

2j.13



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"ZARAGOZA"**

**CLASIFICACION INMUNOLOGICA DE
LEUCEMIAS POR MEDIO DE
ANTICUERPOS MONOCLONALES**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A:

GABRIELA ELVIRA GARCIDUEÑAS PEREZ

MEXICO, D. F.

1987.



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E .

	Pag.
CAPITULO UNO: INTRODUCCION.....	1
Introducción.....	2
Hipótesis.....	3
Objetivos.....	4
Planteamiento del Problema.....	5
CAPITULO DOS: ANTECEDENTES CIENTIFICOS.....	6
Antecedentes Científicos.....	7
Clasificación Citoquímica de Leucemias Agudas.....	9
Anticuerpos Monoclonales.....	10
Técnicas de Obtención de Anticuerpos Monoclonales.....	10
Clasificación Inmunológica de Leucemias Agudas por Anticuerpos Monoclonales.....	11
CAPITULO TRES: MATERIAL Y METODOS.....	12
Material y Equipo.....	13
Métodos:	
Separación de Linfocitos.....	15
Identificación de la Estirpe Linfocitaria por medio de los Anticuerpos Monoclonales.....	16
Tinción del Acido Peryódico de Schiff (PAS).....	18
Tinción de Peroxidasa.....	19
Tinción de Sudan Negro B.....	20
Tinción de Fosfatasa Acida.....	21
CAPITULO CUATRO: RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS.....	22
Resultados.....	23

Tablas y Gráficas.....	24
Análisis de Resultados.....	39
CAPITULO CINCO: CONCLUSIONES.....	40
Conclusiones.....	41
APENDICES.....	42
Apendice A: PREPARACION DE REACTIVOS.....	43
a) SEPARACION DE LINFOCITOS	
1.- Preparación del Amortiguador de Fosfatos (PBS); pH 7.2 - 7.4	43
b) IDENTIFICACION DE LA ESTIRPE LINFOCITARIA POR MEDIO DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES.	
1.- Preparación del Amortiguador de Fosfatos - con el Suero Fetal de Ternera al 5% (PBS= SFT al 5%).....	43
c) TINCION DEL ACIDO PERYODICO DE SCHIFF (PAS)	
1.- Reactivo de Schiff.....	43
2.- Solución de Metabisulfito de Sodio.....	44
3.- Solución de Acido Peryódico al 0.5%.....	44
d) TINCION DE PEROXIDASA	
1.- Solución Fijadora.....	44
2.- Mezcla de Tinción.....	44
e) TINCION DE SUDAN NEGRO B.	
1.- Amortiguador de Sudan Negro B.....	45
2.- Solución Stock de Sudan Negro B.....	45
3.- Solución de Trabajo.....	45
4.- Solución de Giemsa.....	45
f) TINCION DE FOSFATASA ACIDA	
1.- Amortiguador de Fijación Formalina-Acetona	

pH 6.6 - 6.8.....	46
2.- Solución de Nitrito de Sodio al 4%.....	46
3.- Solución de Para-rosaanilinas.....	46
4.- Acido acético al 1%.....	46
5.- Amortiguador de Acetato 0.1 N pH 5.0.....	46
6.- Solución "A".....	47
7.- Solución "B".....	47
8.- Mezcla de Incubación I.....	47
9.- Verde de Metilo.....	47
Apendice "B: VALORES DE REFERENCIA DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES EN LA POBLACION INFANTIL // MEXICANA.....	48
Apendice C: SIGNIFICADO DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONA- LES.....	49
BIBLIOGRAFIA:.....	50
Bibliografía.....	51

C A P I T U L O

U N O
=====

INTRODUCCION.-

Las leucemias son una causa importante de mortalidad en edad pediátrica. En nuestro medio se encuentran entre las cinco causas de muerte, en niños de 5 a 14 años. En los países desarrollados son la segunda causa de mortalidad, tan sólo excedida por los accidentes.

Se define la leucemia aguda como una enfermedad maligna de los órganos hemopoyéticos que se caracteriza por la proliferación anormal de leucocitos inmaduros que producen infiltración generalizada de la médula ósea, sustituyendo a la hemopoyesis normal de la misma, e infiltrando el resto de los órganos linfopoyéticos y, prácticamente toda la economía.

Antes del desarrollo de la quimioterapia moderna, las leucemias agudas en cualquiera de sus formas, eran enfermedades de evolución rápidamente fatal. Actualmente todas son tratables y casi la mitad con posibilidades de curación o remisión prolongada. En el caso de la Leucemia Linfoblástica Aguda, 65 a 70% de los niños permanecerán en remisión completa continua cinco años después de establecido el diagnóstico.

La incidencia real en nuestro país se desconoce ya que no contamos con cifras estadísticas apropiadas; sin embargo en la sección de Hematopediatria del Hospital General Centro Médico "La Raza", las leucemias constituyen aproximadamente el 40% de todas las neoplasias que se atienden en el mismo. Correspondiendo a un 75% de los casos tipo Linfoblástico Agudo.

Es por ésto que el objetivo del presente trabajo se basará en la caracterización inmunológica de las Leucemias Linfoblásticas Agudas (LLA), por medio de Anticuerpos Monoclonales.

HIPOTESIS.-

La clasificación inmunológica de las Leucemias Linfoides Agudas mediante Anticuerpos Monoclonales, permite reconocer rápidamente la estirpe afectada mediante los antígenos linfocitarios presentes en la célula.

OBJETIVOS.-

1.- Clasificar morfológicamente las Leucemias Linfoides Agudas.

2.- Clasificar citoquímicamente a las Leucemias Linfoblásticas, por medio de las diferentes tinciones especiales, encontrándose entre las de mayor importancia de las siguientes: Peroxidasa, Tinción del Acido Peryódico de Schiff (PAS), Sudan Negro B, y Fosfatasa ácida entre otras.

3.- Clasificar inmunológicamente a las Leucemias Linfoblásticas, utilizando para ello los diferentes anticuerpos monoclonales, como lo son: BMA 010 BMA 020, BMA 030, BMA 040, BMA 050, BMA 090, BMA 0120, entre otros, los cuales sirven para reconocer a los linfocitos T y B, tanto maduros como inmaduros, así como a la célula linfocitaria común.

4.- Proporcionar al médico el pronóstico de la enfermedad ya que con ello se aplicará el tratamiento adecuado para provocar remisión parcial o total.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.-

En nuestra comunidad, las leucemias constituyen una causa frecuente de muerte, aunque no se encuentran dentro de las primeras, esta sobre todo en la población infantil. Una de las medidas para acortar esa frecuencia es su detección a tiempo, ya que si son tratadas tempranamente, es posible lograr una remisión parcial o total. El tratamiento de las leucemias depende de la estirpe afectada, ya que al ser clasificadas se da el pronóstico de la enfermedad, y con esto se aplica el tratamiento.

La clasificación de las leucemias se ha realizado mediante morfología celular y técnicas citoquímicas enzimáticas y no enzimáticas. Sin embargo, aunque las técnicas citoquímicas sean de gran utilidad no siempre permiten hacer una clasificación correcta.

Cuando las células del sistema inmune humano son producidas y liberadas anómalamente, son las causantes de enfermedades linfoproliferativas como las leucemias. Estas células se pueden clasificar en subpoblaciones, pudiéndose identificar mediante antígenos de superficie. Utilizando heteroanticuerpos producidos en conejos frente a linfocitos normales o malignos (anticuerpos monoclonales), es posible clasificar a las leucemias en cuatro grupos.

Mediante el uso de estos anticuerpos monoclonales es posible dar un diagnóstico más certero y rápido, y así aplicar el tratamiento correcto lo antes posible, ya que la vida del paciente depende de la prontitud con que se de el diagnóstico.

C A P I T U L O

D O S

ANTECEDENTES CIENTIFICOS.-

Las Leucemias Agudas se caracterizan por una maduración inadecuada de -- las células linfocitarias o granulocíticas en etapa primitiva de blastos, pudiendo ser bloqueada parcial o totalmente dicha maduración. Las células leucémicas ---- inmaduras se acumulan en la médula ósea, sangre periférica y en ocasiones en otros tejidos, ya que estas células no son depuradas normalmente (2). Esto es como ---- resultado de una pérdida de la función hemopoética de la médula ósea, teniendo -- como consecuencia desarrollo de anemia, trombocitopenia y granulocitopenia (3).

La clasificación de las leucemias agudas por medio del diagnóstico ---- morfológico las ha separado en dos grandes grupos: Leucemias Linfoblásticas ---- Agudas (LLA), y Leucemias no Linfoblásticas Agudas ó Leucemias Mieloblásticas ---- Agudas (LMA), (4). Virchow probablemente fué el primero en clasificar a las ---- leucemias, esta clasificación permaneció de 1800 a 1900. Para 1930 ya se conocían las formas morfológicas de la Leucemia Aguda, descrita por varias clasificaciones. Para 1948 Farber y colaboradores indicaron la importancia de una clasificación --- clínica, ya que eran los inicios de la quimioterapia, con lo cual llegaron a inducir remisiones sobre todo en niños con leucemias de tipo linfóide ó indiferenciada que en aquellos con leucemia de origen granulocítico ó monocítico. Para 1950; fue introducida la mercaptopurina como droga efectiva para el tratamiento de esta ---- enfermedad, enfatizando así la importancia del diagnóstico citológico.

