

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA**



**ANALISIS INMUNOFENOTIPICO EN MUESTRAS DE MEDULA OSEA DE NIÑOS
CON LLA-B CON LOS MARCADORES CD19/CD10/CD34/CD3
POR CITOMETRIA DE FLUJO**

Elaborado por:

EDGAR TEDDY QUISPE SOTO

**TESINA DE GRADO PARA OPTAR AL TITULO DE
LICENCIATURA EN BIOQUIMICA**

**La Paz – Bolivia
2007**

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA**



**ANALISIS INMUNOFENOTIPICO EN MUESTRAS DE MEDULA OSEA DE NIÑOS
CON LLA-B CON LOS MARCADORES CD19/CD10/CD34/CD3
POR CITOMETRIA DE FLUJO**

Elaborado por:

EDGAR TEDDY QUISPE SOTO

Asesores:

**Dr. Ricardo Amaru
Dra. Gina Torres**

**TESINA DE GRADO PARA OPTAR AL TITULO DE
LICENCIATURA EN BIOQUIMICA**

**La Paz – Bolivia
2007**

RESUMEN

Mediante la citometría de flujo y anticuerpos monoclonales marcados con diferentes fluorocromos podemos realizar un análisis multiparamétrico, para la caracterización de células, en medula ósea normal como también en medula ósea de pacientes con leucemia.

Esta caracterización permite realizar un diagnóstico y clasificación inmunológica, también permite la detección de la enfermedad mínima residual después del tratamiento.

El presente trabajo tiene como objetivo, determinar en 20 muestras de MO de niños con LLA-B la frecuencia de los subtipos inmunológicos, mediante citometría de flujo y Analizar la utilidad del panel CD19/CD10/CD34/CD3 en el seguimiento de pacientes con LLA-B.

Este análisis se realizó en 20 muestras de aspirado de médula ósea de niños con LLA-B diagnosticados en la Unidad de Biología celular de la Facultad de Medicina.

En los resultados obtenidos se observó 12 casos (60%) de sexo masculino y solamente 8 casos (40%) de sexo femenino, en relación a la frecuencia de los subtipos inmunológicos de la LLA-B se diagnosticaron 17 (85%) como común-B, 2 como pro-B (10%) y 1 como LLA-B madura (5%), el análisis mostró que del 100% de muestras CD19+ un 85% de muestras son además CD10+, 55% CD34+ y el 100% son CD3-.

Concluimos que mediante la citometría de flujo y el panel de anticuerpos monoclonales utilizados podemos diagnosticar y clasificar las leucemias linfoblásticas agudas tipo B, y que el panel permite hacer el seguimiento del paciente con un valor pronóstico comparable con el de la detección de la enfermedad mínima residual en un 85% de nuestros pacientes

DEDICATORIA:

A Dios, por permitir seguir una carrera.

A mis padres, por el inmenso amor brindado siempre.

A Jacky y Alan, por el apoyo y alegría que me brindan siempre.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores, Dr. Ricardo Amaru y Dra. Gina Torres, por haberme introducido en el mundo de la citometría de flujo, por su apoyo, entusiasmo y modelo de trabajo y sobre todo por su amistad.

A los docentes de la Facultad de Cs. Farmacéuticas y Bioquímicas entre ellos la Dra. Esther Flores, Dra. Rosario Peñaloza, Dra. Giovanna Dorigo, Dra. Jacqueline Calla, quienes contribuyeron a mi formación. Y la amistad brindada a mi persona.

Al personal del Instituto Gastroenterológico Boliviano Japonés, por el año de internado rotatorio, la enseñanza brindada y su amistad.

A la Dra. Heidy García por su interés, apoyo y amistad.

A la Dra. Hortensia I. de la unidad de biología molecular por su apoyo

A mis hermanos, Nelson y Manuel por el apoyo y la amistad brindada siempre

A mis suegros, Alfonso y Nelly por el apoyo brindado.

A mí cuñada Verónica

A mis amigos y compañeros con quienes egresamos de la Facultad.

INDICE

Pag.

RESUMEN	
1.	INTRODUCCION.....1
2.	MARCO TEORICO.....2
2.1	Células madre2
2.1.1	Célula madre somática o adulta.....2
2.2	CD34+ una molécula expresada en las células madre hematopoyéticas3
2.3	CD10: La molécula y su función4
2.4	El linfoblasto6
2.4.1	Ontogenia6
2.5	Leucemias agudas.....9
2.5.1	Definición y características9
2.5.2	Fisiopatología9
2.5.3	Clasificación11
2.5.4	Epidemiología13
2.6	Leucemias Agudas y el Inmunofenotipo.....13
2.7	Inmunofenotipo en la LLA-B14
2.8	Enfermedad Mínima Residual17
3.	ANTECEDENTES19
4.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....20
5.	JUSTIFICACION20
6.	OBJETIVOS21
7	MATERIAL Y METODOS.....21
7.1	Diseño o tipo de estudio.....21
7.2	Área de Estudio21
7.3	Población Estudiada 21
7.3.1	Criterios de inclusión.....21

7.3.2	Criterios de exclusión	21
7.4	Tamaño muestral	22
7.5	Lugar	22
7.6	Material	22
7.6.1	Equipos.....	22
7.6.2	Reactivos.....	26
7.6.3	Material de Laboratorio	26
7.6.4	Material biológico	26
7.7	Método	27
7.7.1	Determinación del % de CD19/CD10/CD34/CD3	27
7.8	Operacionalización de las variables.....	29
8.	RESULTADOS.....	30
9.	DISCUSIÓN.....	32
10.	CONCLUSIONES.....	34
11.	RECOMENDACIONES	34
12.	BIBLIOGRAFIA.....	35

INDICE DE FIGURAS

	Pagina
Figura 1. Estructura del CD34	
3	
Figura 2. Esquema de CD10	5
Figura 3. Posible rol de CD10 en la maduración y diferenciación del linfocito B	5
Figura 4. Características en la maduración del Linfocito B	7
Figura 5. Receptor del linfocito pre-B	8
Figura 6 Clasificación EGIL	12
Figura 7 Diferenciación linfoide B en MO normal	
17	
FIGURA 8. ESQUEMA DE UN CITÓMETRO DE FLUJO	23
Figura 9. Detección de luz a 90° y luz dispersada en la misma dirección que el rayo láser	24
Fig.10 Antígenos de diferenciación y localizaciones específicas de los leucocitos en un diagrama de dispersión	25
Fig. 11 Incidencia de LLA-B por Sexo	30
Fig. 12 Incidencia de la LLA-B de acuerdo a la clasificación EGIL	30

INDICE DE TABLAS Y CUADROS

Cuadro 1 Inmunofenotipo de la LLA de línea B	16
Tabla 1 Incidencia de LLA-B clasificación EGIL por grupos de edad	
31	
Tabla 2 Porcentajes por marcadores celulares	31
Tabla 3 Expresión de CD34 en LAL-B	

1. INTRODUCCION

El desarrollo de las células sanguíneas linfoides sigue un proceso complejo en el cual estas células interactúan entre si, interactúan con su micro ambiente, con factores de crecimiento y con la matriz extracelular (1). Es necesario que los linfoblastos expresen moléculas ya sean receptores o moléculas de adhesión celular que les permitan transmitir señales procedentes de otras células (2). Durante el desarrollo linfoide B existe una secuencia de expresión antigénica, estos antígenos celulares o también llamados marcadores celulares se estudian con anticuerpos monoclonales purificados, que son conjugados con fluorocromos.

Estos anticuerpos reconocen antígenos celulares específicos que se le dieron números en el sistema de *cúmulos de designación* (CD) tanto el antígeno como el anticuerpo correspondiente reciben la misma designación CD. Estos antígenos pueden ser de membrana (CD19) o pueden ser citoplasmáticos (cCD22), pueden ser marcadores de una línea celular específica (CD79a) o pueden describir una etapa de maduración.(CD10/CD34)

Mediante un estudio inmunofenotípico podemos determinar la expresión y el porcentaje de células que presentan estos marcadores en medula ósea (MO) normal como también en MO de pacientes con leucemia.

El inmunofenotipo coadyuva al diagnóstico y permite realizar una clasificación inmunológica de las leucemias linfoblásticas agudas, también permite identificar fenotipos leucémicos, que serán utilizados en la detección de la enfermedad mínima residual (EMR) o leucemia mínima residual después de instaurado el tratamiento, que ha resultado muy importante como un factor predictor de recaídas o por el contrario una sobre vida libre de enfermedad (SLE).

Existen datos que relacionan determinados inmunofenotipos con ciertas alteraciones moleculares, al clasificar inmunológicamente a las leucemias linfoblásticas agudas

tipo B, lo que permitiría investigar específicas alteraciones moleculares en cada uno de estos subtipos.

2 MARCO TEORICO

2.1 Células madre

Los términos aplicados en español para identificar a estas células han sido variados. Inicialmente se utilizó el mismo término que en inglés: *stem cells*, pero posteriormente se han introducido diversos nombres que han dependido más bien del criterio del traductor. Así encontramos los de células troncales, células tronco, células precursoras, células progenitoras y células estaminales, *células madre*.

Desde el punto de vista de su capacidad reproductiva y funcional, las células madre se han definido como aquellas que pueden dividirse simultáneamente para mantener por un lado su auto-renovación, con producción de más células madre semejantes a ella, y por otro lado, generar células hijas comprometidas con diferentes linajes celulares que se diferencian en diversos tipos de células especializadas, no solo morfológicamente, sino también funcionalmente (3).

