



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**CLASIFICACIÓN INMUNOLÓGICA DE LA LEUCEMIA  
AGUDA LINFOBLÁSTICA MEDIANTE CITOMETRÍA  
DE FLUJO EN PACIENTES PEDIÁTRICOS.  
EXPERIENCIA EN EL INSTITUTO NACIONAL DE  
PEDIATRÍA.**

TESINA

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

ESPECIALISTA EN BIOQUÍMICA CLÍNICA

PRESENTA:

QFB. RICARDO FLORES BADILLO



MÉXICO, D.F.

2012.



**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Dr. Rogelio Paredes Aguilera  
**VOCAL:** M. en C. Isela Montúfar Robles  
**SECRETARIO:** M. en C. María de los Ángeles Granados Silvestre  
**PRIMER SUPLENTE:** MASS. Eva Delia Calderón Garcidueñas  
**SEGUNDO SUPLENTE:** M. en C. María Guadalupe Ortiz López

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Instituto Nacional de Pediatría, Laboratorio de Hemato-Oncología, Insurgentes Sur 3700C. Colonia Insurgentes Cuicuilco, Coyoacán, México, D.F.

**ASESOR DEL TEMA:** EBC. LINA ROMERO GUZMÁN

**SUSTENTANTE:** QFB. RICARDO FLORES BADILLO.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente a la Facultad de Química por contribuir a mi formación académica y personal.

Al Instituto Nacional de Pediatría por abrirme sus puertas y permitirme realizar mi tesina y estancias hospitalarias.

A la EBC. Lina Romero Guzmán, por admitirme en su grupo de trabajo, por sus enseñanzas y comentarios al presente trabajo de investigación.

A la QFB. Fabiola Mújica Guzmán por su invaluable y valiosa asesoría para la elaboración de este trabajo, por compartirme sus conocimientos de Hematología y sobre todo por su tiempo y paciencia.

A los miembros del jurado, Dr. Rogelio Paredes Aguilera, M. en C. Isela Montúfar Robles, M. en C. María de los Ángeles Granados Silvestre, MASS. Eva Delia Calderón Garcidueñas y M. en C. María Guadalupe Ortiz López, por las revisiones y correcciones que realizaron al trabajo final y por el tiempo que dedicaron para revisarlo.

A la EBC. Ana Margarita Zavala Ortiz por todas sus enseñanzas, comprensión, dedicación y apoyo incondicional que en todo momento mostró hacia mis compañeros y a mí.

A todo el personal que labora en el Servicio de Hemato-Oncología del Instituto Nacional de Pediatría, por toda su ayuda y amabilidad.

## **DEDICATORIAS**

A Dios. Por todo lo que me ha dado.

A mis padres Elena y José, por todo lo que representan para mí y ser un ejemplo de vida.

A mi hermano José Manuel, por creer siempre en mí.

A mis sobrinas Guadalupe (+), Angeline y Jazmín, por darle un nuevo sentido a nuestras vidas.

A Liliana Guadalupe, por la maravillosa experiencia que fue, es y será estar siempre a tu lado, por motivarme a iniciar este proyecto. Gracias por todo. Te amo.

A Ociel, por ser un gran amigo y contar con tu amistad de tantos años.

A mis compañeros de la Especialidad en Bioquímica Clínica, Alberto, Ana María, César, David, Graciela, Hugo, Javier, Luis, María José Gutiérrez, María José Jaramillo y María Teresa, gracias por todos los buenos momentos.

## ÍNDICE

<b>I. RESUMEN</b> .....	1
<b>II. ANTECEDENTES</b> .....	2
<b>2.1 Generalidades de las Leucemias</b> .....	2
<b>2.1.1 Clasificación de las Leucemias</b> .....	2
<b>2.1.2 Leucemia Aguda Linfoblástica (LAL)</b> .....	2
<b>2.1.3 Epidemiología en México y el mundo</b> .....	4
<b>2.1.4 Factores de Riesgo</b> .....	5
<b>2.1.5 Diagnóstico de las Leucemias Agudas</b> .....	6
<b>2.2 Ontogenia de las Células B y T</b> .....	6
<b>2.3 CD (grupo de diferenciación)</b> .....	9
<b>2.4 Citometría de Flujo</b> .....	10
<b>2.4.1 Antecedentes Históricos</b> .....	10
<b>2.4.2 Principio</b> .....	10
<b>2.4.3 Anticuerpos Conjugados con Fluorocromos</b> .....	11
<b>2.4.4 Presentación de Datos</b> .....	12
<b>2.4.5 Informe de resultados</b> .....	12
<b>2.5 Inmunofenotipo</b> .....	13
<b>2.5.1 Clasificación de Leucemias por medio de Inmunofenotipo</b> .....	13
<b>2.5.2 Marcadores de estirpe celular B</b> .....	14
<b>2.5.3 Marcadores de estirpe celular T</b> .....	14
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b> .....	16
<b>IV. HIPÓTESIS</b> .....	17
<b>V. OBJETIVOS</b> .....	17
<b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	18
<b>VII. RESULTADOS</b> .....	22
<b>VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b> .....	27

<b>IX. CONCLUSIONES .....</b>	<b>31</b>
<b>X. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>32</b>
<b>XI. ANEXOS .....</b>	<b>33</b>
<b>XII. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>34</b>

## ABREVIATURAS

<b>AcMo</b>	<b>Anticuerpo Monoclonal</b>
<b>ADN</b>	<b>Acido Desoxirribonucleico</b>
<b>CALLa</b>	<b>Antígeno de la Leucemia Linfoblástica Aguda Común</b>
<b>CD</b>	<b>Cluster of Differentiation (Cúmulo de Diferenciación)</b>
<b>FAB</b>	<b>Franco-Americano-Británico</b>
<b>FSC</b>	<b>Forward Scatter (Dispersión Frontal)</b>
<b>HLA-DR</b>	<b>Human Leukocyte Antigen (Complejo Mayor de Histocompatibilidad en Humanos)</b>
<b>IgD</b>	<b>Inmunoglobulina D</b>
<b>IgG</b>	<b>Inmunoglobulina G</b>
<b>IgM</b>	<b>Inmunoglobulina M</b>
<b>LA</b>	<b>Leucemia Aguda</b>
<b>LAL</b>	<b>Leucemia Aguda Linfoblástica</b>
<b>LAM</b>	<b>Leucemia Aguda Mieloblástica</b>
<b>Nm</b>	<b>Nanómetros</b>
<b>PCB</b>	<b>Precursor de Células B</b>
<b>SSC</b>	<b>Side Scatter (Dispersión Lateral)</b>
<b>TdT</b>	<b>Transferasa desoxinucleotidil Terminal</b>

## I. RESUMEN

El cáncer en la población pediátrica es un problema creciente de salud pública, debido al incremento en su incidencia. El cáncer más común en población infantil lo constituyen las leucemias, las cuales representan alrededor del 35% de todos los cánceres infantiles tanto en estadísticas nacionales como internacionales. La leucemia aguda linfoblástica (LAL) representa tres cuartas partes de los casos de leucemia infantil. En el 90% de los niños con cáncer no se puede identificar un factor causal y no existe una forma de prevenirlo. La sospecha diagnóstica se establece con los hallazgos en la historia clínica, la exploración física y la biometría hemática. El diagnóstico definitivo se establece con un estudio de médula ósea. El inmunofenotipo de las células malignas ha tenido considerable impacto en la estratificación de riesgo con el reconocimiento de grupos de bajo y alto riesgo. Esta clasificación permite el desarrollo de regímenes terapéuticos más específicos, logrando tasas de remisión más altas en grupos de alto riesgo, y reduciendo la toxicidad en los grupos de bajo riesgo.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la clasificación inmunológica de la LAL mediante el empleo de citometría de flujo para poner de manifiesto la frecuencia en la asignación de la estirpe y el estado de maduración celular. Para ello se estudiaron mediante un análisis retrospectivo un total de 561 pacientes pediátricos, diagnosticados *de novo* con leucemia aguda (LA), durante el período comprendido entre los años 2003 al 2011 en el Instituto Nacional de Pediatría.

La mayor frecuencia se presentó en la estirpe celular B, específicamente la denominada Precursora de Células B CD 10+ (PCB-CD10+), con un 78.1%, considerada de buen pronóstico, es decir, los pacientes cuentan con altas posibilidades de sobrevivir, previo tratamiento.

El presente trabajo refleja la importancia de la inmunofenotipificación por medio de citometría de flujo en la evaluación, diagnóstico y clasificación de las leucemias agudas en pacientes pediátricos.

**Palabras clave:** Leucemia Aguda Linfoblástica, Inmunofenotipo, Citometría de Flujo.

## **II. ANTECEDENTES**

### **2.1 Generalidades de las Leucemias**

Las leucemias representan las neoplasias hematológicas más frecuentes. Son enfermedades progresivas de los órganos hematopoyéticos, caracterizadas por una alteración de la proliferación y el desarrollo de los leucocitos y sus precursores en la sangre y la medula ósea (López, 2007).

#### **2.1.1 Clasificación de las Leucemias**

Las leucemias se pueden clasificar según el grado de diferenciación celular en agudas o crónicas. Se denominan agudas cuando se encuentran numerosas células inmaduras o blastos y crónicas cuando estas células son diferenciadas y maduras.

Las leucemias afectan tanto a niños como adultos y pueden originarse de células linfoides o mieloides; de acuerdo a lo anterior, se distinguen dos tipos, la leucemia aguda linfoblástica (LAL) y la leucemia aguda mieloblástica (LAM). (Dorland, 2005; Hansen & Lambert, 2006, Molinés, 2001).

