

00544 /
25.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**UTILIDAD DE LOS MARCADORES
INTRACITOPLASMICOS EN LA IDENTIFICACION
DE LA ESTIRPE EN LLA EN NIÑOS**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE
ESPECIALISTA EN BIOQUIMICA CLINICA
P R E S E N T A :
LENNY ALEJANDRA | BURBANO CERON

MEXICO D. F.

270722

1999

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS:

A MIS PADRES:

Ing. Angel Leonardo Burbano Rosero y a mi madre Hermencia Cerón , por sus deseos de convertirme en alguien más competente.

A MIS HERMANOS:

Andrés y Camilo David porque aunque somos diferentes son mi fuente de inspiración.

A MIS AMIGOS:

Hilda, Lina Teresa, Juan José y Luis Carlos por su confianza y apoyo durante la elaboración de este trabajo.

A MIS MAESTROS:

María Dolores Lastra y Dr. Rogelio Paredes Aguilera.

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|--------------------|----|
| RESUMEN | 1 |
| INTRODUCCION | 3 |
| MARCO TEORICO | 9 |
| JUSTIFICACION | 17 |
| OBJETIVOS | 18 |
| MATERIAL Y METODOS | 19 |
| RESULTADOS | 26 |
| DISCUSION | 34 |
| CONCLUSIONES | 37 |
| APENDICE | 38 |
| BIBLIOGRAFIA | 47 |

RESUMEN

La leucemia aguda es una enfermedad que se produce debido a un bloqueo en la diferenciación de las células precursoras hematopoyéticas y tiene un ciclo de regeneración prolongado. La transformación leucémica puede afectar a cualquier etapa de la diferenciación, la afectación de la serie linfóide origina la leucemia linfóide aguda (LLA), mientras que la transformación neoplásica de las células precursoras mieloides se expresa en forma de leucemia mielóide aguda (LMA). Las leucemias agudas se clasifican de acuerdo a las características citomorfológicas y citoquímicas de los blastos de acuerdo con los criterios del grupo colaborativo Franco-Americano-Británico (FAB), con la cual se obtiene entre el 58 - 64% de concordancia entre diferentes observadores. La determinación de marcadores celulares inmunológicos específicos, incrementan la concordancia de los diversos observadores hasta el 97.5%. Ante la necesidad de aumentar la precisión en la identificación de la estirpe, así como del estado de maduración en que se presentan las células leucémicas, se propone el uso de marcadores intracitoplásmicos debido a que éstos se expresan desde los estados más tempranos de diferenciación, aumentando la correlación en la clasificación a un 99%. La importancia de tener una clasificación precisa radica en que la aplicación de los tratamientos con quimioterapia son estirpe-específicos. Cada uno de los inmunofenotipos de leucemia presentan diferente respuesta al tratamiento con quimioterapia, así como diferente pronóstico, por lo tanto se elaboran protocolos de tratamiento diferentes para cada uno de los tipos, lo que permite observar desde un aumento en la supervivencia de los pacientes hasta un aumento en la proporción de pacientes curados.

El objetivo del presente trabajo fue la evaluación de la expresión de los antígenos intracitoplásmicos en la clasificación de leucemia aguda (LA), para establecer la utilidad de los mismos en un grupo de niños del Instituto Nacional de Pediatría.

La población estudiada consistió en 20 pacientes captados en el Servicio de

Hematología en el período de julio a diciembre de 1997. El método utilizado se basó en la detección del antígeno intracitoplásmico por medio de una fijación-permeabilización previa de la membrana citoplásmica de los blastos, identificando los antígenos con los correspondientes anticuerpos monoclonales anti-CD3 para estirpe T, anti-CD79a para estirpe B, anti-mieloperoxidasa (MPO) para estirpe mieloide y anti-desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) como un marcador de maduración. El porcentaje de células positivas para cada uno de los antígenos se cuantificó por medio de un citómetro de flujo Profile XL (Coulter, Miami Flo., USA).

Por medio de los marcadores intracitoplásmicos se identificó la estirpe en los 20 casos (100%), mientras que con marcadores de membrana sólo fue posible la clasificación de 19 casos (95%). Los marcadores intracitoplásmicos resultaron muy sensibles y completamente específicos ya que no mostraron reacción cruzada con leucemias agudas de otra estirpe que la involucrada y confirman estudios previos de otros autores: que dichos marcadores citoplásmicos aparecen en estadios tempranos del proceso de diferenciación antes de su expresión en la membrana celular y que son altamente específicos. El presente estudio debe extenderse con mayor número de casos ya que de confirmarse estos resultados preliminares, deberán incluirse los marcadores intracitoplásmicos de línea frontal en la asignación de la estirpe.

INTRODUCCION

Las leucemias son neoplasias malignas de células precursoras hematopoyéticas que se caracterizan por la expansión maligna de una clona derivada de una célula perteneciente a una estirpe, la cual va a infiltrar médula ósea, si bien no se conoce la naturaleza íntima de la lesión molecular en la célula leucémica, sí se conoce que es un defecto genético adquirido de las células hematopoyéticas.

Las células de la sangre se derivan de una célula pluripotencial que tiene la capacidad de limitar progresivamente su expresión de diferenciación a una única estirpe celular. En este proceso, las células pasan por diferentes etapas de maduración, caracterizadas por distintos estados asociados a signos funcionales y morfológicos, por lo tanto, las características clínicas asociadas a la leucemia deben reflejar el nivel en el que el proceso de diferenciación de la célula tronco pluripotencial ha sufrido la transformación maligna ocasionando una expansión clonal a nivel de médula ósea.

En los estudios morfológicos y de cinética celular se ha encontrado que en las leucemias agudas existe un bloqueo en la diferenciación de las células precursoras leucémicas y que los blastos leucémicos tienen un ciclo de regeneración prolongado, por lo tanto la acumulación de los blastos leucémicos, es consecuencia de la falta de maduración hacia células definitivas funcionales, más que de una rápida proliferación de las células transformadas. A medida que se acumulan los blastos leucémicos en la médula ósea se inhiben a las células precursoras hematopoyéticas normales, esta inhibición se debe a la sustitución física de los precursores normales por el clon de células en expansión.

La transformación leucémica puede afectar a cualquier estadio de la diferenciación de las células hematopoyéticas multipotenciales. La afectación de la serie linfóide origina la leucemia linfóide aguda, mientras que la transformación neoplásica de las células

precursoras mieloides se expresa en forma de leucemia mieloide aguda.

Las leucemias agudas se clasifican de manera tradicional en leucemias agudas linfoides (LAL) y leucemias agudas mieloides (LAM) de acuerdo a las características citomorfológicas y citoquímicas de los blastos que permite identificarlas como derivadas de precursores de los linfocitos o de los granulocitos/monocitos. El fundamento de esta clasificación se basa en que la leucemia es la resultante de la transformación maligna de una célula progenitora capaz de comprometerse o ya comprometida con un solo linaje o estirpe, lo que le permite compartir características con los progenitores normales afectados.

En 1976 el grupo colaborativo Franco-Americano-Británico (FAB) propuso un sistema de clasificación y nomenclatura de las leucemias agudas que distinguía tres categorías en las LAL y seis en las LAM (1). Este sistema de clasificación es el más aceptado en la actualidad en el mundo occidental, y aunque este sistema contribuyó enormemente para la unificación de los criterios de clasificación, muy pronto se hizo aparente que el grado de concordancia entre diversos observadores era relativamente bajo con porcentajes variando entre el 58-64 % para los dos subtipos principales de leucemias agudas (2). Este hallazgo propició una revisión del sistema de clasificación y el diseño de un sistema de puntuación basado en los rasgos distintivos más comunes de los linfoblastos, con el fin de facilitar el análisis morfológico y mejorar la reproducibilidad de los resultados (3). Más tarde, se llevó a cabo una revisión de los criterios de clasificación en LAM (4) e incluso se agregó posteriormente un nuevo subgrupo en esta variedad de leucemia.

Una clasificación y subclasificación exacta de las leucemias agudas es importante para definir el pronóstico y la terapia. Las propuestas originales para la clasificación morfológica por el grupo FAB fueron dependientes de signos y características morfológicas en sangre y médula ósea revelados por tinciones de Romanowsky y un grupo de tinciones citoquímicas. La célula blástica de la leucemia aguda se encuentra representando entre el 30 y 90% de los leucocitos circulantes y no obstante, que los estudios morfológicos y citoquímicos habían sido considerados como "estándar de oro" en el diagnóstico de leucemia aguda, se han incorporado procedimientos de diagnóstico más sofisticados para

llegar a un diagnóstico final, métodos que incrementan la concordancia de los diversos observadores hasta 97.5%, gracias a la determinación de marcadores celulares específicos en los blastos para definir estirpe linfoide y grado de maduración (5).

Las leucemias agudas linfoides fueron las primeras neoplasias en beneficiarse de los estudios inmunológicos, siendo clasificadas inicialmente en B, T o nulas (no T y no B) según expresaran inmunoglobulina de superficie (SIg), formaran rosetas con hematíes de camero o carecieran de ambos marcadores, respectivamente. Posteriormente, el descubrimiento de un antisuero contra el antígeno presente en el 70 % de las LAL infantiles, llamado antígeno común de la leucemia aguda linfoblástica (cALLA o posteriormente CD10) permitió definir un nuevo fenotipo común al que pertenecían la mayoría de las LAL nulas (6,7).

La capacidad para clasificar leucemia aguda linfoide, depende de la utilización de reactivos para la definición precisa de las características de la estirpe celular, los cuales se desarrollaron a partir tres conceptos claves:

- Los estudios de Köhler y Milstein, respecto a que los plasmocitos inmunes normales pueden fusionarse con las células de mieloma, dando como resultado células híbridas somáticas estables (hibridomas) que siguen produciendo los anticuerpos específicos contra el antígeno que sensibilizó a las células de origen. Esto hace posible la producción de cantidades ilimitadas de anticuerpos monoclonales altamente específicos que reconocen distintos epítopes de antígenos celulares (8).
- El desarrollo de cromógenos altamente sensibles como ejemplo el isotiocianato de fluoresceína (FITC), la rodamina (RD) y otros mas.
- Los anticuerpos en cuestión, o con más frecuencia fracciones de gamma globulina de un antisuero, se unen químicamente (conjugación) a un colorante fluorescente. Este colorante permite identificar el anticuerpo marcado empleando luz ultravioleta y con los adelantos en lámparas de láser mediante la citometría de flujo que confiere mayor sensibilidad.

La reactividad de las células leucémicas y normales a una combinación de anticuerpos específicos establece un patrón ontogénico y filogénico de desarrollo, así como un modelo de expresión antigénica que se define como inmunofenotipo celular.

