



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DETECCIÓN DE LEUCEMIA A TRAVÉS DEL
ESTUDIO DE LA CITOMETRÍA HEMÁTICA EN
PACIENTES INGRESADOS POR EL ÁREA DE
URGENCIAS DEL INSTITUTO NACIONAL
DE PEDIATRÍA

INFORME DE LA PRÁCTICA PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

VIRGINIA MARTÍNEZ BEZIES



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA



MÉXICO, D.F.

2005

m. 347022



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).

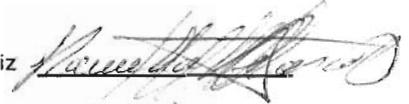
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Graciela Nava Díaz
Vocal	Prof. Claudia Huesca Gómez
Secretario	Prof. Romelia Velasco Ortiz
1er. Suplente	Prof. Martha Patricia Neri Paez
2º. Suplente	Prof. Perla Deyanira Maldonado Jiménez

Sitio en donde se desarrolló el tema: Instituto Nacional de Pediatría.

Asesor del tema: Q.F.B. Esp. en B.C. Romelia Velasco Ortiz



Sustentante: Virginia Martínez Bezies



AGRADECIMIENTOS:

- A Dios; por haber tenido la oportunidad de estudiar y poder concluir, finalmente, mi carrera.
- A mis padres; porque por ellos soy la persona que soy.
- A mis hermanas; Irma, Alicia A. y Gabriela porque han sido el motivo de mis deseos de superación y por haber tolerado en varias ocasiones mi mal carácter.
- A mis compañeros del I.N.P.; Teresa Flores, Antonia Sánchez, Jorge A. Segura, Miguel Rivera, E. Eugenia Zerón, Virginia Reyes y Manuel Galindo por haber compartido conmigo sus conocimientos y experiencia y por la paciencia que me manifestaron al tener mi primer contacto con un Laboratorio de Análisis Clínicos.
- A mis profesores de la Facultad; porque gracias a ellos pude lograr integrar la enseñanza teórica con lo aprendido en el campo laboral.
- A la Q.F.B. Lina T. Guzmán y el Dr. Rogelio Paredes porque sus enseñanzas me comunicaron el interés por la Hematología.
- A la Q.F.B. Romelia Velasco Ortiz; por su confianza y apoyo en la elaboración de este trabajo.
- A las personas que contribuyeron de forma directa e indirecta en la recopilación de la información utilizada en este trabajo.
- A mi esposo; Manuel Fernando Pérez Velázquez, por todo su apoyo y paciencia y por estar conmigo incondicionalmente, aún en mis momentos de mal humor.

DEDICATORIA:

A mis Hermanas,

A mi Esposo,

A mis Amigos,

A mis Compañeros,

A mi Universidad,

A mis Maestros,

A la gente que ha contribuido a mi formación personal y profesional,

Y, especialmente, a mis compañeros Q.F.B Pedro Flores Toledano y Dr. Manuel Pérez Galindo.

*Nunca consideres el estudio como un deber,
sino como una oportunidad para penetrar
en el maravilloso mundo del saber.*
Albert Einstein.

AGRADECIMIENTOS	I
DEDICATORIA	li
ÍNDICE	1
1. Introducción	4
2. Justificación	7
3. Objetivos	9
4. Leucemia	11
4.1. Definición	12
4.2. Antecedentes Históricos	12
4.3. Etiología	13
4.4. Clasificación	14
4.1.1. Leucemia Aguda	15
4.4.1.1 Subclasificación de Leucemia Aguda	15
4.4.2 Leucemia Crónica	16
4.4.3 Métodos utilizados en la clasificación de las leucemias	17
4.4.3.1 Clasificación Morfológica	18
4.4.3.2 Clasificación Inmunológica	23
4.4.3.3 Clasificación Citoquímica	24
4.4.3.4 Clasificación Citogenética	24
4.5. Cuadro clínico	25
4.5.1. Leucemia Aguda	25
4.5.2. Leucemia Crónica	26
4.6. Diagnóstico	26
4.6.1. Leucemia Aguda	26
4.6.2. Leucemia Crónica	26
4.7 Factores Pronósticos	27
4.7.1 Leucemia Aguda	27
4.7.2 Leucemia Crónica	28
4.8 Tratamiento	28
4.8.1 Leucemia Aguda	28

4.8.2 Leucemia Crónica	30
4.9 Quimioterapia	31
4.10 Transplante de Médula Ósea	33
5. El Laboratorio de Análisis Clínicos	35
5.1 Antecedentes	36
5.2 Importancia del Laboratorio de Análisis Clínicos (Urgencias).	37
6. Citometría Hemática	38
6.1 Historia del Estudio de la Sangre	39
6.2 Citometría Hemática relacionada con el Diagnóstico de Leucemia	40
6.3 Relevancia de la Citometría Hemática	41
6.3.1 Información de la Prueba	41
6.3.1.1 Principio del Analizador Hematológico Coulter STKS	42
6.3.1.2 Parámetros determinados por el Equipo Coulter STKS	46
6.4 Examen de Extendidos de Sangre Periférica	46
6.4.1 Origen de las Muestras	47
6.4.2 Preparación y Tinción del Extendido	49
6.4.3 Examen Microscópico	51
7. Materiales y Métodos	59
7.1 Selección de Pacientes	60
7.1.1 Criterios de Inclusión	60
7.1.2 Criterios de Exclusión	60
7.2 Criterios de Análisis	60
7.3 Materiales	61
7.3.1 Tipo de Muestra	61
7.3.2 Volumen de Muestra Requerido	61
7.3.3 Preparación Previa de la Muestra	61
7.4 Equipo e Instrumentación y Material	62
7.5 Reactivos	62
7.6 Métodos	63

7.6.1 Control de Calidad	63
7.6.2 Proceso de la Muestra	65
7.6.3 Cálculos y Conversiones	66
7.6.4 Limitaciones del Método	66
7.7 Intervalos de Referencia	67
7.7.1 Valores Críticos	67
8. Resultados	68
9. Discusión	73
10. Conclusiones	76
11. Apéndice	80
12. Bibliografía	88

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

Debido a que las leucemias conforman un grupo de enfermedades en las que la manifestación común es una proliferación no regulada y maligna de una clona de células hematopoyéticas y a que es la entidad neoplásica maligna más frecuente en la edad pediátrica (seguida de los linfomas y tumores del sistema nervioso central), por su rápida progresión, es muy importante su detección temprana para que el médico tratante pueda ofrecer al paciente un tratamiento rápido y eficaz y, a su vez, el paciente tenga la oportunidad de tener mejores expectativas para su recuperación.

La frecuencia de la leucemia es mayor entre los 3 – 5 años de edad, aunque puede presentarse entre los 0 – 15 años. Esta enfermedad se caracteriza por afectar tanto al sexo masculino como femenino. La mortalidad para esta enfermedad es de 57/ 100 000 casos por año, en comparación con los países industrializados que es de 4/ 100 000 ¹.

Actualmente la supervivencia del paciente pediátrico con un padecimiento oncológico es de aproximadamente 70% siempre y cuando exista un diagnóstico oportuno, correcto y que el tratamiento se realice en un centro hospitalario especializado. Para que esto sea posible es necesario contar con la infraestructura técnica, profesional y humana para desarrollar protocolos de detección, tratamiento e investigación para poder lograr resultados concretos, sin embargo esto sólo es posible en unidades de tercer nivel de atención médica que cuenten con un grupo interdisciplinario de especialistas e investigadores en onco-hematología pediátrica ².

El estudio de la Hematología se ha visto revolucionado por la gran cantidad de instrumentos automatizados para el proceso de diagnóstico clínico. Las tecnologías de dispersión de luz, impedancia eléctrica y conductividad agregaron parámetros cuya importancia no se había aclarado por completo ni se aplicó a la clínica, aunque el estudio morfológico del extendido de sangre periférica (o frotis) mediante microscopio óptico aún se mantiene como característica distintiva en la evaluación clínica de pacientes con anomalías hemáticas ³.

La Citometría Hemática (CH) o Biometría Hemática (BH) constituye la prueba de laboratorio que permite en la mayoría de los pacientes sospechar de la posibilidad de una leucemia aguda. En el análisis de esta prueba es importante conocer el estado de las 3 líneas celulares importantes (eritrocitos, leucocitos y plaquetas) para el posible diagnóstico de una leucemia. Una cuenta leucocitaria dentro de los límites normales no descarta la posibilidad de leucemia, así como

una marcada elevación de estas células no necesariamente es un indicio de esta enfermedad. Por otra parte, la presencia de blastos en la citometría hemática debe sugerir la presencia de leucemia hasta que otros estudios a realizar descarten dicha enfermedad ⁴.

Por medio de la asociación de la información a través de las alteraciones morfológicas observadas con los aspectos clínicos, patogénicos y bioquímicos se obtiene el criterio para analizar el cuadro presentado por el paciente y así establecer un diagnóstico.

Un frotis bien hecho y examinado con cuidado puede proporcionar información valiosa respecto a la salud del paciente. De hecho, pueden obtenerse más datos de esta prueba que de varios otros análisis hematológicos que se realizan de rutina.

Justificación

2. JUSTIFICACIÓN

Una de las principales formas para determinar trastornos hemáticos es el examen de sangre periférica y de la médula ósea, por medio de la citometría hemática y aspirado de médula respectivamente. La Citometría Hemática es una prueba de detección básica y la más solicitada en el laboratorio ya que los datos que proporciona constituyen información diagnóstica y pronóstica muy valiosa sobre el estado hematológico y otros sistemas del cuerpo. Consta de una serie de pruebas que determinan el número, variedad, porcentaje, concentración, maduración y calidad de las células sanguíneas.

La interpretación correcta de toda la información que ofrece la citometría hemática permite fundar sospechas diagnósticas definidas sobre la enfermedad que causa las alteraciones en la misma y auxilia al médico a establecer el mejor tratamiento para el paciente.

Objetivos

3. OBJETIVOS

1. El objetivo principal de este trabajo es hacer énfasis en la oportuna detección de las alteraciones que pueden presentarse en la citometría hemática, tales como la observación de blastos (células inmaduras), que pudieran sugerir la presencia de leucemia en los pacientes que ingresan por primera vez al Instituto Nacional de Pediatría por medio del Servicio de Urgencias.
2. Observar y comparar, de acuerdo a la literatura sobre el tema, en qué sexo y edad se presenta con mayor frecuencia la presencia de leucemia en los pacientes estudiados.
3. Determinar los lugares de procedencia donde se presentó mayor incidencia de la enfermedad en los pacientes tratados.

Leucemia

4. LEUCEMIA

4.1 Definición

La palabra leucemia significa "sangre blanca". Las leucemias son un grupo heterogéneo de padecimientos que suponen proliferación desordenada de una clona de células hematopoyéticas.

4.2 Antecedentes Históricos

La leucemia es una enfermedad relativamente nueva ya que la primera descripción fue realizada hasta el siglo XIX. Tampoco hay alguna referencia en los escritos bíblicos o grecorromanos que pudiera considerarse retrospectivamente como leucemia.

En 1845, John Bennet (Edimburgo) y Rudolf Virchow (Berlín), publicaron, cada uno por su parte, sus observaciones en pacientes leucémicos. Las historias clínicas de sus pacientes fueron análogas; en ellas se describía a dos hombres con síntomas de debilidad creciente, hinchazón en el abdomen y epistaxis severas. En las necropsias, los hallazgos más importantes fueron un bazo muy crecido y aspecto peculiar en la consistencia y color de la sangre.

Bennet pensó que la sangre tenía aspecto de haberse mezclado con pus y al hacer la observación microscópica, afirmó que ésta contenía corpúsculos semejantes a los encontrados en el pus, pero que no se encontraron signos de inflamación, estado que generalmente acompaña la presencia de pus.

Por su parte, Virchow prefirió el término "sangre blanca" a fin de describir el color blanquecino pálido de la sangre y para evitar que se le relacionara con un proceso inflamatorio. Posteriormente, el término "sangre blanca" se tradujo al griego, quedando como leucemia.

Al estudiar más enfermos con leucemia, Virchow observó que no todas las leucemias se relacionaban con el aumento de un mismo tipo de célula blanca. En algunos casos, las células eran granulares con núcleos irregulares o divididos y el bazo estaba crecido en exceso. En otros casos, las células eran agranulares con núcleos redondos y los ganglios linfáticos del paciente mostraban crecimiento.

La descripción de los tipos celulares realizada por Virchow, fue verificada por Ehrlich cuando introdujo su método de tinción diferencial para las células sanguíneas.

En 1889, Ebstein propuso una clasificación adicional de las leucemias, a la que parecía no responder al tratamiento le llamó **Leucemia Aguda**. El segundo grupo fue denominado **Leucemia Crónica**, debido a que el paciente recibía alivio temporal de sus síntomas ⁵.

Desde la década de 1900 las leucemias se estudiaron por microscopio óptico, coloraciones citoquímicas, microscopio electrónico, marcadores inmuno-nucleares y de superficie y técnicas citogenéticas ³.

4.3. Etiología

La causa precisa de la **Leucemia Aguda (LA)** tanto como de la **Leucemia Crónica (LC)** se desconoce.

En el caso de las LA, la proliferación clonal por medio de divisiones sucesivas a partir de una célula progenitora da origen tanto a las Leucemias Agudas linfoblásticas (LAL) como mieloblásticas (LAM). La activación de oncogenes como MLL, MYC, ABL, BCL-2 y RAS, al igual que la formación de genes quiméricos como TEL/ AML1, BCR/ ABL, PML/ RAR- α , AML1/ ETO están relacionados con la presencia de leucemia, aunque probablemente el origen es multifactorial. Es posible que la exposición a derivados del benceno tenga un papel importante en la leucemogénesis así como las radiaciones ionizantes.

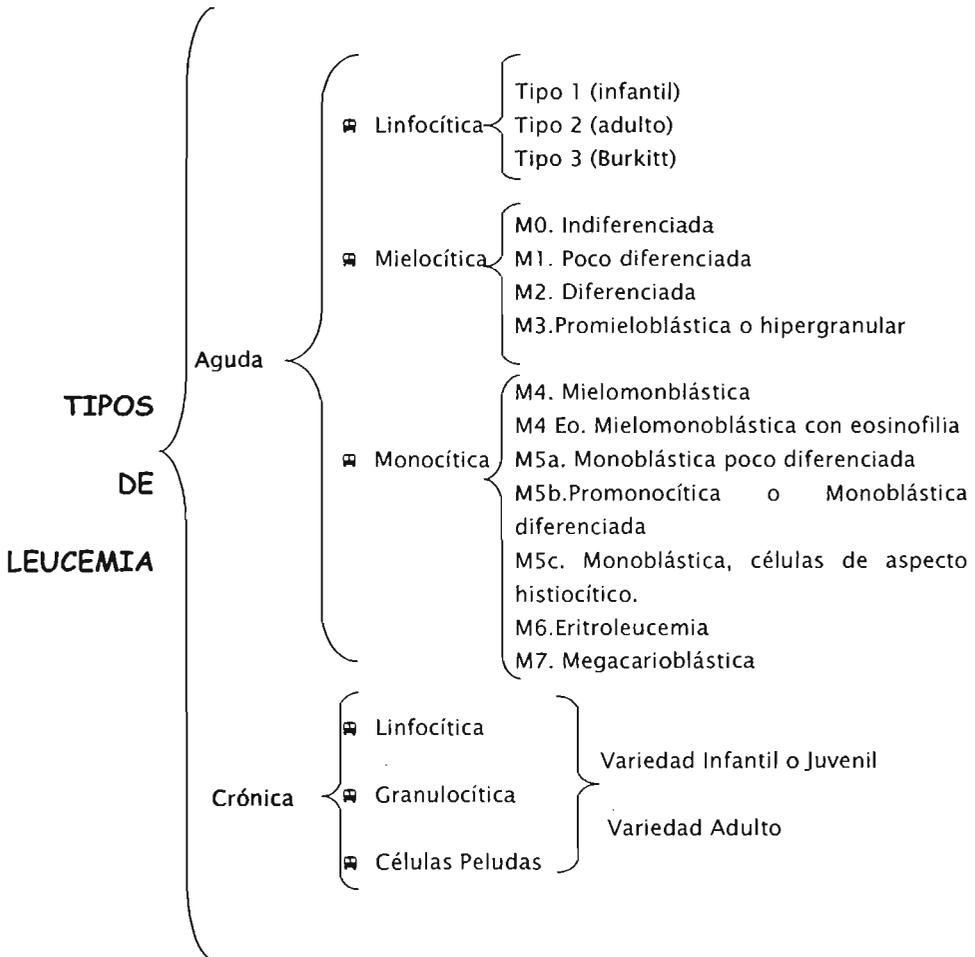
Los agentes que dañan al ácido desoxirribonucleico (ADN) como los medicamentos alquilantes por ejemplo, pueden causar leucemia; algunos daños son secundarios al uso de sustancias quimioterapéuticas para diferentes enfermedades que son muy agresivas. Algunos virus también pueden generar leucemia, entre ellos están los rotavirus HTLV-I y HTLV-II, que tienen semejanzas con el HIV-1. Los padecimientos en los que hay inestabilidad cromosómica, como el síndrome de Fanconi, pueden derivar en leucemia así como la prevalencia de esta enfermedad es mayor en pacientes con síndrome de Down (trisomía del cromosoma 21) que en la población general.

En el caso de la **Leucemia Crónica (LC)**, su origen también es desconocido, sin embargo, se sabe que la frecuencia aumentó en la población japonesa expuesta a la radiación atómica en 1945. Existe menos evidencia que en la Leucemia Aguda en relación a los fármacos, agentes químicos o factores hereditarios como causas directas de la enfermedad. Existen genes alterados (oncogenes) que se relacionan directamente con la presencia y permanencia de la enfermedad pero por qué aparecen dichos genes o las alteraciones cromosómicas de la LC aún no se sabe ⁶.

4.4 Clasificación

Las leucemias se caracterizan por el comienzo abrupto de signos clínicos (palidez, hemorragia, fiebre e infección) y síntomas (debilidad, fatiga, dolor óseo y articular), y puede producirse la muerte en el transcurso de meses si no se diagnostica y da tratamiento oportunamente.

Los tipos de la leucemia, de forma general, pueden resumirse de la siguiente manera:



4.4.1 Leucemia Aguda

Las leucemias agudas (LA) afectan tanto a niños como adultos. La clasificación propuesta en 1976 por el grupo cooperativo FAB (Franco-Americano-Británico) indica que los blastos constituyan el 30% de todas las células nucleadas de la médula ósea. La clasificación propuesta por la Organización Mundial de la Salud (OMS) modificó el porcentaje de blastos a 20%, ya sea en sangre periférica o en médula ósea.

El recuento de leucocitos puede estar elevado, disminuido o dentro de los límites de referencia ($4.1-15.5 \times 10^3/\mu\text{L}$ intervalo dependiente de la edad), aunque generalmente están aumentados. La anemia normocítica, la neutropenia y trombocitopenia son características distintivas de las LA.

4.4.1.1 Subclasificación de Leucemia Aguda

Históricamente, las leucemias también se dividieron desde el punto de vista citomorfológico en:

- a) Mieloide (LAM)
- b) Linfoblástica (LAL)

Sobre la base del parecido morfológico de los blastos con los mieloblastos o los linfocitos inmaduros (linfoblastos).