En la población infantil, el 97% de las leucemias son agudas y el 3% crónicas. La LAL infantil abarca varios subgrupos que se diferencian por la clínica y su diferente biología. Se pueden clasificar por diferentes métodos, tales como la morfología, citoquímica, inmunofenotipo, citogenética y análisis molecular, siendo todas estas técnicas complementarias.

#### **2.1.2 Leucemia Aguda Linfoblástica (LAL)**

Las leucemias, según las características morfológicas del blasto, tanto del núcleo (tamaño, nucléolo) como del citoplasma (cantidad, basofilia, presencia de gránulos) y empleando la clasificación descrita por el comité Franco-Americano-Británico (FAB) se diferencian en linfoblásticas (80%), mieloblásticas (15%) e indeferenciadas (5%).

La leucemia aguda linfoblástica es una neoplasia maligna que se caracteriza por una proliferación clonal de una célula progenitora de linfocitos B o T, cuyo origen primario es la médula ósea. Esta proliferación descontrolada, resulta en la acumulación de células inmaduras (blastos) que interfieren y suprimen el adecuado desarrollo de las células normales, evitando la hematopoyesis normal e infiltrando órganos a distancia como ganglios linfáticos, bazo, hígado, meninges, sistema nervioso central (cerebro y médula espinal), gónadas y otros órganos (Margolin, 2001).

En las leucemias linfoblásticas se describen 3 subgrupos: L1, la más común en el niño (80%), con una célula pequeña, núcleo regular con nucléolos poco aparentes y escaso citoplasma, L2 son blastos de mayor tamaño, con nucléolos prominentes y abundante citoplasma y L3 son células grandes con gran basofilia citoplasmática y vacuolas, es la menos frecuente (2-3%).

Los linfoblastos tienen reordenamientos de las inmunoglobulinas o de los genes receptores de las células T y expresan antígenos que corresponden al proceso normal de desarrollo de los linfocitos T y B, también pueden tener una expresión aberrante de ellos dando origen a fenotipos diferentes de los progenitores normales.

Empleando anticuerpos monoclonales, que reconocen determinados grupos moleculares de los antígenos intracelulares o de la membrana superficial se puede identificar las diferentes etapas de diferenciación celular y de cuál estirpe es el linfoblasto.

En los niños el 80-85% de las LAL son de precursores de células B, que según su maduración incluye los grupos precursor de células B-CD10-, precursor de células B-CD10-, pre B y B madura. El 15 a 20% de las LAL son de estirpe T: incluyen los subgrupos pro T, pre T, T intermedia y T madura. Esta identificación es fundamental para dar el tratamiento adecuado de cada grupo de pacientes (Palomo, 2005; Turgeon, 2006).

### **2.1.3 Epidemiología en México y el mundo**

La leucemia aguda es el tipo de cáncer más frecuente en niños, constituye el 35% de las neoplasias en edad pediátrica y la leucemia aguda linfoblástica (LAL) comprende el 75 % de ellas (Mejía, 2010).

Cada año aparecen en los países occidentales entre 60 y 100 nuevos casos de leucemia por cada millón de habitantes. La LAL es ligeramente más común entre los niños de raza blanca que en los de raza negra y asiáticos; la mayor proporción de casos reportados se presentan en niños con respecto a niñas.

El pico de incidencia ocurre entre los 2 y 5 años de edad, dicha situación se ha incrementado en las últimas 2 décadas (Chan, 2002).

El riesgo de leucemia es más alto en países industrializados como se observa en Estados Unidos, Italia, Australia, Suiza y Japón, y existe un riesgo más bajo en países de África y Asia (Redaelli 2005).

En Latinoamérica, la leucemia aguda (LA) es la principal causa de muerte relacionada con cáncer en pacientes pediátricos. Presenta un considerable incremento en los casos registrados para ambos sexos, principalmente en Colombia, Ecuador y México; destacando sustancialmente el aumento de pacientes para México (Curado, 2011).

La frecuencia de leucemias agudas, específicamente la LAL, en la ciudad de México, se encuentra entre las más altas del mundo, similar a la población infantil hispana radicada en los Estados Unidos o Costa Rica.

Un bajo nivel socio-económico y agentes infecciosos se han considerado como factores relacionados con una alta incidencia de casos de LAL entre la población infantil hispana (Mejía, 2010; Pérez-Saldivar, 2011).

### 2.1.4 Factores de Riesgo

Las factores que originan leucemias, hasta el momento se desconocen, generalmente la LAL se presenta en niños previamente sanos. Sin embargo, existe una estrecha relación a padecer leucemia, principalmente en relación a factores genéticos, ambientales, biológicos, inmunodeficiencias, entre otros (como se demuestra en la tabla 1) aunque en la mayoría de los casos no es posible detectar este tipo de asociaciones que desencadenan dicho padecimiento (Belson, 2007; Mejía, 2005; Zorlu, 2002).

**Tabla 1. Factores asociados con el origen de leucemias en niños (Belson, 2007; Mejía, 2005).**

Factores	Ejemplos
Genéticos	Síndrome de Down Síndrome de Klinefelter Síndrome de Li-Fraumeni Síndrome de Bloom Anemia de Fanconi
Ambientales	Radiaciones Productos químicos y/o tóxicos Exposición in útero a rayos X Pesticidas Campos de corriente eléctrica de alto voltaje. Campos magnéticos
Otros	Edad de la madre y/o uso de ésta, de cigarros, bebidas alcohólicas, anticonceptivos. Peso alto al nacimiento Dieta

### **2.1.5 Diagnóstico de las Leucemias Agudas**

La clasificación de la FAB requiere un examen del frotis de sangre periférica y del aspirado de la médula ósea, efectuando una cuenta diferencial a 500 células, estableciéndose el diagnóstico de leucemia aguda si cumple con los siguientes criterios: a) presencia de blastos con una cifra  $>/30\%$  del total de células nucleadas en la médula ósea; b) si en la médula ósea existe un predominio de células de serie roja nucleadas ( $>50\%$ ) que el 30% de los blastos; c) células con características morfológicas de leucemia premyelocítica hipergranular (Sabrafen, 2006).

### **2.2 Ontogenia de las Células B y T**

Los linfocitos B y T atraviesan estadios de maduración en los que adquieren y pierden antígenos diferentes.

La célula troncal más temprana del linaje linfoide B se encuentra en la médula ósea y expresa la enzima nuclear linfoide primaria Transferasa desoxinucleotidil Terminal (TdT), el antígeno leucocitario humano HLA-DR, el antígeno de la célula troncal CD34 y CD45 débil. Cuando la célula B madura expresa en forma secuencial los antígenos de superficie B, CD19, CD10 (el antígeno de la leucemia linfoblástica aguda común CALLa), CD20 y de superficie y los antígenos citoplasmáticos CD22 y CD79, además de HLA-DR y TdT nuclear. Las células B que expresan combinaciones de estos antígenos por lo general se denominan "células B inmaduras o precursoras". Después de la aparición de CD20, la expresión de TdT nuclear se debilita y las cadenas pesadas mu de la molécula de inmunoglobulina M (IgM) puede detectarse en el citoplasma de la célula B, que ahora se denomina célula pre-B.

Estas células pre-B se caracterizan por la presencia de la cadena pesada mu citoplasmática en el citoplasma de la célula, pero no tienen inmunoglobulina de superficie. La célula B de transición es similar a la célula pre-B pero expresa una cadena pesada mu tanto en la superficie como en el citoplasma de la célula.

El paso de diferenciación final produce células B maduras que expresan las moléculas de la inmunoglobulina enteras como IgG, IgM, e IgD en su superficie.

Los marcadores de B, como CD19, CD20 y CD22, persisten, pero ya no se observan la cadena pesada mu citoplasmática, TdT nuclear, el CALLa (CD10) y el CD34. Luego las células B maduras abandonan la médula ósea y se diseminan por la sangre periférica a los ganglios linfáticos y otros tejidos linfoides, donde pueden interactuar con los antígenos extraños y convertirse en plasmocitos productores de inmunoglobulina. Si bien los plasmocitos segregan en forma activa y sintetizan las moléculas de inmunoglobulina, no expresan inmunoglobulinas de superficie, CD10 o los antígenos CD19, CD20 ó CD2 (Mayani, 2007; Pui 2006; Rodak; 2005).

El desarrollo y maduración de las células T se produce en el timo. El precursor linfóide T programado más temprano expresa CD45 débil, HLA-DR, CD34 y TdT nuclear. En el estadio I de diferenciación (protimocitos), las células T inmaduras expresan CD7, CD2, TdT nuclear y CD3 citoplasmática. A medida que la célula madura a un estadio II a III de timocito común, adquiere marcadores T adicionales, como CD3, CD5, CD4, y CD8, CD1 y CD38. El estadio IV de células linfoides T maduras liberadas por último desde el timo para sembrar la médula ósea se subdividen en los subtipos de células helper CD4+ o supresoras CD8+; los antígenos inmaduros como TdT nuclear, CD34, y CD1 están ausentes y las células T expresan diversos antígenos CD7, CD2, CD3 y CD5 (Mayani, 2007; Paredes-Aguilera 2001; Pui 2006; Rodak; 2005).

