



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

**INCIDENCIA DE LEUCEMIA MEGACARIOBLASTICA
(LAM-7) EN NIÑOS DEL SERVICIO DE
HEMATOLOGIA PEDIATRICA, HOSPITAL GENERAL
CENTRO MEDICO "LA RAZA"**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A N
IMELDA RAVELO OCHOA
ANA MARIA RODRIGUEZ GARCIA

ASESORAS DE TESIS:
Q.F.B. ROSARIO MEJIA LUNA
Q.F.B. MARTHA SANCHEZ RODRIGUEZ

MEXICO, D. F.

AGOSTO, 1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

INDICE

RESUMEN	2
INTRODUCCION	3
MARCO TEORICO	4
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	30
OBJETIVOS	31
HIPOTESIS	32
MATERIAL Y EQUIPO	33
REACTIVOS	36
METODOS	40
RESULTADOS	51
ANALISIS DE RESULTADOS	62
CONCLUSIONES	65
SUGERENCIAS	66
ANEXO	67
BIBLIOGRAFIA	74

RESUMEN

La leucemia megacarioblástica (LAM-M7) es una nueva variedad de las leucemias mieloides agudas incluida por el Grupo Cooperativo Franco-Británico-Americano en 1985. Esta leucemia se presenta en pacientes con mielofibrós y frecuentemente en niños con síndrome de Down.

En esta leucemia se puede presentar cifras plaquetarias normales pero defectuosas en sus funciones, su pronóstico es malo, tal vez peor que el de otras leucemias mieloides.

Los métodos más recomendables para su identificación han sido: a) Por peroxidasa plaquetaria (con microscopía electrónica) y b) por anticuerpos monoclonales.

Los anticuerpos monoclonales identifican moléculas específicas de precursores de serie plaquetaria (megacariocítica), como es el CD41 (complejo glucoproteico IIb/IIIa) y el CD61 (glucoproteína IIIa).

La identificación de este tipo de leucemia, en el Servicio de Hematología Pediátrica del Hospital General Centro Médico "La Raza", ha sido difícil, por lo que el presente trabajo fué desarrollado con la finalidad de establecer la detección de LMA-M7 por medio de anticuerpos monoclonales en este hospital.

Los resultados indican que de 54 casos, sólo 2 (3.7%) fueron leucemias de tipo megacarioblástica.

Estos datos son importantes si consideramos, que la clasificación adecuada de la leucemia, permite al médico establecer cuadros terapéuticos más acertados para este tipo de pacientes y con ello dar la posibilidad de una vida más prolongada.

INTRODUCCION.

Se define la leucemia aguda como una neoplasia de células hematopoyéticas (generalmente leucocitos), los cuales se caracterizan por una sustitución difusa en la médula ósea por células neoplásicas, éstas invaden la sangre donde pueden encontrarse en abundancia, también infiltrar el hígado, bazo, ganglios linfáticos y otros tejidos del cuerpo.

En México, en base al registro nacional del Cáncer de la Secretaría de Salud en 1983, se reporta que las leucemias y los linfomas constituyen el 51% de las neoplasias más frecuentes en niños.

En una revisión realizada en la Sección de Hematología Pediátrica del Hospital General Centro Médico " La Raza ", se observó que el 50.9% correspondía a Leucemia Linfoblástica Aguda, el 20.3% a Leucemia Mieloblástica Aguda, encontrándose también que el 16.6% de los casos fueron indiferenciados debido a que las técnicas que se emplearon (morfológicas y citoquímicas) fueron insuficientes, por lo que el 12.2% de los casos no se pudieron evaluar por falta de material.

Consideramos que sería conveniente lograr una mayor tipificación e identificación de las Leucemias, sobre todo porque se ha encontrado una nueva variedad que es la Leucemia Megacarioblástica (M7), que no se reporta frecuentemente y que es más agresiva para el paciente. En este trabajo esta tipificación se realizará Inmunológicamente por medio de Anticuerpos Monoclonales.

MARCO TEORICO.

LEUCEMIA.

Son neoplasias de las células hematopoyéticas (trastornos primarios de la médula ósea); que se caracterizan por una sustitución difusa de la médula ósea por células neoplásicas que invaden la sangre, donde pueden encontrarse en abundancia, también infiltrar el hígado, bazo, ganglios linfáticos y otros tejidos del cuerpo. (1).

BREVE HISTORIA.

La historia de la leucemia desde que fué reconocida como enfermedad distinta, data de un poco más de 100 años. Fué descrita por primera vez por el inglés Bennet y el célebre patólogo alemán R. Virchow, quienes en forma independiente publicaron en 1845 los dos primeros casos de leucemia. Corresponde también el crédito de haber acuñado el término " leucemia " a Virchow, aún cuando sostuvo en un principio el error de considerarlo un proceso supurativo " por hallarse enorme acumulación de células blancas en la sangre periférica ". Así mismo, propuso la primera clasificación de las leucemias, refiriéndose sin saberlo, a las formas crónicas de la enfermedad, tomando en cuenta que esta enfermedad fué descubierta era muy poco lo que se sabía acerca de la composición, origen y funciones de la sangre normal, y no existía tampoco ningún método adecuado para su investigación.

Parece probable que la primera descripción de un caso de leucemia sea la publicada en 1827 por Velpeau, un paciente de sexo masculino de 63 años de edad el cual presentaba una pronunciada hinchazón abdominal, fiebre, debilidad y síntomas consecutivos de litiasis

urinaria, al fallecer pocos días después de su ingreso al hospital y realizarle la autopsia demostró la existencia del hígado y bazo enormes, la sangre era densa, lo que llamó la atención de los observadores. Así, Barth en 1839 cuando encontró un caso similar examinó la sangre encontrando que más de la mitad de esta muestra estaba constituida por " glóbulos mucosos " que no podían diferenciarse de los corpúsculos de pus.

En 1856 Rudolph Virchow dividió las leucemias en dos clases: la primera " esplénica " o " lienal " la cual se asociaba de una hipertrofia del bazo; la segunda " linfática " asociada con tumefacción de los ganglios linfáticos, y con la presencia de corpúsculos incoloros en la sangre. Virchow comenzó con afirmar que estos corpúsculos incoloros estaban siempre presentes en la sangre normal, que aumentaban después de procesos inflamatorios y que conforme aumentaban estos corpúsculos blancos, existía una disminución en los corpúsculos rojos. Un año más tarde Friedreich observó que las alteraciones en la sangre no eran causadas por una mezcla de la misma con pus, sino probablemente por una proliferación de esos corpúsculos blancos que eran constituyentes normales de la sangre; llegando a la conclusión que las alteraciones primarias de la enfermedad radicaban, más bien en la misma sangre en los " órganos linfáticos ".

Para 1870 Neuman demostró que la médula ósea era una localización importante para la formación de corpúsculos sanguíneos, tanto de pacientes sanos como de enfermos. Sus estudios partieron de la observación de médulas óseas de aspecto anormal evidente en las autopsias de pacientes fallecidos por leucemias " esplénicas ". Observando que la médula no era roja como en los sujetos normales sino de un color amarillo verdoso sucio parecido al pus. Supuso que esos cambios podían ser comunes en pacientes con leucemia además de que pudieran existir variedades esplénicas, linfáticas y una leucemia mielógena.

El primero en reconocer una leucemia distinta a la variedad crónica habitual fué Ebstin, quien en 1889 recopiló 17 casos parecidos que clasificó como " leucemias agudas ". Fraenkel en 1895 demostró que la variedad aguda era mucho más común que las variedades crónicas de la leucemia, hizo hincapié que en la sangre de estos pacientes estaban aumentados exclusivamente los leucocitos mononucleados, que él consideraba como linfocitos, ya que aún no se habían descubierto las células más jóvenes de la estirpe granulocítica. No es, sin embargo hasta los estudios de Paul Ehrlich a fines del siglo pasado que pudo clasificar diversos tipos mieloides con ayuda de tinciones celulares, y llegó a la conclusión de que la

leucemia " esplénica " de Virchow y la " mielógena " de Neuwman era la misma debido a la superproducción de células granulosas.

Türk en 1903 agrupó las leucemias linfoides, tanto crónicas como agudas. Al poco tiempo de esta aparición la teoría fué olvidada debido a la proposición de Sternberg en 1905 quién separó los casos de " leucemia linfática " en dos grupos: en el primero se mostraban los datos leucémicos usuales, y además había infiltración de pequeños linfocitos en todos aquellos órganos que normalmente contienen leucocitos; en el segundo que denominó " leucosarcoma", había también lesiones en órganos en los que normalmente no hay linfocitos.

Schilling en 1913 publicó una nueva variedad de leucemia aguda en la que la leucemia típica era el monocito llamada leucemia monocítica pura. La presencia de monocitos y mieloblastos fué denominada por Naegeli como leucemia mielomonocítica, también a principios del siglo se encontró un tipo de leucemia con desarrollo neoplásico de precursor eritroide la cual llamaron eritroleucemia, posteriormente han sido descritas otras variantes más raras como la leucemia de megacarioblastos en 1931. Quedando así establecidas las leucemias crónicas linfoides y granulocíticas (mielógena) y las leucemias linfoides granulocíticas (mieloblásticas) y monocíticas. (2).

CLASIFICACION.

El grupo cooperativo Franco-Británico-Americano (FAB) propuso apartir de 1976 una forma universal de clasificar a la leucemia aguda con el fin de unificar criterios y determinar patrones de comportamiento evaluables en cualquier lugar, con ayuda de la tinción de Romanovsky y tinciones citoquímicas clasificándolas según el tipo celular normal al que se asemeja la célula leucémica dividiéndolas en dos grandes grupos: 1) Leucemia linfoblástica. 2) Leucemia mieloblástica. (tabla 1 y 2). Y un tercer grupo adicional que incluye a los padecimientos que se caracterizan por presentar trastornos de maduración y diferenciación mielóide, denominados en conjunto: síndrome dismielopoético.

TABLA No. 1

CLASIFICACION DE LAS LEUCEMIAS AGUDAS DE DIFERENCIACION
LINFOIDE, SEGUN EL GRUPO COOPERATIVO DE LA FAB (1978).

Características	L1	L2	L3
tamaño	pequeño (hasta 2 veces el linfocito pequeño)	grande heterogéneo en tamaño.	grande y homogéneo.
cromatina	homogénea en cada caso.	heterogénea	finamente punteada y homogénea.
contorno nuclear	regular indentaciones ocasionales.	irregular indentación	regular oval o redondo.
nucleolo	no visible o pequeño.	1 ± más a veces grande.	prominente 1 ± más. vesiculoso.
citoplasma	escaso.	variable a veces moderadamente abundante.	moderadamente abundante, con múltiples vacuolas que superponen incluso al núcleo
basofilia citoplasmática.	ligera o moderadamente intensa.	variable	muy intensa
vacuolas citoplasmáticas.	variables	variables	a menudo prominentes.