En las LAL, la alteración más frecuentes es el cromosoma Filadelfia: $t(9q+; 22q-)(q34;q11.2)$, que produce al gen quimérico BCR/ ABL (breakpoint cluster region/ Abelson) que codifica la síntesis de las proteínas p190, característica de LAL, y p210, de la LMC, ambas con función de cinasa de tirosina. El cromosoma Filadelfia aparece en el 2% de los enfermos de LAL infantil y en el 25% de los casos de adultos, donde se ha asociado con pronóstico sombrío.

En las LAM, las alteraciones cromosómicas ($t(4:11)(q21; q23)$) tienen lugar en el 50% de los enfermos. Las alteraciones cromosómicas de mayor pronóstico en LAM son tres:

- I. $t(15; 17)(q22; q11.2)$ de la LAM-M3, promielocítica que produce un gen quimérico (PML/ RAR- α).
- II. $t(8; 21)$ de la LAM-M2, que produce el gen quimérico AML1/ETO.
- III. $inv(16)$ de la LAM-M4Eo (eosinofílica)

La presencia de cualquiera de estas 3 alteraciones genéticas en LAM se asocia a un mejor pronóstico, con mayor posibilidad de lograr la remisión y con supervivencia más prolongada ⁶.

4.4.2 Leucemia Crónica

Las leucemias crónicas se caracterizan por el comienzo insidioso (engañoso) de los signos (palidez, viceromegalia, pérdida de peso) y síntomas (debilidad, fatiga, depresión), y la muerte por lo general se produce años después del diagnóstico. Las LC se pueden encontrar en adultos, aunque hay formas juveniles de leucemia mieloide crónica.

Los recuentos leucocitarios pueden estar disminuidos, aumentados o dentro de los límites de referencia, aunque pueden estar más elevados que en la LA.

Lo tipos de LC de mayor importancia son tres:

- a) Granulocítica
- b) Linfocítica
- c) Células peludas o Tricoleucemia

La **Leucemia Granulocítica Crónica** (LGC) consiste en una proliferación neoplásica predominantemente de la serie granulocítica; sin embargo, se observan alteraciones en la serie roja y en las plaquetas, lo que indica que el origen de la entidad parte de la célula madre (*stem cell*). Esta enfermedad se ha relacionado con una anomalía cromosómica (traslocación del cromosoma 22 al 9; t: 9q+; 22q-) denominada cromosoma Filadelfia (CrPh1), la cual se observa en más del 90% de los pacientes ⁶.

La LGC en México es menos común que la LA, pero más frecuente que la **Leucemia Linfocítica Crónica** (LLC) a diferencia de los países anglosajones donde es más común. La enfermedad se observa a cualquier edad, pero en niños ocupa el 3% de las leucemias en general; su frecuencia predomina en los adultos de 40-50 años y se observa más en hombres que en mujeres (3:2).

A diferencia de los pacientes con LA, los pacientes con LC en un principio se observan recuentos de plaquetas normales o aumentados, que en la evolución posterior desarrollan trombocitopenia.

La **Leucemia de Células Peludas** se origina en los linfocitos B. Las células leucémicas se caracterizan por tener prolongaciones en el citoplasma ("pelos"), son fosfatasa ácida positiva y resistentes al tartrato. Es una enfermedad

característica de la edad media (entre la quinta y sexta décadas). Este tipo de leucemia es poco común en México pero se ha encontrado en el norte del país. Su diagnóstico se basa en la demostración de los linfocitos característicos en sangre periférica, médula ósea o bazo.

4.4.3 Métodos utilizados en la clasificación de las leucemias

Además del examen físico y clínico de la patología del paciente, el médico requiere de una investigación de las células involucradas.

<p>Morfológica: Citología de la médula ósea (clasificación FAB) Patología de la biopsia Observación de las células en microscopio</p> <p>Citoquímica: Métodos enzimáticos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Peroxidasa - Estereasa (específica y no específica) - Fosfatasa - Aril sulfatasa - B- glucuronidasa <p>Métodos no enzimáticos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Negro de Sudán - PAS - Pironina <p>Inmunológica: Marcadores de superficie celular:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Roseta E - Receptor de complemento - Inmunoglobulina de membrana <p>Antígeno de superficie celular:</p> <ul style="list-style-type: none"> - HTA - CALLA <p>Síntesis de inmunoglobulinas celulares Inmunoglobulina citoplasmática</p>	<p>Bioquímica: Deoxinucleotidil transferasa terminal (Tdt) Adenosin deaminasa Lisozima en suero y orina 5-Nucleotidasa Hexosaminidasa Sitios de unión de insulina Receptor de glucocorticoides</p> <p>Citogenética: Alteraciones numéricas Alteraciones estructurales</p> <p>Citometría de Flujo: Análisis del ciclo celular</p> <p>Cinética Celular: Índice mitótico Radiosensibilidad in vitro</p> <p>Estudio de sensibilidad a drogas: Sensibilidad in vitro a Ara-C y L-asparaginasa</p>
---	---

Tabla 4.1. Métodos usados en clasificación de leucemias

* HTA: Antígeno de Timocito Humano

** CALLA: Antígeno LAL Común

4.4.3.1 Clasificación Morfológica (FAB)

El grupo FAB (Franco–Americano–Británico) propuso los criterios para realizar la clasificación morfológica de las LA, que la dividía en 9 tipos: 3 de estirpe linfoide y 6 de estirpe mieloide. Posteriormente, ante la gran información generada, se agregaron a la clasificación inicial 2 variedades más de la leucemia mieloide: M0 y M7, las que no pueden ser diagnosticadas sólo con bases morfológicas (Tablas 4.2 y 4.3).

No obstante que las tinciones especiales, los marcadores de superficie, el inmunofenotipo, la citometría de flujo y el cariotipo han contribuido para lograr el diagnóstico de las leucemias en forma más precisa, los estudios básicos, como el examen cuidadoso de los frotis de sangre periférica y de médula ósea, siguen teniendo gran importancia.

En el examen morfológico debe ponerse especial atención en las características del núcleo; su grado de madurez (determinado por la finura de la cromatina), la presencia o no de nucléolos y la forma y contorno del mismo núcleo ⁸.

La naturaleza de las inclusiones citoplasmáticas, particularmente gránulos primarios o secundarios, granulación azurófila, vacuolas y cuerpos de Aüer, son puntos clave en el diagnóstico. Igualmente, la proporción del citoplasma basofílico es importante para juzgar el grado de inmadurez; un citoplasma abundante que no es azul es característico de mayor madurez.

El uso de microscopía óptica es el primer paso para diferenciar LAL de LAM. Las características que las distinguen son sutiles ya que los linfoblastos son más pequeños que los mieloblastos. Cuando se cuenta con un contador celular por impedancia, sus volúmenes se superponen (en los histogramas obtenidos) en las regiones de distribución de linfocitos y monocitos normales, por lo que la experiencia y el criterio del observador se deben aplicar cuando hay sospecha de la presencia de blastos ³.

<p>Leucemias Agudas Linfoblásticas (LAL)</p> <p>LA-L1: Linfoblástica "típica" LA-L2: Linfoblástica "atípica" LA-L3: Parecida al linfoma de Burkitt</p>
<p>Leucemias Agudas Mieloblásticas (LAM)</p> <p>LA- M0: Mielobástica diferenciada mínimamente LA- M1: Mielobástica Inmadura LA- M2: Mielobástica madura LA- M3: Promielocítica hipergranular LA-M4: Mielomonoblástica LA-M5: Monoblástica pura LA- M6: Eritroleucemia LA- M7: Megacarioblástica</p>

Tabla 4.2. Clasificación Morfológica de las Leucemias Agudas ⁶.

Características Citológicas	Subtipos		
	L1	L2	L3
Tamaño Celular	Predominan células pequeñas	Grande y heterogéneo	Grande y homogéneo
Cromatina nuclear	Homogénea en todos los casos	Variable, heterogénea en todos los casos	Puntilleo fino y homogéneo
Forma nuclear	Regular, hendiduras ocasionales	Irregular, hendiduras o indentaduras	Regular oval a redondo
Nucleolos	No visibles o pequeños, no discernibles	Existe 1 ó más, a menudo grandes	Destacados 1 ó más
Cantidad de citoplasma	Escasa	Variable, abundante a moderado	Abundante a moderado
Basofilia en citoplasma	Ligera o moderada, intensa en raras ocasiones	Variable, intensa en algunas células	Muy intensa
Vacuolación citoplásmica	Variable	Variable	A menudo importante

Tabla 4.3. Criterios del grupo FAB para los subtipos LAL ⁸.

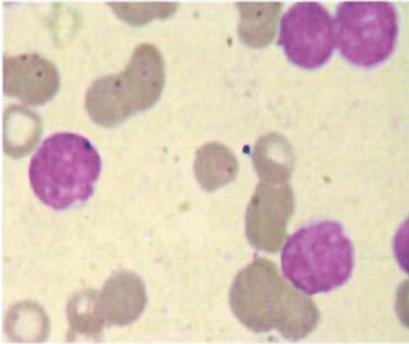


Fig. 1A. Linfoblasto L1 (SP):
Citoplasma azul escaso
Núcleo redondo
Nucleolos indistintos
Vacuolas leves a escasas

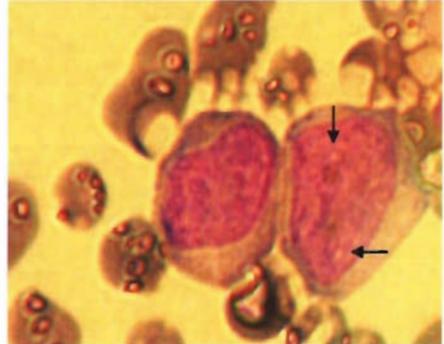


Fig. 1B. Linfoblasto L1 (SP):
Citoplasma azul-grisáceo moderado
Nucleolos escasamente visibles (flechas).

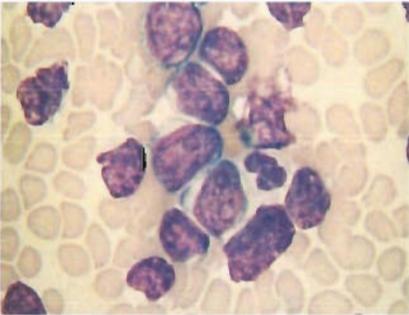


Fig. 2A. Linfoblasto L2 (SP):
Citoplasma moderado
Núcleo irregular
Nucleolos visibles (grandes)
Vacuolas variables ³

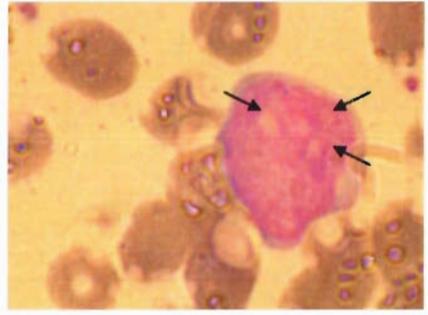


Fig. 2B. Linfoblasto L2 (SP):
Citoplasma escaso
Núcleo irregular
Nucleolos visibles (flechas)

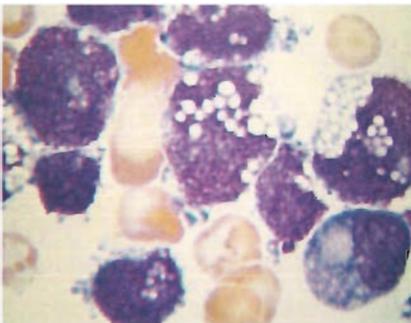
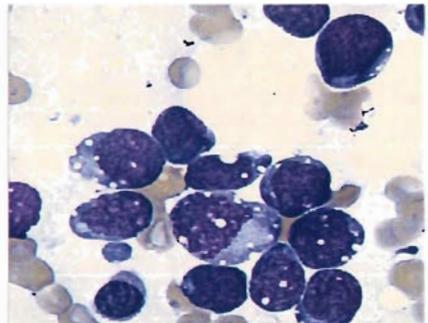


Fig. 3A y 3B Linfoblasto L3 (M0):
Citoplasma grande, homogéneo
Nucleolos prominentes (1 ó más)



Núcleo regular, redondo u oval
Vacuolas abundantes ³.

Designación	Terminología común	Tipos de células predominantes
M0	Mínimamente diferenciada	Blastos de tamaño pequeño o mediano, sin granulación citoplasmática y pocos de ellos vacuolados.
M1	Indiferenciada	Mieloblastos sin signos de maduración, común en adultos y lactantes menores de 1 año. Algunos blastos pueden tener gránulos azurófilos o bastones de Aüer.
M2	Mielocítica aguda	Mieloblastos con signos generalmente de diferenciación promielocítica (\pm 50% blastos y progranulocitos), con granulación azurófila y bastones de Aüer.
M3	Promieloblástica	Promielocitos hipergranuloso. Puede haber la presencia de bastones de Aüer en "empalizada" (90-95% de los casos).
M4	Mielomonocítica aguda	Granulocitos (médula ósea) y monocitos (sangre periférica). Citoplasma irregular, algunas vacuolas citoplasmáticas, cromatina inmadura, nucleolos y, a veces, algunos gránulos protoplasmáticos y/o eosinofilia.
M5	Monocítica aguda	Monoblastos (5A), promonocitos (5B). Blastos con moderado citoplasma y núcleo con cromatina gruesa.
M6	Eritroleucemia	Eritrocitos y granulocitos (más del 50% de células en MO son eritroides). Eritroblastos prominentes y, algunos multinucleados, mieloblastos distorsionados.
M7	Megacarioblástica	Presencia de megacariocitos.

Tabla 4.4. Clasificación de Leucemia Mieloblástica Aguda del grupo FAB.

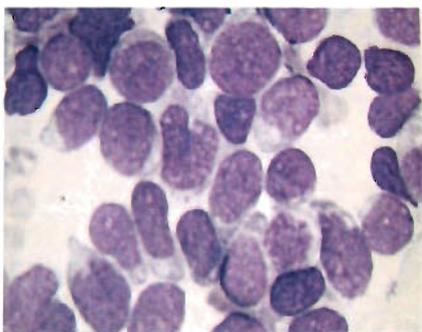


Fig. 4 LAM-M0 mínimamente diferenciada ⁵.

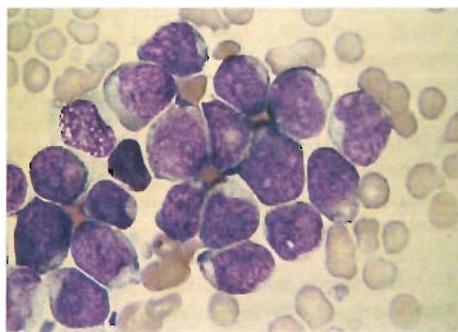


Fig. 5 LAM-M1 sin maduración con menos del 10% de granulocitos maduros ⁵.

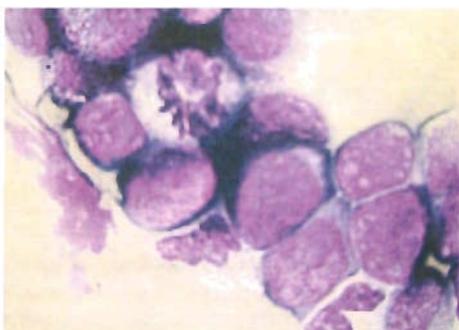


Fig. 6 LAM-M2 con maduración ⁵.

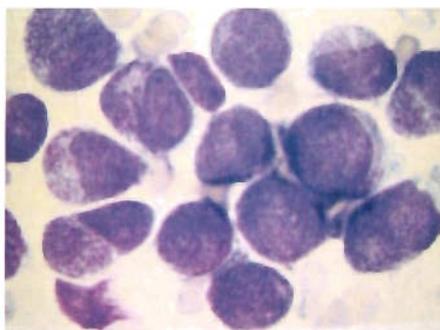


Fig. 7 Leucemia promieloblástica M3 ⁵.

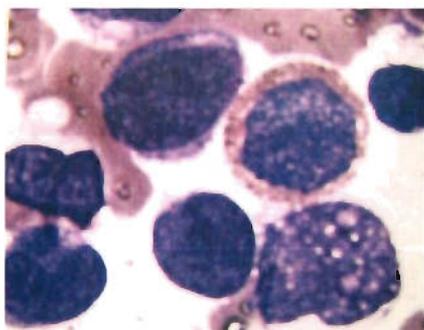


Fig. 8 Leucemia mielomonocítica aguda con eosinofilia M4 ⁵.

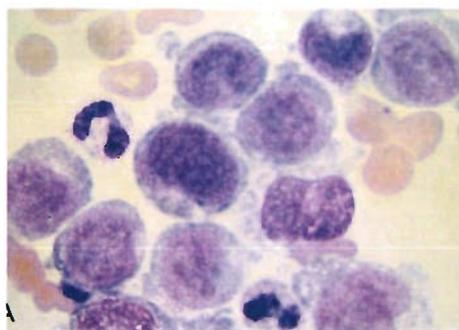


Fig. 9 Leucemia monocítica aguda M5 ¹⁸.

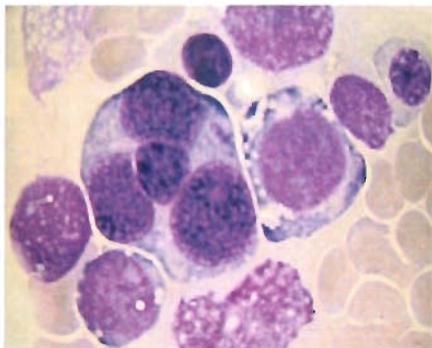


Fig. 10 Eritroleucemia M6. Hay desferitropoiesis con cromatina megaloblástica ¹⁸.

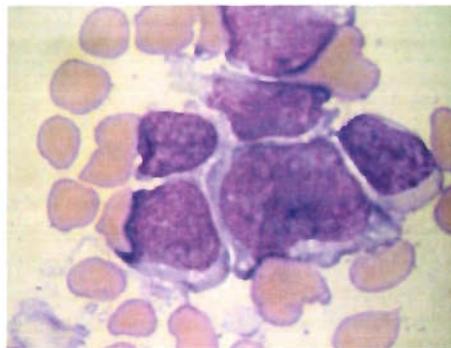


Fig. 11 Leucemia Megacarioblástica aguda M7 ¹⁸.

4.4.3.2 Clasificación Inmunológica

Al identificar las células por medio de sus características antigénicas, los marcadores inmunológicos permiten el estudio de las células hematopoyéticas. Éstos se emplean para definir y subdividir a las leucemias linfoides.

Mediante los métodos inmunológicos es posible reconocer antígenos (Ag) en la membrana o en el citoplasma de las células, algunos de los cuales son específicos para diferentes poblaciones celulares determinadas.

La presencia de inmunoglobulinas citoplasmáticas es también un marcador importante de los linfocitos B. La identificación de antígeno de diferenciación de membrana (Ag que aparece en ciertas etapas de maduración y diferenciación celular) proporciona la información sobre las etapas de maduración de los linfocitos B y T, basada en la constitución antigénica de la célula ⁶.

Propósito	LAL B	LAL T	LAM
Definición de línea	CD79a/ CD19	CD3c/ CD7	MPOc/CD13,CD33
Maduración	CD34/ TdT	CD34/ TdT	CD34/CD15/HLA DR

Tabla 4.5. Clasificación inmunológica simplificada de las leucemias agudas ⁶.

