

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUIMICA
INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNOSTICO E
INVESTIGACIÓN EN SALUD
SELADIS



**"EVALUACIÓN DE PARÁMETROS MORFOLOGICOS, CITOQUÍMICOS
E INMUNOFENOTÍPICOS DURANTE LA FASE DE INDUCCIÓN DE
PACIENTES ADULTOS CON LEUCEMIA AGUDA"**

**Tesis para optar el grado de Especialista en Diagnóstico Clínico
con mención en Hematología.**

Postulante: Lic. Sara Aruquipa Cerrogrande

**Asesores: Dra. Patricia Gómez M. Sc.
Dra. Mónica Guzmán**

La Paz- Bolivia.
2007

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUIMICA
INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNOSTICO E
INVESTIGACIÓN EN SALUD
SELADIS



**"EVALUACIÓN DE PARÁMETROS MORFOLÓGICOS, CITOQUÍMICOS
E INMUNOFENOTÍPICOS DURANTE LA FASE DE INDUCCIÓN DE
PACIENTES ADULTOS CON LEUCEMIA AGUDA"**

**Tesis para optar el grado de Especialista en Diagnóstico Clínico
con mención en Hematología.**

Postulante: Lic. Sara Aruquipa Cerrogrande

La Paz- Bolivia.
2007

TABLA DE CONTENIDOS

	Pag.
I. INTRODUCCIÓN.	1
II. MARCO TEORICO	3
A. ANTECEDENTES.	3
B. ETIOLOGÍA.	5
1. HEREDITARIA.	5
2. QUÍMICOS.	6
3. DROGAS.	6
4. VIRUS.	6
C. CLASIFICACION.	6
1. MORFOLÓGICA.	7
2. METODOS CITOQUÍMICOS DE IDENTIFICACIÓN CELULAR.	9
a. MIELOPEROXIDASA.	10
b. REACCION DEL ACIDO PERIÓDICO DE SCHIFF(PAS).	10
c. ESTERASA INESPECÍFICA ALFA NAFTIL ACETATO ESTERASA(ANAE).	11
d. INHIBICIÓN DE LA ESTERASA INESPECÍFICA CON FNA.	11
e. ESTERASA ESPECIFICA CLOACETATO ESTERASA.	11
3. INMUNOFENOTIPO.	12
4. CITOGENÉTICA.	16
D. CLINICA.	17
E. EVALUACIÓN PRE TRATAMIENTO.	20
F. FACTORES PRONOSTICOS PARA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA	21

G. TRATAMIENTO.	21
1. TRATAMIENTO DE LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA DEL ADULTO	22
a. AVANCES EN EL MANEJO DE LLA EN EL ADULTO.	23
b. MODIFICADORES DE RESPUESTA CELULAR	24
2. TRATAMIENTO ESTANDAR DE LMA EN EL ADULTO	25
a. INDUCCIÓN DE REMISION.	25
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	27
IV. JUSTIFICACIÓN.	30
V. OBJETIVOS.	30
A. OBJETIVO GENERAL.	30
B. OBJETIVOS ESPECIFICOS.	30
VI. MATERIAL Y METODOS.	31
A. TIPO DE ESTUDIO.	31
B. PACIENES.	31
C. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y DE EXCLUSIÓN.	31
D. VALORACIÓN MORFOLÓGICA.	33
E. VALORACIÓN CITOQUIMICA.	34
F. INMUNOTIPIFICACIÓN.	35
G. TRATAMIENTO.	38
1. FASE DE CONSOLIDACIÓN E INTENSIFICACIÓN	40
2. FASE DE MANTENIMIENTO	40
H. DEFINICIONES.	40
VII. RESULTADOS.	42
A. CARACTERÍSTICAS DE PRESENTACIÓN DE LOS PACIENTES	46
B. EVALUACIÓN MORFOLÓGICA, CITOQUIMICA E INMUNOFENOTÍPICA POS FASE DE INDUCCIÓN	
C. RESPUESTA AL TRATAMIENTO DE INDUCCIÓN.	53
D. OCURRENCIA DE RECAIDAS.	55
E. PRONOSTICO.	55

VIII.	DISCUSIÓN.	57
IX.	CONCLUSIÓN.	66
X.	BIBLIOGRAFÍA.	68

I. INTRODUCCIÓN.

Las leucemias agudas son un grupo heterogéneo de enfermedades o padecimientos que se caracterizan por la proliferación incontrolada y acumulación de células inmaduras de la sangre, debido a la alteración de un clon celular, que surge de un progenitor hematopoyético y que generalmente origina un estado de insuficiencia medular, por lo que se las considera entidades sistémicas desde su diagnóstico.^{9,12,22}

Tradicionalmente, las leucemias agudas se dividen en mieloides (LMA) y linfoides (LLA), tomando en cuenta la célula madre de la cual se originan, es así, que las tinciones especiales, los marcadores de superficie y el inmunofenotipo, han contribuido notablemente para lograr el diagnóstico y clasificación de las leucemias en forma más precisa, no dejando de lado los estudios básicos, como son el cuidadoso examen de los frotis de sangre periférica y de médula ósea, ya que siguen teniendo gran importancia en nuestro medio.⁹

El objetivo principal del diagnóstico es el poder establecer el tipo de leucemia y así asignar al paciente a un determinado tratamiento antineoplásico y erradicar el clon leucémico, restableciendo así, la hematopoyesis normal en la médula ósea, lo cual es posible lograr, siempre que se apliquen tratamientos adecuados a los diferentes grupos pronósticos. El avance tecnológico en la última década se ha reflejado tanto en el desarrollo de técnicas específicas para la identificación de las leucemias, como en el uso de nuevos agentes farmacológicos y biológicos, lo cual en conjunto, resulta en mejores formas de tratamiento para las leucemias agudas, en donde ya no es suficiente el hecho

de lograr remisión, sino, alcanzar sobrevidas más prolongadas e incluso mayor porcentaje de curaciones.⁹

Dentro de los aspectos importantes a tomar en cuenta, cuando se planea el tratamiento de un paciente con leucemia aguda debemos tomar en cuenta la clasificación biológica de la leucemia en base a características citoquímicas, inmunofenotipo, citogenética y alteraciones genéticas moleculares que permiten la definición de grupos de riesgo sobre la base de factores de impacto pronóstico conocido para posteriormente realizar la evaluación de enfermedad mínima residual para la definición de remisión completa⁹.

Históricamente, los factores pronósticos y el manejo de esta enfermedad se decidían sobre la base de la morfología celular, los parámetros de la citometría hemática y los datos clínicos, siendo pilares fundamentales en la caracterización de neoplasias hematológicas y en muchos casos suficientes para establecer el diagnóstico. Los avances en el análisis de inmunofenotipo por citofluorometría multiparamétrica, la citogenética, la genética molecular y la aplicación combinada de todos ellos, para caracterizar las células leucémicas, no solo han aumentado el conocimiento de la biología o la patobiología de las leucemias agudas, sino que también han contribuido a una más fina clasificación de los subtipos de la leucemia aguda y la identificación de distintas entidades clínico-patológicas, permitiendo el diseño y desarrollo de esquemas y estrategias de tratamiento más específicos para cada subgrupo ya que es reconocida la heterogeneidad de las leucemias agudas y sus implicaciones en el pronóstico^{8,30}.

El concepto de enfermedad mínima residual fue introducido para estimar el número real de células leucémicas después del tratamiento y en torno a ello mejorar el manejo y tasas de curación. El beneficio potencial de la detección de la enfermedad mínima residual durante la quimioterapia jugaría un rol importante en cuanto a su valor predictivo y subsecuente recaída, los métodos anteriormente mencionados contribuyen en la detección de blastos residuales, lo cual puede facilitar ciertas estrategias de tratamiento.^{9,11,22 y 30}

El presente trabajo tiene como objeto evaluar la evolución de pacientes con Leucemia aguda tomando en cuenta el inmunofenotipo de los blastos en el momento del diagnóstico y posteriormente al final de la fase de inducción del tratamiento respectivo.

II . MARCO TEORICO.

A. ANTECEDENTES.

El reconocimiento de la heterogeneidad de las leucemias agudas y sus implicaciones en el pronóstico ha obligado a realizar numerosos estudios incluyendo el fenotipo inmunológico de las células neoplásicas como lo demuestran estudios realizados en el Jude Children's Research Hospital^{1,4,5,19,20}

En términos generales y a pesar de estos notables progresos, los resultados no han sido igual de espectaculares en todos los casos, ya que alrededor del 10 % de los pacientes no respondieron o lo hicieron pobremente a la terapia de inducción de primera línea, es así que la valoración de ciertos factores con valor pronóstico se encuentran íntimamente relacionados con la respuesta al tratamiento, por lo tanto la identificación en la fase inicial de grupos de riesgo como lo han demostrado estudios en el período entre 1987-1991 en la ciudad de Buenos Aires, de los 10 parámetros que emplearon como factores pronósticos se identificó que solo 1 de ellas tenía verdadero valor directamente asociado (desnutrición).

Si bien la clasificación en grupos de riesgo es importante para el pronóstico, también debe tenerse en cuenta otros factores. Es evidente que los porcentajes de remisión, la mediana duración de la remisión completa y la supervivencia en los pacientes leucémicos en nuestro país son menores que los informados en países desarrollados. Son varios los factores que podrían

explicar estas diferencias . algunas expresiones de los parámetros de conducta en nuestro país, como la búsqueda precoz de atención médica, o la falta de acato de las indicaciones médicas, o el incumplimiento de las órdenes médicas, resultan francamente inadecuados.

Es así que no se ha reportado en nuestro medio estudios que permitan realizar un valoración del inmunofenotipo durante la fase de inducción del tratamiento, lo cual desde luego nos permitiría encontrar la presencia de Blastos residuales o alguna alteración genética de algún fenotipo post tratamiento¹⁹.

B. ETIOLOGÍA.

No existe una sola etiología que dé cuenta de todas las Leucemias, siendo identificados varios factores de riesgo relacionados con una incidencia aumentada, por lo que ha sido documentada en alteraciones genéticas, exposición a radiación, químicos y virus⁴.

1. HEREDITARIA.

Existe una predisposición genética; en casos de gemelos idénticos, la probabilidad de presentar leucemia es 5 veces mayor que la población general, si el otro gemelo padece la enfermedad., así mismo, ciertas enfermedades congénitas, con alteración de la cromatina (cromatina inestable), se asocian con riesgo aumentado de leucemia: Anemia de Fanconi, Sd. De Bloom, Sd. Ataxia telangectasia, Agamaglobulinemia Congénita, Sd. Down, Sd. Klinefelter^{18,21}.

2. QUÍMICOS.

La exposición a químicos esta estrechamente relacionada con un incremento en la incidencia de leucemias agudas. Es bien sabido que una exposición prolongada con benceno puede inducir a diferentes tipos de cáncer incluyendo la leucemia, así también,

el kerosén y tetracloruro de carbono, con mayor incidencia de LMA y l a exposición a tabaco y pesticidas dan un riesgo mayor de LLA²¹.

3. DROGAS.

La asociación principal, es con medicamentos usados en el tratamiento de otros cánceres, variando su incidencia y mecanismo de producción, según el tipo de droga específica.

- 1).- Agentes alquilantes (Melfalán).
- 2).- Inhibidores de topo isomerasa II: (Etoposido, Doxorrubicina).
- 3).- Inmunosupresores y factores de crecimiento: (Ciclosporina y G-CSF)^{8,21}.

4. VIRUS.

No se han establecido relaciones directas, excepto en formas raras de leucemia: el virus de Epstein-Barr, un virus ADN que se asocia al linfoma de Burkitt, Leucemia de Células peludas y Leucemia de Células T, asociadas a retrovirus identificadas con mayor frecuencia en Japón y el Caribe^{21,22}.

C. CLASIFICACION.

Se ha establecido un sistema de clasificación internacional para identificar el tipo de leucemia de acuerdo al tipo de células tumorales que se identifique, basándose en un extendido de médula ósea teñidos con Wright, que ofrece una imagen amplia de toda la arquitectura y celularidad medular, dándonos

características morfológicas con limitaciones en la precisión del diagnóstico, para el pronóstico y tratamiento; por ello, las tinciones citoquímicas y la inmunotipificación juegan un rol importante para el diagnóstico¹¹.

En recientes publicaciones se menciona la importancia de la valoración inmunofenotípica para la detección de enfermedad residual y se desea resaltar la confiabilidad de estos estudios.¹¹

En nuestro medio, el diagnóstico de leucemia se realiza por evaluación morfológica de médula ósea acompañada de caracterizaciones citoquímicas e inmunotipificación, pero no se tiene referencia de la investigación de marcadores celulares de superficie por anticuerpos monoclonales (inmunofenotipo) para evaluar la efectividad del tratamiento.²⁷

Durante años, las leucemias se han clasificado de acuerdo sólo a su aspecto morfológico y sobre la base de algunas reacciones citoquímicas, lo que no siempre lograba un diagnóstico preciso. La clasificación FAB (Franco-Americana-Británica), se basa en estas características y aunque sigue siendo la más usada o la base de las clasificaciones, el desarrollo de nuevas técnicas, como la inmunocitoquímica, citogenética y biología molecular, han permitido reconocer algunas alteraciones más específicas³⁰.