Dadas las tecnologías anteriores se ha podido establecer fenotipos inmunológicos de células leucémicas, lo que ha llevado a una comprensión más profunda del desarrollo de células hematopoyéticas normales y neoplásicas, proporcionando mayor correlación entre diagnóstico y pronóstico. Con el empleo de tales marcadores se identifican las leucemias linfoides de precursores de estirpe T, de precursores de estirpe B y nulas (9).

A lo largo de la década de los 80 se obtuvieron numerosos anticuerpos monoclonales que detectan antígenos de línea linfóide B y T, demostrándose que la mayoría de las LAL no T no B (comunes y nulas) son de origen B.

Con la unificación de criterios en la definición de diferentes antígenos leucocitarios, la cual se estableció en base a los trabajos de un grupo internacional para definir los antígenos de diferenciación de los leucocitos humanos, se agruparon "diferentes" anticuerpos monoclonales que reconocían a los mismos antígenos, estableciendo la llamada designación de grupo (Cluster Designation CD), con esto se facilitó la interpretación de los resultados de los grupos de trabajo de los diferentes países.

La inmunotipificación ha sido uno de los procedimientos más aceptados dentro del grupo de estudios a realizarse en un paciente con leucemia aguda, complementa a los métodos morfológicos, citoquímicos y citogénéticos que juntos guían a una mejor clasificación de la leucemia, para decidir el pronóstico y terapia de cada paciente (10).

En los análisis de muestras de leucemia aguda, muchos laboratorios están usando un primer panel de anticuerpos que definen la naturaleza de la estirpe celular en mieloide o linfóide de tipo B o T, y una segunda línea de anticuerpos es aplicada para disecar la hematopoyesis y establecer el grado de diferenciación celular en dichas muestras (10). En octubre de 1996, se llevó a cabo el primer Consenso latinoamericano para la inmunotipificación de la leucemia en la ciudad de Puebla, México, donde participó

activamente el Servicio de Hematología del Instituto Nacional de Pediatría, definiéndose la guía para establecer la metodología a emplear, los paneles de anticuerpos monoclonales tanto intracitoplásmicos, como de membrana a utilizar, así como los fluorocromos, las condiciones de la muestra e interpretación de los resultados. Estos criterios fueron utilizados en el presente trabajo (11).

En la diferenciación B, los primeros antígenos en aparecer son CD19 en la membrana y CD22 a nivel de citoplasma. Inmediatamente después o incluso a la vez aparece CD10 y más tarde CD20. Posteriormente el linfocito B adquiere cadena pesada μ de inmunoglobulina en el citoplasma para expresarla posteriormente en la membrana.

De acuerdo a estos marcadores, las LLA de origen B se clasifican actualmente en B precoz (CD19 + , CD22c +) ; común (CD10 +) ; pre B (cIg +) y B (SIg +) .

Las LLA de estirpe T se dividen en dos grandes grupos: PreT y tímicas. Las pre T se identifican por la expresión del antígeno CD7 en la membrana o CD3 en el citoplasma que son los marcadores T más precoces, las restantes LAL T son de origen tímico. El fenotipo T precoz se caracteriza por la adquisición de receptor para hematófagos de carnero (CD2); a nivel de timocito cortical común la célula coexpresa los antígenos CD4 y CD8 junto a CD1 y el timocito medular maduro expresa CD3 de superficie y CD4 o CD8, pero no los dos a la vez (12,13).

A partir de la introducción de este panel de anticuerpos se ha desarrollado una variedad de nuevos reactivos y nuevas metodologías que ayudan a mejorar la exactitud de la inmunotipificación ya que se presentan limitaciones como por ejemplo las células B normales como las B malignas se definen por su expresión de inmunoglobulina de superficie, otros marcadores de superficie son menos útiles, puesto que sus expresiones no están restringidas a las células B, incluyendo receptores para la fracción constante (Fc) de inmunoglobulina G y receptores para los componentes de sistemas de complemento, se han encontrado en monocitos y células no hematopoyéticas, igualmente el antígeno de histocompatibilidad HLA DR no es específico de estas células (14); por esta razón se ha

visto la necesidad de identificar nuevas entidades con relevancia clínica enfocadas principalmente a la extensión del análisis de antígenos de superficie celular hacia componentes intracelulares. Con esta tecnología los estadios más tempranos de diferenciación celular linfoide pueden ser identificados usando anticuerpos contra MPO, CD79a, CD3 citoplásmico (MPOc, CD79a-c, CD3c) y la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) nuclear, siendo propuestos como marcadores para la identificación de la estirpe más fidedigna ya que son expresados desde los estadios más tempranos de diferenciación y en efecto localizados dentro del citoplasma y aumentando la correlación en la clasificación de las leucemias a un 99% (15).

MARCO TEORICO

El inmunofenotipo tiene un papel establecido en el diagnóstico y subclasificación de leucemia linfocítica aguda con el reconocimiento de la estirpe (B y T) y sus variantes probando de esta manera su relevancia clínica. El análisis de células leucémicas por citometría de flujo usando anticuerpos monoclonales, ofrece un estudio rápido, sensible y objetivo de la expresión de los antígenos de diferenciación, permitiendo el diagnóstico para el tratamiento clínico de la leucemia aguda. Sin embargo, la citometría de flujo ha sido limitada principalmente para la detección de antígenos de superficie. Algunos marcadores intracitoplásmicos, particularmente la TdT y las cadenas μ de inmunoglobulina se han venido realizando por medio de tinciones y citocentrifugación, sin embargo ahora es posible su detección por medio del citómetro de flujo. Estos marcadores se han ganado un sitio de aceptación dentro de la clasificación de LLA. La expresión citoplásmica del CD3 es un evento temprano del desarrollo de células T en el timo y se ha reportado en todos los casos de LLA con precursores de tipo T. Igualmente se ha reconocido la expresión del CD22 citoplásmico para células B inmaduras normales y en la mayoría de los casos de LLA con precursor de células B. Se ha demostrado que ambos marcadores son específicos para su respectiva estirpe y para mejorar la exactitud en el diagnóstico del fenotipo en LLA (16).

La linfopoyesis resulta de la continua producción de linfocitos B maduros y linfocitos T, ambos forman el sistema inmune antígeno específico. Los dos tipos de linfocitos expresan receptores unidos en su membrana celular, que permiten el reconocimiento específico de antígenos. Los receptores antígeno-específico son diferentes en cada linfocito, pero cada linfocito o clona de linfocitos expresan miles de receptores con la misma especificidad antigénica.

Las moléculas de inmunoglobulina unidas a la superficie de membrana representan el receptor antígeno específico de linfocitos B y las moléculas denominadas receptor de células T muestran esta función en los linfocitos T. El reconocimiento de la unión de la molécula del receptor con el antígeno induce a la activación y proliferación de los linfocitos involucrados. Esto resulta en la maduración de los linfocitos B a células B de memoria y células plásmáticas que secretan moléculas de inmunoglobulina antígeno específico, mientras los linfocitos T activados muestran su función citotóxica específica.

La diversidad de los receptores antígeno específico de los linfocitos es el resultado de un proceso de reordenamiento en los genes que codifican para inmunoglobulina y receptor de células T (17,18).

Por más de una década se ha reconocido que en los estadios tempranos del desarrollo de los linfocitos, algunos antígenos de diferenciación asociados a membrana se expresan inicialmente en el citoplasma antes de su inserción en la membrana celular. Se ha observado a la Ig M intracelular en precursores de células pre B de hígado fetal de ratón y también se han observado otros antígenos asociados a células B como CD22, en el citoplasma de los linfocitos B inmaduros de médula ósea y aparece en la membrana de células B maduras (17).

CELULAS B.

El receptor de células B es un complejo multimérico de proteínas que tiene un papel importante en señales transduccionales después de la unión del antígeno (19). La cadena de inmunoglobulina α tiene un peso molecular de 34 kDa y es codificado por el gen mb-1 y la cadena de inmunoglobulina β es un producto del gen B29. Por medio de técnicas inmunocitoquímicas en células B normales y neoplásicas se demostró que la proteína humana mb-1 aparece muy temprano en el proceso de diferenciación de células B, probablemente antes de la expresión de cadenas μ citoplásmicas y persiste hasta el estado

de células plásmáticas, dónde es visto como un componente intracitoplásmico. De acuerdo a los análisis histológicos de tejidos linfoides y linfoma la proteína mb-1 es específica para las células B (19).

El complejo inmunoglobulina de superficie-CD79 es expresado en células B tan pronto se completa el reacomodo del gen de la inmunoglobulina de cadena pesada y ligera. Sin embargo, en el estado de diferenciación de células Pre B, el resultado del reordenamiento funcional de la inmunoglobulina de cadena pesada es la expresión citoplásmica débil de inmunoglobulina de cadena pesada μ o pre-citoplásmica. En algunas células pre B se puede encontrar una expresión de membrana débil del llamado complejo celular pre B (pre B SIgM-CD79). Este complejo celular pre B consiste en las cadenas de proteínas CD79 e inmunoglobulina μ . La maduración al estado de células plásmáticas se caracteriza por la pérdida del complejo SIg-CD79 y la aparición de altos niveles de inmunoglobulina citoplásmica.

En conclusión, la expresión del antígeno CD79a es detectable en precursores de células pre B en médula ósea y su expresión precede la aparición de cadenas μ citoplásmicas. Este persiste hasta el estado de células plásmáticas, después de que ha cesado la expresión de la inmunoglobulina de superficie (19).

CELULAS T.

Recientemente se ha sugerido que una secuencia similar de eventos puede ocurrir con CD3 durante la ontogenia y diferenciación de células T, la cual puede ser estudiada por medio del análisis a subpoblaciones de timo y leucemias de células T, considerada como la contraparte maligna en los estados de diferenciación de células T (20). Dichos estudios muestran que el fenotipo inmunológico de células T cambia durante las etapas de diferenciación, resultando en células T maduras que expresan el antígeno CD3 en la superficie celular.

El antígeno humano CD3 consiste en tres cadenas de proteínas (CD3- α , CD3- β y CD3- γ), el cuál está íntimamente asociado con el receptor de células T, del que se han descrito tres diferentes tipos de cadenas: TCR- α , TCR- β y TCR- γ . Semejante al gen para las inmunoglobulinas, el rearreglo del gen para el receptor de células T durante la diferenciación celular hace posible la diversidad de éste (21).