CD= Designación de grupo

MPOc= Mieloperoxidasa citoplásmica identificada por anticuerpo monoclonal

TdT= Transferasa de desoxinucleótidos terminales identificada por anticuerpo monoclonal

4.4.3.3 Clasificación Citoquímica

Este sistema utiliza una combinación de tinciones basadas en la técnica de Romanowsky y reacciones citoquímicas. En el panel actual de estudios citoquímicos de la clasificación de la FAB se incluye mieloperoxidasa, negro de Sudán B, cloroacetato esterasa y esterasa inespecífica (mediante el empleo de α -naftil acetato o butirato como sustrato). Ejemplo:

La mieloperoxidasa (MPX) es una enzima que se encuentra en los gránulos primarios de neutrófilos, eosinófilos y algunos monocitos. Los linfocitos no presentan actividad de MPX. Esta tinción es útil para diferenciar la LAM de la LAL.

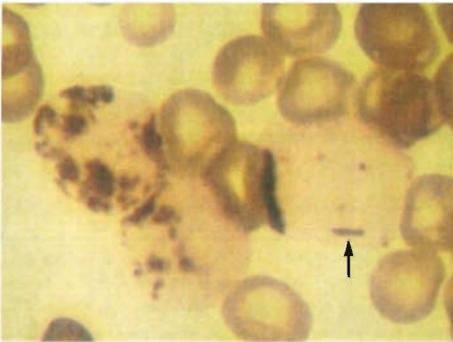


Fig. 12. Tinción de Mieloperoxidasa (+) en células mieloides tempranas (flecha: bastón de Auer).

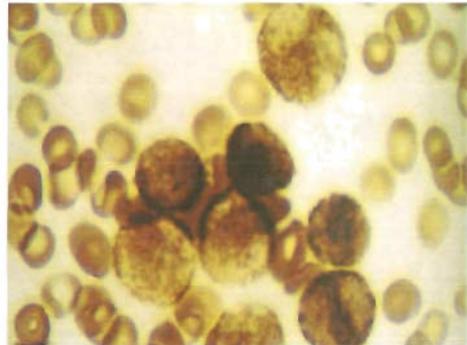


Fig.13. Mieloperoxidasa (+) en Promielocitos leucémicos (LAM- M3).

4.4.3.4 Clasificación Citogenética

En numerosos casos de LAL se encuentran alteraciones cromosómicas de forma uniforme en las células leucémicas. Al emplear técnicas de bandeado y alta definición estandarizadas, casi todas las células leucémicas presentan una anomalía citogenética clonal de un tipo u otro. Estas anomalías pueden ser de número (ploidía) o estructura (traslocaciones, deleciones y acomodamientos).

Alteración cromosómica	Oncogenes implicados	Subtipo LAL	Frecuencia (%)
t(9;22)(q34;q11)	BCR/ ABL	LAL- pre B	5 - 25
11q23	HRX (ALL/1)	LAL- pre B	5 - 70
t(1;19)(q23;p13)	PBX1/E2A	LAL- pre B	25
t(8;14)(q24;q32)	MYC/ Ig's	LAL- B	100
t(11;14)(p13;q11)	RHOM-2/TTG2	LAL- T	10
t(1;14)(q32;q11)	TAL-1/ TCR	LAL- T	20
t(10;14)(q24;q11)	HOX11/ TCR	LAL- T	7
t(8;14)(q24;q11)	MYC/ TCR	LAL- T	10

Tabla 4.6. Alteraciones genéticas en Leucemia Linfoblástica Aguda (LAL).

Alteración cromosómica	Oncogenes implicados	Subtipo LAM	Frecuencia (%)
t(15;17)(q21;q21)	PML/ RARA ⇔	M3	100
t(8;21)(q22;q22)	AML1/ ETO	M2	40
t/del/inv(16)(p13;q22)	C8FB/ MYH1	M4	75
t(6;9)(p23;q24)	DEK/ CAN	M1/ M2/ M4	<5
t/ del(11)/q23)	HRX (ALL1)	M5	<6
t(9;22)(q34;q11)	ABL/ BCR	M1/ M2/ M5	<5

Tabla 4.7. Alteraciones genéticas en Leucemia Mieloide Aguda (LAM).

4.5 Cuadro clínico

4.5.1 Leucemia Aguda

Los pacientes que sufren LA presentan síndromes hemorrágicos, anémico o infiltrativo, aislados o en combinación. La hemorragia puede deberse a trombocitopenia por invasión leucémica de médula ósea o a coagulopatía. La anemia se debe también a invasión tumoral de médula ósea y habitualmente es más grave en la leucemia linfoblástica, aunque la anemia grave es un dato de buen pronóstico en leucemia linfoblástica infantil.

El síndrome infiltrativo supone crecimiento de ganglios, bazo o hígado; las leucemias con componente monoblástico infiltran las encías con mayor frecuencia que las leucemias linfoblásticas.

La expansión de la cavidad medular por la proliferación celular monoclonal puede causar dolores óseos. Las LAL de linfocitos T con frecuencia generan crecimiento del timo, visible en radiografías de tórax ⁶.

4.5.2 Leucemia Crónica

Generalmente el diagnóstico se realiza cuando el paciente se encuentra asintomático y acude a realizarse estudios rutinarios. La LC es determinada por medio de la citometría hemática. La anemia puede no existir y cuando se presenta suele ser moderada; las plaquetas e encuentran aumentadas en la mitad de los casos y es rara la trombocitopenia al momento del diagnóstico.

En la exploración física se encuentra esplenomegalia en el 95% de los enfermos y hepatomegalia en aproximadamente el 50%; es común encontrar adenomegalia moderada. Púrpura o fiebre se presentan en menos del 25% de los pacientes ⁶.

4.6 Diagnóstico

4.6.1 Leucemia Aguda

El diagnóstico de LA se efectúa con el estudio de extendidos de sangre periférica o aspirado de médula ósea empleando tinciones del tipo Wright, Romanovsky o May-Grünwald-Giemsa. Cuando la invasión blástica en sangre periférica es muy grave, no hay dificultad para establecer el diagnóstico de LA, sin embargo, cuando existen dudas debe hacerse el estudio en médula ósea. Cuando la invasión por blastos en sangre periférica es masiva, se infiere que hay más de 20% de blastos en la médula ósea. La presencia de bastones de Auer en las células leucémicas de sangre periférica o de médula ósea, es suficiente para establecer el diagnóstico de LAM.

4.6 .2 Leucemia Crónica

El diagnóstico se basa principalmente en los hallazgos de la citometría hemática. Cuando hay leucocitosis sin causa aparente, proliferación de formas jóvenes de la serie mieloide, aumento de plaquetas, etcétera, asociadas con esplenomegalia, las posibilidades diagnósticas diferenciales son escasas. En ocasiones, infecciones crónicas como tuberculosis (en ancianos), tumores que invaden médula ósea o infecciones agudas pueden simular la enfermedad (síndrome leucemoide).

4.7 Factores Pronósticos

4.7.1 Leucemia Aguda

Las características iniciales del enfermo con LAL permiten predecir con cierta seguridad la respuesta a la terapéutica y las posibilidades de supervivencia prolongada o curación. En primer lugar depende del tipo celular implicado en la misma. La división en grupos riesgo de pacientes con LAL es algo arbitraria pero generalmente se acepta que la edad, el sexo, el estado nutricional y el recuento leucocitario son datos muy importantes (tabla 4.8), seguidos de la estirpe T o B de la leucemia y los cambios cromosómicos en un cariotipo de médula ósea.

Factores	Favorable	Desfavorable
1. Edad	1 - 10 años	< 1 año > 10 años
2. Sexo	Femenino	Masculino
3. Magnitud y distribución de la carga tumoral		
- Leucocitos	< $10 \times 10^9/L$	> $50 \times 10^9/L$
- Viceromegalias "masivas"	Ausente	Presente
- Tumor mediastinal	Ausente	Presente
- Infiltración testicular	Ausente	Presente
- Infiltración renal	Ausente	Presente
- Infiltración SNC	Ausente	Presente
4. Clasificación citomorfológica	FAB L1	FAB L2, L3
5. Clasificación inmunológica	LAL "común"	LAL tipo "T", "B"
6. Clasificación citogenética	Alteraciones numéricas; hiperdiploidia < 50 cromosomas	Alteraciones estructurales t(9;22, 1;19, 4; 11, 8; 14, 11;14)
7. Respuesta al tratamiento de inducción	M0 = M1 (< 5% blastos en el día 14)	M0 = M3 (> 25% blastos en día 14)
8. Estado nutricional al diagnóstico	Normal	Deficiente

Tabla 4.8 Indicadores de valor pronóstico en Leucemia Aguda Linfoblástica infantil ⁸.

La **leucemia tipo T** precisa da un tratamiento diferente y supone un peor pronóstico cuando se presenta con hiperleucocitosis; las **leucemias tipo B** tienen un curso menos agresivo y las leucemias LAL con antígenos mieloides son de mal

pronóstico; la presencia del cromosoma Filadelfia da un pronóstico poco alentador, sobre todo en adultos.

Los pacientes clasificados como de "riesgo habitual" o "normal" (RH) comprenden las edades de entre 18 meses y 10 años de edad, un estado nutricional normal, menos de 30 000/uL leucocitos al diagnóstico, leucemias de estirpe B, ausencia de traslocaciones o marcadores mieloides, presencia de la t (12; 21), carencia de infiltración al Sistema Nervioso Central al momento del diagnóstico y contenido euploide (número normal de cromosomas) o hiperploide (uno o más cromosomas o segmentos cromosómicos añadidos al número normal de cromosomas) de ADN.

Se clasifica a los pacientes como de riesgo "alto" (RA) cuando su edad es menor a un año o mayor de 10 años, leucocitos por arriba de 50 000/uL al momento del diagnóstico, inmunofenotipo T (por expresión de antígenos mieloides), mal estado nutricional y la presencia de la traslocación t (9; 22), ésta última es de mal pronóstico.

4.7.2 Leucemia Crónica

Todas las formas crónicas de leucemia son poco frecuentes en niños, sin embargo la más común en estos pacientes es la Leucemia Mielocítica Crónica (LMC), de la cual ocurren 2 tipos en la niñez: la **variante infantil** o juvenil (en niños menores de 5 años) y la del **tipo adulto** (en niños en edad escolar: 5 a 9 años).

El tiempo promedio de supervivencia después del diagnóstico es de 4 a 5 años. Las causas principales de muerte son infecciones, hemorragia, trombosis e insuficiencia cardíaca.

4.8 Tratamiento

4.8.1 Leucemia Aguda

El tratamiento debe ser conducido por un hematólogo u oncólogo capacitados. Los medicamentos que pueden utilizarse tienen efectos diversos: agentes alquilantes (ciclofosfamida, clorambucil), antimetabolitos (metotrexato, arabinósido), sustancias que fijan al ADN como antraciclinas, etcétera.

La manera de administrar los fármacos y las fases del tratamiento dependen del tipo de LA que el paciente sufra. Muchos hematólogos usan antibióticos (cotrimoxazol, quinolinas), antimicóticos (itraconazol, fluconazol) e inhibidores de la fibrinólisis (ác. ϵ -aminocaproico) de manera profiláctica para

prevenir la generación de granulocitopenia o trombocitopenia iatrogénicas o ambas.

El tratamiento se realiza en varias fases:

- a) *Inducción a la remisión.* En esta fase se pretende destruir a la mayoría de las células leucémicas y recuperar la hematopoyesis normal y el bienestar del paciente. Para ello se utilizan fármacos que no afecten en gran medida la síntesis de ADN:
 - **Vincristina:** 1.5 mg/m²/ semana, endovenosa con máximo 2 mg por 4-5 días.
 - **L-asparaginasa:** 5000 - 10 000 UI/m² intramuscular, con vigilancia por probable presencia de reacción de hipersensibilidad, hiperglicemia eventual y/o pancreatitis.
 - **Prednisona:** 60 mg/m²/día, vía oral por 21 a 28 días.

- b) *Tratamiento post-remisión.* Se pretende destruir a las células residuales sobrevivientes de la etapa anterior, en este caso se utilizan fármacos que afectan la síntesis de ADN que puedan destruir a las células en "reposo" o que se encuentren en la fase G₀ del ciclo celular:
 - **Quimioprofilaxis intratecal (vía infra).**
 - **Arabinósido de citosina (Ara C):** >1 mg/m² en infusión alternada con
 - **Metotrexate:** > 1 mg/m² por infusión de 24 horas, seguido de leucovorina a las 24 horas de haberse terminado la infusión.

- c) *Tratamiento preventivo de Leucemia Meningea o Profilaxis del SNC.* Se administran fármacos en por vía intratecal (metotrexato, arabinósido de citosina y corticoesteroides) para destruir a las células alojadas en este sitio. También se ha recurrido a radioterapia craneal, aunque se reserva para los pacientes de alto riesgo (hiperleucocitosis al momento del diagnóstico).

- d) *Tratamiento de continuación.* Se pretende destruir a las células leucémicas residuales utilizando medicamentos que interfieren con la síntesis de ADN (mercaptopurina y metotrexato), produciendo mielosupresión. También pueden realizarse quimioterapias intermitentes (vincristina, prednisona, antraciclinas):
 - **6-Mercaptopurina:** diaria en administración nocturna.
 - **Metotrexate:** semanal intramuscular y un periodo de pseudo-reinducción con vincristina y prednisona cada 3 meses.
 - **Terapia triple intratecal.**

- e) *Tratamiento de formas específicas de LAL.* A los pacientes con cromosoma Filadelfia (Ph1) puede dárseles tratamiento con mesilato de imatinib

(STI-671), inhibidor de de la cinasa de tirosina especifica de ABL, capaz de inducir remisiones hematológicas, citogénicas y hasta moleculares ⁶.

En las Leucemias Agudas Mieloblásticas (LAM), el tratamiento inicial es de inducción a la remisión, aunque las posibilidades de remisión completa y sostenida son menores (50 - 70% con quimioterapia en comparación de aproximadamente 90% en LAL). Se requiere apoyo transfusional, uso de antibióticos y antimicóticos profilácticos para evitar infecciones por microorganismos oportunistas en los periodos de neutropenia.

En las LAM con componentes monocíticos (M4 y M5), es más frecuente la infiltración a SNC por lo que se sugiere tratamiento profiláctico con quimioterapia intratecal. Los niños con estas variedades de leucemia y recuento de leucocitos altos en el momento del diagnóstico se ven beneficiados con esta terapéutica ^{3,6}.

4.8.2 Leucemia Crónica

La enfermedad al inicio se mantiene estable y responde en forma adecuada y rápida al tratamiento (fase crónica); después de algunos años, la respuesta es errática y el padecimiento se torna más agresivo y resistente (fase acelerada) para que, en un lapso menor a un año, se transforme en enfermedad aguda con la presencia de numerosos blastos que finalmente termina con la vida del paciente (fase o crisis blástica).

Un medicamento utilizado para el tratamiento de Leucemia Mielocítica Crónica (LMC) es el agente alquilante busulfán, el cual se administra por vía oral continua a una dosis inicial de 4 a 10 mg/día con vigilancia semanal; la dosis se ajusta de acuerdo con la respuesta clínica y de laboratorio del paciente. En un lapso variable (2 - 6 semanas) se observa respuesta favorable en la mayoría de los casos, lo que permite reducir o suspender el tratamiento por periodos variables.

Otro medicamento que puede usarse es la hidroxurea ya que la respuesta es más rápida y la toxicidad es menor y predecible. La terapéutica generalmente se basa en el uso de la quimioterapia con medicamentos que impidan la división del ADN ya que el objetivo del tratamiento es controlar y hacer retroceder los efectos negativos del padecimiento.

El busulfán y la hidroxurea normalizan los recuentos de leucocitos y reducen el tamaño del bazo. Esencialmente, la enfermedad no se cura con quimioterapia, por lo tanto, el trasplante de médula ósea es la única oportunidad de curación con una tasa de supervivencia de 50-70 %.

En el caso de la Leucemia Linfocítica Crónica (LLC), lo que se trata es de prolongar la supervivencia del paciente. En este tipo de leucemia, sólo el trasplante de médula ósea la cura. Dado que esta enfermedad se presenta en personas mayores y con desarrollo muy lento de la enfermedad, rara vez se realiza el trasplante. La combinación de cloraminofeno y esteroides (prednisona) son el tratamiento de elección por su efectividad y tolerancia ».

4.9 Quimioterapia

Consiste en la administración de fármacos que tienen por objetivo impedir la reproducción de las células cancerosas. Dichos fármacos (conocidos como citostáticos) se clasifican en varios grupos:

- a) Agentes alquilantes
- b) Antimetabolitos
- c) Antibióticos antitumorales
- d) Derivados de plantas
- e) Quimioterapia específica

Agentes alquilantes

Los alquilantes son compuestos químicos que interfieren en la división celular al inhibir la replicación del DNA estableciendo sólidos puentes de unión entre los átomos N7 de la guanina y N3 de adenina y guanina de ambas hebras del DNA (Fig. 13).

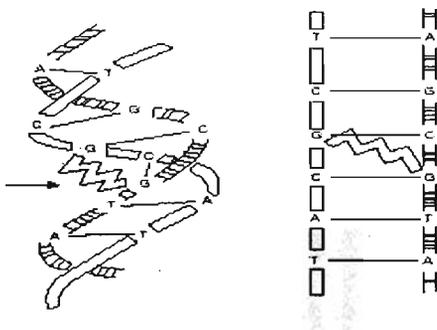


Fig. 13. Principal lugar de acción de los agentes alquilantes.

Antimetabolitos

Los antimetabolitos son sustancias similares a los metabolitos naturales, pero en los que se han introducido uno o dos cambios en su estructura química. La célula los utiliza indistintamente, pero el antimetabolito induce la denominada síntesis letal de bases púricas o pirimídicas.

Antibióticos antitumorales

Son productos de origen microbiano (aunque luego se obtengan por medios sintéticos) que inhiben el crecimiento tumoral. Existen dos grupos: *Antibióticos que interfieren o reaccionan con el DNA.*

Derivados de plantas

Diversos alcaloides derivados de plantas tienen una actividad anticancerosa. Entre ellos destacan las *Epidofilotoxinas* (VM-26 y VP-16). Son derivados semisintéticos. Interaccionan con la Topoisomerasa II, enzima nuclear del DNA, con detención del ciclo mitótico en G2 y posterior muerte celular, tras la máxima acción en la fase S.

Quimioterapia específica

Intenta la reconversión de las células malignas en benignas. Este concepto constituye la base de la aplicación de la *L-asparaginasa*. Algunas células leucémicas se caracterizan por su déficit intracelular de L-asparagina, por lo que dependen a diferencia de las células normales, de la L-asparagina extracelular. Ésta es inactivada por la L-asparaginasa, que produce su desaminación.

Bases experimentales

Las bases de la quimioterapia antineoplásica son las siguientes: los citostáticos destruyen una fracción constante de células, son más activos frente a las células con un índice de proliferación elevado que sobre las que se encuentran en reposo mitótico. Deben utilizarse en periodos breves y discontinuos, a dosis altas para actuar sobre la población celular maligna, cuya actividad proliferativa es mayor que la de las células normales "".

