

**EXPRESION DE MARCADORES MIELOIDES CD13 Y/O CD33 EN
LEUCEMIAS LINFOBLASTICAS AGUDAS EN NIÑOS Y ADULTOS**

MARIA ANGELICA CESPEDES ARDILA

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS
CARRERA DE BACTERIOLOGIA
Bogotá, D.C.
Noviembre 2000**

EXPRESION DE DOS MARCADORES MIELOIDES CD13 Y /O CD33 EN
LEUCEMIAS LINFOBLASTICAS AGUDAS EN NIÑOS Y ADULTOS

MARIA ANGELICA CESPEDES ARDILA

Tesis de grado presentada como requisito parcial para
optar por el título de Bacterióloga

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS
CARRERA DE BACTERIOLOGIA
Bogotá, D.C.
Noviembre 2000

**EXPRESION DE DOS MARCADORES MIELOIDES CD13 Y /O CD33 EN
LEUCEMIAS LINFOBLASTICAS AGUDAS EN NIÑOS Y ADULTOS**

MARIA ANGELICA CESPEDES ARDILA

DR CARLOS SAAVEDRA

DIRECTOR

Dra MARTHA MESA¹

CODIRECTORA

DR. HUGO DÍEZ

JURADO

Dra. NELLY SUSANA RUEDA

JURADO

DR CARLOS CORREDOR

DECANO ACADEMICO

Dra AURA ROSA MANACERO

**DIRECTORA DE CARRERA DE
BACTERIOLOGÍA**

A Dios, por ser nuestra guía,
A mis padres y hermano
por ser un apoyo constante
e incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento a:

Dr. Carlos Saavedra, Especialista en Patología y director de la Investigación, por sus valiosas orientaciones y aportes para el desarrollo de este trabajo.

Dra. Martha Mesa, profesora de la carrera de Bacteriología en la Pontificia Universidad Javeriana, por su constante apoyo y orientación en este trabajo.

Dra. Mónica Patricia Londoño, por su constante ayuda y motivación en este trabajo.

Dra. Amparo Buendía, por permitir el acceso a datos clínicos de algunos pacientes de la población pediátrica.

A mis padres, por su apoyo incondicional en todas las etapas del proyecto.

A mis amigos y compañeros, por su constante motivación en este trabajo

Artículo 23 de la resolución N°13 de Julio de 1964
"La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus
alumnos en sus tesis de grado"

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCION	1
MARCO TEORICO	5
2.1. MEDULA OSEA Y FORMACION DE CELULAS SANGUINEAS	5
2.1.1. Marcadores de superficie de los leucocitos	7
2.1.2. Granulopoyesis	7
2.1.3. Monopoyesis	9
2.1.4. Linfopoyesis	10
2.1.4.1. Precursores de las células B	11
2.1.4.2. Precursores de las células T	15
2.2. METODOS USADOS EN LA INMUNOTIPIFICACION DE LEUCEMIAS	17
2.2.1. Inmunohistoquímica	18
2.2.2. Inmunofluorescencia y Citometría de flujo	18
2.3. LEUCEMIA AGUDA	19
2.3.1. Fisiopatología	20
2.3.2. Características clínicas	20
2.3.3. Criterios diagnósticos	21
2.3.4. Laboratorio básico	22

2.3.5. Clasificación de leucemias agudas	23
2.4. LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA	24
2.4.1. Clasificación morfológica	24
2.4.2. Nuevos esquemas de clasificación para leucemia linfoide aguda	26
2.4.3. Leucemia linfoide aguda de linaje B	27
2.4.3.1. Leucemia linfoide aguda Pre-pre B	27
2.4.3.2. Leucemia linfoide de células Pre B	28
2.4.3.3. Leucemia linfoide aguda Pre B transicional	29
2.4.3.4. Leucemia linfoide aguda de células B madura	30
2.4.4. Leucemia linfoide aguda de linaje T	30
2.5 LEUCEMIA AGUDA CON EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS LINFOIDES Y MIELOIDES	33
3. JUSTIFICACION	39
4. OBJETIVOS	40
5. MATERIALES Y METODOS	42
5.1. Población a estudio	42
5.2. Inmunofenotipo	42
5.3 .Selección de casos de LLA con expresión de CD13 y/o CD33	43
5.3.1. Relación del subtipo inmunologico con la expresión de marcadores mieloides CD13 y/o CD33	43
5.3.2. Estudio morfológico	44
5.3.3. Análisis citoquímico	44
5.4. Recuento de leucocitos y blastos	44

5.5. Análisis estadístico	45
6. RESULTADOS	46
6.1. Descripción general	46
6.2. Población seleccionada	47
6.3. Coexpresion de marcadores mieloides en leucemia linfoide aguda	47
6.4. Clasificación morfológica FAB	49
6.5. Categorías de expresión de los marcadores mieloides	50
6.6. Citoquímica	52
6.7. Expresión de CD79a	54
6.8. Recuentos leucocitarios y porcentaje de blastos en leucemia linfoide aguda con presencia de marcadores mieloides	54
6.9. Leucemias Bifenotípicas	55
7. DISCUSION	59
8. CONCLUSIONES	64
9. RECOMENDACIONES	66
10.BIBLIOGRAFIA	67

LISTA DE TABLAS		Pag
Tabla 1	Clasificación morfológica de las LLA	26
Tabla 2	Leucemia aguda: subtipos inmunológicos y genética	32
Tabla 3	Criterios utilizados por el St.Jude Children's research Hospital para definir LLA My+, LMA Ly+ y verdaderas Leucemias mixtas	36
Tabla 4	Subtipos inmunológicos de LLA	46
Tabla 5	Casos de leucemia linfoide aguda con marcadores mieloides de acuerdo con edad y subtipo inmunologico	48
Tabla 6	Categorías de expresión de marcadores mieloides y subtipos Inmunológicos	51
Tabla 7	Promedio de leucocitos en las tres categorías de expresión de los marcadores mieloides	55
Tabla 8	Porcentaje de blastos a los 28 días de tratamiento	56
Tabla 9	Leucemias bifenotípicas	58

LISTA DE GRAFICAS

Pag

Gráfica 1	Hematopoyesis Normal	6
Gráfica 2	Desarrollo granulocítico	8
Gráfica 3	Desarrollo monocítico	9
Gráfica 4	Desarrollo de células B	15
Gráfica 5	Desarrollo de las células T	17
Gráfica 6	Coexpresión en niños	47
Gráfica 7	Coexpresión en adultos	48
Gráfica 8	Clasificación FAB de las LLA My+ en niños	49
Gráfica 9	Clasificación FAB de las LLA My+ en adultos	49
Gráfica 10	Expresión de CD13 y CD33 en LLA	50
Gráfica 11	Porcentaje de positividad para CD13	51
Gráfica 12	Porcentaje de positividad para CD33	52
Gráfica 13	Expresión de MPO en LLA My+	53
Gráfica 14	Determinación de PAS en LLA My+	53
Gráfica 15	Expresión de CD79a en blastos de LLA My+	54
Gráfica 16	Recuento de Leucocitos al diagnóstico en LLA My+	55
Gráfica 17	Porcentaje de blastos a los 28 días de tratamiento vs Coexpresión de marcadores mieloides	56

Gráfica 18	Porcentaje de reducción de blastos a los 28 días de tratamiento en adultos	57
Gráfica 19	Porcentaje de reducción de blastos en LLA en niños a los 28 días de tratamiento	57

RESUMEN

Las leucemias agudas son un grupo de enfermedades que resultan de la transformación neoplásica de progenitores hematopoyéticos, que se caracterizan por la proliferación incontrolada de células muy inmaduras (blastos), que infiltran la médula ósea (desplazando la hematopoyesis normal) y ocasionando una falla medular, que puede manifestarse como síndrome anémico, infeccioso y hemorrágico.

Las Leucemias agudas han sido divididas en dos grandes grupos de acuerdo a la clasificación Franco-Británico-Americano(FAB) que son: Linfoides y Mieloides, sin embargo hoy en día resulta significativo el porcentaje de casos de leucemias linfoides agudas que expresan marcadores tanto mieloides como linfoides, este tipo de leucemias comúnmente se denominan "leucemias mixtas agudas" o "leucemias bifenotípicas".

