



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores

Zaragoza

“Relación de la expresión de CD123 con los diferentes tipos de Leucemia Mieloide Aguda (LMA) determinada por Citometría de Flujo”.

TESIS

Que para obtener el título de
Químico Farmacéutico Biólogo

Presenta:

Carla Gisela Vargas Soto.

Asesora de Tesis: M. en C. Rosa Elba Galván Duarte.

Directora de Tesis: M. en C. Laura Josefina Rabelo Carrasco.



México, D.F., Noviembre del 2014.



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.

Agradecimientos.

A Dios por brindarme sabiduría y permitirme llegar a vivir esta maravillosa experiencia.

A la máxima casa de estudios Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, por los profesores que aportaron sus conocimientos, enseñanzas, sufrimientos y alegrías para poder desarrollarme como profesionista.

Al Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional, Siglo XXI, Hospital de concentración y tercer nivel del IMSS lugar de desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Luis Meillon García, Jefe del Servicio de Hematología del Hospital de Especialidades CMN, Siglo XXI, por facilitar el acceso a las muestras de sus pacientes para la realización de este proyecto.

A la M. en C. Laura Rabelo Carrasco Jefa del Laboratorio de Hematología Especial del Hospital de Especialidades CMN, Siglo XXI por su invaluable colaboración y por brindarme la oportunidad de realizar este proyecto. Muchas gracias por su confianza, apoyo científico, profesional y amistad.

A la M. en C. Rosa Elba Galván Duarte por su apoyo en la asesoría de este trabajo. Muchas gracias por brindarme su confianza, seguridad, amistad y por haberme recomendado para ocupar un lugar en este proyecto. .

Dedicatorias.

A mi mamá Irma Soto Martínez por guiarme en este camino de la vida que por muy complicada que se presente siempre estarás apoyándome en las buenas y en las malas y a mi papá Luis Vargas Rivas por esperar lo mejor de mí. Para ambos muchas gracias por su apoyo, paciencia, confianza y por ser una gran inspiración en mi vida, los amo.

A mis hermanos Brenda, Alex, Rodrigo, que también han estado presente en este proceso y quienes presenciaron mi estrés, enojo, tristezas, y alegrías. Chicos los quiero muchísimo.

A mis amigos Adrián, Dora, Liliana, Lucía, gracias por su apoyo y amistad que me brindaron durante todo este tiempo en nuestra querida UNAM

A quienes me ayudaron mentalmente con su apoyo moral y amistad, gracias por acompañarme y apoyarme siempre, los quiero mucho Elba y David. Y recuerden en ésta y en la otra vida siempre estaremos juntos.

A los químicos Verónica, Eva, Miguel y Jesús del Laboratorio Clínico Biodextra por su amistad, consejos y motivación para terminar este trabajo.

Contenido

I. Resumen.	1
II. Abreviaturas.	2
1. Introducción.	3
2. Marco Teórico.	4
2.1. Generalidades de la Leucemia.	4
2.1.1. Epidemiología.	4
2.1.2. Factores de riesgo.	4
2.1.3. Clasificación de las leucemias.	4
2.2. Leucemia Mieloide Aguda.	5
2.2.1. Subtipos de acuerdo a la clasificación FAB de la LMA.	5
2.2.2. Clasificación de la LMA de acuerdo a la OMS.	10
2.2.3. Fisiopatología de la LMA.	10
2.2.3.1. Hematopoyesis normal y leucémica.	10
2.2.4. Diferenciación y desarrollo de las líneas mieloide y monocitoide.	12
2.2.5. Diagnóstico.	14
2.2.5.1. Diagnóstico clínico.	14
2.2.5.2. Pruebas diagnósticas.	14
2.2.6. Tratamiento.	15
2.3. La IL-3 y sus receptores celulares.	16
2.3.1. Señalización de IL-3.	17
2.3.2. IL-3 y sus principales funciones.	18
2.3.3. Importancia del estudio de CD123 en las leucemias.	19
2.4. Fundamentos y aplicaciones de la citometría de Flujo.	20
2.4.1. Generalidades del Citómetro de Flujo.	20
2.4.1.1. Principio del método.	20
2.4.1.2. Componentes del citómetro.	21
2.4.1.3. Fluorocromos.	22
2.5. Fenotipo de la LMA.	23
3. Planteamiento del problema.	25
4. Objetivos.	25
5. Hipótesis.	25
6. Diseño experimental.	26
6.1. Tipo de estudio y universo de estudio.	26
6.2. Criterios de inclusión y exclusión.	26
6.3. Variables.	26
6.4. Material.	26
6.5. Método	27
6.6. Análisis estadístico.	29
7. Resultados.	30
8. Discusión.	37
9. Conclusiones.	39
10. Perspectivas.	39
11. Anexos.	40
11.1. Preparación de soluciones	40
11.2. Solicitud de envío.	40

11.3 Formato de resultados de Inmunofenotipo	40
12. Referencias.	41

I. Resumen

Introducción. La leucemia mieloide aguda (LMA) es una enfermedad maligna caracterizada por la proliferación clonal no regulada de células endógenas de la médula ósea. En estudios realizados por citometría de flujo del CD123 (IL-3R α) en la LMA muestran su presencia en varias neoplasias mieloides y ha sido asociado a un elevado conteo de blastos durante su diagnóstico; por lo que puede ser considerado como un marcador pronóstico para las células madre de la LMA. En México no hay reportes al respecto, por lo que se determinó la expresión de CD123 en la LMA y la relación que tiene este marcador con el comportamiento clínico de la enfermedad.

Material y métodos. Se llevó a cabo un estudio retrospectivo y comparativo de una muestra de 181 pacientes mayores de 16 años, los cuales ingresaron al Servicio de Hematología del Hospital de Especialidades del CMN, Siglo XXI, Hospital de concentración y tercer nivel del IMSS, del 2011 hasta el 2013. A todos los pacientes se les determinaron marcadores inmunofenotípicos para caracterizar las leucemias agudas incluyendo el marcador CD123, mediante la inmunotinción de antígenos de membrana e intracelulares y su análisis por citometría de flujo, así como la cantidad de leucocitos

Resultados y discusión:

Fueron clasificados los tipos de leucemia aguda a partir de los parámetros de laboratorio y marcadores inmunofenotípicos analizados por citometría de flujo, encontrándose que el 44% correspondió a leucemia linfocítica aguda (LLA) y el 56% a leucemia mieloide aguda (LMA). Los pacientes con LMA fueron sub-clasificados en LMA de novo, promielocítica, secundarias y tratadas. En base a los criterios de la OMS de la clasificación de las leucemias agudas del 2008, la leucemia promielocítica aguda (45%) y la LMA de novo (15%) fueron las leucemias mieloides que predominaron. Al comparar la expresión del antígeno CD123 los resultados fueron estadísticamente significativos en pacientes con LMA de novo 44.5%, LMA secundaria 39.0%, LMA tratadas 26.7% y Leucemia Promielocítica Aguda 23.6% con respecto al grupo control 2.8%. La caracterización que encontramos en nuestro trabajo de la expresión de CD123 con respecto a las células madre leucémicas y las hematopoyéticas normales fueron de CD34+/CD38- y CD123+d, CD34+/CD38- y CD123- respectivamente, teniendo una expresión en el grupo control de 3% y en el subtipo de LMA de novo de 43%.

Conclusión:

En este estudio se demostró que el CD123 se expresa en pacientes con Leucemia Mieloide Aguda, mostrándose de manera significativa un incremento de expresión en los blastos leucémicos de la LMA de novo y secundaria. El CD123 pudiera considerarse como un marcador pronóstico para detectar la enfermedad. El inmunofenotipo es un estudio idóneo para evaluar de manera significativa la expresión del CD123.

II. Abreviaturas

Ab	Anticuerpo
AMO	Aspirado de médula ósea
ATRA	Ácido holo-trans-retinoico
CTH	Célula Tronco Hematopoyética
CSL	Célula Stem Leucémica
CD	Grupo de diferenciación (Cluster of differentiation)
DHL	Deshidrogenasa Láctica
FAB	Grupo Franco-Americano-Británico
FISH	Hibridación fluorescente in situ
IL-3	Interleucina 3 hibridación fluorescente in situ
IL-3R α	Receptor α de la Interleucina 3
IL-3R β	Receptor β de la Interleucina 3
JAK	Janus cinasa
LA	Leucemia aguda
LLA	Leucemia Linfoide Aguda
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LPA	Leucemia Promielocítica Aguda
OMS	Organización Mundial de la Salud
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
SMD	Síndrome mielodisplásico
STAT	Transductor de señal y activador de la transcripción (Signal transducer and activator of transcription)
SP	Sangre periférica

1. Introducción

La leucemia es considerada a nivel mundial como un tipo de cáncer que afecta tanto a hombres como a mujeres en diferentes etapas de la vida y que cada día va en aumento. En México la incidencia de la leucemias en general en una proporción con respecto a las mujeres se presenta elevada en los hombres, la cual representa el 5.3% mientras que en las mujeres representa el 4.3%, observándose la mortalidad igualmente elevada en los hombres con un 6.5% y en las mujeres de 5.3% ¹.

Mediante el grado de diferenciación celular, las leucemias se dividen en agudas cuando la enfermedad tiene un tiempo de evolución corto y la población celular está formada por células inmaduras o blastos; mientras que en las crónicas las células son diferenciadas y maduras, además de que la enfermedad puede evolucionar por muchos años sin causar trastornos graves. ^{13, 14}

Las leucemias agudas están formadas a partir de células inmaduras o progenitoras, las cuales al presentarse una mutación en esta célula se desencadena una proliferación clonal de células leucémicas inmaduras. La célula precursora donde se produce la transformación leucémica pierde la capacidad de seguir con su proceso de maduración. ¹³

El grupo French-American-British (FAB) reconoció entre los años setenta y ochenta 11 tipos de leucemias agudas mediante la clasificación morfológica y tinción citoquímica de los blastos leucémicos de la médula ósea, donde tres son de tipo linfóide y ocho de tipo mielóide. Mientras que en la última revisión de la OMS en el 2008 para la clasificación de neoplasias mieloides tomaron en cuenta diversas características morfológicas, citogenéticas e inmunofenotípicas. ²

La Leucemia Mielóide Aguda (LMA) es una neoplasia hematológica caracterizada por un incremento en la médula ósea de células mieloides, acompañado de un bloqueo en su maduración. Para analizar de manera detallada las leucemias mieloides agudas, es necesario integrar tanto los cambios biológicos como los clínicos. Un estudio fundamental para el diagnóstico de las leucemias es el inmunofenotipo por citometría de flujo, mediante el cual se analizan diversos antígenos específicos de las leucemias mieloides. ^{2,3}

El marcador CD123 se conoce como receptor α de la IL-3 (IL-3R α), este es expresado en las células hematopoyéticas con predominio en células mieloides, y escasamente en monocitos, neutrófilos y en subpoblación madura de linfocitos B. El CD123 al ser un receptor de la IL-3, actúa sobre células multipotentes, estimulando su proliferación y supervivencia. ⁶

Estudios realizados acerca del CD123 indican que su presencia puede contribuir en el desarrollo y proliferación de blastos en la leucemia mielóide aguda (LMA) por lo que puede así ser considerado como un marcador pronóstico para las células madre de la LMA. ⁷

2. Marco Teórico

2.1. Generalidades de la Leucemia

La palabra leucemia significa “sangre blanca” (del griego *leuco*: “blanca” y *emia* “sangre”), éste término fue propuesto en 1846 por Rudolf Virchow, La leucemia es un conjunto de enfermedades malignas hematológicas caracterizada por la proliferación no regulada de células endógenas de la médula ósea, donde pueden verse involucradas cualquiera de las células progenitoras hematopoyéticas o sus precursores.¹⁰⁻¹¹

2.1.1. Epidemiología.

En el año 2002, a nivel mundial la leucemia se encontró dentro de las primeras causas de mortalidad por neoplasias malignas y la incidencia por grupo de edad, y género. Durante este año en México, se registraron 108.064 nuevos casos de cáncer, donde el 9.6% correspondió a enfermedades hemato-oncológicas de las cuales la leucemia representó el 8.2%.^{1, 2}

Diversos informes en Europa y Estados Unidos mencionan que la LMA es la leucemia aguda que más frecuentemente se presenta después de los 60 años. La sociedad americana de cáncer informó en el 2009, 12 810 nuevos casos de LMA Asimismo, la tasa de mortalidad por leucemia es constante hasta los 35 años de edad (1.7 y 2.5 por cada 100,000 habitantes) tanto en hombres como en mujeres, duplicándose a partir de los 35 años de edad y llegando a un nivel máximo en la población mayor de 65 años (16.3 en hombres y 13.0 en mujeres). La mortalidad por leucemia mieloide correspondió al 4.2% de las defunciones registradas, localizándose dentro de los primeros lugares como causa de muerte.^{1, 2}

2.1.2. Factores de riesgo.

La etiología de la leucemia por el momento es desconocida. Diversos estudios epidemiológicos evidencian varios factores de riesgo asociados a esta patología, dentro de las principales se encuentran factores ambientales (tabaquismo, exposición a altas dosis de radiación y bencenos, agentes quimioterapéuticos), factores genéticos, inmunológicos, biológicos, entre otros.^{1, 2, 14}

2.1.3. Clasificación de las leucemias.

Dependiendo del origen de la célula en donde se produce la transformación leucémica (clona) las leucemias se clasifican en mieloides o linfoideas. La clasificación de leucemias agudas más utilizada ha sido la del grupo French-American-British (FAB) que reconoce 11 tipos de leucemias agudas basándose en el tipo de células leucémicas y su grado de madurez, dividiéndolas en 3 de tipo linfóide y 8 de tipo mieloide (tabla 1).¹⁵

Tabla 1. Clasificación morfológica de leucemias agudas por la FAB¹⁵

Leucemias agudas linfoblásticas (LAL)

- LA-L1 linfoblástica "típica"
- LA-L2 linfoblástica "atípica"
- LA-L3 parecida al linfoma de Burkitt

Leucemias agudas mieloblásticas (LMA)

- LA-M0: mieloblástica diferenciada mínimamente
- LA-M1: mieloblástica inmadura
- LA-M2: mieloblástica madura
- LA-M3: promielocítica
- LA-M4: mielomonoblástica
- LA-M5: monoblástica pura
- LA-M6: eritroleucemia
- LA-M7: megacarioblástica

La última revisión de la OMS en el 2008 para la clasificación de neoplasias mieloides cuenta con diversas categorías y sub-categorías descriptivas, esta clasificación ha tenido un gran impacto y ha sido de gran utilidad clínica para el manejo de los pacientes y que en conjunto con la clasificación FAB reúne diversas características actualizadas a nivel citogenética, inmunofenotipo y molecular.^{13, 16}

2.2. Leucemia Mieloide Aguda.

La leucemia mieloide aguda (LMA) es una enfermedad hematológica maligna que proviene de una pequeña población de células leucémicas de origen mieloide que detienen la maduración de las células en desarrollo mieloide normal y provocan la acumulación de un gran número de blastos leucémicos no funcionales en la médula ósea, la sangre y otros tejidos, iniciando y propagando así la enfermedad.^{5, 11, 16}

Aunque en la mayoría de los pacientes puede ser tratada de manera eficaz con quimioterapia de inducción estándar, la recaída es un problema común, con una supervivencia del 30% al 40% a los 4 años después del diagnóstico.^{11,16}

2.2.1. Subtipos de acuerdo a la clasificación FAB de la leucemia mieloide aguda.

Como se mencionó existen 8 diferentes tipos de leucemias mieloides agudas de acuerdo a la clasificación FAB, basándose en la morfología principalmente para observar el tipo de células leucémicas y su grado de madurez.