En 1985, Campana y cols. demostraron la expresión de CD3c en células T inmaduras detectada en secciones de tejidos congelados y preparaciones citocentrifugadas, mientras que la expresión de CD3 no pudo detectarse en la superficie de estas células inmaduras por marcado inmunofluorescente en suspensión. En estudios recientes se indica que la expresión del CD3 en la superficie celular es dependiente de la presencia del receptor de células T (TCR) y que el ARN mensajero para la molécula de CD3 está presente en células T inmaduras. Sin embargo, el CD3c puede ser demostrado en células T inmaduras que todavía no expresan el antígeno CD3 en la membrana celular. En precursores tímicos inmaduros las moléculas CD3 están primeramente expuestas en citoplasma presidiendo la síntesis de la cadena TCR β citoplásmica y la inserción del complejo TCR α - β CD3 en la membrana celular. Por lo tanto el CD3c puede ser detectado en células inmaduras que todavía no expresan el antígeno CD3 en la membrana celular (22).

Con un grupo de marcadores de superficie para estirpe linfoide T y B incluyendo CD7, CD2, CD10 y CD19, se obtiene una precisión en el diagnóstico del 97%, y con la detección del marcador CD3 citoplásmico se confirma esta clasificación y se incrementa la precisión en el diagnóstico al 99%, asignando la estirpe en leucemias agudas con problemas de diagnóstico (23,24).

El CD3c así como otros marcadores intracitoplásmicos representan a los marcadores más específicos que ayudan a establecer el compromiso más temprano de los blastos leucémicos, hacia estirpe B o T (25,26).

ENZIMA DESOXINUCLEOTIDIL TRANSFERASA TERMINAL (TdT).

La TdT es una ADN polimerasa molde-independiente. La TdT inserta nucleótidos extra entre las regiones variable y de ensamblaje de los genes de inmunoglobulina. Tienen un papel importante en la generación de inmunoglobulinas diversas.

La enzima TdT es una proteína de 58kDa, cuyo gen tiene una extensión de 35 kb en el cromosoma 10q23-25, está presente en altas concentraciones en los timocitos y está ausente en linfocitos normales T y B maduros, sin embargo el papel biológico del TdT no se entiende, probablemente juegue un papel importante en el rearreglo de genes de las inmunoglobulinas y receptor de células T durante el desarrollo linfoide temprano incrementando la diversidad de inmunoglobulinas y RCT (9). En las leucemias, la actividad de la enzima se encuentra aumentada debido a un defecto en los mecanismos que controlan la actividad enzimática (27,28).

La enzima TdT se detectó en células de timo normal en 1960 y en médula ósea humana en 1974. Desde la primera observación de células TdT positivas en niños con leucemia linfoblástica aguda, se ha investigado el papel de la enzima en el diagnóstico, clasificación y seguimiento de neoplasias hematopoyéticas. La actividad de TdT decrece durante la diferenciación temprana de células B (después del rearreglo del gen de la inmunoglobulina de cadena pesada), en cambio el TdT se expresó durante todo el proceso de diferenciación tímica postnatal de células T. Esta enzima se expresa en más del 90% de las leucemias linfoblásticas, sin embargo la utilidad del TdT como marcador de leucemia residual, ha sido limitado por la presencia de TdT en precursores linfoides normales en médula ósea y la relativa inestabilidad de la enzima (29).

La presencia de esta enzima no es indicativa de ningún subtipo de leucemia aguda, sin embargo hay marcos diagnósticos en los cuáles la expresión de TdT por parte de las células es de vital importancia pues las células de sangre periférica no expresan este marcador, entonces la demostración de su expresión en sangre sugiere la expansión de la enfermedad (30).

Inicialmente la enzima TdT se consideró un marcador de células inmaduras linfoides, pero varios estudios han reportado la existencia de TdT positivo en varios casos de leucemia mieloide aguda, siendo más común en los de tipo celular inmaduro (M0, M1). En estos estudios también se observó una alta correlación con el marcador CD34 lo que sugiere que el TdT positivo representa a una población inmadura, además el porcentaje de positividad fue más bajo para la leucemia mieloide aguda que para la leucemia linfóide aguda, por lo que el marcador TdT positivo puede ser visto como un marcador de inmadurez hematopoyética.

Aproximadamente del 1 al 5% de células mononucleares expresan TdT en sangre periférica y médula ósea normal, en combinación con antígenos linfoides, pero un doble marcaje de antígenos mieloides de superficie y TdT nuclear es indispensable para distinguir entre las células TdT positivas normales y mieloblastos leucémicos (31, 32).

En la LLA el inmunofenotipo ha demostrado tener una alta correlación con los marcadores de superficie, mientras en la LMA se ha observado que no hay marcadores específicos. Los anticuerpos monoclonales que reaccionan con células de la serie mieloide únicamente lo hacen con una proporción de pacientes con LMA y no con las células de todos los pacientes, por otra parte se ha visto la expresión de antígenos CD13 y CD33 en células de pacientes con LLA.

MIELOPEROXIDASA (MPO).

Un marcador inmunológico específico para caracterizar a la leucemia mieloide aguda es el anticuerpo monoclonal contra la MPO. La MPO está localizada en los gránulos azurófilos primarios de células mieloides, su síntesis se lleva a cabo en estadios tempranos de diferenciación y es una de las proteínas más abundantes de los granulocitos maduros. Esta enzima cataliza la producción de ácidos hipoclorosos, un potente agente microbicida.

La demostración citoquímica de la actividad de la MPO constituye un marcador clásico en el diagnóstico de leucemia, (ver Apéndice). En la clasificación del grupo FAB, la presencia de más del 3% de blastos MPO positiva, se considera diagnóstico de leucemia

mieloide aguda. Sin embargo, es difícil demostrar la actividad de MPO en blastos con un microscopio de luz convencional. Se han propuesto técnicas más sensibles a nivel ultraestructural como la aplicación de la microscopía electrónica, que implica un trabajo intensivo. Se ha descrito recientemente una atractiva alternativa, y es la presencia de formas y proformas de MPO en el citoplasma de blastos con leucemia mieloide aguda usando anticuerpos monoclonales contra la MPO con microscopía de fluorescencia convencional en preparaciones citocentrifugadas (33).

Este anticuerpo contra la MPO aparece como el marcador inmunológico más sensible y específico para identificar células de estirpe mieloide, y se produjo gracias a la necesidad de un anticuerpo que pudiera distinguir leucemia mieloide aguda de leucemia linfocítica aguda. Usando el anticuerpo, la MPO inmunológicamente reactiva se demostró en el 95% de 206 pacientes con leucemia mieloide aguda morfológica y citoquímicamente definidos. Esta alta frecuencia de expresión sugiere que la activación del gen de la MPO es controlado por genes promotores específicos que son activados tempranamente en la diferenciación mieloide (33).

Cuando este anticuerpo se usó en combinación con marcadores específicos de membrana el diagnóstico de LMA fue posible en el 89% de los pacientes, sin embargo en el 17% de los casos positivos, las células leucémicas reaccionaron con solamente uno de los anticuerpos de membrana específicos para diferenciación mieloide porque la expresión de antígenos de membrana de estirpe mieloide no se limita completamente a leucemia mieloide aguda sino que puede ocurrir en leucemia linfocítica aguda. El AcMo MPO fue reactivo con células de un paciente, dentro de los 50 pacientes muestreados con LLA. Entonces una prueba antimieloperoxidasa positivo aparece para mostrar no solamente una alta sensibilidad en el diagnóstico sino también una alta especificidad (34).

No se encontró correlación entre el porcentaje de células MPO positivas y la clasificación de la FAB porque el anticuerpo contra la MPO también reconoce el precursor de la enzima, el cuál es enzimáticamente inactivo, el anticuerpo puede reaccionar con células que son capaces de sintetizar MPO, pero que no tienen la capacidad para procesar la

a la forma madura o activa. La presencia de la MPO inmunológicamente reactiva, pero enzimáticamente inactiva en estados tempranos de diferenciación mielóide, explica la falta de correlación con los estados de maduración de la leucemia mielóide aguda. Además las células leucémicas de pacientes con leucemia monocítica (LMA-M5), expresan una baja reactividad con el anticuerpo, pues las células de estirpe monocítica contienen MPO en cantidades mucho menores que las células de estirpe granulocítica.

En la mayoría de los pacientes se detectaron en forma más específica células MPO positivas con el anticuerpo monoclonal que con el marcador citoquímico. Esto puede deberse al reconocimiento tanto de la enzima madura como de los precursores enzimáticamente inactivos por parte del anticuerpo monoclonal, y efectivamente se encontraron grandes cantidades del precursor de la MPO por inmunomancha en las células de un paciente con un bajo porcentaje de MPO por el método citoquímico y alto porcentaje por el método inmunológico, por lo tanto, se puede concluir que el anticuerpo monoclonal contra la MPO es el mejor reactivo para el diagnóstico inmunológico de la LMA.

JUSTIFICACION

En el Servicio de Hematología del Instituto Nacional de Pediatría se atienden aproximadamente 60 nuevos casos de LA por año, el personal clínico se ve ante la necesidad de contar con nuevos métodos de laboratorio para la obtención de una clasificación inmunológica cada vez más precisa ya que esto conlleva al uso de tratamientos estirpe específicos con los que se obtendrán mejores resultados en cuanto a la supervivencia de los pacientes que sufren este tipo de enfermedad. El uso de la detección de antígenos intracitoplásmicos se considera un adelanto en cuanto a la asignación de la clasificación de la LA.

OBJETIVOS

1. Evaluar la expresión de los antígenos intracitoplásmicos en niños con LLA, para establecer con mayor exactitud la estirpe celular a la que pertenecen.
2. Tener una herramienta extra para establecer una terapia individualizada estirpe-específica.

MATERIAL Y METODOS

1. MATERIAL

1.1 SELECCION DE PACIENTES

La población estudiada se captó a través de la consulta externa del servicio de Hematología en el Instituto Nacional de Pediatría en un periodo que abarcó desde julio de 1997 a diciembre del mismo año, y consistió en niños con una edad entre 2 y 16 años.

1.2 CRITERIOS DE INCLUSION

- Diagnóstico reciente de leucemia linfocítica aguda.
- Diagnóstico basado en resultados morfológicos correspondiente a LLA1, LLA2, LLA3.

1.3 CRITERIOS DE EXCLUSION

- Leucemias en recaída
- Leucemias crónicas
- Leucemias en remisión
- Otros síndromes linfoproliferativos.

1.4 CRITERIOS DE ANALISIS

Se incluyó información obtenida de estudios citomorfológicos y de inmunofenotipo, alternados con el uso de marcadores intracitoplásmicos, incluyendo la tinción citoquímica para mieloperoxidasa.

2. MUESTRA

2.1 CELULAS

Se obtuvieron, por aspirado de médula ósea células leucémicas de todos los niños del Servicio de Hematología del Instituto Nacional de Pediatría con diagnóstico reciente de leucemia linfóide aguda. Las muestras se anticoagularon con heparina y se procesaron dentro de las 24 horas posteriores a la recolección.