Durante el período de Abril de 1999 a Junio del 2000, en el Instituto Nacional de Cancerología se encontraron 46 casos de Leucemias linfoides agudas con expresión de marcadores mieloides y 2 casos de verdaderas Leucemias bifenotípicas. La expresión de marcadores mieloides se presentó en los subtipos inmunológicos: Pre-pre B, Comun, Pre B y T tardía; la morfología

que predominó en la población pediátrica fue la L1 mientras que en la población adulta fue la L2.

De las tres categorías de expresión de marcadores mieloides, los casos CD33+/CD13- presentaron recuentos elevados de leucocitos, los casos CD13+/CD33+ presentaron recuentos leucocitarios normales y aquellos casos CD13+/CD33- presentaron recuentos leucocitarios bajos.

La respuesta a la inducción en los niños con leucemia linfocítica aguda que expresaron marcadores mieloides fue del 90%, en los adultos fue del 38%, y en los dos casos de Leucemias bifenotípicas ninguno respondió al tratamiento a los 28 días, además de los 6 casos con expresión de CD33, ninguno consiguió remisión completa a los 28 días de tratamiento, lo que sugiere que la presencia de este marcador es de pronóstico adverso.

1. INTRODUCCION

Las leucemias agudas son un grupo de enfermedades que resultan de la transformación neoplásica de progenitores hematopoyéticos, que se caracterizan por la proliferación incontrolada de células muy inmaduras (blastos), que infiltran la Médula ósea (desplazando la hematopoyesis normal) y ocasionando una falla medular, que puede manifestarse como síndrome anémico, infeccioso y hemorrágico.

Las Leucemias agudas han sido divididas en dos grandes grupos de acuerdo con la clasificación del grupo Franco-Británico-Americano (FAB) que son: Linfoides y Mieloides; a su vez el grupo de las linfoides se clasifica morfológicamente en L1, L2 y L3, mientras que las mieloides morfológicamente y citoquímicamente se dividen en M0,M1,M2,M3,M4,M5,M6 y M7, de acuerdo a la clasificación FAB.

Sin embargo, el desarrollo de los anticuerpos monoclonales y de la citometría de flujo ha hecho posible al análisis la detección de fenotipos de células Leucémicas de acuerdo con la expresión de antígenos de superficie y citoplasma y de enzimas nucleares. Mucho se ha aprendido acerca de la diferenciación normal de células T y B de estudios inmunológicos de Leucemia Linfóide Aguda; es por ello que ahora es posible definir los estadios de maduración de los linfocitos y los granulocitos usando

anticuerpos monoclonales y pruebas moleculares que identifican la expresión de marcadores de varios linajes celulares (Cabrera M 1990). La determinación del fenotipo indica que la Leucemia Linfocítica Aguda presenta subtipos inmunológicos de acuerdo con su origen y estadio de maduración: B (pre-pre B, pre B, B común y B madura) y T (temprana, intermedia y tardía), mientras que para las Leucemia Mieloide Aguda, el inmunofenotipo es más un apoyo que una clave diagnóstica, ya que la mayoría de ellas se diagnostican con base a la morfología y la citoquímica (Goetzman E 1993). Es de especial interés, el porcentaje de casos de leucemias linfoblásticas agudas que expresan marcadores tanto mieloides como linfocíticos; este tipo de leucemias comúnmente se denominan "leucemias mixtas agudas", para las cuales se han recomendado diferentes nomenclaturas de acuerdo con la literatura encontrada: (1) Leucemia mixta aguda con dos poblaciones distintas de células blásticas (mieloide y linfocítica), (2) Una sola población de células blásticas con marcadores de linaje mieloides y linfocíticos (expresión bifenotípica) y (3) Transformación blástica de un linaje celular a otro (Neame P et al. 1985).

En el momento y según el grupo de pediatría del St.Jude Children's Research Hospital, se recomienda clasificar las Leucemias Agudas con expresión de otros linajes de la siguiente manera: (1) Leucemia Linfocítica Aguda de precursores B con expresión de antígenos mieloides, (2) Leucemia Linfocítica Aguda de precursores T con expresión de antígenos mieloides,

(3) Leucemia Mieloide Aguda con expresión de antígenos linfoides y (4) Verdaderas Leucemias de linaje mixto.

En leucemias agudas en las cuales los blastos expresan ambas características linfoides y mieloides, reflejan que es una buena razón para creer que las células leucémicas no son perfectamente réplicas de las células normales de las cuales han sido derivadas (Cabrera M 1990).

Esta heterogeneidad de linaje ha tratado de ser explicada con base en la expresión de genes aberrantes ó transformación maligna de células progenitoras pluripotentes capaces de diferenciarse en ambos linajes mieloide y linfoide (Cabrera M 1990).

Greaves propuso que las células leucémicas pueden mostrar asincronía en la expresión fenotípica en comparación con las células normales; él sugiere que en lugar de ello existe una infidelidad de linaje, o lo que se ha llamado promiscuidad de linaje (Cabrera M 1990).

El significado clínico de la expresión de antígenos mieloides en Leucemia Linfoide Aguda ha permanecido en controversia. Muchos estudios han reportado respuesta pobre en niños con Leucemia Linfoide Aguda con expresión de marcadores mieloides o Leucemia Aguda de linaje mixto, sin embargo otros han encontrado que la respuesta a tratamiento es similar en Leucemia Linfoide Aguda con antígenos mieloides y Leucemia Linfoide Aguda sin expresión de estos antígenos mieloides (Putti C et al 1998), (Ching P et al.1993) Por el contrario en la población adulta, muchos autores describen que la existencia de antígenos mieloides en Leucemia Aguda es

de pronóstico adverso (Killick S et al 1999). Por ello es importante identificar en el Instituto Nacional de Cancerología estos casos, para que en el futuro se pueda hacer un mejor diagnóstico, tratamiento, seguimiento del paciente y identificación de la enfermedad mínima residual.

