



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

Hospital Infantil de México
"FEDERICO GOMEZ"

ESTUDIO MORFOLOGICO ESTRUCTURAL
DE LEUCEMIAS AGUDAS
EN SANGRE PERIFERICA Y MEDULA OSEA
METODO DE CONCENTRADO CELULAR

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS DE POSTGRADO

Especialidad: *Pediatría Médica*
DR. RODRIGO ORDAZ VERDE

DIRECTOR
DR. ROBERTO HERRERA GOEPFERT

México, D. F. 1985



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.

C O N T E N I D O

	Página
INTRODUCCION	
CONSIDERACIONES GENERALES	1
LEUCEMIAS LINFOBLASTICAS	10
LEUCEMIAS MIELOBLASTICAS	19
OTRAS LEUCEMIAS MENOS FRECUENTES EN PEDIATRIA..	23
MATERIAL Y METODOS	27
RESULTADOS	31
DISCUSION	54
CONCLUSIONES	59
BIBLIOGRAFIA	61

INTRODUCCION

CONSIDERACIONES GENERALES

En la especie humana, la mayor parte de los tejidos es tán constituidos por células bien diferenciadas que, en condiciones normales, muestran poca o ninguna evidencia de rege neración. Sin embargo, hay algunos que por características - propias de su función, sus células constituyentes proliferan y se diferencian continuamente: ejemplos de ello son la muco sa intestinal, y de hecho cualquier mucosa, la piel y el te jido linfo-hematopoyético.

Esta capacidad inherente a su propia naturaleza depende en buena medida de la existencia de un número relativamente pequeño de células aún no bien caracterizadas, a las que se les ha denominado células "madre" ó "tronco" (stem cell): cualquier alteración en ellas, o bien en sus mecanismos regu ladores, tiene por consecuencia la aparición de enfermedades graves y ciertos padecimientos que afectan al tejido hemato poyético parecen estar relacionados, de alguna u otra manera, con tales aspectos etio y fisiopatogénicos ¹⁻³.

Las leucemias constituyen un grupo heterogéneo de procesos neoplásicos que resultan de la proliferación exagerada e incontrolable de una determinada subpoblación hematopoyéti

ca, que infiltra órganos y sistemas de la economía y que de algún modo reflejan la detención en su maduración espontánea así como la pérdida de la respuesta a los mecanismos homeostáticos. Las células leucémicas son estructuras transformadas metabólicamente y morfológicamente, que deben interpretarse como desviaciones de su contraparte normal. Es probable que las células leucémicas constituyan una clona genéticamente aislada de la población normal de células tronco, que en su crecimiento incontrolado, termina por reemplazar a éstas y así alterar la función de la médula ósea. A medida que la enfermedad avanza, las células leucémicas invaden no sólo los órganos relacionados con la hematopoyesis fetal y/o adulta (médula ósea, hígado, bazo, ganglios linfáticos), sino que afecta cualquier tejido, inclusive los supuestamente menos accesibles como el sistema nervioso central y las gónadas. En términos generales, cuando se establece el diagnóstico, las leucemias son de hecho enfermedades neoplásicas generalizadas; las manifestaciones clínicas traducen por un lado, la invasión a distintos órganos o tejidos por las células leucémicas y, por el otro, la disfunción medular producida por el desplazamiento y sustitución del tejido hematopoyético normal.

No se conoce con certeza el origen de las leucemias, pero es conocido que las radiaciones ionizantes, la exposición prolongada a variados agentes químicos mielodepresores,

derivados del benzeno, antibióticos como cloranfenicol, pueden inducir padecimientos de tal naturaleza. La etiología viral, aunque muy probable, permanece controvertida. Diversos estudios se han realizado para apoyar esta última teoría y es así como el análisis ultraestructural ha demostrado, en las células de sangre periférica y médula ósea de pacientes leucémicos, partículas de aspecto viral. El hallazgo de una enzima específica - la transcriptasa - en algunos tejidos afectados, sugiere la presencia de un virus RNA oncogénico -- (oncornavirus)⁴⁻⁸. Así mismo, en el nivel ultraestructural se ha descrito reactividad específica con partículas virales (aglutinación) en sueros de pacientes con leucemias agudas - tipo T⁹⁻¹¹. Por otro lado, hay datos demostrativos de que pacientes con ciertas alteraciones cromosómicas, tienen con mayor frecuencia cuadros leucémicos: trisomía 21, trisomía 6, síndrome de Klinefelter, enfermedad de Fanconi, síndrome de Bloom, agammaglobulinemia congénita, ataxia telangiectasia, así como miembros de familias con antecedentes leucémicos y en gemelos univitelinos¹².

Las leucemias son más frecuentes en la edad pediátrica y corresponden aproximadamente al 40% de todos los procesos neoplásicos en individuos menores de 14 años; la gran mayoría de éstas son agudas (97% en la experiencia del Hospital Infantil de México "Federico Gómez")¹². La incidencia anual de casos nuevos, de acuerdo con diversos estudios, es alrede

dor de 4 por 100.000 niños menores de 14 años de edad 13-16.

Los síntomas y signos de los pacientes leucémicos se pueden agrupar en 4 síndromes:

- a.- Síndrome anémico: manifestado por palidez progresiva, astenia, adinamia, cefalea, fatiga fácil, taquicardia y soplos funcionales.
- b.- Síndrome febril prolongado: fiebre variable que usualmente es debida a la actividad tumoral ó a procesos infecciosos sobreagregados, que son muy frecuentes en este tipo de pacientes (de cada 10 de estos que presentan fiebre, se demuestra infección en la mitad de ellos).
- c.- Síndrome hemorrágico: equímosis, petequias, gingivorragia, epistaxis y sangrado en cualquier sitio del cuerpo.
- d.- Síndrome infiltrativo: debido a la acumulación de células leucémicas en cualquier región de la economía.

En la exploración física, hay palidez, petequias, equímosis, adenomegalias en más de 70% de los casos, hepato y/o esplenomegalia en el 50%, infiltración en glándulas salivales ó lagrimales, engrosamiento gingival, exoftalmos uni ó bilateral, nefromegalia, afección de los huesos del cráneo, crecimiento testicular y en ocasiones, invasión en sistema nervioso central, que puede manifestarse como un síndrome craneohipertensivo (con alteraciones citoquímicas y presencia de células neoplásicas en el líquido cefalorraquídeo) ó bien como síndrome de compresión medular¹⁷⁻²³.

Las leucemias agudas se clasifican en dos grandes gru-

pos: las linfoblásticas (LAL) y las mieloblásticas (LAM). - El primer grupo constituye el 82% de las formas agudas y el último el 18% restante. Las leucemias crónicas son muy raras en pediatría y la mayoría son de estirpe mielocítica. Los porcentajes de frecuencia general de acuerdo con varios - con varios autores se esquematiza en la Tabla I.

La clasificación de las leucemias se ha basado tradicionalmente en las características citológicas exhibidas cuando - se utilizan métodos tintoriales con los colorantes de Romanovsky (May-Grunwald, Wright, Giemsa), que han demostrado ser de menor utilidad en el reconocimiento de las variantes agudas, ya que éstas comparten entre sí características morfológicas - muy peculiares, que hacen difícil en un momento dado su distinción ó bien, ésta escapa insensiblemente a los métodos convencionales de diagnóstico cito e histopatológico. En 1976, - el grupo cooperativo French-American-British (FAB) propuso la clasificación a la fecha más aceptada internacionalmente de las leucemias agudas, fundamentada en el aspecto, forma, tamaño, características tintoriales y citoquímicas que mostraban las células neoplásicas y que supuestamente las hacía distintivas unas de otras ²⁶. De esta manera se formaron 2 grupos generales; a saber:

- A.- Leucemias de origen linfoide ó linfoblásticas en cuya categoría quedaron incluidos los subgrupos denominados, L 1, L 2 y L 3.
- B.- Leucemias de origen mieloide ó mieloblásticas, de las que

TABLA I

FRECUENCIA GENERAL DE LAS LEUCEMIAS AGUDAS EN LA EDAD PEDIATRICA

TIPO DE LEUCEMIA	PORCENTAJE
Leucemia Linfoblástica (LAL)	75,5%
Leucemia mieloblástica (LAM)	20,3%
Leucemia mieloide crónica	
Tipo Adulto	0,9%
Tipo Juvenil	3,3%
Total	100,0%

se reconocen 6 subgrupos: M 1, M 2, M 3, M 4, M 5 y M 6.

Aunque resulta una clasificación simplista y accesible, en la práctica hay casos - predominantemente del subgrupo M1 de las leucemias mieloides y las linfoides en general - cuya interpretación es difícil de realizar por las razones expuestas anteriormente.

Por lo tanto, el diagnóstico de las leucemias agudas requiere en muchas ocasiones de un estudio multidisciplinario - si el tipo de célula que predomina quiere ser establecido adecuadamente. En la actualidad, a pesar de la variedad de estudios disponibles, una proporción no despreciable de los casos eluden una definición precisa. Aunque la experiencia y los recursos técnicos en un laboratorio limitan la utilidad de una prueba, es evidente que existen subpoblaciones celulares de las cuales no tenemos a la mano un método lo suficientemente elaborado para clasificarlas con precisión. El tratamiento actual requiere que las diferentes estirpes celulares sean designadas adecuadamente pues esta información brinda - datos valiosos no sólo sobre la sensibilidad a la estrategia terapéutica inicial, sino también de la resistencia a determinados medicamentos, a la aparición de nuevas subpoblaciones y a la coexistencia de alteraciones en otras poblaciones celulares neoplásicas²⁷.

La mayoría de los estudios realizados con técnicas tincionales, citoquímicas, marcadores inmunológicos, marcadores

bioquímicos, etc. han demostrado que existen células tan indiferenciadas que dejan dudas acerca de su línea celular de origen. Así, al utilizar métodos tintoriales y citoquímicos según la FAB, de un 10 a 20% de las leucemias son indiferenciadas y dependiendo del observador, de la calidad de los extendidos y de las características clínicas del paciente evaluado, se clasifican erróneamente otra parte de estos padecimientos²⁶; con la técnica de marcadores de superficie en linfocitos, existe un porcentaje similar de leucemias indiferenciadas.

el estudio ultraestructural es entonces un instrumento útil y de gran valor en la caracterización de tales grupos ya que, mediante la apreciación acuciosa de los componentes anatómicos en cada categoría individual, es posible obtener información detallada que permite, con mayor precisión, orientar diagnósticos y establecer criterios morfológicos que facilitan su identificación. Tales elementos estructurales corresponden a la forma y tamaño de las células, del núcleo, la presencia ó no de nucleolo, glucógeno, vacuolas, gránulos intracitoplasmáticos y la proporción y distribución de otros organelos.

Antes de la aplicación de la microscopía electrónica como método auxiliar en el diagnóstico de estos padecimientos, la mayoría de los autores reportaron de un 10 a 20% de casos de leucemias no-mieloblásticas no clasificables²⁸⁻²⁹. Al emplear marcadores específicos (peroxidasa) en microscopía e-

electrónico de transmisión, de acuerdo con Marie y cols³⁰, el porcentaje de las llamadas leucemias indiferenciadas disminuye hasta el 2,7%. En un estudio reciente, Janossy y cols llevaron a cabo una comparación multiparamétrica con marcadores inmunológicos y deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT), observaron que el 7.3% de las leucemias linfoblásticas no podían ser clasificadas³¹. Mettelsman y cols refieren un 4% de leucemias indiferenciadas. La determinación de actividad de peroxidasa mediante microscopía electrónica de transmisión permite hacer una distinción más objetiva de estos padecimientos. La excelente preservación de la estructura celular que se logra con las técnicas empleadas para microscopía electrónica, explica las diferencias en los resultados obtenidos con microscopía de luz y electrónica.

Un estudio realizado por Dvorak y cols²⁷, la determinación de marcadores bioquímicos con microscopía electrónica de transmisión (tanto para LAL como para LAM), demostró que generalmente es posible hacer el diagnóstico correcto al interpretar en forma adecuada la morfología de las células neoplásicas.

La microscopía electrónica de barrido (MEB) permite analizar detalladamente las características morfológicas de la superficie celular. La hematología fué probablemente uno de los primeros campos biomédicos en donde se introdujo esta metodología y se ha convertido en una de las herramientas más

útiles para el estudio de los padecimientos hematológicos.--

Antes de los ensayos de Hattori y cols³², quienes aplicaron la desecación de punto crítico en las células sanguíneas, los resultados eran contradictorios cuando se estudiaban los leucocitos circulantes y no se había podido definir la imágen característica de sus superficies ya que, estas células son sumamente volubles y varían fácilmente con el manejo técnico utilizado. Por otro lado presentan diferencias sustanciales condicionadas por el estado fisiológico en que se encuentren, ya sea en forma activa ó inactiva³³. En la actualidad, es posible diferenciar en condiciones ideales, todos los tipos de leucocitos por la cantidad, longitud y característica de las microvellosidades ó urópodos que presentan³⁴⁻³⁵. En el campo patológico la controversia persiste y los diferentes autores que se han enfrentado a este problema no han hallado, hasta el presente, las células típicas para asegurar a que línea pertenece una célula neoplásica estudiada; sin embargo, se han logrado avances importantes y el futuro de este método es prometedor.