Para 1958 "The Medical Research Council's Working P" en la Gran Bretaña planteo su primera terapéutica, consistiendo en mercaptopurina y prednisona, que - se aplicaron a 100 pacientes dando como resultado una mejor respuesta a está, en - jóvenes con leucemia de tipo linfóide, teniendo mejor pronóstico. Desde este tiempo se distinguía la leucemia linfoblástica y no la no linfoblástica ó mieloblástica

Algunos años más tarde el grupo cooperativo Francés - Americano - Británico (FAB), clasificarán a las leucemias agudas en: Linfoblásticas y Mieloblásticas. Dentro de las linfoblásticas encontramos tres grupos: L1, L2, y L3, definidas por la frecuencia individual de los aspectos morfológicos (5). En lo que respecta a - las de tipo mielóide, la diferenciación es: M1, mielóide sin maduración; M2, ---- mielóide con maduración; M3, promielocítica hipergranular; M4, mielomonocítica; M5, monocítica; M6, eritroleucemia. Definidas de acuerdo con: a) Dirección de diferenciación a lo largo de una o varias líneas celulares y b) Grado de maduración de la célula. Aún se encuentra en discusión la clasificación de la M7, ó leucemia megacarioblástica, puesto que no ha sido esclarecida totalmente (6).

Para 1980 la FAB estudio cientos de aspirados de Médula ósea leucémica, -- obteniendo como conclusión que la presencia de leucemias linfoides es; L1 = 85.1%, - L2 = 14.0% y la L3 = 0.9%, encontrándose que la de peor pronóstico es la tipo L3 (7)

También propuso que para diferenciar mejor entre la L1 y la L2 se consideraran las siguientes características: a) Relación núcleo - citoplasma, b) Presencia de nucleolos, c) Regularidad en el contorno de la membrana nuclear y d) tamaño de la célula. Con esto se incremento la concordancia de criterios de un 63 a un 83%, encontrándose además que el 74% de los casos de L1 eran niños, mientras que el 66% - de los casos de L2 eran adultos, no observándose diferencias significativas para la incidencia de los casos de L3, además de que todos los casos de L3 tenían características de células B. Dando un mejor pronóstico para la L1, que para la L2, y a su vez que para la L3 (8).

Alrededor de 1970, Mathé y colaboradores subclasificaron a las leucemias linfoblásticas en: 1) Prolinfoblástica; los blastos están más indiferenciados - que los linfoblastos típicos (nucleolos más prominentes, más cromatina reticular, más citoplasma basófilo, menor relación núcleo - citoplasma), 2) Macrolinfoblástica, los linfoblastos miden 12 micras de diámetro o más, 3) Microlinfoblástica los linfoblastos miden 12 micras de diámetro o menos, 4) Prolinfocítica, las células leucémicas, están menos indiferenciadas que las linfoblásticas (núcleolo menos visible, menos cromatina reticular, menor relación núcleo - citoplasma). Esta subclasificación presenta ambigüedades en su determinación, por lo que actualmente no es aplicable.

Las células leucémicas animales y humanas poseen antígenos de superficie que no se encuentran en las células normales. Dichos antígenos se han aislado y caracterizado.

Las células leucémicas de la LLA, pueden diferenciarse por marcadores - de células B y T (10), con antiseros heterólogos o monoclonales contra células T células B y células nulas, las células T humanas son reconocidas por su capacidad de formar rosetas con eritrocitos de carnero. Las células B humanas son reconocidas por la presencia de inmunoglobulinas de superficie, detectables sobre membrana y receptores sobre la fracción C3 del complemento. Las células Pre -B tienen --- inmunoglobulinas unidas a la membrana y reaccionan con antiseros contra determinantes tempranos de las células B.

Las células nulas carecen de todos los marcadores anteriores de las --- células T y B y no reaccionan con los antiseros.

Los anticuerpos para estos antígenos son preparados mediante inmunización de animales de laboratorio. Los antígenos séricos asociados con las leucemias y los antígenos en general pueden ser determinados o detectados por radioinmunanálisis, por fluido citométrico, utilizando anticuerpos monoclonales (para identificar la presencia de antígenos particulares (9), técnicas de inmunofluorescencia - inmunoperoxidasa, inmunofosfatasa ácida) con anticuerpos preparados en animales de laboratorio.

CLASIFICACION CITOQUIMICA DE LEUCEMIAS AGUDAS.-

La clasificación citoquímica de Leucemias Agudas se basa en la reacción que proporcionan con diferentes compuestos; entre los métodos comunmente empleados para su clasificación se encuentran: Peroxidasa, Fosfatasa Acida (técnicas enzimáticas), Sudan Negro B, y PAS (técnicas no enzimáticas). Las tinciones anteriormente mencionadas son las que se utilizan en el Hospital General Centro Médico -- "La Raza", Laboratorio de Hematología Especial, pero también existen otras tinciones como lo son: Rojo Oleoso, Estearasas, etc.

TABLA 1.- CLASIFICACION CITOQUIMICA DE LAS LEUCEMIAS AGUDAS

TIPOS DE LEUCEMIAS	PEROXIDASA	PAS	SUDAN NEGRO B	FOSFATASA ACIDA
Células B	Negativo	Positivo y Negativo - menor al 5% de los casos	Negativo	Negativo
Células T	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
Mieloblásticas	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Indiferenciada	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

ANTICUERPOS MONOCLONALES.-

Definiendo a los anticuerpos, podemos decir que son aquellas moléculas sintetizadas por células inmunocompetentes, como consecuencia de la estimulación antigénica y que poseen una alta especificidad para reaccionar o unirse al antígeno que les dio origen.

En cuanto a los anticuerpos monoclonales, estos surgieron accidentalmente en el laboratorio de Cesar Milstein en Cambridge Inglaterra, mientras realizaban estudios sobre la genética de las inmunoglobulinas, utilizando técnicas de fusión y clonaje celular (18, 19).

TECNICAS DE OBTENCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

La creación de técnicas para la producción de anticuerpos monoclonales por parte de Köhler y Milstein, revolucionó el criterio serológico para el análisis de los antígenos presentes en la membrana de las células cancerosas.

Con dicha técnica pueden "inmortalizarse", por fusión con una línea de células de mieloma, células que producen un sólo tipo de anticuerpos (linfocitos B) y secretan por tanto un anticuerpo homogéneo de alta especificidad. Estas células "inmortalizadas" que producen el anticuerpo buscado pueden ser segregadas en clones ("clonadas") y así obtener el anticuerpo deseado en cantidades ilimitadas.

De esta manera pueden obtenerse líneas de células híbridas con capacidad de producir anticuerpos monoclonales que reaccionan con linfocitos T de Leucemias humanas.

Para la obtención de éstos, los ratones son inmunizados con células de Leucemias T humanas, durante tres o cuatro días, después de la última inyección las células esplénicas de los animales se fusionan con la línea de células de mieloma murino que muestran deficiencia de la enzima hipoxantina, guanina, fosforribosil transferasa (HGPRT). Las células de mieloma confieren la capacidad de crecimiento ininterrumpido y las células esplénicas inmunizadas confieren la capacidad de producir una inmunoglobulina específica.

Las células no fusionadas se eliminan por cultivo en un medio que contenga aminopterina, hipoxantina y timidina (HAT). Las células de mieloma no fusionadas carecen de la enzima HGPRT, necesario para la utilización de purinas hexogénas, razón por la cual no sobreviven en un medio con aminopterina.

Las células esplénicas normales que no se fusionan "no son inmortales" desaparecen en cultivo ininterrumpido. De este modo sólo sobrevivirán los híbridos que han obtenido la actividad de la enzima HGPRT de las células esplénicas la capacidad por parte de las células de mieloma de crecimiento ininterrumpido

Las clonas obtenidas se pueden conservar indefinidamente en cultivos o proliferar como un tumor de ascitis "in vivo". El líquido ascítico producido por estos hibridomas contiene anticuerpos en cantidades extraordinariamente grandes y

el líquido de ascitis a menudo posee títulos superiores a una parte por millón.

En base a estos anticuerpos monoclonales ha sido posible clasificar a las leucemias linfoides agudas. (Tabla II)

TABLA II.- CLASIFICACION INMUNOLOGICA DE LEUCEMIAS AGUDAS POR ANTICUERPOS MONOCLONALES.

Anticuerpo Monoclonal *	Valor de Referencia%	Leucemia Pre-preB	Leucemia Pre-B	Leucemia B	Leucemia Pre-T	Leucemia T	Leucemia Indiferenciada
BMA 010	100	100	100	100	100	100	100
BMA 020	12 ₊₅	12	↑ →59	↑ →80	12	12	12
BMA 030	70 ₊₁₀	70	70	70	70	70	70
BMA 040	50 ₊₁₅	50	50	50	50	↑ →80	50
BMA 060	menor a 1	0.5	0.5	0.5	0.5	↑ →30	0.5
BMA 090	menor a 1	0.5	0.5	0.5	↑ →30	0.5	0.5
BMA0120	menor a 1	↑ →75	↑ →60	0.5	0.5	0.5	0.5

* Existe un número mayor de Anticuerpos Monoclonales para la caracterización de LLA que no fueron utilizados debido a que carecía de ellos en el Laboratorio de Hematología Especial del Hospital General del Centro Médico "La Raza".