2.1.1 Célula madre somática o adulta

Clásicamente se ha definido como una célula especializada dentro de la organización de las células de un tejido específico de un organismo ya formado, que está restringida en su capacidad de diferenciación y es capaz únicamente de generar células del tejido que representa, a las que debe recambiar de forma natural. Se ha señalado que en su evolución el organismo sitúa en los tejidos células madre somáticas como parte de los mecanismos que emplea para su renovación en condiciones fisiológicas o ante un daño hístico.

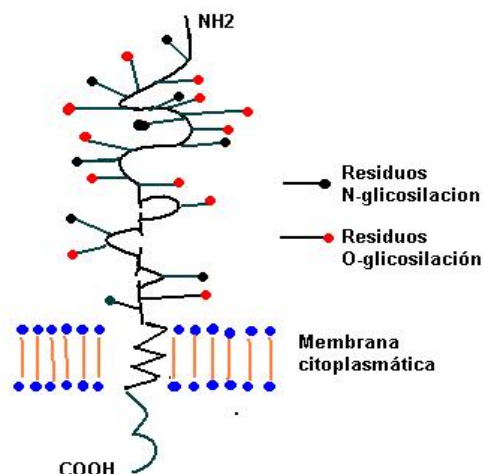
Sin embargo, en los últimos años, se han realizado varios estudios que han aportado resultados sorprendentes, pues sugieren que la potencialidad de algunos tipos de

células madre adultas es mayor de lo esperado, ya que han mostrado en determinadas condiciones capacidad para diferenciarse en células de diferentes linajes. El caso más destacado es el de las células madre hematopoyéticas capaces de diferenciarse en diversos tejidos, entre ellos endotelio, músculo cardíaco, músculo estriado, hepatocitos, neuronas, piel e intestino (3) (4). Aunque se ha planteado que los criterios establecidos para definir a una célula madre adulta son difíciles de comprobar experimentalmente, se ha señalado que la mayor parte de los criterios que cumplen las células madre embrionarias los satisfacen también la célula madre hematopoyética, pues esta puede tener divisiones auto-renovadoras, puede dar lugar a todas las células sanguíneas, reconstruir la médula ósea cuando se trasplanta en receptores irradiados letalmente o aplasiados mediante quimioterapia, y además se ha observado su implantación en tejidos sanos (2).

2.2 CD34+ una molécula expresada en las células madre hematopoyéticas

CD34+ es una glico-proteína transmembranal de tipo I de 105 a 120 kilodalton (Kd), expresada en las células madre hematopoyéticas, progenitores hematopoyéticos, como también en el endotelio vascular, vénulas endoteliales altas y algunos fibroblastos (5) (6). CD34 no presenta homología estructural con otra proteína conocida, esta se compone de 354 amino ácidos y contiene 9 sitios de N-glicosilación y un número indeterminado de sitios O-glicosilación (fig.1), el gen destinado a la síntesis del antígeno CD34 esta localizado en el brazo largo del cromosoma 1 banda q32 (5). CD 34 es una molécula de adhesión celular y representa el ligando de la selectina-S y también se ha demostrado que protege a la célula progenitora hematopoyética de enzimas proteolíticas de parte de las células estromales presentes en el micro ambiente medular (7) (5).

Figura 1. Estructura del CD34*



(*Tomada de Lanza F. et. al.)

La frecuencia de las células CD34+ en MO se ha estimado entre 1-3% de la células mononucleadas, en sangre de cordón umbilical (SCU) oscila entre 0,2-1% y en sangre periférica entre 0,01 – 0,1 % (8).

El antígeno CD34 es reconocido por numerosos anticuerpos monoclonales (AcMo) MY10, 12.8.B1-3C5, 115.2, ICH3, TUK3. Los diversos anticuerpos reconocen distintos epítopes del mismo antígeno. La expresión del CD34+ es clasificado como un marcador *no asociado* ha una específica línea (Thy1-CD90+, CD38+, HLA-DR+, CD45 RA+), como marcador asociado a la línea linfoide T (cCD3+, CD3+, CD7+, CD5+, CD2+), B-linfoide (CD19+, cCD79a+), mieloide (CD33+, CD13+) y megacariocítica (CD61+, CD41+, CD42b+) (8).

Las CMH se encuentran en la subpoblación celular CD34+, CD 38- y también expresan el CD133, el Thy-1 (CD90) y tienen una baja o nula expresión de c-kit (CD117) (8).

Por lo tanto las células CD34+ en MO constituyen una población muy heterogénea en la que se incluyen también progenitores hematopoyéticos comprometidos a una determinada línea celular por lo que también coexpresará marcadores que pueden ser mieloides o linfoides.

2.3 CD10: La molécula y su función

CD 10 que en inmunohematología es conocido como cALLA (antígeno común de la leucemia linfoblástica aguda), es también conocido como *encefalinasa* y adquirió el nombre oficial de *neprilysin* o Ec. 3.4.24.11. Es una proteína de tipo II

transmembranal de 90-100 Kd con un grupo amino terminal intracitoplasmático y un grupo carboxi-terminal, esta molécula esta expresada como una simple cadena de 795 amino ácidos (aa) (fig.2). La cola intracitoplasmática consta de solo 24 aa. En medio de los 700 aa de la porción extracelular hay 12 residuos de cisteína, también existen numerosos sitios potenciales de glucosilación y por lo menos se han identificado tres secuencias que unen cinc. Por tanto CD10 es verdaderamente es una *metalo-peptidasa* que requiere el catión cinc para ser eficiente y cuya actividad enzimática esta localizada en la porción de 5 aa His-Glu-[ile, Leu, Met]-Xaa-His. CD10 pertenece a la familia de exopeptidasas en la que se encuentran también CD13 y CD26. Esta molécula actúa preferiblemente en los siguientes amino ácidos valina, isoleucina, fenilalanina, leucina o alanina.

Figura 2 Esquema de CD10

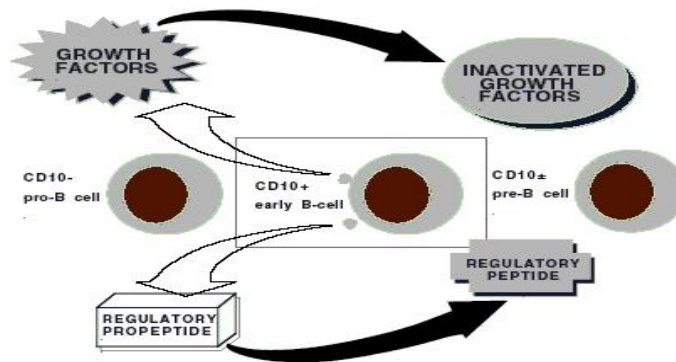


LA MOLECULA DE CD10. Los puntos verdes son residuos de cisteína. Las barras horizontales representan sitios de union al Zn. El sitio activo esta deletreado. (Tomada de Béné MC et al.)

CD10 se encuentra en los bordes cillados de los eritrocitos, túbulo renal, glomérulo renal, por lo que puede estar implicado en la degradación de pequeños péptidos del alimento y de los mediadores renales (angiotensina 1 y 2), en el cerebro fue conocido como encefalinas puesto que inactiva péptidos opiodes Met y Leu encefalinas (9). En la circulación sanguínea esta involucrado en los procesos de inflamación y quimiotaxis del neutrófilo, CD10 junto a CD13 en el neutrófilo hidroliza e inactiva péptidos semejantes a la secuencia Leu-Phe. En el sistema hematopoyético CD10 se encuentra en las células encargadas de la linfopoyesis B, regulan sea por activación e inactivación de péptidos o por activación de pro péptidos inhibitorios aunque los sustratos todavía no están bien identificados (9) (fig. 3).

Figura 3. Posible rol de CD10 en la maduración

Y diferenciación del linfocito B*



Parece ser que esta actividad es específica del sistema hematopoyético humano por que no se observaron en modelos ratones (9).

2.4 El linfoblasto

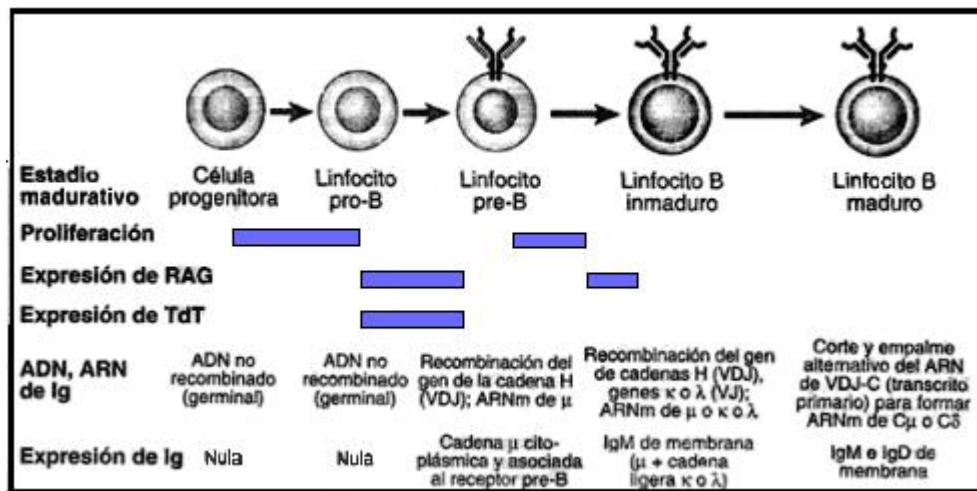
El desarrollo de las células sanguíneas de origen linfoide sigue un proceso muy complejo de cambios en la expresión génica que esta gobernada además por influencias del micro ambiente linfopoyético y que tiene lugar en varios tejidos del organismo a lo largo del desarrollo fetal, pero la médula ósea es el lugar exclusivo de la linfopoyesis desde la mitad de la gestación hasta la octava década de la vida (1) (2).