1. MORFOLÓGICA.

En el examen morfológico debe ponerse especial atención en las características del núcleo: su grado de inmadurez determinado por la finura de la cromatina, la presencia o no de nucleolos y la forma y contorno del mismo núcleo. La naturaleza de las inclusiones citoplasmáticas, particularmente

gránulos primarios o secundarios, granulación azurófila, vacuolas y cuerpos de Auer, son puntos clave en el diagnóstico. Igualmente, la proporción de citoplasma basofílico es importante para juzgar el grado de inmadurez^{21,30}.

En estudios por biopsia es de gran valor detectar el grado de celularidad y la presencia y magnitud de cambio de células normales por células neoplásicas. Además, los grados de fibrosis e infiltración de grasa son consideraciones muy importantes³².

La clasificación morfológica según el criterio FAB, tomando en cuenta las características anteriormente mencionadas se observa en el **Tabla 1 y 2**.

Tabla 1. Clasificación morfológica de las leucemias linfoblásticas agudas según

criterio FAB			
	LLA-1	LLA-2	LLA-3
FRECUENCIA	A: 31 % N:80%	A:60%/N:17%	A:9%/N:3%
MPO	NEGATIVA	NEGATIVA	NEGATIVA
TAMAÑO CELULAR	PEQUEÑO	GRANDE HETEROGENEO	GRANDE HOMOGENEO
NÚCLEO	REGULAR	IRREGULAR	REGULAR
NUCLEOS	NO VISIBLES	= ó > 1, prominente	= ó > 1, prominente
CITOPLASMA	ESCASO	VARIABLE	ABUNDANTE
BASOFILIA CITOPLASMÁTICA	LIGERA	VARIABLE	INTENSA
VACUOLAS	AUSENTES	AUSENTES	ABUNDANTES

Ref: Clinical Hematology. Theory and Procedures. Little, Brown and Company, 1987. Boston/Toronto.

Tabla 2. Clasificación morfológica de las leucemias mieloblásticas según el criterio FAB

LEUCEMIAS MIELOBLASTICAS AGUDAS.	
CLASIFICACION FAB	DESCRIPCIÓN
M0	Minimamente diferenciada: Blastos de mediano tamaño, cromatina dispersa, núcleo con uno o dos nucleolos, morfología similar a un linfoblasto.
M1	Mieloblástica indiferenciada: Sin granulación citoplasmática.
M2	Mieloblástica diferenciada. Algunas o muchas células pueden tener granulación dispersa.
M3	Promielocítica: Granulación típica de morfología promielocítica.
M4	Mielomonoblástica: morfología mieloblástica y monocítica mixta.
M5	Monoblástica: Morfología monoblástica pura.
M6	Eritroleucemia: morfología eritroblástica predominantemente inmadura: en ocasiones aspecto megaloblásticos.
M7	Megacarioblástica: Células con bordes irregulares que pueden mostrar prominencias.

Ref: Clinical Hematology. Theory and Procedures. Little, Brown and Company, 1987. Boston/Toronto.

2. METODOS CITOQUIMICOS DE IDENTIFICACIÓN CELULAR.

El estudio morfológico de las células hematopoyéticas, basado en la apreciación de las diferentes estructuras con los métodos de tinción clásicos, ha sido ampliamente rebasada por diversas metodologías en las que se estudian los elementos químicos encontrados en las células^{4,21}.

La citoquímica estudia la composición química de la célula siendo este un nexo de unión entre la morfología y la bioquímica²⁷.

La mayoría de las reacciones citoquímicas datan de 1830, siendo la primera reacción enzimática aplicada a la hematología la de las oxidasas y peroxidasas, adquiriendo un reconocido prestigio entre las células mieloides y linfoides¹³.

Los compuestos que se estudiaron a continuación se agrupan en:

- Hidratos de carbono, detectados mediante la reacción del ácido periódico de schiff o reacción de PAS.
- Enzimas oxidantes, evidenciadas mediante la reacción de las peroxidasas.
- Enzimas hidrolíticas²¹.

a. MIELOPEROXIDASA.

Enzima que en presencia de peróxido de hidrógeno oxida al clorhidrato de bencidina, pasando de su forma incolora a un derivado marrón que se localiza en los gránulos (inespecíficos) azurófilos presentes desde el estadio de mieloblasto en todas las formas evolutivas de la serie mieloide⁴.

b. REACCION DEL ÁCIDO PERYÓDICO DE SCHIFF (P.A.S).

La reacción de PAS se basa en el principio oxidante que convierte los grupos oxidrilo de los átomos de carbono adyacentes en aldehídos. Los di-aldehídos

resultantes se combinan con el reactivo de Schiff. Esta reacción tiene interés para el diagnóstico de las leucemias linfoblásticas agudas^{21,27}.

c. ESTERASA INESPECÍFICA ALFA NAFTIL ACETATO ESTERASA (ANAE).

Son esterases leucocitarias que hidrolizan un éster derivado del naftaleno, entonces se libera un compuesto naftílico que se acopla rápidamente a una sal diazónica presente en la mezcla, lo que produce un precipitado de color brillante en la zona de actividad enzimática o en sus proximidades. Esta reacción enzimática muestra gran utilidad para la identificación de las células de estirpe monocítica, tanto las más maduras (monocitos e histiocitos) como sus precursores en leucemias monocíticas y mielomonocíticas^{4,27}.

d. INHIBICIÓN DE ESTERASA INESPECÍFICA CON FNa.

Las esterasa inespecíficas son sensibles al FNa (Fluoruro de sodio) en las células de estirpe monocítica, inhibiéndose la reacción positiva en estas células en presencia de FNa, en cambio las células linfoides son resistentes y mantienen su positividad a pesar de la presencia del inhibidor²⁷.

e. ESTERASA ESPECIFICA CLOROACETATO ESTERASA.

Las esterasa leucocitarias hidrolizan un éster derivado del naftaleno. Entonces se libera un compuesto naftólico (o naftílico) que se acopla rápidamente a una sal diazónica presente en la mezcla. La reacción de la cloroacetatoestensa, utilizando AS-D es positiva en los neutrófilos y sus precursores y débil o negativa en los monocitos y sus precursores y en otras células sanguíneas^{4,21,27}.

Los marcadores citoquímicos más usados para determinar y diferenciar los blastos en las leucemias agudas se muestra en el **Tabla 7**.

3- INMUNOFENOTIPO.

Durante la ontogenia de los linfocitos B y T, estas células comprometidas adquieren y pierden moléculas de superficie, lo que representa cambios en sus funciones metabólicas y de adhesión, ocurriendo en varios estadios de la diferenciación. El proceso neoplásico que conduce a la aparición de la leucemia se caracteriza por una disregulación molecular; el resultado es un fenotipo diferente a cualquier célula normal; estas diferencias son extremadamente variables. Muchas de las funciones de estas moléculas de superficie son aun desconocidas; sin embargo, el contar con anticuerpos monoclonales dirigidos contra ellas nos permitirán su reconocimiento y la diferenciación entre las células normales y las células leucémicas. La inmunofluorescencia directa permite identificar estos marcadores.⁹

Con el empleo de anticuerpos monoclonales v/s antígenos de superficie, se observó en general que estos antígenos son los mismos de las células hematopoyéticas normales en diferenciación, pero con patrones claramente aberrantes, que es lo que finalmente las diferencia.^{22,30}

Las LLA fueron las primeras neoplasias en beneficiarse de los estudios inmunológicos, siendo clasificadas inicialmente en B, T o nulas (no-T, no B). Posteriormente el descubrimiento de un antígeno presente en el 70% de las LLA infantiles (c ALLA o CD10) permitió definir un nuevo fenotipo, " común", al

que pertenecían la mayoría de las LLA nulas. Además, todas las LLA, excepto las Ig.sup+, expresaban la enzima intranuclear transferasa terminal deoxinucleotídica (TdT). A lo largo de la década de los 80 se obtuvieron numerosos anticuerpos monoclonales que detectan los antígenos de línea linfocitoide B y T, demostrándose que la mayoría de las LLA no T- no B (comunes o nulas) son de origen B ^{1,3,30}.

En la diferenciación B, los primeros antígenos en aparecer son CD19 en la membrana y CD22 a nivel del citoplasma. Inmediatamente después o incluso a la vez aparece CD10 y más tarde CD 20. Posteriormente el linfocito B adquiere cadena pesada μ de inmunoglobulinas en el citoplasma para expresarla finalmente en la membrana. De acuerdo a estos marcadores, las LLA de origen B se clasifican actualmente en: B- precoz (CD 19+, CD22c+); común (CD10+); pre B (Ig.cit+) y B (Ig.sup+). Debe reseñarse que aunque todas son de origen B, el término LLA-B se reserva para las de fenotipo más maduro Ig sup+. ³⁰

Las LLA de origen T se dividen en cuatro grupos definidas acordando el grado de diferenciación tímica (**Tabla 9**). Las Pre-T se identifican por la expresión del antígeno CD7 en la membrana o CD3 en citoplasma que son los marcadores T más precoces. Las restantes LLA T son de origen tímico: 1) El fenotipo T- precoz se caracteriza por la adquisición de receptor para hematías de carnero (CD2); 2) a nivel de timocito cortical común la célula coexpresa los Ags CD4 y CD8 junto a CD1, mientras que 3) el timocito medular maduro expresa CD3 y CD4 o CD8, pero no los dos a la vez. Este último estadio es más propio de linfoma linfoblástico que de LLA-T. Los hallazgos inmunofenotípicos se han

intentado correlacionar tanto con la clasificación morfológica FAB como, con el patrón de reordenamiento de los genes de Ig y receptor de célula T (TCR).

Con respecto a la morfología, sólo existe correlación entre subtipo FAB-L3 y LLA-B Ig.sup+. El reordenamiento de Ig.sup.+ y TCR se asocia, lógicamente, a LLA-B y T, respectivamente; si bien en un 10 - 20 % de los casos se detectan reordenamientos cruzados, sobre todo en el caso de los genes T γ y δ . Además el reordenamiento de las Inmunoglobulinas y TCR es posterior a la aparición de los antígenos CD19, CD22c, CD7, CD30, por lo que los estudios inmunofenotípicos tienen mayor utilidad para la clasificación de las LLA.

Algunos subtipos inmunológicos se asocian con alteraciones citogenéticas específicas, lo que ha motivado un intento de clasificación integradora-morfología, inmunofenotipo y citogenética. Con respecto al valor pronóstico de la clasificación inmunológica, aunque su influencia parece haber variado, en función de la intensificación de la terapéutica de las LLA, es evidente que, con tratamientos convencionales, el fenotipo común se asocia con mejor pronóstico que el Pre-B y T y que a las LLA Ig.sup.+ les corresponde la peor evolución. Aunque existen algunas controversias, en general las LLA Pre T tienen peor pronóstico que las LLA-T.

Los primeros antígenos en detectarse en la diferenciación hematopoyética mieloide normal son CD33 y CD13. Al igual que ocurría en la linfopoyesis, CD13 se expresa primero en citoplasma y después en membrana. La expresión de alta intensidad de los antígenos CD15 y CD14 es específica de granulocitos y monocitos maduros, respectivamente; sin embargo, ambos se coexpresan en los

precursores mieloides, lo que cuestiona su utilización para diferenciar leucemias granulocíticas (M1, M2 y M3) de monocíticas (M5)^{3,9}

La glicoforina A es un marcador eritroide específico, pero aparece relativamente tarde en la eritropoyesis, por lo que muchas M6 son negativas. En cambio la diferenciación megacariocítica dispone de excelentes marcadores desde los primeros estadios de diferenciación (CD61, CD41 y CD42 que reconocen a las glicoproteínas IIIa, IIb/ IIIa y complejo IX/Ib, respectivamente) lo que les convierte en el arma clave para la detección de las leucemias megacarioblásticas (M7). De hecho, la utilidad de los anticuerpos monoclonales (Ac.Mo) en el diagnóstico de las LA se centra en las M7 y Mo (indiferenciadas) y quizá también en la variante microgranular de la leucemia promielocítica (HLA-DR+) que morfológicamente, puede plantear problemas diagnósticos con la M4 (HLA DR+), así como para distinguir las M5 de algunos linfomas leucemizados con los que pueden presentarse confusión.

En las otras variantes de LA realmente el único papel de los AcMo, salvo los estudios de investigación, es confirmar el diagnóstico morfocitoquímico. A diferencia de esto, en las LLA no existe una clasificación inmunológica de las LMA totalmente aceptada; una posible opción incluirá los siguientes fenotipos: mieloblástico (positivo sólo para MPO, CD33 y/o CD13); granulomonocítico (CD15+ y/o CD14+); eritroide (glicoforina A+) y megacariocítico (CD61+ y/o CD41+)

4. CITOGENETICA.

Se basa en la detección de alteraciones a nivel de los cromosomas, ya sea en cuanto a número (ploidía) y/o estructura (delecciones, translocaciones, etc). Sólo 2 alteraciones se han vinculado a un tipo específico de leucemia: t(15:17)= M3 o LPA; inv(16)= M4E=, ambas de buen pronóstico. Algunas alteraciones de mal pronóstico son: monosomía o delación de los cromosomas 5 y 7 o trisomía del cromosoma 8.²¹

Podemos decir que, en general las alteraciones cromosómicas asociadas a leucemias mieloides agudas corresponden a genes que codifican factores de transcripción de DNA o bien, la regulan, modificando el "destino" celular; menos frecuentemente, corresponden a alteraciones de factores de crecimiento¹¹.