2.2 ANTICUERPOS

Se utilizaron anticuerpos monoclonales contra antígenos de membrana y citoplásmicos marcados con FITC, de la casa comercial Coulter (Miami, Flo. USA). En la Tabla 1 se describe la designación de grupo, nombre comercial (Coulter) y patrón de reactividad de cada uno de ellos.

Tabla 1
Anticuerpo monoclonales usados en la clasificación de LLA

| Designación de grupo | Anticuerpos | Patrón de reactividad |
|-------------------------|----------------------|-------------------------------------|
| Estirpe B | | |
| CD 19 | B4 | Precursor de células B |
| CD 20 | B1 | Precursor de células B |
| CD 21 | B2 | Subpoblación de células B |
| CD 22 | Leu-14 | Células B |
| CD 24 | BA-1 | Precursor de células B |
| Ig citoplásmica | Clonab BS 7 | Células pre-B |
| Ig de superficie | Linfocitos B | Células B |
| CD 79 citoplásmico | Anti CD79 | Precursor de células B |
| Estirpe T | | |
| CD 2 | T 11 | Células T |
| CD 5 | T1 | Timocitos, linfocitos T y células B |
| CD 7 | 3A1 | Casi la mayoría de células T |
| CD 3 (citoplásmico) | Anti CD3 | Células T |
| Estirpe mielóide | | |
| CD 13 | My7 | Células mieloides |
| CD 14 | My4 | Monocitos y macrófagos |
| CD 33 | My9 | Células mieloides y monocitos |
| CD 41 | Plt-1 | Megacariocitos y plaquetas |
| MPO (citoplásmico) | Anti MPO | Células mieloides |
| ---- | My8 | Monocito-granulocito |
| Sin estirpe definida | I2 J5 Anti TdT | Estirpe B y T |

2.3 REACTIVOS

-SOLUCION LISANTE: para lisis de glóbulos rojos.

Solución cuaternaria de amonio 19 g/L

Isopropanol 1%

Cloruro de potasio 0.5 g/L

-SOLUCIONES DE FIJACION Y PERMEABILIZACION

Propuestos para fijar células en suspensión y su respectiva permeabilización; este procedimiento le da al anticuerpo el acceso a la membrana y al citoplasma y deja intactas las características de dispersión morfológica de las células.

--Solución permeabilizante:

Tritón al 1% en PBS.

--Solución fijadora:

Formaldehído al 1% en PBS.

- REACTIVO AMORTIGUADOR DE FOSFATOS SALINO (PBS).

Contiene albúmina bovina al 0.2% y azida de sodio al 0.2 % para el lavado de las células.

2.4 CITOMETRIA DE FLUJO

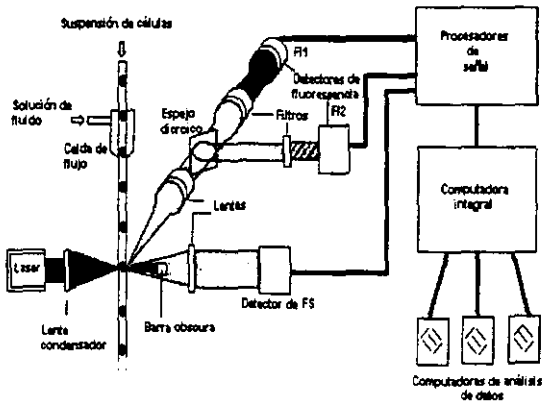
Las células marcadas con los anticuerpos conjugados con la fluoresceína se analizaron en un citómetro de flujo Epics Profile XL Coulter. La citometría de flujo se ha adaptado para detectar la presencia de glicoproteínas por medio de un fluorocromo. Por este método se cuantifica la fluorescencia de los blastos incubados con el anticuerpo monoclonal conjugado con FITC. Los resultados se expresan como cantidad de fluorescencia en por ciento.

2.4.1 FUNDAMENTO

El citómetro de flujo consiste en una fuente de luz generalmente un rayo laser de argón 15 mW, el cual proporciona luz monocromática a 488 nm. Las células las cuales fluyen e interceptan el rayo del laser, refractan la luz y si están presentes fluorocromos son excitados y emiten luz fluorescente. La luz es refractada en dos diferentes ángulos: la dirección frontal (FS = forward scatter) y la forma lateral a 90° (SS = side scatter) y ambas formas son detectadas. La señal FS es dependiente del volumen de las partículas mientras que SS da la medida de la organización interna (gránulos, citoplasma) o textura de las partículas. La luz fluorescente emitida es recolectada por el sistema óptico (lentes). Dependiendo de la longitud de onda emitida, la luz es separada por una serie de espejos y filtros en dos o tres nuevos rayos de luz. Los citómetros actuales detectan 4 o más fluorocromos simultáneamente. La luz reflejada es detectada por fotodiodos y fotomultiplicadores, los cuales convierten la luz en una señal eléctrica. La magnitud de la señal eléctrica es proporcional a la cantidad de luz detectada, la cual en caso de ser luz fluorescente es relacionada al número de moléculas fluorescentes. Cada señal llega a la computadora y ésta procesa la información de un gran número de partículas o células, información que presenta en forma de gráficas (histogramas), así mismo los valores en porciento de cada uno de los parámetros (35).

En la figura 1 se observa la estructura interna del citómetro de flujo.

FIGURA 1
CITOMETRO DE FLUJO



LTRG

2 METODOS

2.1 TINCIONES DE RUTINA

El frotis del aspirado de médula ósea se tiñó con el colorante de Wright, para realizar el diagnóstico de leucemia y al observar los rasgos morfológicos y se elaboró el diagnóstico citomorfológico y con las tinciones citoquímicas de mieloperoxidasa, ácido peryódico de Schiff (PAS) y negro sudán, se apoyó el diagnóstico, (estas técnicas se presentan en el Apéndice).

2.2 DETECCION DE LOS ANTIGENOS DE SUPERFICIE

- Colocar 50 uL de aspirado de médula ósea en un tubo eppendorf con el anticuerpo correspondiente ya marcado con fluoresceína, dejar por 15 minutos a temperatura ambiente.
- Adicionar 2 mL de PBS para lavar las células, centrifugando a 400 G.
- Agregar 100 uL de solución lisante.
- Lavar 2 veces
- Resuspender en 1 mL de PBS.
- Analizar en el citómetro de flujo.

2.3 DETECCION DE LOS MARCADORES INTRACITOPLASMICOS

Este proceso utiliza reactivos para fijar células en suspensión y permeabilizar las mismas, con el objeto de dar a los anticuerpos acceso a las estructuras intracelulares y dejar intactas las características de dispersión morfológica de la célula.

- Colocar 50 uL de médula ósea, sangre total o suspensión de células mononucleares en un tubo de 5 mL.
- Agregar 100 uL del reactivo de fijación a temperatura ambiente.
- Incubar por 15 minutos a temperatura ambiente.
- Adicionar 5 mL de PBS y centrifugar por 5 min a 200 G.
- Eliminar el sobrenadante y adicionar al botón celular 100 uL del reactivo permeabilizante y 20 uL del respectivo anticuerpo monoclonal conjugado con FITC.
- Agitar en el vortex a baja velocidad por 1 o 2 segundos.
- Incubar por 15 minutos a temperatura ambiente.
- Lavar las células con 5 ml de PBS.

- Eliminar el sobrenadante y resuspender las células en PBS para el análisis inmediato o resuspender las células en 0.5 ml de formaldehído al 1% y almacenar a temperatura de 2 a 8 °C en la oscuridad para su análisis dentro de las 24 horas siguientes.

RESULTADOS

La clasificación correcta pudo ser establecida sin dificultad en 17 casos, con microscopía de luz y pruebas citoquímicas, sin embargo con el uso de estas variables no se concretó una clasificación definitiva en los casos 4, 8 y 20, por lo tanto el inmunofenotipo y los marcadores intracitoplásmicos fueron de gran importancia para definir la estirpe de la leucemia. En la tabla 2 podemos observar los datos correspondientes a los exámenes morfológicos, citoquímicos, marcadores de superficie e intracitoplásmicos. Se consideran positivos aquellos datos analizados en el citómetro de flujo con resultados mayores o iguales al 30%.

En relación al diagnóstico citomorfológico, se puede observar que el tipo LLA-L1 fue el más frecuente, se encontraron 16 de 20 casos, las leucemias indiferenciadas fueron 3 y solo un caso de LLA-L2.

Referente a las pruebas citoquímicas, la tinción de mieloperoxidasa fue negativa en el total de los casos. Con el uso de la tinción de negro sudan 19 casos fueron negativos y solo un caso alcanzó el 20 % de positividad. Con la tinción de PAS, 9 fueron negativos, 6 de positividad intermedia, 4 de positividad alta y uno de positividad baja.

En cuanto a los marcadores de superficie, el CD19 se presentó en un rango de 0 a 88% de positividad. Dado que los casos positivos se consideraron a partir del 30% o más de células positivas, solo se obtuvieron 12 casos positivos. El CD10 se presentó en un rango de 0 a 98% de positividad con 15 casos positivos, el CD5 se obtuvo en un rango de 0 a 74% de positividad con 4 casos positivos, el CD2 en un rango de 3 a 58 % de positividad con 4 casos positivos, el CD14 en un rango de 0 a 34% de positividad con un caso positivo, el CD13 en un rango de 1 a 98% de positividad con un solo caso positivo, el My 8 (a este marcador no se le ha designado un número de grupo de designación CD), se presentó en un rango de 0 a 41% de positividad con 2 casos positivos, el CD33 en un rango de 2 a 29% siendo negativos todos los casos, el CD41 en un rango de 0 a 68 % de positividad con 2

