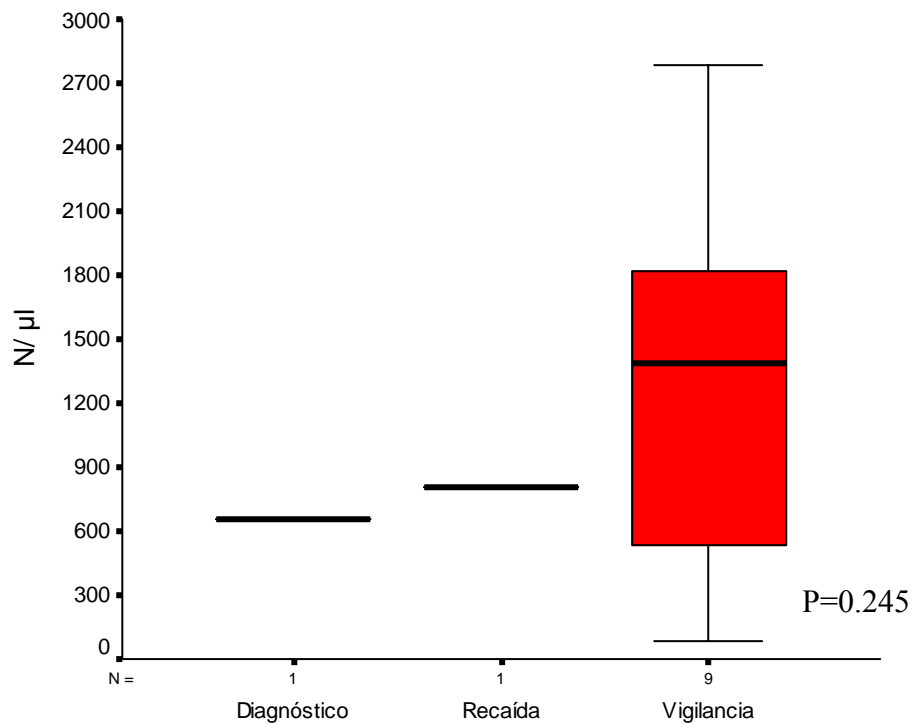


FIGURA No. 7 CORRELACION ENTRE EL PORCENTAJE DE CDm CON LINFOCITOS CD8 EN MEDULA OSEA EN EL GRUPO GENERAL

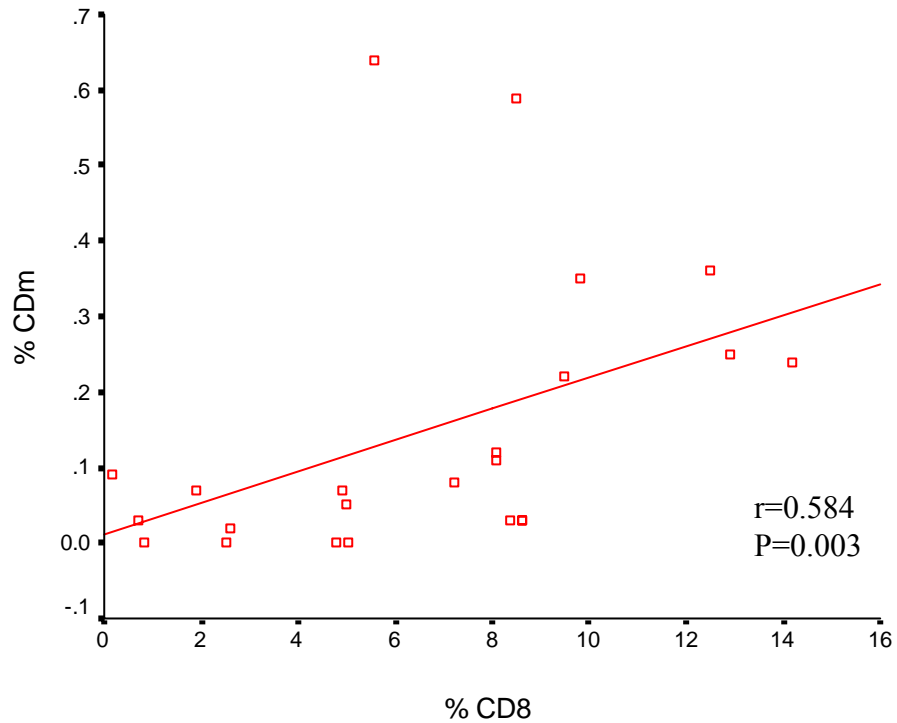


FIGURA No. 8 CORRELACION DEL PORCENTAJE DE CDp Y DE LINFOCITOS CD8 EN MEDULA OSEA EN EL GRUPO GENERAL

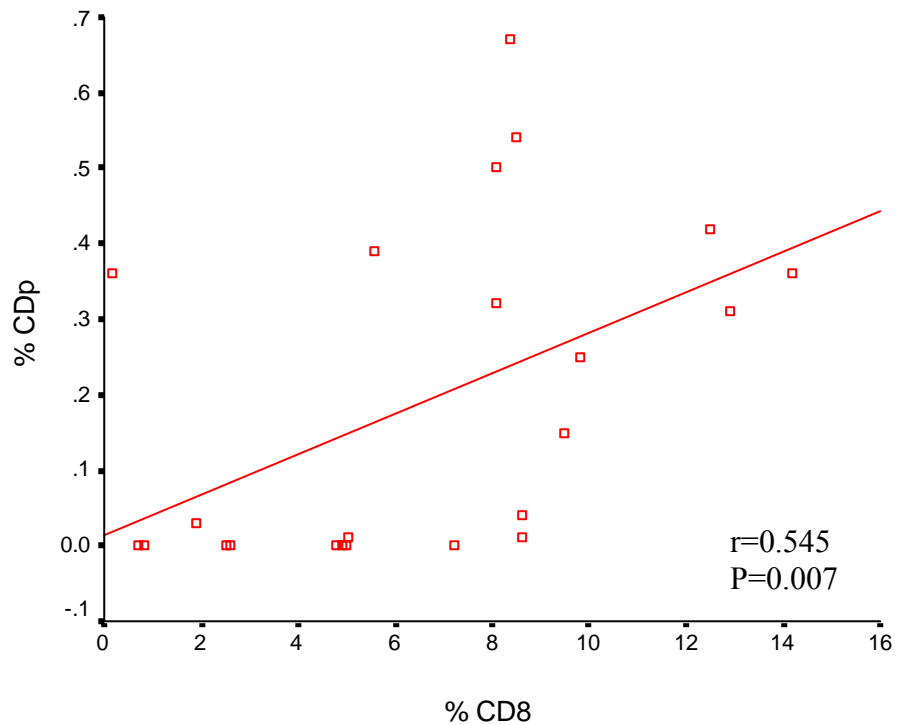


FIGURA No. 9. CDm/ μ l EN MEDULA OSEA DE ACUERDO A ACTIVIDAD LEUCÉMICA

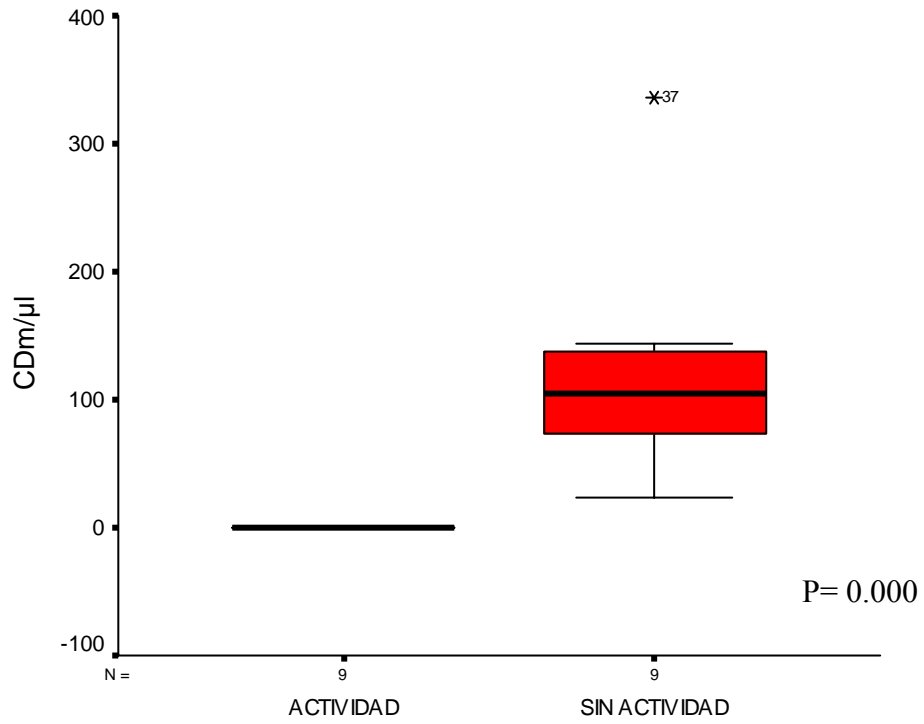


FIGURA No. 10 CDp/ μ l EN MÉDULA ÓSEA DE ACUERDO A ACTIVIDAD LEUCÉMICA

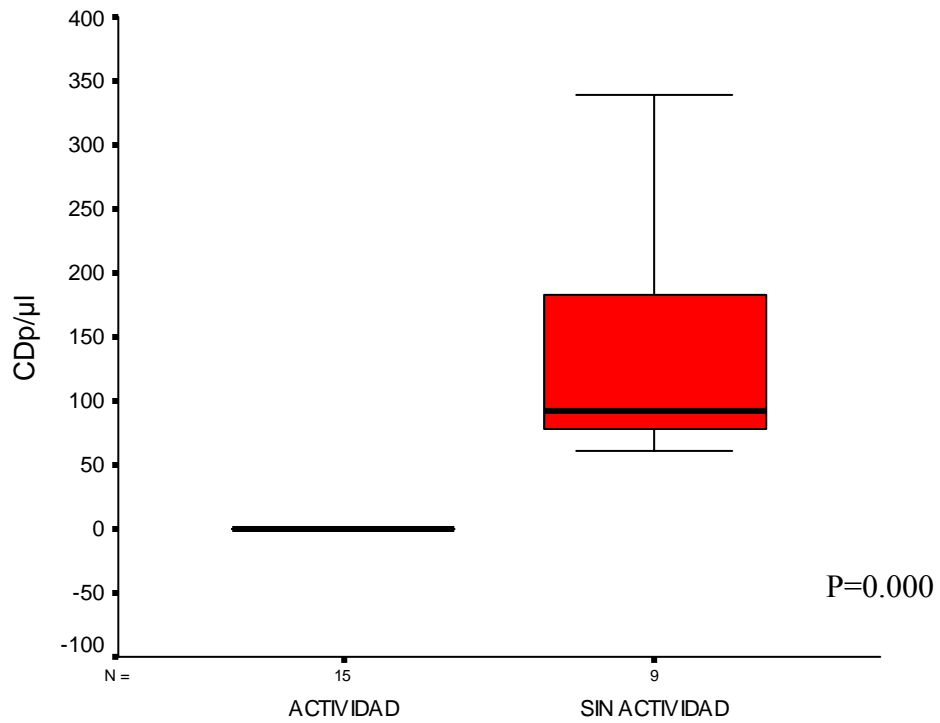


FIGURA No. 11. CDm/μl EN SANGRE PERIFÉRICA DE ACUERDO A ACTIVIDAD LEUCÉMICA

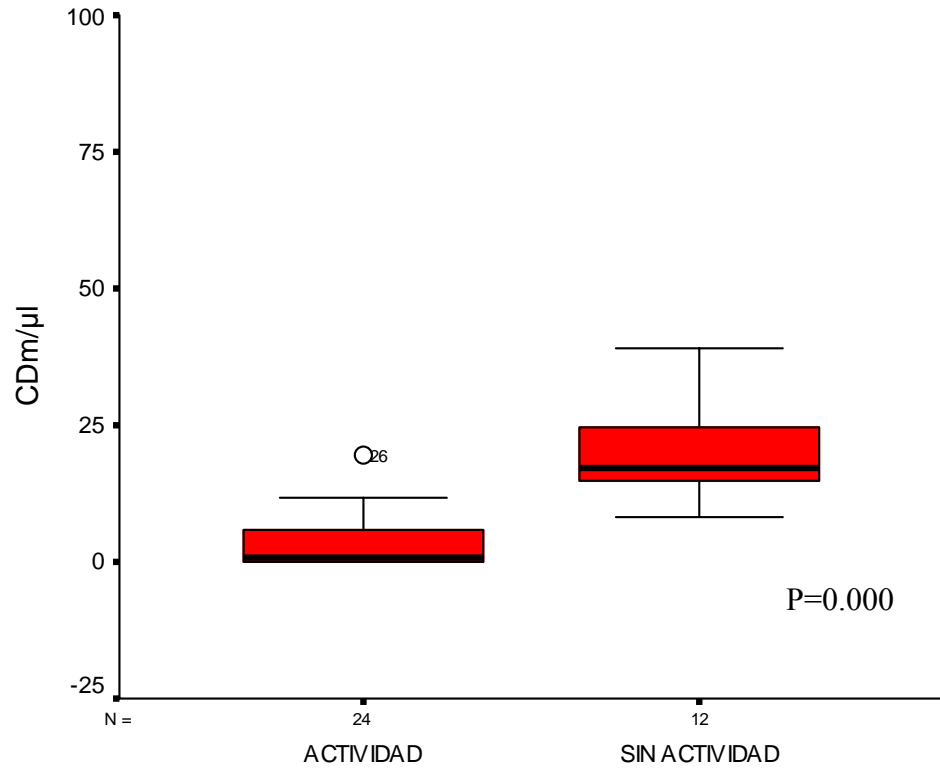
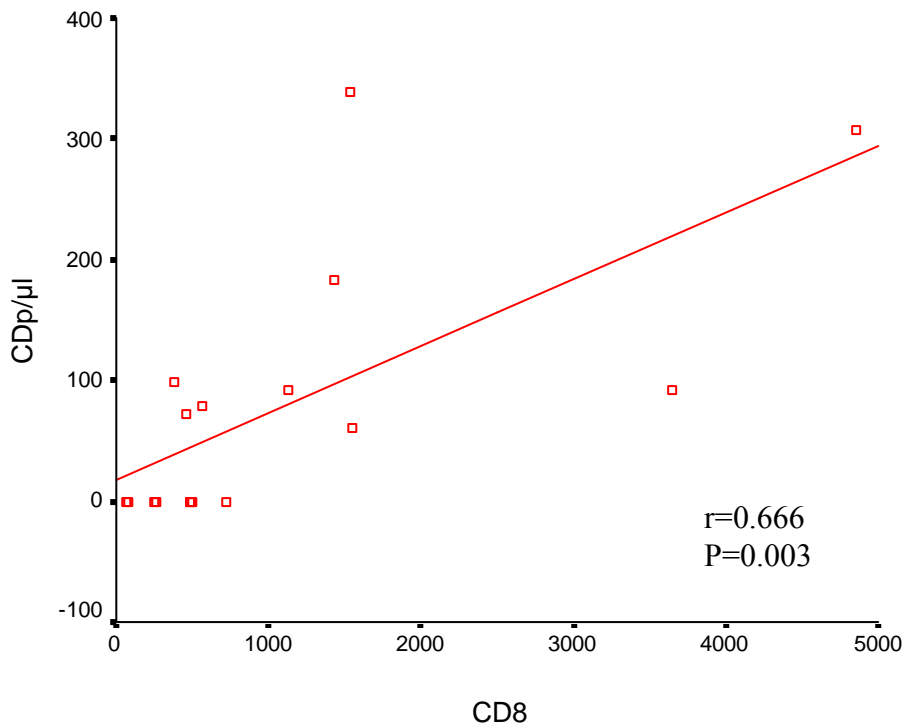