TABLA No. 2

CLASIFICACION MORFOLOGICA DE LAS LEUCEMIAS AGUDAS DE DIFERENCIACION MIELOIDE, SEGUN EL GRUPO COOPERATIVO DE LA FAB.

- MIELOBLASTICA SIN MADURACION M1:

Diferenciación granulocítica muy escasa, puesta de manifiesto por 3% o más de positividad a peroxidasa y uno o más nucleolos, o proporción variable conteniendo al menos unos gránulos azurófilos, bastones de Auer o ambos.

- MIELOBLASTICA CON MADURACION M2:

Más del 50% de las células medulares son micloblastos y promielocitos. existen a menudo nucleolos y la extensión del citoplasma es variable, conteniendo normalmente muchos gránulos azurófilos. Los cuerpos de Auer casi siempre aislados son frecuentes.

- PROMIELOCITICA M3:

La gran mayoría de las células son promielocitos anormales. La forma del núcleo es variable, a veces oculto por el gran número de granulaciones citoplasmáticas. Es característica la aparición de haces de bastones de Auer. Estos al igual que los gránulos, pueden verse aislados por ruptura celular.

- MIELOMONOCITICA M4:

Existen a la vez formas mieloides y monocitoides. Se distingue de la M2 en la proporción de formas, por exceder del 20% de las células de la sangre periférica. La médula puede semejar a M5.

- MONOCITICA M5:

En sangre periférica blastocis monocitoides más o menos diferenciada. Las células medulares son monoblastos con escaso número de mieloblastos más promielocitos, nunca excediendo el 20% (a diferencia de la M4).

- ERITROLEUCEMIA M6:

Componente eritroblástico superior al 50% de todas las células medulares nucleares, con grados variables de atipia, fundamentalmente con multilobulaciones. Hay un exceso de mieloblastos más promielocitos superiores al 40%.

A. Villegas 1982 (4).

Después de este primer intento de clasificación por grupo cooperativo FAB, el estudio de las leucemias ha permitido conocer un poco más a fondo las diferentes etapas de diferenciación reconociendo además antígenos de superficie en el leucocito, por lo tanto, la reclasificación actual de esta patología cuenta con parámetros morfológicos, citoquímicos e inmunológicos, mediante la detección de marcadores de membrana, persistiendo la clasificación general de leucemias linfoides y aumentando una nueva variante en la mieloides. En 1985, nuevamente el grupo cooperativo FAB incluyó la variedad LMA M7 (Megacarioblástica), con características morfológicas de las células altamente polimórficas, redondas, con escasa cantidad de citoplasma y cromatina densa, parecida a la leucemia linfoblástica L1 y L2 teniendo gránulos y tres nucleolos, éste es redondo con cromatina finamente reticulada, el tamaño de las células es heterogéneo, siendo las tinciones citoquímicas sudán negro B y peroxidasa negativas, PAS positivo y alfa naftil acetato esternas variable.

(2,3,4,5,6)

Tiempo después fue descrita una leucemia mieloides designada como M0, con una mínima diferenciación, debido al parecido que tiene con la L2 y raramente con la L1, solo que estos blastos son grandes y agranulares esta M0 no fue incluida anteriormente por la FAB. (7)

CITOQUIMICAS.

Las tinciones especiales llamadas citoquímicas fueron empleadas por el grupo cooperativo de la FAB para apoyar el diagnóstico así como la clasificación. Su mecanismo de acción se debe a la presencia de la actividad enzimática y constituyentes químicos, los cuales van a reaccionar según el tipo de leucemia que se presente.

Estas tinciones son: Peroxidasa, Acido peryódico (PAS), Fosfatasa ácida, Sudán negro B y Esterasas inespecíficas.

- Peroxidasa: Granulocitos, mieloblastos agranulares hasta un 30% positivos; neutrófilos 100% positivos. Los monocitos con positividad en gránulos dispersos. Positiva en leucemias mieloides.

- PAS: Linfocitos B positivos y en menor grado los linfocitos T. Positiva en leucemias linfoides, y puede ser muy finamente positivo en leucemias mieloides.

- Fosfatasa ácida: Plaquetas y linfocitos T altamente positivos, positividad menor o ausente en linfocitos B. Positiva en leucemias linfoides.

- Sudán negro B: Los eritrocitos y monocitos son positivos, mientras que los linfoblastos son negativos. Positiva en algunas leucemias mieloides.

- Esterasa: Plaquetas y monocitos altamente positivos, granulocitos y linfocitos negativos. Positiva en algunas leucemias mieloides. (Tabla 3).

TABLA No. 3

CLASIFICACION CITOQUIMICA.

FAB	PEROXIDASA	PAS	FOSF.AC.	SUD.NEGRO	ESTERASAS
L1	-	+	-	-	-
L2	-	+	+++	-	-
L3	-	-	+*	-	-
M0	+*	-	-	+*	-
M1	+	-	+/-	+	-/+
M2	+	-	+/-	+	-/+
M3	+	+	+/-	+	-
M4	+	+	+	+	+
M5	-(+*)	+	+	-(+*)	+
M6	+	+	+*	+	-
M7	-	+	-	-	+*

* débilmente.

A. Villegas 1981 (8)

OBTENCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.

Uno de los adelantos recientes más importantes en la Inmunología ha sido la obtención de métodos para producir " in vitro " grandes cantidades de anticuerpos homogéneos contra una sola especificidad antigénica llamado anticuerpo monoclonal. Estos surgieron accidentalmente en el laboratorio de César Milstein en Cambridge, Inglaterra mientras realizaba estudios sobre la genética de las inmunoglobulinas, utilizando técnicas de fusión y clonaje celular.

El origen de estos anticuerpos monoclonales es el hibridoma, la descendencia de la fusión entre células linfoides B normal secretora de anticuerpos y una célula de mieloma de origen animal o humana. Según el método original, se inmuniza un ratón en varias ocasiones con el antígeno deseado y se extirpa el bazo que contiene las células B proliferantes. Las células B, normalmente mueren en cultivo, pero pueden ser inmortalizadas mediante fusión con células de mieloma no secretora exponiéndose a un agente que estimula la fusión celular como el polietilenglicol.

Después de la fusión producida aparecen cierto número de clones de híbrido capaces de producir varios anticuerpos monoclonales para cualquiera de las especificaciones antigénicas que se descubren en el inmunógeno. Luego se seleccionan clones de híbridos con medio de HAT (hipoxantina aminopterín timidina), las células de mieloma no fusionadas son destruidas por carecer de la enzima HGPRT (Hipoxantina guanina fosforribosil transferasa) necesaria para la utilización de purinas exógenas, y las células B de los ratones mueren de forma espontánea. Los híbridos logrados apartir de las células del mieloma (hibridomas) sobreviven a la selección por HAT debido a que las células B aportan enzima HGPRT. Por último los clones seleccionados pueden guardarse en refrigeración, cultivados o inyectados en la cavidad peritoneal de ratones para permitir el cultivo de células plasmáticas con producción de dicho anticuerpo monoclonal. (Fig. 1) (9).

PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

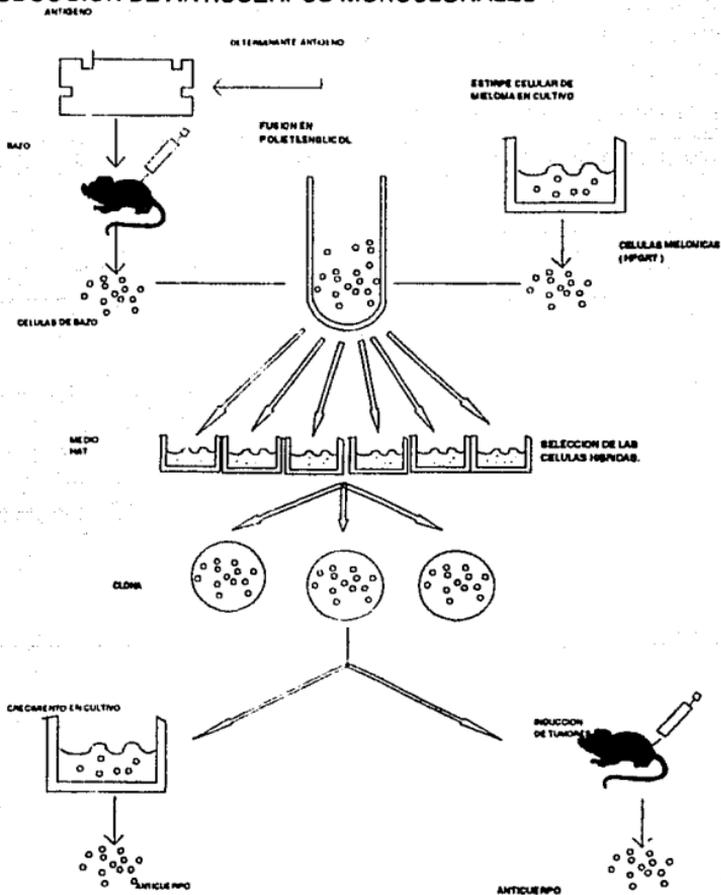


FIGURA No.1

METODOS DE DETERMINACION.

INMUNOFLUORESCENCIA.

La inmunofluorescencia descubierta por Coons en 1941 consiste en revelar sitios antigénicos presente sobre una estructura celular o tisular mediante la aplicación sobre las moléculas de los tejidos de un antisuero específico que previamente se vuelve fluorescente por la fijación de un fluorocromo.

Los fluorocromos más empleados son el isotiocianato de fluoresceína, que da una fluorescencia verde y el isotiocianato de rodamina que da una coloración naranja. (10).

METODOS PARA LA APLICACION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CON INMUNOFLUORESCENCIA.

Se han diseñado técnicas en donde se aplica la metodología del anticuerpo monoclonal y fluorescencia:

1.- Inmunofluorescencia directa: Se utiliza en anticuerpo marcado con el fluorocromo incubando directamente con el sustrato donde se vaya a identificar el antígeno (corte de tejido o células) en condiciones adecuadas. Los anticuerpos que no se unen son lavados y los específicamente unidos se ven al microscopio de fluorescencia.

2.- Inmunofluorescencia indirecta: El primer antisuero se utiliza sin marcar, siendo necesario hacer una segunda incubación con un segundo antisuero marcado con el fluorocromo frente al primero.

3.- Técnica en " sandwich ": Esta técnica se emplea para identificar la presencia de un anticuerpo en tejidos. El antígeno se incuba con el tejido y su fijación se revela con un antisuero marcado específicamente de este antígeno.