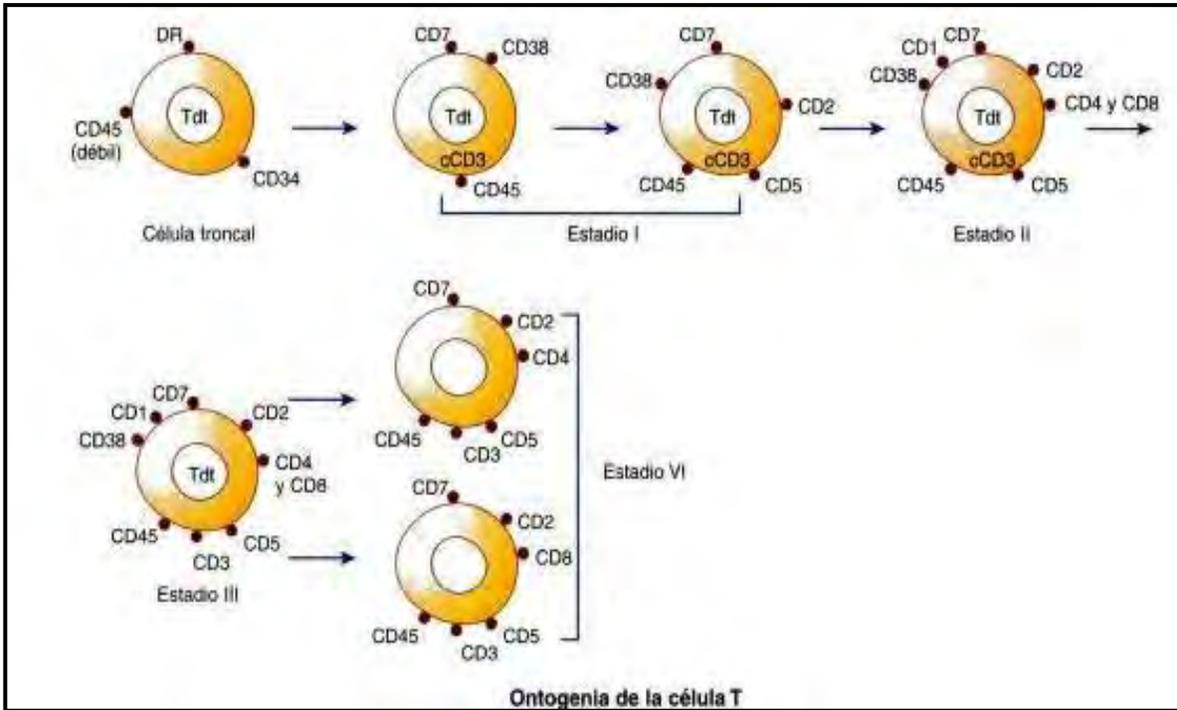


Figura 1. Ontogenia de la célula T (Rodak, 2005).

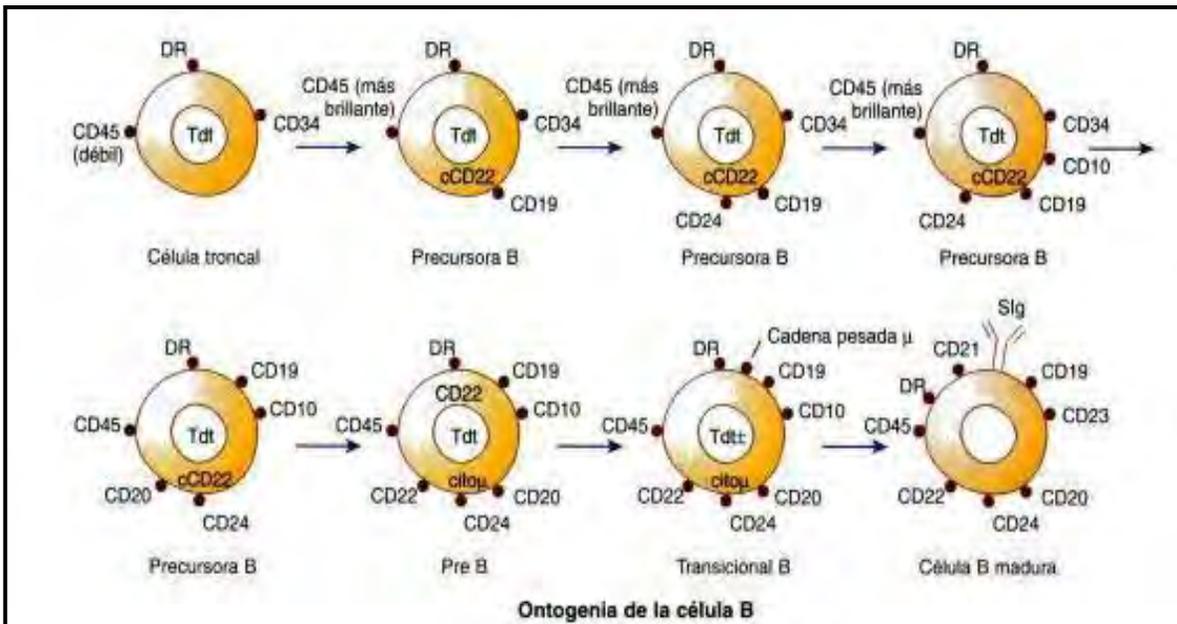


Figura 2. Ontogenia de la célula B (Rodak, 2005).

### 2.3 CD (grupo de diferenciación)

Durante el proceso de diferenciación, maduración y activación celular, las células expresan proteínas necesarias para el desarrollo correcto de sus funciones celulares. Por ello, las poblaciones de células linfoides se pueden analizar en función de la presencia o no con determinadas proteínas (que se pueden denominar marcadores) en sus respectivas membranas.

Cada población se puede a su vez dividir en subpoblaciones según la presencia de marcadores particulares que aparecen en ciertos momentos de su desarrollo o de su activación.

La nomenclatura aceptada para los marcadores linfocíticos recurre a una designación según los números de CD (*cluster of differentiation*, del inglés) significa “grupo de diferenciación”, término histórico para referirse a un grupo de anticuerpos monoclonales que son específicos frente a un determinado marcador de diferenciación linfocítica. El sistema CD proporciona un modo uniforme de identificar las moléculas de la superficie celular presentes en los linfocitos y muchos otros tipos celulares pertenecientes al sistema inmunitario.

Los anticuerpos monoclonales, reconocen cada uno de los marcadores de diferenciación, y su unión a sustancias fluorescentes permite analizar las diversas subpoblaciones celulares, bien sea por citometría o por microscopía.

Las moléculas de la superficie celular reconocidas por los anticuerpos monoclonales reciben el nombre de antígenos por la posibilidad de obtener anticuerpos contra ellos o de marcadores, debido a que identifican y distinguen entre poblaciones celulares diferentes. Estos marcadores pueden reunirse en varias categorías, algunos son específicos de las células pertenecientes a una estirpe particular o a una vía madurativa y otros varían en su expresión según el estado de activación o diferenciación de las mismas células (Abbas, 2008; Belov 2001).

## **2.4 Citometría de Flujo**

Un citómetro de flujo es un aparato capaz de medir componentes y propiedades de células o de partículas en suspensión.

La citometría de flujo es una tecnología que permite medir características físicas y químicas de células en suspensión. Dicha técnica entrega información sobre el tamaño celular, la granularidad o complejidad interna, así como también de la intensidad de fluorescencia relativa que posean las células en estudio. La citometría de flujo es una de las herramientas técnicas de gran valor en el estudio de neoplasias hematológicas, la cual permite analizar individualmente miles de células en un periodo muy corto de tiempo (segundos) (Dunphy, 2004; Malley, 2006; Palomo, 2005; Peakman, 2011).

Algunas de las aplicaciones clínicas de la citometría de flujo son: en la inmunofenotipificación (leucemias y linfomas; subpoblaciones linfoides, contenido de ADN, fases del ciclo celular, proteínas del ciclo celular, oncogenes, entre otros) (Palomo, 2005; Pimentel, 2006; Sabrafen, 2006).

### **2.4.1 Antecedentes Históricos**

Los principios básicos del citómetro de flujo fueron desarrollados por Moldovan en 1934 y Kielland en 1941. Con la aportación de anticuerpos monoclonales en 1975, ha permitido que la citometría de flujo sea utilizada tanto en la práctica clínica como en la investigación básica (Palomo, 2005).

### **2.4.2 Principio**

El principio básico de la citometría de flujo (y de muchos contadores hematológicos), es la interacción de una fuente de luz, específicamente un rayo láser, con células en suspensión, las cuales son canalizadas e «interrogadas» individualmente por el láser, recogiendo la información obtenida de dicha interacción. Existen equipos que cuentan con uno, dos o más rayos láser, siendo lo usual, la presencia de un láser que emita a 488 nm (láser de argón).

La interacción de una célula con la luz del láser (light scattering) puede producir la desviación de esta última, en un ángulo menor a 10 grados, lo que se conoce como dispersión frontal o FSC (forward scatter) y a su vez la desviación de la luz en más de 10 grados, pero en menos de 90, se conoce como dispersión lateral o SSC (side scatter). Es así como FSC y SSC son parámetros intrínsecos a la célula. Si a la suspensión celular se agrega un fluorocromo que tenga afinidad por algún componente celular y que además este fluorocromo sea excitable con el rayo láser en uso, se podrá detectar un cambio en la longitud de onda de emisión del fluorocromo; lo anterior se traducirá en formación de rangos o canales de fluorescencia, la cual es posteriormente detectada. Por ejemplo, la fluoresceína, fluorocromo ampliamente usado tanto en microscopía de fluorescencia como citometría de flujo, tiene un espectro de excitación máxima a 494 nm, siendo su espectro de emisión a 518 nm. En los citómetros de flujo actuales, con aplicación clínica, es posible detectar simultáneamente desde 1 hasta 4 rangos o canales de fluorescencia, lógicamente usando fluorocromos que emitan en diferente longitud de onda (Campana, 2002; Campos, 2004; Dunphy, 2004; Heller, 2004; Palomo, 2005; Pimentel, 2006).