2 . MARCO TEORICO

EXPRESIÓN DE DOS MARCADORES MIELOIDES CD13 Y/O CD33 EN LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA

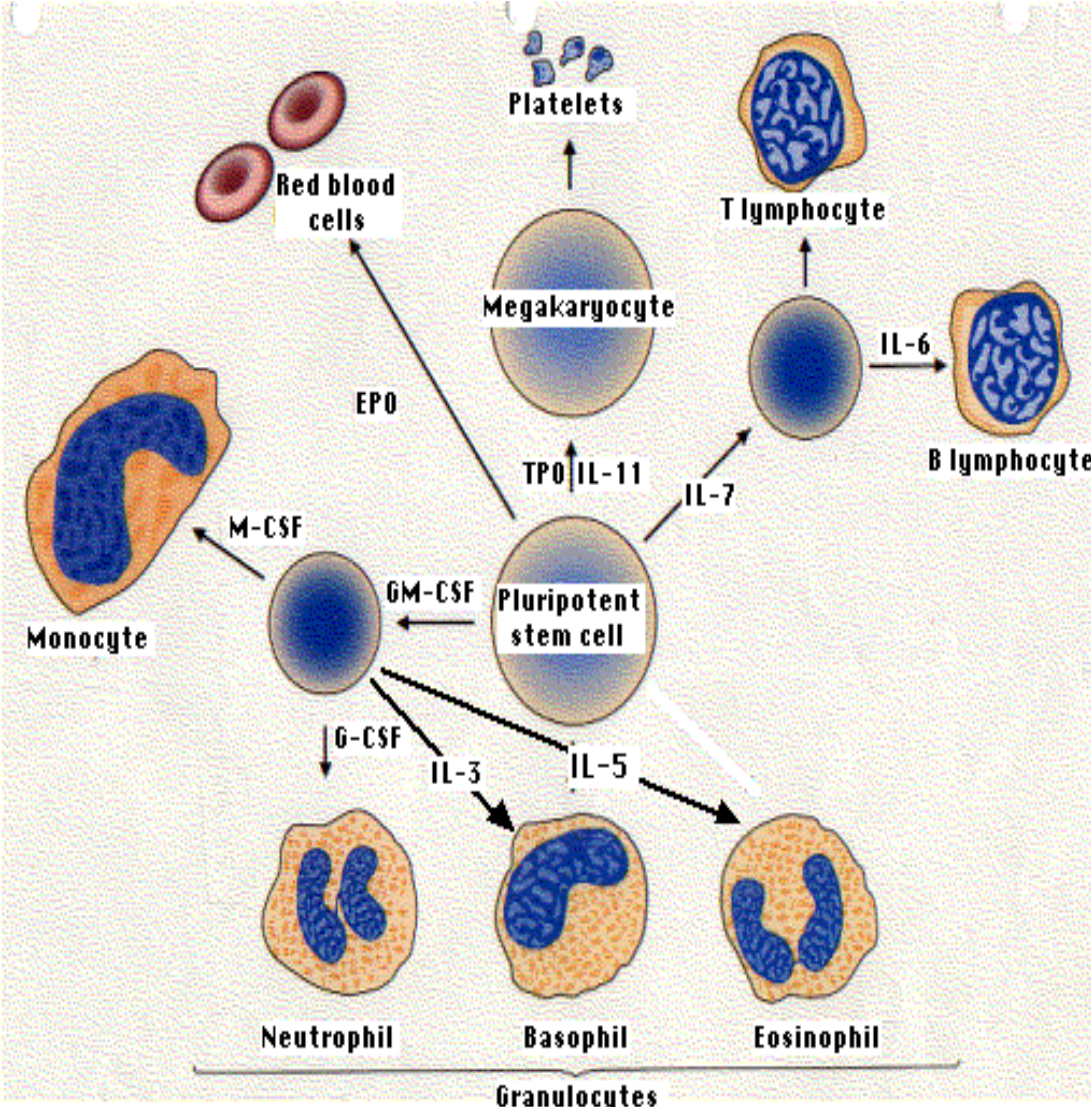
2.1. MÉDULA ÓSEA Y FORMACIÓN DE LAS CÉLULAS SANGUÍNEAS

Hematopoyesis (poiesis = formación) es el término usado para describir la formación, diferenciación y maduración de todos los tipos celulares de la sangre (eritrocitos, granulocitos, monocitos, linfocitos etc.) a partir de una célula madre pluripotencial (*Stem cell*), que tiene lugar en el tejido hematopoyético, principalmente en la médula ósea (Fawcett D, 1995). (Gráfica No. 1).

La hematopoyesis comienza desde el decimonoveno día después de la fertilización en el saco vitelino del embrión humano. Cuando el hígado fetal se convierte en el sitio principal de producción de células sanguíneas, más o menos al tercer mes de la vida embrionaria, el saco vitelino abandona su papel en la hematopoyesis. Para este momento, la hematopoyesis comienza también en menor grado en bazo, riñón, timo y ganglios linfáticos. Estos últimos continúan como sitio importante de linfopoyesis toda la vida; pero la producción de sangre en hígado, bazo, riñón y timo se suspende o disminuye conforme la médula ósea se vuelve activa, y para el sexto mes de

la gestación ya es el sitio primario de la hematopoyesis. Continúa como origen primario de células sanguíneas después del nacimiento y durante toda la vida.

Gráfica No. 1 Hematopoyesis Normal



2.1.1. Marcadores de superficie de leucocitos

Los linfocitos y otros leucocitos, así como sus precursores hematopoyéticos presentan patrones característicos de moléculas de superficie y citoplasma que pueden ser aprovechadas como marcadores para distinguir y caracterizar distintas poblaciones celulares, dependiendo de su estadio de maduración (Jennings D et al, 1997). Esta caracterización se realiza mediante anticuerpos monoclonales (AcMo); cada anticuerpo monoclonal distingue un solo tipo de molécula, e incluso partes específicas y variantes de cada tipo de molécula, por lo tanto el análisis de la expresión de antígenos en el desarrollo y diferenciación de células linfoides puede ser acompañada por la citometría de flujo o inmunohistoquímica (Behm G et al 1999).

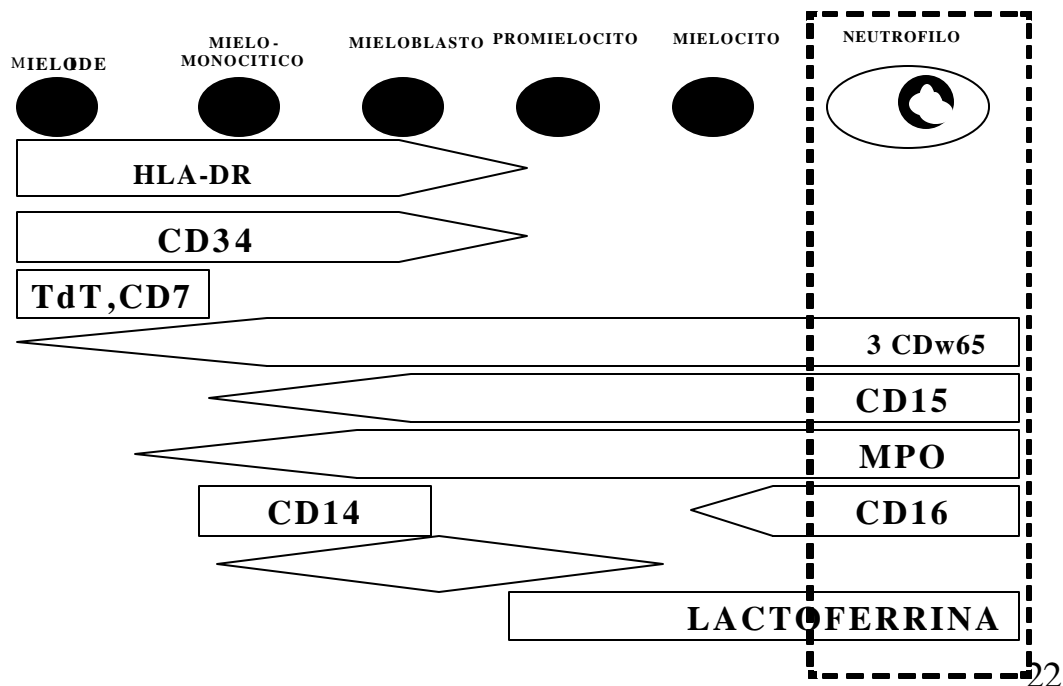
2.1.2. Granulopoyesis

Inmunológicamente los mieloblastos tempranos expresan CD34 y HLA-DR, pero se pierden en el estadio de promielocito, el CD13 es expresado en la superficie e incrementa con la maduración granulocítica, al contrario el CD33 disminuye su intensidad con la maduración, el CD65 es el primer antígeno detectado en precursores granulo-monocíticos que han perdido el CD34, su intensidad incrementa con la maduración de neutrófilos y monocitos (Fawcett D, 1995).

El antígeno CD117 es fuertemente expresado en blastos en mas del 85% de los casos de Leucemia Mieloide Aguda, y puede ser encontrada en todos los subtipos inmunológicos de LMA (Reuss B et al, 1994), (Di Noto et al, 1996), (Valverde L et al 1996), (Knankura Y et al, 1993).

Dos moléculas intracelulares, mieloperoxidasa y lactoferrina son marcadores empleados para la asignación de diferenciación mieloide. La mieloperoxidasa es un componente de los gránulos primarios o azurófilos; la lactoferrina es una enzima contenida en los gránulos secundarios o específicos, los mieloblastos y promielocitos tardíos contienen Mieloperoxidasa pero no Lactoferrina, mientras que los mielocitos, metamielocitos y neutrofilos producen mieloperoxidasa y lactoferrina. (Behm G et al 1999). (Gráfica No. 2)