2.4.1 Ontogenia

De la célula madre hematopoyética deriva un progenitor linfoide común, que tiene capacidad para diferenciarse hacia células T, B o asesinas naturales (NK). Los progenitores comprometidos a la formación de linfocitos B, las células **early B**, inician reordenamientos DJ_h (corresponde a la cadena pesada) y expresan proteínas específicas de línea B como la denominada "VpreB" y la "Ig α (CD79a)", pero aun no expresan proteína de superficie CD 19. El siguiente estadio madurativo sería la célula pro-B, población mejor definida, que expresa CD34+, CD19+, la mayoría de ellas son TdT positivas y reordenan V a DJ_h ; en una etapa adelante se expresa CD10+ donde además en un 5- 10% de ellas se detecta cadenas pesadas μ citoplasmáticas. La pérdida de CD34 y TdT y la adquisición de cadenas μ citoplasmáticas en más del 95% de las células, definen un estadio más avanzado de

maduración las células pre-B (preB-I o células grandes proliferantes y preB-II o células pequeñas post mitóticas) que tiene capacidad de reordenar cadenas ligeras κ y λ (fig. 4) (10) (11).

Figura 4. Características en la maduración del Linfocito B

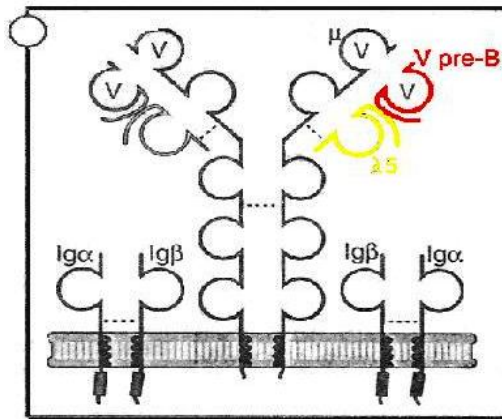


Muestra los estadios madurativos y sus características desde la célula progenitora hasta el linfocito B maduro (Modificado de Abbas, et al.; 2004, pg. 146)

Los linfocitos pre-B no expresan receptores antigénicos en su superficie por que no hay una expresión completa de moléculas de inmunoglobulinas. Algunas de las cadenas pesadas μ de los linfocitos pre-B se asocia a un grupo de proteínas denominadas **cadenas ligeras subrogadas** que son estructuralmente homólogas a las cadenas ligeras κ y λ , pero que son idénticas en todos los linfocitos B. Por lo tanto existe complejos formados por la cadena "μ" y cadenas ligeras intermedias denominadas receptores de linfocitos pre-B (pre-BCR). Los pre-BCR estimulan la proliferación y maduración de los linfocitos-B en desarrollo, por lo que la expresión de estos receptores es esencial para que tales células completen con éxito su

maduración (11) (12). No se sabe que reconoce el complejo Pre-BCR ni que señales bioquímicas transmite. Si se conoce que una cinasa, denominada *tirosina cinasa de los linfocitos B* (Btk), se asocia al pre-BCR y es necesaria para la transmisión de señales desde este receptor que estimula la maduración de los linfocitos B mas halla del estadio pre-B (FIG. 5) (11).

Figura 5. Receptor del linfocito pre-B



Receptor del linfocito pre-B, en asociación de las cadenas alfa y beta, los pre-BCR estimula la proliferación y maduración del linfocito B en desarrollo. (Abbas; 2004 pg. 148)

En el siguiente estadio madurativo los linfocitos B en desarrollo también reordenan sus genes de la cadena ligera κ o λ y además producen la cadena ligera, que se asocia a la cadena μ sintetizada previamente para formar la proteína completa de IgM. Estos linfocitos B todavía son considerados inmaduros. El siguiente estadio madurativo es el linfocito B que si es considerado maduro. En esta fase, los linfocitos co-expresan las cadenas pesadas μ y δ en asociación con una cadena κ o λ , y por tanto, expresan en su membrana IgM e IgD. Ambos con la misma región variable y con la misma especificidad antigénica. La coexpresión de IgM e IgD se acompaña de la adquisición de la competencia funcional y por esta razón estos se conocen como linfocitos B maduros los cuales se encuentran en circulación y órganos linfoides

periféricos. Por lo que es un hecho que la mayoría de los linfocitos B en sangre periférica o en los tejidos linfáticos de los individuos normales son IgM+ e IgD+ (12)(13).

Estos estadios madurativos descritos constituyen el compartimiento de precursores linfoides B. Un momento crítico en su desarrollo funcional es la aparición de la proteína VpreB que a su vez forma parte de un complejo molecular conocido como pre-receptor B (pre-BCR). La gran mayoría de las LLA expresan este receptor a nivel citoplasmático o en su superficie, reflejando así la similitud entre precursores normales y patológico (11).

En cuanto al linfoblasto T: ya sea la célula linfoide común o la célula con capacidad tri-lineal T/NK/célula dendrítica migra desde la MO hacia el timo donde adquieren inmuno-competencia mediante la presentación de antígenos. El linfoblasto leucémico T es indistinguible morfológicamente del B y de la hematogonia con los que comparte antígenos como el CD10 o el TdT, pero se diferencia por tener antígenos de estirpe T inmaduro, que normalmente no se encuentra en MO ni en sangre periférica (10)(12)(13).

2.5 Leucemias agudas

2.5.1 Definición y características

Las leucemias conforman un grupo de enfermedades neoplásicas malignas y progresivas de las células madre hematopoyéticas (CMH), caracterizadas por la proliferación no regulada de células endógenas en MO, provocando un reemplazo difuso en esta por células neoplásicas lo que llevará a una disminución en la producción de células normales (2) (14)

Las proliferaciones malignas de células formadoras de la sangre, células hematopoyéticas inmaduras, que se acompaña de una disminución en la *producción celular sanguínea normal* (leucocitos, eritrocitos y plaquetas), y son causantes de los signos de alarma que son palidez, sangrado, moretones, fiebre, cansancio, pérdida de peso, tumores, hinchazón, sudoraciones e infecciones.

Las leucemias pueden involucrar cualquiera de las células formadoras de la sangre y encontrarse en lesiones metastásicas en el organismo como por ejemplo el sistema nervioso central (SNC), hígado, bazo y ganglios linfáticos. Aunque la presencia de grandes cantidades de células anormales en sangre periférica es la manifestación más notable en un examen de rutina debe recordarse siempre que las leucemias son trastornos primarios de la médula ósea.

2.5.2 Fisiopatología

La etiología precisa se desconoce.

En la fisiopatología podemos decir que la leucemia se presenta como resultado de una mutación somática de solo una célula progenitora hematopoyética (una sola clona) (1) (2).

La proliferación clonal anormal por medio de divisiones sucesivas a partir de una célula progenitora constituye el origen de las leucemias agudas tanto linfoides como mieloides. La falla de los mecanismos de control negativo de crecimiento clonal mutante casi siempre se debe a cambios en los genes reguladores lo que conduce a una sobre producción, sin sentido, de células incapaces de madurar y diferenciarse a células sanguíneas funcionales y parecen estar detenidas en una etapa de maduración específica. Escapan a la apoptosis y el efecto neto es la expansión de la clona leucémica (1) (2) (14).

Cada vez hay más evidencia de que la clona neoplásica se desarrolla a partir de una célula progenitora con una o más mutaciones genéticas las cuales afectan a la proliferación y diferenciación celular. El gen mutado se conoce como oncogen y su contraparte normal es el proto oncogen. Por tanto los oncogenes inician un proceso que termina en malignidad. Podemos mencionar por ejemplo la activación del oncogén MYC, ABL, BCL-2 y RAS, al igual que la formación de genes quiméricos como el BCR/ABL (en la LMC y LLA) o PML/RAR- α (en la LMA-M3) que probablemente son multifactoriales (2).

Dado que los genes de Ig y TCR son lugares donde se producen múltiples recombinaciones del ADN en los linfocitos B y T y que además estos lugares aumentan su actividad transcripcional después de la recombinación somática, los genes de otros “loci” pueden translocarse de forma anómala con estos loci lo que originaría una *transcripción anómala* de los primeros. En las neoplasias de los linfocitos B y T suelen translocarse protooncogenes junto a los loci de los genes de Ig (en los cromosomas 14, 2 y 22) y los genes del TCR. Dichas translocaciones cromosómicas suelen acompañarse de un aumento de la transcripción de oncogenes, lo que se cree que es uno de los factores que favorecen la aparición de las de las leucemias/linfomas (14).

Los protooncogenes son genes normales de las células que suelen codificar proteínas que intervienen en la regulación de la proliferación, diferenciación y supervivencia de las células, así como de factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento y factores de transcripción. Estos protooncogenes están regulados muy estrechamente pero se alteran por: mutaciones o se introducen a las células por retrovirus RNA y presentan una *actividad aberrante como oncogenes*.

Existen factores leucemogénicos entre ellos están los factores externos como las radiaciones ionizantes, factores químicos como el benceno, fármacos el cloranfenicol e incluso retro virus el HTLV-1 y HTLV-2 que están relacionados con la leucemia (14).

2.5.3 Clasificación

Tradicionalmente se clasifica en dos amplios grupos:

Primero. Por su agresividad y tiempo de instauración de los signos y síntomas en **leucemias agudas (LA)** y **leucemias crónicas (LC)**. Las leucemias agudas están caracterizadas por la presencia de células inmaduras y por un curso rápidamente mortal si no es tratado. Las leucemias crónicas se asocian generalmente a leucocitos bien diferenciados (maduros) con un curso relativamente indolente.

Segundo. De acuerdo al origen de la clona, en **mieloides y linfoides**.

En base a esta clasificación se distingue cuatro tipos de patrones:

- Leucemia Linfoblástica aguda (LLA).
- Leucemia Linfocítica Crónica (LLC).
- Leucemia Mieloblástica aguda (LMA).
- Leucemia Mieloide Crónica (LMC).