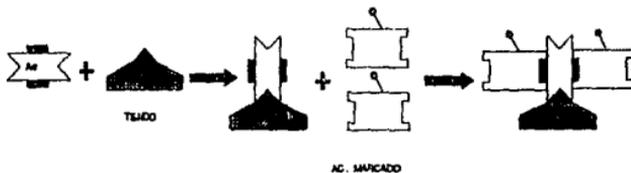
4.- Técnica del complemento: La reacción del anticuerpo específico con el tejido provoca la fijación del complemento, que se añadió anteriormente a la preparación. El complemento se revela con un antisuero marcado dirigido contra un factor del complemento (tomado de S. Sell). fig 2. (11).

METODOS PARA LA APLICACION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CON INMUNO FLUORESCENCIA

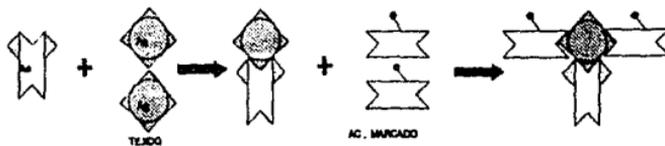
1.- DIRECTO



2.- INDIRECTO



3.- SANDWICH



4.- COMPLEMENTO

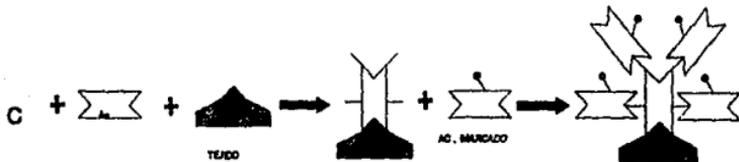


FIGURA 2

CLASIFICACION INMUNOLOGICA.

Uno de los adelantos más importantes de la última década es la clasificación inmunológica de las leucemias.

La aplicación de anticuerpos monoclonales (marcadores de membrana) ha hecho posible la identificación de las subpoblaciones linfoides de: linfocitos T y linfocitos B que se traducen en estadios de maduración.

Estos estudios inmunológicos aplicados a las células leucémicas han permitido la clasificación inmunológica y se aceptan tres grandes grupos: LLA B, LLA T y LLA no T no B, y dentro de éste último grupo, la aplicación del suero antilinfocítico de Greaves (antígeno calla) ha permitido separar en dos subgrupos uno positivo y el otro negativo al antisuero, el primero corresponde a la LLA "Común" y el segundo a la LLA "Nula".

CARACTERISTICAS DE LOS GRUPOS.

LLA B: En este grupo se observa un número escaso de leucemias (2%), presenta inmunoglobulinas de superficie y antígeno Ia. Morfológicamente son compatibles con la leucemia "Tipo Burkitt" (L3).

Un pequeño grupo presenta inmunoglobulinas citoplasmáticas (IgM) y antígeno común (calla) clasificandola como pre B. Estas leucemias son de mal pronóstico.

LLA T: Se observa aproximadamente en el 20% de los pacientes, presentan enzima terminal deoxinucleotidil transferasa (tdt), los linfoblastos presentan receptores de membrana para eritrocitos de carnero y antígeno timocítico humano (HTA), son calla negativos y carecen de antígeno Ia. Estas leucemias son de mal pronóstico.

Existe un pequeño grupo dentro de la LLA T, con antígeno común y ausencia de receptores para eritrocitos de carnero y estas son de mejor pronóstico.

LLA no T no B dividida en dos subgrupos:

- LLA "Común": Es la forma más frecuente en niños, abarcando el 70% de los casos de 3 a 5 años de edad. Las células blásticas son no T no B, poseen antígeno Ia, tdt y reaccionan positivamente con el antisuero de Graves. Un 30% de ellas presentan IgM intracitoplasmáticas, por lo que se les denomina células pre B, estas son de mejor pronóstico.

- LLA "Nula" o indiferenciada o inclasificable: Corresponde a un reducido número, que carecen de antígeno común (callea negativos), clínicamente indistinguibles de la LLA común. Pueden presentar antígeno Ia o tdt, este grupo se presenta generalmente en adultos, con pronóstico intermedio entre las formas comunes no T no B y la LLA T.

El estudio de los marcadores inmunológicos y su correlación con la FAB ha sido reportada por A. Villegas, que existe una mayor correlación entre:

- L1 y el antígeno callea.
- L3 y la expresión para marcadores B.

No obstante de lo antes mencionado cabe señalar que no existe una exacta correlación entre la clasificación citomorfológica y la inmunológica, ya que tanto la L1 como la L2 pueden corresponder a la LLA T, a la LLA no T no B, o a la forma "nula". (tabla 4) (2,4, 13, 14).

TABLA No. 4

CLASIFICACION INMUNOLOGICA.

	NULA*	PRE B	B	T	M7	MELOIDE	VAL. REF.
TDT	-	+	-/+	-	-/+	-	12 ± 5
CD10	-	+	-/+	-	+/-	-	< 1
CD19	-	+	+	-	-/+	-	10 ± 5
CD22	-	-	+	-	-/+	-	10 ± 5
CD34	++	-	-	-	+	+/-	< 1
CD11	-	-	-	-	+	+	3 ± 2
CD41	-	-	-	-	+	-	30 ± 10
CD3	-	-	-	+	-/+	-	70 ± 10

*no T no B (calle -)

Calle (CD10).

VAL. REF. = Valores de Referencia

Carl. Pochedly, 1990 (15)

GENERALIDADES SOBRE LAS LEUCEMIAS.

INCIDENCIA.

La leucemia linfoblástica aguda predomina en la etapa infantil y juvenil representando un 80-85%, y la leucemia no linfoblástica aguda (LNLA) ó mieloblástica (LMA) está integrada por menos de un 20% aproximadamente, presentándose con mayor frecuencia en niños la leucemia de tipo LLA L1.

La incidencia de leucemia es ligeramente mayor en varones que en mujeres, encontrándose entre los 3 y 5 años de edad (40%), en los neonatos es extremadamente rara, observándose sólo escasas de tipo mieloblástica.

La mayor incidencia es en países de mayor nivel social afectando con mayor frecuencia a la raza blanca que a la negra. (4).

ETIOLOGIA.

La etiología es desconocida pero se han señalado varios factores que son:

- Radiaciones ionizantes.
- Sustancias químicas incluyendo fármacos (benceno, agentes alquilantes, sulfamidas, cloramfenicol, fenilbutazona, hexaclorociclohexano).
- Virus oncogénicos: encontrándose en pacientes leucémicos partículas víricas caracterizadas como RNA virus (oncomavirus). El virus de la mononucleosis infecciosa se relaciona directamente con un síndrome linfoproliferativo.

- Alteraciones cromosómicas: Síndrome de Down (trisomía en par 21).

Síndrome de Bloom.

Anemia de Fanconi.

Ataxia-telangectacia.

Defectos inmunológicos congénitos generalmente asociados a rupturas cromosómicas y translocaciones.

- Predisposición genética: La incidencia es 12 veces mayor en gemelos univitelinos que en bivitelinos apareciendo la leucemia durante los cuatro primeros años de vida.

- Factores ambientales: Observándose con mayor frecuencia en varios miembros de la familia lo que parece señalar un factor ambiental y no genético determinante de la leucemia.

CUADRO CLINICO.

La leucemia puede manifestarse bien de forma incidiiosa, siendo un descubrimiento casual en un estudio de sangre periférica caracterizado por una proliferación de células anormales a nivel de médula ósea, estas células anormales pasan después a sangre periférica, se infiltran y se multiplican en el bazo, ganglios linfáticos, hígado y otros tejidos produciendo el engrandecimiento de estos órganos.

SIGNOS Y SINTOMAS.

Se refiere: astenia, anorexia, sudoración, pérdida de peso al inicio de la enfermedad, debido a la actividad neoplásica. Anemia producida por la incapacidad de la médula ósea para producir precursores eritroides. Fiebres ocasionadas por procesos infecciosos de vías aéreas, urinarias o del tubo digestivo, debido a las condiciones de inmunosupresión. Fenómenos hemorrágicos debido a la trombocitopenia, como son: petequias, equimosis, epistaxis, hemorragia digestiva, cerebral (rara). También se observa Invasión extramedu-

lar, dolores óseos, meningismo, hepatosplenomegalia, adenomegalia; Invasión a SNC por síndrome meníngeo (vómito, cefaleas, papiledema, signos neurológicos de irritación meníngea y convulsiones).

LEUCEMIA MEGACARIOBLASTICA (M7).

Esta leucemia representa la proliferación de una o más clonas de células hematopoyéticas precursoras de la serie megacariocítica / trombocítica.

El primer caso de leucemia megacarioblástica fué descrita en 1931 por Von Boros y Korenyi. Se consideraba que la leucemia megacarioblástica (M7) era muy rara debido a la falta de criterios morfológicos. Hacia finales de la década de los 70's se encontró que la mayoría de los casos diagnosticados de mielofibrosis aguda o de mieloesclerosis maligna correspondían a leucemias megacarioblásticas, se encontraron entonces dos métodos para definirlos con certeza como son: la peroxidasa plaquetaria identificable por microscopía electrónica y la inmunocitoquímica empleando anticuerpos monoclonales que identifican estructuras específicas en la membrana de precursores de serie plaquetaria (megacariocítica) (16, 17).

Se presenta una incidencia del 8-10% en adultos y 3% en niños aproximadamente de todas las leucemias agudas, y un 21% en leucemias no linfoblásticas agudas. (18, 19).

En 1985 el grupo cooperativo de la FAB publicó criterios para establecer el diagnóstico de la LMA M7. en esta publicación destacan tres puntos:

1.- La morfología por sí sola es insuficiente para establecer el diagnóstico confundiendo con MO, L1, L2 y M1.

2.- Se incluyen métodos de microscopía electrónica o de inmunocitoquímica para establecer el diagnóstico definitivo de esta entidad.

3.- En virtud de la dificultad que en ocasiones existe para el aspirado de médula ósea se puede realizar el diagnóstico en sangre periférica. (20, 21).

La leucemia megacarioblástica presenta variantes que son:

A) Leucemias agudas megacarioblásticas primarias (de novo) con o sin mielofibrosis.

B) Leucemias agudas megacarioblásticas secundarias a un síndrome dismicropoyético o mieloproliferativo.

C) Proliferaciones megacarioblásticas limitadas como micropoyesis transitoria anormal del recién nacido con síndrome de Down.

Las dos primeras formas son las más frecuentes, en algunas series las leucemias megacarioblásticas secundarias son más frecuentes que las primarias (las leucemias megacarioblásticas agudas con mielofibrosis son más frecuentes que aquellas sin mielofibrosis. (22).

FENOTIPO INMUNOLOGICO.