En LLA 60-75 % tienen alteraciones genéticas, de ploidía o estructura, siendo el factor pronóstico más importante, ya que las características clínicas y de laboratorio de buen o mal pronóstico, se correlacionan con ellas. Por ejemplo, la t(9:22) o cromosoma Philadelphia (PA), es una alteración de mal pronóstico, encontrándose en un 5 % de las LLA infantiles; en cambio, está presente en un 25% de las LLA en adultos. Se asocia con menor porcentaje y duración de Remisión Completa (RC) y mayor compromiso del SNC (**Tabla 3**).. Al contrario, el hallazgo de hiperploidía (más de 50 cromosomas), es una alteración de buen pronóstico y está presente en un 30% de las LLA en niños, mientras que sólo se encuentra en un 2- 5% de LLA en adultos¹¹.

Tabla.3. Subtipos de leucemia aguda y alteraciones cromosómicas y moleculares.

Alteración cromosómica	Genes	Incidencia
LLA-B		
t(9;22) (q34;q11)	BCR-ABL (ARNm)	Adultos 30-35%
t(1;19)(q23;p13)	E24-PBX1(ARNm)	Niños 5- 8 %
t(4;11)(q21;q23)	MLL-F4(ARNm)	Niños aprox. 3 %
t(12;21) (p13;q22)	TEL-AML1(ARNm)	Niños aprox. 20 %
LLA-T		
TAL 1 del	SIL-TAL1(ADN)	10 –25 %
t(11;14)(p13;q11)	RHOM1-TCRD(ADN)	3 – 5 %
t(1;14)(q24;q11)	TAL1-TCRD(ADN)	1 – 3 %
t(10;14)(q24;q11)	HOX11-TCRD(ADN)	1 – 3 %
LMA		
t(8;21)(q22;q22)	AML1-ETO(ARNm)	5 – 8 %
t(15;17)(q23;q21)	PML-RARA(ARNm)	5 – 10 %
inv (i16)(p13;q22)	CBFB-MYC11(ARNm)	3 – 5 %
aberraciones 11q23	MARN de MLL aberrante	Aprox. 10 %
t(9;22)(q34;q11)	BCR-ABL(ARNm)	1 – 3 %

Ref.: Revista de la Sociedad Argentina de Hematología. Editorial Médica Panamericana. 1998. México.

D. CLINICA.

Las leucemias agudas se caracterizan por el comienzo abrupto de signos clínicos (p. ej.: infección, hemorragia y palidez) y síntomas (p. ej.: fatiga, debilidad, dolor óseo y articular) lo cual esta relacionado con un verdadero

desequilibrio homeostático de todos sus elementos celulares en la médula ósea, para posteriormente tener repercusiones sistémicas que condicionen en el huésped un estado de disfunción orgánica⁶.

Pueden existir manifestaciones inespecíficas tales como malestar general, astenia, adinamia, anorexia y pérdida de peso.⁶

La leucemia aguda se considera como una verdadera enfermedad monoclonal con crecimiento celular logarítmico que al momento del diagnóstico alcanza una carga celular de 1×10^{12} (1kg de células leucémicas), de la estirpe específica del tipo de leucemia de que se trate. Esta situación condicionará el cese y alojamiento de los elementos (incluyendo precursores celulares) formes en la médula ósea, así como, una infiltración de las células leucémicas fuera de la médula ósea incluyendo las gónadas, sistema nerviosos central y cualquier otro sitio de la economía del huésped. Por otro lado, el índice de proliferación y destrucción de las células malignas será elevado produciendo alteraciones tanto electrolíticas, metabólicas y hematológicas como la anemia, neutropenia y trombocitopenia (75% menor a $100 \times 10^9 / L$, con un 25 % en un rango severo menor a $25 \times 10^9 / L$), e infecciosas.^{6,20,21,}

En cuanto a los hallazgos de laboratorio, destacan anemia, de mayor o menor cuantía, generalmente normocítica - normocrómica y una eritropoyesis infecciosa con disminución del recuento de reticulocitos.²²

En promedio el recuento de glóbulos blancos se encuentra alrededor de $15 \times 10^9 / L$, aunque un 25-40% lo tiene menos a $5 \times 10^9 / L$; 20% de los pacientes, se presentan con recuentos mayores a $100 \times 10^9 / L$ y menos del 5 % tiene lo

que se conoce como leucemia "aleucémica", es decir sin blastos en la periferie^{4,20,21}. La presentación clínica de un paciente con LMA es inespecífica y refleja la producción disminuida de los elementos normales de la médula ósea. La mayoría de los pacientes presenta un recuento total de leucocitos entre $5 \times 10^9/L$ y $30 \times 10^9/L$, pero puede ser tan bajo como $1 \times 10^9/L$ o tan alto como $200 \times 10^9/L$. En el 90 % de los pacientes se hallan Mieloblastos en sangre periférica, estos y otros hallazgos se describen en la siguiente tabla.

Tabla 4. Hallazgos clínicos al momento del diagnóstico.

CARACTERISTIC A	LINFOBLÁSTICA AGUDA	MIELOBLÁSTICA AGUDA
Edad de máxima incidencia	Infancia	Cualquier edad
Concentración de leucocitos	A en 50% N o B en 50 %	A en 60% N o B en 40 %
Fórmula leucocitaria	linfoblastos	Mieloblastos
Anemia	En >90%	En >90 %
Plaquetas	Elevadas	Elevadas
Linfadenopatía	B en >80%	B en > 90%
Esplenomegalia	Frecuente 60 %	Esporádica 50 %
Otras características	Afección del SNC en el 50 % tras 1 año	Rara afección del SNC. Pueden observarse bastones de Auer

A = Alto, N = Normal, B = Bajo

Ref: **Clinical Hematology. Theory and Procedures.** Little, Brown and Company, 1987. Boston/ Toronto.

E. EVALUACIÓN PRE-TRATAMIENTO.

Una vez realizado el diagnóstico de leucemia aguda, hay una serie de consideraciones a tomar previo al inicio del tratamiento con quimioterapéuticos⁹.

Deben realizarse estudios para establecer el subtipo de leucemia, caracterizándola lo mejor posible, ya que como hemos señalado, incide de forma directa en el tipo de tratamiento a emplear y en la probabilidad de supervivencia del paciente^{11,31}.

Es conveniente evaluar la integridad y función de los sistemas cardiovascular, pulmonar, hepático y renal ya que varias de las drogas utilizadas en la quimioterapia tienen efectos deletéreos sobre ellos. Asimismo, se recomienda obtener y criopreservar muestras celulares de médula ósea y sangre periférica de los pacientes.³¹

Debe descartarse la presencia de infección y tratarse ésta de encontrarse, antes de iniciar cualquier tratamiento¹⁸.

En casos en que sea necesario (anemia severa, hemorragias importantes), pueden realizarse transfusiones de glóbulos rojos, plaquetas o plasma¹⁹.

El 50% de los pacientes tiene hiperuricemia al momento del diagnóstico, alcanzado niveles significativos en un 10%; esto aumenta con la quimioterapia, lo que podría desencadenar en una nefropatía severa. Por esto, se recomienda

hidratar en forma importante a los pacientes previo a la quimioterapia, el uso de Alopurinol (300-600 mg/día) y alcalinizar la orina²⁰.

F. FACTORES DE RIESGO PARA LEUCEMIA AGUDA.

Ciertas características clínicas y biológicas de la L.A. influyen en la respuesta al tratamiento y en la prolongación de la vida, estas características son factores de riesgo que deben ser conocidos y mediante ellos cambiar los esquemas terapéuticos lo que llevará a mejorar la respuesta y alcanzar remisión Completa de la enfermedad, lo que significa obtener recuentos leucocitarios mayores o iguales a $1.5 \times 10^9/L$, plaquetas mayor a $100 \times 10^9 /L$, ausencia de blastos periféricos. En cuanto a la médula ósea conseguir una maduración trilinear mayor al 20 % y recuentos menores del 5 % de blastos.²¹

Todo esto debe mantenerse por un plazo mínimo de 4 semanas, para considerarse Remisión Completa (RC)¹⁹.

Debe realizarse inmunofenotipo y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar enfermedad residual, ya que si bien estas técnicas aún no están consideradas dentro del diagnóstico de RC, son tremendamente importantes a la hora de decidir incrementar el tratamiento y/o predecir la duración de Remisión Completa y por ende una eventual recaída³⁰.

G. TRATAMIENTO.

Tanto en la LMA como en la LLA, el tratamiento se basa en quimioterapia y las drogas se administran de acuerdo a protocolos establecidos. En todos ellos,

existe una fase de Inducción, cuyo objetivo es lograr la RC y fase de consolidación e intensificación, que da cuenta de la sobrevida libre de enfermedad, ya que sin ella la mayoría de los pacientes recae en un tiempo promedio de 4 meses, por lo cual la profilaxis y la fase de mantenimiento post tratamiento juegan un rol importante⁹.

1. TRATAMIENTO DE LA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DEL ADULTO.

La leucemia aguda linfoblástica (LLA) se caracteriza por una proliferación maligna y acumulación de células linfáticas inmaduras en la médula ósea, la sangre periférica y los órganos linfáticos⁹.

Estos blastos leucémicos muestran diferentes inmunofenotipos que reflejan en especial en la LLA de linaje B con un alto grado de diversidad genotípica evidenciando una patogénesis de la enfermedad en la que están involucradas múltiples vías moleculares, lo que se traduce en una respuesta diferente a los esquemas de quimioterapia "estándar"^{9,31}.

En la LLA del adulto se consigue hasta un 80 % de remisión completa, asociado al tratamiento en la fase de inducción con vincristina, prednisona y daunuromicina, durante 4-6 semanas. La adición de asparaginasa no supone ventaja alguna, según algunos autores¹⁵.

Como alternativa válida a la profilaxis neuromeníngea citada, cabe referir la administración de metotrexato intratecal durante la fase de inducción y posteriormente mensual durante la fase de mantenimiento.⁴La profilaxis neuromeníngea supone una reducción significativa de las recidivas en el SNC⁴.

La mayor parte de los autores preconizan curas de reinducción con vincristina, prednisona, daunuromicina y citarabina.⁴

a. AVANCES EN EL MANEJO DE LA LEUCEMIA AGUDA LINFOBLÁSTICA DEL ADULTO.

En un informe reciente, se menciona que antes de 1990, con los protocolos o esquemas "estándar", se obtenían 68 % de RC tanto en el grupo con alteraciones citogenéticas de mal pronóstico como en el de alteraciones misceláneas, con una remisión completa continua (RCC) a 5 años de 0 y 0,30 respectivamente. A partir de 1990, se intensificó la inducción de la remisión, añadiendo ciclofosfamida y L- asparaginasa, con lo que la remisión completa aumento el 82 % y 88% respectivamente, con una RCC a 5 años de 0,13 y 0,57 para los dos grupos. El impacto se observó en el grupo con alteraciones genéticas misceláneas y no en el grupo de alto riesgo, en el que, el trasplante alogénico de médula ósea (TMO-A) o de células totipotenciales hematopoyéticas (CTH) ofrece las mejores posibilidades, con una RCC de 25 a 45%.

En los pacientes que no cuentan con un donador compatible o no pueden ser sometidos al TMO se están ensayando estrategias novedosas, aún por probar, como la IL-4, que parece tener un efecto inhibitorio sobre las células con la t (9;22). El mesilato de imatinib (STI 571, Glivec), inhibidor sintético de la cinasa de tirosina, un potente inhibidor selectivo de la actividad e tirosina cinasa de BCR / ABL, que en un estudio reciente de Brian Druker y Moshe

Talpaz indujo 70% de respuestas hematológicas y 20 % de remisiones completas en un grupo de 20 pacientes con crisis blásticas linfocíticas de LGC o LLA con t (9:22)⁹.

b. MODIFICADORES DE RESPUESTA CELULAR:

Las sustancias que se producen en forma natural en el cuerpo humano y se utilizan para ayudar a tratar el cáncer se denominan modificadores de respuesta biológica (MRB), utilizado en el apoyo de pacientes que reciben tratamiento quimioterapéutico es el factor estimulador de colonias (CSF), para estimular la producción y la maduración rápida de las líneas celulares blancas de la sangre.¹³

Otro MRB importante es el interferón alfa. La experiencia clínica mostró que puede inducir remisiones en la leucemia células pilosas, la leucemia y el linfoma de células B, y leucemia mieloide crónica (LMC).¹⁰

En teoría los MRB serían los tratamientos del cáncer más apropiados, podrían atacar la células malignas en forma selectiva sin afectar células normales. Dado que estos compuestos biológicos derivan de seres humanos y otras fuentes animales, podrían minimizar en gran parte los efectos colaterales potencialmente fatales y molestos. El problema fue que los MRB utilizados para tratar el cáncer no son lo suficientemente tóxicos para el tumor, y por eso, se observan recidivas. Durante la investigación con MRB aparecieron muchas dificultades, si bien el futuro aún es promisorio con respecto a los interferones, las interleucinas y los factores de crecimiento⁶.

2. TRATAMIENTO ESTANDAR DE LA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA DEL ADULTO.

En los últimos 20 años la investigación clínica del tratamiento de la leucemia mieloide aguda (LMA) se ha centrado principalmente en incrementar la dosis de fármacos citotóxicos con el objetivo de hacer máximo el efecto de producir la muerte de las células leucémicas. Aunque estas formas de tratamiento han incrementado el porcentaje de curación en poblaciones seleccionadas, también se asocian con toxicidad en forma temprana o tardía, y adicionalmente los enfermos considerados con mal pronóstico difícilmente se curan. El factor pronóstico más importante para determinar el efecto final del tratamiento son las alteraciones cromosómicas adquiridas de las células leucémicas que ha permitido junto con otros datos subdividir a la LMA en tres grupos de pronóstico tales como favorable, estándar (intermedio) y no favorable. A continuación se revisa el abordaje clásico del tratamiento de la LMA con quimioterapia⁹.

a. INDUCCIÓN DE REMISION.