FIGURA No. 12. CORRELACION DE CDp/ μl CON CD8 EN MEDULA OSEA EN PACIENTES CON ACTIVIDAD



ANEXO NO. 1

LEUCEMIA LINFOBLASTICA: Enfermedad neoplásica de la médula ósea que se origina de la mutación somática de un progenitor linfoide único en alguna de las fases diferenciadas de la maduración celular, estableciéndose el diagnóstico de la misma en el aspirado de médula ósea, por la presencia de células neoplásicas de morfología linfoide que constituye el 25% o más de la población celular de la misma.

Etapas de la Enfermedad:

Remisión completa:

-Remisión completa hematológica

Ausencia de datos clínicos de Leucemia, restauración de la hematología y médula ósea con menos de 5% de blastos y biometría hemática con Hemoglobina mayor que 10 g/dL (sin transfusión), Neutrófilos totales $\geq 1500/\text{mcL}$ y plaquetas $\geq 100\ 000/\text{mcL}$.

Recaída

Cuando el paciente presenta nuevamente datos clínicos de leucemia, o en la biometría hemática citopenias y/o blastos y se corrobora en aspirado de Médula ósea cuando hay más de 5% de blastos, o en algún sitio extramedular.

Fase de Mantenimiento:

Periodo de quimioterapia posterior a la Inducción a la Remisión, Intensificación a Sistema Nervioso Central y Profilaxis a Sistema nervioso central (esta última en pacientes de alto riesgo), que consiste en administrar dosis bajas de fármacos diseñadas para ser administradas en régimen ambulatorio, cada 3 semanas, en pacientes con remisión completa hematológica, durante un periodo de 24 meses.

ANEXO 2

TECNICA PARA OBTENCION DE MEDULA OSEA

TECNICA: Previa asepsia y antisepsia, colocación de campos quirúrgicos y anestesia local con Xilocaína simple, piel, tejido celular subcutáneo y periostio al 1% en los siguientes puntos anatómicos según edad:

LACTANTES MENORES: En posición decúbito dorsal, a nivel de la porción anteromedial de la tibia.

MAYORES DE 1 AÑO: En decúbito ventral, en la cresta iliaca posterior

Aguja: trocar provisto de mandril (Aguja de Osgood). Con movimientos suaves rotatorios con guía dentro para evitar tomar tejido diferente a MO, se introduce la misma hasta penetrar la cortical posterior a la cual la introducción del trocar es más fácil, se retira de guía de la aguja y se conecta ésta a una jeringa de 20 ml sin anticoagulante.