### **2.4.3 Anticuerpos Conjugados con Fluorocromos**

Dado que ciertos fluorocromos se pueden unir a proteínas, es posible disponer anticuerpos conjugados con diversos fluorocromos. Si a esto se le suma el explosivo desarrollo de la producción y comercialización de anticuerpos monoclonales, conjugados con diversos fluorocromos, las potencialidades son enormes. Es así como hoy se dispone de anticuerpos contra una infinidad de moléculas biológicas, lo que se ha traducido en un gran desarrollo de los estudios de caracterización inmunofenotípica de diversos tipos celulares, muchos de ellos con una aplicación clínica correcta, como es el caso del estudio inmunofenotípico de enfermedades oncohematológicas (leucemias, linfomas, mieloma múltiple y otras (Campana, 2002; Campos, 2004; Dunphy, 2004; Palomo, 2005; Peakman, 2011).

#### **2.4.4 Presentación de Datos**

Los citómetros de flujos, a pesar de tener un sistema de fluidos, un sistema óptico y un sistema electrónico, es un equipo controlado informáticamente, existiendo para ello, diversas plataformas, las cuales mediante programas adecuados permiten tanto la adquisición como el análisis de los datos obtenidos.

Los datos se pueden visualizar como gráficos de puntos, contorno, densidad, histogramas, tridimensional, obteniéndose, en cada caso información numérica por ejemplo: coeficiente de variación, media de intensidad de fluorescencia, mediana, media geométrica, etc.

Un concepto fundamental al efectuar un análisis es la correcta selección de la región de interés a estudiar, la que se conoce como “gate” o ventana de análisis. Es posible combinar varias regiones al momento de hacer un análisis, lo que se traduce en una gran capacidad y versatilidad en el manejo de la información (Heller, 2004; Malley, 2006; Palomo, 2005; Peakman, 2011).

#### **2.4.5 Informe de resultados**

El informe de un inmunofenotipo debe incluir la definición de la presencia o ausencia (positivo o negativo), de un antígeno determinado, en algunos casos su intensidad de expresión (“bright” o “dim”). Es importante describir la expresión de varios antígenos por parte de las células neoplásicas, ya que en ocasiones puede ser clave para clasificar una leucemia (Heller, 2004; Malley, 2006; Palomo, 2005; Peakman, 2011).

## **2.5 Inmunofenotipo**

Se define como inmunofenotipo al proceso de identificación de los marcadores de la membrana celular (antígenos) en las diversas etapas de su diferenciación con el uso de anticuerpos monoclonales (McKenzie, 2000).

La inmunofenotipificación de leucemias por medio de citometría de flujo, es un componente útil y necesario clínicamente en el diagnóstico, clasificación, pronóstico y monitoreo de estas patologías. Debido a que resulta esencial para determinar si las células neoplásicas son de línea linfocítica o mielocítica (McKenzie, 2000; Rodak; 2005).

En las leucemias agudas debe realizarse un análisis con un mínimo de anticuerpos monoclonales que permita su diagnóstico inmunofenotípico. Es recomendable el empleo simultáneo de marcadores citoplasmáticos y de membrana que permitan identificar con mayor exactitud la población blástica. La utilización del anticuerpo CD45 es de gran utilidad, pues permite una mejor identificación y caracterización fenotípica de las células leucémicas (Sabrafen, 2006).

### **2.5.1 Clasificación de Leucemias por medio de Inmunofenotipo**

Las leucemias agudas se analizan con un amplio panel de anticuerpos monoclonales dirigidos contra los antígenos mielocíticos, linfocíticos u otros citoplasmáticos o nucleares, con el objeto de distinguir de modo reproducible las leucemias linfocíticas y mielocíticas

La evaluación morfológica de las leucemias no diferencia las dos categorías principales de modo uniforme. Por lo general se requieren técnicas auxiliares como la inmunofenotipificación por citometría de flujo para clasificar estos trastornos de manera correcta y asignar el linaje celular.

### **2.5.2 Marcadores de estirpe celular B**

Las LAL derivadas de las células B se subdividen en cuatro categorías inmunofenotípicas principales.

Las LAL de precursores tempranos o células B inmaduras expresan diversas combinaciones de HLA-DR, CD10-, CD34, CD19, CD20, CD79 intracitoplasmático y TdT nuclear; CD45 puede ser débil o ausente.

Las LAL de células pre-B expresan cadena pesada mu citoplasmática, por lo general en asociación con CD10, CD19, CD20, CD79 y TdT variable, pero carecen de inmunoglobulina de superficie.

La LAL de células B transicional tiene cadena pesada mu citoplasmática y de superficie asociada con antígenos de células B.

La LAL de células B maduras expresa la molécula de inmunoglobulina entera (ambas cadenas, pesada y liviana) en su superficie, además del marcador de células B CD19, CD20 o CD22. Este estadio de maduración carece de los antígenos inmaduros como CD34, CD19 o TdT, como se ejemplifica en la tabla 2. (Campana, 2002; McKenzie, 2000; Pui, 2006; Rodak; 2005; Turgeon 2006).

### **2.5.3 Marcadores de estirpe celular T**

Los marcadores CD3 intracitoplasmático y TdT permiten identificar los casos de LAL de células T. Otros anticuerpos empleados en la identificación de células T (CD2, CD5, CD7 y CD1a) como se ejemplifica en la tabla 2. (Campana, 2002; McKenzie, 2000; Pui, 2006; Rodak; 2005; Turgeon, 2006).

**Tabla 2: Marcadores inmunológicos empleados en inmunofenotipo de las leucemias agudas (Palomo, 2005).**

<i>Anticuerpo</i>	<i>Linaje</i>
CD 10	Ag LAL común: temprana pre-B: 90% (20%: T)
CD 19	Ag precursores del linfocito B (LAL linaje B)
CD 20	Linfocitos B (LAL linaje B)
CD 22	Precursores linfocitos B (Ag de superficie: 14% LAL) (Ag citoplasmático: 98% LAL)
CD 24	Precursores de linfocitos B, LAL linaje B y granulocitos
CD 34	Linfoblastos de linaje B, precursores de T tempranas Progenitores mieloides, micloblastos
Anti-IgG Cadena Mu	Ag citoplasmático pre-B, linfocitos tardíos y células plasmáticas
Anti G	IgG de cadena ligera: Ag de superficie de membrana, en linfocitos B
CD 7	Linfocitos T maduros, LAL T
CD 5	Linfocitos T común y tardío, LAL-T, (Linfomas cels B y T)
CD 2	LAL T (80%) linfocito T maduro
CD 1	Linfocito T maduro y en algunas LAL-T
CD 4	Linfocitos T maduros, algunas LAL-T
CD 8	Linfocito T maduro, LAL-T
CD 3	Ag de membrana linfocito T, en algunas LAL-T
CD 13	Mieloides: 80% LAL
CD 33	Progenitores mieloides: 80% LAL
CD 15	Mieloides maduras, granulocitos y monocitos
CD 11b	Serie monocitoide: monoblastos y monocitos
CD 14	Serie Monocitoide
CDW 65	Serie granulocítica y monocítica
CD 41	Glicoproteína plaquetaria: IIb/IIIa: megacarioblastos, megacariocitos y plaquetas
CD 42a	Glicoproteína IX plaquetaria
CD 42b	Glicoproteína Ib plaquetaria

### III. JUSTIFICACIÓN

Aún cuando algunos tipos de leucemias pueden diagnosticarse claramente, mediante criterios clínicos y citomorfológicos bien establecidos, hay otros casos, como las LAM-M0 y LAM-M7, donde es imprescindible la inmunofenotipificación para el establecimiento inequívoco del diagnóstico, clasificación, pronóstico y tratamiento. La forma rutinaria de realizar la inmunofenotipificación es mediante citometría de flujo con paneles de anticuerpos monoclonales fluorescentes.

El presente trabajo de investigación pretende identificar, clasificar y precisar los perfiles epidemiológicos (frecuencias) del inmunofenotipo de LAL en pacientes pediátricos mexicanos atendidos en el Instituto Nacional de Pediatría, mediante citometría de flujo que permitirá caracterizar a las células leucémicas para poner de manifiesto la asignación de la estirpe celular y su estadio de maduración, mediante el empleo de un panel de anticuerpos monoclonales que implique a las tres estirpes celulares. Esta información también ayudará a crear mejores estrategias de tratamiento, mejorar el estudio de los casos, optimizar el método de citometría de flujo en el laboratorio del Servicio de Hemato-Oncología y comprender mejor los cambios fenotípicos surgidos en los blastos leucémicos como respuesta al tratamiento y la historia natural de la enfermedad.

#### **IV. HIPÓTESIS**

La inmunofenotipificación de leucemias agudas mediante citometría de flujo permitirá caracterizar a las células leucémicas para poner de manifiesto la asignación de estirpe celular y establecer la frecuencia de la misma en la población pediátrica.