La clasificación morfológica de las leucemias agudas es la que goza de mayor difusión y aceptación en el ámbito hematológico internacional, y fue elaborada en 1976 por el grupo cooperativo *Franco-Americano-Británico* (FAB), sujeta a ampliaciones y matizaciones en 1985 y 1991 con la ayuda de la inmunología y la citoquímica ultra estructural, se clasificó las LMA en 8 variedades (**M0**, M1, M2, M3, M4, M5, M6 y **M7**) y las LLA en tres “L1, L2 y L3” (1)(2).

La inmunología y la citoquímica han proporcionado valiosa información en el diagnóstico y pronóstico de las leucemias agudas. Una caracterización inmunofenotípica se lleva a cabo mediante una amplia batería de anticuerpos monoclonales que reaccionan con antígenos bien definidos, específicos para una determinada línea celular o incluso para un estadio madurativo concreto, otros son menos restrictivos, pero cuando se emplean como parte de una serie también prestan una valiosa contribución diagnóstica y pronóstica.

Es así que el Grupo Europeo para la Caracterización Inmunológica de las Leucemias (EGIL) del inglés *European Group for the Immunological Classification of leukemias* (EGIL), proponen una clasificación de las leucemias agudas linfocíticas en base a criterios inmunológicos que delimitan los distintos estadios de diferenciación a partir de los que se ha desarrollado el clon leucémico. La *Leucemia Linfoblástica Aguda de Linaje B* que de acuerdo al grado de maduración de los linfoblastos B se clasifican en cuatro entidades (fig. 6)

Pro-B (EGIL G-I); *Común* (EGIL G-II); *Pre-B* (EGIL G-III); *B madura* (EGIL G-IV)

Figura 6

<u>CLASIFICACIÓN EGIL</u>	
1995	
Línea B (CD19+ y/o cyCD79a+ y/o cyCD22+)¹	
Pro-B (B-I)	No expresión de otros marcadores
Común (B-II)	CD10+
Pre-B (B-III)	cyIgM+
B madura (B-IV)	Kappa o Lambda+ (superficie)

(cy = citoplasmático)

La Leucemia Linfoblástica Aguda de Linaje **T** se han clasificado en cuatro subtipos, según el grado de maduración de los linfoblastos en *Pro-T*, *Pre-T*, *T cortical* y *T madura* (15).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera actualmente que las LLA y los linfomas linfoblásticos (tanto de estirpe B como T) son una misma entidad biológica. La **leucemia** se definiría como aquella enfermedad que se manifiestan por una afectación extensa de la MO, acompañado de un gran número de células tumorales en sangre periférica y el **linfoma**, cuando el proceso esta confinado a una masa extra medular que aparecen como masas tisulares (16)

Por tanto en la clasificación REAL existen cuatro grandes grupos según el inmunofenotipo:

- Neoplasias de precursores de células B (células B inmaduras)
- Neoplasias de células B periféricas (células B maduras)
- Neoplasias de precursores de células T (Células T inmaduras)
- Neoplasias de células T periféricas y células citolíticas naturales (neoplasias de células T maduras y de células NK).

2.5.4 Epidemiología

En los niños la leucemia aguda es la causa mas frecuente de muerte por cáncer.

En cuanto a la epidemiología en la población general la incidencia de la leucemia aguda es de 1 a 10 casos / 100 000 habitantes y año (17)

La leucemia linfoblástica aguda es principalmente una enfermedad de la infancia; de todos los casos en niños aproximadamente el **80 %** corresponde a la **LLA** y el 20 %

a las LMA, dentro de las LLA las del tipo B es la que mayor incidencia tiene 80 al 85% y la LLA-B común es el subtipo de mayor incidencia.

En datos de la Unidad de Biología Celular (UBC) de La Paz – Bolivia en las leucemias linfoblásticas agudas infantiles la LLA-B corresponde al 84% y la LLA-T a 15.7% (Dra. Torres, Dr. Amaru - UBC).

2.6 Leucemias Agudas y el Inmunofenotipo

La inmunocitología tiene como objetivo la detección, la identificación y la localización de diversos componentes celulares por medio de anticuerpos marcados (por ejemplo con enzimas, fluorocromos).

El inmunofenotipo es la caracterización celular por medio de AcMo marcados con diferentes fluorocromos y detectados con un equipo: el citómetro de flujo.

La detección de Ags inicialmente se realizó por la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) a nivel de microscopia de fluorescencia, y posteriormente por inmunohistoquímica (inmunoperoxidasa o inmuno fosfatasa alcalina-APPAP) sobre células fijadas. En los últimos años la citometría de flujo ha adquirido gran difusión debido fundamentalmente a su rapidez, objetividad y facilidad para emplear dobles y hasta cuatro marcajes directos, incluida la detección de antígenos citoplasmáticos y la separación física de una población celular en estudio. Permite además caracterizar diferentes estadios madurativos.

La citometría de flujo que empezó como método de investigación y que lo sigue siendo, en la actualidad, en Bolivia se aplica en la rutina clínica fundamentalmente en onco-hematología y en el seguimiento de pacientes con VIH.

El diagnóstico de leucemia aguda se lo hace utilizando criterios clínicos y de laboratorio. El análisis inmunofenotípico tiene como objetivo:

- El asignar el linaje a la proliferación blástica ya establecida en el examen morfológico.
- Permite realizar la clasificación inmunológica (EGIL) de las leucemias agudas.

- identificar inmunofenotipos únicos que pueden ser de utilidad en la detección de la enfermedad mínima residual (EMR) o leucemia residual, al distinguir poblaciones normales de precursores hematopoyéticos, de proliferaciones leucémicas de baja carga tumoral.

El panel de anticuerpos utilizados para la línea linfocítica B son CD19, cCD22 (c=citoplasmático), cCD79a, por el estirpe T CD3, CD2, CD5, para la línea mielocítica cMPO, CD13 y CD33, para la línea eritrocítica Gly A y para el estirpe megacariocitario son CD41 y CD61.

Además de asignarle el linaje existen otros marcadores que aparecen o disminuye su expresión a medida que la célula va madurando, en el caso de la línea B, CD34, TdT, CD20, CD22, CD10, cIgM, sIg (s=de superficie) que nos permiten tener una secuencia normal de maduración en cuanto a su inmunofenotipo.

2.7 Inmunofenotipo en la LLA-B

Con el desarrollo de AcMo y la citometría de flujo se logró una clasificación inmunológica publicada en 1995 para las leucemias linfoblásticas agudas por el EGIL que dividió en cuatro grupos a la LLA-B.

Este grupo de leucemias se definen por la expresión de, al menos, dos de los marcadores más tempranos de la línea B: CD19, cCD22 o cCD79a. En función de la expresión de diversos marcadores de la línea B y otros no específicos de línea, se estableció estas cuatro categorías según la mayor o menor diferenciación de la clona proliferante (18). Cuadro 1.

LAL Pro-B (EGIL-B1) (CD10-) Corresponde a la proliferación de células B más inmaduras. El fenotipo positivo para alguno de los marcadores de línea B y en la mayoría de los casos expresan CD34. A menudo no expresan otros marcadores de diferenciación B, y por definición no expresan CD10 (18). Su incidencia en niños es de 5%-6% en especial en niños menores de un año (18) (19).

Las LLA-proB están asociadas con una alta incidencia de re-arreglos en el gen MLL - t (4; 11) - y con la coexpresión de antígenos mieloides (CD15 y el NG2) en un 63% - 75% (10) (18) (19).

LAL-común (EGIL B-II) (CD10+) Se consideran de buen pronóstico, alcanzándose entre un 85 – 95% de remisiones a largo plazo en niños. El fenotipo suele ser positivo cCD22, cCD79a, y por definición CD10+, cμ- y slg-. La mayoría de los casos también son positivos CD34 y TdT. La expresión de CD22 y en mayor medida CD20 aumenta con el grado de madures de la clona leucémica. En comparación con los grupos EGIL-III, EGIL-IV y niños menores de 1 año este presenta mejor pronóstico. Este sub tipo esta asociado a la t(9;22) con una expresión homogénea de CD34 y CD10, heterogénea y débil de CD38, expresión de antígenos mieloides CD13 y reaccionan con el anticuerpo KOR-SA3544. Las leucemias TEL-AML1 son generalmente del fenotipo común-B con expresión intensa de CD10, frecuentemente negatividad para CD45 a menudo hiperdiploides (10) (18).

LAL- pre B (EGIL-BIII) Este grupo se define por la positividad para las cadenas pesadas μ citoplasmáticas en presencia o no para reactividad para CD10. La reactividad para TdT y CD20 es variable y CD34 suele ser negativo. Este tiene peor pronóstico que los grupos EGIL I y II, que generalmente se asocia de manera particular a la presencia de t (1; 19). La traslocación comporta la creación de un gen fusión E2A-PBX1 y se asocia al fenotipo clμ+, CD19+, CD10+, CD24+ y CD9+, expresión variable de CD20 y negatividad para CD34, el fenotipo tiene valor predictivo del 25% para esta traslocación (10) (18).

LAL-B (EGIL B-IV) Representan del 2- 5% de todas las LLA (18) y equivalen el linfoma de Burkitt en su fase leucémica. El fenotipo es positivo para CD19, CD20, CD22 y CD24, y también para CD10+/- . El diagnóstico diferencial se establece basándose en la positividad para slg, con mayor frecuencia de tipo IgM (18).

En la actualidad se considera una enfermedad curable, aun que de pronostico intermedio en niños. Los pacientes presentan reordenamientos *c-myc* en el cromosoma 8, presentando la clásica t (8; 14) (q24; q22) o las variantes t (2; 8) o t (8; 22) cuando las traslocaciones afectan a los genes de las cadenas pesadas o las cadenas ligeras κ o λ , respectivamente.