Las principales características citológicas que han sido utilizadas para evaluar el tipo de blastos son el tamaño celular, cromatina nuclear, forma nuclear, presencia de nucléolos, cantidad de citoplasma, cantidad de basofilia en el citoplasma, presencia de bastones de Auer o inclusiones citoplasmáticas. Además han sido observados tres tipos diferentes de blastos los cuales se basan el grado de granularidad, siendo los de tipo I como agranulares, los de tipo II como granulares y los de tipo III hipergranulares.

- La leucemia mieloide aguda mínimamente diferenciada (FAB-M0), como el nombre lo dice los blastos no desarrollan características morfológicas mieloide, no presentan gránulos (figura 1), menos del 3% de los blastos son positivos a la mieloperoxidasa (MPO) o Sudán Negro B (SNB), la presencia de cariotipo es desfavorable con (5q-,7q-); solo puede diferenciarse de la LLA y LMA-M1 por inmunofenotipo. De los subtipos de LMA, ésta es la que tiene peor pronóstico de todas^{9,15}.

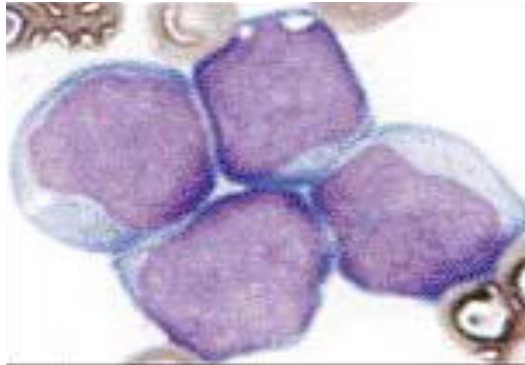


Figura 1. Blastos que corresponden a una LMA-M0¹⁶

- La leucemia mieloide aguda sin maduración (FAB-M1) presenta una mínima diferenciación mieloide, puede ser posible diferenciar una discreta granulación citoplasmática. El 90% de las células no eritroides son mieloblastos típicos con granulación azurofila (figura 2), más del 90% son blastos de tipo I. La MPO y el SNB están presentes en más del 3% de las células.^{9,13,15}

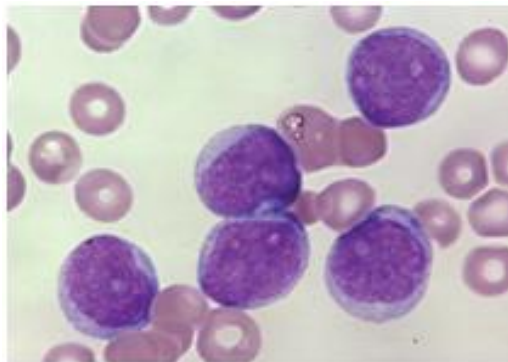


Figura 2. Mieloblastos correspondientes a una LMA-M1¹⁶

- La leucemia mieloide aguda con maduración (FAB-M2) presenta maduración granulocítica y hay maduración más allá del estadio de promielocito en más del 10% de las células no eritroides. Los blastos son pequeños a medianos, con cromatina laxa presente en el núcleo (figura 3), los blastos son tipo I y II, además de ser MPO y SNB positivos^{9,13, 15}.

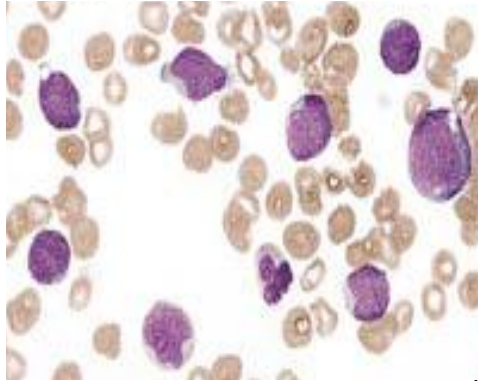


Figura 2. Blastos con maduración en la LMA-M2¹⁶

- La leucemia promielocítica aguda (FAB-M3) presenta proliferación de blastos y promielocitos anormales con gránulos positivos a MPO, la médula presenta pocas células blasticas agranulares, el núcleo presenta aspecto monocitoide y perfil bilobulado (figura 4). También se presentan blastos de tipo III, además de numerosos cuerpos de Auer o también haces de cuerpos de Auer (células faggot).^{9,13,15}

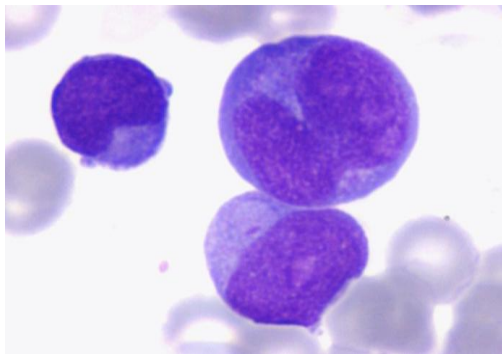


Figura 3. Células blasticas en LMA-M3¹³

- En la leucemia mielomonocítica aguda (FAB-M4) se encuentran presentes blastos mieloides y monocitoides en la sangre y médula, los blastos son del tipo I y II, estos de gran tamaño y basofilia variable, presencia de nucléolos y el núcleo con forma redondeada, arriñonada o irregular (figura 5). Más del 30% son mieloblastos, los cuales reaccionan con Peroxidasa o Cloroacetato esterasa, mientras que los monoblastos reaccionan con Esterasa inespecífica.^{9,13,15}

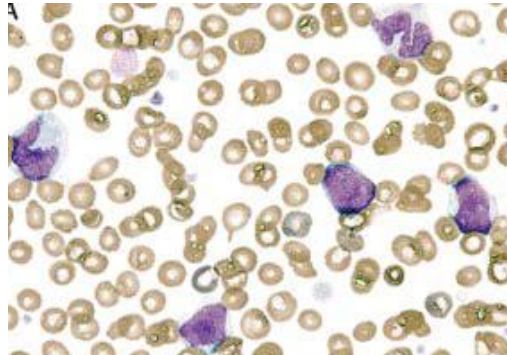


Figura 4. Blastos mieloides y monocitoides en la LMA-M4¹⁶

- La leucemia monocítica aguda (FAB-M5) presenta más del 30% de blastos en la médula con más precursores mieloides que eritroides y donde el 80% de las células son de la línea monocítica. Se reconocen dos subtipos de M5; la M5a en donde más del 80% de todas las células monocíticas son monoblastos (figura 6) y en la M5b menos del 80% son monoblastos y la células predominantes son promonocitos y monocitos (figura 7)^{9,15}.

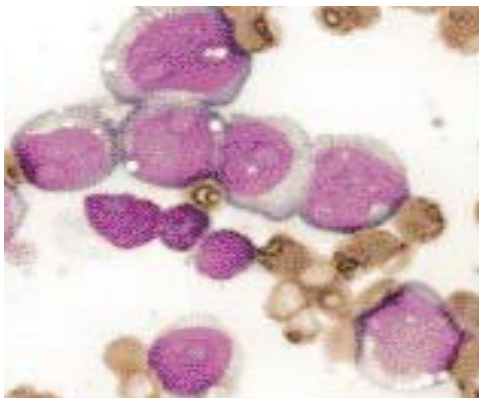


Figura 6. Monoblastos en la LMA-M5a¹⁶

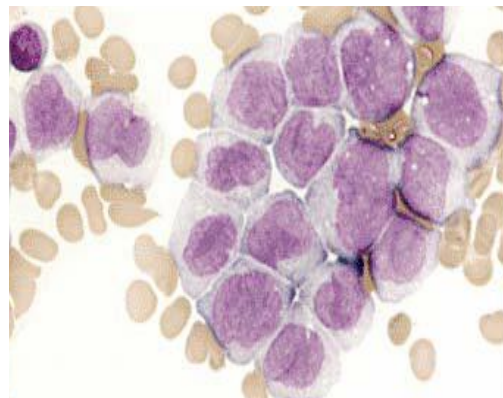


Figura 7. Promonocitos y monocitos en la LMA-M5b¹⁶

- La eritroleucemia aguda (LMA-6) es la única LMA con hiperplasia de precursores eritroides, más del 50% de las células de médula ósea son eritrocitos nucleados, el 30% de las células restantes son mieloblastos. Los eritroblastos medulares son muy anormales con formas multinucleadas gigantes, con gemación nuclear y fragmentación. Las coloraciones con PAS suelen ser positivas en las células eritroides (figura 8)^{9,15}.

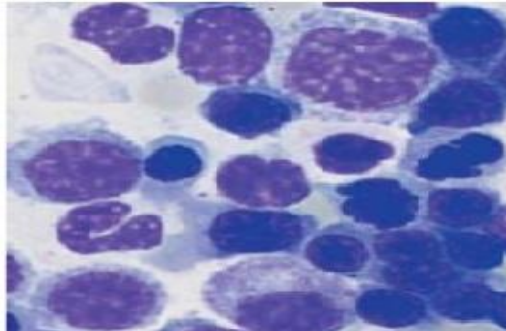


Figura 8. Precursores eritroides y mieloblastos en LMA-M6

- La leucemia megacarioblástica aguda (LMA-M7) existe una presencia de más del 30% de blastos de la línea megacariocítica en la médula ósea y/o sangre, los blastos son muy polimórficos e inmaduros, con citoplasma agranular y basofilo, en sangre periférica se observan fragmentos megacarioblasticos al igual que megacariocitos (figura 9). Los blastos pueden ser identificados con la actividad de peroxidasa.^{9,15}

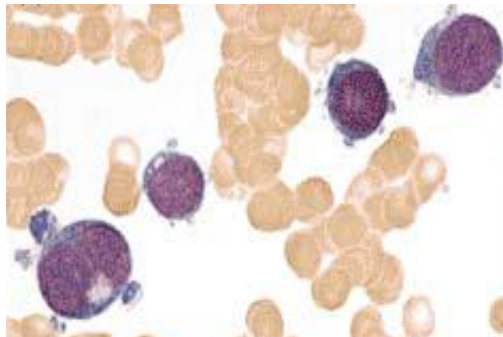


Figura 9. Blastos LMA-M7¹³

2.2.2. Clasificación de la LMA de acuerdo a la OMS.

Los criterios de la OMS para las neoplasias mieloides, toma en cuenta alteraciones citogenéticas específicas, cambios genéticos moleculares, antecedentes de trastornos hematológicos (LMA secundaria), también las características morfológicas y/o inmunofenotípicas son utilizadas para establecer el linaje de las células neoplásicas y evaluación de su maduración (tabla 2).

Un cambio importante propuesto en la clasificación de la OMS se establece el 20% o más de blastos en sangre periférica o médula ósea es considerado dentro de una leucemia mieloides aguda cuando se produce de novo¹⁸⁻²⁰.

Tabla 2. Clasificación de leucemias mieloides agudas (LMA) por la OMS (2008)¹⁷

LMA con anomalías genéticas recurrentes	LMA sin otra especificación:
LMA con t(8;21); RUNX1-RUNX1T1	LMA con mínima diferenciación
LMA con t(9;11); MLLT3-MLL	LMA sin maduración
LMA con t(6;9); DEK-NUP214	LMA con maduración
LPA con t(15;17); PML-RARA	Leucemia mielomonocítica aguda
LMA con inv(16) o t(16;16); CBFB-MYH11	Leucemia mieloblastica/monocítica aguda
LMA con inv(3) o t(3;3); RPN1-EVI1	Leucemia eritroide aguda
LMA () con t(1;22); RBM15-MKL1	Leucemia pura eritroide
Entidad provisional: LMA con NPM1 mutado	Eritroleucemia eritroide/mieloide
Entidad provisional: LMA con CEBPA mutado	Leucemia megacarioblastica aguda
	Leucemia Basofílica aguda
	Panmielosis con mielofibrosis aguda
<ul style="list-style-type: none"> Leucemias agudas de linaje ambiguo: Leucemia aguda de fenotipo mixto con t(9;22)(q34;q11.2); BCR-ABL1 Leucemia aguda de fenotipo mixto con t(v;11q23); MLL rearranged Leucemia aguda de fenotipo mixto, mieloides-B, NOS Leucemia aguda de fenotipo mixto con mieloides-T, NOS 	<ul style="list-style-type: none"> LMA con cambios relacionados a mielodisplasia

2.2.3. Fisiopatología de la LMA.

2.2.3.1. Hematopoyesis normal y leucémica.

La hematopoyesis es definida como la formación y desarrollo de las células sanguíneas, Se inicia a partir de la célula tronco hematopoyética (CTH), que es capaz de autorrenovarse, diferenciarse y proliferar extensamente, la cual en conjunto con células estromales y sus productos, regulan la localización y fisiología de las células hematopoyéticas, además son fácilmente estimuladas para entrar al ciclo celular mediante la exposición in vitro a citocinas^{18, 19}

Se reconocen cuatro tipos de compartimientos hematopoyéticos: comenzando con el compartimiento pluripotencial en donde se encuentran la CTH, las cuales tienen

una alta capacidad de autorenovación. El fenotipo de esta célula puede variar drásticamente y de forma reversible cuando son estimuladas por algunas citocinas (IL-11, IL-3, Ligando KIT). Debido a que no son distinguibles morfológicamente, son identificadas por inmunofenotipo como $CD34^+/38^{-/+débil}$, así como $CD90^+, CD117^+$, $CD133$ y $HLA-DR^-$, mostrando la ausencia de $CD123$ y de los marcadores de linajes específicos (Lin^-).^{18, 19}

En el compartimiento bipotencial, la célula que da origen a la unidad formadora de colonia granulocítica-monocítica (UFC-GM) expresa los antígenos mieloides $CD33, CD15$ y $CD13$ y posiblemente $CD14$ y $HLA-DR$, con expresión débil de $CD34$, otra característica es que pierden las propiedades de dividirse¹⁸.