C A P I T U L O
= = = = =

T R E S
=====

MATERIAL Y EQUIPO.-

EQUIPO

Balanza analítica; Mettler
Balanza granataria; Mettler
Baño María; J. M. Ortiz
Centrifuga; Sol - Bat
Congelador a -20°C; Revco Rheem
Estufa a 37°C; J. M. Ortiz.
Microscopio de contraste de fases; Leitz Wetzlar
Microscopio de fluorescencia; Carl Zeiss
Microscopio de Luz visible; Carl Zeiss
Refrigerador a 4°C; General Electric

MATERIAL

Agitadores de vidrio
Algodón
Bulbos para Pipetas Pasteur
Cajas de Petri
Cámaras húmedas
Cámaras de Neubauer
Capilares
Cubrehematímetro
Cubreobjetos
Embudos de vidrio de cuello corto
Espátulas
Gradillas metálicas para 20 y 40 tubos
Jeringas de 5 ml.
Jeringas de 10 ml.
Lancetas
Matraces aforados de 50 ml.
Matraces aforados de 100 ml.
Matraces aforados de 1000 ml.
Matraces aforados de 2000 ml.
Matraz Erlenmeyer de 125 ml.
Matraz Erlenmeyer de 250 ml.
Papel filtro
Papel pH
Pipetas automáticas de 5 microlitros
Pipetas automáticas de 10 microlitros
Pipetas automáticas de 25 microlitros
Pipetas automáticas de 50 microlitros
Pipetas automáticas de 100 microlitros
Pipetas automáticas de 500 microlitros
Pipetas graduadas de 1 ml.
Pipetas graduadas de 5 ml.
Pipetas graduadas de 10 ml.
Pipetas para globulos blancos
Pipetas para globulos rojos
Pipetas para hemoglobina
Pipetas Pasteur

Portaobjetos

Probetas graduadas de 50 ml.

Probetas graduadas de 100 ml.

Probetas graduadas de 250 ml.

Probetas graduadas de 500 ml.

Tubos de ensayo de 13 x 100 mm. de vidrio

Tubos de ensayo de 12 x 75 mm. de plástico

Tubos de ensayo de 8 x 25 mm. de vidrio

Vasos de Coplin

Vasos de precipitado de 10 ml.

Vasos de precipitado de 50 ml.

Vasos de precipitado de 100 ml.

Vasos de precipitado de 250 ml.

Vasos de precipitado de 500 ml.

SEPARACION DE LINFOCITOS

FUNDAMENTO:

Cuando se quiere separar un tipo de células de la sangre tota se puede hacer mediante un gradiente de concentración, como lo son el Ficoll-Hypaque, --- que entre 1500 a 2000 revoluciones por minuto, se separan solamente a los linfocitos y células mononucleadas, encontrándose estas en la fase intermedia formando -- un menisco blanquesino.

PROCEDIMIENTO:

- 1.- Tomar una muestra de 5 ml. de sangre periférica con 3 o 4 gotas de heparina, ó bien desfibrinada.
- 2.- Diluir la sangre, al doble del volúmen con amortiguador de fosfatos ó PBS, pH 7.2 - 7.4 (*).
- 3.- Estratificar 4 ml. de sangre diluida sobre 3 ml. de Ficoll-Hypaque en un tubo de ensaye de 13 x 100 m.m.
- 4.- Centrifugar a 1500 - 200 rpm. durante 17 minutos.
- 5.- Separar la fracción de linfocitos (separados como una capa de células en la interfase), con la ayuda de una Pipeta Pasteur y con movimientos circulares rápidos, para evitar tomar el resto del plasma, que se encuentra sobre esta -- interfase.
- 6.- Transferir esta capa de células a un tubo de ensaye de 13 x 100 mm. y lavar las células con amortiguador de fosfatos PBS, pH.7.2 - 7.4, por centrifugación a 1500 - 2000 rpm. durante tres minutos en tres ocasiones.
- 7.- Descartar el sobrenadante y resuspender en un mínimo de volúmen, -- ajustando a una concentración de 1 a 3 millones de células por milímetro cúbico.

INTERPRETACION:

Se observa un botón blanquesino en el fondo del tubo, de acuerdo a la -- cantidad de células que se hayan obtenido de la muestra, esto es antes de resuspenderla.

(*) La preparación de reactivos se describe en el Apéndice A.

IDENTIFICACION DE ESTIRPE LINFOCITARIA POR MEDIO DE LOS

ANTICUERPOS MONOCLONALES

FUNDAMENTO:

Los anticuerpos monoclonales posibilitan la observación de las estructuras celulares en células vivas con reconocimiento simultáneo de la función en el sistema inmunitario, lo que hasta la fecha no era posible aplicando otras medidas. Con los anticuerpos monoclonales pueden identificarse las poblaciones celulares - linfoides y mieloides humanas en los tejidos linfáticos y en caso de infiltración en las regiones orgánicas patológicas. En consecuencia, se brinda a la anatomopatología y a la histología una valoración simplificada de los cortes histológicos que para la valoración no dependerá ya únicamente de la morfología y del comportamiento de las coloraciones.

INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.- Los linfocitos aislados del paciente reaccionan con los BMA en el caso de que exista el correspondiente receptor en el linfocito. A continuación se añade el conjugado anti-Ig de ratón que se fija al BMA ya unido. Los linfocitos marcados de este modo se valoran al microscopio de fluorescencia y se expresa el resultado en porcentaje de la cifra de linfocitos.

PROCEDIMIENTO:

- 1.- Diluir al Anticuerpo Monoclonal* con 245 microlitros de amortiguador de fosfatos de PBS con suero fetal de Ternera al 5%.
- 2.- Colocar 50 microlitros de cada uno de los anticuerpos monoclonales a utilizar en tubos de ensayo de 8 por 25 mm. y agregar 50 microlitros de la suspensión de linfocitos ajustada a la cantidad de células deseadas.
- 3.- Incubar 30 minutos a 4°C.
- 4.- Hacer tres lavados de tres minutos cada uno, con 500 microlitros de amortiguador PBS -suero fetal de ternera al 5%, para cada uno de los tubos.
- 5.- Diluir el fluorocromo con 245 microlitros de amortiguador PBS con suero fetal de ternera al 5%.
- 6.- Después de la última centrifugación, tirar el sobrenadante y resuspender en un mínimo de volumen y adicionar 50 microlitros de fluorocromo.
- 7.- Incubar 30 minutos a 4°C.
- 8.- Lavar tres veces, tres minutos cada uno, con 500 microlitros de amortiguador de PBS con suero fetal de ternera al 5%, para cada uno de los lavados.
- 9.- Después de la última centrifugación, tirar el sobrenadante y resuspender en un mínimo de volumen, y adicionar una gota del amortiguador de PBS con suero fetal de ternera al 5% y glicerol al 10%.

10.- Montar las laminillas, colocar una gota de cada uno de los tubos en un portaobjetos limpio, y colocar el cubreobjetos sobre la preparación.

11.- Leer a inmersión en el microscopio de fluorescencia, contar 200 - células, y al mismo tiempo contar el porcentaje de células fluorescentes o ----- positivas.

* Cada una de las alicuotas, tanto de los anticuerpos monoclonales como del fluorocromo son de 5 microlitros.

INTERPRETACION:

Observar las células primero a la luz visible, y después sobre esas mis mas contar las células fluorescentes, reportando el porcentaje.

TINCIÓN DEL ÁCIDO PERYÓDICO DE SCHIFF

(PAS)

FUNDAMENTO:

El ácido peryódico oxida los glicoles y los compuestos relacionados en aldehídos para reaccionar con el Schiff, liberando fucsina y tiñéndose los ---- compuestos celulares que contienen oxidables. En las células de la sangre y de la médula ósea, el glucógeno parece ser el compuesto principalmente responsable, ya que la tinción puede ser bloqueada por la digestión con *A*milasa.

PROCEDIMIENTO:

- 1.- Secar los frotis de sangre periférica o médula ósea al aire libre y fijar con vapores de formol alcohólico durante cinco minutos.
- 2.- Lavar con agua corriente por 15 minutos.
- 3.- Poner los frotis en ácido peryódico al 0.5% por 10 minutos.
- 4.- Lavar con agua destilada y secar.
- 5.- Poner las laminillas de las muestras en el reactivo de Schiff por 45 minutos al abrigo de la luz.
- 6.- Poner las muestras en Metabisulfito de sodio al 0.5%, por tres -- minutos tres veces.
- 7.- Lavar con agua destilada tres minutos tres veces.
- 8.- Contrateñir con Hematoxilina de Harris, durante 10 minutos.
- 9.- Lavar con agua destilada y secar.
- 10.- Observar al microscopio con el objetivo de inmersión.

INTERPRETACION:

Los blastos positivos al igual que los neutrofilos se observan con granu los color bugambilia intensos.

TINCIÓN DE PEROXIDASA

FUNDAMENTO:

La peroxidasa, enzima leucocitaria transfiere al hidrógeno de la bencidina al peróxido de hidrógeno, dando un derivado de color azul intenso pudiéndose detectar el lugar donde hay actividad enzimática.

PROCEDIMIENTO:

- 1.- Secar los frotis de sangre periférica o médula ósea al aire y fijar las laminillas por 60 segundos en la solución fijadora a temperatura ambiente.
- 2.- Lavar las laminillas así fijadas por 30 segundos con agua destilada
- 3.- Sumergir las laminillas en la solución de tinción por 30 segundos y lavar con abundante agua.
- 4.- Contrateñir un minuto con safranina, lavar con abundante agua, y -- observar al microscopio de luz visible, con el objetivo de inmersión.

INTERPRETACION:

Los gránulos se observan de color negro en los blastos que son positivos

TINCIÓN DE SUDAN NEGRO B

FUNDAMENTO:

El sudan negro B tiñe gran variedad de lípidos incluyendo las grasas -- neutras, los fosfolípidos y los esteroides. También colorea algunos componentes -- celulares que no son lípidos, como se demuestra por la imposibilidad de eliminar completamente el colorante en los disolventes de los lípidos como la acetona. En los leucocitos la sudanofilia corre paralela con la reacción de la peróxidasa. -- Los linfocitos y los linfoblastos no se tiñen con el Sudan Negro B, mientras que los precursores de los eritrocitos y los monocitos inmaduros muestran característicos patrones de tinción.