4.10 Transplante de Médula Ósea

Los pacientes que no logran la remisión completa con quimioterapia de inducción, tienen un pronóstico malo ⁹.

El transplante de médula ósea es actualmente el tratamiento de primera elección. El procedimiento para que el transplante sea exitoso implica la preparación del receptor para erradicar las células malignas y suprimir la inmunidad del huésped. Esto se logra con el empleo de dosis elevadas de ciclofosfamida y la irradiación total ¹⁰.

El proceso de preparación es 7 a 10 días. La médula ósea se obtiene, con el donante bajo anestesia general, mediante la aspiración de varios sitios a lo largo de las espinas ilíacas posteriores. La cantidad de médula del donante requerida depende del tamaño del receptor. Después del procesamiento, la médula se infunde en el receptor por vía intravenosa ¹¹.

Los trasplantes de médula para enfermedades malignas provienen de 3 tipos de donantes:

- a) **Transplante singénico.** Proviene de un donante gemelo idéntico, es el más apropiado porque la compatibilidad celular es total, pero por razones obvias son poco frecuentes.
- b) **Transplante alogénico.** Donante genéticamente diferente del receptor. Se intenta compatibilizar lo más posible los antígenos leucocitarios humanos (HLA). Dentro de cualquier familia puede haber solo 4 haplotipos de HLA (2 de la madre y 2 del padre), y cada paciente tiene la posibilidad de 1/4 de tener un hermano con HLA idéntico.
- c) **Transplante autólogo.** De células troncales de médula o sangre periférica del mismo donante cuando éste se encuentra en remisión. Se recolecta del paciente y se les vuelve a infundir. La remisión de las células recolectadas, probablemente contaminadas con células malignas, se logra in vitro mediante el uso de anticuerpos monoclonales antileucémicos o fármacos citotóxicos (Fig.14).

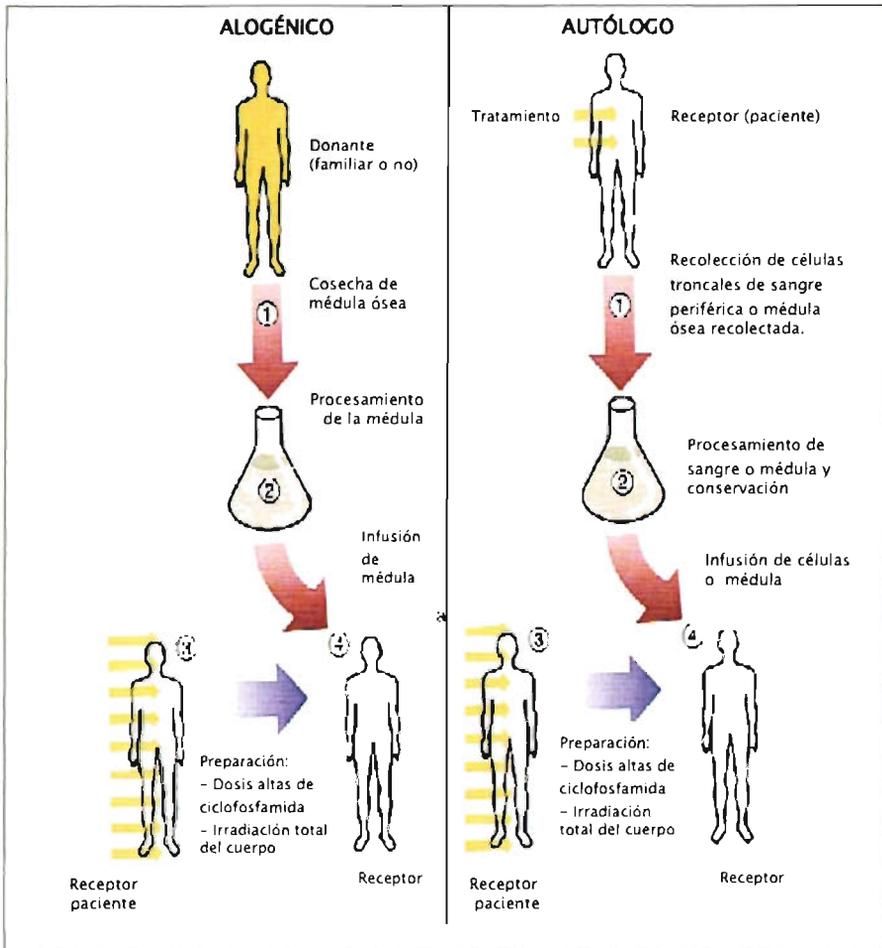


Figura 14. Esquema del trasplante de Células troncales de sangre periférica y de médula ósea ³.

Laboratorio de Análisis Clínicos

5. El Laboratorio de Análisis Clínicos

5.1 Antecedentes

Los laboratorios de análisis clínicos se crearon en el siglo XIX. Uno de los primeros lo estableció Jan Purkyně en su casa, en Breslau en 1824, seguido por el formado en 1826 por Justus von Liebig en Gissen, aunque estos lugares eran más bien académicos que asistenciales.

El primer laboratorio cuyas funciones analíticas y diagnósticas eran las principales se fundó en 1885 por Hugo von Ziemssen en Munich, basado en técnicas químicas bacteriológicas y microscópicas. En los estados Unidos, los primeros laboratorios de análisis clínicos se fundaron en 1893 en Michigan y, en 1895, en Filadelfia. Fue cuando se introdujo el término "patología clínica" para identificar los trabajos de laboratorio relacionados con los pacientes vivos y distinguirlos de la "anatomía patológica".

Con la generalización del uso de exámenes de laboratorio el ejercicio de la medicina volvió a cambiar: se había iniciado como *práctica clínica privada*, cuando el paciente era visto en su casa o en el consultorio del médico; que poco a poco se fueron convirtiendo en hospitales, se transformó en *medicina de hospital*, y con la introducción de la patología clínica se convirtió en *medicina de laboratorio*.

A principios del siglo XX todavía existían hospitales que albergaban, en un pequeño cuarto o hasta en un rincón de las salas de internamiento, una mesa con mechero de Bunsen, una pequeña estufa, algunos tubos de ensaye, cajas de Petri con medios sólidos de cultivo, hisopos y a veces hasta un microscopio, para que el médico residente realizara algunos exámenes sencillos, pero urgentes, casi siempre de noche y cuando el laboratorio principal estaba cerrado.

La realización de la mayor parte de los exámenes de laboratorio se han convertido en una especialidad, que requiere no solo conocimientos y habilidades sofisticados, sino también experiencia y juicio crítico; el médico debe conocer las indicaciones de los distintos exámenes posibles e interpretar correctamente sus resultados, pero no está capacitado para hacerlos personalmente ⁴.

5.2 Importancia del Laboratorio de Análisis Clínicos (Urgencias).

Desde el punto de vista informático, el laboratorio de análisis clínicos tiene tres componentes: la entrada (material que llega al laboratorio para comenzar el trabajo), que son las solicitudes y las muestras; el procesamiento (análisis de las muestras en el laboratorio) y la salida (informes de resultados, consultas). Este representa un enfoque tradicionalista que presenta limitaciones y problemas de comunicación que afectan la eficiencia de las pruebas que se realizan en el laboratorio y, por lo tanto, la atención médica.

Para ser más eficiente en el ofrecimiento de los servicios, el laboratorio clínico debe considerar la adecuación de la prueba solicitada respecto al cuadro clínico del paciente y el momento de recolección de la muestra. Durante el procesamiento, el laboratorio debe tener en cuenta no sólo la exactitud y la precisión de la estimación del analito sino también la importancia clínica y el tiempo empleado en el análisis.

En la salida de los informes, la interacción se concentra en el impacto de los resultados en la atención del paciente, considerando si los datos proporcionados por el laboratorio se interpretaron adecuadamente y se integraron al plan de atención ¹².

El laboratorio de análisis clínicos de urgencias es un departamento clave en hospitales e instituciones de salud, pues los médicos generalmente necesitan de ese servicio para realizar un diagnóstico certero de las enfermedades que aquejan a las personas que acuden con el médico de guardia en días y horarios fuera de lo común, así como para dar seguimiento del estado de salud de los pacientes que se encuentran hospitalizados.

La misión de un Laboratorio de Urgencias consiste en proporcionar al clínico un informe con el resultado de las determinaciones de las magnitudes biológicas, con la máxima rapidez y confiabilidad que conlleve a establecer un diagnóstico certero y/ o modificar una actuación terapéutica en beneficio del paciente.

El laboratorio clínico debe agrupar a profesionales expertos en áreas como la bioquímica clínica, biología molecular, hematología, etcétera, y al personal técnico de apoyo. En este caso el laboratorio clínico puede estar en posición de ofrecer al médico los servicios y la consulta adecuados para la mejor atención del paciente. El laboratorio debe colaborar con el médico tratante, especialmente en los casos en que se pueden presentar problemas de diagnóstico y no sólo propiciar que la información técnica proporcionada se limite a resultados numéricos como respuesta a la requisición de estudios del médico.

Citometría Hemática

6. Citometría Hemática

6.1 Historia del estudio de la sangre

Por siglos, la sangre ha sido considerada la esencia de la vida. Uno de los escritos hipocráticos que data del siglo IV a. C. describe al cuerpo como compuesto por cuatro humores: bilis negra, sangre, moco o flema y bilis amarilla.

Fahraeus, médico sueco del siglo XII, sugirió que la teoría de los cuatro humores podía tener su origen en la observación de la sangre coagulada. En el proceso de coagulación, la sangre se separa en un coágulo gelatinoso rojo oscuro, casi negro, en una capa de leucocitos y plaquetas y una capa de suero amarillento. Se pensaba que la salud y la enfermedad eran el resultado de una alteración en el equilibrio de estos humores.

La composición celular de la sangre no se reconoció hasta la invención del microscopio. Leeuwenhoek (1632 - 1723) describió y midió los corpúsculos rojos. El descubrimiento de los leucocitos y plaquetas fue hasta que mejoraron los lentes del microscopio.

Karl Vierordt publicó en 1852 los primeros resultados cuantitativos del análisis de las células sanguíneas. Sus procedimientos para la cuantificación eran prolongados y tediosos; la sangre era colocada en un portaobjetos con un líquido diluyente. Se contaban todas las células de la mezcla con ayuda de un micrómetro en el ocular del microscopio. Posteriormente, se intentó correlacionar las cuentas celulares con diversos estados patológicos.

Con el adelanto de los conocimientos en fisiología sanguínea, en 1930, se estudiaron las anemias y otros trastornos sanguíneos bajo una base más firme. En algunos casos, la patología de la enfermedad pudo comprenderse hasta que el paciente respondía al tratamiento experimental, por ejemplo, se observó mejoría en pacientes con anemia macrocítica al incluir en su alimentación hígado (rico en vitamina B₁₂) y que, a su vez, la carencia de la vitamina B₁₂ producía éste tipo de anemia ⁵.

Actualmente se sabe que las alteraciones en los componentes de la sangre son el resultado de la enfermedad y no su principal causa. La sangre ha evolucionado de los aspectos mágicos a los biológicos.

6.2 Citometría Hemática relacionada con el Diagnóstico de Leucemia.

El estudio de la Hematología se ha visto revolucionado por la gran cantidad de instrumentos automatizados para el proceso de diagnóstico clínico, aunque el estudio morfológico del extendido de sangre periférica (o frotis), mediante microscopio óptico, aún se mantiene como característica distintiva en la evaluación clínica de pacientes con anomalías hemáticas.

El término citometría hemática proviene de "*cit*" célula, "*metros*" medida y "*haema*" sangre. El empleo racional de la información generada por los contadores de partículas a través de la citometría de flujo, permite la orientación adecuada sobre el origen de las alteraciones de las células sanguíneas, sin embargo, estas mediciones pierden su valor si no se confirman con la observación al microscopio de los frotis ⁴.

Debido a que ciertas enfermedades afectan primariamente a la sangre y, sobre todo, a sus elementos formes (leucocitos, eritrocitos y plaquetas), la evaluación cualitativa y cuantitativa de los rasgos morfológicos en el examen microscópico de un frotis es de gran utilidad ya que aporta información determinante sobre problemas hematológicos y contribuyendo así a establecer el diagnóstico ³.

Por medio de la asociación de la información de las alteraciones morfológicas observadas con los aspectos clínicos, patogénicos y bioquímicos se obtiene el criterio para analizar el cuadro presentado por el paciente y así establecer un diagnóstico.

Un frotis bien hecho y examinado con cuidado puede proporcionar información valiosa respecto a la salud del paciente. De hecho, pueden obtenerse más datos de esta prueba que de varios otros análisis hematológicos que se realizan de forma rutinaria.

En la observación al microscopio, es importante establecer la diferencia entre las células reactivas y blastos (células inmaduras), ya que la presencia de éstos últimos en sangre periférica es muy sugestiva de la presencia de leucemia, por lo que se debe realizar inmediatamente una investigación hematológica más detallada para descartar o confirmar el diagnóstico.

Actualmente la morfología clásica de las células sanguíneas sigue siendo una parte básica de la Hematología, por lo tanto, en este campo como en otras disciplinas, se requiere gran exactitud técnica y criterio experimentado para poder interpretar las alteraciones que se presentan, ya que no sólo aborda el

diagnóstico hematológico, sino que también permite reconocer diversos trastornos infecciosos, hereditarios o metabólicos.

6.3 Relevancia de la Citometría Hemática

La citometría hemática constituye la prueba de laboratorio que permite, en la mayoría de los casos, sospechar de la presencia leucemia aguda o crónica así como de anemia y/o anomalías en la serie plaquetaria. En el análisis de esta prueba es importante observar y conocer el estado de las 3 líneas celulares importantes para el posible diagnóstico de leucemia principalmente. Es importante destacar que una cuenta leucocitaria dentro de los límites normales no descarta la posibilidad de leucemia, así como una marcada elevación de estas células no necesariamente es un indicio de esta enfermedad. Por otra parte, el hallazgo de blastos en la citometría hemática debe sugerir la presencia de leucemia hasta que otros estudios a realizar descarten dicha enfermedad.

Debido a que las leucemias conforman un grupo de enfermedades en las que la manifestación común es una proliferación no regulada y maligna de una clona de células hematopoyéticas y a que es la entidad neoplásica maligna más frecuente en la edad pediátrica, es muy importante establecer un diagnóstico temprano para que el médico pueda ofrecer al paciente un tratamiento igualmente rápido y eficaz para que, a su vez, el paciente tenga la oportunidad de tener mejores expectativas para su recuperación.

Por otra parte, al determinar la incidencia y la prevalencia de los padecimientos hematológicos se pueden programar acciones que conduzcan a mejorar las bases diagnósticas, las medidas terapéuticas y las acciones preventivas pertinentes.

6.3.1 Información de la Prueba

La Citometría Hemática (CH) es una prueba de detección básica. Consta de una serie de pruebas que determinan el número, variedad, porcentaje, concentración y calidad de las células sanguíneas. La interpretación correcta de la CH supone un análisis detallado de cada uno de los datos que informa. La medición de todos los parámetros e índices eritrocíticos se realiza empleando contadores de partículas (analizadores hematológicos).

Para los procesos de rutina de las muestras tanto internas como externas (de rutina), así como las de urgencia se realizan en los sistemas hematológicos LH-750 y STKS respectivamente.



Fig. 15. Equipo STKS utilizado en el Laboratorio de Urgencias.

La medición de cada uno de los parámetros que conforman la Citometría Hemática (CH) se realiza en un analizador hematológico Coulter el cual es un contador automatizado para el uso diagnóstico *in vitro* en el laboratorio. El principio del Coulter es un método electrónico para contar y medir partículas, aunque la aplicación específica de este principio es contar y medir los leucocitos, eritrocitos y plaquetas.

6.3.1.1 Principio del Analizador Hematológico Coulter STKS

El analizador hematológico Coulter STKS proporciona un análisis completo de eritrocitos, plaquetas y leucocitos con recuento diferencial de 5 componentes (Neutrófilos, Linfocitos, Monocitos, Eosinófilos y Basófilos) mediante el Método Coulter.

El Método Coulter cuenta y mide las células detectando y midiendo los cambios en la resistencia eléctrica a medida que la célula, en un líquido conductivo, pasa a través de una pequeña apertura. Las células de la sangre suspendidas en un líquido conductivo (diluyente Isoton) actúan como aisladores eléctricos. La suspensión de células es extraída a través de la apertura por un vacío suave. Un flujo de corriente eléctrica se establece entre dos electrodos sumergidos en el baño de conteo. Uno se encuentra localizado dentro del armazón de la apertura (llamado electrodo interno). A medida que cada célula pasa a través de la apertura, momentáneamente aumenta la resistencia para el flujo de corriente eléctrica. Esto causa un pulso eléctrico que puede contarse y medirse. El tamaño (amplitud) del pulso eléctrico es proporcional al volumen de la célula (Fig. 17) ¹³.

El Coulter realiza tres diluciones de una muestra de sangre. La primera es dispensada al baño ERIT para el análisis de eritrocitos y plaquetas. La segunda es dispensada al baño LEUC para el recuento de leucocitos y la medición de la hemoglobina. La tercera dilución se utiliza para el análisis diferencial de leucocitos en la celda de flujo. Dos de los 3 recuentos realizados en los recipientes de eritrocitos y leucocitos deben concordar en los límites especificados para los recuentos para que el equipo los acepte. Este procedimiento de conteo múltiple previene los errores de los datos por obstrucciones de la apertura o valores estadísticos extremos y permite que haya reproducibilidad en los resultados ¹⁵.

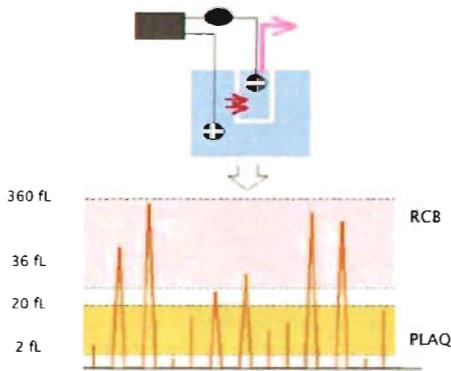


Fig.16. Representación de las variaciones en la diferencia de potencial (DDP) producidas por el paso de células a través del orificio.

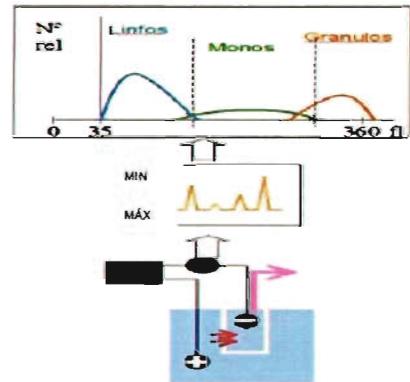
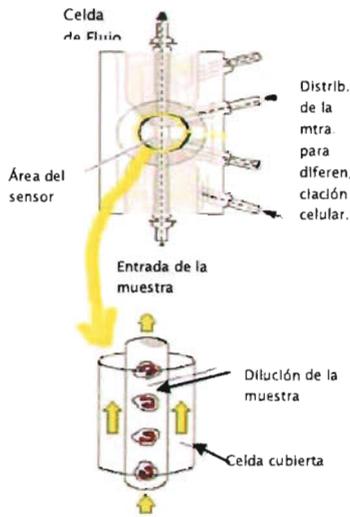


Fig. 17. Cuenta de la serie blanca.