Los estudios clásicos del Grupo B de Cáncer y Leucemia condujeron al desarrollo del tratamiento de inducción estándar con arabinosido de citosina (Ara C) 100 mg /m² en infusión continua por 7 días y daunorrubicina 45 mg/m² por 3 días consecutivos que conduce a una RC en aproximadamente 64 % de los pacientes. La mediana de duración de RC fue de 8-12 meses y la mediana de supervivencia de 9-16 meses. El grupo ECOG informó la supervivencia global

(SG) de 1414 pacientes con LMA que fueron incluidos en 5 estudios clínicos donde 62 % logró RC pero 76% recayeron o murieron. Así la supervivencia global para todos los pacientes a 5 años es tan sólo de 15 %, de 9 % a 33 % para pacientes menores de 55 años y de 6 a 15 % para pacientes mayores de 55 años. Los intentos para mejorar el esquema tales como prolongar Ara-C a 10 días o aumentar la dosis de Ara C de 100 mg/m² por día a 200 mg/m² no han mejorado la eficacia de del esquema en estudios con controles.⁹

Otros fármacos que han sido probados en el tratamiento de inducción son amsacrina, aclarubicina y mitoxantrona. Todos estos agentes han mostrado ser superiores o por lo menos mostrar tendencia a ser mejores cuando se comparan con daunorrubicina. En recientes estudios agregan el etopósidos en la inducción convencional o bien a altas dosis de Ara-C con daunorrubicina prolongada la duración de la remisión completa y la supervivencia libre de enfermedad además de ser un esquema relativamente bien tolerado.⁹

En la actualidad están en curso estudios para probar la eficacia de tratamientos de inducción intensificados tal como adicionar dosis altas de Ara C durante tres días inmediatamente después de la inducción estándar para explotar el potencial de reclutar las células leucémicas en ciclo celular y evitar la administración de un segundo ciclo de inducción para pacientes con leucemia residual después del primer ciclo.⁹

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La valoración morfológica y citoquímica se han convertido en una herramienta útil para el diagnóstico diferencial de enfermedades hematopoyéticas, no obstante con el desarrollo de tecnologías nuevas como la evaluación de marcadores de superficie y las técnicas de alta resolución para las pruebas citogenéticas, han permitido una mejor caracterización de las leucemias y realizar tratamientos dirigidos a los diferentes fenotipos para conseguir una remisión completa, pero a pesar de estos avances los resultados no han sido igual de espectaculares, esto debido a que podrían recaer debido a la persistencia de un pequeño número de células malignas que no son detectables por evaluación morfológica convencional post quimioterapia.

Considerando como toda técnica sus limitaciones y sensibilidad, las técnicas morfológicas y citoquímicas pueden detectar 1 blasto de cada 100 células (10^2), y si comparamos con la inmunotipificación esta técnica nos permite la detección de 1 blasto de cada 1000 células (sensibilidad = 10^3)¹², lo cual nos permitirá al momento de valorar muestras de médula ósea en aplasia, determinar de forma más precisa la presencia de blastos residuales.

Es por esta razón que planteamos en este trabajo la utilización de la técnica de inmunotipificación como instrumento para la evaluación de la fase de Inducción del tratamiento de pacientes con LA.

IV. JUSTIFICACIÓN.

Los grandes avances en el éxito del tratamiento de leucemia comprenden un período de 50 años, durante el cual ha dejado de ser una condición uniformemente fatal, para constituirse en una enfermedad con una tasa de curación entre 65 % y 75 % en los países desarrollados.⁶

Los programas realizados en la década de 1990 con relación a la caracterización molecular, cariotipo e inmunofenotipo de los blastos leucémicos han mejorado la comprensión de la biología de la leucemia aguda y han refinado los criterios de clasificación de riesgo, lo cual permite la asignación adecuada de los pacientes a diferentes esquemas de tratamiento. La combinación de estos avances, sumada a la continua mejoría en las medidas de soporte, han producido la tasa de curación mencionada^{9 y 23}.

Sin embargo, en países en vías de desarrollo como el nuestro, las limitaciones económicas y las políticas de salud no han permitido implementar en todos los centros la infraestructura necesaria para brindar el manejo óptimo a estos pacientes lo cual se traduce en tasas de curación más bajas y una sobre-vida más corta¹¹.

Los métodos inmunológicos nos ayudan a la clasificación precisa de las LA y posteriormente determinar el grado de enfermedad mínima residual posterior a la fase de inducción del tratamiento de la remisión clínica. Los pacientes evaluados mediante inmunotipificación, que presentan remisiones inmunológicas en los que es posible detectar hasta un 0,01 % de células leucémicas del total

de células nucleadas de la médula ósea lograrían mejores resultados clínicos que aquellos en los cuales la remisión se basa únicamente en criterios morfológicos, que permite detectar solamente hasta 5 % de células leucémicas, lo que representa una masa tumoral importante. Por lo recién expuesto es que se plantea utilizar la inmunotipificación como método para evaluar la fase de inducción en el tratamiento de leucemia aguda, ya que hasta el momento en nuestro medio se utiliza principalmente la evaluación morfológica.¹⁰

IV. OBJETIVOS:

A. OBJETIVO GENERAL:

- Evaluar la presencia de marcadores inmunofenotípicos presentes en los blastos de pacientes con leucemia aguda durante el diagnóstico y post fase de inducción del tratamiento.

B. OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- Determinar la posible modificación post quimioterapia de inducción, de los marcadores de las células blásticas identificados en el diagnóstico inicial por inmunotipificación.
- Determinar la eficiencia de los parámetros morfológicos y citoquímicos en la evaluación de la fase de inducción del tratamiento de leucemia aguda.

VI. MATERIAL Y METODOS.

A. TIPO DE ESTUDIO.

Es un estudio descriptivo de serie de casos

B. PACIENTES.

Este estudio fue realizado inicialmente en 14 pacientes con Leucemia Aguda, tratadas en el Hospital de Clínicas, Hospital Obrero y Hospital Militar "COSMIL", durante un período de 2 años (Marzo de 2001 a Enero de 2003).

El diagnóstico fue basado sobre parámetros morfológicos, citoquímicos e inmunofenotípicos.

Todos los pacientes que llenaron los criterios clínicos y de laboratorio para leucemia aguda fueron elegibles independientemente de las características de presentación.

Se diagnosticaron inicialmente 14 pacientes de los cuales 8 casos presentaron LLA y 6 casos LMA.

Al final del estudio reportamos a los cuatro casos con LLA que culminaron la fase de inducción y que fueron valorados mediante estos 3 parámetros.

C. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y DE EXCLUSIÓN.

Ciertas características clínicas y biológicas de la leucemia aguda influyen en la respuesta al tratamiento y en la prolongación de la vida, estas características son los factores de riesgo que deben ser conocidas siendo de importancia y valor pronóstico.

Se excluyeron a aquellos pacientes que no completaron el tratamiento hasta llegar a la fase de inducción.

Los pacientes se clasificaron en 3 grupos alto, intermedio y bajo riesgo de acuerdo con los criterios universalmente conocidos (Tabla 5 y 6).

De acuerdo a estos criterios, el tipo LLA- Pre B, así como las variedades MO, M5, M6 y M7 serán incluidos en grupos de alto riesgo. Se consideraron de riesgo Intermedio a los que compartían factores favorables (el fenotipo) y factores de riesgo desfavorables (la edad, sexo y recuento de leucocitos) al momento del diagnóstico

Los demás pacientes se consideraron de bajo riesgo para leucemia aguda.

Tabla 5. FACTORES PRONOSTICO Y GRUPOS DE RIESGO EN ADULTOS PARA LEUCEMIA LINFOCITARIA AGUDA		
FACTORES	FAVORABLES	DESFAVORABLES
EDAD	11 a 30 años	Mayor a 30 años
SEXO	FEMENINO	MASCULINO
Magnitud y distribución de la carga tumoral -Leucocitosis -Visceromegalias "masivas"	-Menor a $30 \times 10^9/L$ -Ausente	-Mayor a $30 \times 10^9/L$ -Presente
CLASIFICACIÓN CITOMORFOLÓGICA	FAB L1	FAB L2 Y L3
CLASIFICACIÓN INMUNOLÓGICA	LLA "COMUN" O NULA	LLA B – T
ESTADO NUTRICIONAL AL DX.	Normal	Deficiente

Ref: Clinical Hematology. Theory and Procedures. Little, Brown and Company, 1987. Boston / Toronto.

Tabla 6. Factores pronóstico y grupos de riesgo en adultos para Leucemia Mieloblástica Aguda.

FACTORES PRONOSTICO Y GRUPOS DE RIESGO EN ADULTOS PARA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA.		
FACTORES	FAVORABLES	DESFAVORABLES
EDAD	11 a 30 años	Mayor a 30 años
SEXO	FEMENINO	MASCULINO
Magnitud y distribución de la carga tumoral -Leucocitosis -Recuento de plaquetas	-Menor a $100 \times 10^9/L$ -Mayor a $25 \times 10^9/L$	-Mayor a $100 \times 10^9/L$ -Menor a $25 \times 10^9/L$
CLASIFICACIÓN CITOMORFOLÓGICA	FAB M1, M2	FAB 0M, M5.M6 Y M7
ESTADO NUTRICIONAL AL DX.	Normal	Deficiente

Ref.: Revista de la Sociedad Argentina de Hematología. Editorial Médica Panamericana. 1998. México.

D. VALORACIÓN MORFOLÓGICA.

La valoración morfológica de las muestras de médula ósea y sangre periférica fueron llevadas a cabo independientemente del diagnóstico laboratorial, evaluación que fue realizada por médicos oncohematólogos de cada centro, los cuales clínica y laboratorialmente asignaban a diferentes tipos de Leucemia aguda.

La clasificación morfológica se realizó de acuerdo con los criterios FAB asignando las categorías M0-M7 y L1 - L3.

E. VALORACIÓN CITOQUIMICA.

A partir de los extendidos de sangre periférica y/o médula ósea, determinamos los perfiles citoquímicos que no solo ayudó a definir el diagnóstico, sino que además nos oriento a establecer la identidad de la población neoplásica (Tabla 7).

Tabla 7. Comparación del patrón citoquímico en Leucemia Aguda.

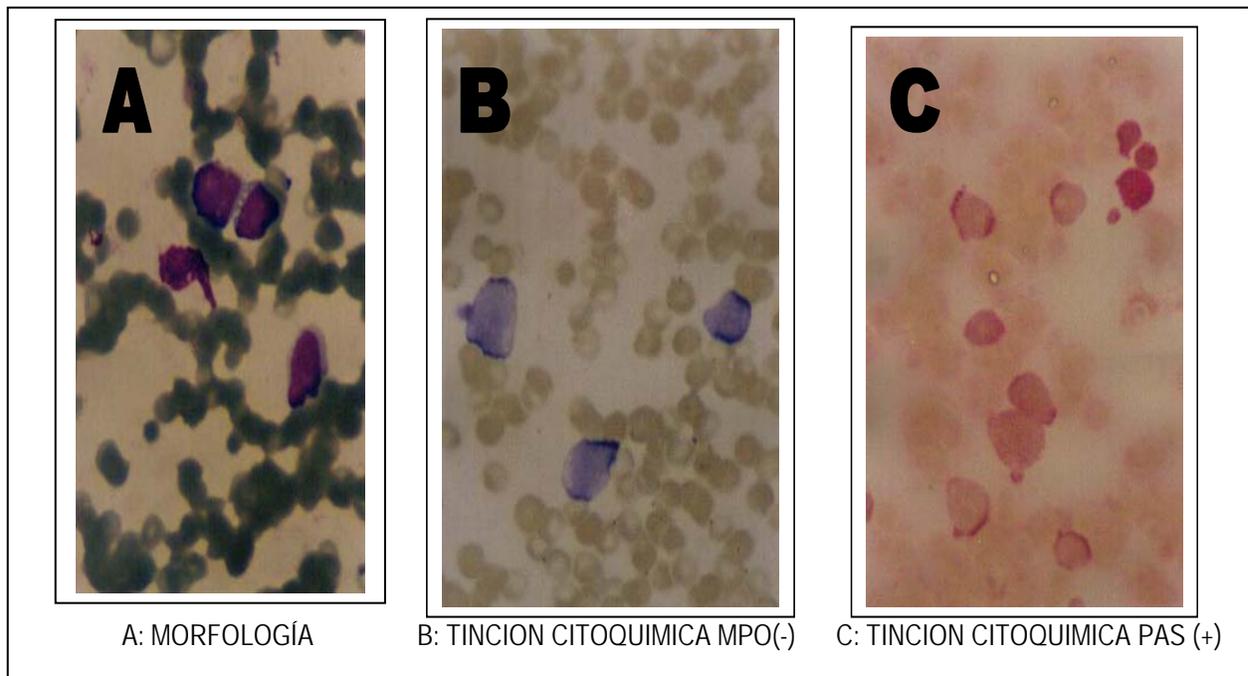
TINCIONES CITOQUIMI C-AS	CLASIFICACION FAB									
	IDENTIFICACIÓN DE ACUERDO AL LINAJE	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	L1oL2 (LLA-T)
MPO	La reacción de la peroxidasa es positiva las células inmaduras (blastos) de estirpe mieloide	-	+	++		+/-	+/-	-	(+) ^a	-
SB	Identifica gránulos azurófilos específicos e inespecíficos de los neutrófilos(serie mieloide)	-	+	++	-	+/-	+/-	-	-	-
PAS	De Interés para el diagnóstico de LLA observándose bloques o agregados fuertemente teñidos.	-	-	-	-	-	-	+	+	+/-
PA	Diferencia blastos de células T de blastos de células o-T en la LLA,		-	-		-	-	-	-	(++) ^b
ANAE	Diferencia los precursores de neutrófilos de los monitos y sus precursores en LA	-	-	-		++	++	+++	+++	-
NASDCA	Las reacciones de cloroacetatoesterasa son similares a las del negro Sudan B y MPO de las leucemias agudas	-	-	+		+/.	-	+	+	-

SB= Sudan Black B, MPO = Mieloperoxidasa, NASDCA= naftol AS-D cloroacetato esterasa, ANAE= alfa naphthyl acetato esterasa, PA= Fosfatasa ácida, PAS= Ácido periódico de Schiff.
 NOTA. Reacciones negativas para todos los exámenes, excepto para el PAS, es indicativo común para la leucemia linfoblástica aguda, pre B o leucemia linfoblástica cell-B, o leucemia linfoblástica aguda no clasificada.