PROCEDIMIENTO:

- 1.- Secar los frotis de médula ósea al aire libre, fijar con vapores de formol durante 10 minutos.
- 2.- Los frotis fijados se secan totalmente.
- 3.- Sumergir los frotis en la solución de Sudan Negro B, en un vaso de Coplin durante 45 minutos.
- 4.- Lavar los frotis con etanol absoluto y secar.
- 5.- Contrateñir con Giemsa por 10 minutos.
- 6.- Lavar con agua destilada, secar totalmente, y observar al microscopio con el objetivo de inmersión.

INTERPRETACION:

Los gránulos en los mieloblastos se observan de color azul intenso ---- cuando son positivos.

TINCIÓN DE FOSFATASA ÁCIDA

FUNDAMENTO:

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

PROCEDIMIENTO:

1.- Fijar los frotis de médula ósea o sangre periférica con una solución amortiguadora de acetona formalina (este fijador se debe de encontrar a 4°C) por 30 segundos.

2.- Lavar los frotis con tres cambios de agua destilada.

3.- Pasar los frotis a la mezcla de incubación, durante 60 minutos, en un vaso de Coplin, en la estufa a 37°C.

4.- Lavar los frotis con dos cambios de agua destilada y secar totalmente.

5.- Introducir los frotis al vaso de Coplin con verde de metilo al 1% durante dos minutos para contrateñir.

6.- Lavar al chorro de agua, y secar totalmente al aire, observar al microscopio con el objetivo de inmersión.

INTERPRETACION:

Los linfocitos poseen la enzima cuando presentan una coloración rojiza en la periferia de las células además esta coloración se va solamente hacia uno de los extremos de la célula, es decir no es perinuclear, es polar.

C A P I T U L O

C U A T R O
=====

RESULTADOS:

Durante el desarrollo de este trabajo realizado en el Hospital General del Centro Médico "La Raza", fueron estudiados 25 pacientes de edad pediátrica con diagnóstico de LLA. A éstos se les determinó en primer término la Biometría Hemática inicial (ver tabla IX). Posteriormente para la clasificación de la leucemia fue necesario realizar un aspirado medular y así obtener su caracterización morfológica y citoquímica (ver tabla VI, VIII y IX).

Las leucemias de tipo mieloide fueron descartadas, por no ser objeto de este trabajo (aproximadamente 4).

Al mismo tiempo que el aspirado medular, se obtenía sangre periférica, para la caracterización inmunológica con Anticuerpos Monoclonales (ver tabla V, VII, y IX).

Cabe hacer mención que la caracterización inmunológica y citoquímica fue realizada antes de aplicar el tratamiento.

A continuación se describen las tablas y gráficas correspondientes a los resultados.

TABLA III.- FRECUENCIA DE LEUCEMIAS LINFOBLASTICAS AGUDAS POR EDADES (AÑOS)

EDAD	No. DE PACIENTES	%
0	0	0
1	0	0
2	2	8
3	3	12
4	4	16
5	3	12
6	2	8
7	2	8
8	2	8
9	0	0
10	1	4
11	1	4
12	0	0
13	4	16
14	0	0
15	1	4

TABLA IV.- FRECUENCIA DE LEUCEMIAS LINFOBLASTICAS AGUDAS POR SEXO.

SEXO	No. DE PACIENTES	%
Femenino	7	28
Masculino	18	72

TABLA V.- FRECUENCIA DE LEUCEMIAS AGUDAS POR SU CARACTERIZACION CON LAS TECNICAS CITQUIMICAS

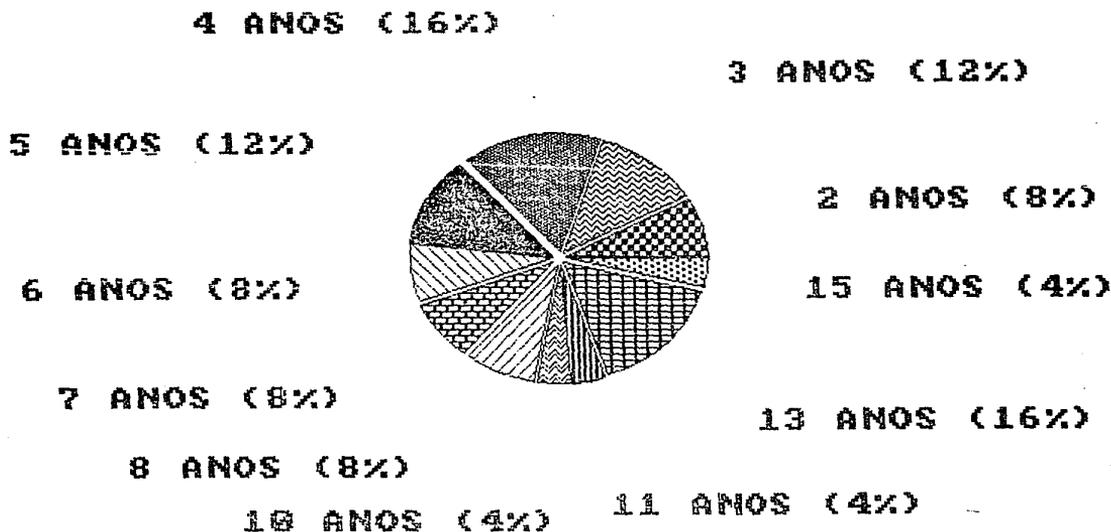
TIPO DE LEUCEMIA	No. DE PACIENTES	%
Leucemia de células B	16	64
Leucemia de células T	0	0
Leucemia Mieloblástica	1	4
Leucemia Indiferenciada	7	28

TABLA VI.- FRECUENCIA DE LEUCEMIAS AGUDAS POR SU CARACTERIZACION CON ANTICUERPOS MONOCLONALES

TIPO DE LEUCEMIA	No. DE PACIENTES	%
Leucemia de células Pre-preB	6	24
Leucemia de células Pre-B	10	40
Leucemia de células B	0	0
Leucemia de células Pre-T	1	4
Leucemia de células T	0	0
Leucemia Mieloblástica	1	4
Leucemia Indiferenciada	7	28

Gráfica 1.-

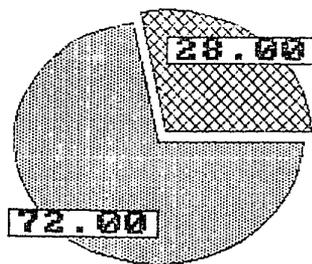
EDAD U.S. PORCIENTO DE PACIENTES



Gráfica 2.-

SEXO US. PORCIENTO DE PACIENTES

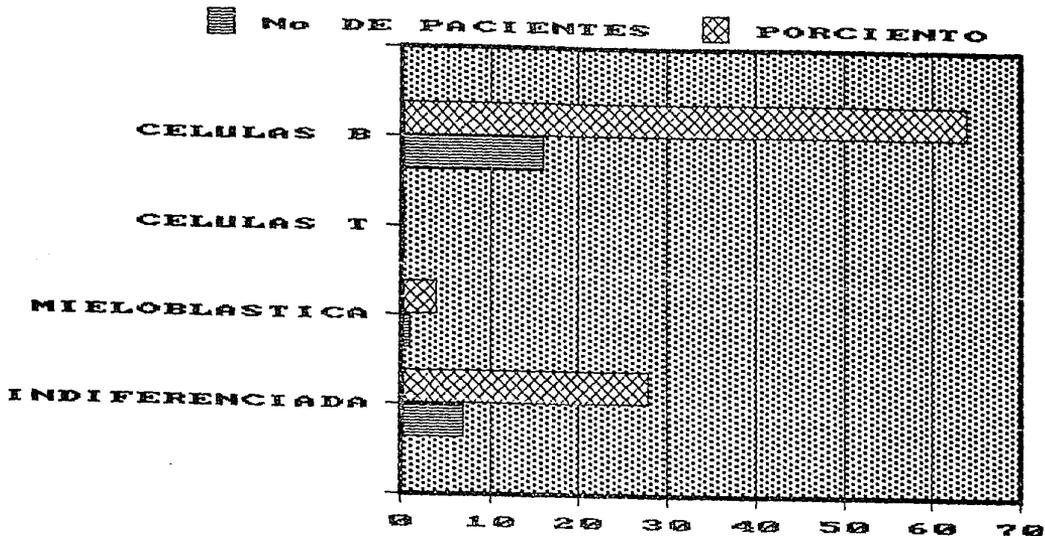
FEMENINO
(7 CASOS)



MASCULINO
(18 CASOS)