LEUCEMIAS LINFOBLASTICAS (LAL)

En esta categoría se incluyeron 3 subgrupos cuyas características morfológicas se resumen en la Tabla II. Desde el punto de vista citoquímico, los linfoblastos son células que no muestran reactividad con peroxidasa ni estearasa y no se tñen con Sudan negro B ni con ácido periódico de Schiff. De

TABLA II

CLASIFICACION CITOMORFOLOGICA DE LAS LAL (FAB)*

CARACTERISTICAS CITOLOGICAS	L 1	L 2	L 3
TAMANO CELULAR	Predominio células pequeñas	Grande, heterogéneo	Grande, homogéneo
CROMATINA NUCLEAR	Homogénea en cada caso	Variable, heterogénea en cada caso	Homogénea, finamente punteada
NUCLEO	Regular, hendiduras ó indentaciones ocasionales	Irregular, frecuentes indentaciones, hendiduras en cada caso	Regular, oval ó redondo
NUCLEOLO	No visible ó uno pequeño	Uno ó más, a menudo grandes	Uno ó más nucleolos vesiculares prominentes
CITOPLASMA	Escaso	Variable, a menudo moderadamente abundante	Moderadamente abundante
BASOFILIA CITOPIASMICA	Ligera a moderada	Variable, intensa en algunos casos	Muy intensa
VACUOLAS CITOPIASMICAS	Variabes	Variabes	Prominentes a menudo

* Bennet JM, Catovsky D, Daniel MT and Sultan C: Proposals for the classification of the acute leukemias. Br J Haematol 33:451, 1976

los 3 subgrupos citados el más frecuente es el tipo L 1 y el menos frecuente el L 3³⁶.

Recientemente, se ha utilizado una clasificación basada en la presencia de marcadores inmunológicos que permiten no sólo reconocer el origen de las células blásticas en muchos de los casos, sino que además orienta esquema quimioterapéuticos específicos. Los marcadores más utilizados para la clasificación de subpoblaciones de células neoplásicas en las LAL son la determinación de inmunoglobulinas y antígenos específicos de superficie (B y T), que pueden complementarse con la prueba de rosetas con eritrocitos de carnero. También se ha desarrollado un nuevo antisuero - el antígeno humano - para linfocitos T (HuTLA) - y además se ha demostrado la presencia de una glucoproteína común a la mayoría de LAL que no portan antígenos específicos (no-T y no-B), así como las células de la leucemia mieloide crónica (LMC) en crisis blástica; este antígeno se ha denominado antígeno común de LAL -- (cALLA). El significado de cALLA no se ha esclarecido aún, pero su presencia en algunas LAL menos diferenciadas (Pre-B) sugiere que está involucrado en la diferenciación de células B^{28,30,37,38}. La clasificación de las LAL, según los marcadores inmunológicos, se esquematiza en la Tabla III.

Otra metodología utilizada es aquella que determina -- marcadores bioquímicos, cuyo representante más empleado es la deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT). Esta enzima-

TABLA III

CLASIFICACION DE LAS LAL (MARCADORES INMUNOLOGICOS)*

SUBGRUPOS	FENOTIPO INMUNOLOGICO				FRECUENCIA EN NIÑOS (%)
	anti-cALL	anti-T	rosetas E	SM Ig	
1. LAL "común"	+	+	-	-	70 - 75
2. LAL tipo T	-	+	+	-	12 - 18
3. LAL pre-T	+	+	-	-	5 - 10
4. LAL tipo B	-	-	-	+	1 - 4
5. LAL pre-B	+	-	-	+	1 - 4
6. LAL "nula" 6 indiferenciada	-	-	-	-	4 - 12

* Thiel E, Rodt H, Huhn D et al: Multimarker classification of acute lymphoblastic leukemia: Evidence for further T groups and evaluation of their clinical significance. Blood 56(5):759-772, 1980

es una proteína intracelular característica de ciertos linfocitos primitivos encontrados en el timo normal y en la médula ósea; puede ser detectada por enzimático ó tinción inmunoquímica, valores elevados de ésta se encuentran en los blastos de las LAL, inclusive las LAL comunes, de células T y de algunas pre-B; este hallazgo quizás sugiere una vía común de diferenciación^{31,39-44}.

El estudio de isoenzimas de la hexoaminidasa tiene valor para definir el origen linfoblástico en los casos dudosos; finalmente una reacción focal intensamente positiva con la tinción citoquímica para fosfatasa, es característica de las células T⁴⁵.

Los resultados satisfactorios que actualmente se obtienen en el tratamiento de este tipo de leucemias, cabe atribuirlo a dos factores: en primer lugar, a las propiedades biológicas de estas neoplasias que le confieren una mayor sensibilidad a los fármacos citostáticos; en segundo lugar, los progresos en los métodos de tratamiento desarrollados en virtud de una serie de estudios llevados a cabo cuidadosamente, que en forma progresiva han ido delineando la estrategia más adecuada. El esquema de tratamiento básico de las LAL se resume en la Tabla IV⁴⁶⁻⁵⁴. La efectividad del tratamiento en una serie arbitraria de niños afectados de LAL podría resumirse así:

- 1.- El 95% de los pacientes que inician el tratamiento tienen una remisión completa en el curso de 4 a 5 semanas.

TABLA IV
TRATAMIENTO BASICO DE LAS LAL EN NIÑOS

1. INDUCCION DE LA REMISION

Prednisona, vincristina, doxorubicina, + L-asparaginasa

2. PREVENCIÓN DE LEUCEMIA EN SNC

Quimioterapia intratecal con metotrexate, + doxorubicina ó
L-asparaginasa. Radioterapia craneal.

3. TERAPIA DE MANTENIMIENTO

Poliqumioterapia con 6-mercaptopurina (6-MP) y metotrexate.
Reinducciones.

4. SUSPENSIÓN DEL TRATAMIENTO

Después de 30 a 60 meses de la remisión completa sin recaídas

- 2.- En 60% de ellos se mantiene el estado de remisión a lo largo del período de tratamiento.
- 3.- Tres de cada cuatro pacientes en quienes se suprime el tratamiento a los 36 meses, continúan en remisión 4 años después.
- 4.- En consecuencia, 40% de los niños que hayan recibido--tratamiento correcto en los últimos 10 años, tienen--grandes posibilidades de haber curado de su enfermedad inicial^{51,55,56}.

La aparición de una recaída medular ó extramedular en el curso de la quimioterapia de mantenimiento, constituye en la actualidad el problema más importante al que se enfrenta el médico e implica el fracaso del tratamiento ó la aparición de resistencia al mismo⁵⁷⁻⁶¹. Se han realizado muchos esfuerzos para tratar de identificar los casos de LAL que corren mayor riesgo de recidiva. Los factores pronósticos iniciales se esquematizan en la Tabla V^{28,62-66}.

En los últimos años, se han diseñado, quizás en forma empírica, esquemas de tratamiento para pacientes clasificados de alto riesgo, en un intento por obtener mejores resultados con un manejo básico común a todos los pacientes. La mejor definición de los grupos de riesgo elevado y los resultados positivos que se deriven de los ensayos en curso contribuirá probablemente a mejorar los resultados obtenidos en este grupo de pacientes. Por otro lado, se estudian los efectos de nuevas drogas antineoplásicas entre las que podemos citar: el Cis-diaminodicloroplatinum (Cis

TABLA V

FACTORES PRONOSTICOS INICIALES EN LAS LAL INFANTILES

FACTORES	FAVORABLE	DESFAVORABLE
1. Edad	2 a 7 años	Menor de 1 año Mayor de 12 años
2. Sexo*	Femenino	Masculino
3. Masa Tumoral		
- Blastemia	Menor de $10 \times 10^9/L$	Mayor de $10 \times 10^9/L$
- Infiltración al SNC	Ausente	Presente
- Tumor mediastinal	Ausente	Presente
- Adenomegalias	Ausentes	Presentes
- Visceromegalias	Ausentes	Presentes
- Otros infiltrados	Ausentes	Presentes
4. Cantidad de Leucocitos en sangre periférica	Menos de 100.000/mm ³	Mayor de 100.000/mm ³
5. Marcadores inmunológicos	LAL "común"	LAL tipo T ó B
6. Respuesta al tratamiento de inducción	M 1 en 3ra semana	M 3 en 3ra semana

* de influencia en recaídas posteriores a la supresión SNC; Sistema nervioso central

platinum), que es un agente antitumoral de amplio espectro en ciertas neoplasias humanas⁶⁷⁻⁶⁸. Los citotóxicos derivados de las podofilotoxinas, VM-26 y VMP 16-213, han demostrado ser de utilidad⁶⁹. Recientemente se está comercializando el Mitoxantrone que muestra en estudios preliminares ser menos cardiotoxico que los antibióticos antraciclínicos (danaurubicina y doxorubicina)⁷⁰⁻⁷³. Nuevas drogas que merecen mención son: la deoxicoformina, potente inhibidor de la adenosindeaminasa, que parece poseer gran acción citorreductora en los casos de LAL tipo T⁷⁴⁻⁷⁵; la amsacrina es derivado sintético de la aminoacridina y actúa inhibiendo la síntesis de ADN (agente prometedor en el tratamiento de las LAM)⁷⁶. A pesar de su carácter aún experimental, el trasplante de médula ósea debe considerarse como alternativa válida para el tratamiento de aquellos pacientes, -- en quienes es previsible una mala evolución, siempre que exista un donante histocompatible y un centro capacitado para llevarla a cabo⁷⁷. La inmunoterapia, que hizo concebir esperanzas hace poco más de una década, no ha proporcionado con todas las modalidades empleadas, los resultados deseados⁷⁸. Quizás el avance en el desarrollo sobre las técnicas de producción de anticuerpos monoclonales, permita que la terapéutica sérica de las leucemias, alcance mayor interés en los próximos años.

La duración del tratamiento ha variado a través de los años. Actualmente se considera que un paciente sin re-

caídas después de un tratamiento correcto, debe ser manejado durante 3 a 4 años consecutivos. Nesbit y cols, realizaron un estudio selectivo sobre resultados de la quimioterapia en LAL y encontraron que el porcentaje de recaídas era similar entre los que recibieron 3 años y 5 años de terapia continua⁷⁹. La supresión del tratamiento en una serie de pacientes, después de 30 a 36 meses de remisión continua, fué seguido de recaídas en el 26% de los casos a lo largo de los 4 años siguientes; transcurrido este período las recaídas fueron raras⁸⁰.

Es frecuente que se desarrollen neoplasias secundarias en este tipo de pacientes, se conocen casos de leucemias mieloides crónicas, leucemias mielomonocíticas y leucemias agudas mieloides, que aparecen de nuevo en pacientes afectados inicialmente de LAL, tras períodos prolongados de remisión completa⁸¹⁻⁸⁴.

LEUCEMIAS MIELOBLÁSTICAS (LAM)

El pronóstico actual en este grupo de leucemias es aún sombrío en todas sus variedades y en cualquier edad. Si bien han mejorado las tasas de remisión obtenidas, no se han conseguido avances notorios en lo que respecta a sobrevivencia. Las remisiones se describen en diversas series entre el 70% y 80%, pero tan sólo de un 25% a 33% se mantienen en remisión total por más de 26 meses, la mortalidad sobrepasa el 60%⁸⁵⁻⁸⁷.

Hacer el diagnóstico preciso del subtipo de LAM es-

importante ya que a pesar de que todas tienen igual pronóstico y reciben esquemas de tratamiento semejantes, -- leucemias como la promiélocítica, tienen mayor riesgo de sangrado y CID durante el inicio de la terapia.

La FAB ha clasificado a las LAM en 6 subtipos bien definidos, de acuerdo al grado de diferenciación y maduración de dichas células. Así, M 1, M 2 y M 3 muestran predominantemente diferenciación granulocítica; se distinguen entre ellas por el grado y la naturaleza de su maduración. M 4 muestra diferenciación tanto granulocítica como monocítica, M 5 diferenciación predominantemente monocítica y M6 diferenciación eritroblástica. Tabla VI. En ellas, son positivas las reacciones de mieloperoxidasa, esterase, Sudan negro B y P.A.S.