TABLA 2
RESULTADOS
DIAGNOSTICO CITOMORFOLOGICO, CITOQUIMICO E INMUNOFENOTIPO (MEMBRANA Y CITOPLASMA)

| Paciente | Diag. Morfol. | Mixoplasma | Negro Sudan | PAS | CD19 | CD10 | CD5 | CD2 | CD14 | CD13 | My8 | CD33 | CD41 | CD34 | TdT | CD3 _c | CD79 _c | MPO _c |
|----------|----------------|------------|-------------|------------------|------|------|-----|-----|------|------|-----|------|------|------|-----|------------------|-------------------|------------------|
| 1. | LLA-L1 | Neg. | Neg. | Neg. | 0 | 0 | 74 | 42 | 0 | 1 | 0 | 2 | | 36 | 68 | 75 | 12 | 0 |
| 2. | LLA-L1 | Neg. | Neg. | Neg. | 18 | 57 | 48 | 58 | 34 | 98 | 39 | | 68 | 34 | 98 | 80 | 95 | 82 |
| 3. | LLA-L1 | Neg. | Neg. | Neg. | 88 | 55 | 20 | 28 | 15 | 1 | 13 | | 7 | 9 | 94 | 0 | 99 | 28 |
| 4. | Indiferenciada | Neg. | Neg. | Neg. | 22 | 96 | 26 | 28 | 27 | 2 | 37 | | 12 | 98 | 99 | 4 | 99 | 8 |
| 5. | LLA-L1 | Neg. | Neg. | Inter. 48 ptos. | 12 | 9 | 11 | 6 | 2 | | | 4 | 7 | 13 | 74 | 18 | 76 | 16 |
| 6. | LLA-L1 | Neg. | Neg. | Alto 182 ptos. | 60 | 30 | 4 | 5 | 2 | | | 11 | 2 | 76 | 80 | 15 | 81 | 11 |
| 7. | LLA-L1 | Neg. | Neg. | Inter. 114 ptos. | 9 | 77 | 0 | 5 | 2 | | | 0 | 56 | 62 | 98 | 18 | 89 | 41 |
| 8. | Indiferenciada | Neg. | Neg. | Neg. | 67 | 80 | 10 | 4 | | | | 6 | | 45 | 5 | 13 | 94 | 13 |
| 9. | LLA-L2 | Neg. | Neg. | Alto 157 ptos. | 84 | 74 | 6 | 9 | 13 | | | 10 | 6 | 94 | | 18 | 91 | 35 |
| 10. | LLA-L1 | Neg. | Neg. | Bajo 20 ptos. | 69 | 96 | 10 | 3 | | | | | 4 | 28 | 4 | 5 | 97 | 42 |
| 11. | LLA-L1 | Neg. | Neg. | Neg. | 55 | 98 | 10 | 16 | 11 | | | 6 | | | 86 | 6 | 84 | 5 |
| 12. | LLA-L1 | Neg. | 20% | Inter. 117 ptos. | 59 | 49 | 28 | 25 | 13 | 20 | 25 | 14 | 14 | 9 | 64 | 24 | 75 | |
| 13. | LLA-L1 | Neg. | Neg. | Inter. 113 ptos. | 26 | 26 | 35 | 32 | 29 | 19 | 13 | 1 | 11 | 29 | 47 | 74 | 27 | |
| 14. | LLA-L1 | Neg. | Neg. | Neg. | 36 | 43 | 7 | 6 | | 8 | 8 | 5 | | 5 | 89 | 19 | 82 | |
| 15. | LLA-L1 | Neg. | Neg. | Alto 513 ptos. | 69 | 18 | 15 | 7 | 3 | 3 | 28 | | 12 | 56 | 79 | 7 | 70 | |
| 16. | LLA-L1 | Neg. | Neg. | Inter. 137 ptos. | 45 | 48 | 16 | 16 | 1 | 9 | 11 | 2 | 0 | 26 | 73 | 3 | 61 | |
| 17. | LLA-L1 | Neg. | Neg. | Neg. | 85 | 66 | 26 | 27 | 2 | 24 | 41 | 29 | 6 | | 64 | 0 | 73 | 0 |
| 18. | LLA-L1 | Neg. | Neg. | Alto 169 ptos. | 60 | 81 | 11 | 6 | 6 | 27 | 25 | 6 | 2 | | 41 | 2 | 45 | 8 |
| 19. | LLA-L1 | Neg. | Neg. | Inter. 58 ptos. | 7 | 72 | 25 | 9 | 2 | 7 | 11 | 4 | 0 | | 99 | 0 | 69 | 2 |
| 20. | Indiferenciada | Neg. | Neg. | Neg. | 28 | 8 | 34 | 50 | 17 | 2 | 1 | 1 | 0 | 13 | 51 | 65 | 4 | 0 |

casos positivos, el CD34 en un rango de 9 a 98 % de positividad con 8 casos positivos , la TdT se presentó en un rango de 4 a 98 % de positividad con 17 casos positivos, el CD3c en un rango de 0 a 80 % de positividad con 4 casos positivos y el CD79a-c en un rango de 4 a 99% de positividad con 16 casos positivos. La MPO monoclonal se presentó en un rango de 0 a 82% de positividad con 4 casos positivos.

En referencia a la tabla 3 los casos 1 y 13 corresponden morfológicamente a una LLA1 en la que el resultado para las 3 tinciones citoquímicas es negativo para el caso 1 y el caso 13 presentó solo PAS + . Por inmunofenotipo se indentifica que pertenece a estirpe T y se confirma con su marcador específico: CD3c.

En los casos 2 y 7 se identifica primero que es una LLA1, con unas tinciones citoquímicas que no correlacionan, pero al observar los resultados del inmunofenotipo vemos un marcador CD41 positivo lo que cambia radicalmente el diagnóstico inicial, además los marcadores intracitoplásmicos confirman la presencia de 2 líneas celulares, concluyendo con la presencia de una LMA-M7.

En los casos 3, 11 y 14 se observa que el diagnóstico morfológico no se confirma con el citoquímico, pero se establece con el inmunofenotipo y el CD79a-c específico para estirpe celular B.

En los casos 4 y 8 ni los resultados morfológicos ni citoquímicos permitieron la clasificación de la leucemia por lo tanto el inmunofenotipo orienta a la presencia de blastos tipo B confirmados con un CD79a-c positivos.

En el caso 20, la clasificación morfológica de la leucemia es indiferenciada, pero tanto los marcadores de membrana como los intracitoplásmicos orientan hacia una clasificación de estirpe T.

TABLA 3

CORRELACION ENTRE CLASIFICACIONES: CITOMORFOLOGICA, CITOQUIMICA E INMUNOFENOTIPO

| PACIENTE | CLASIFICACIÓN CITOMORFOLÓGICA | CLASIFICACIÓN CITOQUÍMICA | MARCADORES DE MEMBRANA | MARCADORES INTRACITOPLÁSMICOS | CLASIFICACION INMUNOLOGICA |
|----------|-------------------------------|---------------------------|--------------------------------------|---|------------------------------|
| 1 | LINFOIDE LLA1 | -- * | PRECURSOR DE CÉLULAS T | PRECURSOR DE CÉLULAS T | LLA1 ESTIRPE T |
| 2 | LINFOIDE LLA1 | -- * | PRECURSOR DE B ,T , CD41 | PRECURSOR DE B ,T | LAM-M7, CON MARCADORES B Y T |
| 3 | LINFOIDE LLA1 | -- * | PRECURSOR DE CÉLULAS B | PRECURSOR DE CÉLULAS B | LLA1 ESTIRPE B |
| 4 | INDETERMINADO | -- * | PRECURSOR DE CÉLULAS B | PRECURSOR DE CÉLULAS B | LLA1 ESTIRPE B |
| 5 | LINFOIDE LLA1 | PAS POSITIVO | NULO | PRECURSOR DE CÉLULAS B | LLA1 ESTIRPE B |
| 6 | LINFOIDE LLA1 | PAS POSITIVO | PRECURSOR DE CÉLULAS B | PRECURSOR DE CÉLULAS B | LLA1 ESTIRPE B |
| 7 | LINFOIDE LLA1 | PAS POSITIVO | PRECURSOR DE CÉLULAS B CD41 POSITIVO | PRECURSOR DE CÉLULAS B | LAM-M7, CON MARCADOR B |
| 8 | INDETERMINADO | -- * | PRECURSOR DE CÉLULAS B | PRECURSOR DE CÉLULAS B | LLA1 ESTIRPE B |
| 9 | LINFOIDE LLA2 | PAS POSITIVO | PRECURSOR DE CÉLULAS B | PRECURSOR DE CÉLULAS B | LLA2 ESTIRPE B |
| 10 | LINFOIDE LLA1 | PAS POSITIVO | PRECURSOR DE CÉLULAS B | PRECURSOR DE CÉLULAS B | LLA1 ESTIRPE B |
| 11 | LINFOIDE LLA1 | -- * | PRECURSOR DE CÉLULAS B | PRECURSOR DE CÉLULAS B | LLA1 ESTIRPE B |
| 12 | LINFOIDE LLA1 | PAS POSITIVO | PRECURSOR DE CÉLULAS B | PRECURSOR DE CÉLULAS B | LLA-L1 ESTIRPE B |
| 13 | LINFOIDE LLA1 | PAS POSITIVO | PRECURSOR DE CÉLULAS T | PRECURSOR DE CÉLULAS T | LLA-L1 ESTIRPE T |
| 14 | LINFOIDE LLA1 | -- * | PRECURSOR DE CÉLULAS B | PRECURSOR DE CÉLULAS B | LLA-1 ESTIRPE B |
| 15 | LINFOIDE LLA1 | PAS POSITIVO | PRECURSOR DE CÉLULAS B | PRECURSOR DE CÉLULAS B | LLA-1 ESTIRPE B |
| 16 | LINFOIDE LLA1 | PAS POSITIVO | PRECURSOR DE CÉLULAS B | PRECURSOR DE CÉLULAS B | LLA-1 ESTIRPE B |
| 17 | LINFOIDE LLA1 | -- * | PRECURSOR DE CÉLULAS B | PRECURSOR DE CÉLULAS B CON MARCADOR ADEERANTE M Y S | LLA-1 ESTIRPE B |
| 18 | LINFOIDE LLA1 | PAS POSITIVO | PRECURSOR DE CÉLULAS B | PRECURSOR DE CÉLULAS B | LLA-1 ESTIRPE B |
| 19 | LINFOIDE LLA1 | PAS POSITIVO | PRECURSOR DE CÉLULAS B | PRECURSOR DE CÉLULAS B | LLA-1 ESTIRPE B |
| 20 | INDETERMINADO | -- * | PRECURSOR DE CÉLULAS T | PRECURSOR DE CÉLULAS T | LLA2 ESTIRPE T |

--* No se observó positividad para MPO, NS, PAS variable.

En los casos 6, 9, 10, 12, 15 y 18, el inmunofenotipo y los marcadores intracitoplásmicos correlacionaron perfectamente concluyendo en una LLA de estirpe B.

Además, en los casos 9 y 10 se observa la expresión citoplásmica de la MPO y se le atribuye a una manipulación incorrecta de la técnica debido a que las muestras presentaron células mieloides residuales las cuales no se eliminaron adecuadamente con el mapa electrónico.

En el caso 19, se identificó ser una LLA1 morfológicamente y se asignó estirpe B con el inmunofenotipo.

En el caso 5 los resultados morfológicos y citoquímicos, conducen a la presencia de una LLA1, en el cual el inmunofenotipo no ubica la presencia de ninguna estirpe celular, pero al detectar un CD79a-c positivo confirma la presencia de células de estirpe celular B.

En el caso 17 el resultado morfológico y citoquímico de LLA1 correlacionan perfectamente, pero al examinar los resultados, este diagnóstico no se ve claro, debido a la presencia de un antígeno mieloide (My 8) positivo, pero los resultados del CD79a-c, identifica la estirpe tipo "B".