CUADRO 1

Inmunofenotipo de LAL de línea B

	Pro-B	Común	Pre-B	B madura
CD19	+	+	+	+/+d
cyCD79a	+	+	+	+
cyCD22	+	+	+	+
CD22	+/-	+/-	+	+/-
TdT	+	+	+	-
CD10	-	++	+/-	-/+
CD34	+	+/-	-	-
CD20	-	+/-	+	+
CD24	-	+	+	+
CD38	++	+	+/-	+/-
CD45	+/-	-/+	+	+
cIgM	-	-	+	- / d
sIg	-	-	-	+

Resaltamos que expresión de CD34 y CD38 en la célula pro-B, la expresión fuerte de CD10 en la etapa común, la disminución de CD10 y aparición de cIgM en pre-B, ausencia de TdT, CD34 con expresión de CD19 y sIg en la célula B madura.

(Tomada de fundaleu)

A continuación vemos en la figura 7 la cinética de los marcadores en las células B durante su maduración y que se tiene que tener siempre presente en el estudio de las LLA-B. CD34 y TdT se hacen negativos al detectarse μ , a medida que el linfoblasto se diferencia CD19, CD20 y CD22 se incrementan y CD10 Y CD38 van disminuyendo.

Figura 7



*Cambios fenotípicos durante la diferenciación del
Linfoblasto en medula ósea normal (tomada de fundaleu)*

2.8 Enfermedad Mínima Residual

Las tasas de curación en niños con LLA han aumentado en los últimos años hasta el 80%, aproximadamente (20). Ha sido posible gracias a la mejoría en el diagnóstico, a la identificación de factores pronósticos y a la utilización de tratamientos adaptados al grupo de riesgo de cada paciente. Los protocolos de tratamiento básicamente constan de una terapia de inducción a la remisión, consolidación y mantenimiento. *La respuesta al tratamiento de inducción es uno de los factores pronósticos más importantes* (20) (21) (22) (23).

Actualmente se consigue remisión citológica en más del 95% de los niños afectados de LLA (20), y se considera como tal la presencia de menos del 5% de células blásticas en medula ósea después del tratamiento de inducción. Un porcentaje aún importante de estos niños recaerá posteriormente entre el 20% y el 30% (10). Esto quiere decir que algunas células leucémicas han sido resistentes al tratamiento administrado, persisten en pequeñas cantidades en médula ósea y no son identificables a microscopía óptica, a estas células se las llama EMR o leucemia mínima residual. Hay varios métodos para reconocerlas en función de las anomalías

moleculares, cromosómicas, reordenamientos genéticos o *características inmunológicas* (20) (21).

Las translocaciones cromosómicas se identifican habitualmente solo en una pequeña proporción de pacientes; por tanto, son poco útiles para el estudio de la EMR. El estudio de reordenamientos de los genes que codifican la síntesis de inmunoglobulinas o los receptores de células T por técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha sido muy utilizada; tiene elevada sensibilidad, detectando una célula de entre 10^4 - 10^5 . La citometría de flujo ofrece una detección de la leucemia mínima residual fácilmente aplicable a la práctica clínica por su rapidez y fácil metodología. Se basa en estudios multiparamétricos con el uso de tres o cuatro fluorocromos a la vez que permiten la detección en el momento del diagnóstico de diferentes “inmunofenotipos leucémicos”; esto es, *infidelidades de línea, asincronismos madurativos, marcadores ectópicos o fenotipos infrecuentes* en la población linfocitaria normal.

Con esta aproximación se pueden detectar marcadores “diana” en el 90% al 95% de los enfermos (20) (25).

La identificación precoz de la EMR identifica a los pacientes en riesgo de recaída que pueden beneficiarse de una modificación en su tratamiento o por otro lado puede evitar efectos secundarios en niños de bajo riesgo que no necesitan tratamientos agresivos.

Sin embargo esto implica el uso de varios marcadores y de tres a cuatro fluorocromos diferentes para conformar paneles como por ejemplo los utilizados por Krampera M. y col (2006) en pacientes adultos con LLA-B y CD38/CD10/CD34/CD19, CD45/CD10/CD34/CD19, CD58/CD10/CD34/CD19, Tdt/CD10/CD34/CD19, CD13/CD10/CD34/CD19, CD15/CD10/CD34/CD19, CD66c/CD10/CD34/CD19. CD33/CD10/CD34/CD19, CD65/CD10/CD34/CD19 que son fenotipos que no se encuentran en medula ósea normal, o que son de muy baja frecuencia.

En general cifras de EMR $\geq 1 \times 10^{-3}$ (0,1%) se asocia a un riesgo elevado de recaída. La presencia de $\geq 1\%$ de EMR al final del tratamiento de inducción parece discriminar un grupo de muy mal pronóstico (10).

3. ANTECEDENTES.

En cuanto al inmunofenotipaje de la leucemia linfoblástica aguda tipo B (LLA-B) la Dra. Vianed Marsán Suárez y col (26) en Cuba (1983-1999) encuentran las siguientes frecuencias en las LLA-B, 48 (81,3 %) fueron común, 7 (11,9 %) pro-B, 3 (5,1 %) pre-B y 1(1,7 %) B, además observan una mayor sobrevida en pacientes de linaje B en relación con los de linaje T y mieloide, con una diferencia significativa ($p < 0,001$).

En un estudio realizado en Chile por la doctora Myriam Campbell B. y col.(27) en 100 niños (1992-1998), encontraron una distribución por sexo y edad: 62% eran varones y 60% de los casos tenían edad entre 1 y 6 años, el hemograma que estuvo siempre alterado, destacando anemia normocítica normocrómica en 90%, trombopenia en 72%, neutropenia en 62%, En el mielograma se encontró infiltración por blastos $> 25\%$ en todos los pacientes; estos fueron catalogados como linfoblastos L₁ 80%, L₂ 17%, 3% tenía blastos no clasificables. De acuerdo al inmunofenotipo se catalogó como común al 80%, pro B 8%, pre B 6% y T 6%; no se presentó ningún caso de LLA-B madura.

En el estudio realizado en MO de infantes (menores de un año) con LLA por la Dra. Patricia Venegas en Costa Rica (2001), encontraron la t (4; 11) como único hallazgo citogenético, con un inmunofenotipo “**pro-B**” (**CD19+**, **CD34+**, HLA-DR+, **CD10-**), con co-expresión de Ag mieloides en un 75% (CD15+) (19).

En cuanto a la utilización de la citometría para la detección de la EMR (umbral de positividad del 0.01%) citamos a Bastida PV y col. en su estudio Leucemia Mínima Residual: Nuevo concepto de remisión completa, en España (1999 – 2003), de 53 niños analizaron las muestras postinducción, postconsolidación, a 6 y 11 meses de mantenimiento, al final del tratamiento y 3 meses después. Encontraron una sobrevida libre de enfermedad del 92%, y ningún paciente con EMR (-) postinducción ha presentado recidiva, por lo que concluyen que el estudio de la EMR es imprescindible y deben estar incluidos en todos los protocolos de tratamiento actuales para niños

con LLA, y que su utilidad radica en el impacto pronóstico de la respuesta al tratamiento de inducción (28).

En el estudio “A simplified flow cytometric assay identifies children with acute lymphoblastic leukemia who have superior clinical outcome” la Dra. Coustan-Smith demuestra que existe correlación en la utilización de un panel amplio y complejo de marcadores y un ensayo simple de 3 marcadores (CD19, CD10 y/o CD34) en la detección de la EMR el día 19 de iniciado el tratamiento de inducción, en 380 muestras y con un umbral de 0,01%, además demuestran su reproducibilidad al realizar este programa en Brasil, por lo que demuestran que este ensayo es útil y pueden aplicarse en laboratorios de recursos limitados en pacientes niños con LLA-B (29).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los avances ocurridos en las últimas décadas en diferentes campos relacionados con la citometría de flujo han permitido realizar una correcta caracterización de las distintas poblaciones linfoides en MO normal y además profundizar en el conocimiento de las características inmunofenotípicas de las células leucémicas de la LLA. Este conocimiento ha permitido establecer las similitudes y diferencias entre el linfoblasto normal y el linfoblasto leucémico, que han sido empleados con éxito para la clasificación de las LLA al diagnóstico y la valoración de la enfermedad mínima residual en pacientes con remisión completa.

Frente a estos avances es necesario que el profesional bioquímico participe en el análisis de las leucemias por este método que cuenta con los criterios de confiabilidad y practicabilidad en el diagnóstico, clasificación y detección de la EMR.

5. JUSTIFICACION

Considerando los datos epidemiológicos, la LLA representa un 80% de las leucemias agudas y un 80 al 85% de las leucemias linfoides agudas del niño son de estirpe celular B (2) (16) (29), por tanto nuestro estudio se realizara en 20 muestras de aspirado medular de niños con LLA-B, con un panel básico CD19/CD10/CD34/CD3

para su clasificación, diagnóstico y además analizar su utilidad en un seguimiento futuro de estos pacientes durante su tratamiento con este panel.

6. OBJETIVOS

- Determinar en 20 muestras de MO de niños con LLA-B la frecuencia de los subtipos inmunológicos, mediante citometría de flujo
- Analizar la utilidad del panel CD19/CD10/CD34/CD3 en el seguimiento de pacientes con LLA-B.

7. MATERIAL Y METODOS

7.1 Diseño o tipo de estudio

El presente estudio es de corte transversal y descriptivo.

7.2 Área de Estudio

Onco-Hematología.