Las combinaciones quimioterápicas utilizadas para el tratamiento de las LAM en niños son iguales a las del adulto, e incluyen al menos dos de los fármacos más activos: citarabina, doxorubicina y tioguanina. Los esquemas más frecuentemente empleados se resumen en la Tabla VII ⁸⁸⁻⁹⁰. En el Hospital Infantil de México se empleaba el Mini- COAP, que consistía en la asociación de ciclofosfamida, vincristina, citosina arabinósido y prednisona. El esquema terapéutico actual se resume en la tabla anterior ⁸⁷; no se ha demostrado superioridad de un régimen sobre los demás. Un problema considerable, es el período tan prolongado de riesgo que tienen éstos pacientes para adquirir infecciones graves, a las que están ex

TABLA VI
 CLASIFICACION CITOMORFOLOGICA DE LAS LAM (FAB)*

CARACTERISTICAS CITOLOGICAS	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5	M 6
DIFERENCIACION	Granulocítica	Granulocítica	Granulocítica	Granulocítica Monocítica	Monocítica	Predominantemen- te eritrocítica
MADURACION	Ausente	Mieloblastos y promielocitos (eosinófi- los, basófilos neutrófilos)	Promielocitos anormales	Promonocitos Monocitos Promielocitos Mieloblastos Promieloblas- tos	Monoblas- tos, promo- nocitos y Monocitos	Eritroblastos Mieloblastos Promielocitos Megacariocitos anormales
NUCLEO	Regular, re- dondo u oval de	Bilobulado ó reniforme	Bilobulado, reniforme, va- riable tamaño y forma	Variable de a cuerdo a tipo celular	Reniforme cerebrifor- me	VARIABLE DE
NUCLEOLO	Uno ó más	Prezente a menudo	Variable	Variable	Aperente, vesiculososo	ACUERDO
CITOPLASMA	Variable	Variable	Moderado a abundante	Variable	Abundante	AL TIPO
GRANULOS	Azurofílicos y/o bastones de Auer, oca- sionales	Azurofílicos abundantes Bastones de Auer (1) fre- cuente	Abundantes grandes, con- fluentes Bastones de Auer en acú- mulos	Azurofílicos presentes en ambos tipos celulares	Azurofíli- cos escasos	CELULAR

* Bennet JM, Catovsky D, Daniel MT and Sultan C: Proposals for the classification of the acute leukemias
 Br J Haematol 33:451, 1976

TABLA VII.
QUIMIOTERAPIA DE INDUCCION EN LAM

INDUCCION	% REMISION	REFERENCIA
CIT 100 mg/m ² /12h		
TG 75 mg/m ² /12h	74	88
DNR 30 mg/m ² /día x 2 días		
PRED 60 mg/m ² /día x 22 días		
VCR 2 mg/m ² cada 7 días x 4 dosis		
CIT 120 mg/m ² /día x 4, cada 15 días 2 dosis	75	*
ADR 30 mg/m ² /día 1° y 15° días		
ADR 45 mg/m ² /día x 3 días		
VCR 2 mg/m ² /dosis semanal x 4	88	89
CIT 100 mg/m ² /día x 7 días		

CIT: citosina arabinósido, TG: tioguanina, DNR: danaurribicina,
PRED: prednisona, VCR: vincristina, ADR: adriamicina (doxorubicina)

* Silva-Sosa M: comunicación personal

puestos predominantemente durante la fase de inducción al tratamiento, debido, a la aplasia medular producida.

En vista de los resultados poco satisfactorios que se han obtenido con la quimioterapia de mantenimiento, existe para aquellos pacientes que han alcanzado remisión inicial completa, la posibilidad del trasplante de médula ósea de un donante histocompatible; y este es un procedimiento que debe ser realizado en Centros que reúnan las características y condiciones adecuadas para llevarlo a cabo.

OTRAS LEUCEMIAS POCO FRECUENTES EN PEDIATRÍA

Las leucemias mieloides crónicas (LMC) en conjunto constituyen del 3% al 5% del total de las leucemias en el niño (ver Tabla I) y la mayoría de los casos corresponden a la variedad juvenil. En este tipo, la edad de los pacientes es menor, en relación a la de tipo adulto; hay ausencia del cromosoma Philadelphia (Ph^+), presencia de eritrocitos con características morfológicas fetales, inicio temprano de trombocitopenia grave y evolución más corta. De acuerdo con estudios en cultivos celulares, la LMC de tipo juvenil correspondería a una panmielopatía, con predominio de la línea monocítica, en tanto que la del tipo adulto sería fundamentalmente granulocítica^{26,90}. No se conoce ninguna terapia efectiva para LMC tipo juvenil y cuando los pacientes desarrollan crisis blásticas, lo cual ocurre en forma inexorable y en periodos variables, el-

control de esta transformación aguda es difícil, lo mismo que la prolongación de la vida.

Los síndromes dismielopoyéticos son alteraciones de las células precursoras hematopoyéticas, caracterizados-- por defectos cualitativos y cuantitativos en la hematopoyésis y que afectan a las 3 líneas celulares. Es notable la discrepancia entre una médula ósea aparentemente celular y la pancitopenia periférica que presentan estos pacientes. Distinguir las mielodisplasias de las leucemias agudas resulta algunas veces difícil, ya que puede haber células paramieloides (in vitro, estudios en cultivos sugieren que existe una célula "madre" común para las series mieloide y monocitoide) que tienen características citoplasmáticas y nucleares que identifican a las mismas. Las células eritroides pueden mostrar cambios megaloblásticos y diseritropoyésis: los megacariocitos pueden estar disminuidos en número, ser agranulares y anormalmente pequeños. Se han descrito granulocitos con granulacion defectuosa y núcleos doblados irregularmente²⁶. En pacientes con leucemia crónica mielomonocítica (LCMM), se ha descrito la presencia de células con propiedades tintoriales ambiguas, tanto para estearasa de cloracetato-- (un marcador mieloide) como para alfa-naftil-butirato estearasa (un marcador monocítico), aún en la misma célula⁹¹.

Anteriormente, se reconocían 2 grandes grupos de padecimientos dismielopoyéticos, ambos más comunes sobre--

los 50 años: la anemia refractaria con exceso de blastos (AREB) y la leucemia mielomonocítica crónica (LMMC). Esta última se diferencia de la primera por la presencia de un componente monocítico prominente en médula ósea y sangre periférica (generalmente monocitos atípicos 1×10^9 en sangre periférica). La clasificación actual de los padecimientos displásicos se resumen en la Tabla VIII Se ha observado que la pancitopenia y/o trombocitopenia progresan a leucemia aguda en un lapso aproximado de 60,4--meses, después del diagnóstico clínico inicial⁹¹⁻⁹². La AREB se caracteriza por anemia (Hb- 10g/dl), granulocitopenia, trombocitopenia e incremento de mieloblastos en médula ósea; este síndrome también ha sido llamado preleucémico ó leucemia aguda latente. En ambos padecimientos la terapia citóxica agresiva no ha mostrado efectos benéficos. . .

Los linfomas con transformación leucémica engloban las formas No Hodgkin (60% de frecuencia) y Hodgkin (ocasionalmente). La relación exacta entre las leucemias y los linfomas todavía no es bien conocido y su distinción, cuando existe afección en médula ósea es a menudo arbitraria⁹³⁻⁹⁵.

TABLA VIII

CLASIFICACION DE LOS SINDROMES DISMIELOPOYETICOS*

MIELODISPLASIA IDIOPATICA

MEDULA CELULAR

- Anemia refractaria: 1% de blastos en sangre periférica, 5% de blastos en médula ósea
- Anemia refractaria con sideroblastos: 1% de blastos en sangre periférica, 5% en médula ósea
- Anemia refractaria con exceso de blastos: 5% de blastos en sangre periférica, 5-20% en médula ósea
- Anemia refractaria con exceso de blastos en transformación: 5% en sangre periférica, 30% en médula ósea
- Leucemia mielomonocítica crónica

MEDULA OSEA HIPOCELULAR (Hemoglobinuria paroxística nocturna)

SECUNDARIOS

Relacionados con terapia (quimioterapia, radiación)

Síndromes de deficiencia vitamínica (B12, B6)

Efectos secundarios a drogas (antifímicos, cloranfenicol)

Efectos secundarios a tóxicos (plomo)

Exposición a agentes químicos (benzeno)

*Degnan T, Weiselberg L, Schuman PH and Budman DR: Dysmyelopoietic syndrome. Am J Med 76: 122-128, 1984

M A T E R I A L Y M E T O D O S

SELECCIÓN DE PACIENTES. Los pacientes incluidos en el estudio fueron seleccionados del Servicio de Oncología del Hospital--Infantil de México "Federico Gómez"; fueron individuos que asistían por primera vez a consulta y que no habían recibido--tratamiento alguno.

CONCENTRADO CELULAR. De cada paciente se obtuvieron 5 ml de--sangre periférica por venopunción, que se mezcló inmediatamente con 30 UI de heparina sódica por cada ml de sangre (total: 150 UI) en un tubo de ensayo. El tubo se colocó en ángulo de 45° y se dejó que la sangre sedimentara a temperatura ambiente--durante una (1) hora. Posteriormente se centrifugó por 10 minutos a 2.000 r.p.m. El plasma sobrenadante se decantó con una--pipeta Pasteur (se procuró dejar de 2 a 3 mm de espesor de la--capa de plaquetas para evitar el enturbiamiento del concentrado celular propiamente dicho). Se añadió fijador de glutafor--mol al 2.5% con pH 7.2⁹⁶ a goteo por las paredes del tubo,---hasta reemplazar la cantidad de plasma retirado y se permitió--que las células se fijaran durante 30 minutos a la temperatura de la habitación. Pasado este lapso, fueron lavados con buffer de fosfatos al 0.1 M con pH 7.4 durante toda una noche; se introdujo una asa de alambre en forma de L hasta 2 ó 3 mm del es--pesor de la capa roja, para después girarla cuidadosamente al--rededor de las paredes del tubo y de esta manera extraer el---concentrado celular (buffy coat). Este fué depositado sobre u-

na placa de cera de dentista y se orientó de tal manera que la capa de células rojas quedara hacia abajo y la superficie en contacto con el plasma hacia arriba. En este sentido, se hicieron cortes longitudinales de 1 mm aproximadamente, con una navaja para rasurar. Fueron entonces fijados nuevamente con glutaraldehído al 2.5% en buffer de cacodilatos al 0.067 M con pH 7.4 por 30 minutos adicionales. Se realizó un nuevo lavado generoso con buffer de cacodilatos, con dos cambios de 15 minutos cada uno. Tanto el fijador como el amortiguador se conservaron a una temperatura de 4°C. Finalmente, las muestras se posfijaron en tetraóxido de osmio al 1% durante 10 minutos y se deshidrataron en alcoholes de concentración crecientes.

ASPIRADO DE MEDULA OSEA DE CRESTA ILIACA. Mediante punción directa con trocar se obtuvo material de médula ósea en cantidad de 1.5 a 2 ml aproximadamente que fué colocado por goteo sobre portaobjetos realizándose un extendido. Se desecaron al aire y se tiñeron con colorante de Wright, para después ser observados con microscopio de luz. El resto de la muestra se mezcló en un tubo de ensayo con heparina y se procesó para estudio ultraestructural de manera semejante a la descrita en el inciso anterior.

OBTENCION DE CORTES SEMIFINOS: Una parte del espécimen obtenido se incluyó en resina dura y se practicaron cortes semifinos de una micra de espesor con un ultramicrotomo MT-11 y con cuchillas de vidrio del N°40. Los niveles fueron colocados sobre portaobjetos y teñidos con azul de Toluidina. Se observaron con el microscopio de luz, con el objeto de seleccionar las zo

nas adecuadas para cortes finos. Se procesaron tanto muestras de sangre periférica como de médula ósea.

OBTENCION DE CORTES FINOS PARA MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION. Luego de seleccionar en los cortes semifinos las áreas ideales, se realizaron cortes finos con cuchillas de vidrio N°40 en el mismo tipo de ultramicrotomo (MT-11). Los cortes se tiñeron entonces con citrato de plomo y acetato de uranio y se montaron en rejillas de cobre de 400 mesh, para ser observados finalmente en un microscopio electrónico modelo EM 10C de Karl Zeiss.

OBTENCION DE BLOQUES PARA MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO. Una parte de la muestra, luego de ser posfijada, se lavó por dos veces en buffer de cacodilatos durante un lapso de 5 minutos cada uno; se lavó de nuevo con agua destilada durante 5 minutos y finalmente se deshidrató con alcoholes a concentración progresivamente mayor (70%, 80%, 96% y absoluto). Posteriormente, fueron desecadas una parte de las mismas muestras al aire y otras en un desecador de punto crítico marca Technics (Critical Point Apparatus II). Se montaron en portamuestras de latón ó bronce con grafito coloidal y fueron recubiertas con oro (capa de 15 a 20 nm) en un Ion Sputter Jeol Fine-Coat modelo JFC-1100. Se mantuvieron en desecación con carbonato de calcio hasta su observación en un microscopio electrónico de barrido Jeol-JSM- 35C a 15 Kv, a una distancia de trabajo de 15 mm y a 0° de inclinación. Las fotografías se obtuvieron con películas Tri-X-Pan 120.

HISTORIA CLINICA. En cada caso se revisó el expediente clínico con el fin de obtener la información pertinente respecto a los antecedentes de importancia, tiempo de evolución, síntomas y signos que caracterizaban el padecimiento y resultados de laboratorio, determinándose finalmente la evolución al mes de iniciado el tratamiento.