Gráfica 3.-

TIPOS DE LEUCENIA

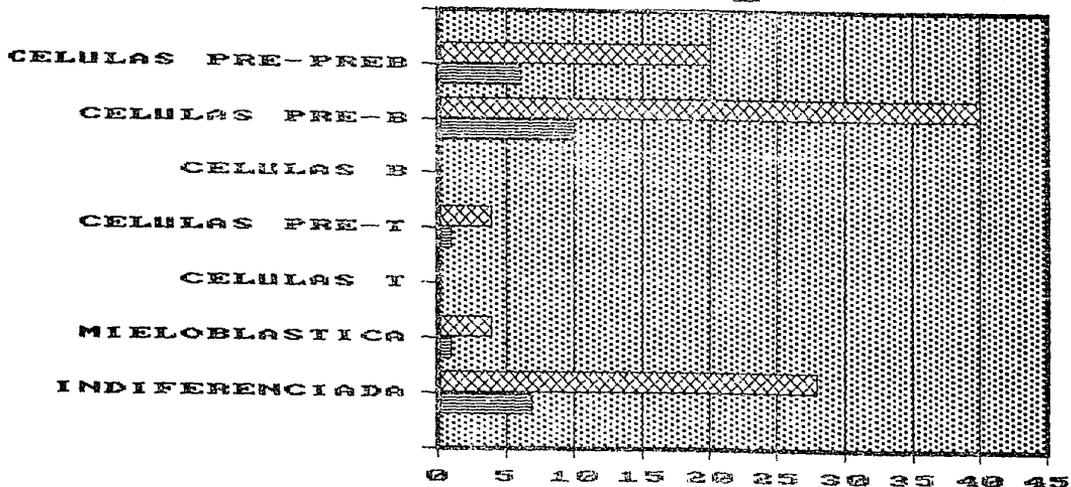


POR TECNICAS CITQUIMICAS

Gráfica 4.-

TIPOS DE LEUCEMIA

■ No. DE PACIENTES ☒ PORCIENTO



POR ANTICUERPOS MONOCLONALES

23
25
TABLA VII.- RESULTADOS DE LOS ANTIQUEJOS PORCENTUALES EN CADA UNO DE LOS FACTORES

CASO	% BMA010	% BMA020	% BMA030	% BMA040	% BMA060	% BMA090	% BMA120
1	100	19	78	56	0.5	0.5	11.5
2	100	17	63	60	0.0	30.0	1.0
3	100	11	45	50	0.0	1.0	0.5
4	100	80	60	53	1.0	1.0	56.0
5	100	17	60	49	0.0	3.0	15.0
6	100	58	38	45	0.0	0.0	32.0
7	100	39	65	54	0.0	2.0	34.5
8	100	24	30	44	0.0	0.5	53.0
9	100	12	63	60	0.0	0.5	0.5
10	100	27	70	50	0.5	1.0	22.0
11	100	33	60	43	0.0	1.0	54.0
12	100	22	74	52	0.5	2.0	12.0
13	100	28	63	40	0.5	1.0	22.0
14	100	52	73	59	1.0	0.5	70.0
15	100	17	65	52	1.5	0.0	0.0
16	100	9	61	54	1.0	0.5	0.0
17	100	23	71	42	1.0	0.5	19.0
18	100	14	63	42	1.0	0.5	15.0
19	100	14	61	46	0.5	0.5	0.5
20	100	8	75	46	1.0	0.0	0.0
21	100	12	75	55	0.5	0.0	35.0
22	100	11	60	44	1.0	0.0	22.0
23	100	17	72	37	1.0	0.0	0.5
24	100	10	65	61	0.0	0.0	41.0
25	100	10	76	37	0.0	0.0	1.0
VALOR DE DE PROME DIA	100	12±5	70±10	50±15	Menor a 1	Menor a 1	Menor a 1

Grafica 5.-

ANTICUERPO MONOCLONAL

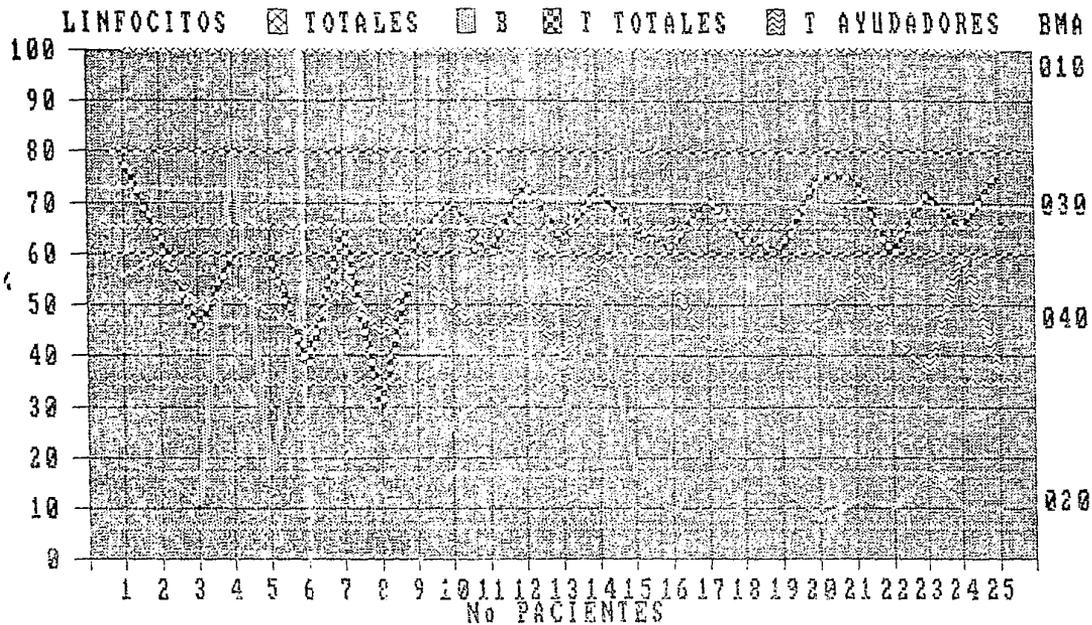


TABLA VIII.-- RESULTADOS DE LAS TECNICAS CITOCUIMICAS EN CADA UNO DE LOS PACIENTES

CASO	FAS	SUDAN NEGRO B	PEROXIDASA	POSPATASA ACIDA	% FAS	% SUDAN NEGRO B	% PEROXIDASA	% POSPATASA ACIDA
1	Pos débil	Negativo	Negativo	Negativo	86	0	0	0
2	Pos +	Negativo	Negativo	Negativo	13	0	0	0
3	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0	0	0	0
4	Pos ++	Negativo	Negativo	Negativo	54	0	0	0
5	Pos +	Negativo	Negativo	Negativo	54	0	0	0
6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0	0	0	0
7	Pos +++	Negativo	Negativo	Negativo	79	0	0	0
8	Pos +	Negativo	Negativo	Negativo	25	0	0	0
9	Negativo	Pos ++	Pos ++	Negativo	0	70	89	0
10	Pos +	Negativo	Negativo	Negativo	22	0	0	0
11	Pos débil	Negativo	Negativo	Negativo	10	0	0	0
12	Pos ++	Negativo	Negativo	Negativo	18	0	0	0
13	Pos +++	Negativo	Negativo	Negativo	80	0	0	0
14	Pos +++	Negativo	Negativo	Negativo	73	0	0	0
15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0	0	0	0
16	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0	0	0	0
17	Pos +++	Negativo	Negativo	Negativo	66	0	0	0
18	Pos débil	Negativo	Negativo	Negativo	42	0	0	0
19	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0	0	0	0
20	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0	0	0	0
21	Pos débil	Negativo	Negativo	Negativo	28	0	0	0
22	Pos +	Negativo	Negativo	Negativo	35	0	0	0
23	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0	0	0	0
24	Pos +	Negativo	Negativo	Negativo	21	0	0	0
25	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0	0	0	0

TABLE IX. - TABLA GENERAL DE RESULTADOS. -

Num. FACIENTE	EDAD AÑOS	SEXO	C I T O G U I F I C A S				SANGRE PERIFERICA		CONSTITUCION DE A. MONOCLONALES	CONSTITUCION DE CITOCITICAS
			PAS	PEROMI PARA	SUPAN NEGRO B.	FORMATAA ACILIA	LEUCOCITOS INICIALES	GLUCOS INICIALES		
1	13	F	86%	0%	0%	0%	104,000	83	Pre-proB	Células B
2	4	M	13%	0%	0%	0%	1,700	16	Pre-T	Células B
3	5	M	0%	0%	0%	0%	22,400	48	Indiferenciada	Indiferenciada
4	3	M	54%	0%	0%	0%	36,500	83	Pre-B	Células B
5	4	F	54%	0%	0%	0%	42,600	93	Pre-proB	Células B
6	5	M	0%	0%	0%	0%	32,450	70	Pre-B	Células B
7	5	M	79%	0%	0%	0%	2,000	17	Pre-B	Células B Indiferenciada
8	8	M	25%	0%	0%	0%	4,700	38	Pre-B	Células B
9	4	F	0%	98%	70%	0%	2,400	2	Miclobástica	Miclobástica
10	3	M	23%	0%	0%	0%	3,350	66	Pre-B	Células B
11	3	M	10%	0%	0%	0%	5,000	35	Pre-B	Células B
12	15	M	13%	0%	0%	0%	1,400	18	Pre-B	Células B
13	4	F	30%	0%	0%	0%	2,200	0	Pre-B	Células B
14	6	M	73%	0%	0%	0%	2,950	24	Pre-B	Células B
15	13	M	0%	0%	0%	0%	757,000	99	Indiferenciada	Indiferenciada
16	11	F	0%	0%	0%	0%	404,000	93	Indiferenciada	Indiferenciada
17	3	M	60%	0%	0%	0%	105,400	96	Pre-B	Células B
18	7	F	42%	0%	0%	0%	600	7	Pre-proB	Células B
19	7	M	0%	0%	0%	0%	13,300	74	Indiferenciada	Indiferenciada
20	2	M	0%	0%	0%	0%	1,300	20	Indiferenciada	Indiferenciada
21	10	M	23%	0%	0%	0%	5,750	37	Pre-proB	Células B
22	2	M	35%	0%	0%	0%	13,400	87	Pre-proB	Células B
23	11	M	0%	0%	0%	0%	33,500	32	Indiferenciada	Indiferenciada
24	0	M	21%	0%	0%	0%	1,350	10	Pre-proB	Células B
25	13	F	0%	0%	0%	0%	15,700	93	Indiferenciada	Indiferenciada