7.3 Población Estudiada

El estudio se realizó en niños que acudieron consecutivamente a la Unidad de Biología Celular del Departamento de Ciencias Funcionales de la Facultad de Medicina – UMSA de la ciudad de La Paz.

Se incorporan al estudio sujetos que reúnan los siguientes criterios:

7.3.1 Criterios de inclusión

- Pacientes de ambos sexos.
- Pacientes con una edad menor a 18 Años.
- Pacientes que presenten LLA-B.

7.3.2 Criterios de exclusión

- Pacientes mayores de 18 años.
- Pacientes con LMA- M0
- Pacientes con LLA-T

7.4 Tamaño muestral

El tamaño muestral es de 20 muestras de MO con LLA tipo B, obtenidos de niños, durante un año de estudio, junio del 2005 a junio del 2006.

7.5 Lugar

El estudio se realizó en el **Laboratorio de Inmunofenotipo** de la Unidad de Biología Celular - Departamento de Ciencias Funcionales de la Facultad de Medicina – UMSA de la ciudad de La Paz - Bolivia.

7.6 Material

7.6.1 Equipos

- o **Citómetro de Flujo:** “FACSTRACK” equipado con láser de ion argón de 488 nm refrigerado por aire, para la excitación fluorescente, el ordenador y software asociado (**Pint a Gate, Cell Quest, Facs Comp**).

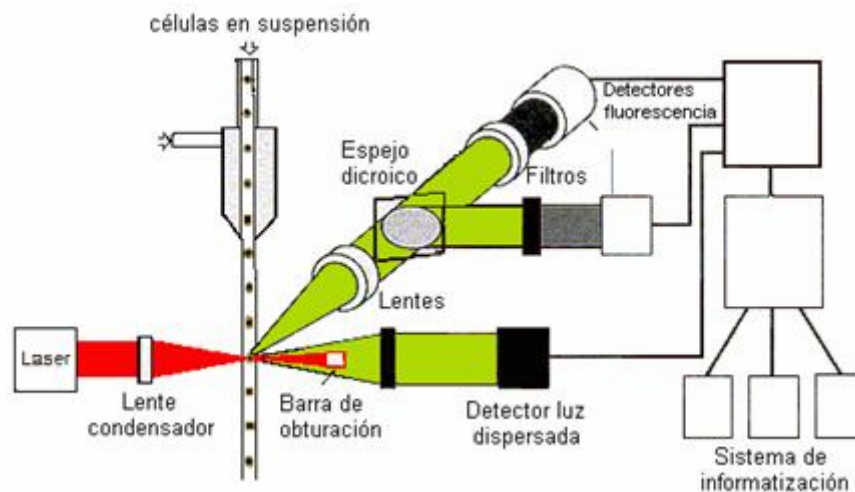
A. Fundamento

Un citómetro de flujo es un instrumento automatizado asistido por computadora que determina las características físicas o antigénicas de cada célula con una fuente de luz láser. Un láser es un tubo hueco, cerrado, que contiene un gas inerte, como argón, helio o neón. Con el paso de una corriente eléctrica a través de este tubo lleno de gas se produce una luz de láser intensa, monocromática producto de la excitación de las moléculas gaseosas inertes a

un nivel de energía mas alto que cuando estos iones excitados retroceden a su estado natural de entropía baja, la energía se libera en forma de un fotón de luz. La luz en el tubo láser se intensifica con una serie de espejos y por ultimo se emite como un haz de luz estrecho de una sola longitud de onda especifica. La longitud de onda de la luz monocromática es característica del gas dentro del tubo láser.

Cuando se aspira una muestra dentro de una tubería que contiene una corriente de líquido que se mueve hacia la periferia (la cubierta) y una corriente central de líquido (la muestra con las células), la corriente de la muestra se centra en forma hidrodinámica en una sola línea de partículas o células mediante el ajuste de la presión externa sobre la cubierta y la velocidad de la corriente. Esto hace que las células se muevan en una sola hilera delante del haz láser, como cuentas en un cordón en el centro de la corriente del líquido. El término utilizado para el movimiento de dos líquidos que pasan entre si sin mezclarse es el de **flujo laminar** (30).

FIGURA 8. ESQUEMA DE UN CITÓMETRO DE FLUJO



Esquema general de un citómetro de flujo que muestra los sistemas de flujo, óptico y electrónico, sistemas necesarios para el análisis de células y moléculas en suspensión.

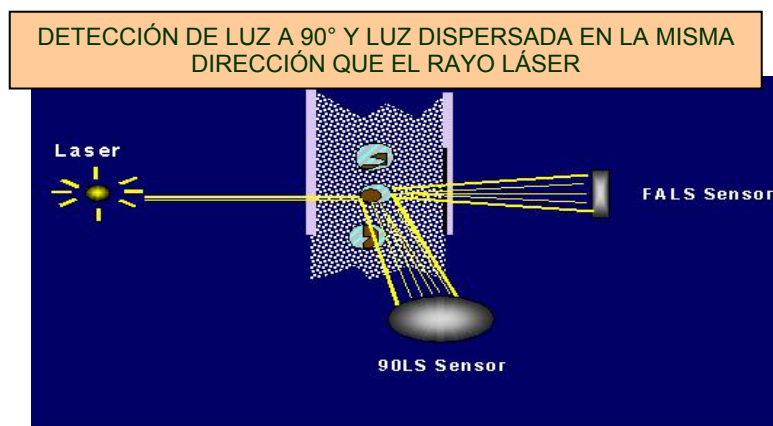
El haz láser se enfoca en células individuales mediante una serie de lentes y prismas. Esta luz puede medirse a medida que se dispersa fuera de las células, o puede excitar partículas fluorescentes adheridas a las células.

Una serie de detectores de luz denominados *fotodiodos* o *tubos foto multiplicadores* colecta la luz dispersa alrededor de la células y a través de ellas, la luz colectada proveniente de las células que no se trataron con sustancias químicas o colorantes exógenos refleja las **características celulares nativas o intrínsecas** que incluyen la dispersión frontal de la luz (en inglés, forward-angle Light scatter: FALS, FS o FSC) y la dispersión lateral (en inglés, side scatter: SS o SSC).

FSC se refiere a la luz colectada por un fotodiodo a lo largo del eje del haz láser y se relaciona con el tamaño celular. SSC se refiere a la luz desviada a través de las células o alrededor de ellas en un ángulo de 90° al haz láser y revela información acerca de la densidad celular, la complejidad nuclear o la granularidad celular.

Es así que la luz desviada fuera de las células nativas por lo general se convierte en un diagrama de dispersión donde cada punto representa una sola célula de un tamaño y densidad determinado (ver fig. 9).

FIGURA 9.

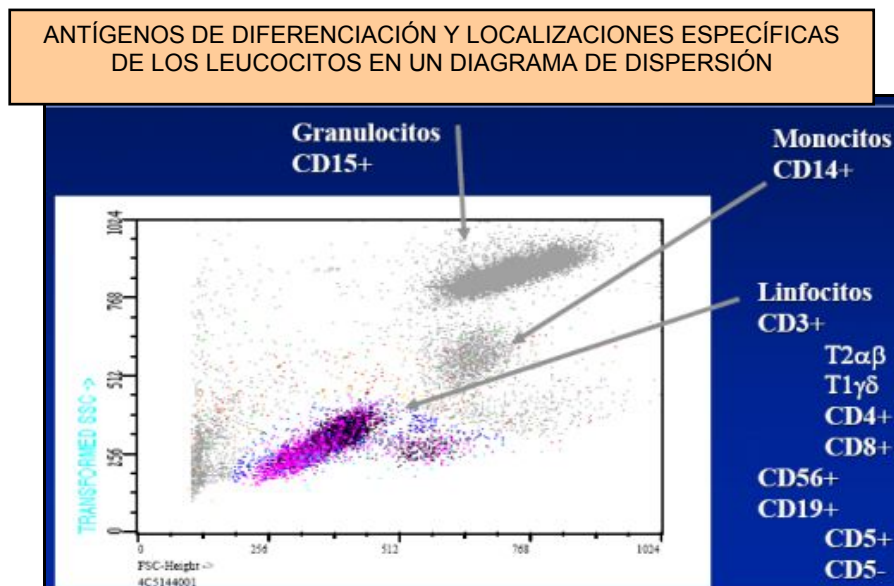


Dibujo en el cual un haz de rayo láser es colectado hacia la cámara de flujo donde interactúa con cada célula en suspensión, este haz es detectado a

90° del punto de incidencia (SSC- dispersión lateral- LS sensor) y también el haz dispersado frontalmente (FSC- FALS Sensor)

Los linfocitos, monocitos, granulocitos y otras células neoplásicas aparecen en localizaciones específicas en el diagrama de dispersión, que se utiliza para aislar en forma electrónica o seleccionar poblaciones celulares adecuadas para el análisis (ver fig. 10).

FIGURA10.



En la figura se muestra un diagrama de puntos (Dot Plot SSC Vs. FSC) de los leucocitos, su ubicación, los CD que los pueden identificar y la escala lineal de este diagrama.

Las **características celulares extrínsecas** como los Ag de superficie, citoplasmáticos o el contenido de DNA nuclear, deben evaluarse con reactivos o colorantes exógenos, fluorocromos. Entre los fluorocromos utilizados para estudiar estas características extrínsecas mencionamos al isotiocianato de fluoresceína (FITC; verde), la ficoeritrina (PE; rojo) y la proteína clorofila peridina (PerCP; amarillo-rojo) que se encuentran conjugadas con anticuerpos monoclonales.

Al excitarse por el haz láser los colorantes emiten una longitud de onda, mas larga y con menos energía, específica de luz que se detecta con una serie de filtros y foto multiplicadores. Luego por medio de una computadora se convierte la señal eléctrica en un histograma o un diagrama de puntos (Dot Plot) como vemos en la figura 10.