R E S U L T A D O S

DATOS CLINICOS

En el periodo de tiempo comprendido entre Julio y Diciembre de 1.984, se estudiaron 16 casos de pacientes con diagnóstico clínico de leucemia. Uno de los casos fué referido como consulta al Departamento de Patología del Hospital Infantil de México "Federico Gómez". El resto provenía del Servicio de Oncología del mencionado Centro y sus edades variaban entre 2 y 14 años. De el caso referido a Patología se desconoce, excepto el sexo (femenino), cualquier información clínica. El 56.2% de éstos casos eran de el sexo femenino y el 43.7% del sexo masculino. En la mayoría de los casos el tiempo de evolución del padecimiento osciló entre 2 y 6 meses (Tabla IX). Los síntomas que predominaron fueron ataque al estado general, palidez, fiebre y pérdida de peso (Tabla X). En la exploración física, el 100% de los pacientes tenía palidez, el 86.6% adenomegalia, el 73.3% hepatomegalia y el 66.6% esplenomegalia (Tabla XI). Las cifras de hemoglobina, a excepción de uno de uno de los casos, estaban por debajo de los límites normales para la edad pediátrica. El 60% de los pacientes mostraron leucocitosis superior a 12.000/mm³ y en 86.6% mostraron trombocitopenia. El estudio de los frotis de sangre periférica re

TABLA IX
LEUCEMIAS AGUDAS. CUADRO CLINICO I

Nº CASO	SEXO		EDAD			TIEMPO DE EVOLUCION		
	M	F	Menor 2a	2 a 11	mayor 12a	menor 1 mes	2 a 6m	mayor 6m
1	+			+				+
2		+		+				+
3		+		+				+
4		+		+				+
5	+				+			+
6		+		+				+
7	+			+			+	
8		+		+				+
9		+			+			+
10		+		+				+
11	+			+				+
12		+		+				+
13	+			+			+	
14	+			+				+
15		+			+			+
16 *	+		-	-	-	-	-	-
TOTALES	7	9		12	3	2	13	
	(43.7%)	(56.2%)		(80%)	(20%)	(13.4%)	(86.6%)	

TABLA X
 LEUCEMIAS AGUDAS. SINTOMAS Y SIGNOS. CUADRO CLINICO 2

Nº CASO	PALIDEZ	PIEBRE	PERDIDA DE PESO	DOLOR OSEO	SANGRADO	ATAQUE AL ESTADO GENERAL
1	+	+		+		+
2	+	+	+			+
3	+	+	+			+
4	+	+			+	+
5		+			+	+
6	+	+	+		+	+
7		+		+		
8	+		+			+
9		+	+			+
10	+		+	+		
11		+		+		+
12	+	+				
13					+	
14	+	+	+		+	+
15	+		+		+	+
16*	-	-	-	-	-	-
	10(66,6%)	10(66,6%)	8(53,3%)	4(26,6%)	5(33,3%)	11(73,3%)

* caso referido al Dpto. de Patología del HIM "Federico Gómez". Porcentajes en base a 15 casos.

TABLA XI
 LEUCEMIAS AGUDAS, EXPLORACION FISICA. CUADRO CLINICO 3

Nº CASO	ADENOMEGALIA	SOPLO FUNCIONAL	HEPATOMEGALIA	ESPLENOMEGALIA	PALIDEZ	INFILTRACION TUMORAL
1	+		+		+	
2	+	+	+	+	+	
3	+		+	+	+	+
4		+	+	+	+	
5	+	+	+	+	+	
6	+	+	+	+	+	
7	+		+		+	
8	+	+	+	+	+	
9	+			+	+	+
10					+	
11	+	+	+	+	+	
12	+		+	+	+	
13	+				+	
14	+		+	+	+	
15	+				+	
16*	-	-	-	-	-	
	13(86.6%)	6(40%)	11(73,3%)	10(66.6%)	15(100%)	2 (13.3%)

*Caso referido al Dpto de Patología del HIM "Federico Gómez". Porcentajes en base a 15 casos.

veló la presencia de blastos en el 66.6% de los casos. Los diagnósticos clínicos se basaron en los hallazgos morfológicos y citofímicos (mieloperoxidasa) encontrados en el análisis de los extendidos de médula ósea de crestas ilíacas. En 14 pacientes-- se hizo el diagnóstico de LAL y en uno (1) de LAM (Tabla XII). Los diagnósticos se basaron en los criterios propuestos por la FAB (figuras 1-6). En 12 de los pacientes (80%) pudo ser determinada la evolución al mes de iniciado el tratamiento (Tabla-- XIII). Es importante señalar que uno de ellos presentaba síndrome de Down.

HALLAZGOS ULTRAESTRUCTURALES

El marco de referencia utilizado en la caracterización y clasificación ultraestructural, tanto con microscopía electrónica de transmisión como de barrido, de las diferentes líneas-- celulares observadas está apoyado en las descripciones originales de azar⁹⁷ y Dvorak y cols.²⁷ y en las de Hattori³² y Lin y cols.³³ respectivamente.

Se estableció una correlación estrecha y apegada a los parámetros citomorfológicos propuestos por el grupo cooperativo FAB y de ésta manera, en cada caso, fué posible definir la-- naturaleza de la estirpe celular proliferante.

En tres de los pacientes sólo se obtuvieron muestras de-- sangre periférica, en una de las cuales no había material representativo (caso N°2) por lo que no se consideró en el estudio ultraestructural. En otro más, se obtuvo material de médula ósea únicamente.

TABLA XII
LEUCEMIAS AGUDAS. LABORATORIO

N°CASO	S A N G R E			P E R I F E R I C A			MEDULA	OSEA						
	HEMOGLOBINA g/dl	LEUCOCITOS mm ³	PLAQUETAS mm ³	BLASTOS	LAL	LAM								
	menor 5 - 5 a B - más B	menor 5 a mayor 5.000 50000 50000	↑ N ↓	SI NO										
1	+													
2	+													
3														
4	+													
5	+													
6														
7														
8	+													
9														
10														
11														
12														
13														
14	+													
15	+													
16*														
TOTALES	6 (40%)	6 (940%)	3 (920%)	5 (33,3%)	5	5	0	2	13 (13,35)	10 (86,6%)	5 (66%)	14 (34%)	1 (93%)	1 (7%)

* caso referido al Dpto de Patología del HIM "Federico Gómez". Porcentajes en base a 15 casos.

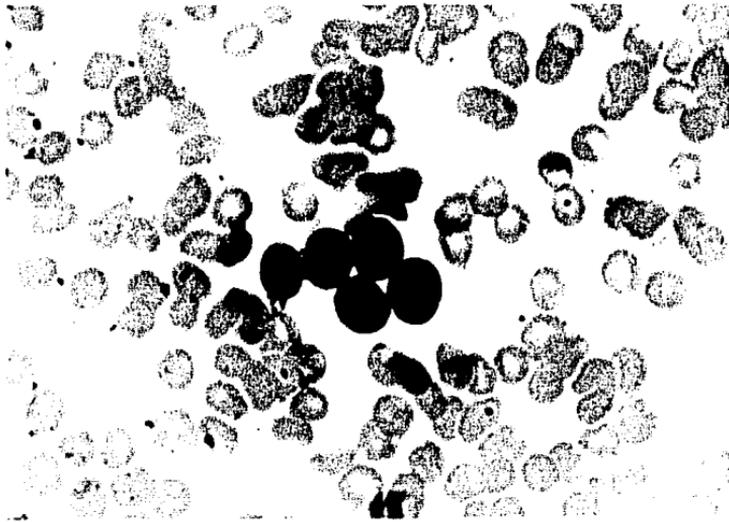


Figura 1. LAL-L1: las células son regulares, de núcleos redondos, homogéneos y citoplasma poco visible. (Wright, 400x).

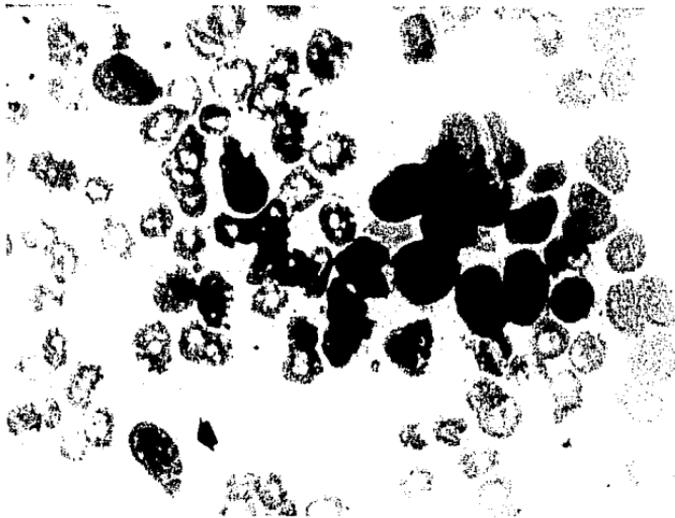


Figura 2. LAL-L2: a diferencia del caso anterior, se observa variabilidad en el tamaño celular e irregularidad nuclear; en el extremo inferior izquierdo hay una célula en espejo de mano (flecha). (Wright, 400x).

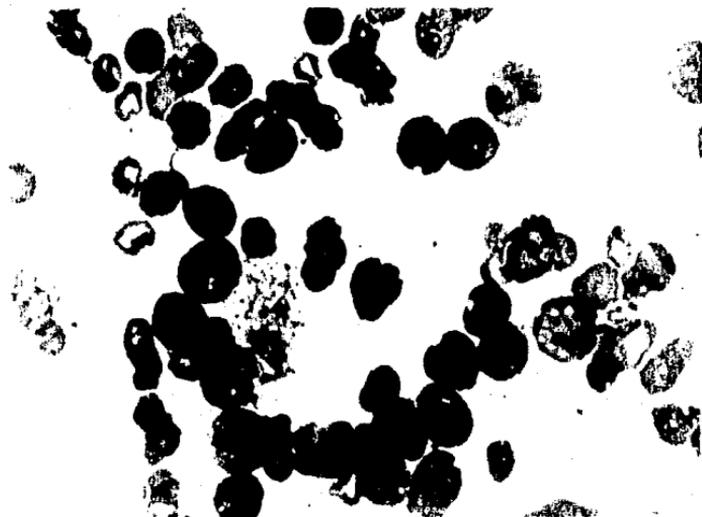


Figura 3. LAL-L2: además de las características ya descritas las células muestran vacuolación citoplásmica (Wright, 400x).

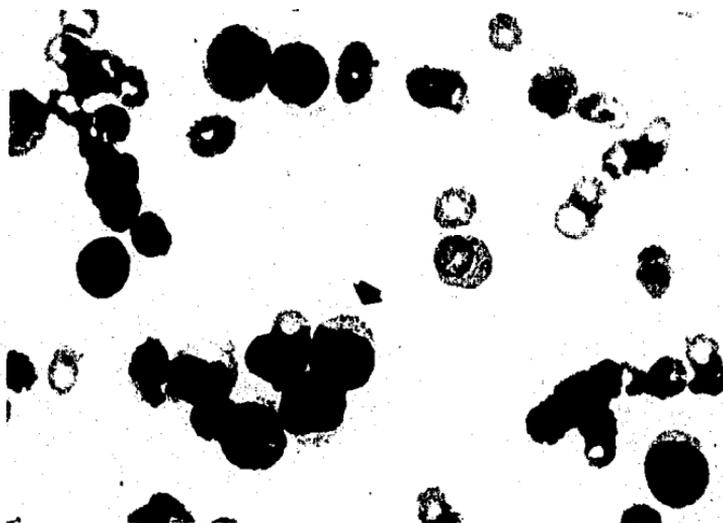


Figura 4. LAM-M1: células de núcleos grandes, ovoides, el citoplasma abundante y en algunos hay escasos gránulos azurofílicos (flecha). (Wright, 400x).

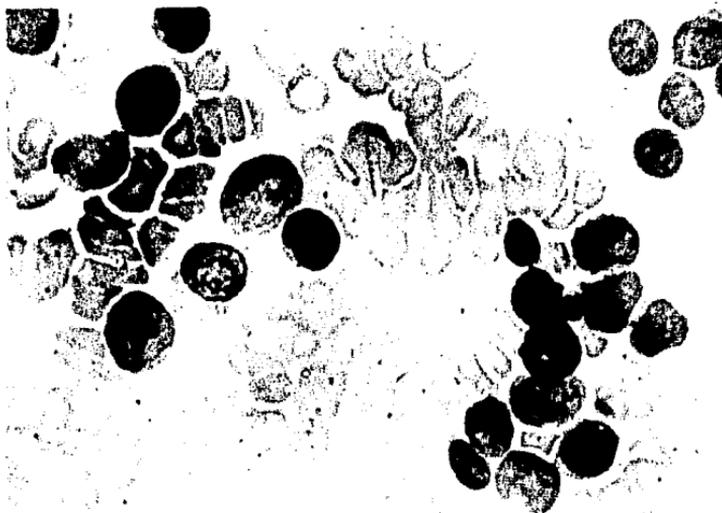


Fig. 5

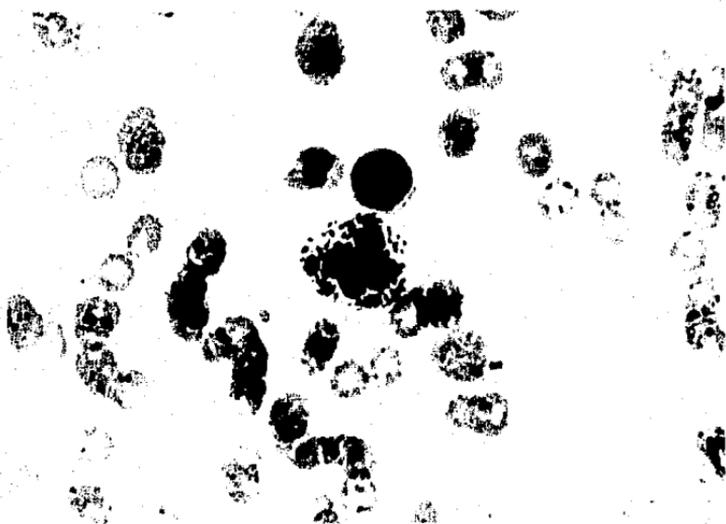


Fig. 6

Figuras 5 y 6. LAM-M2: diferentes campos de un mismo caso; en el primero (Fig. 5) se distinguen mieloblastos y en la parte central del segundo (Fig. 6) se observa un promielocito anormal con gran cantidad de gránulos azurofílicos. (Wright, 400x).