#### **V. OBJETIVOS**

##### **GENERAL**

Determinar la clasificación inmunológica de la LAL mediante el empleo de citometría de flujo para poner de manifiesto la frecuencia en la asignación de estirpe celular en pacientes pediátricos diagnosticados con leucemia en el Instituto Nacional de Pediatría (INP) durante el periodo comprendido entre el año 2003 al 2011.

##### **• PARTICULARES**

- 1.- Realizar una revisión retrospectiva de casos que presentaron LAL en el INP para elaborar una base de datos con los resultados de inmunofenotipificación obtenida mediante citometría de flujo.
- 2.- Establecer la frecuencia de la estirpe celular en pacientes pediátricos caracterizados con LAL.
- 3.- Comparar los resultados de los pacientes pediátricos mexicanos con otros grupos de estudio.

## **VI. MATERIALES Y MÉTODOS**

Se realizó un estudio retrospectivo con revisión de los expedientes clínicos de 561 pacientes pediátricos con diagnóstico de leucemia aguda linfoblástica (LAL) confirmada mediante citometría de flujo. Los pacientes fueron atendidos entre Enero de 2003 y Diciembre de 2011 en el Servicio de Hemato-Oncología del Instituto Nacional de Pediatría (INP)

Los datos de cada paciente fueron obtenidos a partir de las bitácoras utilizadas en el INP, las cuales contenían, número de registro, nombre, conteo de blastos (>30%) y el resultado de cada uno de los anticuerpos monoclonales empleados en la caracterización inmunológica (inmunofenotipo). Se consideró la positividad de una clona para un marcador de superficie celular, si era mayor o igual a 30% de las células obtenidas con el anticuerpo y su respectivo marcador.

La clasificación inmunológica de la LAL se evaluó mediante el empleo de un panel de anticuerpos monoclonales con las 3 estirpes para caracterizar las células blásticas. Dependiendo del modelo de reactividad y expresión de antígenos intracelulares y de superficie o co-expresión, los casos de LAL se clasificaron de la siguiente manera, en Estirpe B: PCB-CD10- (CD79+, CD22+, CD19+, CD10-), PCB-CD10+ (CD79+, CD22+, CD19+, CD10+), Pre-B (CD79+, CD22+, CD19+, CD10-, C $\mu$ +) y B (CD19+, IgSK O IgS $\lambda$ ). Con respecto a los casos de LAL de estirpe T: (CD2, CD3c, CD5, CD7).

La citometría de flujo se realizó en muestras de médula ósea. Las muestras se analizaron con anticuerpos monoclonales (AcMo) intracitoplasmáticos y de superficie, enmarcados en las tablas 3 y 4, marcados con fluorescencia y procesadas en un equipo Beckman Coulter Epics XL,

**Tabla 3. AcMo (Intracitoplásmaticos)**

No. Tubo	Anticuerpos Monoclonales (Intracitoplásmaticos)
1	Control (50 µL Muestra + 10 µL CD45 PC5)
2	TdT F / CD45 PC5
3	MPO F / CD45 PC5
4	CD3 F / CD45 PC5
5	Cadenas µ F / CD45 PC5

**Tabla 4. AcMo (Superficie)**

No. Tubo	Anticuerpos Monoclonales (Superficie)
1	Control (100 µL Muestra + 10 µL CD45 PC5)
2	CD10F / CD45 PC5
3	k F / λ PE / CD 19 ECD / CD45 PC5
4	CD20F / CD5 PE / CD45 PC5
5	CD21F / CD7PE / CD45 PC5
6	CD41F / CD13PE / CD45 PC5
7	CD42 F / CD33PE / CD45 PC5
8	CD61F / CD56PE / CD45 PC5
9	CD64F / CD45 PC5
10	CD2F // CD45 PC5
11	Cadenas µ F / CD45 PC5

Al finalizar la recolección de datos, se procedió a clasificarlos en las diferentes estirpes celulares de LAL (antes mencionadas), de acuerdo a la batería de anticuerpos monoclonales empleados en el inmunofenotipo, como se demuestra en la tabla 3 y 4.

Se agruparon los datos y se manejaron mediante número de pacientes, años y porcentaje (frecuencia) según la utilidad del caso para facilitar su análisis. Los datos y la agrupación de los datos de las diferentes estirpes celulares se efectuaron por medio del sistema de cómputo Excel.

Criterios de inclusión:

- 1.- Edad <18 años
- 2.- Ambos géneros (niñas y niños)
- 3.- Diagnóstico *de novo* de LAL confirmada por medio de citometría de flujo.

Criterios de exclusión:

- 1.- Pacientes con recaídas
- 2.- Determinación de subpoblaciones
- 3.- Pacientes con diagnóstico de Leucemia Aguda Mieloblástica (LAM).

**Clasificación Inmunológica de LAL**

**Linaje celular B:**

<b>PCB-CD10-</b>
CD79c+, cyCD22+, CD19+, CD10-
<b>PCB-CD10+</b>
CD79c+, cyCD22+, CD19+, CD10+
<b>Pre-B</b>
CD79c+, cyCD22+, CD19+, CD10-, cyμ+
<b>B</b>
CD79c+, CD19+, CD10+, Igs+

**Linaje celular T:**

CD2, CD3c, CD5, CD7
---------------------

**Tabla 5. Anticuerpos monoclonales usados en el estudio para su respectiva afiliación en linaje, estado de maduración y caracterización en leucemias agudas.**

Linaje	B	T
Asignación	CD79c CD22c CD19	CD3c CD7
Estado de Maduración	CD34 TdT	CD34 TdT
Caracterización Adicional	CD10 CD20 CD22 cy $\mu$ k / $\lambda$	CD1 CD2 CD3 CD5

## VII. RESULTADOS

En el periodo comprendido entre Enero de 2003 a Diciembre de 2011, se estudiaron de forma retrospectiva 692 pacientes pediátricos con diagnóstico de leucemia aguda, los cuales fueron admitidos en el Servicio de Hemato-Oncología del Instituto Nacional de Pediatría, en la ciudad de México.

Del total de pacientes diagnosticados con leucemia aguda, los casos de LAM conformaron (131/692) 18.9 %; la mayor proporción está centrada en los casos de LAL, los cuales representaron (561/692) 81.1 %.

Un total de 561 pacientes pediátricos fueron diagnosticados con LAL. De éstos (317/561) 56.5% fueron niños y (244/561) 43.5 % fueron niñas.

El análisis de las LAL clasificadas con linaje celular B incluyeron: 438 casos (78.1%) de PCB-CD10+, 58 casos (10.3%) de PCB-CD10-, 21 casos (3.7%) de pre-B y 6 (1.1%) casos para la estirpe celular B, como se observa en la tabla 6.

El número de pacientes diagnosticados con LAL de la estirpe celular T fueron 38, los cuales representaron (6.8%) del total de los casos analizados, como se observa en la tabla 6.

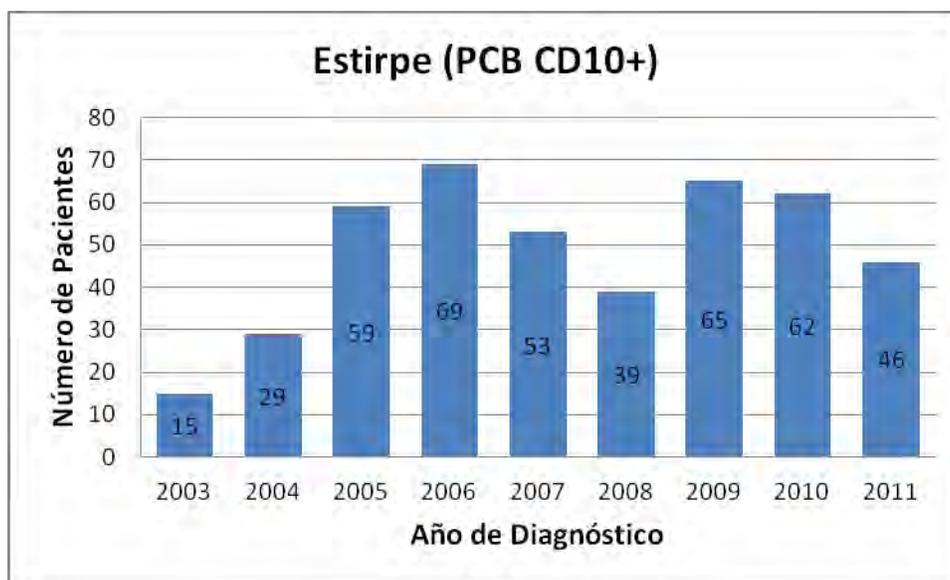
<b>Inmunofenotipo en Leucemias Agudas Linfoblásticas</b>		
<b>Datos INP (2003-2011).</b>		
<b>N=561</b>		
<b>Estirpe</b>	<b>Inmunofenotipo</b>	<b>Frecuencia (%)</b>
PCB-CD10+	HLADR (+/-), CD79c (+), CD19 (+), CD10+	78.1
PCB-CD10-	HLADR (+/-), CD79c (+), CD19 (+/-)	10.3
PRE-B	HLADR (+/-), CD79c (+), CD19 (+), CD10+, Igc+	3.7
B	HLADR (+/-), CD79c (+), CD19 (+), CD10+, Igs+	1.1
T	CD2(+), CD3c(+), CD5(+), CD7(+)	6.8

Tabla 6. Resultados para Inmunofenotipo de LAL.