- **Centrifugadora:** Hettich industria Alemana
- **Agitador Vortex:** VELP scientifica. 10-40 Hertz.

7.6.2 Reactivos

- Combinación de AcMo, CD3; CD19; CD10; CD34, conjugados con fluorocromo que permitan la identificación de las subpoblaciones celulares de las que se pretenda realizar el recuento.
- Ficoll Hypaque
- Solución Hank's o PBS
- Solución fisiológica
- Solución PBS
- Lidocaína al 2%
- Alcohol yodado
- hipoclorito de sodio 5%

7.6.3 Material de laboratorio

Para el estudio inmunofenotípico utilizamos tubos de plástico de 5 mL y 15 mL (FALCON-BD), micro pipetas (20 µL – 50 µL) y puntas, jeringas de 5 mL, tubos de 5 mL con EDTA-K₃, porta objetos, cronómetro, pipetas pasteur de plástico, pizetas, gradillas, pinzas, parafilm.

7.6.4 Material biológico

I. Sangre Periférica

Se tomaron 3 mL de sangre por punción venosa a nivel del plexo del codo (mediana basílica o mediana cefálica) y recogida en un tubo con anticoagulante EDTA-K₃.

II. Médula ósea

El aspirado de médula ósea (AMO), se realizó a nivel del esternón (punción esternal), o en la tuberosidad de la cresta iliaca pósterio superior. Se tomaron 2 mL de sangre medular y se recogió en un tubo con EDTA-K₃.

7.7 Método

7.7.1 Determinación del % de CD19/CD10/CD34/CD3

I. Preparación de la Muestra sangre medular (AMO)

- En un tubo con la numeración del paciente colocar una cantidad de 2mL sangre medular y diluir con solución Hank's 1:4 en tubos falcon 15 mL
- Se transfiere a tubos falcon que contienen 3mL de Ficoll.
- Centrifugar los tubos a 1000 r.p.m. por 30 minutos.
- Extraer la capa formada en la interfase, con sumo cuidado, a tubos falcon.
- Resuspender con 10 mL de solución Hank's para el lavado de las células.
- Nuevamente centrifugar a 1000 r.p.m. por 5 minutos.
- Se aspira el sobrenadante; de acuerdo al sobrenadante se reconstituye con solución Hank's para luego mezclar con vortex.

- Se tomarán 40 μ L de muestra y 40 μ L de tripán azul, homogenizar y esperar 2 minutos.
- Cargar la cámara Neubauer.
- En el microscopio a 40X realizar el conteo de células viables (no coloreadas) y las no viables (coloreadas).
- Se efectúan los cálculos por mL y por el volumen total al cual se ha diluido la muestra. Del mismo modo el porcentaje de viabilidad.
- Es necesario tener en cuenta para el efecto del análisis que el número de células no debe ser menor de 200 000 (ideal 300 000) y el porcentaje de viabilidad superior al 70%.

II. Marcaje con anticuerpos monoclonales (AcMo)

A. Marcaje con AcMo de antígenos de membrana

- Se tomarán volúmenes de muestra (100 μ L) que contengan el número de células requeridos, para ser colocados en tubos de plástico del citómetro, previamente rotulados con el número de muestra y el Ac que ha de emplearse.
- Adicionar 20 μ L del anticuerpo respectivo.
- Incubar 30 min. A 4 °C protegidos de la luz.
- Añadir 3 ml de solución PBS para centrifugar por 3 min. a 3 400 r.p.m.
- Se efectúa el aspirado, dejando un volumen de 50 μ L, el pellet obtenido es reconstituido con 1 mL de solución PBS.
- Homogenizar la muestra con vortex, la muestra se encuentra apta para ser corrida en el citómetro de flujo.

III. Análisis por Citometría de Flujo

- **Preparación del citómetro**, instalar la última calibración (Facs Comp) para dispersión de la luz (FSC/SSC en escala lineal).
- Fijar un valor bajo para el umbral para reducir al mínimo los restos celulares (cuadrante inferior izquierdo).
- Agitar manualmente los tubos durante 10 segundos inmediatamente antes de su adquisición.
- **Adquisición de los datos** (se adquieren 10 000 eventos). La sensibilidad del método depende del número de eventos adquiridos (la sensibilidad del método es de 10^{-4} - 10^{-5}).
- **Análisis de los resultados** con el paquete “Pint a Gate”.
- En la plantilla de análisis de los resultados se utilizarán los “*diagramas de puntos*” para la discriminación de la población celular de interés en el estudio.
- Selección del área de blastos.
- Determinación del porcentaje.
- **Cálculo de resultados**. Se considera positivo porcentajes > 20%.
- **Registro de resultados**.

7.8 Operacionalización de las variables

Variable	Definición	Operacionalización
Sexo	Características fenotípicas del sujeto	Mujeres, Varones
Edad	Edad cronológica que es referida.	Por intervalos: <2, 2-10 y de 10-18-
LLA-B	Positividad para CD19+ Y CD3-	En porcentajes positivo >20%

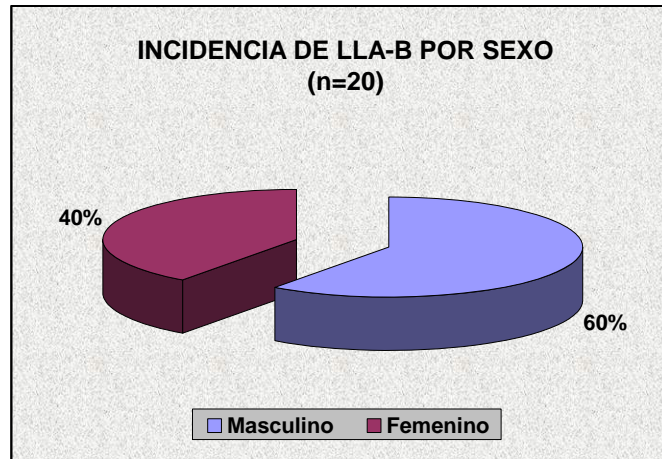
Sub tipos de LLA-B	Pro-B	CD19+CD34+ CD10-	En porcentajes Positivo >20%
	común-B	CD10+, CD19+	
	pre-B	CD19+, clgH	
	B	CD19+CD34- CD10	

8. RESULTADOS

Se estudiaron 20 niños de ambos sexos con LLA-B cuya edad esta comprendida entre 1 y 18 años de los cuales se ha determinado el porcentaje de CD3, CD19, CD10 y CD34.

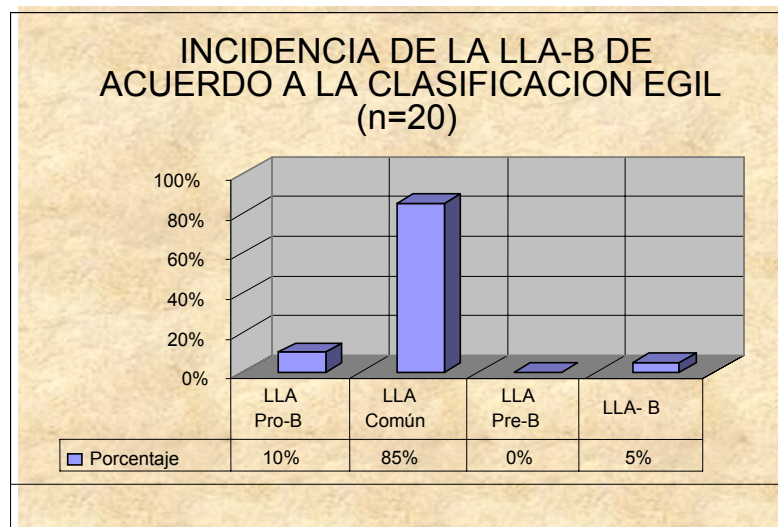
- De las muestras analizadas se ha encontrado 12 del sexo masculino que representa el 60% y 8 del sexo femenino que representa el 40% (fig. 11)

Figura 11



- De todas las muestras con LLA-B se diagnosticaron 17 (85%) como común-B, 2 como LLA pro-B (10%) y 1 como LLA-B (5%). Fig. 12.

Figura 12



- No se analizó el subtipo de LLA pre-B, dado que el estudio se realizó con marcadores de superficie y no así con marcadores citoplasmáticos.
- En lo que respecta a la edad encontramos una incidencia del 5% en niños menores de 2 años, del 50% en niños comprendidos entre 2 – 10 años y del 45% en niños que tienen entre 11 y 18 años. (Tabla 1)

TABLA 1

INCIDENCIA DE LLA -B CLASIFICACION EGIL POR GRUPOS DE EDAD (n=20)					
LLA-B					
EDAD (años)	Pro- B	común B	Pre - B	LLA - B	%
<2	0	1	0	0	5%
2 – 10	1	8	0	1	50%
11 – 18	1	8	0		45%
PORCENTAJE	10%	85%	0%	5%	TOTAL 100%

- El análisis inmunofenotípico mostró que del 100% de sujetos CD19+ existe un 85% de CD10+, 55% de CD34+ y el 100% son CD3-.

Tabla 2.

PORCENTAJES POR MARCADORES CELULARES		
LLA-B		
(+) >20%	n(20)	%
CD19	20	100
CD10	17	85
CD34	11	55
CD3	0	0

- De las 11 muestras que presentaron CD34+ 2 fueron pro-B y 9 del tipo común-B. La población celular Pro-B presentó porcentajes de CD34+ entre 84% y 43%. En población celular común-B (CD10+) encontramos porcentajes entre 90% y 25% para CD34+. Tabla 3.