TABLA XIII

LEUCEMIAS AGUDAS. EVOLUCION A UN MES DE TRATAMIENTO

Nº CASO	DIAGNOSTICO INICIAL	EVOLUCION
1	LAL - L 1	Desconocida
2	LAL - L 1	Remisión
3	LAL - L 1	Remisión
4	LAL - L 2	No remisión
5	LAL - L 1	Desconocida
6	LAL - L 1	Desconocida
7	LAL - L 3	Defunción
8	LAL - L 1	Remisión
9	LAL - L 1	Remisión
10	LAM - M 1	Defunción
11	LAL - L 1	Remisión
12	LAL - L 1	Desconocida
13	LAL - L 1	No remisión
14	LAL - L 2	Defunción
15	LAL - L 1	Remisión
16*	Desconocido	

Remisión : 46.6%; No remisión: 13.3%, Defunción: 20%, Desconocida:20%
 Total: 99.99%

*Caso referido al Servicio de Patología del HIM "Federico Gómez"

MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION. La comparación entre el diagnóstico morfológico inicial y el diagnóstico ultraestructural en todos los casos, se muestra en la Tabla XIV. El 40% de los casos no tenía correlación diagnóstica. De ésta cifra en el 26% las diferencias se encontraban en el grupo de las leucemias linfoblásticas, el 6.6% en las mieloblásticas y el 6.6% restantes entre linfoblásticas y mieloblásticas. Los hallazgos ultraestructurales en las células neoplásicas, tanto en sangre periférica como en médula ósea, fueron constantes.

LEUCEMIAS LINFOBLASTICAS

De los 15 casos estudiados, 12 (80%) correspondieron al grupo de las leucemias linfoblásticas: Nueve (9) de ellos (75%) eran del subgrupo L 1 y 3 (25%) al L 2.

Ultraestructuralmente, las células de la variedad L 1 eran regulares en tamaño y forma, los bordes citoplásmicos también definidos, el citoplasma escaso y se encontraron pocos organelos entre los que destacaban las mitocondrias que, generalmente, eran ovoideas y mostraban grados variables de dilatación. El retículo endoplásmico era escaso, de tipo rugoso, en algunas de las células se encontró el aparato de Golgi poco desarrollado; ocasionalmente, las células exhibían prolongaciones citoplásmicas que les daba aspecto de células en "espejo de mano". Los núcleos eran redondos u ovoides, algunos con indentaciones poco profundas. En ellos, se observó un patrón de heterocromatina dispuesta predominantemente hacia la periferia e interrumpida a intervalos más o menos simétricos. En la mayoría de ellos se podían observar de uno a tres nucleolos pequeños---

TABLA XIV
LEUCEMIAS AGUDAS. DIAGNOSTICO INICIAL Y ULTRAESTRUCTURAL

Nº CASO	DIAGNOSTICO INICIAL	DIAGNOSTICO ULTRAESTRUCTURAL
1	LAL - L 1	LAL - L 2
2	LAL - L 1	*
3	LAL - L 1	LAL - L 1
4	LAL - L 2	LAL - L 1
5	LAL - L 1	LAL - L 1
6	LAL - L 1	LAL - L 1
7	LAL - L 3	LAL - L 2
8	LAL - L 1	LAL - L 1
9	LAL - L 1	LAL - L 1
10	LAM - M 1	LAM - M 2
11	LAL - L 1	LAL - L 1
12	LAL - L 1	LAL - L 1
13	LAL - L 1	LAL - L 1
14	LAL - L 2	LAM - M 1
15	LAL - L 1	LAL - L 2
16*	Desconocido	LAM - M 2

* Caso referido al Servicio de Patología del HIM "Federico Gómez"

° Escaso material. No se incluyó en el estudio.

ver figuras 7, 8 y 9.

En el subgrupo L 2 las células mostraban variabilidad en la forma y tamaño. La cantidad del citoplasma era mayor que en el subgrupo anterior y aunque los contornos citoplásmicos estaban bien definidos eran muy irregulares, tenían prolongaciones finas, en mayor proporción que en los casos de L 1 había células en "espejo de mano". Las mitocondrias eran polimórficas, exageradamente dilatadas y de aspecto vacuolado; el retículo endoplásmico se encontró en menor proporción que en la variante antes descrita. Algunas células contenían gránulos primarios (azurófilos) pleomórficos. Los núcleos, muy irregulares, presentaban pliegamientos y hendiduras profundas. Había condensación de la cromatina en forma de grumos tanto en la periferia como en el resto del núcleo; el nucleolo, generalmente uno, era prominente (Fig.10 y 11). En ninguno de los casos de leucemia linfoblástica (L1 y L2) se observaron figuras mitóticas.

LEUCEMIAS MIELOBLÁSTICAS

De éste grupo, se revisaron 3 casos, lo que constituye en esta serie el 20%. Se identificaron 2 subgrupos diferentes: un (1) caso de M1 y dos (2) de M2. Las células de la leucemia mieloblástica sin diferenciación (M1) eran grandes, redondas u ovoides, con citoplasma en regular cantidad en el que habían mitocondrias, retículo endoplásmico rugoso y ocasionalmente gránulos primarios (azurofílicos) poco desarrollados. Había además en algunos de ellos escasas prolongaciones citoplásmi-

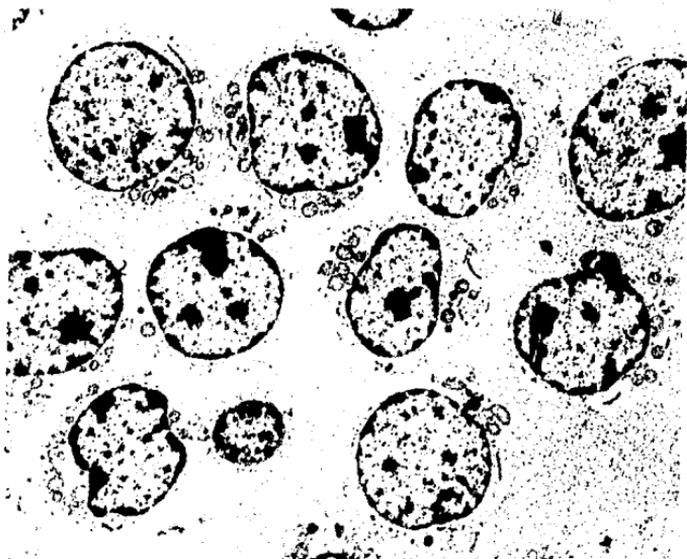


Figura 7. LAL-L1: hay uniformidad en el tamaño y aspecto de las células, la heterocromatina distribuida en la periferia nuclear (Acetato de Uranilo-citrato de plomo, 4.500x)

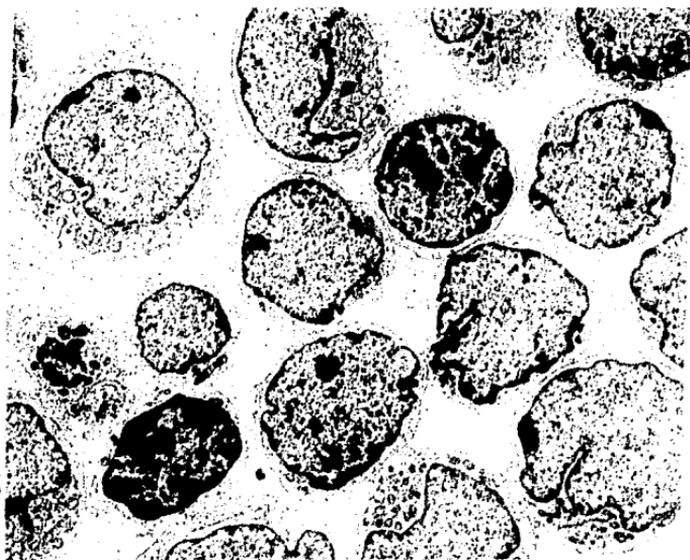


Figura 8. LAL-L1: adicionalmente las células pueden mostrar hendiduras y plegamientos nucleares, el nucleolo es poco aparente (acetato uranilo-citrato plomo, 4.500x).

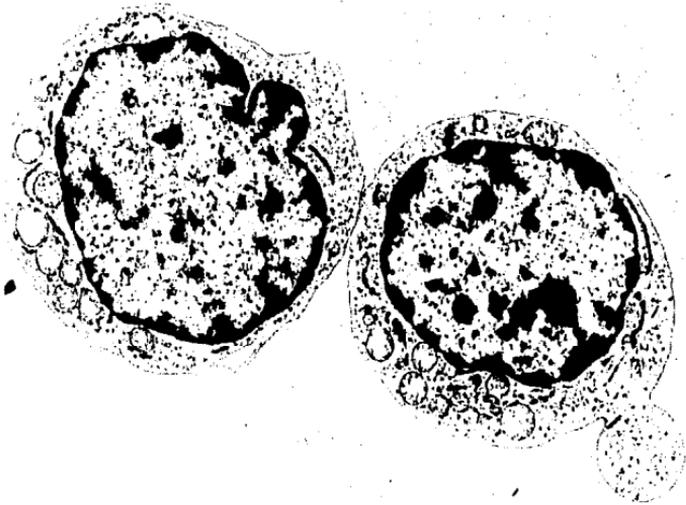


Figura 9. LAL-L1: algunas células muestran prolongaciones citoplasmáticas, la cantidad y tamaño de las mitocondrias varía de célula a célula (acetato uranilo-citrato plomo, 9.000x).

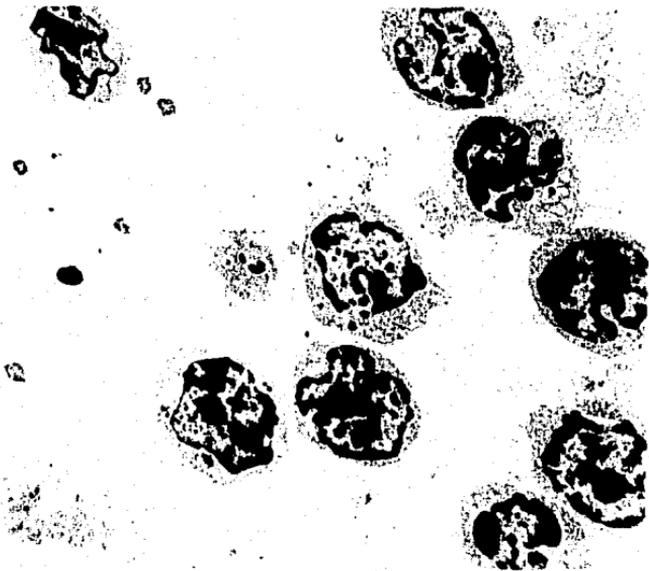


Figura 10. LA'-L2: nótese la heterogeneidad celular, los núcleos con marcada irregularidad y el nucleolo prominente. (acetato uranilo-citrato plomo, 4.500x).

cas finas. Los núcleos eran regulares de contornos bien definidos y mostraban principalmente patron de eucromatina con uno ó más nucleolos prominentes (Fig.12).

En los casos de leucemia mieloblástica con diferenciación (M2) la población celular fué heterogénea y se pudieron observar mieloblastos, con características semejantes a las descritas en párrafos anteriores, promielocitos y mielocitos anormales. La cantidad de citoplasma era variable de célula a célula; los promielocitos mostraban gránulos primarios en mayor cantidad que gránulos específicos (secundarios), la distribución de éstos gránulos era característica en relación al aparato de Golgi; algunas células sugieren maduración fundamentalmente neutrofílica. Los núcleos tendían a ser reniformes lo que les daba aspecto "monocitoide"; tenían un nucleolo muy prominente y la heterocromatina aunque escasa se distribuía hacia la periferia en forma de bandas finas generalmente continuas. Los mielocitos, en los que predominan los gránulos específicos, mostraban segmentación anormal del núcleo con mayor cantidad de heterocromatina (Fig.13 y 14).

MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO. Para este fin y de manera comparativa, una parte de los especímenes, se desecó con punto crítico y en otra representativa se prescindió de este método; dado que no había diferencias significativas, se optó una vez fijados, deshidratarlos y montarlos. De cualquier forma, se comprobó que la obtención de bloques del concentrado celular para su observación con el microscopio electrónico de barrido,

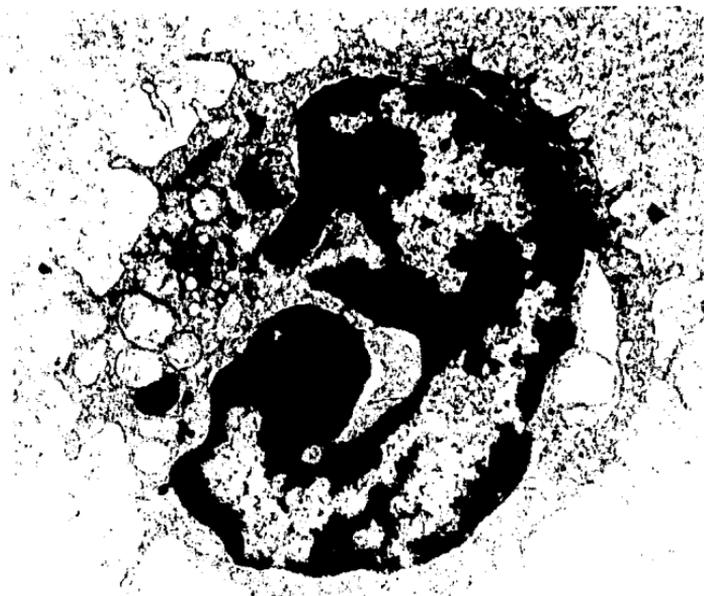


Figura 11. LAL-L2: las hendiduras nucleares profundas, la heterocromatina dispuesta en grumos, citoplasma en moderada cantidad; mitocondrias dilatadas, ocasionalmente pueden observarse gránulos azurofílicos (acetato uranilo-citrato plomo 18.000x).

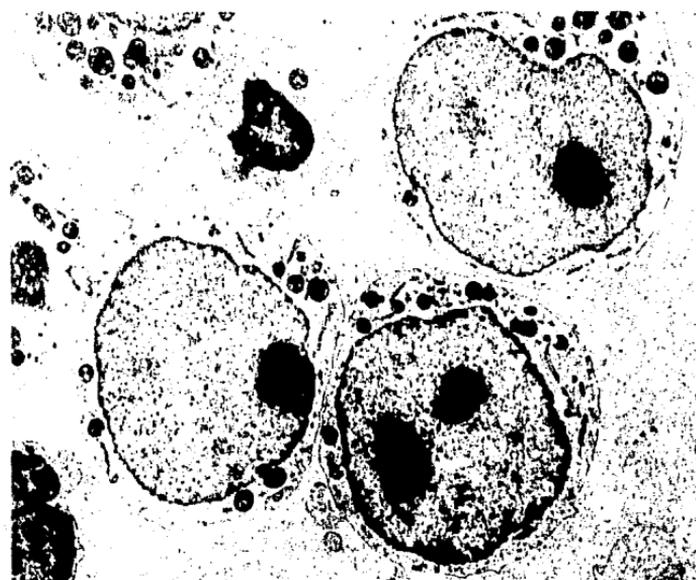


Figura 12. LAM-M1: células regulares, citoplasma en moderada cantidad, gránulos ausentes ó escasos, núcleos con patrón de eucromatina, uno ó más nucleolos prominentes (acetato uranilo-citrato plomo, 9.000x)

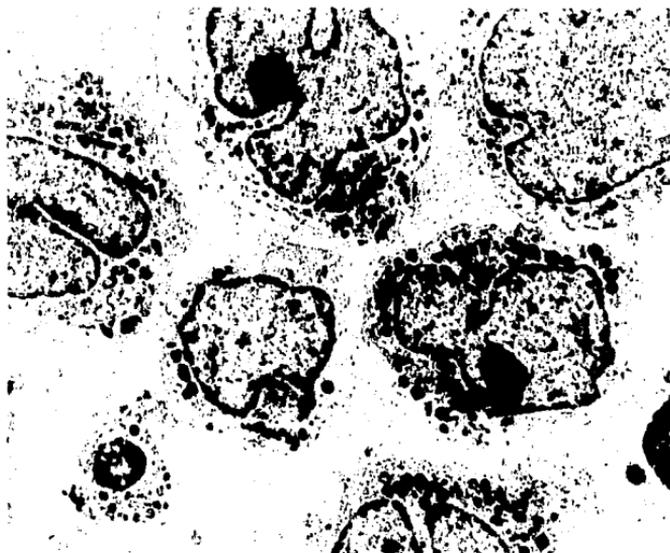


Figura 13. LAM-M2: hay mezcla de mieloblastos (extremo superior derecho) y diversas formas de promielocitos (centro), nótese variabilidad en cantidad, tamaño y forma de los gránulos azurofilicos (citrato plomo-acetato uranilo, 5.670x)



Figura 14. LAM-M2: frecuentemente se observan precursores de la serie monocítica (izquierda); son evidentes las diferencias entre éste y los promielocitos (derecha). (acetato uranilo-citrato plomo, 7.200x).

es poco adecuada, ya que se presentan diversos artificios que en un momento dado, hacen difícil la interpretación morfológica.

En los casos de leucemias linfoblásticas del subgrupo L1 se confirmó la regularidad en el tamaño y forma celular (Fig. 15). Estas células mostraban sobre su superficie prolongaciones en cantidad variable y de contornos bien delimitados (Fig. 16) su tamaño era comparable o menor al de un eritrocito (Fig. 17) y algunas tenían aspecto de células en "espejo de mano" -- (Fig. 18). Por otro lado las células en los casos del subgrupo L 2, eran evidentemente heterogéneas en forma y tamaño, -- más grandes que un eritrocito y parecían poseer menor cantidad de microvellosidades (Figs. 19 y 20).

No hubo oportunidad, por lo escaso del material, de analizar con este método una de las leucemias mieloblásticas con diferenciación (M2). Las células de la leucemia mieloblástica sin diferenciación (M1), aunque comparables en dimensiones -- con las del subgrupo L2, presentaban una morfología homogénea a diferencia de los linfoblastos, la superficie celular mostraba plegamientos bien regulares y de límites fácilmente distinguibles (Fig. 21).

Por último, en las células del subgrupo M 2, había diferencias en cuanto a forma y tamaño se refería, así como en la cantidad distribución y delimitación de los plegamientos citoplásmicos (Fig. 22).

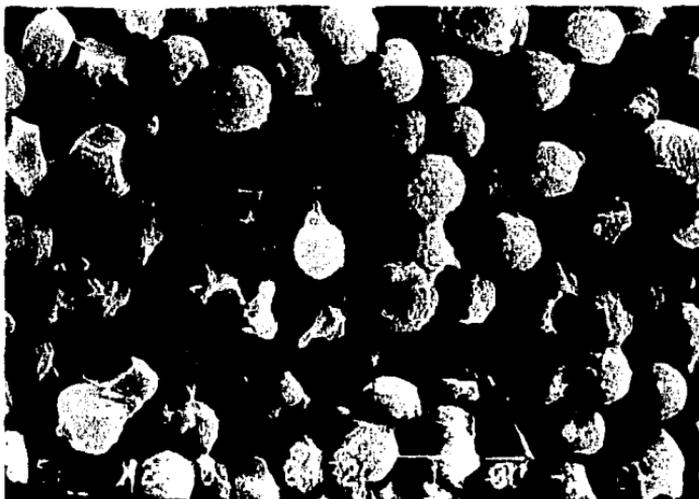


Figura 15. LAL-L1: El tamaño celular es uniforme y sus contornos regulares (oro, 2.600x).

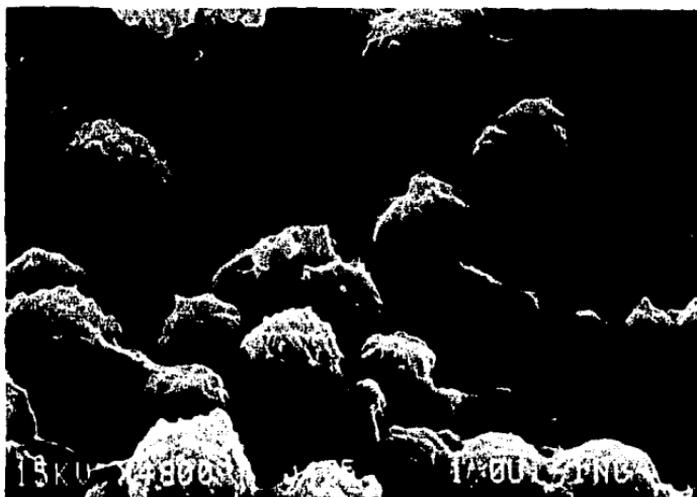


Figura 16. LAL-L1: las células exhiben sobre la superficie prolongaciones citoplasmáticas (microvellosidades) cortas y anchas en cantidad variable (oro, 4.800x).



Figura 17. LAL-L1: el tamaño de las células puede compararse con el de los eritrocitos (flechas). (oro, 4.800x).



Figura 18. LAL-L1: algunas células tienen aspecto en "codo de mano", adviértase el detalle de las microvelosidades (oro, 9.400x).

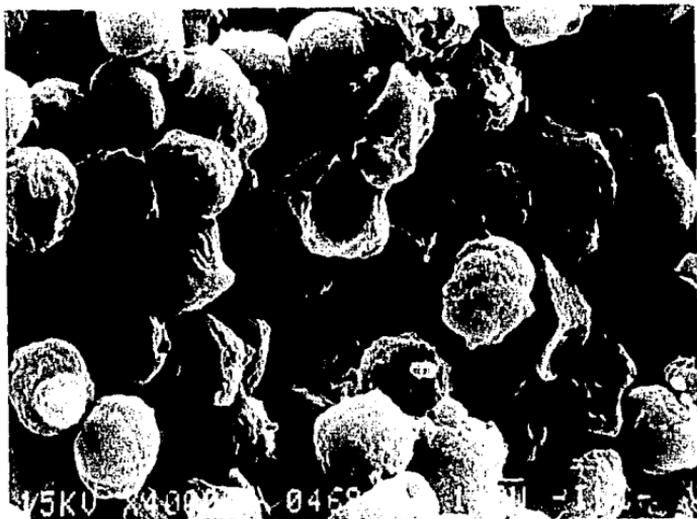


Figura 19. LAL-L2: las células son grandes muy irregulares y de formas distintas (oro, 4.000x).

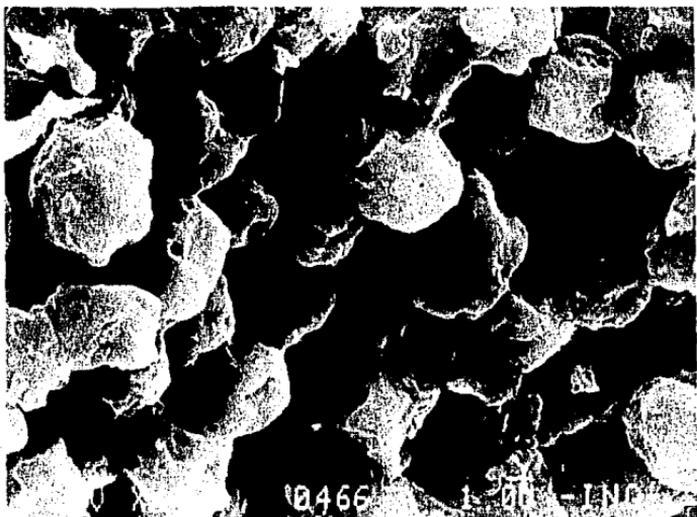


Figura 20. LAL-L2: comparéense estas células con las de LAL-L1; además de las características mencionadas, la superficie celular tiene aspecto más bien liso. (oro, 4.400x).

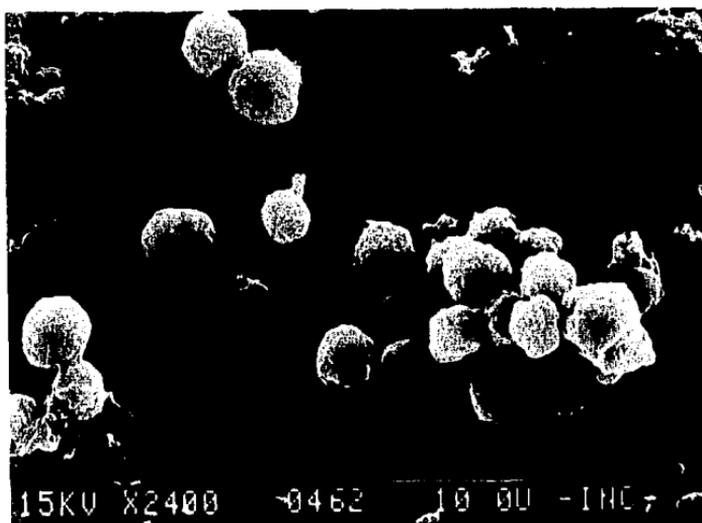


Figura 21. LAM-M1: a diferencias de las LAL, las células en este caso están desprovistas de microvellosidades, son regulares y muestran plegamientos en la superficie. (oro, 2.400x).