Se aspiran entre 0.2 a 0.5 ml inicialmente para realización de extendidos en laminillas para su tinción con Writte y Giemsa para evaluación morfológica y tinciones especiales para complementación diagnóstica: Mieloperoxidasa, Fosfatasa acida, Esterasa Leucocitaria, PAS (Acido periódico de Shiff).

Posteriormente se toman en jeringa de 20ml previamente heparinizada, 3 a 5 ml de médula ósea para realización de inmunofenotipo y cariotipo.

ANEXO 3

CRITERIOS PARA DIAGNOSTICO, CLASIFICACION DE LAS LLA E IDENTIFICACION DE CD Y LT CITOTOXICOS

CLASIFICACION MORFOLOGICA FRANCO AMERICANA BRITANICA (FAB)

Clasificación	Tipo Celular	Características
L1	Microlinfoblastos	Microlinfoblastos pequeños, muchas veces sin nucleolos o son pequeños
L2	Grandes linfoblastos indiferenciados	Células grandes y más indiferenciadas. Casi siempre contienen nucleolos que varían en tamaño y cantidad
L3	Tipo Burkitt	Célula grande de núcleo regular oval o redondo con uno o más nucleolos vesiculares prominentes. Vacuolización citoplasmática prominente en la mayoría de las células.

Tinciones especiales: Resultados compatibles con LLA: Mieloperoxidasa, Esterasa negativas. Fosfatasa ácida y PAS habitualmente positivos.

MARCADORES DE ESTIRPE

Células dendríticas	HLA-DR, CD123, CD11c
Linfocitos T citotóxicos	CD3, CD8
Linfoblastos T	CD3, CD2, CD4, CD5, CD7, antiTCR
Linfoblastos B	CD79a, CD10, CD19, CD20, CD22
neutrófilos y eosinófilos	CD14
Linfocitos NK, Macrófagos, Monocitos, neutrófilos.	CD16
Linfocitos NK	CD56

Los resultados se anotarán en la hoja de recolección de datos

ANEXO 4

TECNICA PARA LA REALIZACION DE INMUNOFENOTIPOS EN LEUCEMIAS MIELOIDE Y LINFOIDE AGUDAS

Esta técnica es llevada a cabo en Médula ósea y Sangre Periférica considerando que tiene más del 40% de blastos para determinar el tipo de leucemia. Es importante que la muestra tenga un volumen de por lo menos 1ml, además no debe tener fibrina ni estar coagulada. Así como tampoco diluida ni hemolizada. Se puede trabajar con sangre periférica cuando el número de blastos es mayor al 50%.

a. Colocar 5mcl de anticuerpo monoclonal en tubo FALCon como se menciona a continuación:

I	Control
II	Isotipo
III	CD3/MPO/CD79a
IV	HLA-DR/CD19
V	CD15/CD22
VI	CD7/CD33
VII	CD10/CD14
VIII	CD2/CD13
IX	CD45/CD34
X	CD4/CD5
XI	TCR/CD20
XII	MPO/CD117
XIII	TdT
XIV	CD1a

- b. Los tubos 3,13 y 13 son marcadores intracitoplasmicos y se trabajan diferente al resto de los tubos. Antes de colocarles el anticuerpo es necesario: controlar 100 μ L de la muestra
1. agregar 400 μ L de solución de lisis, dejarlos con solución 2 a 4 minutos y centrifugar a 1500 rpm durante 3 a 5 min. Decantar.
 2. Agregar 400 μ L de FACSFLOW. Centrifugar a 1500 rpm por 3 a 5 min y decantar.
 3. Agregar 100 μ L de sol permeabilizadota, dejar incubar por 10 minutos.
 4. Colocar 400 μ L de FACSFLOW, centrifugar y decantar.

5. Colocar el anticuerpo monoclonal. Incubar por 15 a 20 min en la oscuridad
6. Agregar 400 μ L de FACSFLOW, centrifugar y decantar.
7. Agregar 400 μ L de FACSFLOW. Muestras listas para leerlas al citómetro de flujo.
- c. Al resto de los tubos colocarles en anticuerpo monoclonal y 50 mcl de la muestra, incubarlos durante 15 a 20 min en la oscuridad.
- d. Agregarles 400 μ L de solución de lisis, incubarlos en la oscuridad durante 5 minutos. Centrifugar a 1500 rpm por 3 a 5 min. Decantar y resuspender con solución FACSFLOW. Muestras listas para leerlas en citómetro de flujo.