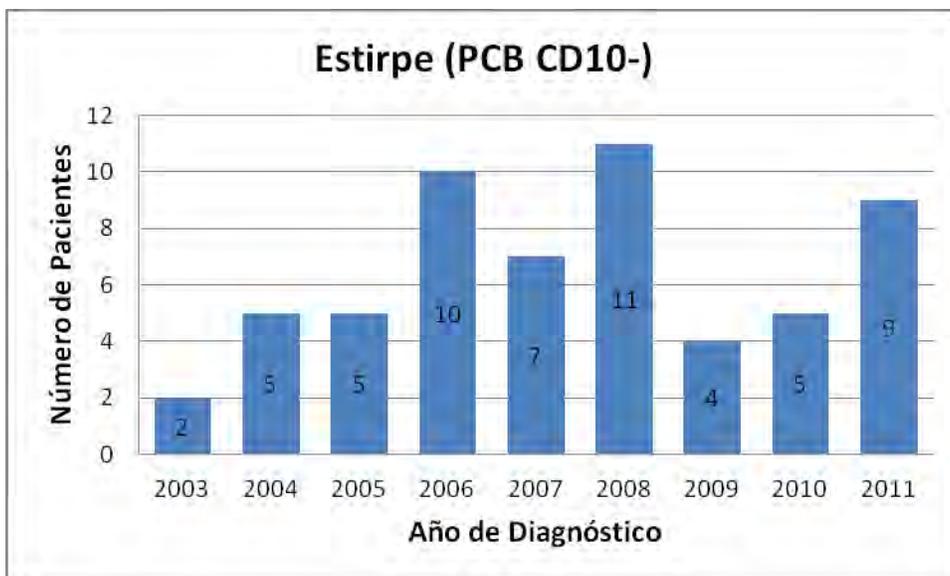
La proporción para cada estirpe celular con respecto al género de los pacientes diagnosticados con LAL mostraron los siguientes resultados para el linaje celular B: PCB-CD10+: niños (55.7%), niñas (44.3%); PCB-CD10-: niños (51.7%), niñas (48.3%); pre-B: niños (57.1%), niñas (42.9%); B: niños (50%), niñas (50%).

Los resultados para el linaje celular T revelaron las siguientes proporciones: niños (73.7%), niñas (26.3%).

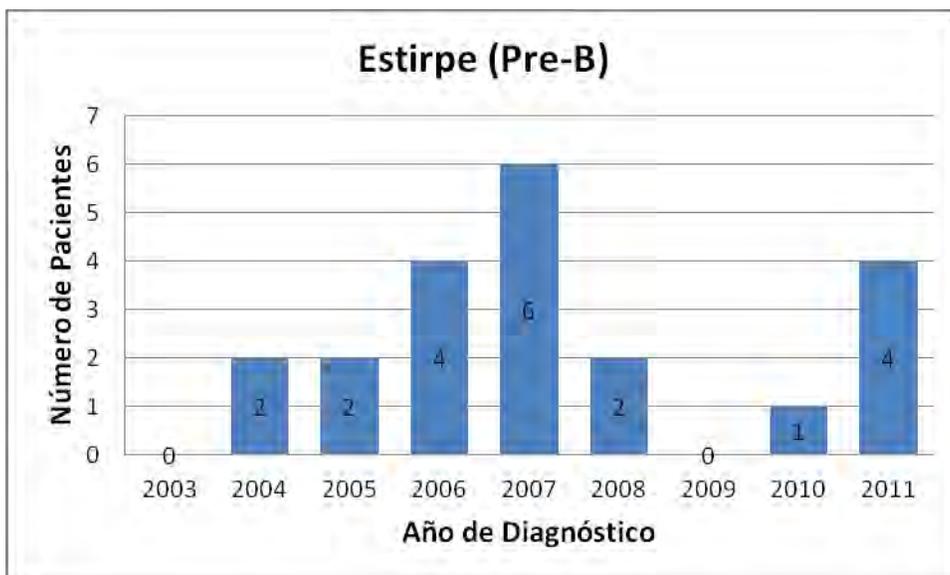
Las tendencias entre los años de diagnóstico y su relación con el número total de pacientes atendidos en el INP se muestran en las siguientes gráfica para cada estirpe celular características para la clasificación de leucemias agudas linfoblásticas (LAL).



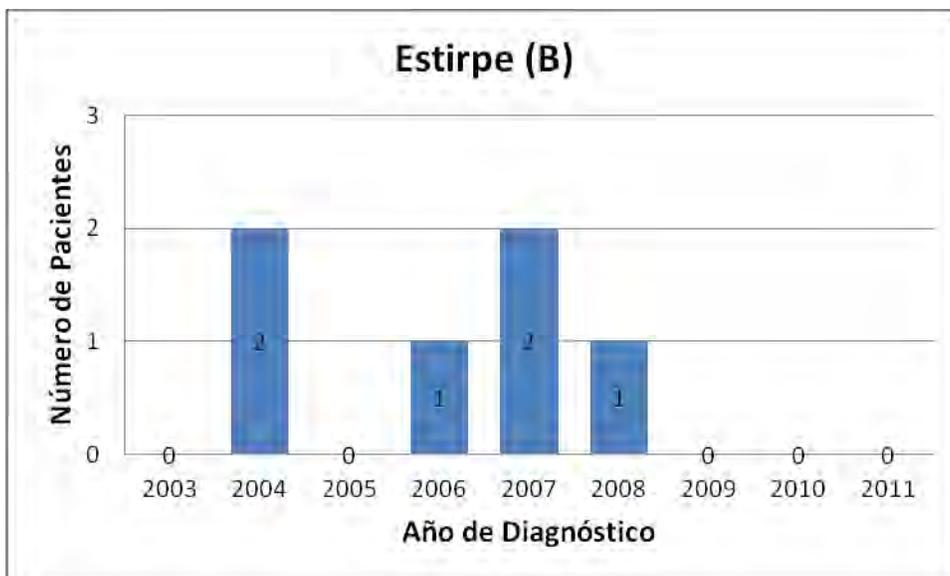
**Gráfica 1. Estirpe (PCB-CD10+)**



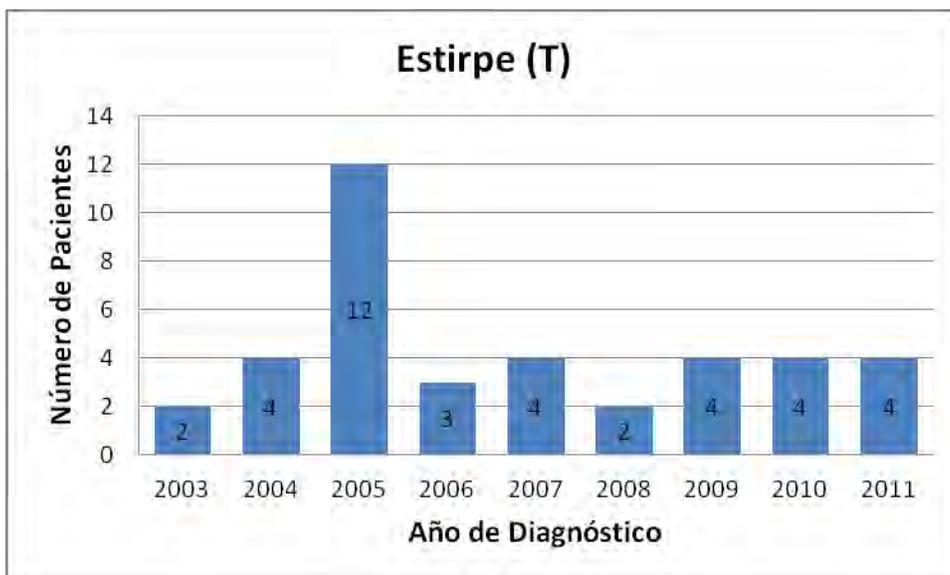
**Grafica 2. Estirpe (PCB-CD10-)**



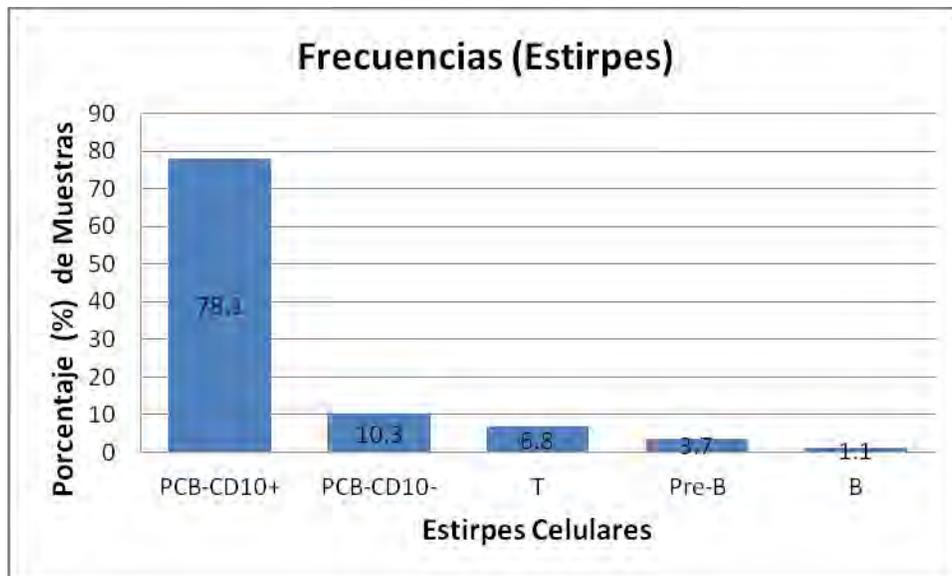
**Grafica 3. Estirpe (Pre-B)**



**Grafica 4. Estirpe (B)**



**Grafica 5. Estirpe (T)**



**Grafica 6. Frecuencias para cada estirpe celular**

## VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los hospitales públicos de la ciudad de México atienden 97.5% de todos los casos de leucemia ocurridos en la capital y su zona conurbada.