El compartimiento unipotencial se forma por células progenitoras y por células precursoras. Las células progenitoras presentan patrones de expresión de marcadores celulares de acuerdo al linaje específico (Lin^+), estas células pierden su capacidad de auto-replicación pero siguen diferenciándose. En el compartimiento terminal, se localizan las células maduras sanguíneas.¹⁸

Los progenitores mieloides se desarrollan a partir de la UFC-GM y requieren para su diferenciación un amplio número de citocinas como el factor estimulador de colonias granulo-monocítico (GM-CSF), la IL-3, IL-6, entre otros. Estos progenitores no presentan auto-renovación a diferencia de las CTH, pero sí presentan marcadores de linajes específicos (Lin^+).^{18, 20}

Los procesos de auto-renovación y diferenciación están controlados por grupos alternados de genes donde unos mantienen la capacidad de auto-renovación y apagarse mientras que otros al mismo tiempo se encienden para regular la diferenciación. Estos genes y los factores de transcripción cada vez que realizan este proceso de encendido y apagado, son capaces de inducir la expresión de receptores de crecimiento involucrados con la diferenciación eritroide megacariocítica y granulo-monocítica.¹⁹

Si se presentan mutaciones genéticas en el sistema hematopoyético y estas se acumulan dentro de las células stem se pueden generar pre-células stem leucémicas (pre-LSC) debido a la capacidad de auto-renovación celular. Sucesivamente, las mutaciones ocurren en las células progenitoras, pero como éstas carecen de capacidad de autorenovación, la mutación se propaga, generando a las células progenitoras leucémicas y a su vez, un bloqueo en la maduración como se ilustra en la figura 10^{20,21}.

En las primeras descripciones acerca de la célula stem leucémica (CSL) de la LMA humana, se identificó que una población de células LMA humanas $CD34^+/CD38^-$ fueron capaces de transferir la enfermedad a ratones NOD/SCID. De la misma manera que las CTH, las CSL comparten características que permiten su supervivencia, y pueden expresar genes de multirresistencia a fármacos (MDR1) los cuales pueden eliminar a los agentes quimioterapéuticos

potencialmente citotóxicos de la célula, y con esto la CSL puede convertirse en un reservorio de mutantes que son resistentes a terapias convencionales²⁰⁻²³.

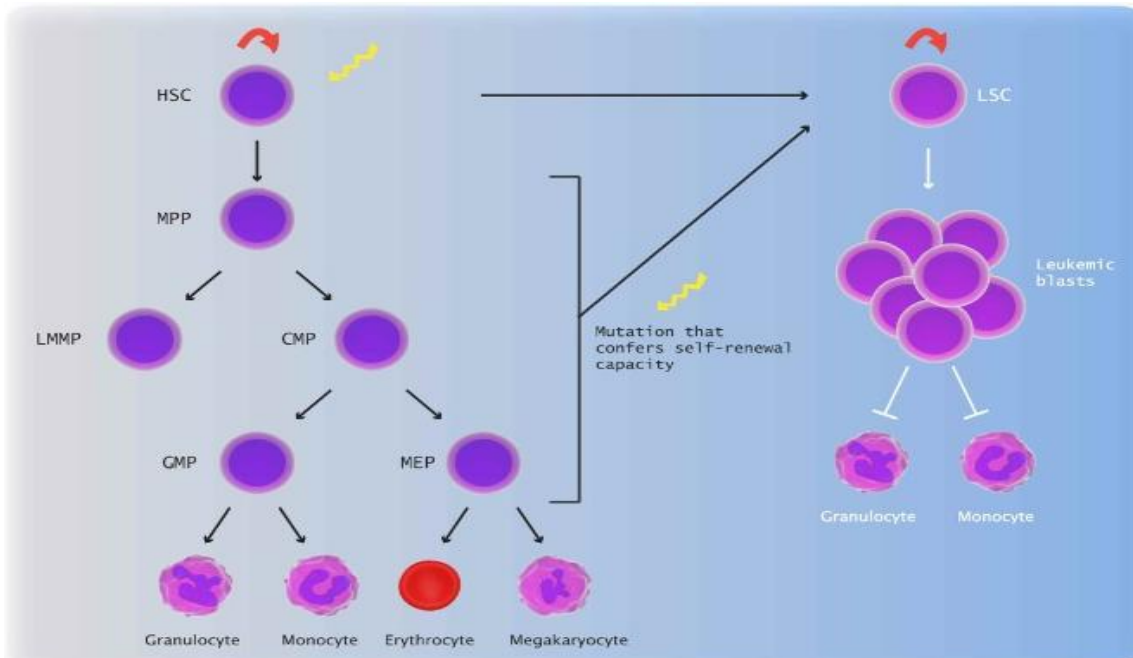


Figura 10. Mielopoyesis normal y leucémica. En la imagen del lado izquierdo se muestra la hematopoyesis normal con sus respectivos progenitores y células maduras, mientras que del lado derecho se muestra la mielopoyesis leucémica. También se indica la localización de las diferentes mutaciones que pueden afectar a la mielopoyesis normal. Tomado de Horton SJ et al, Recent advances in acute myeloid leukemia stem cell biology.²¹

2.2.4. Diferenciación y fenotipo de las líneas mieloide, monocitoide, eritroide y megacariocítica

Tanto en los progenitores como en el transcurso de la diferenciación granulocítica, se expresan diversas proteínas específicas de la superficie celular, las cuales son de suma importancia para la diferenciación y función mieloide. Estos marcadores sirven también para distinguir las diferentes etapas de maduración mieloide²⁰.

El fenotipo de las CTH tempranas son CD34+/CD33-/Lin-, pero en el progenitor mieloide común UFC-GEM hay co-expresión de CD33 y en los precursores granulocíticos y monocíticos el CD33 se expresa en niveles altos aunque disminuye en la maduración granulocítica. De los marcadores específicos del linaje granulocítico (figura 3) que se expresan sólo a nivel mieloblasto y monoblasto. Comienza a disminuir HLA-DR, CD34 y CD117 hasta dejar de expresarse en la etapa de mielocito, la MPOc (mieloperoxidasa citoplasmática) también se expresa en este linaje encontrándose mínimamente desde la etapa de mieloblasto.^{22, 23}

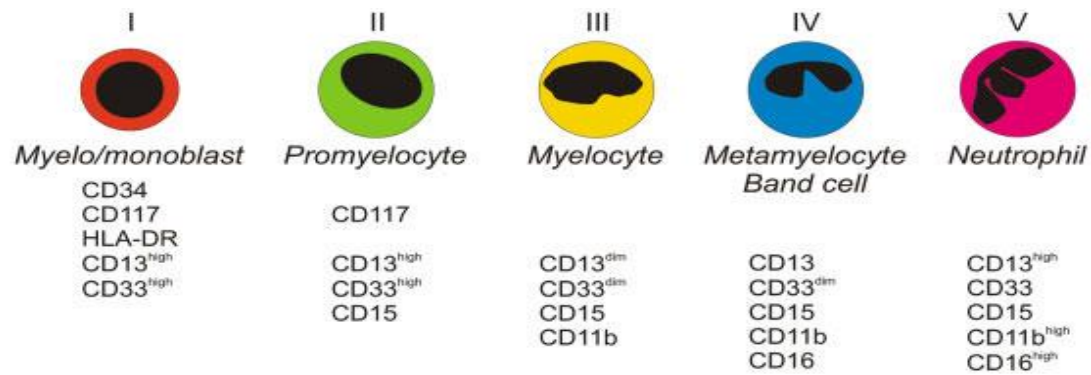


Figura 11. Desarrollo normal granulocítico en la médula ósea. Tomado de: Van Lochen EG et al. Immunophenotypic Differentiation Patterns of Normal Hematopoiesis in Human Bone Marrow.²²

De la misma manera que en la línea granulocítica, los marcadores específicos del linaje monocítico (figura 12) en la etapa de mieloblasto son los mismos, comienza a variar la expresión con respecto al CD117 y CD34 que dejan de expresarse en la etapa de promonocito, el HLADR no deja de expresarse y también en la etapa de monoblasto se expresa el CD64.²²

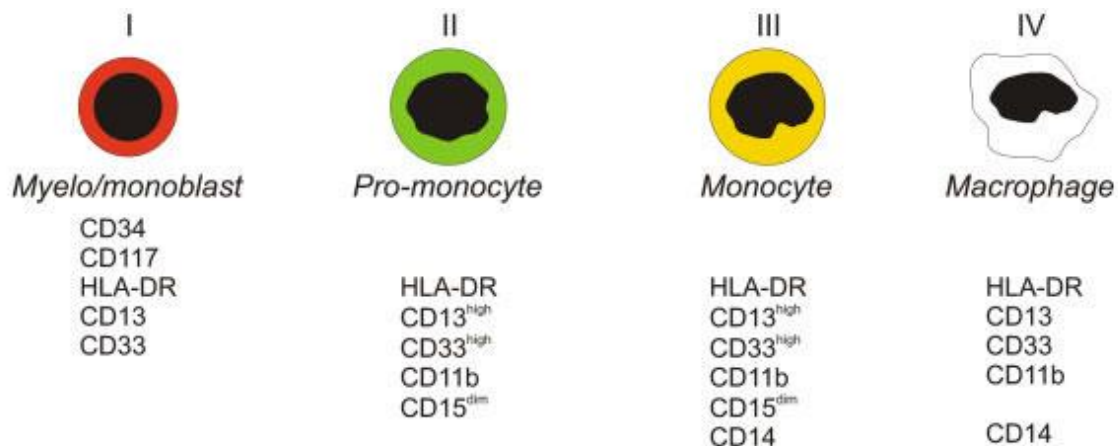


Figura 12. Desarrollo normal monocítico en la médula ósea Tomado de: Van Lochen EG et al. Immunophenotypic Differentiation Patterns of Normal Hematopoiesis in Human Bone Marrow.²²

Los marcadores específicos del linaje eritroide (figura 13) en la etapa de proeritroblasto el CD117 está presente, de la misma manera, se localiza el CD45 y CD71, comienza a variar la expresión con respecto al CD117 dejando de expresarse en la etapa de eritroblasto, y haciéndose presente el CD36, CD235a.²²



Figura 13. Desarrollo normal eritroide. Tomado de: Van Lochen EG et al. Immunophenotypic Differentiation Patterns of Normal Hematopoiesis in Human Bone Marrow.²²

2.2.5. Diagnóstico

2.2.5.1. Diagnóstico clínico.

Los factores de riesgo comunes para la LMA se encuentran la edad, exposición a bencenos, radioterapia, quimioterapia, síndrome mielodisplásico, anemia de Fanconi y Trisomía 21. El paciente con LMA presenta dentro del cuadro clínico síndrome febril, pérdida de peso, síndrome anémico, síndrome purpúrico, dolor óseo, algunos pacientes presentan sarcoma granulocítico, organomegalia, infiltración en piel, encías, orbitas, espacio epidural y con una infiltración a sistema nervioso central menor al 5%².

Dentro de los hallazgos clínicos de la LMA la cuenta leucocitaria debe ser menor a 5.000/ μ L (5×10^9 /L), además de que se puede presentar anemia y/o trombocitopenia donde el valor de las plaquetas es menor a 50.000/ μ L (50×10^9 /L) y pueden mostrarse defectos en la agregación plaquetaria. Mientras que el valor de los mieloblastos sanguíneos y los presentes en médula ósea varían de un 3-95% del total de leucocitos, y un incremento del DHL^{2,3}.

2.2.5.2 Pruebas Diagnósticas

Para el diagnóstico de la LMA es necesario un examen de frotis de sangre periférica y médula ósea para el estudio morfológico con tinción de Wright, detectando la presencia de más del 20% de blastos en la médula ósea (de aspirado o biopsia dependiendo el caso). La detección de los marcadores de LMA (CD3, CD4, CD7, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD33, CD34, CD36, CD45, CD117, HLA-DR, MPOc) por inmunofenotipo por citometría de flujo multiparamétrica.^{2,3}

Se utiliza la citoquímica para la identificación del linaje celular y características morfológicas celulares de los mieloblastos y monoblastos con la tinción de ácido periódico de Shichiff (PAS), Sudán negro y tinción de mieloperoxidasa, siendo útiles si no se cuenta con estudio inmunofenotípico.^{2,3}

La evaluación de las características sobresalientes que propone la OMS para el diagnóstico de las neoplasias mieloides es realizar cuando sea posible el análisis citogénético como parte inicial del diagnóstico, como la prueba RT-PCR y el FISH para la certeza diagnóstica en alteraciones moleculares y el diagnóstico temprano en los pacientes.^{2,3}

2.2.6. Tratamiento

El tratamiento farmacológico de los tumores malignos es una modalidad terapéutica denominada quimioterapia. La quimioterapia del cáncer nace y se desarrolla como consecuencia de la ineficacia de las medidas exclusivamente locales en el control sistémico de la enfermedad. El factor más condicionante de la respuesta de un tejido tumoral a la quimioterapia es su fracción celular en crecimiento. Tumores con alta proliferación celular son vulnerables a la acción de agentes citostáticos²⁴.

Desde el punto de vista celular, existen en los tumores tres compartimentos: compartimento proliferativo, compuesto por células que se encuentran en fase de crecimiento y ciclo celular; compartimento potencialmente proliferativo, que incluye células que tienen capacidad de duplicarse, pero que están en estado de reposo; y compartimento no proliferativo, que incluye células que no tienen capacidad ni posibilidad de duplicarse por encontrarse en fases muy avanzadas de diferenciación²⁴.

Dado que la mayoría de los tejidos normales apenas tienen células en fase de división o proliferación, estos son escasamente sensibles a la acción de los citostáticos. La quimioterapia tumoral antiproliferativa tiene actividad sobre las células proliferativas en fase de ciclo celular. Después de la administración de citostáticos las células normales son capaces de recuperar su número y función, mientras que las células tumorales se recuperan en menor cantidad, por lo que se reduce su número^{24, 25}.

Una mayoría de citostáticos ejercen su acción interfiriendo con la síntesis o función de los ácidos nucleicos, ADN, ARN (Daunorrubicina o Idarrubicina) o impidiendo la formación de determinadas proteínas e interfiriendo con las funciones normales de varios metabolitos esenciales afectando la fase S del ciclo celular (Citarabina). Los alcaloides de la Vinca y taxanos antagonizan la formación del uso mitótico funcional en la fase M²⁴.

El tratamiento usual de la LMA está conformado por una fase de inducción, donde está involucrada una combinación de altas dosis de medicamentos para poder erradicar la masa leucémica y así una restauración de la hematopoyesis normal obteniéndose una remisión. El esquema de combinación con mayores resultados de éxito utilizado en la LMA incluye antraciclina (Daunorrubicina o Idarrubicina) y Citatabina, con excepción a la leucemia promielocítica aguda (LPA), que consiste en ácido holo transretinoico (ATRA) más una antraciclina².