Gráfica No.2 DESARROLLO GRANULOCÍTICO



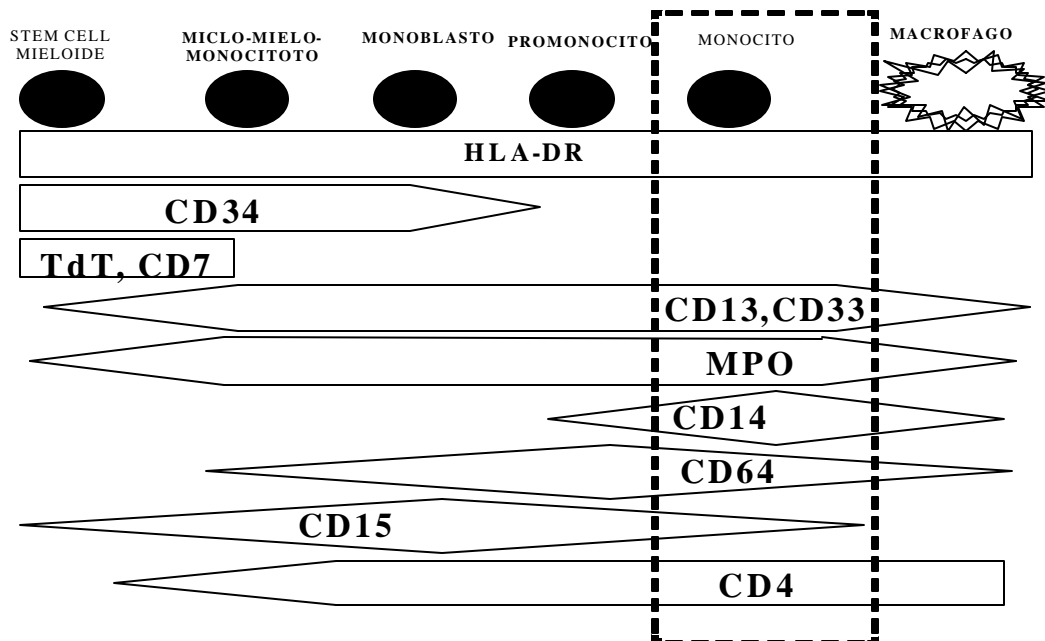
2.1.3. Monopoyesis

Inmunológicamente se detecta la expresión de CD13 en colonias granulo-monocíticas, su expresión desciende con el desarrollo monocítico; el CD14 es expresado fuertemente en monocitos y macrófagos pero débilmente en células monocíticas inmaduras.

El CD15 es detectado inicialmente en promonocitos y mielocitos tempranos e incrementa su expresión con la maduración monocítica, el CD33 y CD36 son claramente evidentes en todos los estadios de desarrollo monocítico, con raras excepciones, los blastos expresan CD65 (Behm G et al 1999).

(Gráfica No.3)

Gráfica No. 3 DESARROLLO MONOCITICO



2.1.4. Linfopoyesis

Se sabe claramente ahora que las células madre linfopoyéticas se originan en la médula ósea. Las células madre unipotenciales destinadas a la formación de linfocitos T abandonan la médula y son transportadas por la sangre hasta la corteza del timo, en donde proliferan y se diferencian a medida que se desplazan desde la corteza hasta la médula de este órgano. Durante su diferenciación adquieren un marcador de superficie (CD5) característico de todas las células T, mientras que los diferentes subgrupos de células T adquieren sus propios marcadores de superficie (Ching P et al,1993).

Por razones todavía no bien conocidas, durante su tránsito desde la corteza a la médula típicamente a través de los vasos sanguíneos y linfáticos, algunos linfocitos posteriormente se alojan en el bazo durante un corto período de tiempo antes de unirse a la reserva de linfocitos circulantes (Fawcett D .1995)

La génesis de los linfocitos B tiene lugar en muchos sitios, entre los que se ha incluido el tejido linfoide asociado con el intestino, el bazo y la médula ósea. Se ha aclarado, sin embargo, que la médula ósea es probablemente el principal lugar primario de la linfopoyesis B en los mamíferos (Fawcett D, 1995).

2.1.4.1. Precursores de las células B

Células de linaje B están presentes en múltiples tejidos en el desarrollo fetal. Sin embargo, del quinto al octavo mes de vida fetal, la médula ósea se convierte en el sitio exclusivo de linfopoyesis B. Las células Pre-B están presentes en la séptima a octava semana gestacional en el hígado (Tucker W, 2000), a través de un análisis en las semanas 18 y 20, el tejido fetal reveló que el desarrollo de las células B es multifocal: CD19+/ μ de superficie (-) de células precursoras B y CD19+/ μ de superficie (+) de células B inmaduras están presentes en médula ósea, hígado, pulmón, riñón y bazo, (Tucker W, 2000). La frecuencia de precursoras de células B en médula ósea fetal es mucho más alta que en médula ósea de adultos. La médula ósea de adultos difiere de la médula ósea fetal por la presencia de CD19+/ μ , δ de superficie (+) en células maduras B (Behm G et al 1999).

Desarrollo de estadios de células de linaje B

Las poblaciones más tempranas de linaje restringidas a progenitores linfoides están pobremente caracterizadas (Tucker W, 2000).

El progenitor linfoide común tiene la capacidad de desarrollarse en células T, B y NK, pero no tiene la capacidad de desarrollo en otros linajes que no sean

linfoides, tal como células eritroides y mieloides. Una batería de ensayos *in vitro* fueron empleadas para demostrar que progenitores CD34+/CD10+/CD45 RA+ son capaces de desarrollarse en células B, T, NK y células dendríticas, pero no en linajes mieloides ni eritroides. (Tucker W, 2000).

Un subsecuente estudio por (Tucker W,2000) muestra que progenitores linfoides CD34+/CD19- expresan receptor de interleuquina 7 (IL-7r) . Los progenitores linfoides CD34+/ IL-7r+ expresaron al mismo tiempo TdT+ y la mayoría expresaron CD10, pero que los CD34+/IL-7r-/CD19- son poblaciones que contienen frecuentemente la unidad formadora de colonias granulo-monocíticas.

Los progenitores linfoides comunes pueden diferenciarse en 1 a 2 progenitores linfoides inmediatos: células tempranas B o T/NK/DC. Células tempranas B son caracterizadas por la iniciación de rearrreglos DJ y la expresión de proteínas específicas de linaje B tales como (CD79a) (Tucker W, 2000). La existencia de una célula madre linfoide experimenta una reordenación del gen DJ y VDJ para formar un gen V funcional para la cadena pesada μ .

En síntesis estas células Pre B tempranas expresan en superficie CD10, CD19, CD24, CD34, HLA-DR, y en citoplasma CD22, CD79a, CD79b y TdT nuclear (Behm G et al 1999). La expresión del antígeno común leucocitario

CD45 es inicialmente débil, pero incrementa con la maduración de la célula (Behm G et al 1999).

Las células humanas pre-B son bien caracterizadas por la expresión de CD10, CD34 y CD19, TdT, IgM en el citoplasma o un bajo porcentaje en la superficie (Tucker W, 2000). Las células Pre B jóvenes son las primeras células en expresar CD22 en superficie, y aparentemente es seguido por el CD20 (Behm G et al 1999).

La diferenciación de una célula Pre-pre B en una célula pre B es caracterizada por la reducción de CD34 y TdT, y la adquisición de la cadena pesada μ citoplasmática compuesta de regiones variables y constantes en más del 95% de las células.

En condiciones normales la célula pre B, se encuentra en médula ósea e hígado fetal, no expresa IgM de membrana totalmente ensamblada y funcional porque la expresión en la superficie requiere la síntesis de cadenas pesadas y ligeras; por lo tanto las células pre B no pueden reconocer o responder al antígeno. Algunas de las cadenas pesadas μ de las células Pre-B, se asocian a proteínas llamadas "sustitutos de cadenas ligeras", que estructuralmente son similares a las cadenas ligeras pero no varían, es decir, no tienen regiones V y son idénticas en todas las células B. Los complejos formados por μ y los sustitutos de las cadenas ligeras pueden expresarse en la superficie celular pero a bajo nivel y se piensa que actúan en la estimulación de la producción posterior de cadenas ligeras κ o λ en la