Tabla 3.- Expresión de CD34 en LAL-B

n=20	Pro-B	Común-B	Pre-B	LAL-B
CD34+ %>20%	2/20 84% ; 43%	9/20 (90% - 25%)	0	0
CD34-		8/20	0	1/20

9. DISCUSIÓN

En relación al sexo se observó 12 casos (60%) de sexo masculino y solamente 8 casos (40%) de sexo femenino, datos que coinciden con otros reportes Marsán et al, Campbell et al. Y Ruiz- Arguelles (26) (27) (14) como también lo indica la OMS.

En cuanto a la frecuencia de los subtipos de LLA-B según la clasificación EGIL encontramos un mayor porcentaje de pacientes con LLA-B común 85% seguido de un 10% diagnosticados LLA-B sub tipo Pro B y solo un 5% de los pacientes fue LLA-B, lo que confirma la conocida preponderancia del sub-tipo inmunológico común-B en niños.

Resientes estudios están demostrando que existe una relación entre el inmunofenotipo con la presencia de alguna alteración cromosómica/molecular específica, es así que la LLA-B con un fenotipo pro-B y la coexpresión de Ag mieloides (CD15) en algunos casos, se relaciona con la translocación t(4; 11) o lo que corresponde a nivel molecular a nivel molecular en el gen MLL sobre el cromosoma 11 q23 se fusiona con el gen AF4 en la región 4q21, produciendo un transcrito fusional quimérico MLL/AF4 (19).

En el caso del sub tipo inmunológico común-B se han descrito en la bibliografía que los pacientes con este fenotipo presentan con mayor frecuencia la t (9; 22) (18)

Por tanto el inmunofenotipo permite orientar la búsqueda de alteraciones citogenéticas o moleculares específicas de acuerdo al subtipo de LLA-B que presente el paciente.

En cuanto a la edad hubo una distribución similar en los grupos de edad entre 2-10 y 11 – 18 años con 10 y 9 casos respectivamente y solamente un caso dentro del grupo < a 2 años.

En el análisis de los marcadores utilizados vemos que dentro del 100% de muestras CD19+ ninguno dio positividad para CD3-, por lo que ninguno de los pacientes que ingreso al estudio presento una leucemia bifenotípica, el 85% de los pacientes fueron CD10+ y un 55% de los pacientes son CD34+. Recientemente fue descrito por Constan-Smith y col. un ensayo que permite hacer un seguimiento de los pacientes con LLA-B CD19+/CD10+ y/o CD34+ (29) con igual valor pronostico que el detectar EMR con un panel mas amplio y mas costoso, considerando los resultados mostrados en la tabla 2, solo un 85% de los pacientes tendría la posibilidad de hacerles un seguimiento con este panel que reflejaría la resistencia o sensibilidad de los blastos al tratamiento administrado, lo que implica un gran beneficio tanto para el medico como para el paciente.

CD34+ no es un marcador de línea pero si un marcador de madures. En cuanto a la expresión de CD34 en LLA-B encontramos positividad en los 2 subtipos pro-B y en 9 casos de los 17 común-B, los porcentajes encontrados en ambas poblaciones fueron muy variables, altos 84% (pro-B) y 90% (común-B), bajos 43% (pro-B) y 25% (común-B).

En comparación con las diferentes etapas de maduración del linfoblasto en MO normal el linfoblasto leucémico, de nuestra población estudiada, presenta mucha variabilidad ya que podemos encontrar porcentajes entre un 25% al 90% en el subtipo común-B, lo que demuestra que el linfoblasto leucémico dentro de un subtipo inmunológico presenta diferentes etapas de maduración y también que no todas las muestras con este subtipo inmunológico son CD34+ 8 fueron negativas.

10. CONCLUSIONES

- Mediante el método de la citometría de flujo determinamos que de las 20 muestras con LLA-B el 10% se encuentra dentro del subtipo inmunológico pro-B, el 85% fue diagnosticado común-B y el 5% LLA-B propiamente dicha.
- Determinamos de las 20 muestras analizadas que la LLA-B se presenta con ligero predominio en el sexo masculino con un 60% frente al 40% del sexo femenino.
- En el análisis del panel CD19/CD10/CD34/CD3 utilizado en este estudio concluimos que es útil en el diagnóstico y clasificación de las LLA-B ya que suma al método, que ya tiene sensibilidad y especificidad, practicabilidad en cuanto a costo/ beneficio tanto para el médico como para el paciente, además permite hacer el seguimiento con un valor pronóstico comparable con el de la detección de la enfermedad mínima residual en un 85% de nuestros pacientes con LLA-B.

11. RECOMENDACIONES

Creemos que en nuestro medio es necesario realizar el diagnóstico de las leucemias por los diferentes métodos como la citología, citometría de flujo, citogenética y biología molecular para una correcta caracterización de las leucemias ya que esto permite al médico realizar mejores tratamientos.

12. BIBLIOGRAFIA

1. Shirlyn B. McKenzie, Hematología Clínica, 2da Edición, México, Editorial el Manual Moderno, 2000.
2. J. Sans- Sabrafen, Hematología Clínica, 4ta edición, Madrid – España, Harcourt S.A., 2001.
3. Hernández PR, Dorticós EB, Medicina regenerativa. Células madre embrionarias y adultas, Rev. Cub. Hematología, 2004; 20(3)
4. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Watson JD, Biología molecular de la Célula, 3ra ed. Barcelona, Omega, 1996.
5. Lanza F. Caracterización y función del antígeno CD34. En: Carlo-Stella C y col. Célula CD34 positivo biología y relevancia clínica. Instituto de Hematología. Universidad de Ferrara.
6. Maynadie M y col. Clinical value of the quantitative expression of the three epitopes of CD34 in 300 cases of acute myeloid leukemia. Haematol. 2002; 87: 803-795.
7. Sánchez FM, González-Amaro R. Moléculas de adherencia se encuentra en el URL: <http://www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular/inmunologia/inmunologia/tema08/etexto08.htm>
8. Carlo-Stella C, Lemoli RM. Organizzazione Cellulare dell'emopoiesi, Cellule CD34+, Università di Parma- Università degli Studi di Bologna.
9. Béne MC, Gilbert C, Faure and the GEIL, CD10 In Acute Leukemias. Haematol. 1997; 82; 210-205.
10. Jiménez-Madrid MC, De Miguel-Valencia A, Club Español de citología Hematológica: El linfoblasto en el contexto de la leucemia linfoblástica aguda, Haematologica (Ed. Esp.), vol 87; supl. 1; 2002, pg. 258-277.
11. Abul k. Abbas, Andrew H. Lichtman. Inmunología celular y molecular, 5ta Ed. Madrid-España. Editorial Elsevier. 2004.
12. Roitt I, Brostoff J, Male D. Inmunología. Londres: Mosby, 1997.
13. Regueiro J. – Carlos López Larrea. Inmunología. Madrid-España. Editorial Médica Panamericana. 1996.

14. Ruiz – Arguelles GF, San Miguel JF. Actualización en Leucemias. México. Editorial Médica Panamericana. 1996.
15. Fernandez JM, Rañada, Alegre A. Terapia en Oncohematología. 3ra Ed. Madrid. Elsevier. 2005.
16. Cotran. Patología Estructural y Funcional. 6ta Ed. México. Mc Graw – Hill Interamericana Ediciones. 2000.
17. Hernández DM, Colldeforns GJ, Cobo-Rodríguez T, Hernández FN. Leucemias Agudas en el Adulto. Medicine. 9ª serie. unidad temática 21. noviembre 2004.
18. Ortuño FJ, Orfao A. Aplicación de la citometría de flujo al diagnóstico y seguimiento inmunofenotípico de las leucemias agudas. Med Clin (Barc) 2002; 118(11): 423-436.
19. Venegas P. Translocación t(4;11) en médula ósea de infantes con leucemia linfocítica aguda. Rev. méd. Hosp. Nac. Niños (Costa Rica) v.36 n.1-2 San José 2001.
20. Coustan-Smith E. y col. Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2000; 96: 2696-2691.
21. Vidriales MB y col. Minimal residual disease in adolescent (older than 14 years) and adult acute lymphoblastic leukemias: early immunophenotypic evaluation has high value. Blood. 2003; 101: 4700-4695.
22. Coustan-Smith E. y col. Use of peripheral blood instead of bone marrow to monitor residual disease in children with acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2002; 100: 2402-2399.
23. Jiann-Shiuh CH. y col. Identification of novel markers for monitoring minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2001; 97: 2119-2115.
24. López RA, Raya SJ, Martínez BP, Cabrera RR, Rodríguez JR. Estudio de la enfermedad mínima residual en el cáncer infantil. Oncología (Barc.). 2004; 27: n10.
25. Krampera M. y col. Methodological approach to minimal residual disease detection by flow cytometry in adult B-lineage acute lymphoblastic leukemia. Haematologica/ the hematology journal. 2006; 91(8): 1112-1109.

- 26.** Marsán VS y col. Inmunofenotipaje y supervivencia global de pacientes pediátricos con leucemias agudas, Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter 2002; 18(1):34-40.
- 27.** Campbell MB, Ferreiro MC, Tordecilla J, Joannon P, Rizzardini C, Rodríguez N. Leucemia linfoblástica aguda. Características al diagnóstico en 100 niños. Rev. chil. pediatr. v.70 n.4 Santiago jul. 1999.
- 28.** Bastida PB, Palacio CG, Solsona MR, Ortega JA, Sánchez de Toledo J. Leucemia mínima residual: nuevo concepto de remisión completa. An Pediatr (Barc) 2005; 63(5): 390-395.
- 29.** Constan-Smith y col. A simplified flow cytometric assay identifies children with acute lymphoblastic leukemia who have superior clinical outcome. Blood. 2006; 108: 97-102.
- 30.** Rodak. Hematología Fundamento y aplicaciones clínicas. 2da edición. Buenos Aires. Médica Panamericana. 2004.