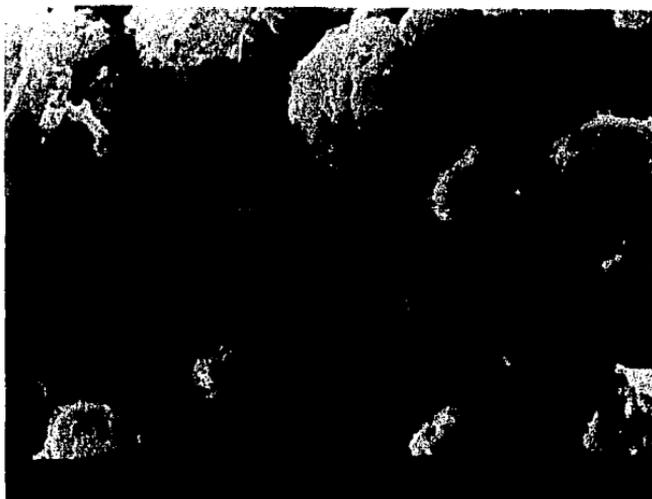


Figura 22. LAM-M2: la irregularidad celular es prominente, se pueden observar sobre la superficie tanto plegamientos como microvellosidades (oro, 3.200x)

DISCUSION

El empleo de la microscopía electrónica en la definición de las leucemias, se ha convertido en un elemento necesario-- cuando fracasan los métodos habituales de diagnóstico. El presente estudio, realizados exclusivamente en niños, confirma-- lo dicho anteriormente. Indudablemente se trató de una serie pequeña y quizás no representativa de casos y, portanto, los resultados plasmados no pretenden establecer modelos estadísticos; sin embargo se trata de una información útil. Tampoco se quiso en ningún momento desplazar a los métodos tradicionales de diagnóstico, que son de gran utilidad y menos costosos; pero es necesario demostrar comparativamente las ventajas que la ultramicroscopía brinda en el estudio de estos padecimientos.

Desde el punto de vista clínico practicamente no hubo diferencias con los resultados reportados en otras series y, -- aunque no era el objetivo primordial, se intentó hacer una correlación clínica con los hallazgos morfológicos ultraestructurales en el intento de buscar puntos de comparación.

El análisis ultraestructural de los casos presentados no mostró finalmente dificultades diagnósticas y se pudo llegar a resultados objetivos en todos los casos estudiados. Al com-

parar estos resultados con los de otros autores^{27,98} es posible asegurar que la identificación de las diferentes subpoblaciones neoplásicas puede realizarse en forma más o menos certera y reducirse el porcentaje de error diagnóstico.

Se encontraron diferencias entre el diagnóstico clínico y el ultraestructural en 6 de los casos (40%) siendo ésta una cifra superior a la reportada por la mayoría de los autores²⁶ esto quizás se deba a las dificultades que presenta el estudio citológico cuyos resultados van a depender, en gran medida, de la calidad del extendido realizado y de los criterios morfológicos empleados por el observador. La mayoría de las comunicaciones previas concuerdan en que la clasificación de las subpoblaciones linfoblásticas, en muchas ocasiones, es difícil de realizar. La FAB refiere dificultades para diferenciar L1 de L2 en base a las características morfológicas solamente. Por otro lado, las L2 deben diferenciarse de las LAM sin maduración (M1) ya que en el primer tipo pueden evidenciarse gránulos azurofílicos ocasionales que son negativos con la peroxidasa y en el último, los gránulos pueden ser muy escasos ó demasiados pequeños hasta ser difícil la interpretación de los resultados en el estudio enzimático. también puede confundirse L2 con M5 poco diferenciada.

En el grupo de las mieloblásticas se reportan controversias en el diagnóstico morfológico y la distinción dependerá entonces de la utilización de reacciones específicas para cada línea celular (mieloperoxidasa, esterasa fluoruro-sensí

tiva). Además es preciso diferenciar aquellas del subgrupo M6 con otras condiciones clínicas no neoplásicas que pueden prestarse a confusión.

En términos generales, mediante el uso del microscopio electrónico de transmisión se facilita la distinción entre las diferentes estirpes celulares dadas sus características citoy ultramorfológicas. El análisis de las superficies celulares con microscopía electrónica de barrido puede sugerir el tipo de células que predomina en el espécimen estudiado. Diversos autores han propuesto que, en condiciones de manejo ideal, con la valoración acuciosa de la morfología de las microvellosidades es factible establecer si una determinada célula corresponde a linfocito T, B ó "nulo". En el presente estudio, el concentrado celular obtenido fué considerado como útil ya que se pudo constatar el buen estado de preservación de las células, que indudablemente facilita la identificación de sus caracteres morfológicos. Por el momento, la técnica para microscopía electrónica de barrido no resultó del todo satisfactoria o como era deseado; a pesar de ésto se pudieron correlacionar los resultados con los dos métodos. Por ejemplo, en los linfoblastos L2, pudo comprobarse la heterogeneidad celular descrita en citología y microscopía electrónica de transmisión. En el grupo de las leucemias mieloblásticas fué posible obtener datos que permitían diferenciar una de otra. Se comprobó que un mejor método para el estudio de este grupo de neoplasias con microscopía electrónica de barrido es -

el de suspensión y filtración celular con lo que se conservan mejor las células.

Es preciso destacar, que con los cortes semifinos de los concentrados celulares pudo hacerse un diagnóstico preciso en la mayoría de los casos. Es casi seguro que con las técnicas-citoquímicas y de marcadores en un nivel ultraestructural se facilita aún más la clasificación de las estirpes neoplásicas.

Un hallazgo inconstante y poco aparente en nuestra serie fué la presencia de células en "espejo de mano"; éstas han sido descritas por varios autores⁹⁹⁻¹⁰¹ como parte de las células linfoblásticas (pre-T); en adultos provocan un cuadro leucémico con plaquetas normales, infiltración de médula ósea hasta en un 50% de la serie predominante, resistencia al tratamiento pero con sobrevida prolongada sin éste. Se han interpretado como un eslabón entre un proceso maligno y uno benigno. No se han descrito este tipo de leucemia en niños y se desconoce su significado biológico.

En resumen, el estudio ultraestructural de las células leucémicas ofrece la oportunidad de hacer diagnósticos precisos de las diferentes subpoblaciones neoplásicas que es indispensable para conocer sobre el manejo terapéutico y sobre el pronóstico de sobrevida en estos pacientes. El método de concentrado celular es realmente inócuo y causa pocas molestias al paciente. En algunos casos pudiera obviarse la toma de médula ósea - procedimiento muy traumático - ya que el material

obtenido en sangre periférica mostró ser suficiente para realizar el diagnóstico aún en aquellos casos en fase subleucémica. Sin lugar a duda, en aquellos casos en que persista la incertidumbre diagnóstica y que justifique el empleo de un método tan costoso, debe realizarse el estudio ultraestructural si se dispone de la metodología adecuada.

Por último, el empleo de diversas técnicas y métodos para el diagnóstico adecuado en el grupo de las leucemias agudas, ha permitido conocer con más detalle, aún indirectamente, el comportamiento biológico de las diferentes subpoblaciones de leucocitos y se ha podido determinar los factores que, en condiciones normales, intervienen en la diferenciación y maduración de estas series hematológicas. Esto redundará, en un futuro no muy lejano, a la mejor comprensión de su fisiopatología en la elaboración de terapéuticas específicas más eficaces.

C O N C L U S I O N E S

- 1.- El estudio multidisciplinario en algunos casos de padecimientos leucémicos es preponderante para definir con precisión la estirpe celular, con el objeto de iniciar una terapéutica más específica y conocer el pronóstico en cada paciente evaluado.
- 2.- El método de concentrado celular para microscopía electrónica es un procedimiento inócuo, que causa pocas molestias al paciente y conserva un espécimen adecuado de las estructuras celulares que facilita la interpretación y clasificación de las diversas subpoblaciones neoplásicas.
- 3.- La metodología empleada para el estudio ultraestructural es laboriosa y costosa, pero justifica su empleo. En la mayoría de los casos, desde los cortes semifinos, se puede hacer un diagnóstico morfológico certero.
- 4.- La microscopía electrónica de transmisión es un instrumento muy eficaz en la caracterización de los subgrupos leucémicos, facilita su clasificación y disminuye sensiblemente el margen de error en los diagnósticos realizados.
- 5.- La microscopía electrónica de barrido aporta imágenes tridimensionales de la estructura celular y con esto se-

puede sugerir la línea celular de origen en buena parte de los casos. Sin embargo, es necesario idear otros métodos y realizar estudios más elaborados para definir con mayor exactitud las características de las células blásticas.

- 6.- Por último, el estudio ultramicroscópico, como la mayoría de los realizados en ésta área, aportará datos sobre comportamiento biológico normal de los leucocitos, cambios en las células blásticas secundarios a tratamiento antineoplásico y elucidaciones acerca de su etiología, que necesariamente han de mejorar el pronóstico a largo plazo de estos pacientes.

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

1. Quesenberry P y Levitt L: Hematopoietic stem cells (1st of three parts) N Eng J Med 301(14):755-760, 1979.
2. Quesenberry P y Levitt L: Hematopoietic stem cells (2nd of three parts) N Eng J Med 301(15):819-823, 1979
3. Quesenberry P y Levitt L: Hematopoietic stem cells (3rd of three parts) N Eng J Med 301(16):868-872, 1979
4. Fong C K, Hsiung GD: Oncornavirus of guinea pigs, morphology and distribution in normal and leukemic guinea pig cells. Virology 70(2):385-398, 1976
5. Friedman M, Lilly F, Nathenson SG: Cell surface antigen induced by friend murine leukemia virus is also in the virion. J Virol 14(5):1126-1131, 1974
6. Blattner WA, Takatsuki K y Gallo RC: Human T-cell leukemia-lymphoma virus and adult T-cell leukemia. JAMA 26, 250(8):1074-1080, 1983
7. Sarin PS, Popovic M, Salahuddin SZ et al: Transmission of human T-cell leukemia virus (HTLV) in to human cord blood T-cells. Haematol bluttransfus 28:389-393, 1983 (Abstract)
8. Miyoshi I, Kubonishi I, Uchida H et al: Production of lymphoid tumors in hamsters by direct implantation of normal human peripheral and umbilical cord leukocytes. Int J Cancer 18(1): 67-75, 1976

9. Ohsuki Y, Miyoshi I et al: Immunoagglutination of type-C virus particles in a human T-cell line by serum supplementation from patients with adult T-cell leukemia. *J Cancer Res Clin Oncol* 105(1):106-108, 1983
10. Oshuki Y, Agaki T et al: Ultrastructural study on Type-C virus particles in a human cord T-cell line established by co-cultivation with adult T-cell leukemia cells. *Arch virol* 73(1):69-73, 1982
11. Fernbach DJ: Natural history of acute leukemia. In *Clinical Pediatric Oncology*. Sutow WW, Fernbach DJ and Vietti TJ. 3rd Ed. C.B. Mosby Co. St. Louis, Toronto. p 332, 1984
12. Silva-Sosa M: Leucemias agudas en los niños. En Programa de Educación Continua en Pediatría. Hospital Infantil de México. 1984
13. Moe PJ: Childhood leukemia in Norway from 1963-1974 with special emphasis on own material. *Acta Paediatr Scand* 65: 529, 1976
14. Iversen T: Leukemia in infancy and childhood. A material 570 danish cases. *Acta Paediatr Scand* 177:55, 1976
15. González P y Alvarez P: Algunos aspectos epidemiológicos y de sobrevivencia en niños con leucemia aguda. *Bol Med Hosp Infant (Méx)* 30(1):59-72, 1973
16. Pierce MI, Borges WH y Geyn R: Epidemiological factors and survival. Experience in 1770 children with acute leukemia. *Cancer* 23:1296, 1969

17. Silva-Sosa M, Sedas MT y Berumen MG: Leucemia aguda en el niño I. Cuadro clínico. Bol Med Hosp Infant (Méx) 27:381, 1981
18. Silva-Sosa M, Sedas MT y Berumen MG: Leucemia aguda en el niño II. Cuadro clínico comparativo entre linfoblásticas y mieloblásticas. Bol Med Hosp Infant (Méx) 27:393, 1971
19. Salas M, Loredó A, Alvarez P y cols: Manifestaciones poco comunes de la leucemia aguda en niños. Bol Med Hosp Infant (Méx) 31(6):1181-1194, 1974
20. Finklestein JZ, Dymont PG and Hammond GD: Leukemic infiltration of the testes during bone marrow remission. Pediatrics 43:1042, 1969
21. Newman AJ y Melhorn DK: Vertebral compression in childhood leukemia. Am J Dis Child 125:863, 1973
22. Thomas LB, Forkner CE, Frei E et al: The skeletal lesion of acute leukemia. Cancer 14:608, 1961
23. Burns CP, Armitage JO, Frey AL, et al: Analysis of the presenting features of adult acute leukemia. Cancer 47: 2460, 1981
24. Ortega J: Tratamiento de las leucemias agudas del niño y enfermedades afines. Anales Nestlé 41(2):1-30, 1983
25. Galton DAG, Dacie JV: Classification of the acute leukemia. Blood Cells 1:17, 1975
26. Bennet JM, Catovsky D, Daniel MT y Sultán S (The FAB cooperative group): Proposals for the classification of