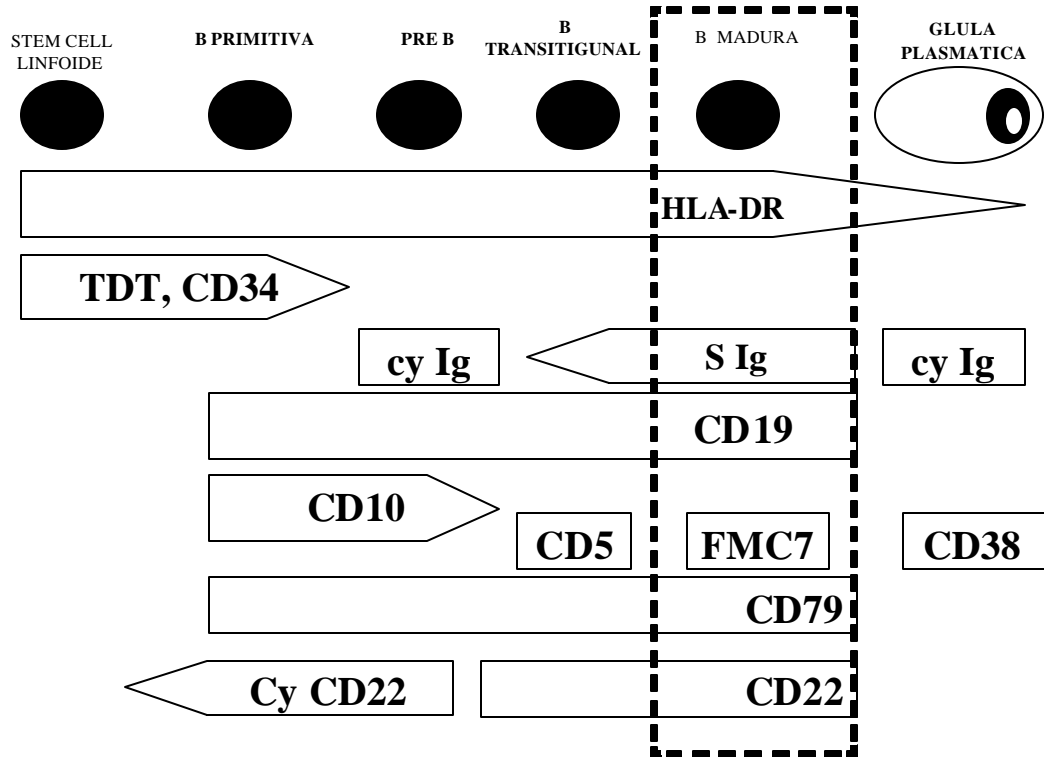
maduración de las células B (Tucker W, 2000), al final de este estadio desaparecen el TdT, el CD34 y el CD10 (Behm G et al 1999).

En el siguiente estadio identificable de célula B madura se producen además cadenas ligeras κ y λ . Estas se asocian con las cadenas pesadas μ y después las moléculas de IgM ensambladas se expresan sobre la superficie celular donde actúan como receptores específicos para el antígeno. La expresión de la IgM de superficie precisa su asociación con diversas proteínas (Tucker W, 2000).

Las células B maduras presentan el complejo receptor completo, el cual comprende la IgM de membrana asociada no covalentemente con dos heterodímeros de CD79a/CD79b. El CD79a y CD79b, vía dominios citoplasmáticos, sirve de señal de transducción de moléculas para construir la familia de kinasas Lyn y Fyn, fosfatidil inositol kinasa 3, y otras fosfoproteínas (Behm G et al 1999).

Los linfocitos B maduros migran de la médula ósea para poblar folículos linfoides en bazo, ganglios linfáticos, placas de Peyer y amígdalas. En estos tejidos linfoides secundarios, el gen de la cadena pesada de la inmunoglobulina de las células B sufre rearrreglos adicionales dando como resultado la producción de IgD o hay un completo cambio para la producción de IgG, IgA o IgE (Behm G et al 1999). (Gráfica No.4)

Gráfica No. 4 DESARROLLO DE CÉLULAS B



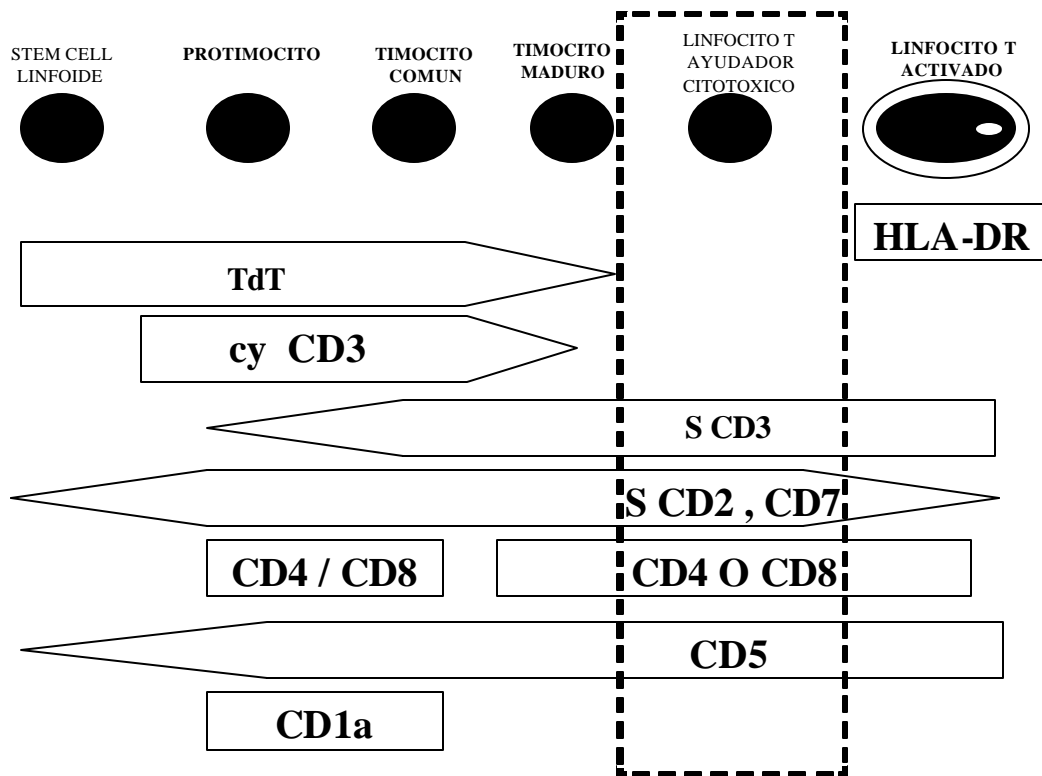
2.1.4.2. Precursores de las células T

El microambiente del timo es necesario para la diferenciación de las células T, los protimocitos migran desde la médula ósea o el hígado fetal hasta el timo, donde son procesados a células T funcionalmente maduras para circular en la sangre hasta los tejidos linfoides periféricos o secundarios (Ching P, 1993).

Durante la diferenciación las células linfoides T expresan dos diferentes tipos de moléculas de TCR; ambas consisten en un heterodímero

polimórfico de dos cadenas polipéptidas glicosiladas ($\alpha\beta$ o $\gamma\delta$) y un complejo monomórfico (CD3). Tradicionalmente, las células T han sido clasificadas de acuerdo con los cambios en la expresión de diferentes antígenos de superficie (Reinherz et al,1980), en los que se propone tres estadios de maduración tímica, los cuales se han utilizado para la clasificación de las LLA de linaje T; sin embargo, hay excepciones en este modelo para ambos timocitos normales y células leucémicas T, sugiriendo a continuación, que los casos que tienen fenotipo de timocitos tempranos expresan CD7, CD2, CD5 y CD3 citoplasmático aunque no expresan CD1, CD4,CD8 y CD3 de superficie. Aquellos con fenotipo intermedio son caracterizados por la expresión de CD7,CD5,CD1 y CD2 con una expresión variable de CD4 y CD8; el CD3 puede ser débilmente expresado en algunos casos (Ching P et al 1993). (Gráfica No.5)

Gráfica No.5 DESARROLLO DE LAS CÉLULAS T



2.2. MÉTODOS USADOS EN LA INMUNOTIPIFICACION DE LEUCEMIAS

El estudio de la expresión de antígenos de superficie por las células sanguíneas es la aplicación más extendida de la citometría de flujo. Esta técnica tiene particular interés en la determinación de subpoblaciones leucocitarias, cuya evaluación es indispensable para el estudio de leucemia, permitiendo su clasificación y filiación según criterios inmunológicos.

El análisis del fenotipo de células sanguíneas se puede determinar mediante la inmunohistoquímica y la inmunofluorescencia por citometría de flujo.

2.2.1. Inmunohistoquímica

Con la técnica inmunohistoquímica, la presencia de antígenos celulares es revelada por una reacción de un anticuerpo primario que es reconocido por un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa o fosfatasa alcalina; la mayor ventaja de la inmunohistoquímica es su excelente sensibilidad (Behm G et al 1999).

2.2.2. Inmunofluorescencia y Citometría de flujo

El linaje celular y el estadio de diferenciación son determinados por la expresión antigénica detectada por medio del empleo de anticuerpos monoclonales (AcMo).