Capítulo 6.-

LEUCEMIA PRE-PREB

- 1a. Cond. Existencia de Blastos 4a. Cond. Monoclonal Ø2Ø dentro de su rango
- 2a. Cond. Citoquímica con Pas 5a. Cond. Monoclonales Ø1Ø, Ø4Ø, Ø6Ø, Ø9Ø normales
- Positivo y otras 3 tinciones Ø3Ø normal o disminuido
- negativas
- 3a. Cond. Monoclonal Ø12Ø aumentado

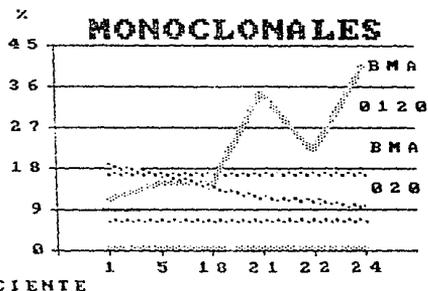
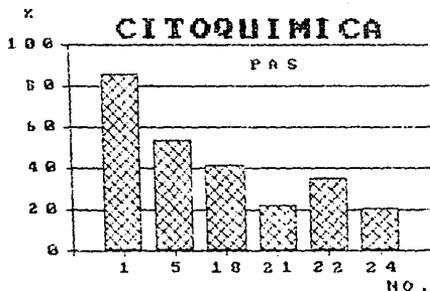
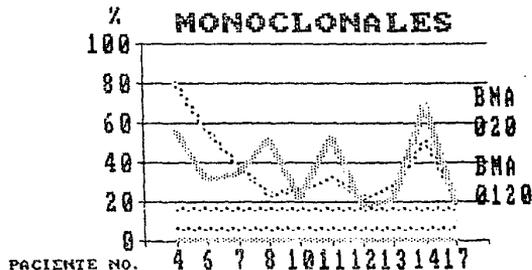
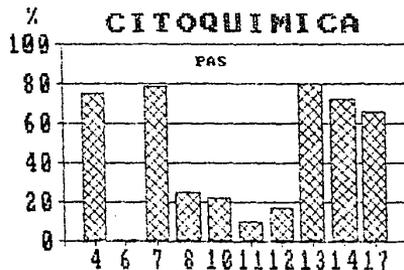


Grafico 7.-

LEUCENIA PRE-B

- 1a. Cond. Existencia de Blastos.
- 2a. Cond. PAS positivo o negativo en un 5% de los casos, los demas negativos.
- 3a. Cond. Monoclonal 0120 aumentado.
- 4a. Cond. Monoclonal 0120 aumentado.
- 5a. Cond. Monoclonales 010, 040, 060 y 090



Citología B.-

LEUCEMIA TIPO B

- | | |
|--|--|
| 1a. Cond. Existencia de Blastos. | 4a. Cond. Monoclonales 010, |
| 2a. Cond. PAS positivo, Peroxidasa,
Sudan Negro B y Fosfatasa Ácida
negativos. | 030, 040, 060, 090 y 0120
dentro del rango. |
| 3a. Cond. Monoclonal 020 aumentado. | |

CITOQUIMICAS

MONOCLONALES

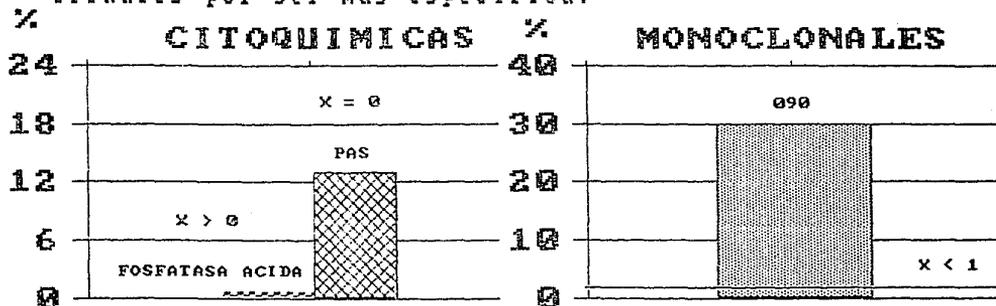
NO SE PRESENTO NINGUN CASO

LEUCEMIA PRE T

- | | |
|------------------------------------|-----------------------------|
| 1a. Cond. Existencia de Blastos. | 4a. Cond. Monoclonales 010, |
| 2a. Cond. Fosfatasa Acida Positiva | 020, 040, 060, 0120 |
| todas las demas negativas | Normales, Monoclonal 030 |
| 3a. Cond. Monoclonal 090 Aumenta_ | Normal o Disminuido. |

PACIENTE No. 2

Nota. Se le dio prioridad a la tecnica de anticuerpos Mono-clonales por ser mas especifica.



Gráfica 10.-

LEUCEMIA TIPO T

- | | |
|---|---|
| 1a. Cond. Existencia de Blastos. | 4a. Cond. Monoclonales 010, |
| 2a. Cond. Fosfatasa Ácida Positiva
PAS, Peroxidasa y Sudan Negro
B negativos. | 020, 030, 090 y 0120
dentro del rango. |
| 3a. Cond. Monoclonal 040 o 060
aumentados, uno o ambos | |

CITOQUIMICAS

MONOCLONALES

NO SE PRESENTO NINGUN CASO

Grafica II.-

LEUCEMIA MIELOBLASTICA

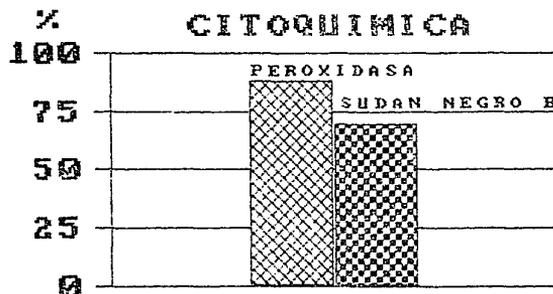
1a. Cond. Existencia de Blastos.

2a. Cond. Peroxidasa positiva

3a. Cond. Sudan Negro B positiva

4a. Cond. PAS y Fosfatasa
acida negativa.

5a. Cond. Monoclonales 010,
020, 030, 040, 060, 090
0120 normales



MONOCLONALES

DENTRO DE RANGO

PACIENTE No. 2

Gráfica 12.-

LEUCEMIA INDIFERENCIADA

- 1a. Cond. Existencia de Blastos.
- 2a. Cond. Citoquímicas negativas

- 3a. Cond. Monoclonales 010,
020, 040, 060, 090, 0120
normales, Monoclonal 030
normal o disminuido.

CITOQUÍMICA

MONOCLONALES

Pacientes No.

	3
	15
IGUALES A CERO	16
	19
	20
	23
	25

DENTRO DE RANGO

ANÁLISIS DE RESULTADOS.-

- Como se menciona en la descripción de resultados las leucemias ----- mieloides fueron descartadas, para una clasificación inmunológica, ya que se ----- carecía del panel de anticuerpos monoclonales para dicha caracterización.

- En primer lugar se describe en la tabla III de pacientes y sus edades observándose que entre 3 y 5 años, existe una alta incidencia de LLA, para declinar en las siguientes, y elevarse a los 13 años (Gráfica 1), con una predominancia en el sexo masculino (tablas IV, IX, Gráfica 2).

- En las tablas V, VIII y IX se describe la caracterización de leucemias agudas por técnicas citoquímicas, observándose una alta incidencia de la LLA de -- células B, seguida de la leucemia indiferenciada (gráficas 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12).

- Posteriormente a la clasificación citoquímica se lleva a cabo la ---- clasificación inmunológica, en donde se demuestra que la mayoría de las LLA son -- del tipo Pre-B (tablas VI, VII, y IX. Gráficas 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, y 12).

- Por último en la tabla IX se describen los resultados de edad, sexo, citoquímica, Biometría hemática, y las conclusiones de cada uno de los 25 pacientes estudiados (Gráficas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, y 12).

C A P I T U L O

C I N C O
=====

CONCLUSIONES.-

- La leucemia aguda es un padecimiento heterológico, que si no se ----
diagnóstica a tiempo, puede llevar a la muerte. Es por esto necesario la implemen-
tación de métodos que permitan clasificar y diagnosticar leucemias, esta alternati-
va la facilitan los Anticuerpos Monoclonales ya que las técnicas citotóxicas y -
características morfológicas no lo permiten.

- En este trabajo se observa una alta frecuencia de LLA en pacientes de
edad pediátrica, con una predominancia sobre el sexo masculino.

- Otra de las características sobresalientes es que el tipo más frecuen-
te de LLA, es la de células B, que en cuanto a pronóstico ocupa un cierto lugar, -
precedida por la de tipo Pre-preB. Pre-B, Pre-T, seguida por la leucemia de células
T, mieloblastica e Indiferenciada.

- Por lo tanto se concluye que la clasificación inmunológica con ----
Anticuerpos Monoclonales, permite una caracterización más específica del tipo de
leucemia, esta permite aplicar mejor terapéutica, lo que redundará en una mayor ---
sobrevivencia.

- Es necesario que para fines de diagnóstico se utilice una mayor ----
variedad de Anticuerpos Monoclonales, para así también clasificar a las leucemias
mieloides que fueron descartadas de este trabajo por no tener acceso a ellos.