MARCAJE DE CELULAS DENDRITICAS Y LINFOCITOS T CITOTOXICOS

De las mismas muestras de sangre venosa central y médula ósea:

1. Colocar la muestra en un tubo para FACS y diluir con volumen igual de PBS, mezclar gentilmente
2. Poner 300 μ L de ficoll en un tubo eppendorf y cuidadosamente colocar 600 μ L de la muestra suspendida en PBS sobre el ficoll
3. Centrifugar a 1300 rpm durante 30 min a 4 grados centígrados.
4. Identificar las células mononucleares de la sangre periférica y de la médula ósea en la interfase y aspirar cuidadosamente con una pipeta.
5. Centrifugar las células a 1300 rpm durante 15 minutos a 4 grados centígrados.
6. Resuspender las células con ayuda de la adición de PBS y realizar un conteo de las células con la ayuda de una cámara de Neubauer y un microscopio óptico.
7. Preparar 8 alícuotas de 1×10^5 células en tubos FACS.
8. Se realizara el marcaje con los anticuerpos correspondientes:

Contenido de tubos FACS para citometría de flujo.

Tubo 1	Blanco
Tubo 2	Isotipo
Tubo 3	Cocktail de linaje
Tubo 4	CD3, CD4
Tubo 5	Granzima B, CD8
Tubo 6	CD95, CD8
Tubo 7	CD178, CD8
Tubo 8	Cocktail para CD.

9. Para el marcaje del anticuerpo que identifica la Granzima B se requiere permeabilizar durante 10 minutos y posteriormente se sigue la misma metodología.
10. Se incuba a 4 grados centígrados durante 1 hora, se lavan y se fijan con paraformaldehído para finalmente ubicarlos en tubos FACS en muestras de 300µL con 1×10^5 células.
11. Realiza el conteo en el citómetro de flujo.

COCKTAIL DE LINAJE PARA CELULAS DENDRITICAS (Lin 1)

El cocktail de linaje (lin 1) contiene anticuerpos que identifican linfocitos, monolitos, eosinófilos y neutrófilos e incluye: CD3, CD14, CD16, CD19, CD20 y CD56. Las células dendríticas y los basófilos de sangre periférica pueden distinguirse de otros leucocitos por medio de marcaje con Lin 1:

DISTRIBUCION ANTIGÉNICA

CD3	Linfocitos T
CD14	Monocitos, macrófagos, neutrófilos y eosinófilos.
CD16	Linfocitos NK, macrófagos, monocitos y neutrófilos.
CD19 y CD20	Linfocitos B
CD56	Linfocitos NK

INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

Para 4 colores:

Añadir 20 µL de Lin 1 FITC, 5µL de CD 123 (anti-IL-3R α), 10mL Anti HLA-DR y 5µL de CD11c 1 en tubo de ensayo, posteriormente añadir 100 mL de sangre a estudiar, mezclar gentilmente e incubar por 15 a 30 minutos en la oscuridad a una temperatura de 20-25 GC. Agregar 2 ml de solución de lisis y mezclar gentilmente e incubar en la oscuridad por no más de 10 minutos. Centrifugar a 300 rpm por 5 minutos. Lavar las células con 1 ml de 1x solución buffer fosfato salina al 0.1%, agregar 0.3 mL de paraformaldehído al 1%, mezclar y analizar

Para 3 colores:

Citometria de flujo

El Lin 1 puede ser usado en 3 o 4 colores para identificar células dendríticas en sangre periférica. Las células dendríticas expresan altos niveles de HLA-DR y tienen expresión débil de CD3, CD14, CD16, CD19, CD20 y CD56. Los eventos de CD pueden ser identificados por la alta expresión de HLA-DR y de CD 123 o CD11c

ANEXO 5
CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Lugar: México DF. CMN La Raza, UMAE HG, Servicio de Hematología Pediátrica. Fecha: _____

Por medio de la presente, autorizo que mi hijo (a) _____

Participe en el protocolo de investigación titulado CELULAS DENDRITICAS Y LINFOCITOS T CITOTOXICOS EN PACIENTES PEDIATRICOS CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA EN DIFERENTES ETAPAS DE LA ENFERMEDAD, registrado ante el comité 3502 con el número: _____

El objetivo del estudio es Conocer cual es la cantidad de células dendríticas y linfocitos T citotóxicos en niños con leucemia linfoblástica aguda en diferentes etapas de la enfermedad.

Se me ha explicado que la participación de mi hijo consiste en utilizar una pequeña cantidad de las muestras de sangre venosa y médula ósea del mismo material obtenido para su diagnóstico y seguimiento de su enfermedad.

Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes y molestias derivados de la participación de mi hijo(a) en el estudio, que son los siguientes: Dolor, moretes, infecciones en sitios de punción, laceración de vena.

En este momento, mi hijo no tendrá ningún beneficio de los resultados del estudio

El investigador responsable se ha comprometido a darme información oportuna sobre cualquier procedimiento alternativo adecuado que pudiera ser ventajoso para el tratamiento de mi hijo(a), así como a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevaran a cabo, los riesgos, benéficos o cualquier otro asunto relacionado con la investigación o con el tratamiento de mi hijo(a).

Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente sin que ello afecte la atención médica que recibo en el Instituto.

El investigador responsable me ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con la privacidad de mi hijo(a) serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque esta pudiera hacerme cambiar de parecer respecto a la permanencia de mi representado(a) en el mismo.

Nombre y firma de ambos padres o tutores.

Nombre, Firma y Matricula de Investigador Responsable

Testigos:

Nombre y Firma

Nombre y Firma

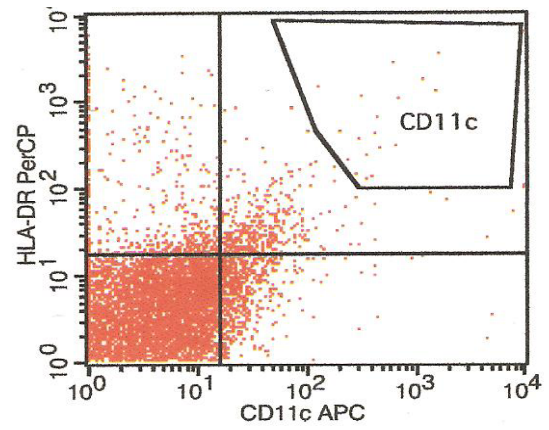
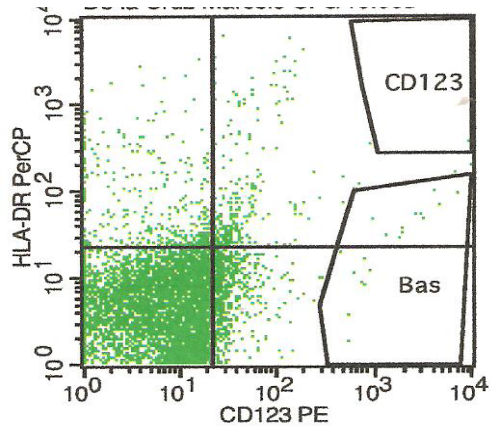
ANEXO 6
PROTOCOLO CMR 2002

ETAPA	TRATAMIENTO
Inducción, 4 semanas	Vincristina 1.5 mg/m ² cada semana (máximo 2 mg) los días 0, 7, 14, 21. Prednisona 40mg/m ² /d del día 0 a 28 Daunorrubicina 30mg/m ² /dosis los días 0 y 1 AR: Cardioxane 300 mg/m ² días 0 y 1 Metotrexate 4g/m ² con rescates de A. Polínico Asparaginasa 25 000 U/ m ² IM x 1 dosis en el día 4 Ara C IT al día 0
Profilaxis a SNC, 3 semanas	RH: Quimioterapia IT con ARA C, MTX, HCS 2 dosis semanales asta 4 dosis. AR: Además de QT IT se indica radioterapia 18 Gy fraccionada
Intensificación, 30 semanas	Ciclos cada 3 semanas: Vincristina 2mg/m ² IV el día 1 (máximo 2 mg) Prednisona 40 mg/m ² /día, los días 1-5. Metotrexate 30mg/m ² IV o IM los días 1, 8, 15. 6-Mercaptopurina 50 mg/m ² /día VO los días 1-15 Asparaginasa 25 000 U/m ² IM semanal x 30 dosis AR: Daunorrubicina 30mg/m ² IV el día 1 del ciclo, previo Cardioxane 300 mg/m ² IV
Mantenimiento, 24 meses con RCC	Ciclos cada 3 semanas: RH: igual que la intensificación, excepto Asparaginasa AR: Igual que la intensificación hasta completar 300mg/m ³ de Daunorrubicina (dosis acumulativa) e incrementar la dosis de Prednisona 120mg/m ² SC los días 1-5