Los métodos de inmunofluorescencia por microscopía son generalmente exitosos, pero la Citometría de flujo ofrece muchas ventajas como la medida cuantitativa de la expresión de antígenos y el análisis rápido de un gran número de células (Behm G et al 1999); Por otra parte, una desventaja de la citometría de flujo, especialmente con muestras que contienen un pequeño número de células malignas, es la dificultad para discriminar entre las células neoplásicas y las células normales, aunque el análisis basado en la

granularidad celular (Side Scatter) y la expresión del antígeno CD45 puede vencer esta limitación (Borowitz et al.1993).

2.3. LEUCEMIA AGUDA

Las leucemias agudas constituyen un grupo heterogéneo de neoplasias que afectan a las células madres hematopoyéticas con compromiso parcial o nulo. Difieren entre sí con respecto al origen celular, presentación clínica, evolución y respuesta al tratamiento. Cuando no se disponía de medidas efectivas, la distinción era irrelevante; no obstante, a medida que se lograron avances terapéuticos, la identificación de los subtipos adquirió cada vez más importancia. Al principio se otorgaba mayor significado al reconocimiento de la leucemia linfoblástica aguda (LLA) porque la medicación solía tener éxito en este caso y fracasar en las formas no linfoblásticas. Más tarde fue factible definir los estadios de la diferenciación de las estirpes linfoides y mieloide y caracterizar las leucemias correspondientes a estas etapas en relación con las propiedades biológicas y los requerimientos terapéuticos. El enfoque actual se basa en la determinación fenotípica de las células malignas en el momento del diagnóstico. Además de la categorización morfológica, esta evaluación podría demandar estudios citoquímicos, inmunológicos, inmunoquímicos, citogenéticos y de microscopía electrónica (Robbins et al 1995).

2.3.1. Fisiopatología

En la leucemia aguda se produce un bloqueo en la diferenciación de la célula madre neoplásica, en donde los blastos neoplásicos tienen un tiempo de generación alargado; por lo tanto, hay acumulación de blastos. La leucemia aguda presenta acumulación de blastos neoplásicos debido a dos situaciones: la primera por una expansión clonal de las células madre transformadas, y la segunda por el fracaso de la maduración hacia células terminales maduras.

La proliferación de blastos neoplásicos suprime a las células madre hematopoyéticas normales, lo anterior repercute clínicamente en escasez de eritrocitos, leucocitos y plaquetas normales (Robbins et al 1995).

2.3.2. Características clínicas

- Se presentan con un comienzo brusco, con una evolución sintomática inicial de 3 meses.
- Síntomas asociados a depleción medular, fatiga producida por la anemia, fiebre generada por un proceso infeccioso cuya causa de base es la ausencia de leucocitos maduros y hemorragias (petequias, equimosis, epistaxis, gingivorragia) secundaria a trombocitopenia.

- Dolor y sensibilidad a la presión en los huesos por expansión medular especialmente en el esternón, tibia y fémur.
- Infiltración a otros órganos manifestándose con linfadenopatías generalizada, esplenomegalia y hepatomegalia.
- Compromiso del sistema nervioso central principalmente en LLA, manifestándose de forma sintomática con cefalea, vómito y parálisis de nervios.
- Las patologías más frecuentes producidas por la ineficiencia inmunitaria son: la celulitis, neumonía e infecciones perirrectales y los agentes infecciosos predominantes son bacterias gramnegativas (*E. coli*, *Klebsiella* y *Pseudomona*) y hongos (*Cándida* y *Aspergillus*)
- En pacientes con hiperleucocitosis (>200.000) se presenta cefalea, confusión y disnea.

2.3.3. Criterios diagnósticos

- A. Corta duración de los síntomas que incluye fatiga, fiebre y sangrado
- B. Citopenia o pancitopenia
- C. Más de un 30% de blastos en médula ósea y/o en sangre periférica.

2.3.4. Laboratorio básico

Cuadro Hemático

- Anemia normocítica normocrómica
- Trombocitopenia: <100.000 plaquetas /ul
- Leucocitosis o
Leucopenia o
- Blastos circulantes>30%
- Leucemia aleucémica: pancitopenia con pocos blastos en sangre periférica y abundantes blastos en médula ósea.

Médula Ósea

- Hipercelular/normocelular/hipocelular
- Blastos se encuentran entre un 60-90% de las células de la médula ósea

Química Sanguínea

- Hiperuricemia
- Aumento de Deshidrogenasa láctica (LDH)

Otros

- CID(coagulación intravascular diseminada) algunas veces se presenta, encontrándose en el laboratorio:
 - ✓ Fibrinógeno disminuido
 - ✓ PT(Tiempo de protrombina) prolongado
 - ✓ Dímero D presente.

Líquido Cefalorraquídeo

- Blastos presentes
- Hipoglucorraquia

Radiología

- Ocasionalmente en la radiografía de tórax se observa una masa en mediastino (principalmente en las LLA de linaje T)

2.3.5. Clasificación de las leucemias agudas

Aunque ciertas observaciones clínicas no son definitivas, podrían ser útiles para distinguir las leucemias agudas linfoblásticas (LLA) y no linfoblásticas (LNLA). La incidencia de las primeras es mayor en los primeros años de la vida, mientras que las últimas predominan en grupos etarios más avanzados. Sin embargo, la edad no es un criterio adecuado porque la superposición es considerable.

Las leucemias agudas se clasifican de acuerdo con el presunto origen celular. En un caso dado la morfología sola no siempre permite reconocer las características de una u otra línea celular. La valoración precisa requiere estudios adicionales. Cuando se suplementan los parámetros morfológicos con datos citoquímicos e inmunofenotípicos la concordancia entre los profesionales experimentados es del 70% al 99%.

2.4. LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) resulta de la proliferación neoplásica de células linfoides inmaduras o (linfoblastos), los cuales se caracterizan por estadios tempranos de diferenciación de linajes de células B y T. La LLA es una de las enfermedades malignas más comunes en niños y constituye 80% de las leucemias en edades inferiores a los 15 años. En adultos (con edad superior a los 15 años), la LLA es relativamente menos común y constituye 15-29% de todos los casos de leucemia aguda.

2.4.1. Clasificación Morfológica

El grupo Franco-Británico-Americano (FAB) define los criterios morfológicos para la clasificación de LLA de acuerdo con el tamaño celular, configuración nuclear, cantidad y prominencia de los nucléolos, y monto relativo y aspecto del citoplasma, se distinguen tres subtipos de LLA: L1, L2 y L3.

Los linfoblastos L1 son pequeños, con proporción núcleo- citoplasmática elevada, núcleo regular o hendido y nucléolo poco llamativo o invisible. Los L2 son más grandes, con membranas nucleares irregulares, uno o más nucléolos notorios y citoplasma más abundante. Los L3 son idénticos a los del Linfoma de Burkitt, grandes, con núcleos redondeados a ovalados, nucléolos destacados y citoplasma muy basofílico; las vacuolas también pueden ser conspicuas.

Esta división tiene valor para preveer la duración de la remisión y la sobrevida. (Miller D et al. 1985), (Miller et al 1981), (Viana MB et al, 1980) En los pacientes con células L1 la evolución es más favorable que en aquellos con blastos L2. En la LLA L3 las remisiones son breves y es difícil lograrlas.

Los datos del FAB deben interpretarse con cautela. El primer problema es la facilidad con que se confunden los linfoblastos L2 con los mieloblastos M0 y M1; para distinguirlos, se requieren técnicas citoquímicas y en ocasiones inmunológicas. El segundo inconveniente es que alrededor del 10% de los pacientes con LLA exhibe blastos heterogéneos, algunos L1 y otros L2, si se emplea el tipo celular predominante para la categorización, se omite esta diversidad. Para cuantificar este hecho algunos autores aconsejan aplicar criterios morfológicos secuenciales (Miller D et al. 1981) Este concepto posee gran relevancia clínica porque en los niños con LLA L1 y 10% o más de células L2, el pronóstico es más reservado que en aquellos con menor porcentaje de blastos L2 (Miller D et al. 1985).

La frecuencia relativa de los subtipos varía con la edad. En el caso de la LLA pediátrica, el 70% es L1, el 18% L2 y el 3% L3 (McKenna R et al. 1979). En los adultos, el 67% de las LLA es L2. Esta cifra concuerda con la naturaleza más agresiva de la enfermedad en el adulto. No existe correlación entre los subtipos L1 y L2 y los fenotipos inmunológicos. Sin embargo, la mayoría de los linfoblastos L3 revela inmunoglobulinas de superficie que los identifican como células B. Además, en todas las células L3 se encuentra una

translocación cromosómica no al azar t(8;14) idéntica a la que advierte en el Linfoma de Burkitt (Tabla No. 1).