A P E N D I C E S

APENDICE "A"
PREPARACION DE REACTIVOS

a).- SEPARACION DE LINFOCITOS

1.- PREPARACION DEL AMORTIGUADOR DE FOSFATOS (PBS); pH 7.2 - 7.4

- 500 ml. de agua desionizada
- Poner al matraz o recipiente la barra magnética y agitar
- Agregar 4 g. de NaCl al agua en el recipiente.
- Agregar 0.10 g. de KCl a la solución en el recipiente
- Agregar 0.10 g. de K_2HPO_4 (fosfato de potasio monobásico) a la solución en el recipiente
- Agregar 1.08 g. de fosfato de sodio dibásico heptahidratado a la solución en el recipiente
- Mezclar hasta disolver todo completamente
- Quitar la barra magnética de la solución y tomar el pH, éste debe ser entre 7.2 a 7.4
- Guardar la solución en un recipiente bien rotulado en el refrigerador de 2 a 8°C

b).- IDENTIFICACION DE LA ESTIRPE LINFOCITARIA POR MEDIO DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES

1.- PREPARACION DEL AMORTIGUADOR DE FOSFATOS CON EL SUERO FETAL DE TERNERA AL 5% (PBS/SFT al 5%).

- Poner en una probeta graduada de 100 ml., 95 ml. de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.2 - 7.4
- Agregar del suero fetal de ternera 5 ml.
- Agitar por inversión, teniendo bien tapada la probeta con papel para film, y quitar la solución, para traspasarla a recipientes de 5, 10 y 50 ml., para guardarlas en el Revco a -20°C

c).- TINCIÓN DEL ACIDO PERYODICO DE SCHIFF (PAS)

1.- REACTIVO DE SCHIFF.

- Llevar a ebullición 200 ml. de agua destilada y retirar del calor
- Agregar inmediatamente 1g. de Fucsina básica, adicionar primero una -

pequeña cantidad del colorante, agitando constantemente, adicionar el resto del colorante, sin dejar de agitar para evitar el burbujeo violento.

- La mezcla es enfriada a 60°C, en un baño de hielo
- Añadir 2 g. de sulfato de sodio monobásico a la solución.
- Enfriar a 20°C la solución.
- Agregar 20 ml. de HCl 1N a la solución
- Guardar la solución en un frasco oscuro a temperatura ambiente por 18 a 26 horas.
- Agregar 300 mg. de carbón activado (Novit A)
- Agitar la mezcla por 1 minuto
- Filtrar la mezcla, y guardar en frasco oscuro a 4°C

2.- SOLUCION DE METABISULFITO DE SODIO

- Pesar 1 g. de Metabisulfito de sodio
- Medir 200 ml. de agua destilada y ponerlos en un matraz erlenmeyer de 250 ml.
- Adicionar el metabisulfito de sodio al agua destilada y disolver totalmente.
- Esta solución se prepara momentos antes de usarla, ya que es para los lavados.

3.- SOLUCION DE ACIDO PERYODICO AL 0.5%

- Pesar 0.5 g. de ácido peryódico, que son agregados a 100 ml. de agua destilada y disolverlos totalmente.

d).- TINCIÓN DE PEROXIDASA

1.- SOLUCION FIJADORA

- Mezclar 10 ml. de Formol al 40%, con 90 ml. de etanol absoluto.

2.- MEZCLA DE TINCIÓN

- 100 ml. de etanol al 30%
- Agregar 0.3 g. de Dicloruro de Bencidina
- Agregar 1 ml. de Sulfato de Zinc heptahidratado al 3.8%
- Agregar 2.1 g. de Acetato de sodio anhidro, ó 1 g. de Acetato de sodio trihidratado.

- Adicionar 0.9 ml. de H_2O_2 al 3%
- Adicionar 1.5 ml. de NaOH 1N
- Agregar 0.2 g. de Safranina 0.

Los reactivos deben añadirse según el orden dado. El dicloruro de ---- Bencidina, puede contener algún material insoluble y por la adición de Sulfato de Zinc se forma un precipitado, el cual se disuelve con la adición de los ingredientes restantes.

El pH debe ser de 6.0 ± 0.05

Filtrar la solución y se conserva en un frasco oscuro a temperatura ---- ambiente por varios meses.

e).- TINCION DE SUDAN NEGRO B.

1.- AMORTIGUADOR DE SUDAN NEGRO B

- Mezclar 16 g. de fenol puro en 30 ml. de alcohol etílico absoluto
- Hacer una solución de 0.3 g. de fosfato de sodio dibásico dodecahidratado en 100 ml. de agua, ó también 0.1189 g. de fosfato de sodio dibásico anhidro.
- Poner la primera mezcla en un matraz aforado a 100 ml. y aforarlo con la solución de fosfato de sodio dibásico.

2.- SOLUCION STOCK DE SUDAN NEGRO B

- A 100 ml. de alcohol etílico absoluto agregar 0.3 g. de Sudan Negro B
- Filtrar la solución en un frasco oscuro y guardarlo a temperatura --- ambiente por varios meses.

3.- SOLUCION DE TRABAJO

- Poner en una probeta de 50 ml., 20 ml. de amortiguador de Sudan.
- Adicionar 30 ml. de la solución stock de Sudan Negro B previamente filtrado a la probeta en donde estan los 20 ml. del amortiguador de Sudan Negro B
- Tapar la probeta con papel parafilm y agitar por inversión.

4.- SOLUCION DE GIEMSA

- Disolver 10 g. de Giemsa en polvo en 540 ml. de glicerina en baño maría a 60 °C, durante 48 horas, agitando frecuentemente.
- Agregar 840 ml. de alcohol metílico absoluto a la mezcla anterior y dejar madurar.

f).- TINCIÓN DE FOSFATASA ACIDA

1.- AMORTIGUADOR DE FIJACION DE FORMALINA - ACETONA pH 6.6 a 6.8

- Poner en un matraz erlenmeyer de 1000 ml. 0.2 g. de fosfato de sodio dibásico.
- Agregar 1.0 g. de fosfato de potasio monobásico.
- Adicionar 300 ml. de agua destilada y disolver los dos fosfatos.
- Agregar 450 ml. de Acetona.
- Agregar 250 ml. de formalina y mezclar todo totalmente.
- Guardar en refrigeración.

2.- SOLUCION DE NITRITO DE SODIO AL 4%

- Pesar 4.0 g. de Nitrito de sodio y ponerlos en un matraz aforado de 100 ml.
- Aforar con agua destilada, y guardarlo por meses a temperatura ambiente.

3.- SOLUCION DE PARA/ROSAANILINA

- Pesar 1.0 g. de para-rosaánilina y ponerlo en un matraz erlenmeyer de 50 ml.
- Adicionar 20 ml. de agua destilada al matraz, y mezclar para disolver el colorante.
- Adicionar 5 ml. de HCl concentrado
- Mezclar de 10 a 15 minutos hasta que la para-rosaánilina se disuelva totalmente, y almacenar en un frasco oscuro.

4.- ACIDO ACETICO 1N

- Agregar en un matraz aforado de 1000 ml., 6.0 ml. de ácido acético -- glacial.
- Aforarlo con agua destilada, y guardarlo por varios meses a temperatura ambiente.

5.- AMORTIGUADOR DE ACETATO 0.1 N pH 5.0

- Pesar 4.797 g. de Acetato de sodio trinitratado y colocálos en un matraz aforado de 1000 ml.

- Adicionar 14.75 ml. de ácido acético 1N
- Aforar con agua destilada y guardar a temperatura de refrigeración.

6.- SOLUCIÓN "A"

- Poner en un vaso de precipitado 1.2 ml. de la solución de nitrito de sodio al 4%
- Adicionar 1.2 ml. de la solución de para-rosaánilina, y mezclarlos bien.

7.- SOLUCIÓN "B"

- Pesar 30 mg. de Naftol AS-BI, y ponerlos en un vaso de precipitados de 10 ml.
- Adicionar 2 ml. de N-N-Dimetilformamida
- Medir en una probeta de 50 ml., 35.6 ml. de amortiguador de Acetato - 0.1 N pH 5.
- Mezclar los 3 componentes en este orden

8.- MEZCLA DE INCUBACION "I"

- Mezclar la solución "B", con la solución "A". Esta mezcla es ajustada a pH 5.1 con NaOH saturado y filtrar en un vaso de Coplin.

9.- VERDE DE METILO

- Pesar 1 g. de Verde de Metilo en polvo y ponerlo en un matraz aforado de 100 ml.
- Aforar con amortiguador de acetato 0.1 N, pH 5
- Ajustar el pH a 4.2 ó 4.5 con NaOH 1N ó con HCl 1N

APENDICE "B"

VALORES DE REFERENCIA DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES EN
LA POBLACION INFANTIL MEXICANA

ANTICUERPO MONOCLONAL	VALOR DE REFERENCIA DE POBLACION MEXICANA % (*)
BMA 010	90
BMA 020	17
BMA 030	69
BMA 040	45
BMA 060	0.5
BMA 070	14
BMA 081	21
BMA 090	0.2
BMA0120	0.4
BMA0200	5

(*) Estos valores fueron tomados y efectuados en el laboratorio de ----
Inmunología del Hospital General Centro Médico "La Raza". (31)

APENDICE "C"

SIGNIFICADO DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES

ANTICUERPO MONOCLONAL	SIGNIFICADO	TIPO DE INMUNOGLOBULINA
BMA 010 (*)	Pan - Leucocitos (leucocitos totales)	Ig G ₁
BMA 020	Ia DR	Ig G ₁
BMA 030	Pan-T linfocitos (leucocitos T totales)	Ig G _{2a}
BMA 040	Linfocitos T ayudadores	Ig G ₁
BMA 060	Timocitos corticales	Ig G _{2a}
BMA 090	Transferrin receptor	Ig G ₁
BMA120	Linfocitos B-asociados al antígeno	Ig G ₃

(*) Este anticuerpo monoclonal, sirve a su vez para comprobación de la técnica utilizada, ya que deben ser positivas prácticamente el total de las células.