Ref: Clinical Hematology. Theory and Procedures. Little, Brown and Company, 1987. Boston/ Toronto

Las valoraciones morfológicas como citoquímicas fueron realizadas en todos los pacientes con sospecha de leucemia aguda, estos parámetros fueron de utilidad para la designación del tipo de leucemia pre tratamiento y fueron corroboradas por inmunotipificación para la designación de los subgrupos de LA.

Fig. 1. A: Valoración morfológica, B: tinción citoquímica reacción MPO(-) ,
C: PAS(+).



F. INMUNOTIPIFICACIÓN.

Las células mononucleares fueron aisladas de las muestras de sangre periférica o médula ósea por centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll- Hypaque (densidad = 1.077 g / cm^3), la suspensión de células fue ajustada con buffer fosfato salino pH = 7,2 0,15M.

Se examinaron los marcadores de superficie por inmunofluorescencia indirecta, técnica que usa el isothiocyanato de fluoresceína F(ab')₂ conjugado con una IgG de cabra anti-ratón como reactivo secundario. (Anexo 5)

Se empleó el siguiente panel de anticuerpos monoclonales para su inmunotipificación:

Tabla. No.8. Clasificación inmunológica de las Leucemias Linfoblásticas Linaje B.

LLA - B	M a r c a d o r e s					
	CD 19	CD22c	CD10	Ig c-μ	Ig s	TdT
B -I (pro-B)	+	+	-	-	-	+
B-II (común)	+	+	+	-	-	+
B-III (Pre-B)	+	+	+	+	-	+
B- IV (B maduro)	+	+	+/-	-	+	-/+

Ref.: Revista de la Sociedad Argentina de Hematología. Editorial Médica Panamericana. 1998. México.

Tabla. No. 9. Clasificación inmunológica de las Leucemias Linfoblásticas Agudas linaje T.

LLA - T	M a r c a d o r e s							
	TdT	CD7	CD3c	CD2	CD3s	CD1	CD4	CD8
T-I (pro T)	+	-	+	-	-	-	-	-
T-II (pre-T)	+	+	+	+	-	-	-	-
T-III (cortical T)	+	+	+	+	-	+	+	+
T-IV(T maduro)	+	+	+	+	+	-	+/-	0-/+

Ref.: Revista de la Sociedad Argentina de Hematología. Editorial Médica Panamericana. 1998. México.

Estos marcadores se emplearon para asignar los diferentes sub tipos de LLA y en algunos casos descartar sospecha de leucemia aguda, marcadores que de igual forma fueron utilizados post fase de inducción para determinar la presencia de blastos residuales.

Los marcadores empleados para tipificar LMA se mencionan en la siguiente tabla:

Tabla 10. Clasificación inmunológica de Leucemias Mieloides Agudas.

CLASIFICACION DE LEUCEMIAS	INMUNOFENOTIPO
LMA (M0) MIELOIDE MINIMAMENTE DIFERENCIADA	CD13,33 y/o anti-MPO +, CD3, 22,79 ^a -; CD34, HLA-DR+; CD11b,14+/-,TdT+ (33%).
LMA (M1) MIELOBLASTICA SIN MADURACION	Marcadores mielomonocíticos (CD13,33,65 y/o 117) otros marcadores sin especificidad mieloide (HLD-DR, CD34, CD7, CD4, CD15, CD11b, CD11c).
LMA(M2) MIELOBLASTICA CON MADURACION	CD19+,TdT +
LMA (M3) PROMIELOCITICA	HLA-DR (-) 75% , CD 34 (-/+ , CD33+,CD13+,CD15+,CD2+
LMA (M4) MIELOMONOCITICA	CD14,CD15,Cd4,CD11b,CD11c, CD13 y CD33 (+).
LMA (M5)MONOCÍTICA	CD14,CD15,CD4,CD11b,CD11c, y CD68 junto a CD1 y CD33.
LMA (M6)ERITROBLÁSTICA	CD 13 +,CD33+, anti-MPO+,CD34+/-, HLA-DR II +/-.
LMA (M7)MEGACARIOBLASTICA	Marcadores linfoides, TdT, CD34, HLA-DR II (-) , Marcadores mieloides CD13 y 33+ (33%); MPO (-).

Ref: Clinical Hematology. Theory and Procedures.Little,Brown and Company,1987. Boston/ Toronto.

G. TRATAMIENTO.

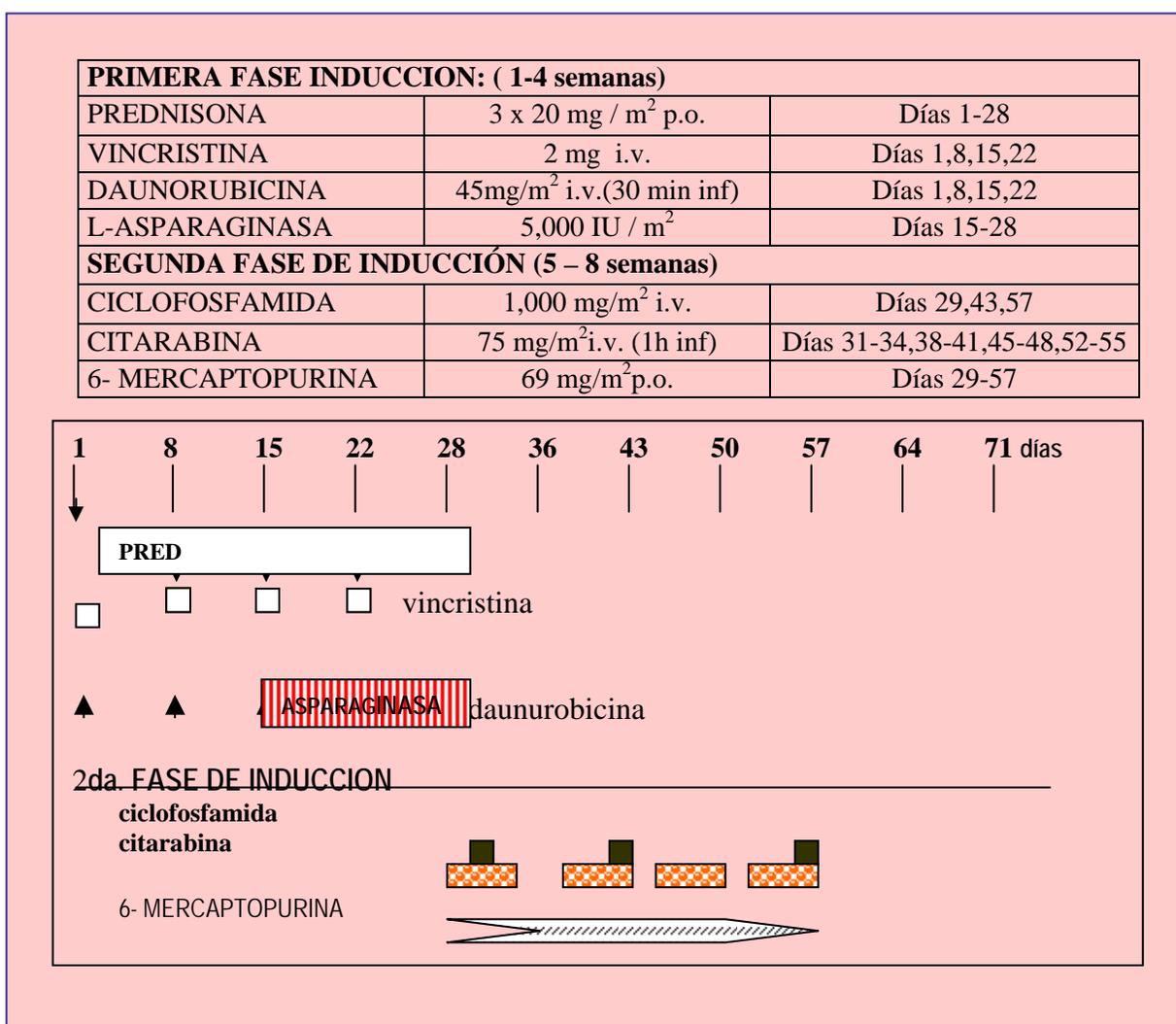
Una vez confirmado el diagnóstico los pacientes se hospitalizaron y se asignaron a diferentes protocolos de quimioterapia según la clasificación de riesgo.

A los pacientes que evidenciaron respuesta adecuada se les dio de alta y continuaron su terapia en forma ambulatoria y se los evaluó mediante consulta control. Se realizó un frotis de médula ósea mediante punción lumbar para verificar la presencia de blastos y respuesta al tratamiento o bien para intensificar el mismo.

Actualmente se trata formas LLA linaje B con un régimen corto de tiempo basado en altas dosis de ciclofosfamida, metotrexate y citarabina, para otros subtipos de LLA el tratamiento esta compuesto de varias fases.

La fase de inducción de la quimioterapia usualmente incluye vincristina, glucocorticoides (ej: prednisona o dexametasona) y una antraciclina (ej: daunorubicina o Doxorubicina) con o sin L-asparaginasa (también PEG-asparaginasa), citarabina, ciclofosfamida, metrotexate, 6-mercaptopurina o Etoposido (Tabla 11).

Tabla 11. Protocolo de tratamiento para leucemias linfoblásticas Agudas



Ref. Hematología Clínica. Doyma. 1998. Barcelona-España.

1. FASE DE CONSOLIDACIÓN E INTENSIFICACIÓN:

Metotexate	1,500 mg/m ² i.v. (cont inf) con ácido fólico	Días 1+15
L-asparaginasa	10,000 IU/m ² i.v. (1 h inf)	Días2+16
6-mercaptopurina	25 mg/m ² p.o.	Días 1-5, 15-19

2. FASE DE MANTENIMIENTO:

6- mercaptopurina	60 mg/m ² /d p.o.	Diariamente
metotrexate	20 mg/m ² i.v.(o p.o.)	Semanalmente

H. DEFINICIONES.

Se definió remisión completa (RC) por evaluación morfológica convencional, así como por inmunotipificación cuando se encontró menos del 5 % de blastos en el aspirado de médula ósea, realizado a los 28 días (fin de la fase de Inducción), con evidencia de regeneración normal de las células hematopoyéticas y ausencia de signos y síntomas clínicos de leucemia.

Se definió remisión sostenida (RS) cuando el paciente permaneció en RC hasta el momento de finalizar el estudio(5 meses después).

Se definió recaída de médula ósea como la reaparición de los signos clínicos y / o laboratoriales relacionados con leucemia después de haber logrado remisión completa, confirmada por la presencia de más del 5 % de blastos en el aspirado de médula ósea, determinada morfológica e inmunofenotípicamente..

Se definió además 3 tipos de eventos: recaídas durante el tratamiento o después de haberlo realizado, no-respuesta a la inducción y muertes en remisión.

VII. RESULTADOS.

A. CARACTERÍSTICAS DE PRESENTACIÓN DE LOS PACIENTES AL MOMENTO DEL DIAGNOSTICO.

Los pacientes que fueron estudiados en el presente trabajo se describen en la siguiente tabla, sin embargo, solo 4 pacientes fueron incluidos en el seguimiento.

Tabla 12. Presentación de los pacientes al momento del diagnóstico.

No. pacientes	Ed.	Sexo	Lugar de procedencia	Recuento de células en el Dx.		Tipo de LA	Grupo de riesgo
				<30 000 cel/mm ³	>30000 cel/mm ³		
1	32	F	Hosp. Gral.	----	*	LLA BII	Intermedio
2	39	M	Hosp. Gral.	----	*	M2	Intermedio
3	31	F	Hosp. Gral.	----	*	Pre B(BIII)	Alto
4	27	M	Hosp. Gral.	----	*	M2	Intermedio
5	40	F	Hosp. Gral.	----	*	MO	Alto
6	39	F	Hosp. Gral.	----	*	LLA BII	Intermedio
7	50	M	Hosp. Gral.	----	*	MO	Alto
8	45	M	Hosp. Gral.	----	*	M2	Alto
9	52	M	Hosp.Obrero	----	*	M0	Alto
*10	74	F	Hosp. Obrero	*	----	LLA BII	Alto
11	26	M	Hosp. Gral.	----	*	LLA BII	Intermedio
*12	22	M	Hosp. Gral.	*	----	LLA BII	Bajo
*13	40	M	Hosp. Gral.	*	----	LLA BII	Bajo
*14	27	M	COSMIL	*	----	LLA BII	BAjo

* Pacientes que concluyeron la Fase de Inducción

FUENTE: Instituto de Diagnóstico en Salud SELADIS.