Tabla No. 1 Clasificación Morfológica de las LLA

CLASE	SUBTIPO	MORFOLOGIA
L1	PRE-B TEMPRANA PRE-B T INMADURA	<ul style="list-style-type: none"> ▪ CELULAS PEQUEÑAS ▪ FORMA NUCLEAR REGULAR ▪ CITOPLASMA ESCASO
L2	PRE-B TEMPRANA PRE-B T INMADURA	<ul style="list-style-type: none"> ▪ CÉLULAS GRANDES ▪ 1 O MÁS NUCLEOLOS GRANDES ▪ FORMA NUCLEAR IRREGULAR
L3	B MADURA	<ul style="list-style-type: none"> ▪ CELULAS GRANDES CON CITOPLASMA ABUNDANTE ▪ 1 O MÁS NUCLÉOLOS GRANDES ▪ INTENSA BASOFILIA.

2.4.2. Nuevos esquemas de clasificación para leucemia linfoide aguda

El grupo de trabajo en Leucemias agudas de la organización Mundial de la Salud (OMS) ha propuesto un esquema de clasificación para LLAs, basado principalmente en la valoración morfológica, citogénética, citoquímica e inmunofenotípica según el cual las LLAs son :

- ❖ Leucemia linfoide aguda de precursores B
- ❖ Leucemia linfoide aguda de precursores T
- ❖ Leucemia linfoide aguda tipo Burkitt

- ❖ En caso de linaje no único y que involucre expresión mielóide se recomienda la nomenclatura de leucemias bifenotípicas (Willman M et al. 1999).

Actualmente se ha categorizado el diagnóstico de Leucemia de linaje mixto o bifenotípica a aquellas leucemias agudas que coexpresan antígenos mielóide y linfoides asociados. Sin embargo, ya que la mayoría de estos antígenos no son reconocidos en un linaje específico, el diagnóstico es únicamente hecho en asociación con una anormalidad genética tal como la t(4; 11) o la t(9;22), la cual resulta de la transformación de una célula pluripotencial capaz de diferenciarse en ambos linajes linfóide y mielóide (Willman M et al.1999).

2.4.3. Leucemia linfóide aguda de linaje B

2.4.3.1. Leucemia linfóide aguda Pre pre B

Constituyen un 70% de LLA en niños, un 60% en adolescentes y un 50% en adultos. (Jennings et al 1997).

Los blastos son típicamente pequeños con mínima dispersión de tamaño y granularidad. Estas células son L1 o L2 según el criterio FAB. (Jennings CD et al 1997).

Los blastos más primitivos carecen de inmunoglobulinas de superficie y citoplasmáticas y de cadenas pesadas (μ). Se reconocen por uno o más de

los antígenos propios de los progenitores B primitivos, CD19 y HLA-DR (Behm G et al 1999) En la mayoría de los casos hay expresión débil de CD22 de superficie, y en este estadio todas las células presentan CD22 y CD79a de citoplasma. (Behm G et al 1999). El CD10 y TdT son detectables en un 90% de los casos, y más del 75% de los casos expresa CD34 (Behm G et al 1999). El CD20 que generalmente aparece con la producción de la cadena pesada μ , está presente en una mínima población de blastos; además el antígeno CD45 es detectable (Behm G et al 1999); las traslocaciones más importantes en este subtipo son t(4:11), t(11;19) y t(9;11) (Behm G et al 1999)(Tabla No.2)

2.4.3.2. Leucemia linfocítica aguda Pre B

Este fenotipo ocurre en alrededor de un 25% en niños con LLA (Pui CH 1993) (Pui CH et al 1988) (Crist W et al 1984)

Los blastos pre-B poseen cadenas pesadas (μ), pero no livianas ni inmunoglobulinas de superficie. El 90% o más es CD10 (CALLA) + y la mayoría es FAB L1, este fenotipo ha sido el más favorable en niños (Pui CH et al 1993) (Crist W et al 1992); sin embargo, en adultos los resultados son menos favorables para este fenotipo en parte por el incremento de la t(9;22) en este grupo (Ong S et al. 1995). Las células pre B, como las pre-pre B son TdT+ y revelan HLA-DR, CD19, CD24, CD22, CD45 y CD79a de

citoplasma (Fred G et al 1999), el CD34 el 50% de los casos es positivo (Fred G et al 1999); muchas células pre B expresan débilmente el CD20 en superficie (Fred G et al 1999). Entre las traslocaciones más conocidas de este inmunofenotipo se encuentran la t(1;19)(q23;p13), t(12;21) (Behm G et al 1999).

Comparadas las LLA pre-pre B con las leucemias pre B se asocian más frecuentemente con un conteo de leucocitos alto, niveles de deshidrogenasa láctica elevado, >51 cromosomas o un contenido de DNA mayor de lo normal (hiperdiploidia) (Behm G et al 1999) (Tabla No.2)

2.4.3.3. Leucemia linfocítica aguda Pre B transicional

Algunos autores (Behm G et al 1999) incluyen una categoría nueva de leucemias que se caracteriza por blastos que expresan ambas cadenas pesadas $\text{clg } \mu$ y $\text{slg } \mu$ aunque no presentan aún las cadenas ligeras κ o λ , hay expresión de CD79a y CD79b (Behm G et al 1999); similar a las células pre B hay expresión de CD10, usualmente TdT y algunas veces CD34. Estudios iniciales encontraron este fenotipo en 1% de las LLA de niños. (Behm G et al 1999)

Los pacientes con LLA pre-B transicional tienen blastos característicos de morfología L1 o L2 según la clasificación FAB; en este estadio los niños no

presentan masas extramedulares ni compromiso de sistema nervioso central, el recuento de leucocitos y el nivel de LDH es usualmente bajo.

Aunque algunas LLA pre B transicionales han sido asociadas con la translocación t(1;19) en la mayoría de los casos no se caracterizan anormalidades cromosómicas (Behm G et al 1999)

2.4.3.4. Leucemia linfoide aguda B madura

Representa de 2% a 5% de todas las LLA. Las células B tienen mas dispersión por tamaño y granularidad que las otras células precursoras, generalmente son L3 según la clasificación FAB (Jennings CD et al 1997).

Los blastos expresan slg μ y además cadenas ligeras κ o λ en superficie, en este estadio final hay expresión fuerte de CD20 y usualmente CD23; la expresión de CD34 y TdT desaparece , aún hay presencia de CD19, CD10 y CD22 ; las traslocaciones mas importantes son t(8;14) (q24;q32), t(8;22) (q24;q11) (Behm G et al 1999) (Tabla No.2)

2.4.4. Leucemia linfoide aguda T

Los blastos en este tipo de leucemia expresan CD3 de citoplasma y CD7 de superficie, alrededor de un 90% de los linfoblastos T expresan CD2, CD5 y

TdT. Individualmente expresan CD1a de superficie; CD3, CD4 y CD8 son detectados en menos del 45% de los casos (Behm G et al 1999).