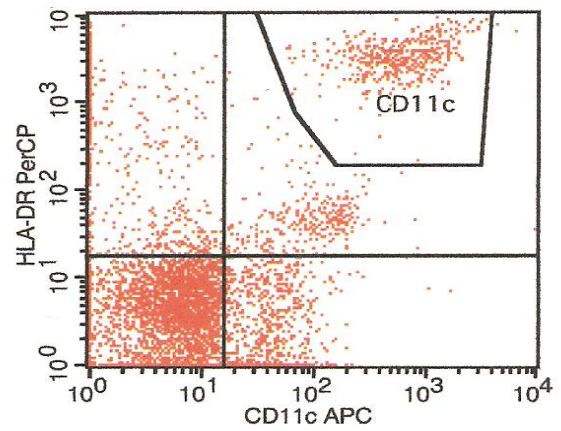
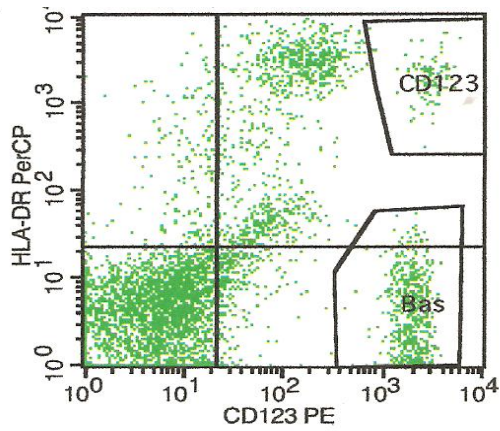
ANEXO 7

CELULAS DENDRITICAS DE SANGRE PERIFERICA EN LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA.

A.



B.

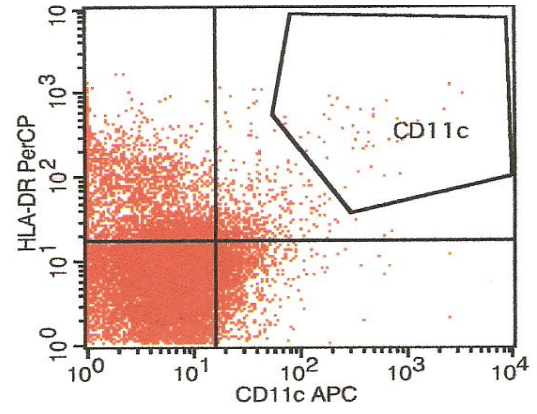
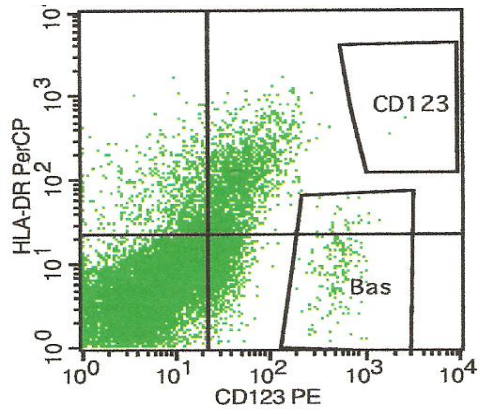


A EN ACTIVIDAD. **B.** EN VIGILANCIA.

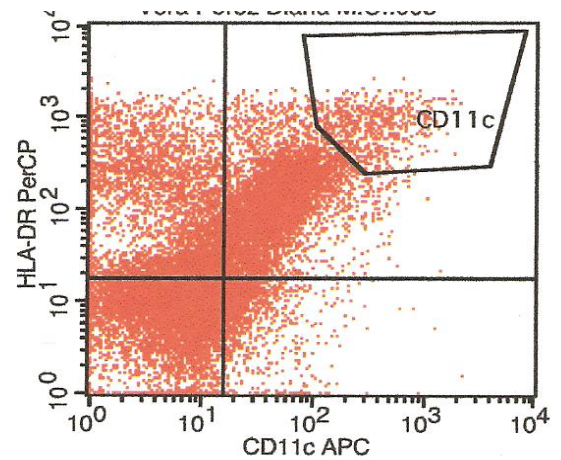
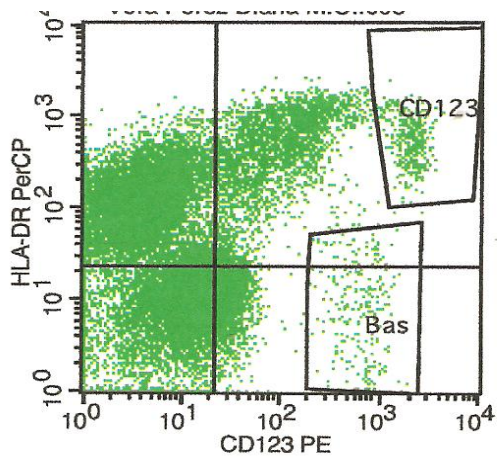
ANEXO 8

CELULAS DENDRITICAS DE MEDULA OSEA EN LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA

A.



B.



A EN ACTIVIDAD. B. EN VIGILANCIA