Una vez que se obtiene la remisión, el tratamiento adicional está indicado para preservar el estado de remisión, que puede consistir en quimioterapia citotóxica, trasplante de progenitores hematopoyéticos o quimioterapia de mantenimiento a bajas dosis, lo cual va a depender tanto de los factores de riesgo y del estado funcional del paciente²

2.3. La IL-3 y sus receptores celulares.

Las citocinas son moléculas glucoprotéicas que actúan como comunicadores químicos llevando información de una célula a otra. La unión de una citocina a su receptor específico, genera una cascada de señales intracelulares que conducen al control de la expresión de uno o varios genes, como expresión de la actividad funcional de la célula. En general las citocinas refuerzan los procesos hematopoyéticos y los de inmunidad innata y adquirida.²⁶

La mayoría de los receptores de citocinas consta de múltiples subunidades como la subunidad única de unión-ligando específico y la subunidad-señal de transducción, dentro de las cuales se reconoce el receptor de clase I conformado por superfamilias de citocinas, de clase II a la superfamilia de las inmunoglobulinas, de la proteína de tirosina, de la superfamilia de receptores de TNF de quinina y de quimiocinas respectivamente. Los receptores de citocinas hematopoyéticas pueden ser divididos en familias basadas en el número de subunidades y / o en la presencia de subunidades compartidas (figura 14),^{27, 29}.

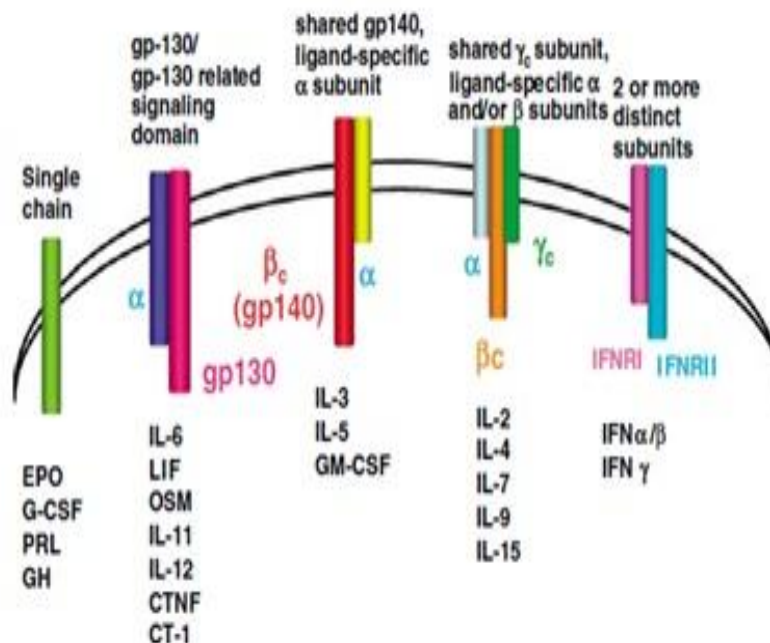


Figura14. Principales subtipos de receptores de citocinas se muestran aquellos subtipos de receptores cuya señal es a través de la subunidad gp-130, compartido a subunidad gp-140, compartido a subunidad γ_c , de dos o más distintas subunidades, y los que son de una sola cadena,²⁷

La interleucina 3 (IL-3) es una citocina producida principalmente por células T activadas, regula la producción y función de células a nivel hematopoyético e inmunológico. El gen de la IL-3 humana se localiza en el cromosoma 5q y consta de cinco exones y cuatro intrones, la proteína IL-3 humana exhibe dos sitios de glicosilación ligando-asparginasa. El receptor IL-3 de superficie celular se compone de una subunidad- α de 60-70kDa (IL-3R α) y una subunidad- β de 130-140kDa (IL-3R β),²⁸⁻³⁰

El receptor IL-3R α (IL-3R α o CD123) pertenece a la superfamilia de receptores de citocinas clase I, es expresado en células hematopoyéticas, con predominio en células mieloides especialmente en células diferenciadas y muy escasamente en monocitos, neutrófilos, basófilos y en subpoblación de linfocitos B.²⁸⁻³⁰

La cadena α de la IL-3, IL-5 y FSC-GM tienen diferentes estructuras pero todos ellos tienen un ligando en el dominio de unión extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular. Estas cadenas parecen realizar funciones de transducción, y la cadena α del IL3R ha sido demostrado que es necesaria para la activación de la STAT-5.²⁸⁻³⁰

2.3.1. Señalización de IL-3

La cadena α de la IL-3, FSC-GM e IL-5 tienen diferentes estructuras pero todos ellos tienen un ligando en el dominio de unión extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular. Estas cadenas parecen realizar funciones de transducción, y la cadena α de la IL3R ha sido demostrada que es necesaria para la activación de los STAT-5. Esta región puede mediar a su vez la activación transcripcional de *c-fos* y *c-jun* y mediar también la activación de c-Raf y p70S6K.^{28,29}

Las cadenas α y β de la IL-3R no se asocian en ausencia de un ligando. La presencia del ligando induce a las cadenas α y β a asociarse para formar un complejo heterodimérico (figura 15). Este proceso constituye una alta afinidad de unión y una activación del receptor óptima y requiere de la formación de enlaces disulfuro entre las cadenas α y β permitiendo una heterodimerización del receptor. La activación del receptor es seguida por la activación del receptor asociado a quinasa JAK2 y a la fosforilación de serina y tirosina en la cadena β citoplasmática.²⁷⁻²⁹

Residuos de aminoácidos en la IL-3 humana (ácido aspártico 21 y el ácido glutámico 22) interactúan con IL-3R cadena α y β siendo trascendental en la actividad de la IL-3. Se cree que la señalización de la IL-3R α es principalmente a través de STAT5 y las vías de MAPK. El CD123 está asociado a la cadena de señalización de CD131, ya que en conjunto participan en los efectos biológicos de la IL-3.²⁸⁻³⁰

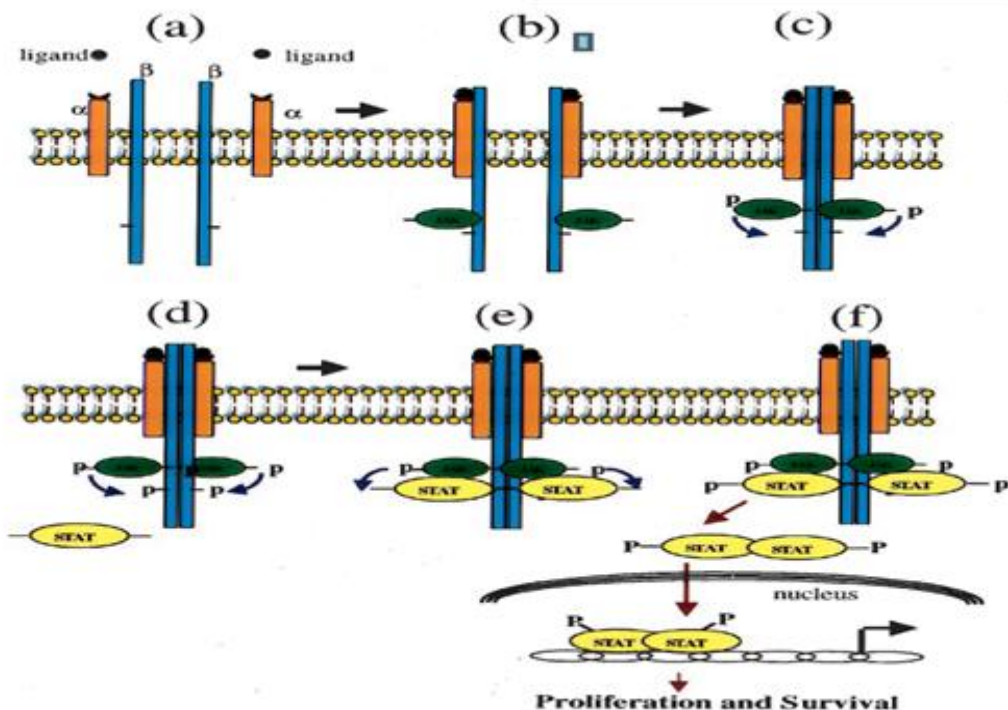


Figura 15. Vía de señalización de JAKs que utiliza la IL-3 . la IL-3 está mediada por esta vía de señalización la cual realiza los siguientes pasos: a) se observan los ligandos (IL-3) y los receptores con sus respectivas cadenas α y β b) unión del ligando (IL-3) al receptor (CD123) c) las JAK fosforilan los residuos de tirosina de la porción intracelular del receptor, d) y e) las JAK fosforilan los STAT sobre los restos de tirosina, f) los STAT con fosfotirosinas se dimerizan, se trasladan al núcleo y se unen los elementos de respuesta del ADN específicos para introducir la transcripción de genes específicos²⁸

2.3.2. La IL-3 y sus principales funciones.

La interleucina 3 (IL-3) por su capacidad de estimular el desarrollo de linajes de células hematopoyéticas en la médula ósea también es conocido como un factor estimulante de crecimiento. La IL-3 promueve el desarrollo de las células hematopoyéticas a través de la activación del receptor complejo de IL-3 (IL-3R).³⁰

En el sistema vascular el receptor de IL-3 en las células endoteliales estimula la proliferación celular, la migración y formación de vasos sanguíneos. Mientras que en la inflamación alérgica la IL-3 es conocida por su capacidad de estimular directamente las reacciones pro-inflamatorias a partir de células inmunes y de la liberación de basófilos, además de una posible participación en las actividades alérgicas, en el asma, la urticaria crónica y algunas reacciones de hipersensibilidad.³⁰

Estudios realizados en la IL-3 en el cerebro indican que la IL-3 y sus receptores se expresan continuamente en el cerebro del ratón y que el IL-3R α es expresado principalmente en células progenitoras neuronales y neuronas, siendo así la IL-3 un promotor de la diferenciación y supervivencia de los progenitores neuronales.³¹ Importancia del estudio de CD123 en las leucemias.

2.3.3 Importancia del estudio de CD123 en la leucemia mieloide aguda

El CD123 ha sido detectado en una variedad de neoplasias hematopoyéticas y en células madre hematopoyéticas de la leucemia mieloide aguda, observándose un elevado incremento sobre células hematopoyéticas leucémicas. Una elevada expresión de CD123 en LMA está asociada a recuentos blásticos altos durante el diagnóstico.^{6-9,32-34}

Testa U. y colaboradores mencionan que en estudios reportados de pacientes, los blastos que expresan niveles elevados de IL-3R α (CD123) mostraron una mayor actividad en el ciclo celular y aumento en la resistencia a la apoptosis provocada por la privación del factor de crecimiento, buscando además en estos blastos leucémicos (CD34⁺CD38⁻) una posible asociación entre los niveles altos de IL-3R α y la respuesta al tratamiento, además de observar una buena correlación entre el número de blastos y la IL-3R α .^{7,9}

También observaron que los niveles elevados de la IL-3R α en blastos presenta una disminución en las remisiones completas, en las recaídas y supervivencia que en niveles normales, sugiriendo así que la expresión desregulada de la IL-3R α contribuye a la proliferación de blastos y esto a un mal pronóstico.^{7,9}

Testa U. y colaboradores mencionan además que en estudios realizados sobre la IL3R α en blastos de LMA de una población enriquecida en células madre leucémicas, mostro que estas células expresan niveles elevados de IL3R α mientras que en su contraparte normal expresa niveles bajos de IL3R α , sugiriendo que la IL3R α sea considerado como un marcador único para las células madre de la LMA.^{7,33}

Otro estudio realizado por Jin L. y col empleando ratones inmunodeficientes plantea que a partir de un anticuerpo monoclonal neutralizante contra CD123 inhibió la supervivencia mediada por la IL-3 de células stem leucémicas de LMA in vitro, demostrando también que el sistema inmune innato desempeña un papel fundamental en la intervención de efectos antileucémicos aumentando la posibilidad de que tanto éste como otros anticuerpos monoclonales puedan dirigirse a las células stem leucémica.

El síndrome mielodisplásico (SMD) comprende de un grupo heterogéneo de trastornos malignos caracterizado por una hematopoyesis ineficaz en uno o más linajes de la médula ósea, por consecuencia, se lleva a cabo una proliferación y diferenciación anormal de estos linajes y por tanto una eventual transformación a LMA; por esta razón hay una dificultad en la detección temprana de la clona maligna. Estudios realizados en el SMD han encontrado que se presenta una expresión anormal en células madre de los factores de crecimiento hematopoyéticos incluyendo la expresión de CD123.^{6,32}

2.4. Fundamentos y aplicaciones de la Citometría de Flujo.

2.4.1. Generalidades del Citómetro de Flujo.

La citometría de flujo es un método rápido, objetivo y cuantitativo de análisis celular (núcleos, cromosomas, mitocondrias) u otras partículas en suspensión. Es un método multiparamétrico ya que es capaz de medir múltiples parámetros celulares como el tamaño, la complejidad, la forma, así como cualquier componente celular o función que pueda ser marcada con un fluorocromo.³⁴⁻³⁸

Dentro sus aplicaciones en la hematología se encuentra el análisis de contenido de ADN, inmunofenotipificación de leucemias y linfomas, monitoreo inmunológico de individuos infectados con VIH y valoración de las propiedades funcionales y estructurales de los eritrocitos, leucocitos y plaquetas.^{34,35}

2.4.1.1. Principio del método de Citometría de Flujo

Al hacer pasar células por una corriente de fluido enfocada Hidro-dinámicamente alineadas de una en una por delante de un haz luminoso (láser), la luz se dispersa en varios ángulos, la luz dispersada hacia adelante en ángulos bajos ($0.5-10^\circ$) representa tamaño de la célula o partícula (Forward-Scatter "FSC") y la luz es reflejada en ángulo recto por la complejidad o granularidad celular (Side-Scater "SSC") como se observa en la figura 16.³⁷

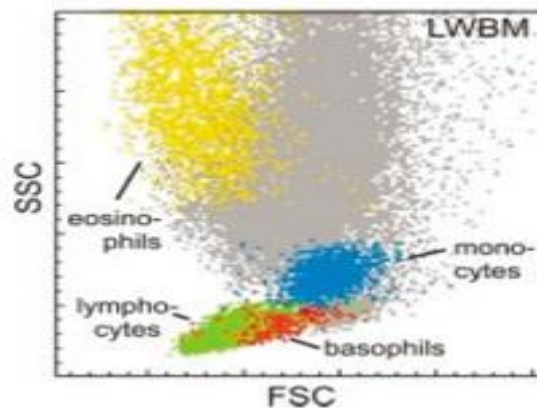


Figura 16. Dot Plot Tomado de: Van Lochen EG et al. Immunophenotypic Differentiation Patterns of Normal Hematopoiesis in Human Bone Marrow.²²

Las células pueden estar marcadas con anticuerpos conjugados a fluorocromos y la intensidad de fluorescencia es proporcional a la cantidad de antígeno presente sobre o dentro de la célula. Las señales luminosas detectadas son transformadas en impulsos eléctricos los cuales se amplifican y se convierten en señales digitales que se procesan por una computadora.^{34,38}

2.4.1.2. Componentes del Citómetro de Flujo.

Un citómetro de flujo está compuesto básicamente por el sistema de fluidos, un sistema óptico, un sistema electrónico y el sistema informático (figura 17).