- the acute leukemias. Br J Haematol 33:451-460, 1976
27. Dvorak AM, Monahan RA and Dickersin GR: Diagnostic electron microscopy I. Hematology: differential diagnosis of acute lymphoblastic and acute myeloblastic leukemia. Use of ultrastructure peroxidase cytochemistry and routine electron microscopy technology. Pathol Annu 1: 101-137, 1981
 28. Thiel E, Rodt H, Huhn D et al: Multimarker classification of acute lymphoblastic leukemia: Evidence for further T groups and evaluation of their clinical significance. Blood 56(5):759-772, 1980
 29. Breton-Gorius J, Reyes F, Gorin NC et al: Megakaryoblastic acute leukemia: Identification by the ultrastructural demonstration of platelet peroxidase. Blood 51(1): 45-60, 1978
 30. Marie JP, Perrot JY, Zittoun R et al: Determination of ultrastructural peroxidases and immunologic membrane markers in the diagnosis of acute leukemias. Blood 59(20) 270-276, 1982
 31. Janossy G, Hoffbrand AV, Lister TA et al: Terminal transferase enzyme assay and immunological membrane markers in the diagnosis of leukemia: A multiparameter analysis of 300 cases. Br J Haematol 44:221, 1980
 32. Hattori A: Contribution of scanning electron microscopy to recent advances in hematology; In Tanaka K, Fujita T Eds.: Scanning Electron Microscopy in Cell Biology and

- Medicine. International Congress Series, 545. Excerpta Medica: 199-208, 1981
33. Lin PS, Cooper AG y Wortis HH: Scanning electromicroscopy of human T-cell and B-cell rosettes. *N Eng J Med* 289(11):548-551, 1973
 34. Sullivan AK, Adams LS, Silke I and Jerry LM: "Hairy" B-cells and "smooth" T-cells (letter). *N Eng J Med* 290(12): 689-690, 1974
 35. Galley FR, Prchal JT, Amromin GD and Jhurani Y: The use of the scanning electron microscope for the differentiation of B from T lymphocytes (letter). *N Eng J Med* 289 (12):690, 1974
 36. Miller DR: Acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr. Clin North Am* 27:269, 1980
 37. Sallan SE, Ritz J, Pesanda J et al: Cell surface antigens prognostic implications in childhood acute lymphocytic leukemia. *Blood* 55:395, 1980
 38. Netzel B, Rodt H, Thiel E et al: Use of specific antisera against leukemia-associated antigens in the diagnosis of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Acta Haematol* 61:177, 1979
 39. Bollum FJ: Terminal deoxynucleotidyl transferase as a hematopoietic cell marker. *J Amer Soc Hematol* 54(6): 1203-1214, 1979
 40. Coleman MS, Greenwood MF, Hutton JJ et al: Serial observations on terminal deoxynucleotidyl transferase activity and lymphoblast surface markers in acute lymphoblas-

- tic leukemia. *Cancer Res* 36:120-127, 1976
41. Donlon JA, Jaffe ES and Braylon RC: Terminal deoxynucleotidyl transferase activity in malignant lymphomas. *N Eng J Med* 297:461-464, 1977
 42. Hoffbrand AV, Ganeshaguru K, Janassy G et al: Diagnostic value of terminal deoxynucleotidyl transferase levels and membrane phenotype in acute leukemia. *Lancet* ii:520, 1977
 43. Vogler LB, Crist WM et al: Pre-B cell leukemia. A new phenotype of childhood lymphoblastic leukemia. *N Eng J Med* 298:872-878, 1978
 44. Marks SM, Baltimore D and McCaffrey R: Terminal transferase as a predictor of initial responsiveness to Vincristine and prednisone in blastic crisis myelogenous leukemia. *N Eng J Med* 298:812-814, 1978
 45. Catovsky D, Cherchi M, Greaves MF et al: Acid phosphatase reaction in acute lymphoblastic leukemia. *Lancet* i: 749, 1978
 46. Mauer AM: Therapy of acute lymphoblastic leukemia in childhood. *Blood* 56:1-7, 1980
 47. Simone J: Optimal current treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Treat Rep* 65:77-100, 1981
 48. Ortega JA, Weiner J et al: L-asparaginase, vincristine and prednisone for induction of first remission in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 37:535, 1977
 49. Damesheck W, Necheles TF et al: Therapy of acute leuke-

- mia. Blood 26:220, 1965
50. Silva-Sosa M: Tratamiento masivo intermitente (TMI) de la leucemia aguda linfoblastica. Bol Med Hosp Infant (Méx) 27:245, 1971
 51. Silva-Sosa M: Resultados a largo plazo del tratamiento masivo intermitente (Protocolo HIM-TMI) de niños con leucemia aguda linfoblastica. Bol Med Hosp Infant (Méx) 33: 1151, 1976
 52. Silva-Sosa M: Resultados a largo plazo del tratamiento secuencial múltiple (Protocolo HIM-TSM) en niños con leucemia aguda linfoblastica. Bol Med Hosp Infant (Méx) 33: 1385, 1976
 53. Huson J, Kenneth S et al: Vincristine and prednisone vs vincristine, L-asparaginase and prednisone for second remission induction of acute lymphocytic leukemia in children. Med and Ped Onc 6:317-323, 1979
 54. Pinkel P, Simone J et al: Nine years' experience with "total therapy" of childhood acute lymphocytic leukemia. Pediatrics 50:246, 1972
 55. Ortega JJ y Javier G: Valor de las reinducciones en un protocolo moderno de tratamiento de las LAL infantiles. Análisis del protocolo D.74. Sangre 26:47, 1981
 56. Nesbit ME, Krivit W et al: A follow-up report of long term survivors of childhood acute lymphoblastic or undifferentiated leukemia. J Pediatr 95:727, 1979
 57. Bleyer A, Coccia P, Harland S et al: Reduction in SNC

- leukemia with a pharmacokinetically derived intratecal methotrexate dosage regimen. *J Clin Onc* 1(5):317325, 1983
58. Rivera G, George S, Bowman P et al: Second central nervous system prophylaxis in children with acute lymphoblastic leukemia who relapse after elective cessation of therapy. *J Clin Onc* 1(8):471-475, 1983
59. Chessells J and Cornbleet M: Combination chemotherapy for bone marrow relapse in childhood lymphoblastic leukemia (ALL). *Med and Ped Onc* 6:359-365, 1979
60. Cornbleet MA and Chessells JM: Bone marrow relapse in acute lymphoblastic leukemia in childhood. *Br Med J* 2: 104, 1978
61. Rivera G, Murphy SB, Aur RJA et al: Recurrent childhood lymphocytic leukemia. Clinical and cytokinetic studies of cytosine arabinoside and methotrexate for maintenance of second hematologic remission. *Cancer* 42:2521, 1978
62. Bowman WP, Melvin S and Mauer AM: Cell markers in lymphomas and leukemias. *Adv Intern Med* 25:391, 1980
63. Brouet JC, Valensi S and Daniel MT: Immunological classification of acute lymphoblastic leukemia: evaluation of its clinical significance in a hundred patients. *Br J Haematol* 33:319, 1976
64. Tsukimoto I, Wong KY and Lampkin BC: Surface markers and prognostic factors in acute lymphoblastic leukemia. *N Eng J Med* 294:245, 1976

65. Belpomme D, Mathé G, Davies AJS et al: Clinical significance and prognostic value of the T-B immunological classification of human primary acute lymphoid leukemias. Lancet i:555, 1977
66. Chessels JM, Hardisty RM et al: Acute lymphoblastic leukemia in children: Classification and prognosis. Lancet ii:1307, 1977
67. Rozencweig M, Von Hoff DD, Slavik M et al: Cisdiaminodichloroplatinum: a new anticancer drug. Am Intern Med 86: 803-812, 1977
68. Eighteenth Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology: Cisplatin experimental and clinical studies. 1982
69. Rozencweig M, Von Hoff DD and Henney J: VM-26 and VMP 16-213: A comparative analysis. Cancer 40:334-342, 1977
70. Taylor A, Applefeld M and Wiernik P: Acute anthracycline cardiotoxicity. Cancer 53:1660-1666, 1984
71. Druck M, Gullenchin K and Evan W: Radionuclide angiography and endomyocardial biopsy in the assessment of doxorubicin cardiotoxicity. Cancer 53:1667-1674, 1984
72. Prentice HG, Robins D and Ho AD: Sequential studies on the role of mitoxantrone in the treatment of acute leukemia. Cancer Treat Res 10:57-63, 1983
73. Paciucci P, Ohnuma T, Holand J et al: Mitoxantrone in acute lymphoblastic leukemia. Cancer Treat Res 10:65-68 1983

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

74. Michell BS, Koller CA and Heyn R: Inhibition of adenosine deaminase activity results in cytotoxicity to T lymphoblast in vivo. *Blood* 56:556, 1980
75. Prentice HG, Smyth JF, Hoffbrand AV et al: Remission induction with the adenosine deaminase inhibitor 2'deoxycoformycin in Thy-Lymphoblastic leukemia. *Lancet* ii:170, 1980
76. Legha SS, Keating MJ and Freireich EJ: 4'(9-acridilamino) methanesulfon-m-anidide (AMSA): A new drug effective in the treatment of adult acute leukemia. *Ann Intern Med* 93:17, 1980
77. Johnson FL, Thomas ED, Stovr R et al: A comparison of marrow transplantation for children with acute lymphoblastic leukemia in second or subsequent remission. *N Eng J Med* 305:846, 1981
78. Heyn R, Joo P, Hammond D et al: BCG in the treatment of acute lymphocytic leukemia. *Blood* 46:431, 1975
79. Nesbit ME, Harland S and Leslie R: Randomized study of 3 years vs 5 years of chemotherapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Onc* 1(5):308, 1983
80. George SL, Aur RJA, Mauer AM and Simone JB: A reappraisal of the results of stopping therapy in childhood leukemia. *N Eng J Med* 300:269, 1979
81. Spremulli E and Dexter D: Human tumor cell. Heterogeneity and metastasis. *J Clin Onc* 1(8): 406-509, 1983

82. Zarrabi M et al: Second neoplasms in acute lymphoblastic leukemias. *Cancer* 32:455-459, 1983
83. Mosijczuk AD and Ruymann FB: Second malignancy in acute lymphocytic leukemia. *Am J Dis Child* 135:313, 1981
84. Madoff L, Davy I, Gordon GB et al: The development of acute myelomonocytic leukemia in a patient with acute lymphocytic leukemia. *Cancer* 48:1157, 1981
85. Gale PR: Progress in acute myelogenous leukemia. *Cancer Treat Rep* 65:87-92, 1981
86. Fialkow PJ, Singer WJ, Adamson JW et al: Acute Nonlymphocytic leukemia. *N Eng J Med* 301:1, 1979
87. Rivera R, Ajuria E Silva-Sosa M y González P: Resultado del tratamiento de leucemia aguda no linfoblástica en población pediátrica. *Bol Med Hosp Infant (Méx)* 34(6): 1343-1355, 1977
88. Haghbin M, Murphy ML and Tan CTC: Treatment of acute non lymphoblastic leukemia in children with a multidrug protocol. *Cancer* 40:1417, 1977
89. Machover D, Rappaport H et al: Treatment of acute myeloid leukemia with a combination of intense induction chemotherapy, early consolidation, splenectomy and long term maintenance chemotherapy. *Cancer* 53(8):1644-1650, 1984
90. Altman AJ, Palmer CG and Baehner RL: Juvenil Chronic

- granulocytic leukemia: a panmyelopathy with prominent monocytic involvement and circulating monocyte colony-forming cells. *Blood* 43:341, 1974
91. Degnan T, Weiselberg L, Schulman P and Budman D: Dysmyelopoietic syndrome. *Amer J Med* 76:122-128, 1984
 92. Sills RH and Stockman JA: Preleukemic states in children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 48:110-112, 1981
 93. Wollner N, Burchenal JH, Murphy ML et al: Non Hodgkin's lymphoma in children. A comparative study of two modalities of therapy. *Cancer* 37:123, 1976
 94. Weinstein H, Buell D, Jaffé N et al: Improved prognosis for childhood non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 50:413, 1977
 95. Finkelstein JZ, Ekert H, Isaacs H and Higgins G: Bone marrow metastasis in children with solid tumors. *Am j dis Child* 119:49, 1970
 96. Mc Dowell L and Trume J: Fixative. *Arch Path Lab Med* 100:405, 1976
 97. Azar H A: The hematopoietic system in Trump BF, Jones RT: Diagnostic electron microscopy. John Wiley & Sons Vol. 2, pag 47-161. 1979
 98. Larraza O, Rosales LM y Areteaga A: Electron microscopy study of hematologic neoplasms in peripheral blood buffy coat. *Patología (Méx)* 22:7-20. 1984

99. Shohat B, Sidi Y, Golstein AL et al: Pre-T cell lineage of hand-mirror cells in acute lymphoblastic leukemia. *Thymus* 2:281-286. 1981
100. Schumacher HR, Perlin E, Miller WM and Stass SA: Hand-mirror cell leukemia (letter) *Lancet* i:655-56. 1977
101. Schumacher HR, Perlin E, Miller WM and Stass SA: Hand-mirror cells: Benign or malignant? (letter) *Lancet* i:1092. 1978