De todos los hospitales públicos ubicados en la ciudad de México, el Instituto Nacional de Pediatría (INP) cuenta con el mayor número de casos de leucemia diagnosticados y tratados en pacientes pediátricos (Pérez, 2011).

Por lo tanto, el presente estudio tendió a ser representativo de la población infantil mexicana, debido al tipo de pacientes que se atienden, los cuales provienen de distintos estados de la República Mexicana. Con el valor agregado de ser un estudio con datos actualizados (hasta el año 2011), contar con un gran número de casos (561), una batería de anticuerpos monoclonales para la caracterización inmunológica por medio de citometría de flujo de los casos de leucemia aguda linfoblástica, además de contar con personal calificado para la realización de dicha técnica y un estricto control de calidad.

El análisis retrospectivo demostró una mayor proporción en los casos de leucemia linfoblástica aguda (LAL) en niños con respecto a niñas, existe una marcada tendencia a una mayor cantidad de casos reportados de LAL en niños. (Belson, 2007 & Mejía, 2010).

De acuerdo a los datos del INP, la frecuencia de LAL de las células B y PCB es similar a la encontrada en población caucásica, predominando en los casos del INP la LAL de estirpe B (89.5%); observándose además una menor frecuencia de LAL de estirpe T (6.8%) y pre-B tardía (3.7%) en comparación con lo reportado en naciones en desarrollo.

La mayoría de los pacientes se clasificaron en la estirpe B, específicamente con LAL PCB-CD10+ (78.1%), lo cual confirmó la conocida preponderancia de este subtipo inmunitario en la infancia.

Las frecuencias de los casos de leucemia aguda linfoblástica aguda en pacientes pediátricos estudiados en el INP presentaron similitud con los reportados a nivel mundial, específicamente en países como Reino Unido o Chile (anexo figura 4) (Rivera, 2006).

Los resultados en cuanto a la proporción de LAL PCB-CD10+, contradicen lo reportado en artículos científicos que abordaron dicho tema, en el sentido de que la distribución de subtipos de LAL en pacientes mexicanos era similar a la hallada en personas de raza negra, en lo que se refiere a un déficit selectivo de LAL común y proporciones significativamente más altas de LAL-T que las observadas en poblaciones caucásicas (Paredes-Aguilera, 1999).

Al comparar la proporción de casos de LAL-T obtenida con datos del INP con diferentes regiones geográficas a nivel mundial, resultó ser inferior a lo reportado en países como Egipto (50 %), India (17 %), Malasia (22 %), Holanda (19.8%), Pakistán (17.2 %) o Alemania (16.6 %), en dichos países las proporciones (en porcentaje) son mayores al 10%. En países como Arabia Saudita (12.3 %), Italia (12.5 %) o Chile (10 %) presentan tendencias similares a México, (Khawaja, 2005).

En trabajos previos realizados en el Instituto Nacional de Pediatría (INP), con casos de LAL en pacientes pediátricos a través de los años (desde 1987 hasta 2002), indicaron un aumento considerable de casos diagnosticados de LAL por dicha institución (en el estudio previo, en 15 años, 682 casos; en el presente trabajo, en 8 años, 561 casos). Con respecto a los casos de la estirpe celular B, como fueron: PCB-CD10+ aumentaron 3.1%, PCB-CD10- aumentaron 5.3%, Pre-B disminuyeron 5.4%, B disminuyeron 0.4% y por último los casos de células T, disminuyeron 2.6% (Rivera, 2006).

La cifra de casos de leucemia a nivel mundial varió notablemente entre un país y otro, registrándose las tasas más altas en niños de raza blanca de países industrializados de Europa (Hungría, Dinamarca), Oceanía (Australia y Nueva Zelanda) y América del Norte (Canadá y Estados Unidos) y las tasas más bajas en niños de raza negra en África y en las naciones de Medio Oriente.

En Latinoamérica, la leucemia aguda es la principal causa de muerte relacionada con cáncer en pacientes pediátricos, esta presenta un considerable incremento en los casos registrados para ambos sexos, principalmente en Colombia, Ecuador y México; destacando sustancialmente el aumento de pacientes para México (Pérez, 2011).

En la ciudad de México, la frecuencia de leucemias agudas, específicamente la LAL, se encuentra entre las más altas del mundo, similar a los casos registrados en Costa Rica o en la población hispana radicada en Estados Unidos. En estas regiones la incidencia de LAL es mayor a 40 casos por millón. En la ciudad de México, la frecuencia de LAL es mayor con respecto a otras ciudades ubicadas en Canadá, Estados Unidos o Reino Unido (Pérez, 2011).

Existen teorías que postulan que ha habido un incremento en la incidencia del subtipo LAL, la cual hizo su aparición en los tiempos modernos con el advenimiento del desarrollo industrial y la prosperidad, lo que parece reflejar exposiciones ambientales asociados con la modernización.

Por otra parte, existen otras teorías con respecto a los principales factores con una alta incidencia de casos de LAL en población infantil hispana, las cuales hacen referencia a un bajo nivel socio-económico, exposición a agentes carcinogénicos y agentes infecciosos.

En el caso específico del nivel socioeconómico, éste puede manifestar muchas influencias, tales como expresión genética, raza, edad materna, educación de los padres y exposiciones ocupacionales, por tanto, es difícil evaluarlo directamente como un solo factor de riesgo. Por ejemplo, en los niños de población negra de África mostraron un déficit selectivo significativo en la incidencia de LAL común (PCB CD10+) y un incremento proporcional en las LAL-T.

La importancia etiológica del pico de incidencia inicial de la LAL de la infancia no es clara, aunque se ha especulado que esté relacionada con fenómenos gestacionales o con el desarrollo inicial del sistema inmunitario.

Es muy probable que los diferentes subtipos de LAL tengan distintas causas de tal forma que el espectro de fenotipos inmunitarios varíe de acuerdo a los diferentes medios ambientales en el que se desenvuelven los pacientes y sus familias.

La mayoría de los estudios de LAL en niños y adultos ha informado un peor pronóstico en los pacientes con LAL de PCB-CD10- que en aquellos con LAL de PCB-CD10+ el cual al menos en los niños se ha asociado a rasgos clínicos y biológicos (reacomodos del cromosoma 11q23) de mal pronóstico (Rivera, 2011)

Existe controversia sobre si un mal pronóstico de los niños con LAL de PCB-CD10- y pre B en la estirpe B y de los niños con LAL-T, se deben mas bien a diferencias en los rasgos clínicos y citogenéticos-moleculares que a las distintas etapas de la diferenciación de los linfocitos T y B.

El rasgo distintivo de las LAL-B es la presencia frecuente de un tumor abdominal linfomatoso, infiltración renal y daños en el Sistema Nervioso Central, predominio en el género masculino y conteos leucocitarios bajos.

## **IX. CONCLUSIONES**

La citometría de flujo permite mediciones objetivas, sensibles, rápidas y reproducibles de gran variedad de las características celulares, lo cual facilita el diagnóstico y la clasificación inmunológica de las leucemias agudas.

La utilización de un panel de anticuerpos monoclonales contra antígenos B y T, ha permitido la asignación correcta de la estirpe en la casi totalidad de los casos de leucemia aguda.

La mayoría de los pacientes se clasificaron dentro de la estirpe celular B, específicamente LAL PCB-CD10+ (78%), lo cual confirmó la conocida preponderancia de este subtipo inmunitario en la infancia.

## **X. PERSPECTIVAS**

Para complementar y/o mejorar el presente trabajo de investigación, se recomienda desarrollar la información de los siguientes puntos:

- Analizar la edad de los pacientes, debido a que dicho parámetro no fue registrado en las bitácoras de trabajo a través de varios años de análisis para la caracterización inmunológica de las leucemias.