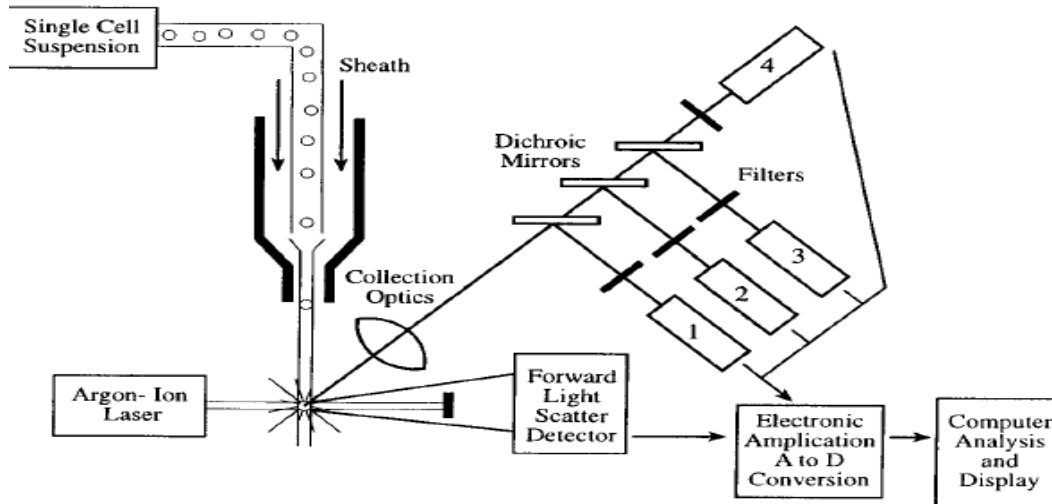


Figura 17. Componentes del citómetro de flujo³⁵

El sistema de fluidos es utilizado fundamentalmente para el transporte de partículas a partir de una muestra en suspensión, este sistema utiliza una regulación de la presión de aire para un funcionamiento estable y consta de una línea de corriente de fluido (vaina) y una muestra alineada que pasa a través de una celda de flujo. Cuando la muestra entra en la cámara de celda de flujo, el fluido de revestimiento exterior fluye más rápido enfocando hidrodinámicamente este fluido en una región estrecha delimitando la alineación de las células. Para facilitar la marcha y la limpieza (start-up) de los instrumentos el citómetro está proporcionado por una línea de vacío.^{37,38}

En el sistema óptico los diferentes tipos de láser son utilizados para iluminar las partículas o células encontradas en el flujo de la muestra, el sistema de espejos y filtros ópticos dirigen la señal de la luz resultante al detector apropiado. Este sistema permite separar la luz de diferente color, la cual contiene información específica de la célula analizada (complejidad, tamaño) además de las diferentes emisiones fluorescentes de los fluorocromos si se encuentran presentes en la célula.^{34, 38}

Los detectores principales utilizados en citometría de flujo son fotodiodos de silicio que dispersan la detección hacia adelante detectando las señales FSC y los tubos fotomultiplicadores está asignada la dispersión lateral SSC y detección de fluorescencia.³⁸

En el sistema electrónico, las señales que se generaron a partir de los detectores, son procesadas por amplificadores lineales o logarítmicos, permitiendo que estas señales puedan ser cuantificables. La amplificación logarítmica es la comúnmente utilizada para medir la fluorescencia en célula. El sistema informático permite la presentación de los datos, los citómetros de flujo utilizan software para control de instrumentos, adquisición y análisis de datos.³⁶⁻³⁸

2.4.1.3. Fluorocromos

Son moléculas que absorben luz, la cual que tiene una determinada longitud de onda y a su vez la emiten a una longitud de onda mayor. Presentan espectros de emisión y de excitación y por tanto van a depender del tipo de láser que utilice el citómetro y de la longitud de onda a la que se exciten (tabla 3). Las propiedades básicas que debe de tener un fluorocromo es que sea inerte, que presenten poco solapamiento espectral entre si, que las intensidades altas se asocien a su fluorescencia (brillante) y que sean fácilmente conjugados con anticuerpos monoclonales.³⁶⁻³⁸

Los fluorocromos unidos a anticuerpos se unen a estructuras químicas específicas sobre o en el interior celular, si estas estructuras son específicas para dicha célula entonces el fluorocromo identificará a la célula. A este tipo de identificación celular mediante anticuerpos monoclonales se denomina inmunofenotipo.^{37,38}

Tabla 3. Longitudes de onda de láser utilizados en Citometría de Flujo³⁸

Láser	UV	Violeta	Azul	Azul-verde	Verde	Amarillo	Rojo
Argon	334-364		458	488	514		
Violeta		405					
Cripton	351-356	407				568	647
Helio-neón							633
Rojo diodo							635

Existe una gran variedad de fluorocromos utilizados para inmunofenotipo que se muestran en la tabla 4. El uso de los múltiples fluorocromos, cada uno con excitación similar de longitudes de onda y diferentes longitudes de emisión, permite medir simultáneamente a varias células.³⁵

Tabla 4. Fluorocromos frecuentemente utilizados para inmunofenotipo^{37,38}

Fluorocromo	Pico de excitación	Pico de emisión (nm)	Longitud de onda (nm)
Pacific Blue	405	455	405, 407
Proteína clorofila peridina (Per-CP)	490	670	488
Ficoeritrina (PE)			
Isotiocianato de fluoresceína (FITC)	495	520	488
Alofocianina (APC)			
Proteína clorofila peridina-Cianina 5.5 (Per-CP Cy5.5)	565	695	488, 514
Ficoeritrina-Cianina 5.5 (PE-Cy5)	565	695	488, 514

2.5. Fenotipo de la LMA

El proceso hematopoyético es caracterizado por la expresión secuencial de marcadores de superficie que permiten el reconocimiento de las diferentes etapas de diferenciación de la célula y valoración del compromiso con los diferentes linajes. El conocimiento de expresión de diversos marcadores de linaje específico, maduro e inmaduro en el desarrollo hematopoyético normal permite tener un control de referencia para el reconocimiento de patrones de diferenciación anormal.²²

El inmunofenotipo en el diagnóstico de las diferentes neoplasias hematológicas requiere de una selección de combinaciones (paneles) únicas de los marcadores individuales así como de apropiados clones de anticuerpos conjugados con fluorocromos para identificar de manera clara el linaje celular, etapa de maduración y fenotipo aberrante, lo cual dependerá de la especificidad de los marcadores.³⁹

En la leucemia aguda, se utiliza la citometría de flujo multiparamétrica, siendo el método de elección para la determinación del linaje blástico, así como de perfiles antigénicos aberrantes que pueden resultar útiles para la vigilancia de la enfermedad (Tabla 5). Un criterio comúnmente utilizado en la mayoría de los marcadores es que más del 20% de las células leucémicas expresen el marcador.^{3, 36}

Tabla 5. Expresión de marcadores de superficie y citoplasmáticos para el diagnóstico de LMA y leucemia aguda con fenotipo mixto.³⁶

Expresión de marcadores para diagnóstico	
Diagnóstico de LMA	
Precursores	CD34, CD38, CD117, CD133, HLA-DR
Marcadores granulocíticos	CD13, CD15, CD16, CD33, CD65, Mieloperoxidasa citoplasmática (cMPO)
Marcadores monocíticos	Esterasa no específica, (NSE), CD11c, CD14, CD64, Lisosima, CD4, CD11b, CD36,
Marcadores megacariocíticos	CD41(gpIIb/IIIa, CS61(gpIIIa), CD42(gplb)
Marcadores eritroides	CD235a (glicoforina A)
Diagnostico de leucemia aguda con fenotipo mixto	
Linaje mieloide	MPO o evidencia de diferenciación monocítica, CD19, con al menos uno de los siguientes CD79a, cCD22, CD10, o CD19, con al menos 2 de los siguientes cCD3 o CD3 de superficie.
Linaje B	
Linaje T	

3. Planteamiento del problema

La prevalencia de la leucemia a nivel mundial es de 5 a 6 casos por cada 100,000 habitantes y es considerada como el principal cáncer de los órganos hematopoyéticos donde existen una serie de signos y síntomas característicos de la enfermedad y afecta a las personas en diferentes etapas de la vida. En México los datos son escasos, sin embargo existen evidencias de que el número de pacientes con esta enfermedad se ha incrementado de forma significativa, reportándose en 1998 más de 600 casos nuevos. En adultos jóvenes, la LPA representa del 10 al 15% de todos los casos de LMA^{1, 2, 14}

En varias neoplasias mieloides el CD123 se ha analizado mediante Citometría de flujo y asociándose con un elevado conteo de blastos al diagnóstico. Además de que lo han indicado en diversos estudios como un marcador pronóstico de las células hematopoyéticas leucémicas. Sin embargo, no hay reportes en México acerca de la expresión de CD123 en la población mexicana, por lo que es de suma importancia determinar su expresión en la LMA y la relación que pueda tener este marcador con el comportamiento clínico de la enfermedad. Y es por ello que se plantea la siguiente pregunta de investigación:

¿Qué relación tiene la expresión del CD123 con los diferentes tipos de leucemias mieloides agudas en la población mexicana?

4. Objetivos

General

- Determinar la expresión de CD123 por citometría de flujo en pacientes con leucemia mieloide aguda.

Particulares:

- Comparar la relación del receptor CD123 con los diferentes tipos de leucemias mieloides agudas.
- Correlacionar datos clínicos con la expresión del CD123.

5. Hipótesis

La expresión del receptor CD123 será alta en pacientes con leucemia mieloide aguda en la población mexicana.

6. Diseño experimental:

6.1. Tipo de estudio y universo de estudio

Se llevo a cabo un estudio retrospectivo y comparativo. El estudio se realizó en una población de 181 pacientes mayores de 16 años que ingresaron al Servicio de Hematología del Hospital de Especialidades, CMN, Siglo XXI, Hospital de concentración y tercer nivel del IMSS. De los cuales 16 correspondieron a un grupo control, el cual consistió de pacientes que ingresaron al servicio con una sospecha diagnóstica diferente a Leucemia Aguda. En el laboratorio se recibieron muestras de sangre periférica (n=10) y aspirado de médula ósea (n=171) del 2011 al 2013.

6.2. Criterios de inclusión y exclusión

Los criterios de Inclusión fueron muestras de médula ósea y sangre periférica de pacientes que ingresen al servicio de Hematología con sospecha diagnóstica de leucemia aguda. Los criterios de exclusión fueron las muestras de pacientes menores de 16 años y muestras con aumento de fibrina y los criterios de eliminación fueron muestras con insuficiente cantidad de blastos reportados además de muestras coaguladas.

6.3. Variables

Variable dependiente

Expresión del Marcador CD123

Variable independiente

Tipo de leucemia mieloide aguda

6.4. Material:

1. Tubos BD Falcon 12x75mm (5mL) y de 50mL
2. Puntas para pipeta automática
3. Pipetas automáticas Finnpiette. Thermo Labsystems 10, 50, 200 y 1000µL
4. Software FACS Diva BD

Reactivos:

1. Solución PBS (solución amortiguadora de fosfatos) Concentración 1:10.
2. Solución de Lisis BD. Concentración 1:10.
3. Solución Permeabilizante BD. Concentración 1:10.
4. Anticuerpos monoclonales acoplados a un Fluorocromo marca BD (BECTON DICKINSON) Biosciences.
 - Para ajuste del equipo: Controles de Isotipo IgG mouse FITC, PE, PerCP-Cy5.5
5. Anticuerpos monoclonales:
 - CD2, CD7, CD15. CD64, CD38, CD16, CD36, CD71, HLA-DR conjugados a FITC.

- CD19, CD5, CD11b, CD117, CD14, CD33, CD34, CD56, CD4, CD13, CD123, MPOc conjugados a PE
 - CD45 -PerCP-Cy5.5
6. Cytometer Setup Tracking beads (perlas de calibración)

Equipo:
Centrifuga SPINCHRON - 15R BECKMAN
Vortex-Genie 2. Scientific Industries
Citómetro de flujo BD FACSCanto II

6.5. Método

Las muestras recibidas en el laboratorio de sangre periférica y de aspirado de medula ósea de pacientes con sospecha diagnóstica de leucemia aguda y un grupo. Se empleó un panel con anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos ya establecido en el laboratorio, en el cual se incluyó el marcador CD123 (tabla 6).

La inmunotinción de antígenos de membrana se realizó empleando 10µl de anticuerpo conjugado con fluorocromo (FITC, PE, PerCP-Cy5.5, la cantidad utilizada es la recomendada tras las pruebas de titulación establecidas en el laboratorio.) y 100 µl de la muestra problema, se agitaron e incubaron a temperatura ambiente y oscuridad por 15 minutos. Posteriormente se lisaron los hematíes con 2mL de Lisis BD durante veinte minutos, se centrifugaron (2000rpm/5min) y se lavaron con 1mL de PBS, llevándose de nuevo a centrifugación. Ya decantadas, se resuspendieron con 300 µl de PBS.

Para el caso de los antígenos intracelulares se realizó el mismo procedimiento, hasta el lavado con el PBS, después del lavado se pipetearon 500 µL de solución permeabilizante e incubaron a temperatura ambiente y oscuridad durante 10 minutos, transcurrido el tiempo se lavaron con 1mL de solución PBS y se realizó nuevamente la centrifugación, después de decantado el sobrenadante se agregaron 10µL de anticuerpo para antígeno intracelular y se llevaron a oscuridad nuevamente durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo se resuspendió con 300 µl de PBS.

Tabla 6. Combinación de anticuerpos monoclonales empleado para diagnóstico de Leucemia Mieloide Aguda

FITC-Ab. conjugado	monoclonal	PE-Ab. conjugado	monoclonal	PerCP-Cy5.5-Ab. monoclonal conjugado
IgG1		IgG1		IgG1
CD2		CD19		CD45
CD7		CD5		CD45
CD15		CD11b		CD45
-		CD117		CD45
CD64		CD14		CD45
HLADR		CD33		CD45
CD38		CD34		CD45
CD16		CD56		CD45
CD36		CD4		CD45
CD71		CD13		CD45
-		CD123		CD45
-		MPOc (intracelular)		CD45

Además, se preparó por paciente un control celular, en el cual solo incluía 100 µL muestra del paciente, se lisaron los hematíes y los lavados con PBS antes mencionados

Realizada la Inmunotinción se llevó a cabo a la adquisición en el citómetro de flujo BD FACS Canto II, utilizando el Software FACS Diva BD. Aunque, para poder realizar la adquisición de las muestras en el primero se realizó el esquema de trabajo que se debe de seguir para el funcionamiento óptimo del citómetro. Iniciando con la verificación del sistema de fluidos (Start-up), la verificación del sistema óptico, empleando Perlas de calibración (CST). Las Cytometer Setup Tracking beads (perlas de calibración) son utilizadas para verificar el funcionamiento correcto del equipo, el flujo correcto del sistema hidrodinámico y del sistema óptico (alineación del láser).