Probablemente los anticuerpos monoclonales CD61 (GP IIIa) y el CD 41 (complejo glucoproteico IIb/IIIa) sean los más útiles para identificar los megacarioblastos. Desde el punto de vista oncogénico parece que la glucoproteína IIIa es la primera en aparecer, seguida de la glucoproteína IIb/IIIa, más tarde se detecta el complejo glucoproteico IX/Ib y posteriormente antígenos asociados al factor VIII (factor VIII: factor Von Willebrand).

Además los megacarioblastos pueden expresar antígenos de células precursoras de serie mielóide (CD 13 y CD 33) pero no antígenos de diferenciación granulocítica (CD 15) o monocítica (CD 14), ocasionalmente coexpresan antígenos de serie linfóide (CD 10 calla) y de serie eritroide (receptor de transferrina de hierro, zinc, glicoforina). La expresión de antígenos inmaduros de precursores hematopoyéticos (CD 9, CD 34 y HLA-DR) es frecuente en megacarioblastos no es infrecuente que en las leucemias megacarioblásticas haya otro componente maligno mieloproliferativo como por ejemplo una población eritroide o mielóide que se mezcla con el componente megacarioblástico.

Se ha descrito también la existencia de leucemias verdaderamente híbridas (linfoblásticas/mieloblásticas) con un componente megacarioblástico (22, 23, 24).

CITOQUIMICAS.

La peroxidasa y Sudán negro B son habitualmente negativos, la esterasa de acetato alfa-naftil y la esterasa de acetato naftil AS-D pueden ser positivos y eso causar confusión con proliferación de serie monocítica. La fosfatasa ácida y PAS son habitualmente positivas en megacarioblastos (21).

ANORMALIDADES GENETICAS.

Dentro de las leucemias que ocurren en pacientes con trisomía 21 (síndrome de Down), probablemente la más frecuente sea la M7 e inversamente en algunas series, hasta el 29% de los niños con M7 tienen síndrome de Down. (25).

CUADRO CLINICO.

Salvo la hemorragia grave dependiente de trombocitopenia como de trombocitopatía adquirida por megacariopoyesis defectuosa, el cuadro clínico de los pacientes con leucemia megacarioblástica no difiere de otras leucemias agudas mieloides, la hepatoesplenomegalia son relativamente frecuentes en tanto que las adenopatías son frecuentes en niños, en la mayoría de los pacientes se detecta anemia, la cifra de leucocitos puede ser variable desde bajo hasta altos, a diferencia de lo observado en otras leucemias, puede cursar con cifras plaquetarias normales e incluso trombocitosis. La hemorragia es grave ya que las plaquetas suficientes en número, son defectuosas en sus funciones. (26, 27, 28, 29).

PRONOSTICO.

El pronóstico de los pacientes con M7 es malo, tal vez peor que el de otras leucemias mieloides. En un análisis de valor pronóstico de marcadores inmunológicos en pacientes con leucemia mieloblástica, se ha encontrado recientemente que la expresión de los antígenos de serie megacarioblástica CD41, CD42 constituyen un factor pronóstico adverso (30).

TRATAMIENTO.

El objetivo del tratamiento es erradicar las células leucémicas que infiltran la médula ósea para restaurar la hematopoyesis normal. Consta de cuatro etapas: inducción a la remisión, intensificación o consolidación, profilaxis de infiltración a SNC y mantenimiento.

El tratamiento se aplica de acuerdo a los grupos de riesgo, que se han separado: existen pacientes de riesgo habitual y otros de riesgo alto, en ocasiones también se incluye un grupo de riesgo intermedio.

Son factores asociados al alto riesgo: La edad (menores de dos años o mayores de dos años), el sexo masculino, la leucocitosis inicial (más de 50, 000 leucocitos), la infiltración a órganos como la hepato o esplenomegalia que rebasa la cicatriz umbilical, la presencia de tumoración mediastinal, el inmunofenotipo.

TRATAMIENTO PARA LA LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA.

Inducción de la remisión, durante un mes.

Prednisona: 40 mg/m² /día, vía oral durante 28 días.

Vincristina: 1.5 mg/ m² / semana, vía intravenosa durante 4 semanas.

Daunomicina: 25 mg/m² /semana, vía intravenosa durante 4 semanas.

Profilaxis del SNC (empezando a las cuatro semanas, si se logra la remisión).

Irradiación craneal con 60 Co: durante dos semanas y media:

2400 rad para niños de más de dos años de edad.

2000 rad para niños de uno a dos años de edad.

1500 rad para niños de menos de un año de edad.

Metotrexato intratecal:

12 mg/m² / dos veces a la semana por dos semanas y media, durante la irradiación craneal.
Una sola dosis, limitada a 15 mg.

Tratamiento de continuación, durante treinta meses:

6-mercaptopurina: 5 mg/m² / día por vía oral.

Metotrexato: 20 mg/m² / semana, vía intravenosa.

TRATAMIENTO DE LA LEUCEMIA NO LINFOBLASTICA.

En estas leucemias también se aplica el tratamiento en cuatro fases, al igual que en las linfoblásticas, pero en estas leucemias se emplea arabinósido de citosina y esquemas de poli quimioterapia cuya base son las antraciclinas, el apoyo de los bancos de sangre para dar una terapia sustitutiva, el tratamiento de las complicaciones infecciosas con antibióticos de amplio espectro, el descubrimiento de nuevas drogas citotóxicas y el trasplante de médula ósea. (31).

TRATAMIENTO DE LA LMA M7.

Como se mencionó anteriormente el pronóstico de los pacientes con M7 es malo, tal vez peor que el de otras leucemias mieloides. El curso de la enfermedad sin tratamiento es más agresivo y fatal a corto plazo, el mejor tratamiento existente en la actualidad es el trasplante de médula ósea.

En relación a la quimioterapia, debido a que la identificación de esta leucemia es relativamente reciente, se ha determinado que no existe en el momento actual estudios prospectivos controlados para evaluar de forma adecuada la efectividad de diversos esquemas antileucemicos.

Recientemente fué publicado por el grupo de Puebla un estudio prospectivo de 14 pacientes con leucemia M7 de " novo " tratados con dos tipos de esquemas, siete enfermos con dosis bajas (10 mg/m subcutáneas de arabinósido de citosina) cada 12 horas durante

21 días, y 7 enfermos con quimioterapia combinada más agresiva (antraciclina, vincristina, arabinósido de citosina, tioguanina). Se encontró que la supervivencia fué superior a los 18 meses para el grupo tratado con el esquema más agresivo (42% frente a 14%), las diferencias observadas no fueron significativas. Los esquemas inductores de hipoplasia medular grave (arabinósido de citosina en infusión continua durante 7 días con alguna antraciclina durante 3 días, esquemas 7/3) parece ser por ahora uno de los mejores tratamientos para le leucemia M7. (32, 33).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

En un estudio realizado durante el periodo de enero a diciembre de 1991, de 108 estudios citoquímicos en médula ósea y/o sangre periférica de pacientes leucémicos se, encontró que: 55/108 (50.9%) fueron catalogados como leucemia linfoblástica aguda; 22/108 (20.3%) como leucemia mieloblástica aguda; 18/108 (16.6%) de estirpe indiferenciada y 13/108 (12.0%) se excluyó por no ser valorable.

Con los estudios citoquímicos no fué posible la identificación de la leucemia megacarioblástica, lo que limita la investigación y el tratamiento al paciente.

El empleo de nuevas tecnologías como son los anticuerpos monoclonales nos permiten hacer mejores diferenciaciones. Por ello, se pretende tipificar completamente a los pacientes leucémicos que se presenten al Servicio de Hematología Pediátrica del Centro Médico "La Raza" por ambos métodos (citoquímicos y anticuerpos monoclonales) y así proporcionar una identificación completa del padecimiento, con beneficio al paciente, pues el tratamiento será específico; además de obtener al mismo tiempo la incidencia de los diferentes tipos de leucemias en la población pediátrica en estudio.

OBJETIVOS:

- Conocer la incidencia de leucemia megacarioblástica en el Servicio de Hematología Pediátrica del Hospital General Centro Médico " La Raza ".
- Correlacionar la clasificación obtenida por pruebas citoquímicas y detección de leucemias con anticuerpos monoclonales.

HIPOTESIS:

Si dentro de la clasificación de leucemias por técnicas morfológicas y citoquímicas no está contemplada la leucemia megacarioblástica, mientras que con anticuerpos monoclonales es posible identificarla, entonces encontraremos que hay algunos pacientes que fueron clasificados erróneamente con un tipo de leucemia diferente a la megacarioblástica. Esta nueva tecnología utilizando anticuerpos monoclonales modificaría los resultados de incidencia de los diferentes tipos de leucemia y con ello el tratamiento al paciente.

MATERIAL Y EQUIPO:

Material Biológico:

Sangre periférica y/o médula ósea anticoagulada aproximadamente 5 ml. Médula ósea (frotis)

Material de vidrio:

Cajas de petri " Pyrex ".

Cámara de Neubauer " American Optical ".

Capilares sin heparina " Propper ".

Cubre hematímetros " NBS ".

Cubreobjetos de 22 x 22 mm. " Madesa ".

Embudos de vidrio talle corto " Pyrex ".

Matraces volumétricos de: 50, 100, 500, 1000 ml "Pyrex".

Matraces Erlenmeyer de: 25, 50, 125 y 250 ml " Pyrex ".

Pipetas graduadas de: 1, 2, 5 y 10 ml " IVA ".

Pipetas Pasteur.

Pipetas de Sahli " Propper Trophy ".

Pipetas de Thoma para glóbulos blancos " Propper Trophy"

Pipetas de Thoma para glóbulos rojos " Propper Trophy ".

Portaobjetos de 26 x 76 mm " Madesa ".

Probetas de: 10, 50, 100 y 500 ml " Pyrex ".

Tubos de ensaye 13 x 100 y 12 x 75 mm " Pyrex ".

Vasos de Coplin.

Vasos de precipitado: 50, 100, 250 y 500 ml " Pyrex ".

Material Diverso:

Accite de inmersión " Sigma Zeiss ".

Algodón y gasas.

Aplicadores de madera.

Barra magnética.

Espátula.

Gradillas.

Jeringas de plástico de: 5, 10 y 20 ml " Jeriplas ".

Mechero Fisher.

Papel filtro.

Papel Parafilm " American Company ".

Pipetas automáticas de: 5, 10, 20, 25, 50, 100 y 500 ml.

Rejilla de alambre.

Tripic.

Contador (piano) " Clay Adams ".

Equipo:

Balanza analítica " Mettler ".

Balanza granataria "Mettler".

Centrífuga "Sol Bat".

Congelador a - 20 ,C " Revco Rheem".

Refrigerador a 4, C " General Electric ". Mod. G 95 B.

Microscopio de luz visible " Carl Zeiss". Mod. West Germany.