Los pacientes con LLA fueron clasificados de acuerdo a los criterios EGIL (*European Group of Immunological Classification of Leukemias*), se reportaron 7 casos con LLA tipo BII común (CALLA) , 1 del tipo Pre B (B III), pacientes que presentaron el siguiente perfil (Tabla 13)

Tabla 13. Panel de marcadores para caracterizar leucemia linfoblástica tipo B II o

Común.

MARCADOR	LLA PRO-B (B-I)	LLA COMUN (B-II)	LLA PRE-B (B-III)	LLA BMADURA (B-IV)
HLA-DR	+	+	+	+
TDT	+	+	+	-
CD19	+	+	+	+
CD22	+	+	+	+
CD10	-	+	-	-
CD3	-	-	-	-
CD7	-	-	-	-
CD1a	-	-	-	-
IgM	-	-	+c	+sup
CD4	-	-	-	-
CD8	-	-	-	-
CD13	-	-	-	-
CD14	-	-	-	-
CD33	-	-	-	-
CD34	-	-	-	-

Pacientes diagnosticados con leucemia mieloblástica aguda fueron: 3 del tipo M2, y 3 del tipo M0.

Alrededor del 71 % de los pacientes no respondieron o lo hicieron muy pobremente a la terapia de inducción de primera línea, nunca entraron en

remisión y fallecieron rápidamente y cerca del 21 % de quienes respondieron en un principio terminaron, más tarde o más temprano, con recidiva de su proceso leucémico encontrándose en fase de aplasia medular (pancitopenia) prolongada post inducción y fallecieron a pesar del empleo sistemático de esquemas terapéuticos similares o idénticos a los de pacientes curados⁹.

Tomando en cuenta las características de presentación al momento del diagnóstico se asignó al grupo de bajo riesgo a 3 pacientes, al grupo de alto riesgo a 6 pacientes y 5 de riesgo intermedio, los que presentaron recaídas o muerte después de los 3 meses de iniciado el tratamiento, no respondiendo así a la fase de inducción, por ello, reportamos en la siguiente tabla a los pacientes 10,12,13 y 14 que respondieron a la fase de inducción.

Tabla 14. Pacientes incluidos en la evaluación de la fase de inducción al momento del diagnóstico.

PACIENTE No.	EDAD(años)	GENERO	RECUESTO DE LEUCOCITOS	ASPIRADO MEDULAR	CITOQUIMICA	INMUNOFENOTIPO LLA BII
10	74	F	4 100 /mm ³	INFILTRACIÓN MEDULAR DE ELEMENTOS INMADUROS 30%	MPO (-) PAS(+)40%	CD10+, CD19+ y TDT+.
12	22	M	27 000 /mm ³	M.O . HIPERCELULAR CON INFILTRACIÓN DE ELEMENTOS INMADUROS 75% (Linfoide)	MPO (-) PAS(+) 94 %	HLA-DR ⁺ , CD19 ⁺ ,CD10 ⁺ ,CD3 ^{+/+} , IgM ^{+/+} ,CD34 ^{+/+} (escasa o nula exp).
13	40	M	26 000 /mm ³	M.O. HIPERCELULAR CON INFILTRACIÓN DE ELEMENTOS INMADUROS 50% (Linfoide)	MPO (-) PAS(+)21%	HLA-DR ⁺ , CD19 ⁺ , CD10 ⁺ ,CD22 ⁺ , Ig M ^{+/+} .
14	27	M	17 000/mm ³	M.O. HIPERCELULAR CON INFILTRACIÓN DE ELEMENTOS INMADUROS 36% (linfoide)	MPO (-) PAS(+)13%	HLA ^{-/+} , CD19 ^{+/-} CD22 ⁺ ,CD10 ⁺

El paciente 10 presentó al aspirado medular morfología hiper celular con infiltración de elementos blásticos (morfología linfoide) , presentando reacción citoquímica MPO (-) y PAS (+), presento un patrón inmunofenotípico CD10+, CD19+ y TDT +.

Al momento del diagnóstico el paciente 12 presentó adenopatías generalizadas y esplenomegalia gigante. Morfológicamente el 75 % de células blásticas observadas son de tamaño homogéneo, su núcleo caracterizado por un tamaño irregular con 1 o 2 nucleolos prominentes y un citoplasma intensamente basófilo, al conteo de células en sangre periférica se reporta 27000 cel/mm³ , asociados con una megacariopoyesis, eritropoyesis y granulopoyesis suprimida. Citoquimicamente el 94 % de células blásticas fueron positivas para la reacción PAS. Inmunofenotípicamente durante el diagnóstico se evidenció la expresión de marcadores de superficie HLA-DR⁺, CD19⁺,CD10⁺,CD3^{-/+}, con una escasa o nula expresión de IgM^{-/+},CD34^{-/+}.

El caso 13 presentó blastos de tamaño y morfología variada fácilmente confundibles con blastos de otras estirpes, blastos con abundante citoplasma, nucleolos visibles, evidenciándose un 50 % de blastos a nivel de sangre periférica, citoquimicamente las células presentan reactividad en 21 %, inmunofenotípicamente se determina el siguiente perfil: HLA⁺, CD19⁺,CD22^{-/+},CD10⁺, Ig M^{+/-}.

El caso 14 presentó pancitopenia severa al momento del diagnóstico, morfológicamente en sangre periférica se observa 36 % de células blásticas, citoquimicamente el 13 % de células fueron positivas para la reacción PAS, inmunofenotípicamente durante el diagnóstico fue evidenciando la expresión de

los siguientes marcadores: HLA ^{-/+}, CD19 ^{+/-} CD22 ⁺, CD10 ⁺ lo cual confirma el diagnóstico para LLA tipo B II.

B. EVALUACIÓN MORFOLÓGICA, CITOQUÍMICA E INMUNOFENOTÍPICA POST FASE DE INDUCCIÓN.

Los pacientes diagnosticados con LLA tipo B II fueron sometidos a tratamiento quimioterapéutico en base a prednisona, vincristina, daurunobicina y asparaginasa. Al 28avo día se evaluó la fase de inducción mediante un aspirado medular obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 15. Comparación del porcentaje de blastos encontrados en pacientes con LLA post fase

de inducción mediante morfología, citoquímica e inmunofenotipo.

Paciente No.	Valoración morfológica	% de células positivas por tinción citoquímica PAS	% de células positivas determinadas por inmunotipificación
10	2% RC.	3%	10%
12	12%	38%	57%
13	4% RC	27%	15%
14	3% RS	37%	16%

RC. Remisión completa; RS. Remisión sostenida.

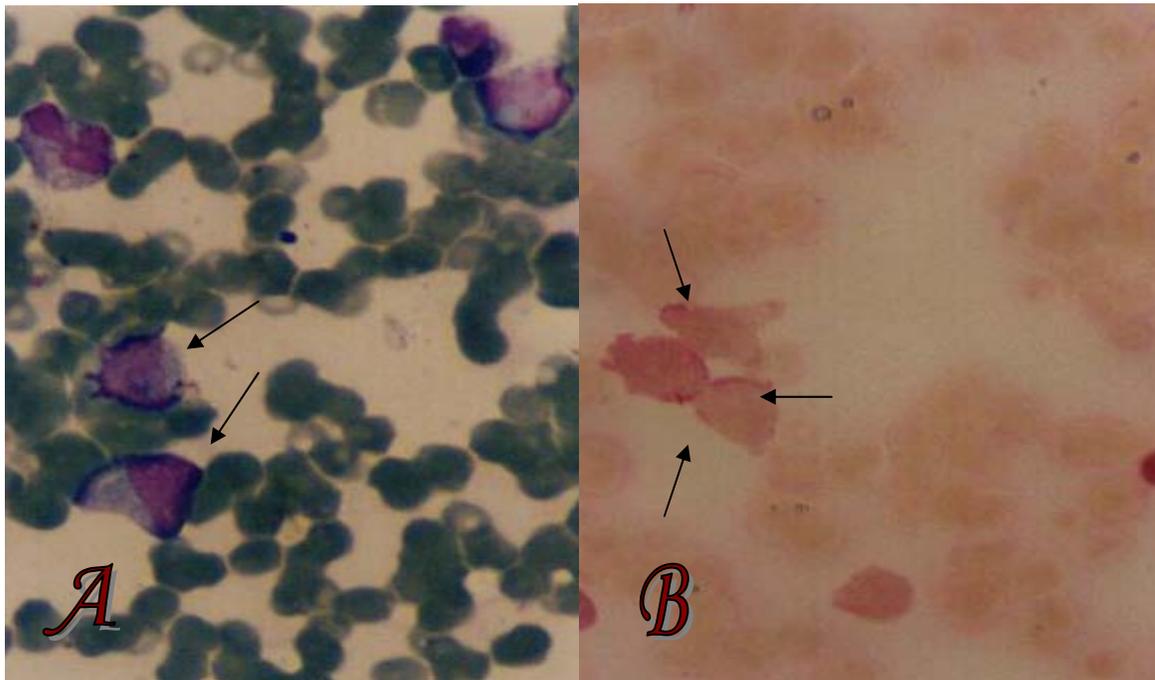
Las técnicas utilizadas muestran resultados de magnitud, lo que se hace más acentuado entre la valoración morfológica e inmunofenotípica(Tabla 15) .

De acuerdo a los aspirados de médula ósea se consideraron en remisión completa a 3 de los 4 casos, ya que se encontró menos del 5 % de blastos en

médula ósea después del tratamiento, si bien, el caso 12 fue reportado como sospecha de recaída por morfología, esto se establece claramente por inmunotipificación, encontrándose un 57 % de células leucémicas residuales.

Por otro lado en el caso 10 se instauró tratamiento quimioterapéutico a menor dosis que el tratamiento convencional debido a la edad de la paciente. Post fase de inducción, morfológica y citoquímicamente la paciente presentó menos de un 5 % de blastos(Tabla 15). Inmunofenotípicamente se determina la utilidad de marcadores Tdt, CD10 y CD19 como predictores de recaídas¹⁰, encontrándose post fase de inducción un 6% de blastos para marcadores CD10 y CD19.(Fig 2-C)

Figura 2. Resultados obtenidos post fase de inducción en el caso 10. A. Extendido de médula ósea tinción Wright B. Tinción PAS. C. Perfil inmunofenotípico.



C

MARCADOR	Reactividad 1ra.Muestra (diagnóstico)	Reactividad 2da.Muestra (Post-FI)	LLA PRO-B (B-I)	LLA COMUN (B-II)	LLA PRE-B (B-III)	LLA BMADURA (B-IV)
HLA-DR	0	0	+	+	+	+
TDT	48	0	+	+	+	-
CD19	75	6	+	+	+	+
CD22	-	-	+	+	+	+
CD10	67	6	-	+	-	-
CD3	-	3	-	-	-	-
CD7	-	4	-	-	-	-
CD1a	-	-	-	-	-	-
IgM	-	-	-	-	+c	+sup
CD4	-	-	-	-	-	-
CD8	=	-	-	-	-	-
CD13	=	-	-	-	-	-
CD14	-	-	-	-	-	-
CD33	-	-	-	-	-	-
CD34	-	-	-	-	-	-

Por efecto de la terapia de inducción, la paciente concomitantemente presentó un cuadro neumónico, durante la inmunotipificación post fase de inducción se evidenció reactividad de los marcadores CD3 y CD7 en menos del 5 % de blastos, lo cual podría estar asociado con su estado clínico. Estado que fue desencadenante y tras varios ciclos de tratamiento, la paciente falleció

El caso 12 post fase de inducción presentó respuesta clínica sin modificación, morfológicamente se encontró 12 % de blastos residuales, citoquímicamente 38% de células reactivas, inmunofenotípicamente permanecieron marcadores CD19 y CD10 fuertemente positivos (57%) (Fig 3-C), lo que indica ausencia de remisión medular. Se inició fase de reinducción y a la semana el paciente abandonó el tratamiento.

Figura 3. Resultados obtenidos post fase de inducción en el caso 1 2. A. Extendido de médula ósea tinción Wright B. Tinción PAS. C. Perfil inmunofenotípico.

C

MARCADOR	Reactividad 1ra.Muestra (diagnóstico)	Reactividad 2da.Muestra (post-FI)	LLA PRO-B (B-I)	LLA COMUN (B-II)	LLA PRE-B (B-III)	LLA BMADURA (B-IV)
HLA-DR	54	-	+	+	+	+
TDT	-	-	+	+	+	-
CD19	61	41	+	+	+	+
CD22	-	-	+	+	+	+
CD10	92	84	-	+	-	-
CD3	4	-	-	-	-	-
CD7	-	-	-	-	-	-
CD1a	-	-	-	-	-	-
IgM	2	-	-	-	+c	+sup
CD4	-	-	-	-	-	-
CD8	=	-	-	-	-	-
CD13	=	-	-	-	-	-
CD14	-	-	-	-	-	-
CD33	-	-	-	-	-	-
CD34	3	-	-	-	-	-

Post fase de inducción el caso 13 (Fig. 4-B,C), por inmunotipificación evidenció la presencia de marcadores HLA R, CD10, CD19, prueba que determinó la presencia del 15 % de blastos residuales, paciente que llega a la fase final de consolidación con presencia de pancitopenia periférica falleciendo por una complicación hemorrágica del sistema nervioso central antes de ingresar a la fase de consolidación .