Para la adquisición primero se adquirieron 30000 células control, posteriormente, los controles de isotipo IgG (mouse FITC, PE, PerCP-Cy5.5), los cuales sirvieron para establecer el voltaje de detección para cada uno de los detectores utilizados y así capturar las señales de fluorescencia emitidas por cada fluorocromo a utilizar y se procedió con la adquisición del resto de las muestras procesadas, como se observa en la figuras 18 y 19.

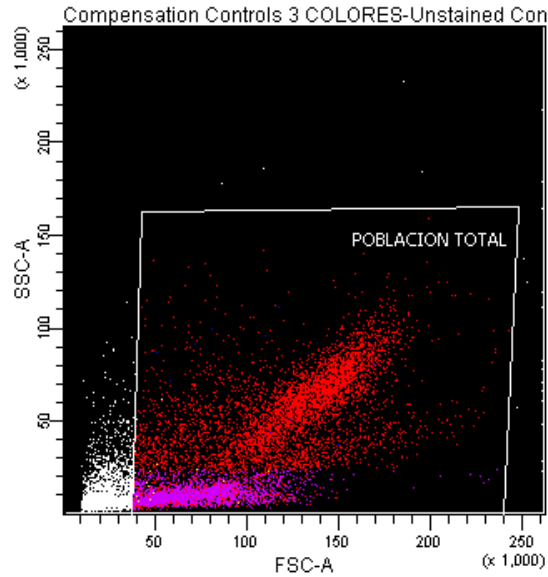


Figura 18. Dot plot que indica el control celular en el cual se observa la fluorescencia emitida de una población total seleccionada separada por tamaño vs complejidad

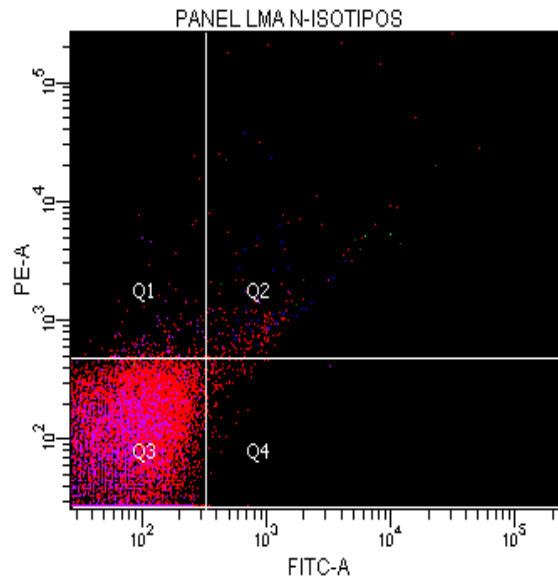


Figura19. Dot plot indicando el control de isotipos IgG, observándose la fluorescencia emitida por los fluorocromos FITC y PE

6.6. Análisis estadístico

Los resultados de expresión de CD123 obtenidos se analizaron mediante estadística descriptiva con medias, medianas, rangos, máximos y mínimos con pruebas de Post Hoc Tukey. además de comparación de medianas mediante análisis no paramétrico test de Kruskal-Wallis.

7. Resultados

Se analizaron muestras de sangre periférica y médula ósea de 165 pacientes con sospecha diagnóstica de Leucemia Aguda, además de 16 pacientes tomados como control. El estudio fue realizado en pacientes que ingresaron al Servicio de Hematología del Hospital de Especialidades, CMN, Siglo XXI del 2011 al 2013

De acuerdo a los parámetros de laboratorio y marcadores inmunofenotípicos que se analizaron fueron clasificados los 165 pacientes, de los cuales el 44% (73/165) correspondió a leucemia linfocítica aguda (LLA), mientras que el 56% (92/165) correspondió a leucemia mielocítica aguda (LMA).

Los pacientes con LMA se sub-clasificaron en cuatro grupos: a. LMA de novo (paciente con reciente enfermedad tipo de LMA), b. LMA promielocítica, c. LMA secundarias a SMD, d. LMA tratadas con algún medicamento. Del primer grupo se encontraron 9 casos (15%) de M1; 10 casos (16%) de M2; 7 casos (11%) de M4 y 8 casos (13%) de M5 (5 M5a y 3 M5b); en un promedio de edad entre los 41 y 51 años de edad.

En cuanto a las características de laboratorio más relevantes como se indica en la tabla 7, al analizar las plaquetas, la hemoglobina y el número de leucocitos, no se observó diferencia entre cada tipo de LMA.

El diagnóstico de una LMA se realizó por medio del inmunofenotipo para lo cual se emplearon diferentes marcadores, estos mismos se utilizaron en los casos control. Para valorar la expresión de CD123 se seleccionó la población de blastos o zona de progenitores (figuras 20 y 21), encontrándose que para el grupo control tanto la selección de progenitores como la expresión de CD123 fue menor al 3%, presentándose la caracterización $CD34^+/CD38^-/CD123^-$. En cambio para el caso de la LMA de Novo en la zona de progenitores, el CD123 presentó una mayor expresión (43%) y su caracterización de mieloblastos fue $CD34^+/CD38^-/CD123^{+d}$.

Complementándose a su vez con la tabla 8, la expresión de CD123 en los subtipos de LMA secundaria promielocítica y tratada, se observó un aumento en la expresión de CD123, además de que la caracterización de estos tipos de LMA también fue del tipo $CD123^{+d}$.

Tabla 7. Parámetros de laboratorio más relevantes obtenidos en pacientes con Leucemia Mieloide Aguda.

Tipo de LMA	Parámetro	Subgrupo	Número de pacientes	Porcentaje
Novo N=35	Leucocitos	<30 000/ μ L	22	51
		30 000-100 000/ μ L	14	33
		>100 000/ μ L	7	16
	Hemoglobina	<10 g/dL	35	83
		10-13 o 14dL	7	17
	Plaquetas	<50 000/ μ L	22	52
		50 000-100 000/ μ L	13	29
		101 000- 150 000/ μ L	8	19
	Secundaria N= 10	Leucocitos	<30 000/ μ L	3
30 000-100 000/ μ L			4	57
>100 000/ μ L			0	0
Hemoglobina		<10 g/dL	1	15
		10-13 o 14dL	6	85
Plaquetas		<50 000/ μ L	3	43
		50 000-100 000/ μ L	4	57
		101 000- 150 000/ μ L	0	0
Tratadas N= 20		Leucocitos	<30 000/ μ L	21
	30 000-100 000/ μ L		10	30
	>100 000/ μ L		2	6
	Hemoglobina	<10 g/dL	16	50
		10-13 o 14dL	16	50
	Plaquetas	<50 000/ μ L	18	55
		50 000-100 000/ μ L	9	27
		101 000- 150 000/ μ L	6	18

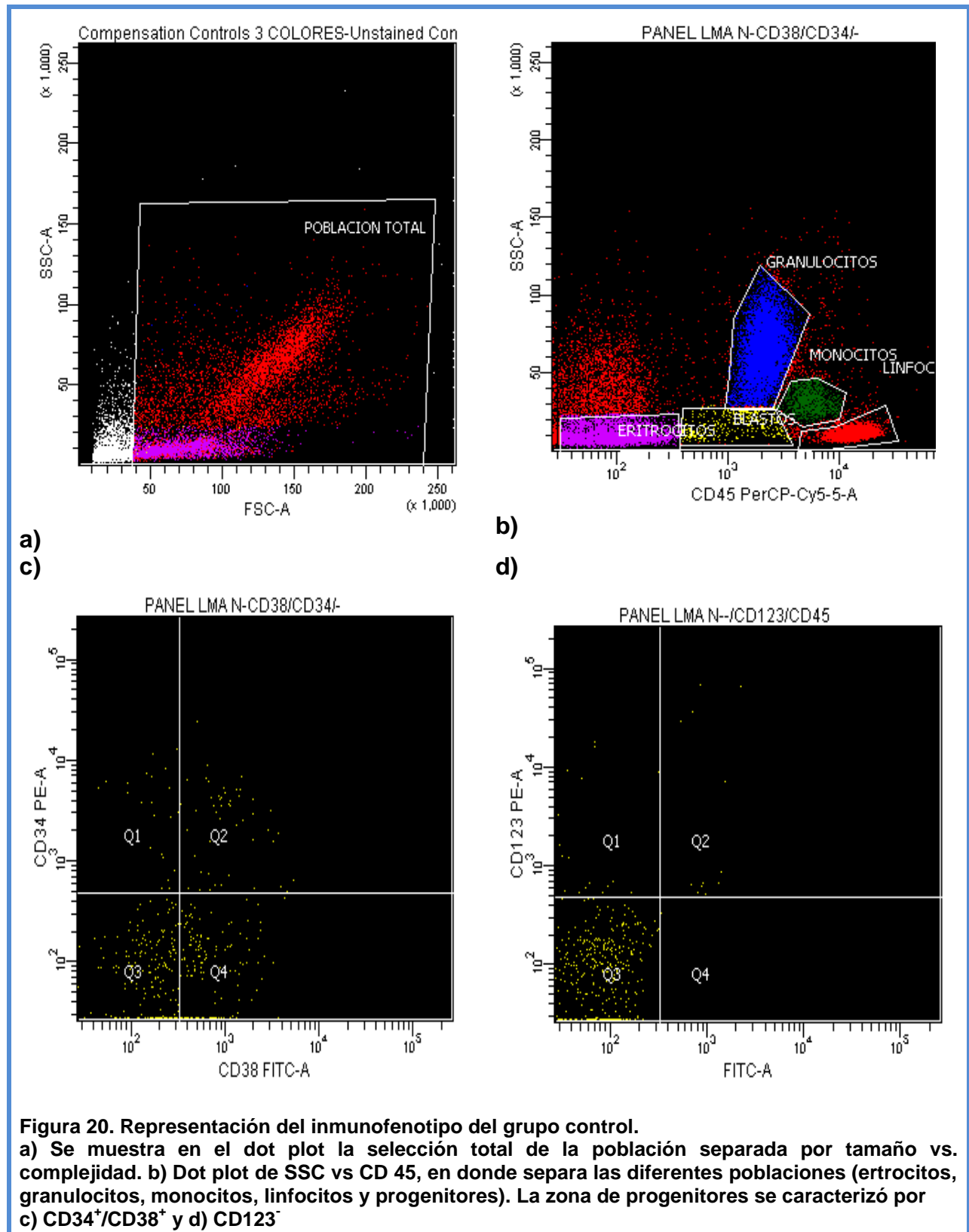
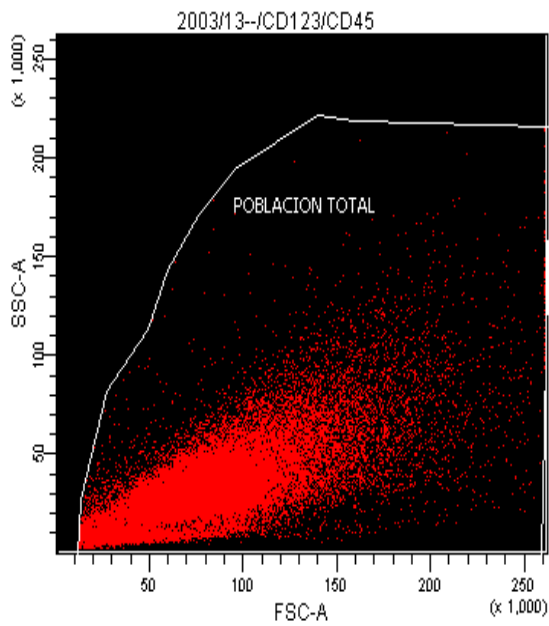
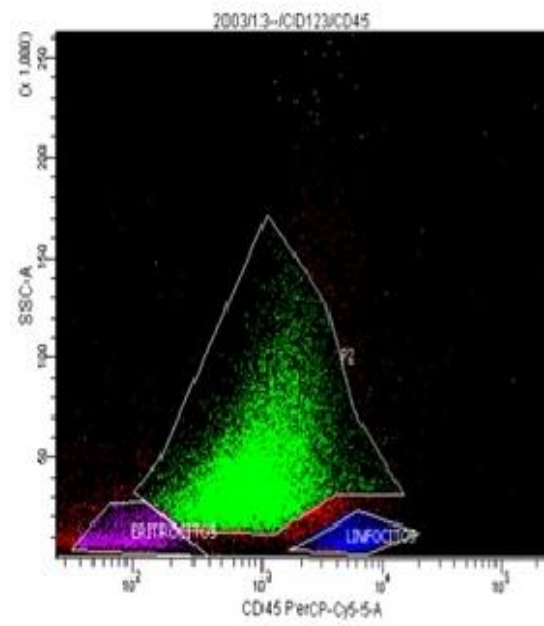


Figura 20. Representación del inmunofenotipo del grupo control.

a) Se muestra en el dot plot la selección total de la población separada por tamaño vs. complejidad. **b)** Dot plot de SSC vs CD 45, en donde separa las diferentes poblaciones (eritrocitos, granulocitos, monocitos, linfocitos y progenitores). La zona de progenitores se caracterizó por **c)** CD34⁺/CD38⁺ y **d)** CD123⁻

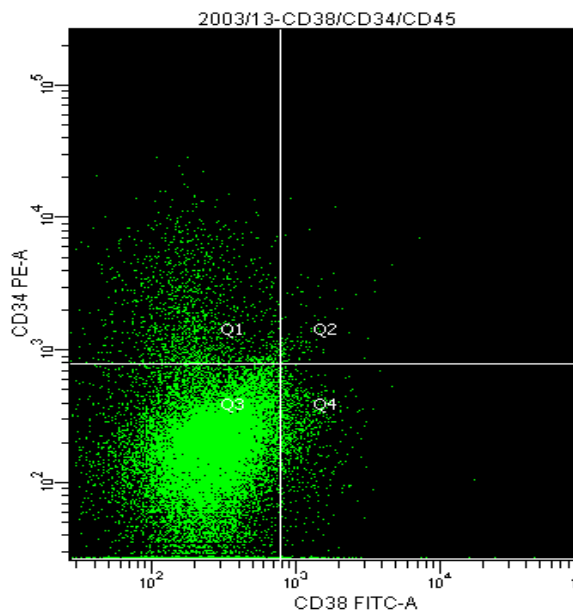


a)



b)

c)



d)