Lámpara de epifluorescencia " Carl Zeiss ". Mod. West Germany.

Espectrofotómetro " Leitz ". Mod. M

Agitador mecánico de pipetas " J 15 ". Serie F.

Potenciómetro "Beckman ". Mod. 3500.

Microcentrífuga " Sol Bat ". Mod. H-07.

Reactivos:

Sólidos

Ferrocianuro de potasio. R.A Merck.

Cianuro de potasio. R.A Allied Chemical.

Bicarbonato de sodio. R.A Merck.

Oxalato de amonio. R.A Sigma.

Benzidina diclorhidrato. Q.P Sigma.

Sulfato de zinc heptahidratado. R.A Omnicem.

Fenol (cristales). R.A Backer.

Fosfato de sodio dibásico dodecahidratado. R.A Backer.

Fosfato de sodio dibásico anhidro. R.A Backer.

Acido Peryódico. Q.P Sigma.

Metabisulfito de sodio. R.A Backer.

Carbón activado. R.A Sigma.

Nitrito de sodio. R.A Merck.

Acetato de sodio trihidratado. R.A Monterrey.

Naftol AS-BI fosfato. Q.P Sigma.

Alfa Naftil Acetato. Q.P Sigma.

Cloruro de sodio. R.A Merck.

Fosfato de potasio dibásico. R.A Backer.

Cloruro de potasio. R.A Merck.

Hidróxido de sodio. R.A Merck.

Líquidos:

Acido acético glacial. R.A Merck.

Formaldehído. R.A Merck

Etanol absoluto. R.A Omnicem.

Peróxido de hidrógeno. R.A Técnica Química.

Acido clorhídrico. R.A Backer.

Acetona. R.A Técnica Química.

N,N Dimetil formamida. R.A Merck.

Ficoll-Hypaque. Q.P Pharmacia Fine Chemicals.

Agua destilada.

Glicerol. R.A Backer.

Anticuerpos Monoclonales " Behring ":

tdt, CD3, CD10, Leucemias de tipo T (L2).

CD10, CD19, CD22. Leucemia tipo B (L3) y tipo pre B (L1).

CD34 Células stem pluripotenciales tanto mieloides como linfoides.

CD11 Leucemias mieloides.

CD41 Leucemias megacarioblásticas.

Colorantes:

Safranina "0". Q.P Merck

Sudán negro B. Q.P Sigma.

Fuchsin básica. Q.P Sigma.

Clorhidrato de p-rostanilina. Q.P Sigma.

Verde de metilo. Q.P Sigma.

Leishman. Q.P Sigma.

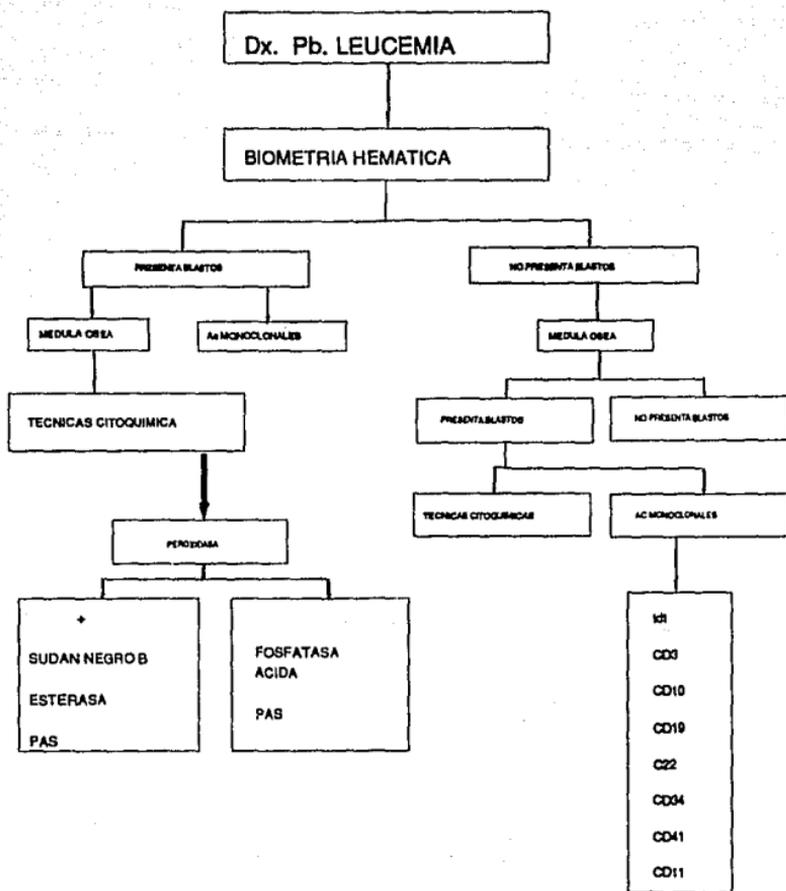
Giemsa. Q.P Sigma.

Hematoxilina de Harris. Q.P Sigma.

Hematoxilina de Mayer. Q.P Sigma.

Azul rápido. Q.P Sigma.

DIAGRAMA DE FLUJO



MÉTODOS:

TINCIÓN DE LEISHMAN-GIEMSA.

FUNDAMENTO:

Está formado por la combinación de un colorante ácido y un básico que permite su uso en una tinción simple para producir una variedad de reacciones de color predecibles. Los colorantes ácidos se unen con los componentes básicos de las células (citoplasma). Inversamente los colorantes básicos son atraídos por los compuestos ácidos de las células y se combinan con ellos (ácidos nucleicos y nucleoproteínas del núcleo).

PROCEDIMIENTO:

1. Tefir durante 6 min aproximadamente con colorante de Leishman.
2. Enjuagar 2 veces con agua destilada.
3. Tefir con Giemsa 3 min aproximadamente.
4. Enjuagar con agua destilada.

* Los tiempos dependen de la maduración del colorante.

TINCION DE PEROXIDASA:

FUNDAMENTO:

Las peroxidasa que contienen hierro son localizadas en los gránulos primarios (azurófilos) de los miembros de serie mielóide. Su presencia puede ser demostrada por medio de sustancias cromogénicas (SH₂) y H₂O₂. El peróxido oxida rápidamente las sustancias indicadoras de peroxidasa incoloras (I) a productos coloreados de acuerdo a la siguiente reacción:



PROCEDIMIENTO:

1. Fijar los frotis de sangre periférica o médula ósea con la mezcla de etanol-formol durante 60 seg.
2. Lavar las laminillas con agua destilada por 30 seg.
3. Sumergir las laminillas en la solución de tinción por 30 seg. y lavar con agua corriente.
4. Contrateñir con safranina por 60 seg, lavar con agua corriente, dejar secar.
5. Observar al microscopio con objetivo de inmersión.

INTERPRETACION:

Las células peroxidasa positivas contienen gránulos negros.

TINCIÓN DE ÁCIDO PERYODICO DE SCHIFF (PAS).

FUNDAMENTO:

El glucógeno de las células hemáticas es el polisacárido más importante, reacciona positivamente al reactivo de Schiff. Otros polisacáridos dan reacción positiva como el almidón, celulosa y glucoproteínas. La fase inicial de la tinción de PAS es la oxidación de los polisacáridos. El ácido escinde los grupos hidroxilos próximos y forma dialdehídos, posteriormente los aldehídos reaccionan con la leucofucina (reactivo de Schiff), y forman compuestos quinonoidicos coloreados. El glucógeno es la única sustancia PAS positiva que es diastasa (amilasa) sensible.

PROCEDIMIENTO.

1. Fijar los frotis con vapores de formol durante 5 min.
2. Lavar con agua corriente durante 15 min, lavar con agua destilada una vez y dejar secar.
3. Tratar con ácido peryódico por 10 min.
4. Lavar con agua corriente varias veces y con agua destilada dos veces, dejar secar perfectamente.
5. Incubar en reactivo de Schiff por 45 min al abrigo de la luz. El tiempo depende de la aparición de un color rosado sobre las laminillas. Se debe tener cuidado de que el reactivo sea siempre incoloro, si aparece el tinte rosado desecharlo. Debe cuidarse que el reactivo no tenga contacto con el agua.
6. Lavar con metabisulfito de sodio al 0.5% tres veces cada lavado por 3 minutos.

7. Lavar con agua destilada tres veces por 3 minutos, dejar secar.
8. Contrateñir con Hematoxilina de Harris de 8-10 min. 9. Lavar rápidamente con agua.

INTERPRETACION:

El material que contiene carbohidratos se tñe de rosa mexicano.

TINCION DE FOSFATASA ACIDA.

FUNDAMENTO:

La fosfatasa ácida está presente en las células mieloides, linfocitos, células plasmáticas, monocitos y plaquetas.

Las fosfatasas poseen la característica de liberar fosfatos de muchos fosfomonoésteres alcohólicos o fenólicos a un pH fuera de la neutralidad. Su demostración depende de la presencia de un precipitado coloreado en los sitios de hidrólisis del sustrato.

PROCEDIMIENTO:

1. Fijar los frotis de médula ósea o sangre periférica con acetona formalina durante 30 seg.
2. Lavar los frotis con agua destilada 3 veces.
3. Pasar los frotis a la mezcla de incubación durante 60 min. a 37 C.
4. Lavar dos veces con agua destilada.
5. Contrateñir con verde de metilo al 1% en amortiguador de acetatos 0.1 N pH 5.0 durante dos minutos.
6. Lavar rápidamente con agua corriente y dejar secar.

INTERPRETACION:

La tinción difusa del citoplasma o gránulos de color rojo indican reacción positiva.

TINCION DE SUDAN NEGRO B.

FUNDAMENTO:

El Sudán Negro B tñe una variedad de lípidos, incluyendo grasas neutras, fosfolípidos y esteroides. La presencia de los lípidos se demuestra por la capacidad del colorante de abandonar su solvente y concentrarse preferencialmente en el lípido intracelular.

PROCEDIMIENTO:

1. Fijar la extensión de médula ósea con vapores de formol durante 15 min.
2. Sumergir en solución de trabajo por 45 min.
3. Lavar con etanol absoluto.
4. Lavar con agua corriente y dejar secar.
5. Contrateñir con Giemsa de 3 a 6 min.

INTERPRETACION:

Los gránulos citoplasmáticos negros o coloración negra difusa del citoplasma indican reacción positiva.

TINCIÓN DE ESTERASA NO ESPECÍFICA.

FUNDAMENTO:

Las esterases son un grupo de enzimas lisosomales que hidrolizan ésteres alifáticos y aromáticos. La esterasa no específica se puede demostrar usando alfa-naftil-acetato como sustrato y p-rostanilina como agente copulante azo para formar un colorante diazo café-rojizo.