En cuanto a las gráficas obtenidas con el citómetro de flujo, en la figura 2 se observa la distribución de la población leucémica en un histograma de dos parámetros: tamaño (FS) en el eje de la X vs granularidad (SS) en el eje de la Y, el cuadro interior representa la población aislada electrónicamente la cual será estudiada. En la figura 3, se puede observar el pico representante de la fluorescencia inespecífica, donde el cursor de la derecha indica la región de los resultados positivos. La figura 4, representa un ejemplo del histograma donde se mide CD79a-c-FITC. Al igual la figura 5 es la medición de CD3c-FITC y la figura 6, la medición de MPOc-FITC.

FS VS SS

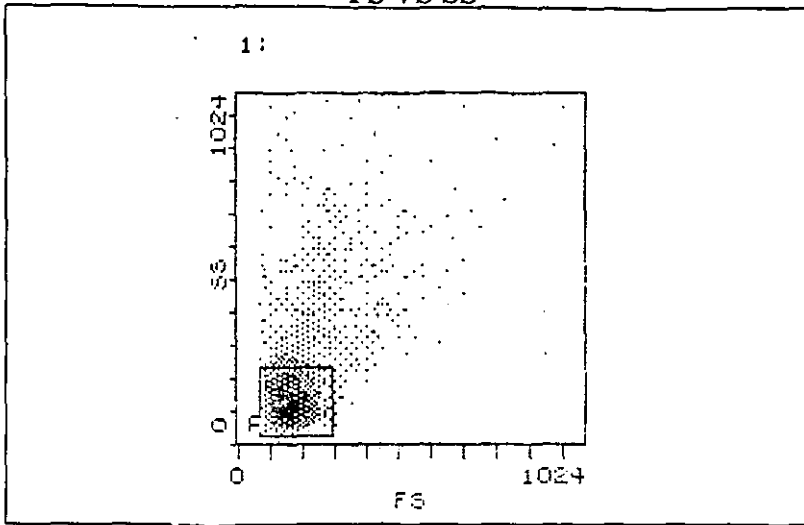


Figura 2. Distribución de la población leucémica de acuerdo a tamaño y granularidad.

CONTROL ISOTIPO

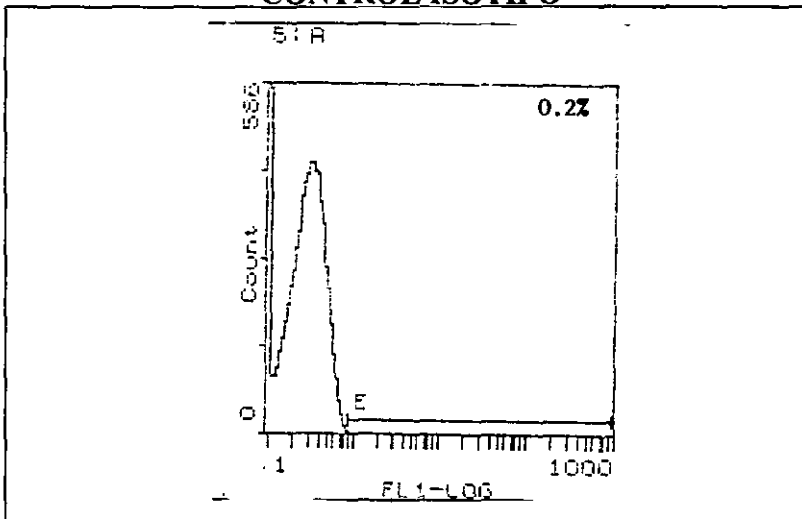


Figura 3. Fluorescencia Inespecifica.

CD79a - FITC

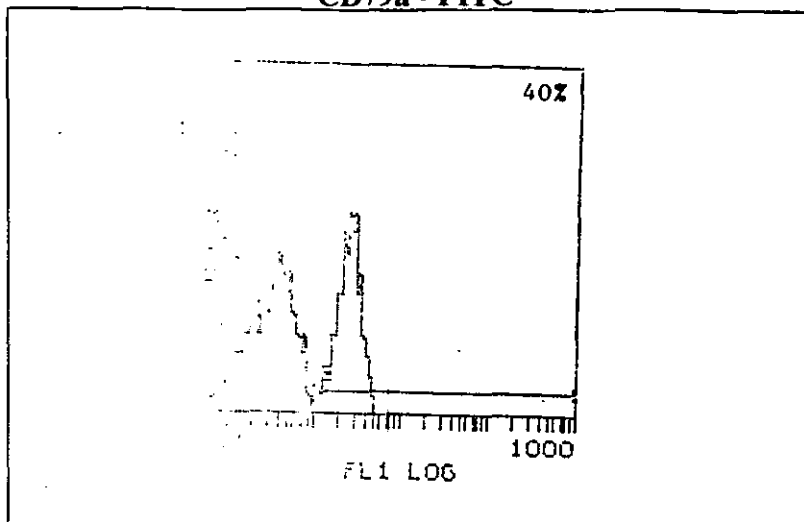


Figura 4. Expresión del antígeno CD79a en la población leucémica

CD3 - FITC

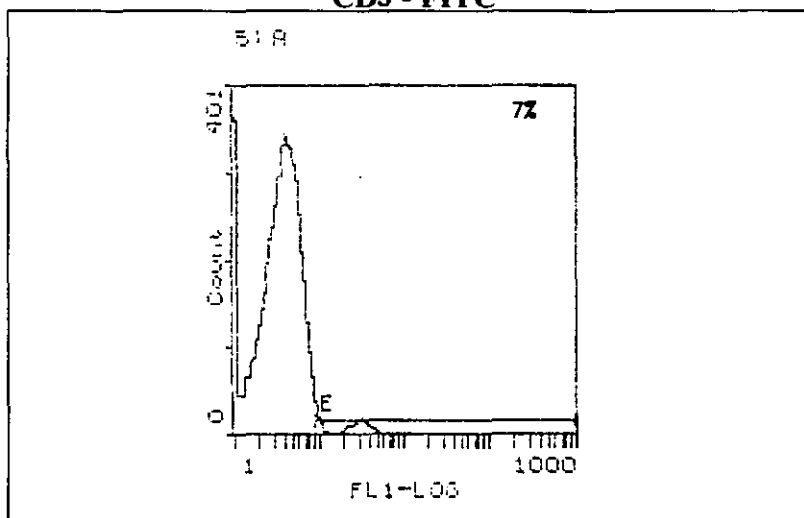


Figura 5. Expresión del antígeno CD3 en la población leucémica

MPO - FITC

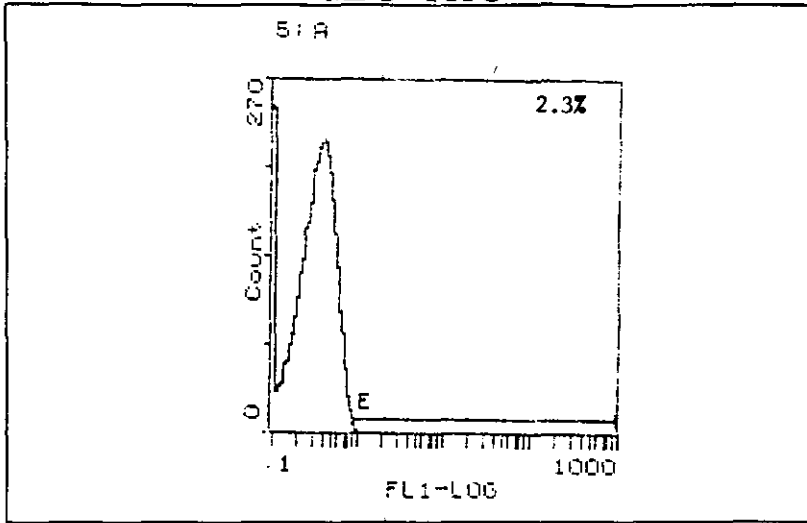


Figura 6. Expresión de la enzima MPO en la población leucémica.

DISCUSION

En base a los criterios del grupo FAB, los resultados del diagnóstico citomorfológico para la clasificación de la leucemia correlacionaron con los del inmunofenotipo en 17 pacientes (85%), como se representa en la figura 7. El examen citomorfológico se ve limitado ya que se ha demostrado en diversas publicaciones que existe una gran similitud entre la LLA1 y LLA2, así mismo, con respecto a las LMA - M7.

Las pruebas citoquímicas en el presente estudio, fueron consideradas importantes en 11 casos (55%), sin embargo solo en 9 casos, los resultados encontrados correlacionan con la clasificación morfológica para establecer un diagnóstico correcto. Esto lo asociamos a la inespecificidad de la reacción de PAS, ya que es positiva en una serie morfológica y en otra como sucede en las M7 donde es positivo al igual que en las linfoblásticas.

Desde que Köhler y Milstein produjeron grandes cantidades de anticuerpos monoclonales, altamente específicos para el reconocimiento de diferentes epitopes de antígenos de células B, T así como mieloides y que estos anticuerpos se conjugaron con diferentes fluorocromos, se conoció el patrón de presentación de diversas glicoproteínas de membrana y más tarde de citoplasma, dependientes del grado de maduración de las células hematopoyéticas normales. Estos estudios asociados a LA, facilitan el reconocimiento de la estirpe así como el grado de maduración de las células leucémicas.

Con el surgimiento en la década pasada de la citometría de flujo para el estudio de los antígenos de membrana celular, de inmediato se implementaron técnicas para la detección de antígenos intracitoplásmicos. La citometría tiene las siguientes ventajas: 1) proporciona análisis multiparamétricos, el citómetro detecta glicoproteínas aisladas o varios tipos de ellas en la misma célula, 2) realiza cuentas de 10 000 a 100 000 células en pocos minutos, lo que aumenta la precisión del estudio, 3) el procedimiento es rápido.

Por estudios de inmunofenotipo, con marcadores de superficie y utilizando la citometría de flujo, se identificó la estirpe en 19 casos (95%), debido a fallas técnicas en la

realización de la prueba, a la presencia de antígenos mieloides en células de estirpe linfoide, y a que no todos los antígenos de membrana se encuentran en todas las leucemias linfoblásticas agudas.

Debido a que actualmente se conoce que algunos antígenos pueden ser detectados intracelularmente antes de su expresión sobre la superficie de la célula durante los estados de diferenciación linfoide, en el presente trabajo se utilizó el procedimiento de fijación y permeabilización para facilitar la detección de antígenos intracitoplásmicos como CD3, CD79a y MPO. Por medio de marcadores intracitoplásmicos, se identificó la estirpe en 20 casos (100%), un poco menos que lo encontrado por otros autores debido también fallas en la ejecución de la técnica, en este caso un aumento en el tiempo para la permeabilización y lisado destruye las células.