El caso 14 post quimioterapia evidenció remisión completa mediante morfología, citoquímica e inmunofenotípicamente se determina la presencia de blastos en más del 5%(Tabla 15). El paciente se encuentra actualmente en fase de mantenimiento, presento buena respuesta clínica , no experimentando sintomatología de tipo infecciosa durante la fase inducción

Si bien, las pruebas citoquímicas son una herramienta para el diagnóstico de LA, la valoración inmunofenotípica evidencia en los 4 casos la presencia de blastos residuales en más del 5 % , así también, fue una prueba discriminatoria entre linfocitos reactivos (PAS positivas) de células blásticas(casos 13 y 14), donde se observó la presencia de un 27 y 37 % de células con reacción citoquímica positiva y por inmunotipificación un 15 y 16 % de blastos para caso.

Casos 13 y 14 evidencian una expresión de CD10 fuertemente positiva asociada a una baja o nula expresión de CD22+.

Figura 4. Resultados obtenidos post fase de inducción en el caso 13. A. Extendido de médula ósea tinción Wright B. Tinción PAS. C. Perfil inmunofenotípico.

MARCADOR	Reactividad 1ra.Muestra (Diagnóstico)	Reactividad 2da.Muestra (Post FI)	LLA PRO-B (B-I)	LLA COMUN (B-II)	LLA PRE-B (B-III)	LLA BMADURA (B-IV)
HLA-DR	65	17	+	+	+	+
TDT	-	-	+	+	+	-
CD19	74	7	+	+	+	+
CD22	10	-	+	+	+	+
CD10	100	16	-	+	-	-
CD3	-	-	-	-	-	-
CD7	-	-	-	-	-	-
CD1a	-	-	-	-	-	-
IgM	16		-	-	+c	+sup
CD4	-	-	-	-	-	-
CD8	-	-	-	-	-	-
CD13	-	-	-	-	-	-
CD14	-	-	-	-	-	-
CD33	-	-	-	-	-	-
CD34	-	-	-	-	-	-

Figura5. Resultados obtenidos post fase de inducción en el caso14. A. Extendido de médula ósea tinción Wright B. Tinción PAS. C. Perfil inmunofenotípico.

MARCADOR	Reactividad 1ra.Muestra	Reactividad 2da.Muestra	LLA PRO-B (B-I)	LLA COMUN (B-II)	LLA PRE-B (B-III)	LLA BMADURA (B-IV)
HLA-DR	67	9	+	+	+	+
TDT	-	-	+	+	+	-
CD19	30	5	+	+	+	+
CD22	54	9	+	+	+	+
CD10	64	11	-	+	-	-
CD3	-		-	-	-	-
CD7	-		-	-	-	-
CD1a	-	-	-	-	-	-
IgM	-	-	-	-	+C	+sup
CD4	-	-	-	-	-	-
CD8	=	-	-	-	-	-
CD13	=	-	-	-	-	-
CD14	-	-	-	-	-	-
CD33	-	-	-	-	-	-
CD34	-	-	-	-	-	-

C. RESPUESTA AL TRATAMIENTO DE INDUCCIÓN.

De los 14 pacientes inicialmente diagnosticados, 10 experimentaron recaídas y solo 4 culminaron la fase de inducción.

En aspirados de médula ósea por valoración morfológica fueron considerados hasta al final del estudio en remisión completa a 3 de los 4 pacientes (Tabla 16).

Tabla 16. Resultado del tratamiento post fase de inducción en los 4 pacientes con LLA

tipo B II

PACIENTES	TIPO DE TRATAMIENTO	REMISION COMPLETA DETERMINAD MORFOLOGI-CAMENTE	SOSPECHA DE RECAÍDA	COMPLICACIONES EN LA PRIMERA FASE DE QUIMIOTERAPIA		REMSION SOSTENIDA DETERMINADA MORFOLÓGI-CAMENTE	BLASTOS RESIDUALES DETERMINADO POR INMUNOFLUO-RESCENCIA
				FI	FS		
10	Convencional	*	---	--	*	*	*
12	Sin asparaginasa	---	*	*	---	----	*
13	Sin asparaginasa	*	---	--	*	*	*
14	Sin asparaginasa	*	---	--	---	*	*

FI. Fase de Inducción. FS. Fase sostenida.

El caso 12 se encontraba en sospecha de leucemia persistente)Caso 12), asociado con el número de blastos encontrados en aspirados de médula ósea (más del 5 %) post fase de inducción.

En los casos 12, 13 y 14 se excluyo a la L- asparaginasa durante la quimioterapia, encontrándose células residuales con reacción PAS fuertemente positiva (Fig 3-B,4-B y 5-B) post fase de inducción.

D. OCURRENCIA DE RECAIDAS.

El promedio de días observados fue de 28 días. Complicaciones en las primeras fases de quimioterapia fue evidente en 10 de los 14 pacientes inicialmente tratados, La mayoría de las recaídas fue en pacientes con edad por encima de 35 años los cuales presentaban 30.000 cel/mm^3 con predominio mieloide al momento del diagnóstico (Tabla12).

El tiempo promedio transcurrido antes de las recaídas fue menos de 1 mes. Para aquellos pacientes que respondieron a la fase de inducción, el tiempo promedio de recaídas fue de 5 meses.

La valoración inmunológica de los cuatro pacientes que culminaron la fase de inducción sugirió que 3 de los 4 pacientes recayeron aun con RC determinada morfológicamente en el tiempo establecido a la de remisión. El caso 14 permanece en fase de mantenimiento hasta el final del estudio.

D. PRONOSTICO.

Aquellos pacientes que no respondieron a la terapia de inducción de primera, fueron asociados a estados de sepsis y hemorragias severas, pacientes que por su condición difícilmente respondieran a la quimioterapia, siendo uno de los factores importantes de muerte en este grupo de estudio.

Es así, que determinamos como factores predictores importantes de recaídas, la edad (< a 35 años), el recuento de leucocitos por encima de 30 000 cel/mm³ al momento del diagnóstico, el tipo de leucemia.

VIII. DISCUSIÓN.

A pesar de los avances del tratamiento, las recaídas son el problema mayor en los casos de leucemia aguda debido a la persistencia de un pequeño número de células malignas que son indetectables por morfología convencional, por lo tanto se requiere de técnicas más sensibles que permitan evaluar la masa residual y monitorear una respuesta al tratamiento de forma individual. El desarrollo de dichos métodos ayudará a detectar e impedir las recaídas previa a una manifestación clínica, o para determinar la calidad de la médula ósea para un trasplante autólogo, siendo actualmente este un desafío en nuestro medio⁹.

En este estudio evaluamos la importancia clínica en cuanto a la presencia de blastos residuales determinados por cuantificación de parámetros inmunofenotípicos y así encontrar la mejor metodología que la valoración morfológica convencional para determinar remisión post fase de inducción en pacientes con leucemia aguda.

En nuestro medio el monitoreo y seguimiento del tratamiento en los pacientes con LA se realiza convencionalmente por morfología, debemos tomar en cuenta que la detección de esta técnica es de 10^{-2} . Experimentos anteriores demuestran la presencia de blastos en valores inferiores de un 1 % no pueden ser detectados por morfología²⁶.

La inmunotipificación fue de utilidad para detectar la presencia de blastos residuales, debemos tomar en cuenta las ventajas de esta técnica en cuanto a la utilización de anticuerpos monoclonales, como la expresión de algunos

antígenos sobre blastos leucémicos y que pueden estar ausentes o raramente positivos en células normales y por supuesto mencionar la sensibilidad de esta técnica (10^3 - 10^4), permitiéndonos detectar 1 blasto de cada 1000 células¹².

Durante la fase de diagnóstico se observó por inmunotipificación en los casos de LLA BII la expresión del marcador CD10 fuertemente positiva asociada a una baja o nula expresión de CD22+, esta expresión se refleja durante el desarrollo de células B, ya que adquieren el CD22 solo cuando maduran, lo cual fue corroborado con los estudios de Brasil et. al. (1999) (Fig. 2,3,4 y 5),

Cuatro pacientes con diagnóstico de LLA BII (CALLA) culminaron la fase de inducción del tratamiento, la inmunotipificación en esta fase permitió su valoración y determinó la utilidad de marcadores Tdt, CD10 y CD19 como predictores de recaídas.

Si bien en literatura se reporta frecuentemente pacientes con fenotipo cambiado post fase de inducción, lo que representa un problema importante en la recaída, en nuestro estudio debemos mencionar (caso 10) la presencia de los marcadores CD3+(3 %) y CD7+(4%) post fase de inducción (Fig 2-c), lo cual se reporta en bibliografía como frecuentes cambios antigénicos que pueden presentarse, éstos generalmente no afectan a las aberraciones antigénicas que definen al fenotipo leucémico. Más aún estos últimos cambios (<20 % en LLA y LMA) muchas veces no son reales, sino que son reflejo de pequeñas subpoblaciones leucémicas ya presentes al momento del diagnóstico y que pasaron inadvertidas. Fuera de este caso no reportamos evidencia de alteraciones antigénicas como resultado de la quimioterapia, pero debemos

mencionar su valor asociado a la clínica ya que la paciente concomitantemente presentó un cuadro neumónico que repercutió en su estado general.

Así también, determinamos la importancia de los factores de riesgo en cuanto a la respuesta de los pacientes al tratamiento y su gran utilidad como factores pronóstico. En los grupos de riesgo las recaídas fueron más frecuentes en los de riesgo alto e intermedio que en los de riesgo bajo(Tabla 12. Entre los factores predictores favorables importantes al momento del diagnóstico deben ser tomados en cuenta, la edad se manifiesta más en la duración de la remisión y en la supervivencia (< a 35 años), el recuento de células por debajo de 30 000 cel/mm³ , así como el fenotipo LLA BII (CALLA) lo cual ha sido establecido desde hace varios años, fenotipo que presentaron los cuatro pacientes que respondieron a la fase de inducción. La carga de masa tumoral, como hepato, esplenomegalia con adenopatía, reflejará una mayor población leucémica y por ende mayor número de células resistentes. Estas variables pueden afectar el desarrollo de recaídas y la remisión sostenida, siendo factores con capacidad predictiva en cuanto al riesgo de muerte temprana para el restante número de pacientes. No fue posible realizar análisis estadístico en la etapa de mantenimiento por el pequeño número de pacientes en seguimiento a largo plazo.

La clasificación morfológica FAB no predijo las recaídas de los pacientes ni la presencia de remisión sostenida, tal como lo plantea este y otros estudios, en donde se ha demostrado que el impacto de algunos factores pronóstico acompañado de pruebas citoquímicas e inmunofenotípicas pueden coadyuvar a

la detección de blastos residuales en más de un 5 %, lo cual no corrobora lo dicho morfológicamente(Tabla 15).

La baja respuesta de los pacientes con LA a la terapia de inducción esta asociada principalmente a la infraestructura y el hacinamiento de las salas de medicina en el Hospital de Clínicas, lo cual repercutió en la mayoría de los pacientes, remitidos de este centro. Complicaciones infecciosas, fueron frecuentes, siendo una de las principales causas de muerte en este grupo de estudio.

Nuestro estudio demostró que la presencia de < 5 % de blastos en aspirados de médula ósea no necesariamente indican remisión completa, además > 5 % de blastos pueden no ser siempre un signo de recaída ya que estos blastos pueden presentar un Tdt negativo los cuales son precursores de células B normales y pueden incrementarse después de la quimioterapia(caso 14), pero una valoración de Tdt, CD10 y CD19 por inmunofluorescencia pueden diferenciar estas dos instancias y determinar precisamente los niveles de remisión en médula ósea.

La sensibilidad de este método inmunológico se encuentra en el rango de 10^{-3} - 10^{-4} si bien es más baja que las técnicas de PCR 10^{-5} - 10^{-6} estos se emplean para identificar en un rango alto las recaídas. Principales estudios por Biología Molecular presentan detección de células residuales inmediatamente después de remisión de inducción y un número substancial de pacientes sobre los 24 meses post-remisión. Esta positividad de PCR no siempre correlaciona con respuestas a largo termino. Para sobrellevar la baja sensibilidad de técnicas inmunológicas respecto a técnica moleculares se deberá hacer un muestreo más

frecuente de pacientes en los primeros 2 años de tratamiento donde las recaídas son más comunes.

Si bien se realizaron trabajos en los que se trata de correlacionar la morfología con el inmunofenotipo, la adición de las pruebas citoquímicas aumenta aun más la probabilidad de encontrar blastos residuales, como se muestra en la Tabla. 15, por ello y pese a que el número de pacientes fue reducido, observamos una correlación entre las tinciones citoquímicas con el inmunofenotipo. Si bien se observó un mayor porcentaje de células con reacción PAS positiva post fase de inducción en relación al porcentaje de blastos determinado mediante valoración morfológica en los casos 13 y 14(Tabla 15), esto puede asociarse a la presencia de linfocitos activados los cuales pueden dar reacción positiva, siendo discriminadas de células leucémicas por evaluación inmunofenotípica, si bien, en el caso 10 y 12 reportamos un menor número de células con reacción positiva, en comparación con las encontradas mediante inmunotipificación, justificamos como posible razón el que la muestra pudo no haber sido representativa debido a la distribución no homogénea de la leucemia en la médula ósea.