PROCEDIMIENTO:

1. Fijar con vapores de formol de 4 a 5 min.
2. Lavar con agua corriente y después con agua destilada, secar al aire.
3. Los frotis de médula ósea serán desengrasados con éter por inmersión durante 60 seg.
4. Mezclar 2 gotas (0.1 ml) de solución de nitrito de sodio al 4% y 2 gotas de p-rostanilina al 4%, dejar reposar por lo menos 60 seg. diluir la mezcla con 5 ml de solución amortiguadora de fosfatos 0.2 M de pH 7.0 - 7.1
5. Disolver completamente 10 mg de alfa-naftil-acetato en 0.3 ml de acetona. Diluir en 20 ml de solución amortiguadora de fosfatos, agitar enérgicamente hasta la desaparición del enturbiamiento inicial.
6. Mezclar las soluciones 4 y 5, filtrar la mezcla (solución de incubación).
7. Incubar los frotis durante 60 min. a temperatura ambiente.
8. Lavar con agua corriente.
9. Contrateñir con Hematoxilina de Mayer de 8 a 10 min.
10. Lavar con agua corriente.

INTERPRETACION:

El citoplasma de las células que poseen una actividad esterásica se colorea de café-rojizo. La reacción es particularmente indicativa de monocitos, donde el citoplasma se colorea de una manera homogénea e intensa. Los linfocitos T muestran algunos gránulos aislados del mismo color.

SEPARACION DE CELULAS MONONUCLEARES.

FUNDAMENTO:

Las células mononucleares son separadas de los demás elementos formes de la sangre por medio de la centrifugación por gradiente de densidad. Este depende de la gravedad específica de un gradiente (lineal o discontinuo) constituido por soluciones como albúmina o Ficoll.

Las células más ligeras tienen una mayor relación núcleo-citoplasma formando una capa en la cercanía de la parte superior del gradiente, con cada población celular buscando la gravedad específica que le corresponde en el gradiente.

PROCEDIMIENTO:

- Tomar de 3-5 ml de sangre periférica y/o médula ósea con 3 ó 4 gotas de heparina.
- Diluir la muestra con solución amortiguadora de PBS pH 7.2-7.4 (1:3 v/v), mezclar.
- Estratificar 4 ó 5 ml de sangre periférica y/o médula ósea con Ficoll-Hypaque (1:3 v/v), en un tubo de ensaye de 13 x 100 mm agregar el volumen de ficoll-Hypaque y con ayuda de una pipeta Pasteur agregar poco a poco y por las paredes la muestra diluida.
- Tapar los tubos con papel parafilm.
- Centrifugar a 400 r.p.m. por 30 minutos.
- Con una pipeta Pasteur separar la fracción de linfocitos (separados como una capa de células en la interfase). Procurando tomar sólo esta capa.

- Transferir la fracción de linfocitos a un tubo de 13 x 100 mm y lavar las células con solución amortiguadora de PBS (5 ml para cada lavado), por centrifugación a 1400 r.p.m. durante 10 minutos, decantar.

- Se hacen tres lavados, decantar el sobrenadante.

- Resuspender en un mínimo de volúmen con solución amortiguadora PBS aproximadamente 1.0 ml.

CONTEO DE CELULAS Y PORCENTAJE DE VIABILIDAD.

- Con la suspensión de células obtenidas cargar una pipeta de thoma para globulos blancos hasta 0.5 y con azul de tripano aforarla.

- Se agita la pipeta y se desechan las primeras gotas.

- Se monta la cámara de Neubauer.

- Se realiza el conteo de las células y al mismo tiempo se cuantifica la viabilidad. (Las células muertas aparecen teñidas de azul, y las células vivas no).

IDENTIFICACION DE LA ESTIRPE LINFOCITARIA POR MEDIO DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.

Esta técnica se lleva a cabo por método indirecto:

- diluir 45 μ l el anticuerpo monoclonal con 45 μ l de amortiguador PBS, se agita en vortex suavemente sin que haga espuma, perfectamente tapado.
- Colocar 50 μ l de cada uno de los anticuerpos monoclonales en tubos de 8 x 25 mm y agregar 50 μ l de la suspensión linfocítica depositando en el fondo de los tubos, se tapan con parafilm y se agita en vortex suavemente.
- Incubar por 30 minutos en un baño de hielo.
- Se hacen dos lavados de 5 minutos a 1400 r.p.m. con 500 μ l de amortiguador PBS.
- Tirar el sobrenadante y en un mínimo resuspender con 1 gota de PBS con glicerol (pH 7.4 al 1%).
- Montar las laminillas de cada uno de los tubos

INTERPRETACION

Observar la preparación al microscopio con fuente de luz normal, al cerrar el diafragma y observar las células positivas las cuales presentan fluorescencia y las negativas no.

RESULTADOS.

Gráfica No. 1 Nos muestra la clasificación morfológica de las leucemias agudas, porcentaje de incidencia de cada una de ellas (tanto LLA, LMA e indiferenciadas).

Gráfica No. 2 También nos muestra el porcentaje de incidencia de leucemias agudas, pero está es clasificada citoquímicamente (LLA, LMA e Indiferenciada).

Gráfica No. 3 Se observa el porcentaje de incidencia de las leucemias agudas pero clasificada inmunológicamente (LLA, LMA e Indiferenciadas), aquí también nos indica el porcentaje de leucemias indiferenciadas que no se pudieron clasificar por anticuerpos monoclonales debido a la falta de células.

Gráfica No. 4 Muestra la clasificación de los diferentes subtipos de leucemias encontradas así como una comparación de los métodos empleados. Debido a la falta de anticuerpos monoclonales no se pudieron clasificar los subtipos de leucemias mieloides excepto la M7.

Gráfica No. 5 Esta gráfica demuestra la incidencia de la M7 con respecto a todas las leucemias.

Gráfica No. 6 Nos representa la incidencia de la M7 con respecto a las leucemias mieloides (LMA ó LNLA).

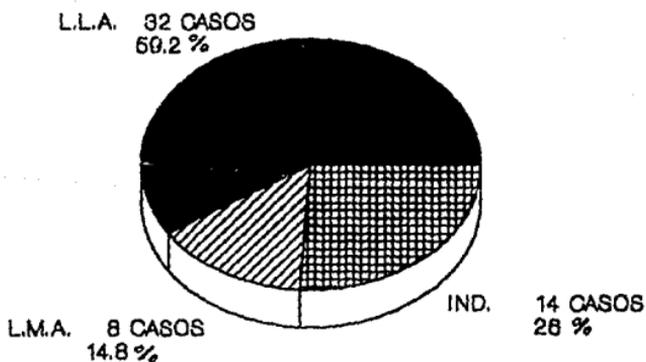
Tabla No. 5 Nos indica , los dos casos de M7 encontrados por anticuerpos monoclonales así como una comparación entre la clasificación morfológica y citoquímicamente.

Tabla No. 6 Nos indica el porcentaje de leucemias que se presenta de acuerdo a la edad y sexo.

Tabla No. 7 Representa la correlación que existe entre los casos clasificados morfológica y citoquímicamente que fueron 20 casos (37%).

Tabla No. 8 Nos muestra la correlación que hay entre los casos clasificados citoquímicamente como inmunológicamente que fueron 27 casos (50.0 %).