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

BIBLIOGRAFIA.-

- 1.- FUNDENBERG H. et al.- "Inmunología Básica y Clínica". 4a Edición Editorial; El Manual Moderno S.A. de C.V. México 1983. Pag 471.
- 2.- TODD-Sandford.- "Diagnóstico Clínico por el Laboratorio". 6a. --- Edición. Salvat editores. Barcelona España. 1983. Pag. 247 - 295.
- 3.- GARCIA C. J. et al.- "Marcadores de superficie de linfocitos en -- Leucemia linfoblástica aguda en adultos". A. J. Clin. Pathol. 68: 543 - 546; --- 1977.
- 4.- HARVEY R. G. et al.- "Classification of Acute Leukemia". Annals of Internal Medicine 87: 740 - 753; 1977.
- 5.- BENNETT M. J. et al.- Proposals for the classification of the Acute Leukaemia". Br. J. of Hematology 33: 451 - 458; 1976.
- 6.- VILLEGAS A. et al.- "Leucemia aguda: consideraciones generales, - clasificación y manifestaciones clínicas". Medicine Tomo II, 18: 545 - 560; 1982
- 7.- MILLER R. D. et al.- "Prognostic Importance of Morphology (FAB --- Classification), in Childhood Acute Lymphoblastic Leukaemia (ALL)". Br. J. of --- Hematology 48: 199 - 206; 1980.
- 8.- BENNETT M. J. et al.- "The Morphological Classification of Acute - Lymphoblastic Leukaemia: Concordance among Observers and Clinical Correlations". Br. J. of Hematology 47: 553 - 561; 1981.
- 9.- FISHLEDER J. et al.- "Immunophenotypic Characterization of Acute - Leukemia by Immunocytology". Am. J. Clin. Pathol 81: 611 - 617; 1984.
- 10.- GORDON S. and Hubbard.- "Surface Membrane Characteristics and --- Cytochemistry of Abnormal Cells in Adult Acute Leukemia". Blood No. 4. 5: 681 - 691; 1978.
- 11.- FOUCAR K.- "Acute Leukemia: Part 1. Acute Lymphoblastic Leukemia" Laboratory Medicine No. 7 12: 404 - 409; 1981.
- 12.- MATHE G. et al.- "Subdivision of Classical Carities of Acute --- Leukemias: Correlation with Prognosis and Cure Expentancy". J. Clin. Biol. Res. 16: 554 - 560; 1971.
- 13.- MATHE G. et al.- "Classification and Subclassification of acute -- leukemias, Correlated with Clinical Expression, Therapeutic Sensitivity and Progno_{sis}". Cancer Research. 43: 6 - 20; 1973.

14.- NELSON A. D.- "Cytomorphological Diagnosis of the Acute Leukemia" Seminars in Oncology. No. 3 3: 201 - 208; 1976

15.- ANNER R. et al.- "prognostic Significance of Morphologic and --- Cytochemical Markers in Adult Acute Leukemia". Am. J. Clin Pathol. 69: 494 - 499 1978.

16.- CATOUSKY D.- "Cytochemical profile of B and T Lymphocytes with special reference to acute lymphoblastic leukemia". J. Clin. Pathol. 27: 767 - 771; 1974."

17.- SMYTH F. J. and Harrap R. K.- "Adenosine Deaminase Activity in -- Leukaemia". Br. J. Cancer 31: 544 - 549; 1975.

18.- JIMENEZ R. R. A.- "Los anticuerpos monoclonales en las investigaciones biomédicas". Rev. Cub. Hematol Inmyn. Hemot 1: 3 - 31; 1985.

19.- MILISTEIN C.- "Anticuerpos Monoclonales". Scientific American 243 (4): 66 - 74; 1980.

20.- THIEL E.- "#Monoclonal Antibodies Against Differentiation antigens of Lymphopoiesis". Blut 47: 247 - 261; 1983.

21.- UHRITZ E.- "Planches d'Hematologia". 2a. edición. Sandoz edito res Suiza 1972. Pag. 33 - 41.

22.- FLANDRIN G.- "Phosphatases Acides". Laboratoire d'Hematologie -- Hospital Saint Louis, Paris. 1982.

23.- NOEL R. R. y Friedman.- "Manual of Clinical Immunology". Editado por American Society for Microbiology. Washington D.C. EUA. 1976. Pag. 64 - 76

24.- MILISTEIN C.- "Continuos cultures of fused cells secreting anti-- body of predefined specificity". Nature 256: 495 - 497; 1975.

25.- LYPINSKY M y Herzenberg.- "Los Híbridos y sus aplicaciones". -- Nature 302: 352; 1980.

26.- LAROCHAR.C. et al.- "Correlación entre marcadores de membrana y marcadores citoquímicos en enfermedades proliferativas T agudas. Sangre 30: 741 751; 1983.

27.- THIEL E et al.- "Multimarker classification of acute lymphoblastic leukemia: evidence for further T subgroups and evaluation of their clinical - significance". Blood 56: 759; 1980.

28.- WEHINGER H et al.- "Cytochemical studies on T and B lymphocytes with special reference to acid phosphatase". Acta Hematol 56: 129; 1976.

- 29.- OHARY M. B. et al.- "Human Homologue of Murine T, 200 Glycoprotein"
J. Exp. Med. 152: 843; 1983.
- 30.- BEHRING INSTITUTE.- "Anticuerpos Monoclonales: Tinción de -----
inmunoperoxidasa; Realización de la prueba".- Manual de Técnicas. 1985. Pag. 21
a 26.
- 31.- ZAMORA L.- "Tesis: Determinación de Valores Normales para linfocitos
T y B mediante Anticuerpos Monoclonales". FES-Cuautitlán; Laboratorio de -----
Inmunología del Hospital General del Centro Médico "La Raza". 1986.
- 32.- BAUR J. D.- "Pruebas de función leucocitaria". Gradwohl's -----
Clinical Laboratory Methods and Diagnosis. Octava Edición. Volumen 1. The C. V. -
Mosby Company. USA. 1980. Pag. 727 - 762.
- 33.- SONNENWRITH A. C. et al.- "Metodos de Tinción de preparaciones de
sangre y médula ósea, in cluyendo citoquímicas". Octava Edición. Volumen 2. The
C. V. Mosby Company USA. 1980. Pag. 765 - 784.
- 34.- LEAVELL B. S.- "Hematología Clínica". 4a. Edición. Editorial --
Interamericana. México 1978. Pag 1 - 51.
- 35.- HAYHOE F. G. J.- "Haematological Cytochemistry". Churchill ---
Livingstone. USA. 1980.
- 36.- BOYUM A. S.- "Aislamiento de células Mononucleares". J. Lab. ---
Clin. Invest. 21: 77; 1968.
- 37.- LAMPSON L. A.- "Uso de Anticuerpos Monoclonales para identifica-
ción de antígenos de superficie celular por inmunofluorescencia". J. Immunol. --
125: 293; 1980.
- 38.- PINTADO C. T.- "Manifestaciones clínicas de los procesos linfopro-
liferativos de origen tímico". Sangre 6: 731 - 740; 1985.
- 39.- MARRACK P.- "The T-Cell and its Receptor; The cell plays a key --
role in the body's capacity to fight viral infection, but it also to reject grafted
tissue. Experiments have now identified the molecule that underlies this behavior"
Scientific American. 28 - 37; 1985.
- 40.- KENNETH A et al.- "Surface Markers on Leukemia and Lymphoma Cells
Recent Advances". J. of the American Society of Hematology. 60: 1 - 13; 1982.
- 41.- BERNACER B. M. et al.- "Leucemias Agudas Linfoblásticas". Medicine
8: 59 - 76; 1985.
- 42.- SACHS L.- "Growth, Differentiation and the Reversal of Malignancy"
Scientific American. 60: 20 - 37; 1986
- 43.- BEHRING INSTITUTE.- "Anticuerpos Monoclonales Behring (BMA), para

diferenciación de leucocitos, linfocitos y tinción de tejidos". Manual de Laboratorio. Pag. 1 - 28; 1986.

44.- VILLEGAS A. et al.- "Morfología y Citoquímica de la Leucemia Aguda". Sangre 26: 963 - 981; 1981.

45.- TORRES R. L.- Tesis de Posgrado: "Leucemia Linfoblástica Aguda en niños". Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina; Hospital de Pediatría: Centro Médico Nacional; IMSS. México 1986. Pag. 1 - 31.

46.- BEHRING INSTITUTE.- "Behring Monoclonal Antibodies (BMA) for the differentiation of B and T Lymphocytes as well monocytes, macrophages and granulocytes. Pag. 1 - 36; 1985.

47.- BLEYER A. W.- "Quimioterapia Oncológica en Lactantes y niños". -- Oncología Pediátrica 2: 591 - 604; 1985.

48.- BERNSTEIN I. et al.- "Inmunodiagnóstico e inmunoterapia del Cáncer en niños". Oncología Pediátrica 2: 607 - 624; 1985.

49.- POLACK D. G. - "Leucemia linfoblástica aguda en niños". Oncología Pediátrica 2: 701 - 725; 1985.

50.- KABAT E. A. y Mayer H. M.- "Inmunología Experimental". Primera Edición. Prensa Médica Mexicana. México 1964. Pag. 309 - 339.

51.- AGRUPACION MEXICANA PARA EL ESTUDIO DE LA HEMATOLOGIA.- "Curso teórico Práctico de Morfología de las células de la sangre periférica". Hospital de Especialidades del IMSS; Departamento de Hematología. México. 1983. Pag. 1 - 60.