Diversos autores como Kung y cols. (36), Hirata y Okamoto (37), describieron un análisis por citometría de flujo para la detección de TdT, con diversos métodos de fijación y permeabilización, es de destacarse que el método empleado y descrito en la metodología del presente trabajo, resultó adecuado y rápido para la determinación de TdT, CD3c, CD79a-c y MPOc, sin embargo es necesario cumplir con las variables de tiempo de incubación y temperatura establecidos, ya que con cualquier modificación al respecto, las pruebas resultan falsamente negativas. En el presente estudio, el TdT fue positivo en 17 casos (85%). Se ha reportado que el TdT es positivo en 90% a 95% de las LLA y más del 40% de las células son positivas, por lo tanto se concluye que el TdT es un marcador ubicuo tanto para las leucemias mieloides como linfoides y asociado únicamente al grado de madurez.

COMPARACION DE LOS METODOS UTILIZADOS PARA DIAGNOSTICO DE LA LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA

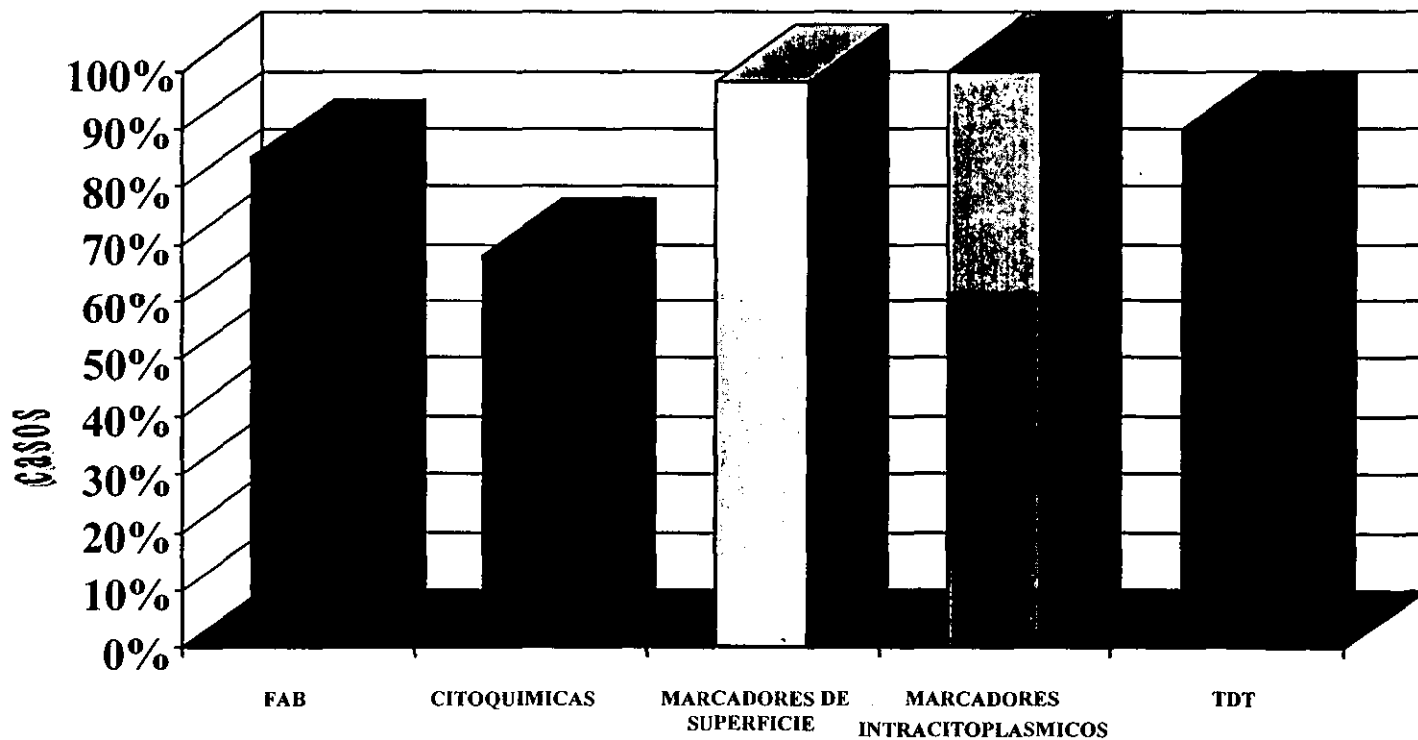


FIG. 7

CONCLUSIONES

1. El 85% de las leucemias agudas se pudieron clasificar de acuerdo a los criterios del grupo FAB.
2. El inmunofenotipo, empleando marcadores de superficie permitió establecer la estirpe celular en el 95% de las leucemias agudas.
3. Todos los marcadores de superficie empleados para identificar células se estirpe T, B o mieloide fueron negativos en el 5% de las leucemias agudas.
4. Empleando los marcadores intracitoplásmicos la estirpe celular se pudo establecer en el 100% de las leucemias agudas.
5. En el 95% de los casos analizados, la estirpe celular obtenida con el inmunofenotipo con marcadores de superficie coincidió totalmente con el obtenido empleando solo los tres marcadores intracitoplásmicos.

APENDICE

CLASIFICACION CITOQUIMICA.

- ACIDO PERIÓDICO DE SCHIFF (PAS).

La oxidación por ácido peryódico rompe la unión 1:2 glicol de la glucosa o de un derivado amino o alquilo sustituto. Por mecanismo de ruptura de las uniones C-C, da origen a radicales aldehído revelables por el Schiff.

MATERIAL BIOLÓGICO:

Extensiones de sangre o de médula ósea del problema.

REACTIVOS:

1.- Solución fijadora:

| | |
|---------------------|------|
| Formaldehído al 36% | 10ml |
| Etanol al 96% | 90ml |

2.- Acido peryódico:

| | |
|--------------------------|-------|
| Peryodato de potasio | 0.69g |
| Agua destilada cbp. | 100ml |

Disolver por calentamiento y agregar:

Acido nítrico concentrado 0.3ml. Conservar a temperatura ambiente.

3.- Reactivo de Schiff:

| | |
|----------------|--------|
| Agua destilada | 100 ml |
| Fucsina básica | 1 g |
| (Dura 2 meses) | |

Poner a ebullición el agua, en este momento poner lentamente el colorante agitando fuera del calor.

Enfriar a 60^oc, filtrar y agregar:

Bisulfito o metabisulfito de sodio 2 g

Acido clorhídrico IN 20 mL

Incubar a temperatura ambiente por 18 a 26 horas, en un frasco tapado.

Agregar carbón activado 300mg

Agitar por 1 minuto. Filtrar. Conservar en frasco obscuro a 4^oc.

Desechar cuando toma un color ligeramente rosa.

4.- Metabisulfito de sodio:

Metabisulfito de sodio: 0.5 g

Agua destilada cbp. 100 mL

Preparar en el momento de usar.

5.- Hematoxilina:

Hematoxilina de Mayer 1g

Agua destilada 500 mL

Calentar a ebullición y agregar en el siguiente orden:

Agua destilada 500 ml

Yodato de sodio 0.2 g

Sulfato de potasio y aluminio 50 g

Agitar bien hasta disolución completa. Filtrar y guardar en frasco obscuro a temperatura ambiente.

Filtrar nuevamente antes de usar.

TECNICA:

1.- Fijar las extensiones de sangre o médula ósea con la solución fijadora por 5 minutos.

2.- Lavar los frotis con agua corriente por 15 minutos. Secar al aire.

3.- Colocar los frotis en un vaso de Coplin con ácido peryódico durante 10 minutos.

4.- Lavar con agua corriente por 5 minutos. Secar al aire. NOTA: Frotis teñidos con Wright o Giemsa pueden teñirse a partir de este punto.

5.- Colocar los frotis en un vaso de Coplin con reactivo de Schiff durante 10 minutos.

6.- Pasar de inmediato los frotis a tres baños sucesivos con metabisulfito de sodio 3 minutos cada uno.

7.- Lavar con agua corriente por 5 minutos. Secar al aire.

8.- Contrateñir con hematoxilina por 15 minutos.

9.- Lavar con agua corriente. Secar al aire

10.- Observar al microscopio.

INTERPRETACION:

El material positivo (glucógeno) dentro de las células toma un color rosa en forma de gránulos o acúmulos gruesos.

INFORME DE RESULTADOS:

Bajo, intermedio, alto.

- PEROXIDASA

Las células hemáticas se impregnan en una solución de bencidina. Ante el agregado de agua oxigenada (perhidrol) aquellas organelas que poseen la enzima desprenden oxígeno naciente del agua oxigenada y éste oxida la bencidina a un óxido intermedio color azul oscuro al principio que luego vira a negro.

MATERIAL BIOLÓGICO:

Extensiones de sangre periférica o de médula ósea del problema. Las extensiones deben ser frescas (menos de 24 horas). Conservadas en la obscuridad duran hasta 3 semanas.

REACTIVOS:

1.- Fijador :

| | |
|---------------------|-------|
| Formaldehído al 36% | 10 mL |
| Etanol 96% | 90 mL |

2.- Solución de tinción:

Agregar en el siguiente orden:

| | |
|--|--------|
| Etanol al 30% (v/v) en agua | 100 mL |
| Sulfato de Zinc 0.132M (3.8%) | 0.3 g |
| (ZnSO ₄ -7H ₂ O) | 1 mL |

La bencidina no llega a disolverse totalmente. Se forma un precipitado con el sulfato de zinc que desaparece al agregar:

| | |
|---|--------|
| Acetato de sodio trihidratado | 1 g |
| (NaC ₂ H ₃ O ₂ - 3 H ₂ O) | |
| Peróxido de hidrógeno al 3% | 0.7 mL |
| Hidróxido de sodio 1N | 1.5 mL |
| Safranina O | 0.2 g |

Ajustar el pH 6.0. Filtrar y conservar en frasco oscuro a temperatura ambiente. Dura 6 meses.

3. Safranina al 0.5%

| | |
|-------------------------|--------|
| Safranina O | 0.5 g |
| Agua destilada filtrada | 100 ml |

TECNICA:

1. Fijar las extensiones de sangre periférica o de médula ósea secas con solución fijadora (1) por 1 minuto.
2. Lavar los frotis en agua corriente. Secar al aire.
3. Teñir con la solución de tinción (2) por 30 segundos.
4. Lavar los frotis con agua corriente. Secar al aire.
5. Teñir nuevamente con safranina (3) por 1 minuto, si la contratinción es muy pálida.
6. Lavar los frotis con agua corriente, secar al aire. Observar al microscopio.

INTERPRETACION:

Los granulocitos en las etapas de maduración de promielocitos a neutrófilos segmentados, los eosinófilos y los monocitos son peroxidasa positivos. en tanto que, los mieloblastos, linfoblastos, linfocitos, células plasmáticas y basófilos son negativos.