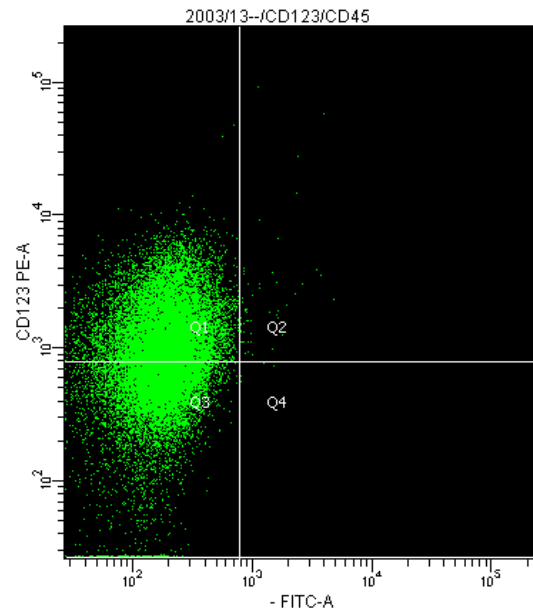


Figura 21. Representación del inmunofenotipo de un paciente con una LMA de novo.
a) se muestra en el dot plot la selección total de la población. b) Dot plot de SSC vs CD 45 el cual muestra tres poblaciones (eritrocitos, linfocitos y blastos). c) Mieloblastos CD34⁺/CD38⁻
d) Mieloblastos CD123⁺

Como se muestra en la tabla 8 y figuras 23-25, la expresión de CD123 en el grupo control el porcentaje medio fue del 3% y la presencia de progenitores nula del 0.5%. La expresión de CD123 de los tipos de LMA se encontró en el caso de la LMA de novo un incremento de expresión de CD123 (43%) que fue a su vez significativo ($p < 0.0001$) en relación a la presencia de blastos. Para la LMA secundaria la expresión de CD123 mostró también un incremento (41%) siendo significativa a la presencia de blastos ($p < 0,0001$). La LMA tratada y la LMA promielocítica también presentaron un aumento en la expresión de CD123 con un 22.5% y 25% respectivamente, relacionándose la primera significativamente con los blastos ($p < 0.0001$)

Para todos los tipos de LMA se observó que el porcentaje de expresión de CD38 fue mayor en comparación con el CD34. Entre la LMA de novo y secundaria ambos presentaron un porcentaje medio de blastos del 50%, el porcentaje de expresión de CD38 predominó en la LMA de novo (54%) sobre el grupo de LMA de novo (42%); del mismo modo, el CD34 en la LMA secundaria el porcentaje medio de expresión se encontró superior con el resto de las LMA estudiadas.

Tabla 8. Expresión de CD123 en los diferentes tipos de LMA encontradas y controles

		CD 123%	CD 34%	CD 38%	Blastos%
LMA novo (N=35)	Media ± DE	44.5 ± 27.1	38.2 ± 26.0	45.2 ± 28.1	50.2 ± 28.3
	Mediana	43	39.0	42.0	50.0
	Rango	3.0 – 94.0	0.1-89.0	0.0 – 96.0	4.0 - 99.0
LMA secundaria (N=10)	Media ± DE	39.0 ± 30.3	55.7 ± 26.6	55.4 ± 30.7	46.0 ± 34.0
	Mediana	41.0	53.0	54.0	50.0
	Rango	5.0 - 81.0	16.0 – 91.0	15.0 -95.0	0.0 - 95.0
LMA tratados (N=20)	Media ± DE	26.7 ± 24.1	24.8 ± 23.7	40.1 ± 27.0	36.5 ± 28.0
	Mediana	22.5	20.5	40.0	33.0
	Rango	2.0 – 91.0	0.10 – 88.0	0.0-86.0	0.0 - 95.0
LMA promielocítica (N=27)	Media ± DE	23.6 ± 21.5	1.9 ± 2.7	41.8 ± 26.9	30.0 ± 32.9
	Mediana	15.0	1.0	38.5	15.0
	Rango	2.0 – 79.0	0.0 – 11.0	3.0 – 86.0	0.0- 100.0
Control (N=16)	Media ± DE	2.8 ± 1.4	2.0 ± 2.1	10.6 ± 6.4	0.5± 1.0
	Mediana	3.0	1.5	8.5	0.0
	Rango	1.0 - 3.0	0.1 – 9.0	3.0 – 26.0	0.0 – 3.0

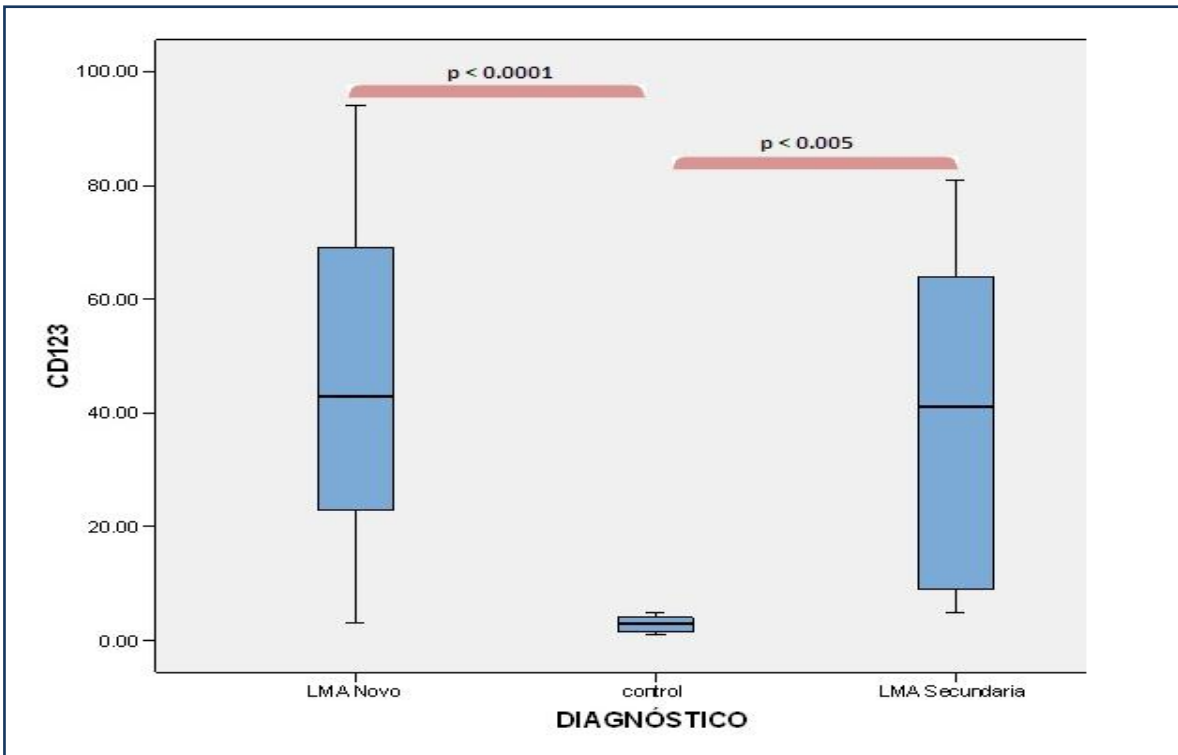


Figura 22. Expresión media de CD123 en LMA de novo y LMA Secundaria contra control.
Prueba ANOVA-Turkey

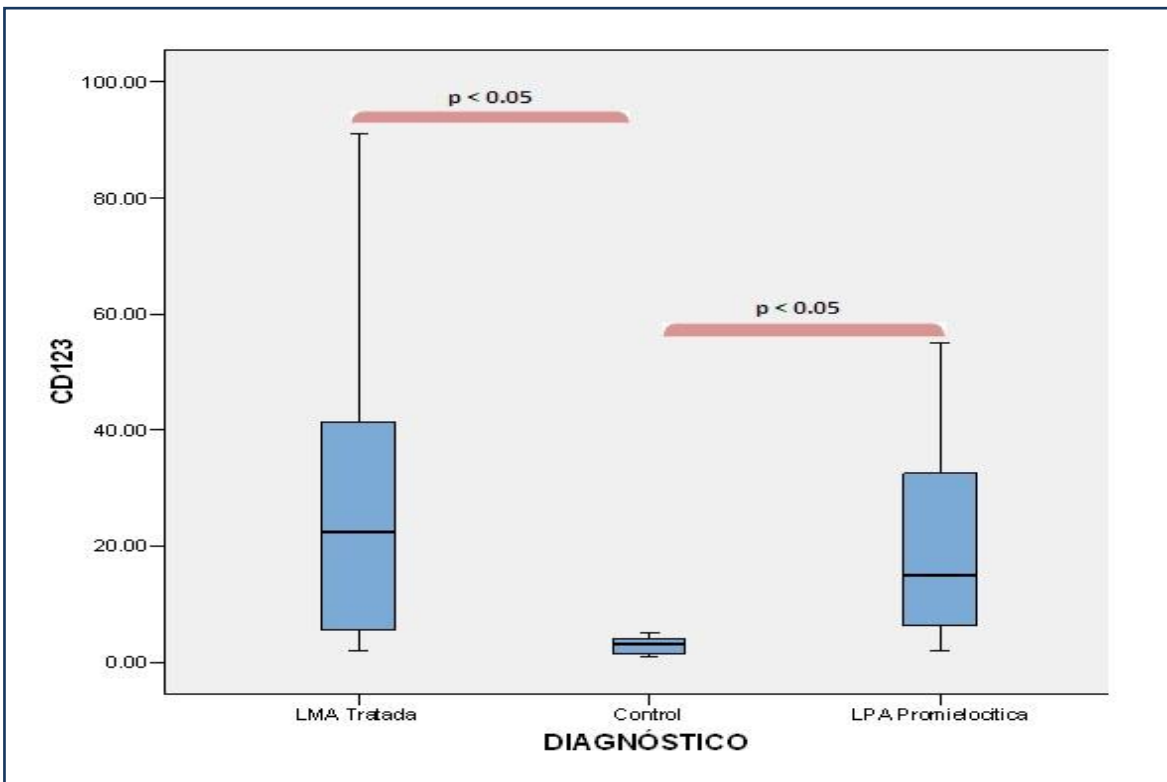


Figura 23. Expresión media de CD123 en LMA tratada y LPA promielocítica contra control.
Prueba ANOVA-Tukey..

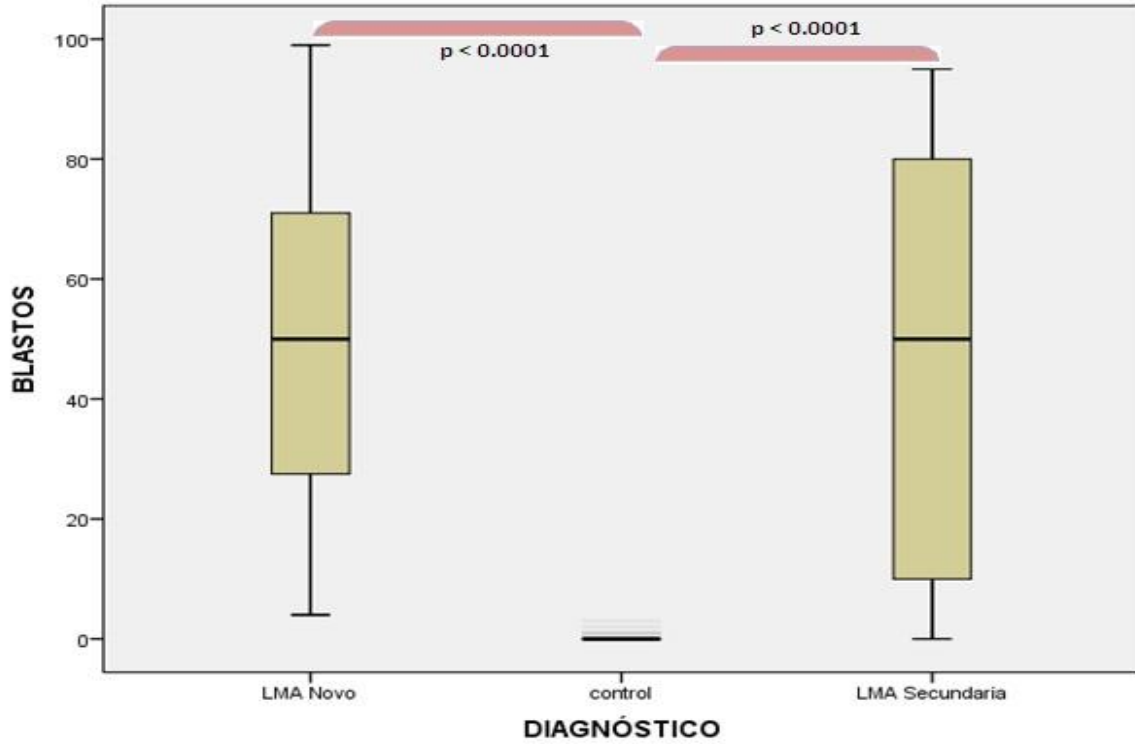


Figura 24. Porcentaje de blastos en LMA de novo y LMA secundaria contra control.
Prueba ANOVA-Tukey

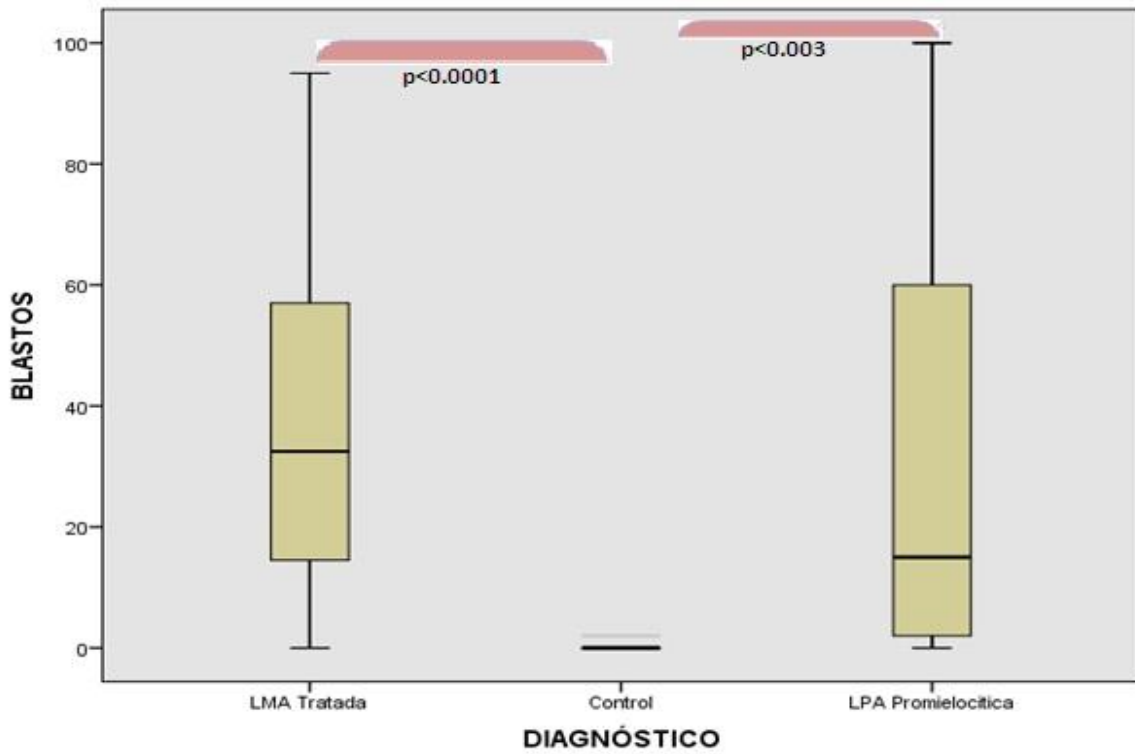


Figura 25. Porcentaje de blastos en LMA tratada y LMA promielocítica contra control.
Prueba ANOVA-Tukey

8. Discusión.

La leucemia aguda es una causa importante del ingreso en el departamento de hematología y que conlleva a una alta morbilidad y mortalidad. Diversos informes en Europa y Estados Unidos mencionan que la LMA es la leucemia aguda que más frecuentemente se presenta después de los 60 años. La sociedad americana de cáncer informó en el 2009, 12 810 nuevos casos de LMA. En nuestro caso, encontramos que en la incidencia de leucemias agudas, la LMA predominó en un 56% sobre la LLA de 44%, siendo la LPA-LMA-M3 el subtipo más común que afecta a la población joven (41-51 años) ^{1,2}.