En la figura 17 se observa que desde 35 fL hasta 360 fL hay población de leucocito y en la gráfica de la figura 16, que desde 36 fL a 360 fL puede haber población de eritrocitos. Esto indica que necesariamente se tienen que separar los dos tipos de células y la manera más sencilla de hacerlo es eliminando a las de un tipo. Lo que se hace es medir en dos cámaras distintas. En una de ellas se cuenta todo, es decir leucocitos, plaquetas y eritrocitos, pero el orificio que comunica ambas cámaras es muy estrecho, de manera que casi exclusivamente pasarán glóbulos rojos y plaquetas y, si pasan algunos leucocitos, su número será despreciable frente al de glóbulos rojos.



En la otra cámara lo que se hace es introducir una sustancia por la que los eritrocitos tienen cierta afinidad, con lo que tienden a dejarla pasar a través de su membrana. Esto produce que se "lisen" los glóbulos rojos y liberen hemoglobina. Esta solución pasa por la apertura que separa ambos recipientes y se detectan los pulsos que origina (sólo debidos a la serie blanca) en un fotoemisor y fotorreceptor para medir la cantidad de hemoglobina (Hb) contenida en la sangre.

Para poder distinguir entre neutrófilos (NE), eosinófilos (EO) y basófilos (BA) se utiliza otro procedimiento: **Conductividad**.

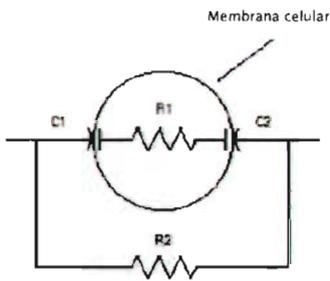


Fig. 19 Simil eléctrico para representar una célula.

Por medio de la conductividad se determina el volumen y composición interna de las células sometiéndolas a alta frecuencia (Fig. 18), de esta forma pueden graficarse comparativamente dos propiedades celulares diferentes para la formación de un *citograma de distribución bidimensional* o un *trazado de distribución*.

En la figura 19, C1 y C2 (capacitores) representan la membrana de la célula, R1 el núcleo de la misma y R2 el diluyente. Por medio de este esquema se puede deducir que la densidad de la célula es función inversa de la conductividad.

La dispersión óptica se utiliza para diferenciar leucocitos, eritrocitos y plaquetas.

A medida que las células atraviesan la zona sensora e interrumpen el haz, la luz se dispersa en todas direcciones. La luz dispersa como resultado de la interacción entre los procesos de absorción, difracción, refracción ¹⁴. La detección y conversión de los rayos dispersados en señales eléctricas se logran mediante fotodetectores en ángulos específicos.

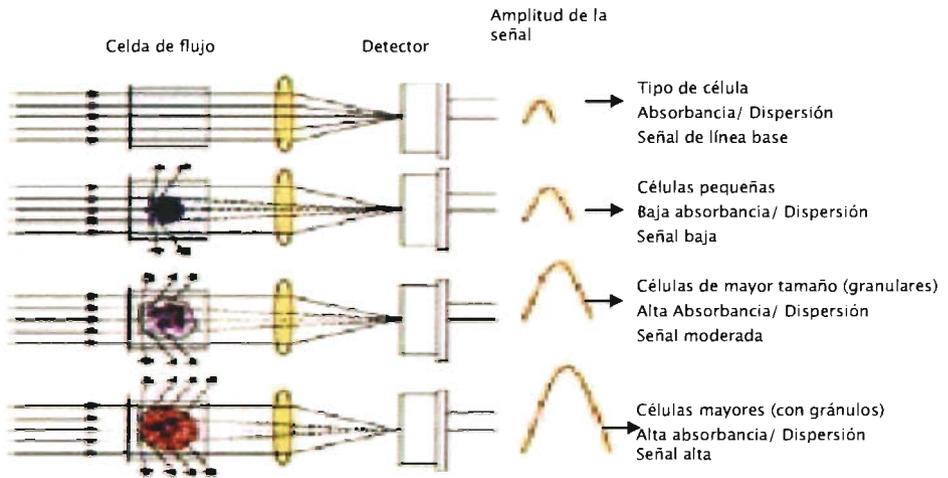


Fig. 20. Dispersión de la luz de un láser en una célula.

Para coleccionar la luz dispersa se utilizan lentes adaptadas con barras bloqueadoras para evitar que la luz no dispersa ingrese en el detector. Una serie de filtros y espejos separa las longitudes de onda variables y las presenta a los fotodetectores.

El equipo STKS genera hemogramas utilizando la tecnología **VCS** para evaluar la determinación diferencial leucocitaria en 5 componentes. La tecnología **VCS** permite la clasificación según el tamaño **V**olumétrico de las células mediante impedancia, las mediciones de **C**onductividad de las células y la dispersión (en inglés, **S**catter) de la luz láser, todas realizadas simultáneamente para cada célula. También cada célula se analiza con luz láser monocromática que da información sobre la superficie celular como su estructura forma y reflectividad.

6.3.1.2 Parámetros determinados por el Equipo Coulter STKS

Mide los siguientes parámetros del hemograma (CBC) y del diferencial leucocitario (DIFF):

Parámetros del hemograma (CBC):

WBC	LEUC	Recuento de Glóbulos Blancos
RBC	ERIT	Recuento de Glóbulos Rojos
HGB	HGB	Concentración de Hemoglobina
MVC	VCM	Volumen Corpuscular Medio
MCH	HCM	Hemoglobina Corpuscular Media
MCMC	CHCM	Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media
RDW	ADE	Ancho de distribución eritrocitaria
PLT	PLAQ	Recuento de Plaquetas
MVP	VPM	Volumen Plaquetario Medio

Parámetro del diferencial leucocitario:

NE%	Porcentaje de neutrófilos
NE#	Número absoluto de neutrófilos
LY%	Porcentaje de linfocitos
LY#	Número absoluto de linfocitos
MO%	Porcentaje de monocitos
MO#	Número absoluto de monocitos
EO%	Porcentaje de eosinófilos
EO#	Número absoluto de eosinófilos
BA%	Porcentaje de basófilos
BA#	Número absoluto de basófilos

6.4 Examen de Extendidos de Sangre Periférica

Un extendido de sangre periférica bien realizado y examinado con cuidado puede proporcionar información muy valiosa respecto a la salud del paciente. También puede calcularse la cantidad de leucocitos y plaquetas, proporciones relativas de los diferentes tipos de leucocitos y evaluar la morfología de las tres líneas celulares en busca de anomalías.

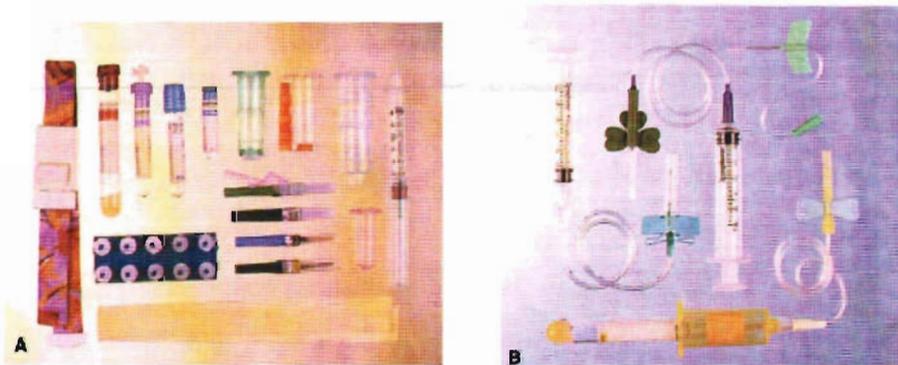
La información que se obtiene al examinar las tinciones de sangre es sumamente importante y sirven de orientación para el tratamiento, así como de

los efectos nocivos de la quimioterapia y de la radioterapia. La fidelidad de la información obtenida depende en gran parte de la calidad de las extensiones. Para un trabajo exacto se necesitan extensiones bien niveladas. Los portaobjetos y cubreobjetos tienen que estar perfectamente limpios y sin grasa. La gota de sangre no debe ser demasiado grande, ya que del tamaño del depende en gran parte el grosor de la extensión.

El espesor adecuado depende de la finalidad de la extensión. Para el estudio de la estructura de las células sanguíneas debe ser tan fina que, en la mayor parte de ella, los eritrocitos estén en una sola capa, próximos entre sí, pero no sobrepuestos. Para el recuento diferencial de los leucocitos es mejor una extensión en la que los eritrocitos estén algo apilados, porque así los leucocitos se distribuyen con más uniformidad, su número es mayor en una superficie dada y se facilita el recuento. Por otra parte, la extensión no debe ser tan gruesa que resulte difícil identificar los leucocitos por separado.

6.4.1 Origen de las Muestras

Las muestras son recolectadas en tubos que contienen ácido etilendiaminotetracético o tripotásico (K_2EDTA o K_3EDTA), que anticoagula la sangre por quelación del calcio, que es esencial para la coagulación. Se prefiere el K_3EDTA líquido porque se mezcla con facilidad con la sangre.



La manera más común de recolectar las muestras de sangre es el sistema de tubo al vacío. Los tubos contienen una cantidad preestablecida del anticoagulante sellado al vacío (Figuras 21-A y 21-B).

Procedimiento para la venopunción:

1. Localizar la vena y seleccionar un sitio adecuado para venopunción.

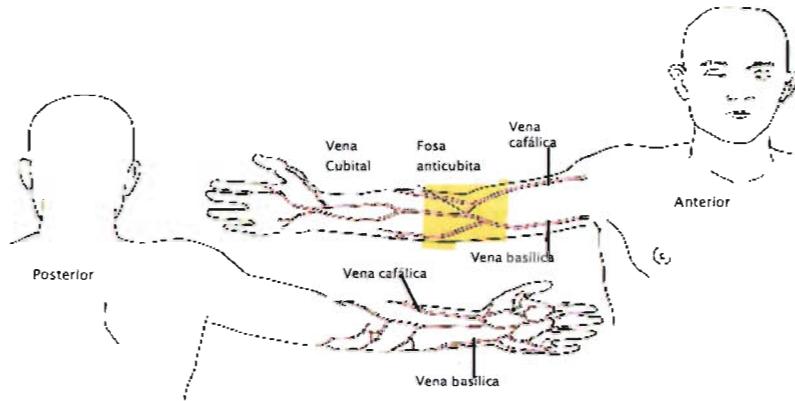


Fig. 22. Venas del antebrazo (dos incidencias).

2. Limpiar el sitio de venopunción con alcohol isopropílico con círculos concéntricos desde el centro a la periferia. DEJAR SECAR AL AIRE.
3. Aplicar un torniquete 5 a 10 cm por encima del sitio de punción seleccionado durante no más de 1 minuto.
4. Revisar la aguja y el equipo.
5. Realizar la punción con la fijación de la vena con el dedo pulgar 2.5 a 5 cm por debajo del sitio e insertar la aguja, con el bisel hacia arriba, con un ángulo de 15° entre la aguja y la piel.
6. Recolectar los tubos respetando el orden correcto de extracción, con la inversión de cada tubo de inmediato después de la recolección.
7. Liberar y eliminar el torniquete en cuanto se restablezca el flujo de sangre.
8. Colocar una gasa o algodón sobre el sitio de punción, con suavidad y sin presionar.
9. Desechar el equipo de punción y rotular los tubos con los datos del paciente.
10. Enviar las muestras rotuladas de manera adecuada al laboratorio.

Tipos de Extendido

Técnica manual con 2 portaobjetos:

Se requieren 2 portaobjetos de vidrio (de 75 x 25 mm) limpios, con borde biselado y esquinas romas de preferencia. También es posible hacer extendidos de buena calidad con un cubreobjetos de hemocitómetro.

1. Se coloca una gota de sangre (de 2-3 mm de diámetro) en un extremo del portaobjetos.
2. El portaobjetos extensor (o cubreobjetos) se sostiene con firmeza a un ángulo de 30 a 45° y se lleva hacia atrás hasta tocar la gota de sangre, dejando que se esparza a lo largo del portaobjetos.
3. Empujar con rapidez y suavidad hacia adelante hasta el final del portaobjetos (Figuras 24 y 25).

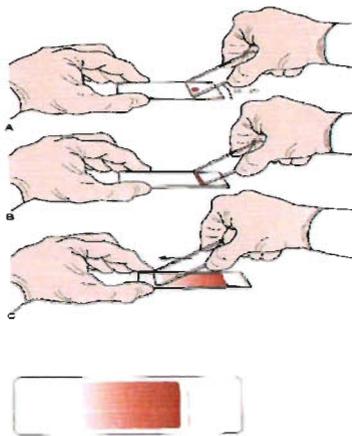


Fig. 24. Técnica para hacer extendidos de sangre periférica.

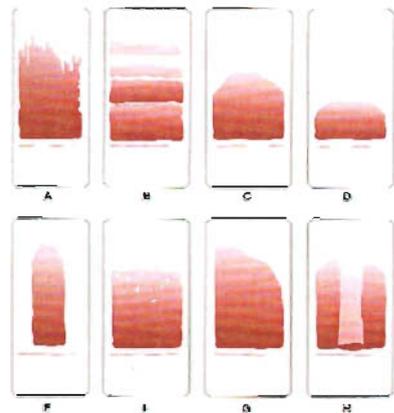


Fig. 25. Frotis de sangre periférica inaceptables.

Secado de los Extendidos

Los frotis de sangre deben secarse lo más rápido posible para evitar los artefactos que produce el secado lento. En algunos laboratorios se usa un ventilador pequeño para acelerar el secado.

Tinción de los frotis

Para teñir los extendidos de sangre periférica y médula ósea se usa la tinción de Wright o de Wright-Giemsa (coloración de Romanowsky). Estas coloraciones se consideran policromáticas, porque contienen eosina y azul de metileno.

El metanol presente en las tinciones fija las células al portaobjetos. La tinción de las células o de los componentes celulares no tiene lugar hasta que se agrega el buffer. El azul de metileno oxidado y la eosina forman un complejo tiazina-eosinato, que tiñe los componentes neutros. El buffer que se utiliza contiene fosfato de sodio 0,05 M (pH 6.4). Las reacciones de tinción dependen del pH.

El azul de metileno libre es básico y tiñe los componentes celulares ácidos (o basófilos), como el RNA. La eosina libre es ácida y tiñe los componentes básicos (o eosinófilos), como la hemoglobina o los gránulos eosinófilos. Los neutrófilos se llaman así porque tienen gránulos citoplasmáticos con pH neutro y toma algunas características de tinción de ambas coloraciones.

6.4.3 Examen Microscópico

El microscopio debe calibrarse en forma correcta para la evaluación del extendido:

- a) Examen con aumento 10X (de bajo aumento):

Con este tipo de aumento puede evaluarse la calidad global del extendido, el color y la distribución de las células. Pueden resisarse con rapidez el borde delgado y los bordes laterales para verificar la distribución de los leucocitos. Una cantidad desproporcionada de células grandes, como los monocitos, vista en cualquiera de los bordes puede indicar un frotis mal hecho y debe repetirse.

b) Examen con aumento 40X (seco fuerte):

Con éste aumento se puede seleccionar fácilmente la zona correcta del extendido en al que se debe empezar el recuento diferencial y evaluar la morfología celular.

c) Examen con el objetivo de inmersión en aceite 100X:

El diferencial leucocitario generalmente se realiza con este objetivo, se cuentan y clasifican 100 leucocitos y se informan como porcentaje de cada tipo de leucocito. La evaluación de la morfología de los eritrocitos, leucocitos y plaquetas, así como la estimación del número de plaquetas se realizan con este objetivo. Las inclusiones de los eritrocitos, como los cuerpos de Howell-Jolly, y las inclusiones de los leucocitos, como los cuerpos de Döhle, pueden verse con facilidad si están presentes. Las células reactivas o anormales también se cuentan con el objetivo de 100X. Si están presentes, los eritrocitos nucleados se cuentan e informan como eritrocitos nucleados/ 100 leucocitos.

En un extendido de buena calidad, los eritrocitos están distribuidos de manera uniforme y separados, con algunos tocándose o superpuestos, y tienen un aspecto bicóncavo normal (palidez central, Fig. 26). Un área demasiado delgada en la que se observan agujeros en el frotis, con eritrocitos planos, grandes y distorsionados (Fig. 27), no es aceptable. Un área demasiado gruesa también distorsiona los eritrocitos al amontonarlos uno encima del otro (Fig. 28).

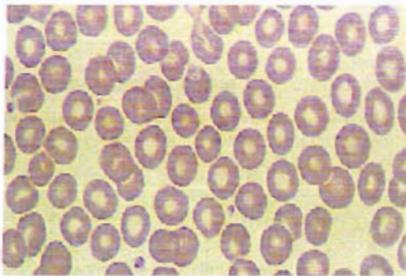


Fig. 26. Microfotografía con área óptima para lectura.

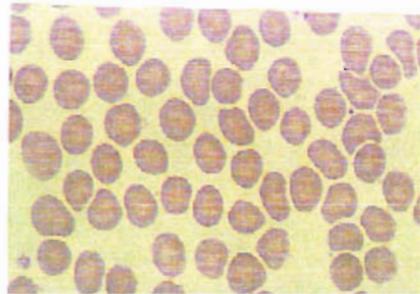


Fig. 27. Microfotografía con área muy delgada para lectura.

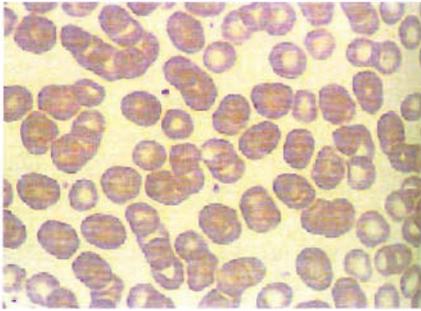


Fig. 28. Microfotografía con área demasiado gruesa para leer.

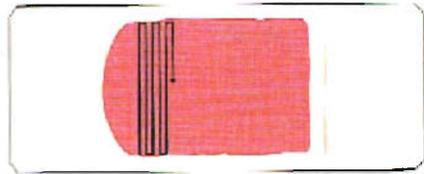


Fig. 29. Patrón recomendado para la lectura de la fórmula leucocitaria.

Morfología Leucocitaria

Los leucocitos o glóbulos blancos se dividen en: linfocitos, monocitos, granulocitos, neutrófilos en banda, neutrófilos segmentados, eosinófilos segmentados, basófilos segmentados (Fig. 31).

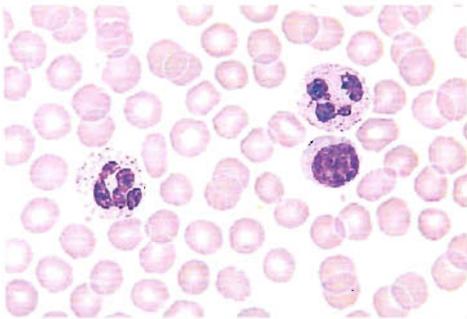


Fig. 30. Frotis de leucocitos encontrados en una muestra de sangre periférica normal.



Fig. 31. Tipos de leucocitos encontrados en frotis de sangre periférica ¹⁸.