INFORME DE RESULTADOS:

Tinción de peroxidasa positiva o negativa.

- SUDAN NEGRO B.

Tiñe una gran variedad de lípidos, incluyendo grasas neutras fosfolípidos y esteroides, es útil para distinguir células mieloides de otras células, puesto que los gránulos de las células mieloides son sudanofílicos.

Lípido + Sudan negro  Presencia de gránulos de color café oscuro a negro

METODO:

Sheehan H. L., Storey G.W.

REACTIVOS:

1.- Fijador:

2. Solución Stock de Sudán negro B:

| | |
|-----------------|--------|
| Sudán negro B | 0.3 g |
| Etanol absoluto | 100 mL |

Requiere hasta dos días a temperatura ambiente para disolverse.

3. Solución buffer:

| | |
|-----------------|-------|
| Fenol | 16 g |
| Etanol absoluto | 30 mL |

Mezclar y agregar a una solución de:

| | |
|--|--------|
| NaHPO ₄ - 12 H ₂ O | 0.3 g |
| Agua destilada | 100 mL |

4. Solución de tinción:

| | |
|---------------------|-------|
| Solución stock (2) | 60 mL |
| Solución buffer (3) | 40 mL |

Filtrar por succión. Esta solución es estable por varias semanas conservándola a temperatura ambiente.

5. Hematoxilina

Hematoxilina de Meyer 1g

Agua destilada 500 mL

Calentar a ebullición y agregar en el siguiente orden:

Agua destilada 500 mL

Yodato de sodio 500 mL

Sulfato doble de aluminio y potasio 50 g

Agitar enérgicamente. Conservar en frasco oscuro a temperatura ambiente. Filtrar antes de usar.

TECNICA:

1. Fijar las extensiones de sangre o médula ósea secas en vapores de formol por 10 minutos en una caja Petri con un poco de formol. Se colocan los frotis sobre puentes de vidrio, la caja se mantiene tapada.
2. Colocar los frotis en un vaso de Coplin con la solución de tinción (4) por 60 minutos para su tinción.
3. Lavar con etanol al 70% por 3 minutos, para eliminar el exceso de colorante.
4. Lavar con agua corriente y secar al aire.
5. Contrateñir con la hematoxilina (5) por 15 minutos.
6. Lavar con agua corriente. secar al aire. observar al microscopio.

INTERPRETACION:

El patrón de tinción es similar al de la mieloperoxidasa. Los lípidos se tiñen de color negro.

INFORME DE RESULTADOS:

Tinción de Sudan Negro B: positiva o negativa.

BUFFER DE FOSFATOS SALINO

- A.- Solución de KH_2PO_4 0.067 M
- B.- Solución de Na_2HPO_4 0.067 M
- C.- Mezclar 13 ml de la solución A a 87 ml de la solución B.

CLASIFICACION CITOMORFOLOGICA

GRUPO COLABORATIVO FRANCO-AMERICANO BRITANICO

LEUCEMIAS AGUDAS LINFOBLASTICAS.

| RASGOS CITOMORFOLOGICOS | L1 | L2 | L3 |
|--------------------------|-----------|--------------|-------------|
| TAMAÑO CELULAR | pequeño | grande | grande |
| | | heterogéneo | heterogéneo |
| CROMATINA NUCLEAR | homogénea | variable | fina |
| | | homogénea | homogénea |
| FORMA NUCLEAR | regular | irregular | regular |
| NUCLEOLOS | pequeños | visibles | visibles |
| CANTIDAD DE CITOPLASMA | escasa | variable | moderada |
| BASOFILIA DEL CITOPLASMA | claro, | poco intenso | muy intenso |
| VACUOLIZACION | variable | variable | prominentes |
| DEL CITOPLASMA. | | | |

BIBLIOGRAFIA

1. Ching Hon Pui, Behm F, Crist W: Clinical and biologic relevance of immunologic marker studies in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1993;82:343
2. Copelan E, Mc Guire E: The biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia in adults. *Blood* 1995;85:115
3. Jannossy G, Coustan Smith E, Campana D: The reliability of cytoplasmic CD3 and CD22 antigen expression in the immunodiagnosis of acute leukemia: a study of 500 cases. *Leukemia* 1989;3:170.
4. Maver A: Clinical Features of Human Leukemia en Maver A: The Biology of Human Leukemia: Alvin M. Maver Edition, 1990, pp. 2-20.
5. Sartor M, Bradstuck K: Detection of intracellular lymphoid differentiation antigens by flow cytometry in acute lymphoblastic leukemia. *Cytometry* 1994;18:119.
6. Borowitz J. Michael: Monoclonal antibody definition of phenotypes of acute lymphoblastic leukemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America* 1990; 4:746.
7. LeBien T., Villablanca J: Ontogeny of normal human B-Cell and T-Cell precursors an its relation to leukemogenesis. *Hematology/Oncology Clinic of North America* 1990;4:835.
8. Köhler G, Milstein C: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975;256:495.

9. Slaper Cortenbach I, Admiral L, Kers J, Leevewen E, Von der Borne A, Tetteroo P: Flow Cytometric detection of terminal deoxynucleotidyl transferase and other intracellular antigens in combination with membrane antigens in acute lymphatic leukemia. *Blood* 1988;72:1639.
10. Knzaapp W, Strob H and Majdic O: Flow cytometric analysis of cell - surface and intracellular antigens in leukemia diagnosis. *Cytometry* 1994;18:187.
11. Ruiz-Argüelles A., Duque ER, Orfao A: Report on the first latin american consensus conferency for flow cytometric immunophenotyping of leukemia. *Cytometry* 1998; 34:39.
12. Ruiz-Argüelles G: Leucemias agudas. En Argüelles G: *Fundamentos de Hematología*: Editorial Médica Panamericana, 1990, pp 137.
13. Foon K, Peter Gale R, Tood R: Immunologic advances in the classification of leukemia. En Mauer A: *The Biology of Human Leukemia*: Alvin Mauer, 1990, pp. 45.
14. Bianco C, Patrick R, Nusenweig V: A population of lymphocytes bearing a membrana receptor for antigen-antibody complement complexes. *J Exp Med* 1970;132:702.
15. Tiirikainen I: Evaluation of red blood cell lysing solutions for the detection of intracellular antigens by flow cytometry. *Cytometry* 1995; 20: 341.
16. Harold R, Schumacher, Shirt M, Kowal Vern A, Dizikes G, Raduany R, Le Bau Michelle: Acute leukemia and related entities. *Arch Pathol Lab Med* 1991;115:33.
17. Van Dongen J J, Adriaansen H: Immunobiology of leukemia. En Henderson, Lister, y Greaves : *Leukemia*: W. B Saunders Company, 1996, pp: 83.
18. Maver A: Acute lymphocitic leukemia. En Beutler E, Lichtman M, Coler B, Kipos T: *Williams Hematology*: Mc Graw Hill, 1995, pp. 1004.
19. Mason D, Cordell J, Tse A, Jacques J, Dongen M.V, Carel J, Van Noesel M, Micklem K, Pulford K, Valensi F, Mariek. Commons Bitter W, Borst J, Gatter K: The Ig M-associated protein mb-1 as a marker of normal and neoplastic B cells. *J Immunol* 1991;147:2474.

20. Chessels JM, Hardisty RM, Rapson N, Graques MF: Acute lymphoblastic leukemia in children classification and prognosis. *Lancet* 1977;1:1307.
21. Borst J, Alexander S, elder J, Terhorst C: The T3 complex on human T lymphocytes involves structurally distinct glycoproteins. *J Biol Chem* 1983;58:5135.
22. Campana D, Janossy G, Bofill M, Trejdosiewick L, David M, Hoffbrand V, Mason D, Leback A, Forster H : Human B cell development. *J Immunol* 1985;134:1524.
23. Campana D, Thompson J, Amlot P, Brown S, Janossy: The cytoplasmic expression of CD3 antigens in normal and malignant cells of the lymphoid lineage. *J Immunol* 1987;138:648.
24. Van Dongen J, Krissansan G, Wolvers Tettero ILM, Comans-Bitter W, Adriaansen HJ, Hooijkaas H, Van Wering E.R, Terhorst C: Cytoplasmic expression of the CD3 antigen as a diagnostic marker for immature T-cell malignancies. *Blood* 1988;71: 603.
25. Campana D, Coustan Smith, E, Janossy G: The immunology detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood* 1990; 76:163.
26. Van Dongen J: T cell receptor-CD3 complex during early T cell differentiation. *J Immunol* 1987;138:1260.
27. Mc Caffrey R, Lillquist A, Sallan S, Osband M: Clinical utility of leukemia cell terminal transferase measurements. *Cancer Res* 1981;41:4814.
28. Kalwinsky Dr. Weatherred WH, Dahl GV, Bowman P, Melvin SL, Coleman MS, Bolom FJ: Clinical utility of initial terminal deoxynucleotidyl transferase determinations in childhood acute leukemia. *Cancer Res* 1981;41:2877.
29. Gore S, Kastan M , Goodman S, Civin C: Detection of minimal residual T cell acute lymphoblastic leukemia by flow cytometry. *J Immunol Meth* 1990;132:275.
30. Serke S: Detection of terminal deoxynucleotidyl transferase by permeabilization of cells using a standard red blood cell lyse reagent. *Cytometry* 1995;19:189.
31. Horvatinovich J, Sparks S, Borowitz M: Detection of terminal deoxynucleotidyl transferase by flow cytometry: a three color metod. *Cytometry* 1994;18:228.

32. Drexler H, Sperling Christian, Ludwig W: Terminal deoxynucleotidy transferase expression in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1993;7:1142.
33. Vander Shoot C, Daans G, Pinkster J, Vet R, Albert E: Monoclonal antibodies against mieloperoxidasa are valuable immunologic reagents for the diagnosis of acute myeloid leukemia. *Br J Haem* 1990;174:173.
34. Grignaschi V: Anticuerpos monoclonales marcadores citológicos. En Grignaschi V: Diagnóstico citológico de las hemopatías. Editorial Médica Panamericana 1991, pp. 393.
35. Van Dongen J, Adiaansen HJ. Immunobiology of Leukemia en Henderson ES, Lister AT, Greaves MF. *Leukemia*: WB Saunders, 1996. Pp.89.
36. Kung PC, Long JC, McCafrey RP, Ratcliff RL, Harrison TA, Baltimore D: Terminal doxinucleotidyl transferase in the diagnosis of leukemia and malingnant lymphoma. *Am J Med* 1978;64:788.
37. Hirata M, Okamoto Y: Enumeration of terminal deoxynucleotidyl transferase-positive cells in leukemia/lymphoma by flow cytometry. *Leuk Res* 1987; 70:509.