INCIDENCIA DE LEUCEMIAS AGUDAS CLASIFICACION MORFOLOGICA

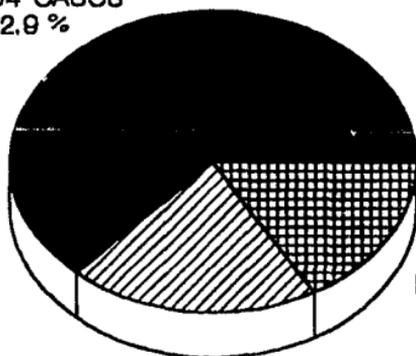


IND. =INDIFERENCIADA

GRAFICA 1

INCIDENCIA DE LEUCEMIAS AGUDAS CLASIFICACION CITOQUIMICA

L.L.A. 34 CASOS
62.9 %



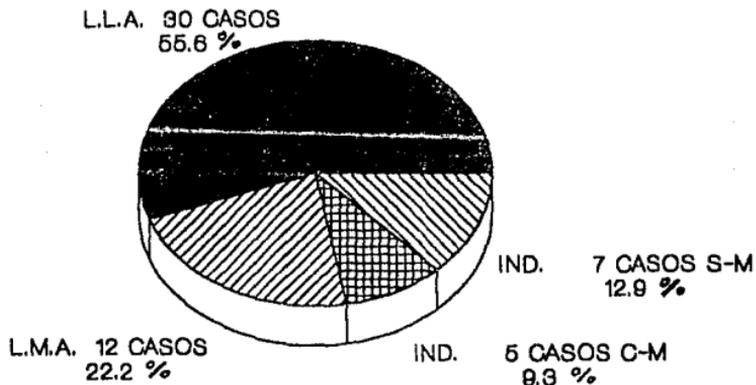
IND. 9 CASOS
16.6 %

L.M.A. 11 CASOS
20.2 %

IND. = INDIFERENCIADA

GRAFICA 2

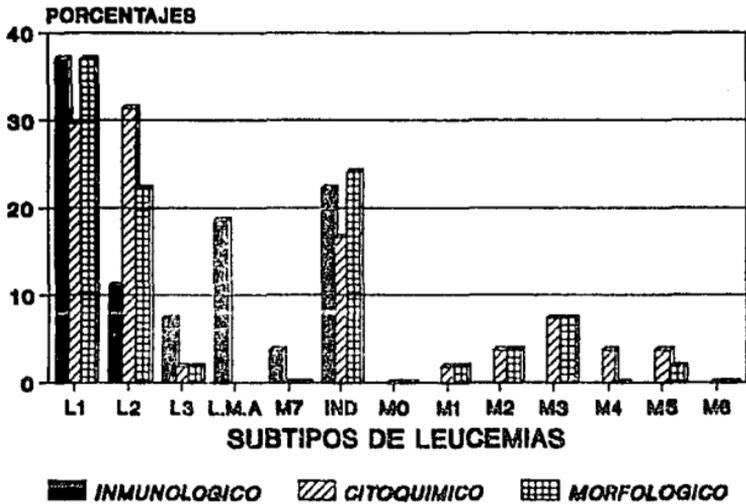
INCIDENCIA DE LEUCEMIAS AGUDAS CLASIFICACION INMUNOLOGICA



IND. = INDIFERENCIADA

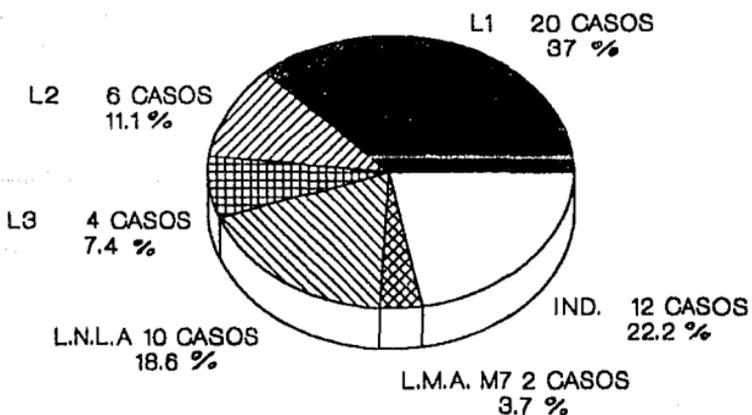
GRAFICA 3

**CLASIFICACION DE LOS SUBTIPOS DE LEUCEMIAS
DE ACUERDO A DIFERENTES METODOS.**



GRAFICA 4

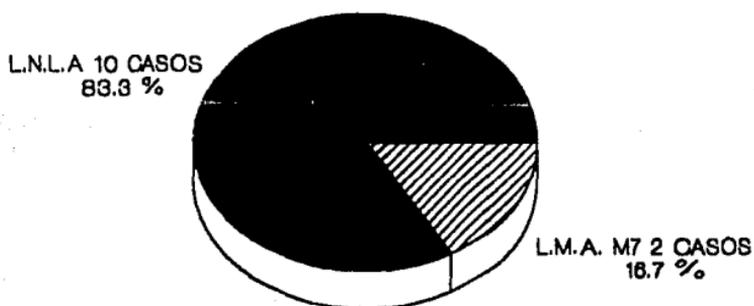
INCIDENCIA DE L.M.A M7 CON RESPECTO A LAS L.A.



IND. = INDIFERENCIADA

GRAFICA 5

INCIDENCIA DE L.M.A. M7 CON RESPECTO A LAS L.N.L.A.



GRAFICA 6

**ESQUEMA DE IDENTIFICACION Y CONTEO DE
PLAQUETAS DE L.M.A. M7 ENCONTRADAS.**

No	EDAD	No PLAQ.	MORFOLOGIA	CITOQUIMICA	INMUNOLOGIA
1	r/n	222,000	Ind. con plaquetas gigantes	L2	CD34 + CD41 + CD11 +
2	5 años	71,000	Ind.	Ind.	tdt + CD19 + CD22 + CD34 + CD41 +

Ind. = indiferenciada.

r/n = Recien Nacido

TABLA 5

INCIDENCIA DE L. A. SEGUN EL SEXO

EDAD	MASCULINO	FEMENINO	TOTAL
0-2	5.5	3.7	9.3
3-5	13.0	20.5	33.3
6-8	11.1	5.5	16.7
9-11	7.4	5.5	12.9
12-15	11.1	16.7	27.8
TOT.	48.1	51.9	100

TABLA 6

COORRELACION MORFOLOGICA Y CITOQUIMICA
Citoquímica

	L1	L2	L3	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	Ind	TOT.
L1	7	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	20
L2	8	4	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	11
L3	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
M0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
M1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
M2	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	2
M3	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-	4
M4	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	0
M5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
M6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
M7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
IND	9	4	-	-	-	-	-	1	1	-	-	6	14
TotL	16	17	1	0	1	2	4	2	2	0	0	9	64

Morfológica

TABLA 7

COORRELACION CITOQUIMICAS E INMUNOLOGICA

Citoquímica

	L1	L2	L3	Ind	M	M7	TOTAL
L1	9	7	-	4	-	-	20
L2	1	5	-	-	-	-	6
L3	1	-	1	2	-	-	4
Ind	5	4	-	2	1	-	12
M	-	-	-	-	10	-	10
M7	-	1	-	1	-	-	2
Tot	16	17	1	9	11	0	54

Inmunológica

TABLA 8

ANALISIS DE RESULTADOS.

En la realización de este trabajo se tuvieron algunos problemas, uno de los cuales fué que la técnica de separación de linfocitos nos marcaba que se empleaba PBS-albúmina, pero con esta técnica la fluorescencia no era muy nítida, las células marcadas aparecían como fantasmas, y después se realizó la técnica por duplicado en la cual la muestra se trabajaba con PBS-albúmina y con PBS sin albúmina, al obtener los resultados de ambas técnicas se observó que cuando se utilizaba PBS sin albúmina la fluorescencia era muy nítida y no aparecían los fantasmas.

Otro de los problemas presentados fué el que algunas muestras de pacientes leucémicos " de novo " (sangre periférica y/o médula ósea), al hacer la estratificación de la muestra (separación de las células mononucleares de los demás elementos formes de la sangre y/o médula ósea) no se separaban las células, esto se repitió en varias ocasiones en los mismos pacientes y daba el mismo resultado por lo cual fueron excluidos.

De los 54 casos estudiados se observó que la frecuencia de la LLA es mayor que la LMA, ambas clasificadas ya sea por métodos morfológicos, citoquímicos e inmunológicos, encontrándose un porcentaje entre el 55 y 64%, la LMA entre 14 y 23%, como se esperaba. El porcentaje de leucemias indiferenciadas fué mayor morfológicamente, obteniéndose un 26%, mientras que la clasificación citoquímica fue menor que la morfológica obteniéndose un 16.6%; con respecto a la clasificación inmunológica se esperaba que esta fuera menor que en los dos métodos anteriores no siendo así, ya que se encontró un (22.2%), debido a que hubo casos (12.9%) en los que no se pudo realizar el método de anticuerpos monoclonales, por no haber obtenido células. El (9.3%) restante aún realizando los monoclonales no fué posible clasificarlas, debido a su baja positividad, nos podemos dar cuenta que este porcentaje fue más bajo comparado con las dos técnicas morfológicas y citoquímicas empleadas. (gráfica 1, 2, 3). Al hacer la clasificación (subtipos de leucemias), encontramos que la mayor frecuencia es la L1 (morfológicamente 37%, citoquímicamente 29.7% e inmunológicamente de 37.7%), con respecto a la leucemia linfoblástica aguda como lo menciona A. Villegas (4). En cuanto a las leucemias mieloides se observó que se encuentra

con mayor frecuencia el tipo M3 (morfológica y citoquímicamente de 7.4%), desgraciadamente por métodos inmunológicos no fué posible complementar dicha clasificación por falta de anticuerpos dirigidos contra este tipo de células mononucleares de origen mielóide. (gráfica 4).

Únicamente se pudo diferenciar por este método la leucemia M7 (megacarioblástica) con una incidencia del 3.7% con respecto a las demás leucemias en comparación con el valor mencionado por Andreas Hirt M.D. Se observa que este porcentaje no varía, ya que es de un 3.0% (18)(gráfica 5).

La incidencia de la M7 con respecto únicamente a las LMA es del 16.6% en niños, semejante al informado por Andreas Hirt aproximadamente del 20.0% (gráfica 6) (18).

Esto nos indica que, en efecto, con ayuda de los anticuerpos monoclonales es posible identificar otros tipos de leucemia como la M7, ya que con métodos morfológicos y citoquímicos es difícil su clasificación debido a la posible confusión con otros tipos de leucemias como son la L1, L2, M0 y M1.

De los dos casos de leucemias M7 encontrados con anticuerpos monoclonales morfológicamente fueron indiferenciados, aunque uno de estos casos presentaba plaquetas gigantes y su número era normal (220 000 mm³).

Citoquímicamente este caso fué clasificado como L2 y el otro permaneció indiferenciado. (tabla 5).

La leucemia M7 es frecuente que se clasifique erróneamente. La M7 presenta un curso muy agresivo y sin tratamiento, es fatal a corto plazo por ello es de gran importancia el que después de un diagnóstico presuntivo se realice inmediatamente la técnica de anticuerpos monoclonales (clasificación inmunológica) para la identificación de los tipos de leucemia, después sabiendo el tipo de leucemia se puede dar el tratamiento , cabe señalar que para la M7 aún no hay tratamiento adecuado. Y así los médicos podrán investigar el tratamiento adecuado para mantener en remisión al paciente como se ha hecho en los demás tipos de leucemias y así prolongar la vida de los pacientes.

En la tabla 6, se muestra la incidencia de leucemias agudas según la edad y el sexo, predominando más en la edad de 3 a 5 años siendo el 33.3 % y predominando en el sexo femenino 20.54%, disminuyendo en todos los demás rangos de edad sólo hasta el de 12 a

15 años se vuelve a incrementar y es en un 27.8% encontrándose que la incidencia sigue predominando en el sexo femenino, lo cual es contrario a lo que describe A. Villegas (4).

Al hacer la correlación entre los resultados obtenidos por morfología y técnicas citoquímicas el 44.4% (24 casos) fueron clasificados de igual forma por ambos métodos y el 55.6% (30 casos) se clasificaron diferentes (tabla 7).

En la correlación entre técnicas citoquímicas y anticuerpos monoclonales el 50.0% (27 casos) sí correspondieron a la clasificación dada por ambos métodos y el otro 50.0% no correspondió. (tabla 8).

CONCLUSIONES.

La incidencia de la leucemia megacarioblástica es del 3.7% con respecto a todas las leucemias, y con respecto a las leucemias mieloides el 16.7%, por lo tanto podemos observar que este porcentaje no es muy bajo tomando en cuenta que el porcentaje de leucemias mieloides totales fué del 22.2% y además que estas son menos frecuentes en niños.

Entre la correlación de los diferentes métodos observamos que entre el citoquímico y el inmunológico (anticuerpos monoclonales) se da un mayor porcentaje, 50.0% a diferencia de la correlación entre morfológico y citoquímico observando así que el empleo de anticuerpos monoclonales nos permite tipificar los diferentes tipos de leucemias, y con ello una pronta identificación de la estirpe afectada y estadio de maduración para dar un diagnóstico y tratamiento adecuado en busca de una remisión y quizás en un futuro hablar de una posible curación.

SUGERENCIAS.

Se propone que para una mayor identificación de todos los subtipos de leucemias mieloides, así como de linfoides se debe tener un panel completo de todos los anticuerpos monoclonales necesarios.

ANEXO

PREPARACION DE REACTIVOS.

1.- SEPARACION DE LINFOCITOS.

a) PREPARACION DEL AMORTIGUADOR DE FOSFATOS (PBS) . pH 7.2-7.4:

Cloruro de sodio (NaCl) 8.20 g

Fosfato de sodio dibásico
(Na₂HPO₄·2H₂O) 0.89 g

Fosfato de potasio monobásico
(KH₂PO₄) 0.68 g

Aforar con agua destilada a 1 lt.

Ajustar el pH si es necesario.

Guardar la solución en refrigeración .