Al examinar un frotis, es importante revisar los bordes laterales para incluir las células más grandes como los monocitos, linfocitos reactivos o “atípicos” y las células inmaduras. Si están presentes, también se evalúan e informan las anomalías de los leucocitos como son las granulaciones tóxicas, cuerpos de Döhle, linfocitos reactivos y bastones de Aüer entre otras.

Serie granulocítica:

- a) **Mieloblastos.** Células inmaduras que normalmente se encuentran en la médula ósea y son células con cromatina fina y nucleolos bien delimitados, su citoplasma es basófilo y no posee gránulos.
- b) **Promielocitos.** Son células inmaduras, con gránulos azurófilos en su citoplasma y/ o bastones de Ahüer.
- c) **Mielocitos.** El núcleo está achatado en el polo dirigido hacia el centro de la célula, el citoplasma muestra zonas basófilas y gránulos azurófilos.
- d) **Metamielocitos.** Son células con núcleo reniforme u oval. En su citoplasma se observan gránulos de color gris o café claro.
- e) **Neutrófilos en banda.** Son células que poseen una cromatina condensada y el núcleo adopta una forma alargada (forma de una banda o cayado).
- f) **Neutrófilo segmentado.** Son células en donde aparecen zonas de segmentación en el núcleo en los que se forman normalmente, entre 2 y 5 lóbulos.

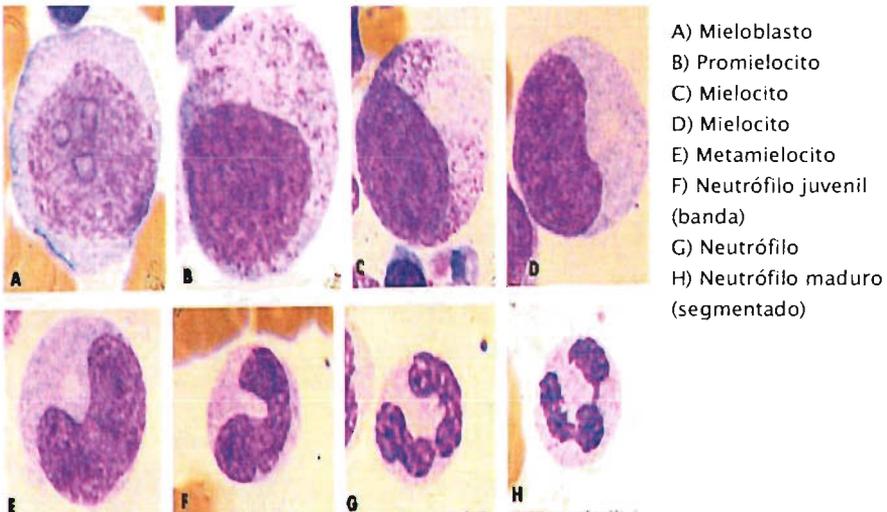


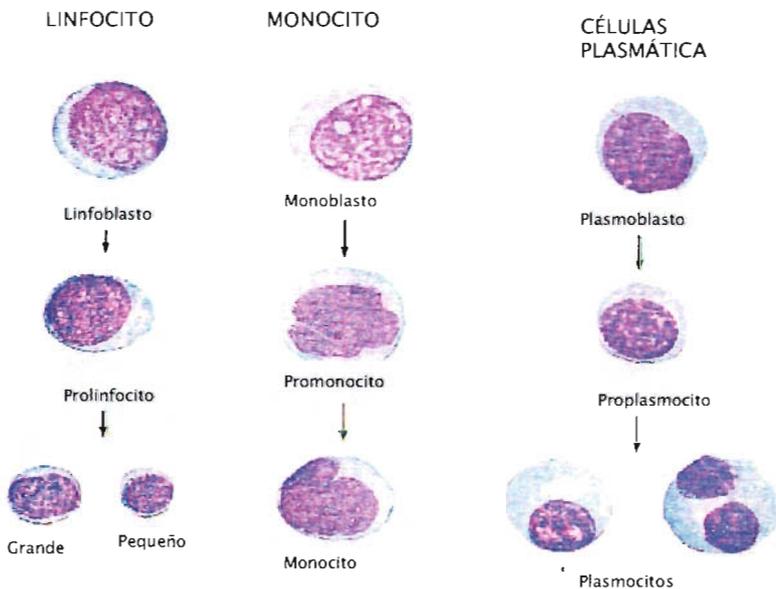
Fig. 32. Maduración de la serie granulocítica ¹⁸.

Serie Linfocítica.

- a) **Linfoblastos.** Son células con cromatina fina, nucleolos poco delimitados, citoplasma basófilo.
- b) **Prolinfocito.** Son células con cromatina más condensada que el linfoblasto, nucleolo ocasional, escaso citoplasma moderadamente basófilo.
- c) **Linfocitos.** Células que poseen cromatina gruesa y núcleo pequeño y escaso citoplasma débilmente basófilo.

Serie Monocítica.

- a) **Monoblastos.** Poseen cromatina fina, nucleolos prominentes, citoplasma basófilo.
- b) **Monocitos.** Células con citoplasma de color gris o azul claro, el núcleo es característicamente reniforme aunque la cromatina es más fina y filamentosa que en los metamielocitos, en el citoplasma se observan gránulos azurófilos.

Fig. 33. Maduración comparativa de Linfocitos, Monocitos y Células Plasmáticas ¹⁸.

Morfología Eritrocitaria

Eritrocitos

Normales: Diámetro de 7 a 8 micras.

Forma: Circular, en ocasiones ligeramente irregular.

Tinción: La periferia aparece de color rosa oscuro y el centro de color rosa pálido o casi incoloro.

Anisocitosis. Término con el que se describe la presencia de eritrocitos de diferente tamaño en una misma muestra. Se observan células que varían de 6 a 9 micras de diámetro.

Microcitosis. Diámetro aproximado de 5 micras. Se observa con frecuencia en anemia por deficiencia de hierro y en las talasemias.

Macrocitosis. Diámetro aproximado de 9 a 10 micras. Se observa en las anemias macrocíticas debidas a deficiencia de ácido fólico o de vitamina B12 y en ciertas enfermedades hepáticas.

Células hipocrómicas. Con diámetro normal o ligeramente menor, sólo se tiñe la periferia de las células debido a que disminuye la concentración de hemoglobina. Se observa en anemias por deficiencia de hierro.

Poiqilocitosis. Término que describe la presencia de eritrocitos de diferente forma en una misma muestra. Hay mezcla de glóbulos rojos circulares, ovals, indentados, etcétera. Se observan en muchos tipos de anemias.

Células falciformes (drepanocitos). Son de forma delgada y angosta, uno o ambos extremos aparecen curvos y agudos. Se observan en la drepanocitosis (anemia de células falciformes) y en la talasemia de células falciformes, junto con eritrocitos nucleados, células en blanco de tiro y, frecuentemente, macrocitos.

Esferocitos. Diámetro de aproximadamente 6 micras, son redondos y todas las células se tiñen uniformemente e incluso, más intensamente. Se observan en la esferocitosis hereditaria en las anemias hemolíticas.

Eliptocitos. Diámetro de aproximadamente 8 micras, de forma oval o en cigarro, se tiñen en forma más oscura en la periferia, especialmente en los extremos. Se observan en las esferocitosis hereditarias.

Esquizocitos. Son fragmente de eritrocitos. Se pueden encontrar en la anemia hemolítica, microangiopática, uremia, anemias hemolíticas debida a agentes físicos y mecánicos y en la coagulación vascular diseminada.

Células en blanco de tiro (en diana o leptocitos). Diámetro de aproximadamente 6 a 8 micras. De forma circular o ligeramente irregular. El centro y la periferia se tiñen de rosa oscuro y entre ellos hay un anillo incoloro. Se observa en ciertas hemoglobinopatías, anemia por deficiencia de hierro y en enfermedad hepática.

Eritrocitos nucleados (normoblastos). Diámetro aproximado de 8 a 10 micras. De forma circular o frecuentemente irregular. El núcleo parece pequeño, de color púrpura oscuro, frecuentemente excéntrico, con cromatina densa. El citoplasma tiene un color rosa o azul-grisáceo.

Eritrocitos con cuerpo de Howell-Jolly. Los glóbulos tienen uno o más, que se tiñen de color púrpura y que presentan remanentes nucleares. Aparecen en las anemias hemolíticas y después de la esplenectomía.

Eritrocitos con punteado basófilo. Se observan gránulos finos que se tiñen de azul púrpura y que representan RNA precipitado o condensado. Se presenta en envenenamiento por plomo, anemia por deterioro en la síntesis de la hemoglobina y anemias megalobásticas.

Generalmente el reporte de las anormalidades eritrocíticas incluye comentarios acerca de la intensidad de la alteración con el uso de escalas numéricas, ejemplo: 1, 2, 3 ó hasta 4 cruces ¹⁶.

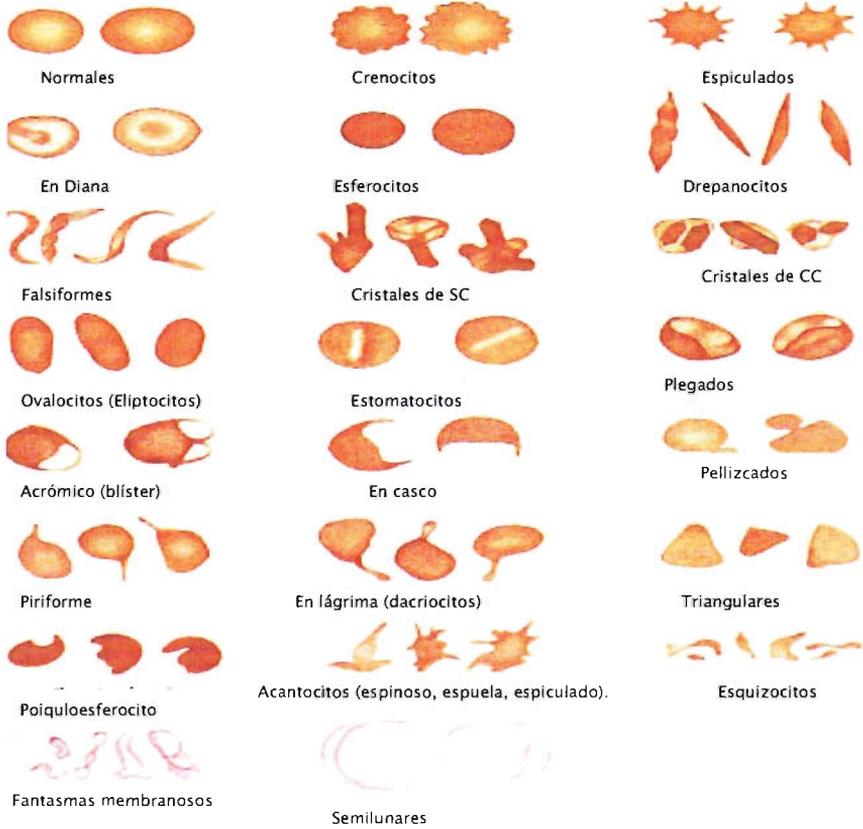


Fig. 34. Diferentes formas que presentan los eritrocitos ¹⁹.

Materiales y Métodos

7. Materiales y Métodos

7.1 Selección de Pacientes

La población estudiada fue seleccionada través del Laboratorio de Química Clínica Urgencias que fue atendida e ingresada por medio del Servicio de Urgencias en el Instituto Nacional de Pediatría en un periodo comprendido entre enero de 2003 a enero del 2004.

Se estudiaron 41 pacientes (22 del sexo femenino y 19 del masculino) seleccionados de una población de 702 pacientes que asistieron a consulta del Servicio de Urgencias.

7.1.1 Criterios de Inclusión

- Pacientes, sin distinción de género ni edad, que fueron atendidos por primera vez por el Servicio de Urgencias del I. N. P., es decir, que no contaban con un número de registro.
- Sin diagnóstico previo de Leucemia.
- Pacientes a los que se les solicitó estudio de Citometría Hemática y fue realizada por el Laboratorio de Urgencias.
- Pacientes a los que se les diagnosticó Leucemia a partir de los resultados de Citometría Hemática y otros estudios (aspiración de médula ósea, inmunofenotipo, cariotipo, etc.) confirmado el diagnóstico.

7.1.2 Criterios de Exclusión

- Pacientes con registro previo en el I. N. P y que se les diagnosticó algún tipo de Leucemia.
- Pacientes que fueron atendidos por el Servicio de Consulta Externa y/o Servicio de Hemato-Oncología.
- Otras Neoplasias Malignas.

7.2 Criterios de Análisis

Debido a que se realizó un estudio retrospectivo (enero de 2004- enero 2005), se incluyó el análisis de la información obtenida de los estudios morfológicos (observación de frotis) derivada de los reportes de Citometría Hemática realizada a los pacientes recibidos en el Servicio Urgencias.

7.3 Materiales

7.3.1 Tipo de Muestra

Las muestras fueron obtenidas a partir de sangre periférica anticoagulada con EDTA_{K₃} (Relación 1mg/ mL de sangre) que fue recolectada en tubos Vacutainer estériles con tapón de seguridad de color lila y se procesaron dentro de la primera hora de toma.

Las muestras recibidas se identificaron perfectamente, conteniendo en la etiqueta nombre completo y número de folio. Las muestras venían acompañadas de una solicitud para realizar el estudio de citometría hemática en la se anotaron los datos del paciente así como fecha de toma de muestra, ubicación del paciente y nombre y clave del médico solicitante.

7.3.2 Volumen de Muestra Requerido

El volumen total requerido es de:

Presentación tubo Vacutainer para 3 mL:	3 mL (- 1.0 + 0.5)
Presentación tubo Vacutainer para 5 mL:	5 mL (- 2.0 mL)
Presentación tubo Microtainer para 0.5 mL:	0.5 mL (+ 0.5 mL)

Con éstos volúmenes se ha observado que no hay variación significativa en los resultados obtenidos ¹⁶.

En el sistema STKS la muestra necesaria para procesarla por el modo primario (automático) es de 250 uL y 150 uL para el modo secundario (manual).

7.3.3 Preparación Previa de la Muestra

Una vez recolectada la muestra, es homogeneizada con el fin de mezclar el anticoagulante con la sangre. La muestra se mezcla por aproximadamente 30 segundos antes de ser procesada o con 6 a 8 inversiones manuales suaves.

7.4 Equipo e Instrumentación

- Impresora de etiquetas Eltron TLP 2742 (impresión de datos del equipo).
- Analizador hematológico (Beckman Coulter) STKS
- Mezclador de muestras
- Contador de células mecánico o electrónico ("piano").
- Tubos con anticoagulante (Vacutainer)
- Portaobjetos
- Colorante de Wright
- Aceite de inmersión
- Microscopio óptico
- Refrigerador (Across Automático)

7.5 Reactivos

- Control celular 5C- ES. Material de control de calidad para hematología utilizado para monitorear el desempeño de los instrumentos Beckman Coulter con tecnología diferencial (CBC, VCS) junto con reactivos Beckman Coulter específicos.

Son tres niveles que se utilizan en los sistemas hematológicos STKS y LH-750 y son los siguientes:

Control normal. Contiene valores normales.

Control anormal I. Contiene valores altos.

Control anormal II. Contiene valores bajos.

El control celular 5C-ES es un preparado de sangre humana esterilizada con el propósito de que puedan realizarse medidas repetidas para evaluar el desempeño diario del sistema. El control es un preparado de hematíes humanos tratados y estabilizados en un medio isotónico y bacteriostático, también contiene un componente estabilizador constituido por partículas de tamaño similar al de las plaquetas y hematíes preparados para simular leucocitos.

- **LYSES III DIFF** (Reactivo lítico). Contiene sales de amonio cuaternario (19-26 g/ L), isopropanol (1-2 g/ L), cianuro de potasio (0.15 - 0.5 g/ L).
- **COULTER CLENZ** (Agente limpiador). Ingredientes activos: solución de enzimas proteolíticas, surfactante, bacteriostático, fungistático libre de azida.
- **ISOTON III** (Diluyente biodegradable). Ingredientes activos: sulfato de sodio anhidro (9.72 g/ L), cloruro de sodio (4.5 g/ L), dimetilo urea (1 g/ L), clorhidrato de procaína (0.11 g/ L).
- **SCATTER PACK**. (Reactivo lítico para eritrocitos). Agente humectante (0.3-1.5 g/ L), ácido fórmico (1.2 mL/ L).
- **STABILYSE** (Reactivo preservativo de leucocitos) Contiene carbonato de sodio (6.0 g/ L), cloruro de sodio (14. 5g/ L), sulfato de sodio (1.3 g/ L).

7.6 Métodos para el Análisis previo de las Muestras

7.6.1 Control de Calidad

☒ **Mantenimiento Diario del Contador Hematológico:**

Antes de utilizar el equipo STKS, se revisa que los reactivos se encuentren en cantidad suficiente, así mismo, se revisa que el recipiente para el desecho de las muestras procesadas esté vacío.

Una vez realizado lo anterior, se enciende el equipo y procede a dar un lavado inicial (START UP) para verificar que se encuentre limpio y en condiciones de uso. Terminado el proceso de START UP, se deben obtener todos los parámetros en los intervalos de limpieza óptimos (PASS), de este procedimiento se obtiene: el estado de los reactivos, la lectura de fondo y el estado del sistema principal. Se debe repetir el START UP en caso de que alguna de estas lecturas se salga de los límites establecidos.

☒ **Control de Calidad Interno:**

Cuando se confirma que el equipo se encuentra en las condiciones para ser utilizado, lo siguiente a es realizar es el control de calidad que consiste en la identificación y procesamiento de cada control que va a usarse en el contador

hematológico STKS (3 niveles: normal, anormal bajo y anormal alto) para su posterior análisis, todos los días y al inicio de cada turno, antes de que se procesen las muestras para citometría hemática; así como en cada nueva calibración, con cada nuevo lote de reactivo y después de realizar procedimientos específicos de mantenimiento o de localización de fallos que pudieran presentarse en el equipo.

Una vez que se procesaron los controles y los resultados de éstos han entrado dentro del intervalo establecido para cada uno, se procede a la preparación de las muestras para su análisis.

☛ **Reproducibilidad:**

Además del procesamiento de los controles proporcionados por el proveedor del STKS, se lleva un control interno para verificar la precisión y reproducibilidad del equipo. Este control consiste en procesar una muestra al azar de un paciente, con suficiente volumen para poder volver a ser procesada, por lo menos en 3 ocasiones (al inicio, a la mitad y al final) durante el turno de trabajo.

☛ **Control de Calidad Externo:**

Cabe hacer la mención que además del proceso de controles internos, el estudio de la citometría hemática participa también en el programa de evaluación externa de la calidad PACAL (Programa de Aseguramiento de la Calidad) y así como en el de la Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica (AMBC) el cual consiste en un envío cada mes por parte de PACAL (muestra de hemolizado para la determinación de hemoglobina y una diapositiva) y en un envío cada 3 meses por parte de la AMBC (frote de sangre periférica, frote de reticulocitos y un hemolizado para la determinación de hemoglobina), para ser analizados por el personal de los laboratorios de Hemato-Oncología y Urgencias y, posteriormente, los resultados obtenidos son enviados y evaluados por ambos programas (PACAL Y AMBC).