La principal pregunta, que permanece a ser respondida es si la detección de células residuales tendrán un rol en la selección de estrategias de tratamiento individual en los pacientes.

El beneficio potencial de determinar la enfermedad residual durante la consolidación de la quimioterapia, sería predictivo a una recaída subsecuente,

así también, su rol como indicador pronóstico (Parahat et. Al., 1998). Esto puede facilitar por lo tanto la elaboración de nuevos protocolos de quimioterapia, así como la respuesta de un tratamiento temprano a la enfermedad incrementaría este indicador.²⁶ Debemos mencionar, que si bien hasta el final del estudio 1 paciente se encontraba en remisión sostenida, esto determinada por morfología, a la larga puede recaer debido al hallazgo de blastos residuales (Tabla 15).

Aquellos pacientes que hicieron recaídas o bien no respondieron a la fase de inducción tuvieron un pronóstico sombrío, ninguno logró permanecer en remisión sostenida (Tabla 16). Una estrategia potencial para mejorar la supervivencia libre de eventos, sería intensificar la terapia inicial para los pacientes que tienen riesgo alto de fallar a la inducción, para lo cual es indispensable aplicar además de la clasificación morfológica las pruebas citoquímicas e inmunofenotípicas, por lo que aquellos pacientes que no pueden alcanzar remisión por el día 28 recaerán más temprano y se deberán colocar en los grupos de peor riesgo.

Varios protocolos de investigación han definido falla a la inducción como la persistencia de leucemia después de un mes de terapia. Nuestros resultados muestran que la remisión completa después de un mes de inducción en los pacientes de riesgo bajo que recibieron tratamiento con tres medicamentos, fue semejante a los de alto riesgo en quienes se utilizaron cuatro medicamentos. No obstante, en este estudio llama la atención la presencia de células que mantienen reacción positiva por inmunotipificación, así como, para la tinción PAS después de 1 mes de quimioterapia, pacientes que recibieron el

tratamiento sin L-asparaginasa, como se observa en las Figuras 3, 4 y 5, en comparación con las células de la primera paciente quien recibió el tratamiento convencional con L-asparaginasa, presentando reacción débilmente positiva tanto para pruebas inmunofenotípicas como citoquímicas (fig 2). Estudios recientes de García. Et. al.(2002) mencionan que a partir de 1990, se intensificó la inducción de la remisión, añadiendo L-asparaginasa con lo que la remisión completa aumentó.⁹

A pesar de que los tratamientos para pacientes con LLA son cada vez más eficaces, algunos grupos de pacientes continúan recayendo, lo que requiere del desarrollo de nuevas ideas para estos tratamientos³⁰. Además, debemos tomar en cuenta que al aumentar la intensidad y potencia de la quimioterapia inicial, se tiene que pagar el precio de una toxicidad y la morbi mortalidad asociada, adicionalmente estos pacientes son hemoderivados lo que conlleva aun costo asociado, lo cual en nuestro medio es difícil de obtener. Sin embargo no hay datos concluyentes acerca de que otra forma de tratamiento logre un resultado mejor que el tratamiento de inducción.

Si bien existió discrepancia en cuanto al comportamiento de estos pacientes al tratamiento, este hallazgo se puede explicar, debido a factores tales como el tamaño de muestra, el período de observación corto y la evaluación de los pacientes después de haber recibido el tratamiento en forma parcial, no obstante la utilización de los mismos o similares esquemas quimioterapéuticos, coadyuvaría a mejorar resultados y profundizar estos estudios.

Así también, debemos mencionar ciertos factores que son inherentes a nuestro medio que pueden explicar estas diferencias, como algunas expresiones de los patrones de conducta en nuestro país, como la falta de búsqueda precoz de atención médica o la falta de acato de las indicaciones médicas, que resultan francamente inadecuados y difícilmente influenciables a corto plazo ya que se encuentran determinados por la estructura sociocultural y el grado de desarrollo prevalente en el país, los estratos socioeconómicos de la población y la estructuración y funcionamiento de los sistemas de salud.

En las 3 últimas décadas, la sobre vivencia en los casos de Leucemia aguda se ha incrementado en casi un 80% en países desarrollados, si bien estos resultados son frecuentemente reportados en niños debemos tomar en cuenta que el tratamiento de LLA en adultos es considerablemente menos efectivo, por lo que una apropiada quimioterapia y una terapia de soporte jugarían un rol importante en la obtención de mejores resultados³².

Muchos más estudios se necesitan para determinar si la inusual expresión de antígenos en un nivel de maduración específica es una necesidad durante la diferenciación normal mieloide o linfoide. Estudios funcionales de estos antígenos son importantes en orden para clasificar la importancia biológica de estos tipos de expresión antigénica¹².

En resumen la clasificación mediante criterios morfológicos exclusivamente o aun acoplado con citoquímica, puede tener cierto grado de imprecisión, sin embargo el inmunofenotipo no puede reemplazar a la morfología completamente y esto simplemente constituye un valor complementario, debemos tomar en

cuenta, que la utilización de diferentes pruebas de forma combinada ya sea, para caracterizar las células leucémicas no solo han contribuido a una más fina clasificación de los subtipos de las leucemias agudas sino también permitir el manejo de nuevas estrategias para el tratamiento.

Este trabajo nos brinda información importante para el manejo adecuado del paciente en cuanto a un tratamiento dirigido, debe considerarse como un estudio preliminar en cuanto a la valoración inmunofenotípica post tratamiento, por la escasez en el número de pacientes, pese a ello nos permitió determinar y predecir las recaídas en 3 de los 4 pacientes diagnosticados con LLA BII, lo que nos lleva a la necesidad de seguir realizando muchos más estudios y profundizar aun más sobre este tema.

IX. CONCLUSIÓN.

- El monitoreo inmunofenotípico post fase de inducción encontró más del 5 % de células leucémicas residuales, demostrando ser un técnica simple y sensible la cual nos permitió realizar el seguimiento en pacientes con LLA, prediciendo las recaídas después de la quimioterapia.
- Se determinó la utilidad de marcadores CD19 y CD10 como predictores de recaídas en 3 de 4 pacientes diagnosticados con LLA B II (CALLA) post fase de inducción
- No se estableció la presencia de aberraciones antigénicas post quimioterapia, se reportó un caso de células con reacción para marcadores CD3 y CD7 ,resultado que podría ser asociado al cuadro neumónico de la paciente.
- La valoración morfológica FAB no predijo recaídas en 3 de los 4 pacientes ni la presencia de remisión sostenida.
- Se estableció como factores predictores importantes de recaída temprana, las edad del paciente (mayor a 30 años), el recuento de leucocitos (mayor a 30000 cel/mm³), el fenotipo de la leucemia al momento del diagnóstico.

- Se logró una correlación entre la presencia de blastos residuales determinada por pruebas citoquímicas e inmunofenotípicas durante la fase de inducción.
- La inmunotipificación discriminó la presencia de linfocitos activados (Reacción PAS positiva) de blastos leucémicos.

X. BIBLIOGRAFIA

1. Albelbide Jorge, Korin J., Chiappe G., Picón A., Falcón C. P. Caracterización Inmunofenotípica de leucemia aguda Análisis de 257 casos. Revista de la Sociedad Argentina de Hematología. Vol. 2 No.1. Enero-Abril de 1998.13-18
2. Barlage S., Rothe G., Knuechel R and Schmitz G. "Flow cytometric Immunophenotyping of mature lymphatic neoplasias using knowledge guided cluster analysis".Analytical Cellular Pathology.19 (1999) 81-90.
3. Bene M.C., Gastoldi S., Knapp W., Ludwis W.D., Matutes E., Orfao A. and MB Van't Veer. (1995). European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL) "Proposals for the immunological classification of acute leukemias" . Leukemia. 1783-1786.
4. Besses R., Castillo C.,LaFuente R., Pardo P., Vives C. Y Woessner C. "Hematología Clínica". 2da. Ed. 1988. 373-389.
5. Borrador de la Clasificación de la OMS de Neoplasias del tejido Hematopoyético y Linfoide.
6. Brady K., Atwater S. And Lowell Cl."Flow cytometric detection of CD10 (cALLA) on peripheral blood B lymphocytes of neonates".British Journal haematology, 1999, 107, 715.
7. Daenen S., Inhoff G., berg E. " Improves outcome of adult lymphoblastic leukaemia by moderately intensified chemotherapy which includes a pre-induction. Course for rapid tumour reduction: preliminary results on 66 patients". British Journal Haematology. 1998, 100, 273-282.

8. Feki S., Omri H., Laatiri M.A., Ennabli S., Bouket K. And Jenhani F." Contribution of flow cytometry tu acute leukemia classification in Tunisia" Disease Markers 16 (2000) 131-133.
9. García Vidrios M.V. "Tratamiento de las leucemias agudas en el adulto". Gac. Medica Mexicana Vol.138 Suplemento No. 1, 2002.
10. Gatter K., Brown D. "An Illustrated Guide to Bone Marrow Diagnosis". British Jornal of Haematology. 1998. 100,804-805.
11. <http://www.conganat.org/linfo.tortosa/conf/cap5/lagudahth>.
12. Hoffbrand A.V., Pettit J.E. Essential Haematology. Blackwell science. Thrid Edition.1999.p 207.
13. Hur M., Chang Y.H., Lee D.S., Park M.H. and Cho H.I." Immunophenotypic and Cytogenetic Changes In acute Leukaemia at Relapse". Clinical laboratorial Haematology. 2001, 23, 173-179.
14. Hwei Fang Tien and Chiu-Hwa Wang. "CD7 Positive Hematopoitic Progenitors and Acute Myeloid Luekemia and other Minimally Differentiated Leukemia", Leukemia and Lymphoma. Vol 31.pp. 93-98.
15. Kersey J. "Fifty years of Studies of the Biology and Therapy of Childhood Luekemia" Blood. Vol 90.No. 11 december 1,1997.
16. kohn C., "Levels of Expression of CD34 epitope Classes have Prognostic Value". Proteomics Weekly. October 21, 2002.
17. Leucemia aguda linfoblástica su diagnóstico y clasificación.
Galenored.com.
18. Leucemia linfocitica aguda en adultos. editors@oncolink.upenn.edu.

19. Leucemia linfocítica aguda en adultos.
http://www.oncolink.upenn.edu/pdq_html/i/span/101024_4html.
20. Leucemia. www.MIMEDICO.NET.
21. Leucemias agudas. <http://www.opolanco.es/Apat/Boletin11/>.
22. Leucemias. <http://www.msd-es.com/publicaciones/mmerck/MM-11-138.htm>
23. Louise Mary Turgeon. Clinical Hematology. Ed.D.,M.T.Little, Brown and company Boston/ Toronto, 125-147.
24. Luengo C., Ocqueteau M., "Leucemias Agudas". Gac. Med. Interna. Julio 2001.
25. Martín A., Soriano García J. L. , Galán Álvarez Y., Armando J., Rodríguez Salva, Fernández Garrote L. .Incidencia de las Leucemias y los miembros en Cuba. La Oncología en Cuba. 1986-1990.
26. Matutes Estrella, Ray L., Powles, Mike Hamblin, John Swansbury, Jennifer G. Treleaven, Athanasios Tomas, Ayad Atra, Daniel Catovsky, Outcome of biphenotypic acute leukemia. Haematológica. 1999; 84: 699-706.
27. Miura T., Ouhira M., Koseki N. D. and Fujimaki S. " Childhood T-Cell acute Lymphoblastic Leukemia With Four Distinct Immunophenotypes Representing Different Stages Of T-Cell Development". Pediatric Hematology and Oncology, 18; 267-272.2001.

28. Parahat N., Morilla A., Ankomah O., Morilla R., Pinnerton R. "Detection of minimal residual disease in B.lineage acute lymphoblastic leukemia by quantitative flow cytometry" british Journal Haematology.1998, 101, 158-164.
29. Pérez Chacón, B. Ximena "Diagnóstico de Leucemia Linfoblástica Aguda Aplicando Parámetros Citoquímicos e Inmunotipificación" 1998. Tesis de Grado para optar al título de licenciatura en farmacia y Bioquímica.
30. Piedras J., López-Karpovitch X., Cárdenas M.R. " Inmunofenotipos celulares en 97 Adultos con Leucemia Aguda". Rev. Invest.Clin. 1997;49(6);457-464.
31. Rothe G. and Schmitz G. for the Working Group on Flow Cytometry and Image Analysis, "Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies". BTS Leukemia. 1996.10,877-895.
32. Ruiz G, San Miguel J. F. Actualización en Leucemias. Edt. Médica Panamericana. 1996.
33. Stevens R., Hann I., Wheatley K. And Gray R.. " Marked improvements in outcome with chemotherapy alone in paediatric acute myeloid leukaemia: results of the United Kingdom Medical Research Council's 10th AML trial". British Journal of Haematology 1998, 101,130-140.
34. Visser J.H., Wessels G. And Hesselng P.B. "Prognostic value of day 14 Blast percentage and the absolute blast index in bone marrow of Children with acute lymphoblastic leukemia". Pediatric Hematology and Oncology, 18:187-191,2001.