Dentro de los parámetros del laboratorio relevantes se encontraron la disminución en el valor de los leucocitos ($<30,000/\mu\text{L}$), hemoglobina ($<10\text{g/dL}$) y plaquetas ($<50,00/\mu\text{L}$) para los casos de LMA tratada y de novo, mientras que en el caso de la LMA secundaria el valor de los leucocitos fue de $30,000\text{-}100,000/\mu\text{L}$.

En un estudio realizado por Jordan y col (2002), la identificación de CD123 entre células madre leucémicas CD34⁺/CD38⁻ facilita su distinción de células hematopoyéticas normales. La expresión del CD123 en muestras de LMA examinadas sugieren que está relacionada con la biología de la LMA, debido a que solo alrededor del 1% de la población progenitora normal expresa niveles elevados de CD123, mientras que en células leucémicas muestran altos niveles de CD123 más del 99%. La caracterización que encontramos en nuestro trabajo de la expresión de CD123 con respecto a las células madre leucémicas y las hematopoyéticas normales fueron de CD34⁺/CD38⁻ y CD123⁺^d, CD34⁺/CD38⁻ y CD123⁻ respectivamente, teniendo una expresión en el grupo control de 3% y en el subtipo de LMA de novo de 43%. ^{33, 44}.

Testa y col (2004) encontraron que entre 79 pacientes con LMA se expresó en más del 60% de blastos el CD123, y que al tener en cuenta que el receptor de IL3 estimula la proliferación de de los progenitores normales y leucémicos, estos últimos fueron los que expresaron los niveles altos de IL3R α ; encontraron una correlación entre los niveles de CD123 y el número de blastos leucémicos al diagnóstico de pacientes con LMA ($p<0.001$). En nuestro estudio, la LMA de novo al ser una leucemia de nuevo diagnóstico, se encontró una expresión de CD123 en más del 50% de blastos, a su vez, contó con una aceptable correlación entre el número de blastos y la expresión de CD123 ($p<0.0001$).

Asimismo, Testa y col (2004), mostraron que existe una posible asociación entre los niveles de expresión de CD123 y su asociación a la respuesta al tratamiento; por este motivo, en nuestro estudio se logró observar una relación entre la LMA de novo y la LMA tratada encontrándose un 44.5% y 26.7% de expresión de CD123 respectivamente. Esta mayor expresión puede estar asociada al tratamiento, debido a que la LMA de novo no presentó un tratamiento previo a la determinación de la expresión de CD123.

En cuanto a la LMA secundaria al ser una enfermedad que puede desencadenarse a partir de un síndrome mielodisplásico, Yue y col. (2010) estudiaron en pacientes con síndrome mielodisplásico la relación de la elevada expresión de CD123 en células blasticas de pacientes con síndrome mielodisplásico encontrando un 48% de expresión de CD123 con respecto a su grupo control 8.5%. En nuestros resultados encontramos que la expresión de CD123 para los casos de LMA de secundaria fue elevada 39.0%, y para el grupo control, sólo presentó 2.8% de expresión.

9. Conclusiones:

De la población mexicana estudiada que ingresaron al Servicio de Hematología del Hospital de Especialidades, CMN, Siglo XXI, la mayor prevalencia de Leucemias Agudas encontrada fue la de tipo mieloide.

El inmunofenotipo a partir de la citometría de flujo resultó ser un estudio idóneo para evaluar de manera significativa la expresión del CD123 y de otros marcadores presentes en las células leucémicas de la LMA

En este estudio se ha demostrado que el CD123 está expresado en las células troncales hematopoyéticas leucémicas de pacientes con Leucemia Mieloide Aguda, mostrándose de manera significativa un incremento de expresión en los blastos leucémicos de la LMA de novo y secundaria

Al presentarse una expresión elevada de CD123 en los diferentes tipos de LMA estudiados con respecto al grupo control, pudiera considerársele como un marcador pronóstico para detectar la enfermedad.

10. Perspectivas

Realizar una Inmunotinción con la combinación de CD34/CD38/CD123 para poder establecer diferentes poblaciones con expresión de CD123. También es pertinente dar un seguimiento al tratamiento empleado en los pacientes con leucemia mieloide aguda de novo acerca de la expresión de CD123 para poder correlacionar con la sobrevida y pronóstico de los pacientes.

11. Anexos.

11.1. Preparación de soluciones:

✓ Solución PBS (solución amortiguadora de fosfatos)
Diluir el contenido del sobre en 1L de agua destilada

✓ Solución de Lisis BD (concentración 1:10)
Diluir 100ml de la concentración 10X del frasco en 900ml de agua desionizada

✓ Solución Permeabilizante BD (concentración 1:10)
Diluir 100ml de la concentración 10X del frasco en 900ml de agua desionizada.

11.2 Solicitud de envío.

Nombre del paciente: _____ Número de Afiliación: _____
Edad: _____ Probable diagnóstico: _____
Antecedentes clínicos: _____
Tratamiento: _____
Leucocitos: _____ Blastos: _____
Plaquetas: _____ DHL: _____
Autorización del Médico: _____

11.3. Formato de resultados de Inmunofenotipo:

Nombre del paciente: _____ Número de afiliación: _____
Edad: _____
Tipo de muestra: _____
Panel: _____
Probable Diagnóstico: _____
Médico: _____

CD2	%	CD4	%	CD5	%	CD7	%	CD11b	%	CD13	%
CD14	%	CD15	%	CD16	%	CD19	%	CD34	%	CD38	%
CD56	%	CD64	%	CD71	%	CD117	%	CD123	%	HLADR	%
MPO	%										

OBSERVACIONES:

DIAGNÓSTICO:

12. Referencias

1. Tirado L, Mohar A, Epidemiología de las neoplasias hemato-oncológicas. *Cancerología*. 2007; 2: 109-120.
2. Guía Práctica Clínica de Diagnóstico y tratamiento de la Leucemia Mieloide Aguda. México; Instituto Mexicano del Seguro Social, 2010.
3. Dönner H, Estey E, Amadori S, Appelbaum F, Büchner T, Burnett A, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2010; 115 (3): 453-474.
4. Hwang K, Park C, Jang S, Chi H, Kim D, Lee J, et al, Flow cytometric quantification and immunophenotyping of leukemic stem cells in acute myeloid leukemia. *Annals of hematology*. 2012; 91:1541-1546.
5. Vergez F, Green A, Tamburini J, Sarry J, Gaillard B, Cornillet P, et. al, High levels of CD34+CD38low/-CD123 blasts are predictive of an adverse outcome in acute myeloid leukemia: a Groupe Ouest-Est des Leucémies Aigües et Maladies du Sang (GOELAMS) study. *Haematologica*. 2011; 96(12): 1792-1798.
6. Jin L, Lee E., Ramshaw H., Busfield S., Peoppl A., Wilkinson L, et al. Monoclonal antibody-mediated targeting of CD123 IL-3 receptor alpha chain, eliminates human acute myeloid leukemic stem cells. *Cell Stem Cell* 2009; 5: 31-42.
7. Testa U, Riccioni R, Diverio D, Rossini A, Lo Coco F, Peschle C, Interleukin-3 receptor in acute leukemia. *Leukemia*. 2004; 18: 219-226.
8. Khorshed K, Elsharkawy N, Elrefaey F, Mansour O, Elgamal B, Interleukin-3 receptor alpha chain as a unique marker for leukemic stem cells in acute myeloid leukemia, *Life Science Journal* 2011; 8(4), 68-74.
9. Testa U. et al, Elevated expresión of IL-3 alpha in acute myelogenous leukemia is asociated with enhanced blast proliferation, increased cellularity, and poor prognostic. *Blood* 2002; 100: 2980-2988.
10. Ortíz C, Notas sobre la historia de la leucemia. *Patología Rev Latinoam*. 2013; 51 (1):58-69.
11. Marshall A. Lichtman, Williams Hematology, 8va edición. McGraw-Hill Publishing. 2010.
12. Rodak FB. Hematología: fundamentos y aplicaciones clínicas, 2da ed. Argentina. Médica panamericana; 2005.
13. Merino A. Clasificación de las leucemias agudas mieloides. *Revista del Laboratorio Clínico*. 2010; 3(3): 139-147.
14. Montesinos J, et al. Nuevos conceptos en la biología de la leucemia mieloide aguda. *Gaceta Médica Mexicana*, 2002; 138 (1): 67-77.
15. Bennet J, Catovsky D, Daniel M, Flandrin G, Galton D, Gralnick R, Sultan C, Proposals for the Classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) Cooperative Group. *British Journal of Haematology*. 1976; 33:451-458.

16. Tkachuk D, Hirschmann J, Wintrobe's Atlas of clinical hematology. Lippincott Williams & Wilkins, 2007.
17. Vardiman J, Thiele J, Arber D, Brunning R, Borowitz, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*, 2009; 114: 937-951
18. Krause D, Scadden D, Preffer F, The hematopoietic stem cell niche- Home for Friend and Foe? *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*. 2013; 84B: 7-20.
19. Mayani H, Flores E, Pelayo R, Montesinos J, Flores P, Chávez A, Hematopoiesis; *Cancerología* 2007; 2: 95-107.
20. Passequé E, Jamieson C., Ailles L.; Weissman I. Normal and leukemic hematopoiesis: Are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *PNAS*, 2003; 100 (1): 11842-11849
21. Horton S, Huntly B. Recent advances in acute myeloid leukemia stem cell biology. *Haematologica* 2012; 97 (7) 966-974.
22. van Lochem E, van der Velden V, Wind H, te Marvelde J, Westerdaal N, Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: Reference Patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*. 2004; 60B:1-13.
23. Hoffman R, Benz E, Shattil S, Furie B, Cohen H, Silberstein L, *Hematology: Basic principles and practice*. 4ta edición, Elsevier. 2007.
24. Sierrasesúmaga, L. *Tratado de oncología Pediátrica*, Madrid, Pearson Educación, 2006.
25. Brunton L, Parker K., Goodman & Gilman: *Las bases farmacológicas de la terapéutica*, 12va ed. México, McGraw-Hill Interamericana 2012.
26. Debets R, Savelkoul H, *Cytokines as cellular communicators, Mediators of Inflammation*, 1996; 5: 417-423.
27. Baker S, Rane S, Reddy E, Hematopoietic cytokine receptor signaling, *Oncogene*. 2007; 26: 6724-6737.
28. Reddy E, Korapati A., Chaturyedi P. Rane S., IL-3 signaling and the role of Src kinases, JAKs and STATs: a convert liaison unveiled. *Oncogene* 2000; 19: 2532-2547.
29. Lopez A, Hercus T, Erker P, Littler D, Guthridge M, Thomas D, et al.. Molecular basis of cytokine Receptor Activation, *IUBMB Life* 2010; 62 (7): 509-518.
30. Broughton S, Dhagat U, Hercus T, Nero T, Grimbaldston M, Bonder C, et al. The GM-CSF/IL-3/IL-5 cytokine receptor family: from ligand recognition to initiation of signaling. *Immunological Reviews*, 2012; 250: 277-302.
31. Dey R, Ji K, Liu, Z, Chen L, A cytokine-cytokine interaction in the assembly of higher-order structure and activation of the interleukine-3:receptor complex. *PloS ONE*, 2009; 4 (4), e5188, 1-12
32. Yue L, Fu R. et al. Expression of CD123 and 114 on the bone marrow cells of patients with myelodysplastic syndrome. *Chin Med J* 2010; 123 (15) 2034-2037.

33. Jordan C., Upchurch D, et al. The interleukin-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells, *Leukemia* 2000; 14: 1777-1784.
34. Barrera L, et al. Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica; *Revista Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 2004 17(2): 42-55.
35. Brown M., Wittwer C. Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology *Clinical Chemistry* 2000; 46: (8B) 1221–1229.
36. Peters J, Ansari Q, Multiparameter Flow Cytometry in the diagnosis and management of Acute Leukemia, *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 2011; 135, 44-54.
37. Gheewala N, Sonara G, Ghetwala T, Parmar R, Viradiua G, et al, Flow cytometry: A cytometric technique for living cells. *Journal of Pharmacy Research*, 2010; 3(1): 114-119.
38. Shaphiro H, *Practical flow cytometry*, Wiley-Liss, 4ta edición New York, 2009
39. van Dongen J, Lhermitte L, Böttcher S, Almeida J, van des Velden V, Flores-Montero J, et al, EuroFlow antibodypanels for standardizen n-dimensional flow cytometric inmunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes, *Leukemia* 2012; 26, 1908-1975.
40. Belurkar et al, Correlation of morphologic and cytochemical diagnosis with flow cytometryc analysis in acute leukemia. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 2013; 9 (1).71-79.
41. Lee R. Lock R. Targeting of AML-leukemic stem cells with monoclonal antibodies. *Future Medicine Oncol.* 2009; 5 (9), 1327-1330
42. Lane S. Guilliland D. Leukemia stem cells. *Seminars in Cancer Biology*, 2010; 20 71-76.
43. Gudgin E., Huntly B. Acute myeloid leukemia biology and leukemia stem cells. *Hematology Education: the education program for the annual congress of the European Hematology Association*; 2009; 3; 17-37.
44. Jordan C.T., Unique molecular and cellular features of acute myelogenous leukemia stem cells. *Leukemia*, 2002; 16 559-562.