☛ **Control de Calidad para el Colorante de Wright**

Las extensiones teñidas de forma adecuada presentan un color rosado a simple vista y el aspecto en el microscopio de las células debe ser uniforme, los hematíes son de color rosa (no amarillo-verdosos ni rojos). El color de la extensión debe ser uniforme, sin espacios de color oscuro o pálido. Los eritrocitos deben estar exentos de artefactos como vacuolas.

Los núcleos de los leucocitos son azul púrpura, con cromatina basófila y acidófila (cromatina y paracromatina) totalmente diferenciadas, y los gránulos del citoplasma son de color lila o violeta. Los eosinófilos contiene gránulos de color naranja y cada uno se debe distinguir perfectamente. Los basófilos tienen gránulos de color púrpura a azul oscuro.

No debe haber presencia de bacterias ni precipitación del colorante. Las tinciones demasiado pálidas u oscuras no son aceptables para el reporte del diferencial y/o morfología de lo hematíes ²¹.

7.6.2 Proceso de la Muestra

Cuando se verificó que el equipo STKS está en condiciones óptimas, se procede a la preparación de las muestras para ser analizadas:

1. Las muestras, que han sido colocadas previamente en el mezclador, son analizadas una por una en el contador hematológico.
2. Se revisa el reporte que emitió el equipo y se anexa a la solicitud con que venía acompañada la muestra.
3. Se realiza la extensión de sangre periférica, por el método de 2 portaobjetos, y se tiñe (Tinción de Wright).

Una extensión adecuada comprende una porción gruesa y una delgada, con una transición gradual entre ambas, su aspecto debe ser liso y nivelado.

4. Se examina minuciosamente la extensión con el objetivo de inmersión en aceite, se clasifica cada leucocito observado y se calcula el porcentaje de cada tipo de célula. Por razones prácticas se cuentan al menos 100 células.

Además del porcentaje de distribución de los leucocitos, el examen de una extensión de sangre proporciona la oportunidad de estudiar y anotar la morfología de los hematíes. En el registro se anota el número de hematíes nucleados que se ven durante el recuento, en virtud de su número por cada 100 leucocitos.

Cabe mencionar que la revisión de los frotis y la cuenta diferencial es realizada por personal capacitado y con experiencia en el área de hematología y,

que por tratarse de un servicio de urgencias que labora las 24 horas los 365 días del año, fueron realizados y revisados por los turnos: matutino, vespertino, nocturnos y especial.

7.6.3 Cálculos y Conversiones

☒ Corrección de la cuenta de leucocitos por presencia de normoblastos.

Se realiza la corrección de la cuenta de leucocitos en todas las muestras que presenten más de 10% de normoblastos en la cuenta diferencial de leucocitos. La fórmula para la corrección es:

$$\text{Cuenta de leucocitos corregida} = \frac{\text{Leucocitos} \times 100}{\text{Normoblastos} + 100}$$

☒ Corrección de la cuenta de leucocitos por hiperleucocitosis.

Aplica para cuentas mayores de 100×10^3 Leuc/uL.

Realizar una dilución 1:2 (200 uL diluyente Isoton/ 200 uL muestra).

El resultado obtenido se multiplica por el factor de dilución (2).

7.6.4 Limitaciones del Método

Los rangos de lectura del equipo STKS son ¹⁵:

Leucocitos	0 - 400×10^3 cél./ uL
Eritrocitos	0 - 8×10^6 cél./uL
Hb	0 - 25 g/ dL
Plaquetas	0 - 3000×10^3 cél./ μ L
NE#, LINF#	0 - $3\ 000 \times 10^3$ cél./ μ L
Ret%	0 - 30%

7.7 Intervalos de Referencia ¹⁶:

Parámetros	1-6 años	7-16 años	6- 16 años(F)	17-65 años (M y F)
Leucocitos	5-15.5 x10 ³ /uL	4.1 - 5.9	4.5 - 13.5	4.3 - 10.3
Neutrófilos	30.3-74.3 %	36.5 - 75.5	36.3 - 75.5	41 - 73
Linfocitos	14.1-55	13.4 - 55	13.4 - 55	19.4 - 44.9
Monocitos	6.3-12	4.4 - 9.1	4.4 - 9.1	0 - 10.9
Eosinófilos	0-5.8	0 - 5.5	0 - 5.5	0 - 6
Basófilos	0-1%	0 - 1	0 - 1	0 - 15
Eritrocitos	4.1-5.9 10 ⁶ / uL	4.1 - 5.9	4.1 - 5.9	4.3 - 5.7
Hb	11.2-14.5 g/ dL	10.9 -15.7	10.1 - 14	13.6 - 17.2
HTO	36-45%	36 - 45	36 - 45	39.5 - 50.3
VCM	80-90 fL	80-90	80 - 90	80.7 - 95.5
CMHC	27.5-33.2 g/ dL	27.5 - 33.2	27.5 - 33.2	27.2 - 33.5
MCHC	32-36 g /dL	32 - 36	32 - 36	32 - 36
RDW	12.5-15 %	12.6 - 15.2	12.6 -15.2	11.8 - 14.3
Plaquetas	170-450 10 ³ / uL	170 - 450	170 - 450	156 - 373
VPM	17.4-10.4 fL	17.4 -10.4	17.4 - 10.4	17.4 - 10.4

7.7.1 Valores Críticos ¹⁶:

Debido a que se trata de un servicio de urgencias, los resultados tienen que reportarse lo más rápido posible (dentro de la primera hora recibida la muestra) al médico tratante ya sea vía telefónica o personalmente cuando sea posible, en los siguientes casos:

- ↗ ≤ 5 g/dL Hb
- ↗ $\leq 1.0 \times 10^3$ Leucocitos/ uL
- ↗ ≤ 500 neutrófilos totales
- ↗ $\leq 10 \times 10^3$ plaquetas/ uL
- ↗ 800×10^3 plaquetas/ uL
- ↗ Presencia de blastos en sangre periférica.

Resultados

8. RESULTADOS

En el periodo de estudio, el laboratorio de urgencias realizó 10 253 citometrías hemáticas, de las que 702 se reportaron con alteraciones cualitativas y cuantitativas de los leucocitos que pudieran sugerir la presencia de leucemia.

Después de la revisión de los resultados de las citometrías hemáticas, se encontraron 41 casos en los que se observó la presencia de blastos, que fueron confirmados y posteriormente diagnosticados y clasificados mediante estudios subsecuentes dentro de los diferentes tipos de leucemia.

De los 41 pacientes estudiados, se encontró que 22 fueron del sexo femenino y 19 del masculino.

Se hizo la clasificación del tipo de leucemia por sexo y edad obteniéndose los siguientes datos:

Leucemia Linfocítica Aguda (Tabla 8.1):

Tipo	Sexo	< 1 año	1-4 años	5-14 años	> 15 años
L1	M	0	5	9	0
	F	1	4	10	1
L2	M	0	0	2	0
	F	0	0	1	0
Totales	M	0	5	11	0
	F	1	4	11	1

Total de pacientes masculinos con LAL: 16

Total de pacientes femeninos con LAL: 17

Leucemia Mieloblástica y Monoblástica Aguda (Tabla 8.2):

Tipo	Sexo	<1 año	1-4 años	5-14 años	> 15 años
M1	M	0	0	0	0
	F	0	0	0	1
M2	M	0	0	1	0
	F	0	0	0	0
M3	M	0	0	1	0
	F	0	0	2	0
M4	M	0	0	0	0
	F	0	0	1	0
Total	M	0	0	2	0
	F	0	0	3	1

Total de pacientes masculinos con LAM: 2

Total de pacientes femeninos con LAM: 4

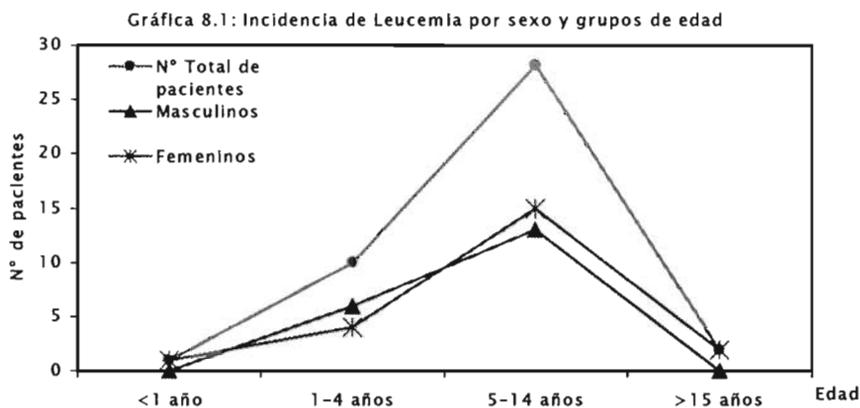
No se encontraron pacientes con LAM: M0, M5, M6 y M7.

Leucemia Granulocítica Crónica (Tabla 8.3):

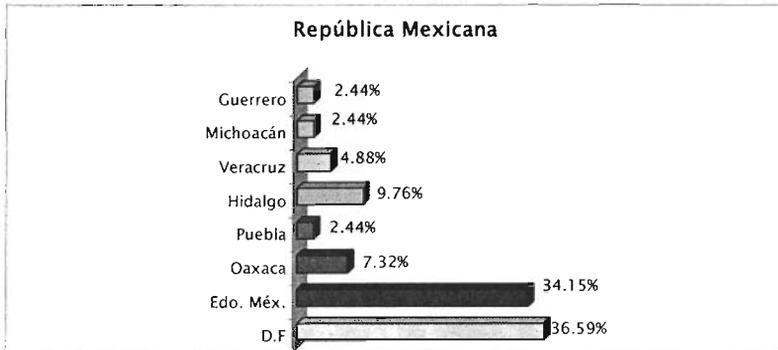
LGC	Sexo	<1 año	1-4 años	5-14 años	> 15 años
LGC	M	0	1	0	0
	F	0	0	1	0
Total	M	0	1	0	0
	F	0	0	1	0

Total de pacientes masculinos con LGC: 1

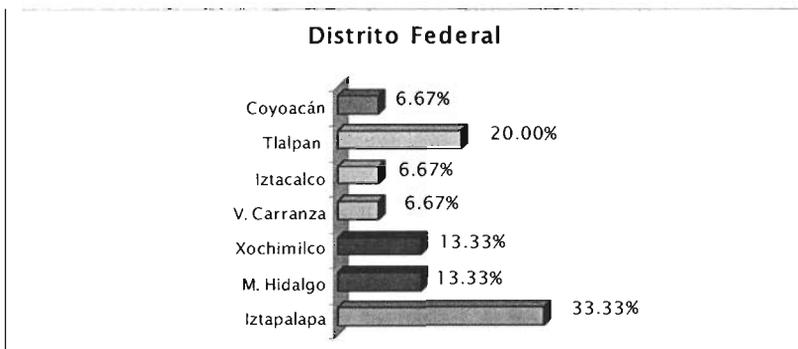
Total de pacientes femeninos con LGC: 1



La procedencia de los casos de leucemia estudiados se encontró distribuida de la siguiente manera (Gráficas 8.2; 8.3; 8.4):



Gráfica 8.2 Distribución en la Republica Mexicana



Gráfica 8.3. Distribución por delegaciones.



Gráfica 8.4. Distribución por municipios.

El número de pacientes a los que se les diagnosticó de leucemia, durante el periodo de estudio, por el Servicio de Hemato-Oncología fue de 68 casos nuevos, incluyendo los pacientes atendidos en Urgencias.

El porcentaje de pacientes a los que se les diagnosticó la enfermedad y que ingresaron por el Servicio Urgencias fue de 60.3% con respecto a los determinados por el servicio de Hemato-Oncología.

Discusión

9. Discusión

Una vez revisados los resultados de las citometrías que pudieran sugerir la presencia de leucemia, se procedió a revisar aquellos que fueran de pacientes de nuevo ingreso (esto pudo ser verificado ya que al paciente que es recibido y atendido por primera vez en el área de urgencias se le asigna un número de folio y, si el paciente lo amerita, posteriormente se le asigna un número de registro para la apertura de un expediente definitivo en el Instituto).

Al comprobar que los pacientes fueron atendidos en el área de Pre-hospitalización del Servicio de Urgencias, se procedió a revisar los expedientes de los pacientes, en los cuales se incluía ya el diagnóstico del tipo de leucemia de que se trataba.

En base a lo consultado en la literatura, hay mayor predisposición del sexo masculino sobre el femenino para el desarrollo de la enfermedad (aproximadamente 3:1), de acuerdo al Registro Histopatológico de Neoplasias en México², no obstante los resultados obtenidos de este estudio, se observó que había prácticamente el mismo número de pacientes del sexo femenino (22) que masculino (19) y, por lo tanto la relación entre ellos es de 1:1, esto puede deberse a que:

1. La cantidad de pacientes estudiados no es una población representativa en comparación con la que se observa en otras instituciones del sector salud debido a que las mismas concentran al grueso de la población infantil.
2. El Instituto Nacional de Pediatría no es un hospital de atención primaria, por lo tanto, la mayoría de los pacientes a los que se les precisó tenían leucemia, acudieron a éste hospital por un diagnóstico diferente o padecimientos similares a una infección (fiebre, adinamia, dolor articular, falta de apetito, etc.) y posteriormente se realizó el hallazgo de blastos en sangre periférica.

El grupo de edad (5–14 años) en el que se observó hay un incremento en la incidencia del padecimiento concordó con lo reportado en la literatura consultada (referencia 1).

De acuerdo al tipo de leucemia presentada, la que predominó en los pacientes estudiados fue la Leucemia Aguda Linfocítica con 33 casos (80.5%), en donde la LAL–1 representa el 90.1%. Esto coincide con lo reportado en la bibliografía de acuerdo a la presencia de esta neoplasia en pacientes en edad pediátrica.

En cuanto a la distribución geográfica, se observó que la mayoría de los pacientes provenían del Estado de México, Hidalgo y del Distrito Federal. En el estado de México se refieren los municipios de Tlalnepantla y Nezahualcóyotl. Esto puede explicarse por la cercanía de los estados con el Distrito Federal y por la ubicación misma del Instituto.

La distribución en las delegaciones del Distrito Federal (Iztapalapa, Tlalpan, Miguel Hidalgo, Xochimilco) puede señalarse porque los pacientes provienen de las zonas con mayor densidad de población o extensión territorial, aunque otras delegaciones con estas características son Venustiano Carranza, Tlahuac, Cuajimalpa pero, como ya se expuso anteriormente, la población estudiada no se considera representativa con respecto a otras instituciones de referencia.

Conclusiones

10. Conclusiones

1. Debido a que porcentaje de pacientes a los que se les diagnosticó leucemia atendidos en Urgencias fue muy alto (60.3%) con respecto al servicio de Hemato-Oncología (39.7%), es de vital importancia que el personal que se encarga de la realización de las citometrías hemáticas tenga la debida capacitación, experiencia y conocimientos para poder distinguir las características de maduración de las 3 líneas celulares y cuando estas se encuentran alteradas.
2. Ya que la mortalidad por neoplasias malignas en la población pediátrica (5-14 años) en la República Mexicana ocupa el segundo lugar (Tabla 10.1) con respecto a la población adulta (Tabla 10.2), es muy importante el diagnóstico temprano y eficaz para que al paciente afectado se le brinden mejores expectativas en el tiempo de sobrevivida o de recuperación total.

Tabla 10.1 Principales causas de mortalidad en edad escolar (de 5 a 14 años) en la Rep. Mexicana

Orden	Causa	Defunciones	Tasa ^{1/}	%
1	Accidentes de tráfico de vehículo de motor	1 011	4.49	14.6
2	Leucemia	596	2.65	8.6
3	Ahogamiento y sumersión accidentales	335	1.49	4.8
4	Agresiones (homicidios)	226	1.00	3.3
5	Nefritis y nefrosis	223	0.99	3.2
6	Infecciones respiratorias agudas bajas	181	0.80	2.6
7	Malformaciones congénitas del corazón	162	0.72	2.3
8	Desnutrición calórico protéica	143	0.64	2.1
9	Lesiones autoinfligidas intencionalmente (suicidios)	143	0.64	2.1
10	Enfermedades infecciosas intestinales	123	0.55	1.8

Tabla 10.2. Principales causas de mortalidad en edad productiva (de 15 a 64 años) en la Rep. Mexicana

Orden	Descripción	Defunciones	Tasa ^{1/}	%
1	Diabetes mellitus	23 365	35.26	13.4
2	Cirrosis y otras enfermedades crónicas del hígado	17 712	26.73	10.1
3	Enfermedades isquémicas del corazón	12 854	19.40	7.4
4	Accidentes de tráfico de vehículo de motor	11 158	16.84	6.4
5	Agresiones (homicidios)	8 720	13.16	5.0
6	Enfermedad cerebrovascular	6 237	9.41	3.6
7	VIH/SIDA	4 359	6.58	2.5
8	Nefritis y nefrosis	3 948	5.96	2.3
9	Lesiones autoinfligidas intencionalmente (suicidios)	3 590	5.42	2.1
10	Uso de alcohol	3 041	4.59	1.7

^{1/} Tasa por 100 000 habitantes.

Fuente: Elaborado a partir de la base de datos de defunciones INEGI/Secretaría de Salud. Dirección General de Información en Salud (Registro Histopatológico de Neoplasias en México) 2000-2003.

La causa por la que la Leucemia ocupa este lugar, puede ser en gran medida, porque la mortalidad por padecimientos neonatales, infecciones y enfermedades gastrointestinales han ido disminuyendo gracias a campañas nacionales de salud pública (control prenatal, programas de hidratación oral en diarreas, inmunizaciones y el diagnóstico y tratamiento oportuno de las infecciones), de manera que estos alcanzan a entrar en la edad de mayor incidencia de neoplasias.

3. Aún cuando existen métodos automatizados que determinan con gran rapidez los parámetros cualitativos y cuantitativos de la citometría hemática, sigue siendo sumamente valiosa la intervención del factor humano ya que este aplica sus conocimientos y experiencia práctica en la resolución de los problemas que pueden presentarse entorno a la obtención de resultados (emitidos por equipo computarizado), en una muestra determinada, es decir, aplica su criterio para discernir cuando el reporte emitido y lo que observa en el frotis de sangre periférica, por ejemplo, no coinciden.

La no coincidencia entre lo reportado por el equipo automatizado y lo observado por el personal (Químico en este caso) puede tener su origen en varios factores inherentes al equipo o calidad de la muestra analizada como:

- a) Observación de leucocitosis en el reporte emitido por el analizador y frotis con células normales o escasas. Lo que podría estar sucediendo es que el equipo confunda leucocitos con eritrocitos nucleados y los clasifique como glóbulos blancos, por lo que tendrá que hacerse la corrección correspondiente para reportar el número real de leucocitos.

También puede ocurrir que halla un aumento en estas células por arrastre de una muestra previa en la que hubo leucocitosis.

- b) Reporte de leucopenia (leucocitos disminuidos) y en el extendido de sangre periférica se observa número normal o aumentado de leucocitos. El equipo puede estar "tapado" por presencia de fibrina o pequeños coágulos en el conducto de aspirado de la muestra.
- c) Muestras que se encuentran hemodiluidas (por ser tomadas de catéter o relación inadecuada de sangre anticoagulante) y en el

reporte de resultados, todas las líneas celulares se encuentran por debajo de los límites de referencia.

Se solicita una nueva muestra para el análisis o sólo puede reportarse el nivel de Hemoglobina.