2.- TINCION DE LEISHMAN - GIEMSA.

a) LEISHMAN :

leishman polvo 4.0 g

Alcohol metílico 1.0 lt

b) GIEMSA:

Giensa	10.0 g
Glicerina	540.0 ml
Alcohol metílico	840.0 ml

Disolver el Giensa en glicerina en baño maría a 60 ° C durante 48 h, agregar el alcohol, mezclar, dejar madurar y filtrar finalmente.

c) AMORTIGUADOR DE FOSFATOS pH 6.9:

Fosfato monobásico (KH_2PO_4)	0.79 g
Fosfato disódico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$)	1.21 g

Triturar las sales por separado, mezclar bien, tomar 1 g de la mezcla y disolverlo en 2 lt de agua destilada.

3.- MEZCLA GIEMSA - AMORTIGUADOR.

A 20 ml de amortiguador pH 6.9 agregar 3.5 ml de giemsa.

4.- TINCION DE PEROXIDASA.

a) FIJADOR (FORMALINA - ETANOL):

Mezclar 10 ml de formol al 40 % con 90 ml de etanol absoluto.

b) MEZCLA DE INCUBACION :

Etanol al 30 %	100.0 ml
Benzidina dihidroclorada	0.3 g
Sulfato de zinc heptahidratado	
al 3.8% (0.132 M)	1.0 ml
Acetato de sodio	
($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)	1.0 g

Peroxido de hidrogeno al 3%	0.7 ml
Hidroxido de sodio 1.0 N	1.5 ml
Safranina "0"	0.2 g

Mezclar los reactivos según el orden dado.

Determinar el pH el cual debe ser de 6.0 \pm 0.05

Filtrar la solución, almacenar en un frasco ambar a temperatura ambiente.

SAFRANINA 0.5%

0.5 g en 100.0 ml de agua destilada.

5.- TINCION DE ACIDO PERIODICO DE SCHIFF (PAS).

a) SOLUCION DE ACIDO PERIODICO:

Acido periódic	0.5 g
Agua destilada	100.0 ml

b) REACTIVO DE SCHIFF:

Fuchsin básica	1.0 g
Acido clorhídrico 1.0 N	20.0 ml
Metabisulfito de sodio	1.0 g
Carbón activado	0.3 g

Disolver 1.0 g de fuchsin básica en 200 ml de agua destilada hirviendo, enfriar a 50 °C. Agregar 20 ml de Acido clorhídrico 1.0 N, enfriar. Añadir 1.0 g de metabisulfito de sodio.

Almacenar en la oscuridad de 24 a 48 horas (la mezcla debe tener un color paja). Agregar carbón activado y agitar por un minuto, filtrar, (desechar las primeras gotas) el reactivo debe ser incoloro. Guardar en refrigeración.

c) SOLUCION DE METABISULFITO DE SODIO:

Metabisulfito de sodio	0.5 g
Agua destilada	100.0 ml.

6.- TINCION DE FOSFATASA ACIDA.

a) FIJADOR BUFFER FORMALINA " ACETONA pH 6.6 - 6.8:

Fosfato de sodio dibásico anhidro	0.2 g
Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4)	1.0 g
Agua destilada	300.0 ml
Acetona	450.0 ml
Formalina	250.0 ml

Mezclar todos los reactivos y guardar en refrigeración.

b) NITRITO DE SODIO AL 4% (P/V)

Nitrito de sodio (NaNO_2)	4.0 g
--------------------------------------	-------

Diluir a 100 ml con agua destilada y refrigerar por una semana.

c) SOLUCION DE P-ROSANILINA:

Clorhidrato de p-rosanilina	1.0 g
Agua destilada	20.0 ml
Acido clorhídrico concentrado	5.0 ml

Mezclar la p-rosanilina de 10 a 15 minutos hasta que se disuelva.

Guardar en frasco ambar a temperatura ambiente.

d) ACIDO ACETICO 1.0 N:

Acido acético glacial (CH_3COOH)	60.0 ml
--	---------

Aforar a 1 lt con agua destilada.

Etanol absoluto 100.0 ml

Mezclar y filtrar la solución en un frasco ambar y guardarlo a temperatura ambiente por varios meses.

b) SOLUCION AMORTIGUADORA:

Fenol (cristales) 16.0 g

Etanol absoluto 30.0 ml

Mezclar.

c) SOLUCION DE FOSFATO DE SODIO DODECAHIDRATADO AL 0.3% EN AGUA:

Fosfato de sodio dodecahidratado 0.3 g

Agua destilada 100.0 ml

Mezclar.

Poner la solución b en un matraz aforado de 100 ml y aforarlo con la solución c.

8.- TINCION DE ESTEARASA INESPECIFICA :

SOLUCION A:

Fosfato monopotásico (KH_2PO_4) 27.234 g

Disolver y aforar a 1 lt con agua destilada.

SOLUCION B:

Fosfato disódico anhidro (Na_2HPO_4) 28.396 g

Disolver y aforar a 1 lt con agua destilada.

SOLUCION AMORTIGUADORA pH 7.0-7.1

35 ml de solución A más 65 ml de solución B.

SOLUCION ACUOSA DE NITRITO DE SODIO AL 4%

0.4 g en 10 ml de agua destilada.

SOLUCION DE p-ROSANILINA AL 4%

Disolver calentando ligeramente 2 g de p-rosanilina en 50 ml de ácido clorhídrico 2 N. Filtrar inmediatamente después de enfriar, guardar en frasco ámbar y dejar madurar 3 días. Guardar en refrigeración a 4 C por meses.

HEMATOXILINA DE MAYERS.

50 g de sulfato de amonio y aluminio en 500.0 ml de agua destilada caliente (sin hervir).

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Robbins. S. " Patología humana ". 3a. ed. Ed. Interamericana. México D.F. 1986, pp. 354.
- 2.- William D., Frederick G. " La Leucemia ". Ed. Científico Médico. 1967. pp 1-12.
- 3.- Plasencia, A.P., Mota, et al. " Leucemias agudas no linfoides ". Medicine. Tratado de Medicina Práctica. Hematología I. 3a. ed. México, Agosto 1989. pp 56-67.
- 4.- A. Villegas., et al., " Leucemia aguda ". Medicine. Tratado de Medicina Práctica. Hematología II. México, 1982. pp. 502-39.
- 5.- Bennett J. A., et al., " Criteria for the Diagnosis of acute leukemia of Megakariocyte lineage (M7)", Ann. Intern. Med. 1985.103:460-2.
- 6.- Rubio B. M.E., " Clasificación de las Leucemias Mieloides Agudas ", Notihem. 1992. 4 (2):10-11.
- 7.- Bennett., Catowsky D. M. T. " Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid. Leukemia (AML-M0)", Br. J. Haematol, 1991. 78:325-9.
- 8.- Villegas A., " Morphology and citochemistry of acute leukemia ", Blood 1981. 26 (5c):963-81.
- 9.- Bellanti J. A., " Inmunología ", 3a. ed. Ed. Interamericana. México D.F. 1986 pp 109-11.
- 10.- Grignashi V. J. " Diagnóstico Citológico de las hemopatías " Ed. Panamericana., Madrid 1991 pp 393-414.
- 11.- Figueredo M. A., et al., " Inmunología ". Madrid. pp 35-56.
- 12.- Francois B. J., " Inmunología ". Ed. Ciencia y Tecnología. 1989. 2:271-77.
- 13.- Bernácer B., " Leucemias Agudas linfoblásticas ". Tratado de medicina práctica. Hematología II. México 1982 pp 502-11.

14.- Ruiz Argüelles G.J. " Las Leucemias Agudas ". Asociación de Medicina Interna de México. Clínicas Médicas Mexicanas. 1987. pp 1-10.

15.- Carl P, M.D. and Curt. " Hematology/Oncology Clinics of North America. W. B. Saunders Company, Philadelphia. 1990. 4:743-61

16.- Brain B. J., Catovsky D., et al., " Megakaryoblastic Leukaemia presenting as acute mielofibrosis. A study of four cases with the platelet peroxidase reaction". Blood 1981. 58:206-13.

17.- Ali N.O., Janes W. O., " Malignant myelo sclerosis (acute mielofibrósisis). Report of two cases following, citotoxic chemotherapy". Cáncer 1979, 43:1211-15.

18.- Carroll A., et al. " The t (1:22) p 13: q 13 is nonrandom and Restricted to infant with acute megakaryoblastic leukaemia a pediatric oncology group study "., Blood 1991. 78 (3):748-52.

19.- Andreas H. M. D., et al., " Acute megakaryoblastic leukemia in children identified, immunological marker studies". Am. J. Pediátríc. Hematol.Oncol. 1990. 12:27-33.

20.- Ruiz Argüelles y cols., " Leucemia megacarioblástica, estudio prospectivo de identificación y tratamiento". Br. J. Haematol. 1986. 62:55-63.

21.- Bennett J. M., et al. " Criteria for the of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7). A report of the French American British Cooperative Group ". Ann. Intern. Med.1985. 103:460-2.

22.- San Miguel J. F., et al., " Leukemias with megakaryoblastic involvement, clinical hematologic characteristic ". Blood 1988. 72:402-7.

23.- Koike T. Aoki S., et al., " Cell surfase phenotyping of megakaryoblasts ". Blood 1987. 69:957-60.

24.- Ruiz Argüelles G. J., et al., " The incidence of hibrid acute leukaemias". Leuk. Res.1988. 12:707-9.

25.- Wilkie A.U.M., Kitchen C., " Bicentric chromosoma in the bone marrow of a child with megakaryoblastic leukaemia and dawn's syndrome". J. Clin. Pathol. 1988. 41:378-438.

26.- Lobat M. E., Ruiz Argüelles G. J., et al " Congenital acute megakaryoblastic leukemia on Down's síndrome report of case". Med. Ped. Oncol. En Prensa.

27.- Lewis D. S. " Association between megakaryoblastic leukaemia and down's síndrome ". Lancel. Sep. 1991. 26, pp 695.

28.- Ruiz Argüelles C. J., et al. "Acute Megakaryoblastic leukemia, a prospective study of its identification and treatment ". Br.J. Haematol.1986. 62:55-63.

29.- Cuirmey A., Mc Kenna, et al., " Acute megakaryoblastic leukemia in children. Br. J. Haematol 1986. 63:541-54.

30.- San Miguel J. F. Ojeda E., et al., " Pronostic value of immunological markers in acute myeloblastic leukemia". Leukemia 1989. 3:108-11.

31.- Joseph V. S., " Leucemia Aguda ". Salvat editores. Barcelona 1979 pp 20-63.

32.- Ruiz Argüelles G. J., Marín L.A., et al., " A prospective trial of the treatment of acute megakaryoblastic leukaemia ". Clin. Lab. Haematol 1988. 10:15-23.

33.- Ninomiya H. et al., " Succesful treatment of acute megakaryoblastic leukemia ". Scand J. Haematol 1986. 36:147-153.