XI. ANEXOS

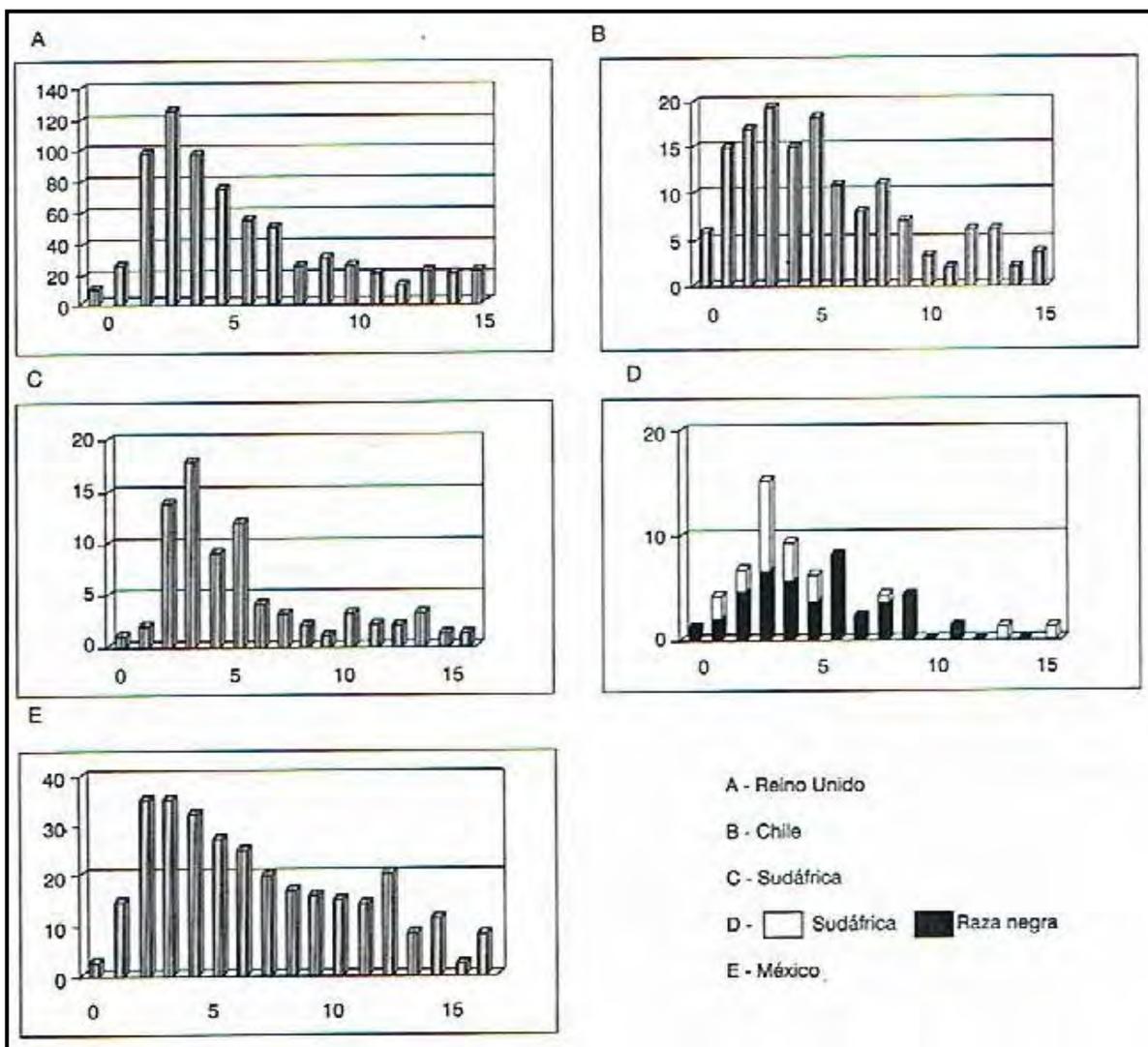


Figura 4. Distribución de los casos de leucemia aguda linfoblástica común en pacientes pediátricos (Romero-Guzmán, Paredes-Aguilera Capítulo 11, página 157 en Rivera, 2006).

**XII. BIBLIOGRAFÍA**

1. Abbas A., Lichtman, A. & Pillai S. 2008, *Inmunología Celular y Molecular*, 6ª Edición, Elsevier España, 566 pp.
2. Belson M., Kingsley B. & Holmes A. 2007, Risk Factors for Acute Leukemia in Children: A Review, *Environmental Health Perspective*, 115:1 (138-145).
3. Belov L., Vega O. & Remedios. C. 2001. Immunophenotyping of Leukemias Using a Cluster of Differentiation Antibody Microarray. *Cancer Research*, 61 (4483-4489).
4. Campana D. & Coustan E. 2002, Advances in the Immunological Monitoring of Childhood Acute Lymphoblastic Leukaemia. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 15 (1-19).
5. Campos A. 2004, *Manual de Prácticas de Inmunología*, Elsevier, Madrid, España, 141 pp.
6. Chan K.W. 2002, Acute Lymphoblastic Leukemia, *Current Problems in Pediatric & Adolescent Health Care* 32:2 (40-49).
7. Curado M.P., Pontes T., Guerra M.E. & Camargo M. 2011, Leukemia Mortality Trends among Children, Adolescents, and Young Adults in Latin America, *Revista Panamericana de Salud Pública* 29:2 (96-102)
8. Dorland B. 2005, *Diccionario Enciclopédico Ilustrado de Medicina* (30ª Edición), Elsevier, Madrid, España, 2210 pp.
9. Dunphy C. 2004, Applications of Flow Cytometry and Immunohistochemistry to Diagnostic Hematopathology, *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 26 pp.
10. Hansen J.T. & Lambert D.R. 2006, *Neteer: Anatomía Clínica*, Elsevier, Madrid, España, 666 pp.
11. Heller D. 2004, A Review and Applications of Flow Cytometry, Department of Chemistry, University of Illinois at Urbana-Champaign, 13 pp.
12. Khawaja M.R., Allana S.S., Akbarali A.N. & Adil S.N. 2005, Flow Cytometric and Demographic Analysis of T cell Acute Lymphoblastic Leukemia in Pakistani Population, *The Aga Khan University, Pakistan*, 17:4 (1-6).
13. López M.A., Vargas J.M., Correa C. & Salazar J. 2007, Prevalencia de Leucemias en Pacientes del Hospital Central Dr. Ignacio Morones Prieto, de la Ciudad de San Luis Potosí, *Bioquímica* 32 (2)
14. Maldonado E. 2002, *Biología Molecular en Medicina*, Limusa, México D.F. 200 pp.

15. Malley J., Lebowitz H. & Bele M. 2006, *Inmunology*, McGraw-Hill, New York, United States of America, 223 pp.
16. Mejía J.M. 2010, *Epidemiología de la Leucemia Linfoblástica Aguda Infantil*, *Revista de Hematología*, 11 (35-36).
17. Mejía J.M., Ortega A. & Fajardo A. 2005, *Epidemiología de las Leucemias Agudas en Niños, Parte 1*, *Revista Médica del Instituto Mexicano de Seguridad Social*, 43:4 (323-333).
18. Mejía J.M., Bonilla M., Lorenzana R., Juárez S. & De Reyes G., 2005, *Incidence of Leukemias in Children from El Salvador and Mexico City between 1996 and 2000: Population-based data*, *Bio-Med Central Cancer* 5:33 (1-9).
19. Margolin J.F., Steuber C.P. & Poplack D.G. 2001. *Acute Lymphoblastic Leukemia*. In: *Principles and Practice of Pediatric Oncology*. Pizzo A., Poplack D. 4th edition. Lippincott Williams & Wilkins Publishers; 489-544 pp.
20. Mayani H., Flores E., Pelayo R., Montesinos J., Flores P. & Chávez A. 2007, *Hematopoyesis*, *Cancerología* 2 (95-107).
21. McKenzie S. 2000, *Hematología Clínica, El Manual Moderno*, México D.F. 872 pp.
22. Molinés A. 2001, *Leucemias Linfoblásticas Agudas Infantiles. Evolución Histórica y Perspectivas Futuras*, *Boletín de la Sociedad Canaria de Pediatría* 25:2 (279-290)
23. Palomo I., Pereira J., & Palma J. 2005, *Hematología, Fisiología y Diagnóstico*, Universidad de Talca, Talca, Chile, 782 pp.
24. Peakman M. & Vergani D. 2011, *Inmunología Básica y Clínica*, 2º Edición, Elsevier, Barcelona, España, 365 pp.
25. Pérez M.L., Fajardo A., Bernáldez R., Martínez A. & Medina A. 2011, *Childhood Acute Leukemias are Frequent in Mexico City: Descriptive Epidemiology*, *Bio-Med Central Cancer* 11:355 (1-11).
26. Pimentel E., Ortíz A.R. & Breña M. 2006, *Tópicos de Genética*, Sociedad Mexicana de Genética, México, 387 pp.
27. Pui C. 2006, *Childhood Leukemias*, Cambridge University Press, 960 pp.
28. Rodak B.F. 2005, *Hematología Fundamentos y Aplicaciones Clínicas*, Editorial Médica Panamericana, 2º Edición, Buenos Aires, Argentina, 838 pp.

29. Paredes-Aguilera R., Romero-Guzmán L., López-Santiago N., Bravo-Lindoro A., Correa-González C. & Joly-Linero R., 1999, Inmunofenotipo de la Leucemia Aguda Linfoblástica en Niños Mexicanos, *Sangre* 44:3 (188-194).
30. Paredes-Aguilera R., Romero-Guzmán L., López-Santiago N., Burbano-Ceron L., Camacho-Del Monte O. & Nieto-Martínez S. 2001, Flow Cytometric Analysis of Cell-Surface and Intracellular Antigens in the Diagnosis of Acute Leukemia, *American Journal of Hematology* 68 (69-74).
31. Redaelli A., Laskin B.L, Stephens J.M. & Pashos C.L. 2005, A Systematic Literature Review of the Clinical and Epidemiological Burden of Acute Lymphoblastic Leukaemia (ALL) *European Journal of Cancer* 14 (53-62).
32. Rivera R. 2006, *Hemato-Oncología Pediátrica Principios Generales*, Editores de Textos Mexicanos, 2006, México D.F., 558 pp.
33. Sabrafen S.J., Raebel C.B. & Vives J.L. 2006, *Hematología Clínica*, Elsevier España, Madrid, España, 889 pp.
34. Turgeon, M.L. 2006, *Hematología Clínica. Teoría y Procedimientos*, El Manual Moderno, México D.F. 616 pp.
35. Zorlu P., Ergör G., Teziç T., Duru F., & Ertem U. 2002, Evaluation of Risk Factors in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia, *Turkish Journal of Cancer* Volumen 32:1 (5-11).