4. Es indiscutible que para lograr la experiencia requerida para la caracterización de la morfología y maduración y de los leucocitos, eritrocitos y plaquetas, el profesional debe capacitarse en torno al área, así como en el uso de los diferentes equipos automatizados, ya que existen infinidad de formas en las que éstos pueden fallar y, por lo tanto, es esencial que el personal que está en contacto con los equipos tenga la capacidad para poder determinar la fuente del problema y solucionarlo de ser posible.
5. Por último, se debe estar consciente de la responsabilidad que implica el reporte final que se emite al médico tratante, ya que de él deriva en la mayoría de los casos, el manejo que se da al paciente y, evidentemente, redundará en su salud.

Apéndice

APÉNDICE

I: Reactivos y métodos

▣ Parámetros determinados por el Analizador Coulter STKS:

Recuento eritrocitario. El recuento eritrocitario es un parámetro medido directamente. La dilución de ERIT contiene eritrocitos, leucocitos y plaquetas. Los umbrales usados para separar los pulsos de las plaquetas, los cuales son mucho más pequeños, de los pulsos de los eritrocitos y leucocitos. Las partículas que son iguales o mayores a 36 fL son contadas como eritrocitos. Los leucocitos presentes en la dilución son incluidos en el recuento de eritrocitos, no obstante, su interferencia es normalmente insignificante.

Histograma de eritrocitos. Además de ser contados, los eritrocitos son seleccionados de acuerdo con su tamaño por un analizador de altura de pulsos. El analizador de altura de pulsos usa un mínimo de umbrales para sortear las partículas en 256 categorías de tamaño (volumen) o canales y crear un histograma de las partículas. El histograma de datos resultante es depurado por una técnica de promedio móvil y proyectado en la pantalla de la PC. La escala de proyección es de 24 a 360 fL. Aunque el umbral para el recuento de eritrocitos es de 36 fL, el área de proyección adicional entre 24 y 36 fL permite que el extremo inferior del histograma sea controlado.

Volumen corpuscular medio. Es derivado del histograma de eritrocitos. Es el tamaño promedio de todas las células en el histograma de eritrocitos entre 36 y 369 fL. Los parámetros de tamaño, tales como el VCM, son también corregidos por el paso de coincidencias debido a que dos células juntas que pasen a través de la apertura crean un pulso mayor.

ADE Ancho de distribución de los eritrocitos. Es una medida de la variabilidad en el tamaño de los eritrocitos y es derivada del histograma de ERIT. La computadora en el analizador mantiene en consideración ambos extremos de la curva de distribución para eliminar los datos más confusos y calcula el coeficiente de variación del tamaño de las células representado por el resto de la curva, esto lo hace calculando la desviación estándar (DS) y el tamaño de la medida de la población de eritrocitos y entonces usa estos datos en la siguiente fórmula:

$$\text{ADE} = \frac{\text{DS} \times 100}{\text{VCM}}$$

Concentración de hemoglobina. Este parámetro es medido directamente. El reactivo lítico de CBC es añadido a la dilución de LEUC, para romper los eritrocitos y convertir la hemoglobina liberada en un pigmento estable con cianuro que puede ser medido fotométricamente. Se lee con luz monocromática a una longitud de onda de 525 nm. La absorbancia es directamente proporcional a la concentración. La absorbancia de la muestra es comparada con un blanco, el cual es determinado al inicio. Un factor de calibración es aplicado y el resultado de la concentración de hemoglobina es reportado a la PC.

Hematocrito (HTC). Es un parámetro calculado que se refiere al volumen relativo de los eritrocitos expresado como porcentaje. La fórmula es:

$$\text{HTC} = \frac{\text{ERIT} \times \text{VCM}}{10}$$

Hemoglobina corpuscular media (HCM). Es calculada e indica el peso promedio de hemoglobina en el eritrocito. La fórmula general es la siguiente:

$$\text{HCM} = \frac{\text{HGM} \times 10}{\text{ERIT}}$$

Concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM). Es una expresión de la concentración promedio de la hemoglobina en los eritrocitos, relaciona la cantidad promedio (peso) de la hemoglobina en los eritrocitos con el volumen promedio de los eritrocitos. Se calcula usando la fórmula:

$$\text{CHCM} = \frac{\text{HGB} \times 100}{\text{HCT}}$$

Recuento de plaquetas. Aunque las plaquetas son medidas directamente usando el principio Coulter, el recuento de plaquetas es derivado del histograma de las plaquetas. Las partículas de entre 2 y 20 fL en la dilución de ERIT/ PLQ son contadas y medidas mientras pasan a través de la apertura.

Los datos netos resultantes son comprobados contra un grupo de criterios matemáticos ajustados en una curva logarítmica normal de 0 a 70 fL. El recuento de plaquetas normalmente es derivado de esta curva ajustada la cual representa todas las plaquetas en la muestra, inclusive aquellas que son menores de 2 fL o mayores de 20fL. Además de ajustar plaquetas que son más pequeñas o más grandes, el proceso de ajuste de la curva, provee la ventaja extra de excluir interferencias de partículas, microburbujas, fragmentos de eritrocitos o eritrocitos muy pequeños. El resultado final es un recuento de plaquetas más preciso.

Volumen plaquetario medio (VPM). Representa el tamaño medio de las plaquetas. El analizador usa el histograma de las plaquetas como base para derivar el VPM.

Son generados tres histogramas por separado, uno de cada uno de los tres periodos de recuento. Los datos se corrigen por coincidencia y se decide sobre éstos si son rechazados. El resultado promedio para ambos, el recuento plaquetario y el VPM, es multiplicado por su factor de calibración respectivo antes de ser reportado.

Por ciento de células para la cuenta diferencial (DIFF) automatizado. %NE, %LINF, %MONO, %EOS, %BASO. Tres mediciones directas (volumen). Conductividad, dispersión de la luz) son tomadas en casa leucocito a medida que una célula pasa a través de la apertura. Éstos datos son registrados tridimensionalmente, las poblaciones de células son identificadas y los porcentajes son reportados.

Número absoluto del DIFF. #NE, #LINF, #MONO, #EOS, #BASO. El número absoluto de cada una de las cinco poblaciones de leucocitos es contado multiplicando el porcentaje del diferencial para esa población por el recuento de leucocitos que fue determinado en el baño de apertura de LEUC ¹⁶.

❖ TINCIÓN DE WRIGHT

COLORANTE DE WRIGHT (Merck) . Colorante de Wright (24 g), glicerina (120 mL), metanol (4L), azida de sodio (0.4 mg), N₂HPO₄ (72 g), KH₂PO₄ (48 g).

Para mejores resultados, se deben teñir las extensiones en cuanto se hayan secado al aire:

1. Colocar el frote en una gradilla y sumergirla en el recipiente 1 que contenga la cantidad suficiente de colorante (concentrado) para cubrir totalmente la laminilla, dejar teñir durante 1 minuto.
2. Trasladar la gradilla con la preparación a otro recipiente con cantidad suficiente de solución amortiguadora (buffer/ colorante 1:10) para cubrir el frote, dejar 2 minutos.
3. Trasladar la gradilla con la preparación a otro recipiente con agua corriente y lavar suavemente.
4. Dejar secar el portaobjetos en posición inclinada sobre un papel absorbente.

5. Se examina minuciosamente la extensión con el objetivo de inmersión en aceite, se clasifica cada leucocito observado y se calcula el porcentaje de cada tipo de célula. Por razones prácticas se cuentan al menos 100 células.

Además del porcentaje de distribución de los leucocitos, el examen de una extensión de sangre permite observar y anotar la morfología de los hematíes. En el registro se anota el número de hematíes nucleados que se ven durante el recuento, en virtud de su número por cada 100 leucocitos.

☛ **Reactivos Utilizados en el Analizador STKS:**

LYSES III DIFF (Coulter Lytic Reagent). Se utiliza en el modo hemograma CBC estromaliza los eritrocitos para el recuento de los leucocitos y para la medición de la hemoglobina. Para uso del Analizador hematológico Coulter destinado para usarse solo con Isoton III y con el agente limpiador Coulter Clenz. Sales de amonio cuaternario (19-26 g/ L), isopropanol (1-2 g/ L), cianuro de potasio (0.15 - 0.5 g/ L). Listo para su uso. Almacenar entre 2- 30° C. Es estable durante 60 días después de abierto.

COULTER CLENZ (Cleaning agent). Estable por 3 meses. Mezclar el contenido vía ligera inversión. Ingredientes activos: solución de enzimas proteolíticas, surfactante, bacteriostático, fungistático libre de azida. Listo para su uso. Almacenar entre 2- 25° C. Es estable durante 3 meses después de abierto.

ISOTON III (Biodegradable). Se utiliza para la dilución de la sangre total y para la estabilización de las membranas de cada célula durante el recuento y medición de tamaño, también para el recubrimiento de las células blancas en su estado casi "nativo", solución electrolíticamente balanceada, debe usarse sólo como diluyente en el conteo y medición de las células sanguíneas. Ingredientes activos: sulfato de sodio anhidro (9.72 g/ L), cloruro de sodio (4.5 g/ L), dimetilo urea (1 g/ L), clorhidrato de procaína (0.11 g/ L). Listo para usarse. Almacenar entre 2- 25° C.

SCATTER PACK. Para uso en el sistema Coulter, en uso diagnóstico in vitro. Ingredientes activos: Eritrolyses II (pack lyse). Se utiliza para el modo diferencial DIFF. Reactivo lítico que estromaliza a los eritrocitos y reduce las partículas celulares a un nivel insignificante sin dañar a los leucocitos. Agente humectante (0.3- 1.5 g/ L), ácido fórmico (1.2 mL/ L). Listo para su uso. Almacenar entre 2- 25° C. Es estable durante 60 días después de abierto.

STABILYSE (Pack preservativo) 500 mL. Se utiliza en el diferencial (DIFF), es un conservador leucocitario que mantiene a éstos en su estado casi nativo para la

diferenciación. Contiene carbonato de sodio (6.0 g/ L), cloruro de sodio (14. 5g/ L), sulfato de sodio (1.3 g/ L).

☒ **Protocolo Clínico para confirmar o descartar el Diagnóstico de Leucemia**

Una vez que el laboratorio ha reportado la presencia de blastos en frotis de sangre periférica, el siguiente paso es la revisión del extendido por el médico hematólogo para reafirmar o eliminar la sospecha de leucemia.

Generalmente se realiza el aspirado de médula ósea para observar la proporción de células jóvenes y blastos en particularmente.

La diagnosis de las leucemias agudas se hace utilizando criterios clínicos y de laboratorio básicos ²⁰:

- a) Se toma en cuenta el tiempo de evolución del padecimiento (\pm 4 semanas, raro más de 6 meses).
- b) Si hay datos de infiltración (dolores óseos, hepatomegalias), asociación a fiebre (generalmente vespertina de 38° C aproximadamente) que sugiera la presencia de infección, pérdida de peso, palidez o signos atribuibles a anemia, trombocitopenia.
- c) Crecimientos de los ganglios linfáticos.

El diagnóstico de leucemia aguda suele establecerse sin dificultad cuando hay un aumento en el número total leucocitos inmaduros en sangre periférica y médula ósea, acompañado de anemia y trombocitopenia.

Sin embargo el diagnóstico diferencial debe realizarse con otras enfermedades como:

- ☒ **Mononucleosis Infecciosa:** Hay aumento de leucocitos (sobretudo linfocitos atípicos), cuadro de adenomegalia; hepatomegalia y esplenomegalia pero no hay anemia ni trombocitopenia.
- ☒ **Anemia Aplásica:** Se encuentra anemia, leucopenia, trombocitopenia, fiebre y hemorragias anormales. El diagnóstico puede establecerse por la presencia de linfadenopatía, esplenomegalia, aspecto de la médula ósea, estudio de frotis de sangre periférica preparado con concentrados de leucocitos; en ocasiones se necesita de un periodo de observación.

▣ **Púrpura Trombocitopénica (PTI):** Presencia de hemorragia, esplenomegalia ocasional, linfocitos atípicos en sangre periférica, petequias, sangrado de las mucosas (a veces). Habitualmente este padecimiento esta asociado a un proceso infeccioso previo (rubéola, sarampión, etc.). El volumen plaquetario (VMP) se encuentra elevado.

▣ **Reacciones Leucemoides:** Las que son a causa de las infecciones no presentan dificultad para su identificación, porque la proporción de células no maduras en la leucemia es mucho mayor que en las infecciones graves, donde hay un aumento de formas intermedias (linfocitos atípicos) y no maduras (blastos).

Al ser establecida la presencia de leucemia se realizan estudios inmunofenotípicos, para asignar el linaje a la proliferación blástica, citogenéticos, para diagnóstico y pronóstico de las entidades neoplásicas, citoquímicos (enzimáticos o no) y moleculares entre muchos otros para designar el tratamiento que debe seguir el paciente afectado.

II: Definiciones

ABL- BCR. Proteína de fusión, derivada de la presencia del cromosoma Filadelfia que altera los mecanismos de proliferación, sobrevida y autorrenovación de las células progenitoras.

ADN. Portador de información genética en todas las formas de vida celular, así como en muchos virus.

Etiología. 1. Estudio sobre las causas y origen de las cosas. 2. Med. Parte de la medicina que estudia las causas de las enfermedades.

Iatrogénica. Cualquier reacción adversa que ocurre en el paciente, como resultado del tratamiento por un médico o cirujano.

Oncogen. Gen cuya actividad promueve la proliferación incontrolada de células eucariotas.

Protooncogen. Gen que promueve la división celular con la capacidad de activarse e inactivarse en condiciones normales.

III: Abreviaturas

ABL	Abelson
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
AML	Akute Myelocytic Leukemia
AML/ETO	Gen quimérico
BCR/ABL	Breakpoint cluster region/ Abelson (gen quimérico).
CH ó BH	Citometría o Biometría Hemática.
HTLV-I	Virus T-linfotrópico Humano de tipo I.
HTLV-II	Virus T-linfotrópico Humano de tipo II.
LAL	Leucemia linfocítica aguda
LGC	Leucemia granulocítica crónica
MLL	Mixed Lineage Leucemia (Leucemia de linaje mezclado).
MYC	Myelocytomatosis virus (Virus de la mielocitomatosis).
PLM/ RAR- \Rightarrow	Promyelocytic leukemia/ retinoid acid receptor alpha (gen quimérico).
RAS	Oncogén del virus del sarcoma murino.
TEL/AML1	Gen quimérico que depende de la traslocación (12; 21)

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA:

1. Rivera Luna, R. ONCOLOGÍA PEDIÁTRICA: CONCEPTOS BÁSICOS Y CLÍNICOS, Intersistemas Editores, 1ª edición, México 2002.
2. COMPENDIO DEL REGISTRO HISTOPATOLÓGICO DE NEOPLASIAS EN MÉXICO 1993- 2002. México: Secretaria de Salud, Dirección General de epidemiología 2002.
3. Rodak, Bernadette F. HEMATOLOGÍA: FUNDAMENTOS Y APLICACIONES CLÍNICAS, Ed. Panamericana, 2ª edición, México 2005.
4. Ruiz Reyes, G. FUNDAMENTOS DE INTERPRETACIÓN CLÍNICA DE LOS EXÁMENES DE LABORATORIO, Ed. Panamericana, 1ª edición, México 2004.
5. McKenzie, Shirlyn B., HEMATOLOGÍA CLÍNICA, Editorial Manual Moderno, 1ª edición, México 1991.
6. Ruíz Argüelles, Guillermo J., FUNDAMENTOS DE HEMATOLOGÍA, Ed. Panamericana, 3ª edición, México 2003.
7. Brunning, R., PROPOSED WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) CLASSIFICATION OF ACUTE LEUKEMIA AND MYELODYSPLASTIC SYNDROMES. Mod. Pathol. 1999; 12: 101-106.
8. Ruíz Argüelles, Guillermo, ACTUALIZACIÓN EN LEUCEMIAS, Ed. Panamericana, 1ª edición; 1ª reimpresión, México 1998.
9. Copeland E. A. Mcguire E. A. THE BIOLOGY AND TREATMENT OF ACUTE LYMPHOCYTIC LEUKEMIA, Blood 1995; 85 (5).
10. Storb R., BONE MARROW TRANSPLANTATION OF THE TREATMENT OF CHRONIC MYELOGENOUS LEUKEMIA, Am J Med Sci, 1988; 296: 87-94.
11. Trigg M.E., BONE MARROW TRANSPLANTATION FOR TREATMENT OF LEUKEMIA IN CHILDREN. Pediat Clin North Am, 1988; 35: 934 - 943.
- 11a. Rozman J. M, Farré V. A, MEDICINA INTERNA, 13ª edición, Edición en CD-ROM, España 1995.

12. Barr J. T., UTILIZACIÓN DEL LABORATORIO CLÍNICO: EL PEPEL CIENTÍFICO DEL LABORATORIO, Davis BG & Bishop ML editores, Filadelfia 1989.
13. <http://www.coulter.com/coulterelectronics>
14. Jovin, T.M., Morris S.J, Striker G., et al, AUTOMATIC SIZING AND SEPARATION OF PARTICLES BY RATIOS OF LIGHT SCATTERING INTENSITIES. *Histochem Cytochem*, 1976; 24: 269-283.
15. Coulter Corporation, MANUAL DE OPERACIÓN COULTER STKS, PN 423592811, Hialeah Florida, 1992.
16. MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS DEL LABORATORIO DE HEMATO-ONCOLOGÍA, Biometría Hemática PT-LHO-01, Versión 0, I. N. P. 2003.
17. Kennedy K. B., Maehara K.T., Backer A. M., CELL AND THE PLATELET STABILITY IN DISODIUM AND TRIPOTASIUUM EDTA. *American Journal Medicine Technology* 1981; 47: 89-93.
18. McDonald G.A., Paul J., Cruickshank B., ATLAS DE HEMATOLOGÍA, Editorial Panamericana, 5ª edición, México 1998.
19. Diggs L. W., Sturm D., Bell A., LA MORFOLOGÍA DE LAS CÉLULAS DE LA SANGRE HUMANA, Abbott Laboratories, Chicago, 1991.
20. Leavell B. S., Thorup O. A., HEMTOLOGÍA CLÍNICA, Editorial Interamericana, 4ª edición, México, 1984.
21. Davidsohn I., Henry J.B., TODD-SANFORD: DIAGNÓSTICO CLÍNICO POR EL LABORATORIO, Salvat Editores, 6ª edición, Barcelona, 1979.
22. Jaime Pérez, J.C, Gómez A. D, HEMATOLOGÍA: LA SANGRE Y SUS ENFERMEDADES, Mc Graw Hill, 1ª edición, México 2004.
23. Voet D., Voet J.G., BIOQUÍMICA, Ediciones Omega, 1ª edición, Barcelona 1992.
24. Klug W., Cummings M., CONCEPTOS DE GENÉTICA, Ed. Prentice Hall, 5ª edición, Madrid 1997.
25. Paredes R., Romero G. L., et al, XIII CURSO DE CITOMORFOLOGÍA DE LAS CÉLULAS SANGUÍNEAS, Instituto Nacional de Pediatría, México 2005.
26. Wallach J. INTERPRETACIÓN CLÍNICA DE LAS PRUEBAS DE LABORATORIO, Ed. Masson, 4ª edición, Barcelona 2002.