Los blastos de las células T expresan CD45 usualmente con una intensidad alta como en las LLA de linaje B; el 40%-45% de los casos son CD10+ y/o CD21+ (Behm G et al 1999). La clasificación más común divide las LLA de linaje T en tres estadios: Temprano (CD7+, cyCD3+, sCD3-, CD4-, y CD8-), Intermedio (cCD3+, sCD3- o CD3+/- CD4+, CD8+, y CD1+) y T ardío (sCD3+, CD1- y también CD4+ o CD8+) (Ching P et al 1993). (Tabla No.2)

Tabla No. 2 Leucemia Aguda : Subtipos inmunológicos y Genética

subtipos	fenotipos	Anormalidades genéticas asociadas
Pre pre B	HLA-DR, CD34,TdT,CD19,CD24,CD20+/-, CD10	Frecuentemente hiperdiploide;t(12;21)(p13;q22),TEL/AML-1:25%;t(9;22)(q34;q11),BCR/ABL;11q23/MLL,Particularmente t(4;11)(q21;q23)
Pre B	HLA-DR,CD34+/-, TdT+/- ,CD19,CD20+/- ,CD24,CD9,CD10,cIgM	t(1;19)9q23;p13), E2A/PBX-1
B madura	HLA-DR,CD34-,TdT- ,CD19,CD20,CD22,CD24,CD10+/- ,Igs	t(8;14)(q24;q32), IgH/MYC; t(2;8)(p12;q24),Igk/MYC;t(8;22)(q25;q11),Igλ/MYC
T	HLA-DR+/-, TdT +/- ,CD1,CD2,cCD3,CD5,CD7,CD4/C D8,CD10+/-,CD34+/-,CD45 débil	αβ(7q35) o γδ (14q11); t(1;14)

2.5 LEUCEMIAS AGUDAS CON EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS LINFOIDES O MIELOIDES (LEUCEMIA BIFENOTÍPICA O DE LINAJE MIXTO)

La mayoría de los modelos de proliferación leucémica se basa en la premisa que sostiene que los fenotipos de las células normales coinciden con los de los progenitores anormales de las leucemias (Behm G et al 1999). Estudios morfológicos y de cinética celular han indicado que en las leucemias agudas existe un bloqueo en la diferenciación de las células madre leucémica y que los blastos leucémicos tienen un tiempo de generación alargado (Robbins L et al 1995).

Con el desarrollo de técnicas inmunológicas y enzimáticas, muchos casos de leucemia han podido ser diagnosticados sin ningún problema; sin embargo con el tiempo han surgido muchos fenotipos inesperados (Jennings D et al 1997). Muchos autores describen la existencia de *infidelidad* o *promiscuidad de la estirpe* que incluye distintas mezclas (una línea linfoide y otra mieloides) (Behm G et al 1999). La Citometría de flujo y la fluorescencia doble han permitido identificar por lo menos tres clases de heterogeneidad de acuerdo con el St. Jude Children's Research Hospital: (1). leucemia mixta, con dos poblaciones de blastos (mieloides y linfoides o linfoides T y B); (2) una población con marcadores mieloides y linfoides (expresión bifenotípica) y (3) La transformación de una línea celular en otra después del tratamiento (Peter B et al 1985). La leucemia mixta y

bifenotípica es excepcional, pero la presencia de unos pocos blastos bifenotípicos en una población homogénea es común. Las leucemias agudas en las cuales los blastos muestran simultáneamente características de más de un linaje (ej: linfocítica y además mieloide), han sido determinadas por morfología, citoquímica e inmunología como leucemias agudas de linaje mixto, quiméricas, híbridas, biclonales, bilineales, sincrónicas, sinérgicas o bifenotípicas (Behm G et al 1999).

Para la asignación de linaje de las células leucémicas se hace necesario la detección de Mieloperoxidasa intracelular (MPO), CD79a y CD3, herramientas muy útiles para el diagnóstico (Orfao A 2000).

La detección de MPO es de importancia clínica y experimental en la distinción de leucemias mieloides de linfocíticas, y en la asignación de linaje de casos aparentemente bifenotípicos o clasificables (Ma W et al 1994); no obstante, la sensibilidad de los diferentes métodos para la detección de Mieloperoxidasa (MPO) varía. En un estudio realizado para detectar esta enzima, se compararon cinco técnicas diferentes para evaluar su presencia: coloración citoquímica, inmunofluorescencia, Northern blotting, reacción en cadena de polimerasa-transcriptasa reversa (RT-PCR) y RT-PCR seguida por Southern blotting (Ma W et al 1994); los resultados demostraron que la máxima sensibilidad correspondía a la técnica Northern blotting sin olvidar que las cinco técnicas tienen ventajas y desventajas y que la sensibilidad de la inmunofluorescencia por citometría de flujo fue mayor que la encontrada por coloraciones citoquímicas. (Ma W et al 1994).

Dos categorías de leucemia aguda se han determinado con base a los parámetros anteriores:

1.LLA con antígenos mieloides asociados (LLA My+)

2.LMA con antígenos linfoide asociados (LMA Ly+)

A pesar del reconocimiento de estas leucemias por los diferentes métodos diagnósticos empleados tales como la inmunohistoquímica y la inmunofluorescencia por citometría de flujo existe una confusión relacionada con el criterio diagnóstico, nomenclatura, decisión terapéutica y significado pronóstico porque los reportes de LLA My+ y LMA Ly+ difieren significativamente de acuerdo con la población estudiada (pediátrica o adulta) y al criterio diagnóstico para definir linajes linfoblásticos y mieloblásticos (Behm G et al 1999).

De acuerdo con esta clasificación las leucemias agudas de la siguiente forma:

A. La LLA de linaje B es diagnosticada cuando los blastos leucémicos expresan:

1. CD22 y/o CD79a de citoplasma.

2. Inmunoglobulina de citoplasma o CD19 de superficie, prescindiendo de la expresión de CD13, CD15, CD33 o CD65, aunque si hay presencia de éstos se denominará LLA de linaje B con expresión de marcadores mieloides. (Tabla No. 3)

- B. La LLA de linaje T es diagnosticada cuando los blastos leucémicos expresan CD7 y además CD3 de superficie o citoplasma. (Tabla No. 3)
- C. La LMA es reportada cuando los blastos leucémicos expresan Mieloperoxidasa o dos o más antígenos mieloides asociados, incluyendo CD13, CD15,CD33 o CD65, en ausencia de inmunoglobulina de citoplasma, CD3 y CD79a. (Tabla No.3)
- D. Un diagnóstico de leucemia de linaje mixto "verdadero" es considerado cuando los blastos leucémicos coexpresan MPO y CD3, MPO é inmunoglobulina o MPO y CD79a (tabla No.3)

Tabla No.3 Criterios utilizados por el St.Jude Children's Research Hospital para definir LLA My+,LMA Ly+ y verdaderas Leucemias mixtas

Clasificación	Marcadores
LLA de linaje B con expresión de marcadores mieloides (My+)	CD19+ y CD79a cy + cCD3 - y MPO - > de 1 antígeno mieloides asociado: CD13,CD15,CD33,CD36 o CD65
LLA de linaje T con expresión de marcadores mieloides (My+)	CD7 + y cCD3 + CD79a - y MPO - > de 1 antígeno mieloides asociado: CD13, CD15,CD33,CD36 o CD65
LMA con expresión de marcadores linfoides (Ly +)	MPO + CD3 - y CD79a cy - > de un antígeno linfoides asociado: CD2,CD5,CD7,CD19,CD22 o CD56
Leucemia de linaje mixto	1.MPO + y CD79a cy + o clgμ + 2.MPO + y cCD3 + 3.cCD3+ y cCD79a+ o clgμ +

En las leucemias mixtas se documentan varias alteraciones cariotípicas, incluyendo t(9;22), t(4;11) y otras aberraciones 11q23, t(9;11), t(11;19) y 14q32.

Ambas traslocaciones la t(9;22) y (11q23) están asociadas con la expresión de antígenos mieloides asociados en LLA sin olvidar que la presencia de t(9;22) de hecho es un mal pronóstico en cualquier leucemia (Pui CH et al 1990) (Pui CH et al 1991); sin embargo, la presencia de antígenos mieloides asociados en LLA no está claramente asociada con un pronóstico adverso en los infantes (Pui CH et al 1991) (Boucheix C et al 1994), contrario a esto algunos autores afirman que la respuesta al tratamiento es pobre contra la leucemia linfoblástica aguda y recalcan el mal significado pronóstico de la coexpresión de fenotipos linfoides y mieloides en LA principalmente en adultos (Das G et al 1987).

Varios factores influyen sobre el pronóstico entre ellos la edad, el inmunofenotipo y las alteraciones citogenéticas. En resumen Inmunológicamente la LLA de linaje B (con excepción del fenotipo B maduro en niños) es de mejor pronóstico que la LLA tipo Burkitt, mientras que la LLA de linaje T es de peor pronóstico que las anteriores.

El pronóstico de las leucemias mixtas y bifenotípicas es reservado, algunos autores describen que esta entidad es de pronóstico desfavorable y además que presenta una respuesta pobre al protocolo de quimioterapia convencional (Schmitt G et al, 1988), (Laura E et al, 1989).

Se ignora la base biológica de la leucemia bifenotípica; tan solo se sabe que las células contienen en su DNA la información necesaria para hacer millones de moléculas de RNA y de proteínas diferentes. Pese a esto una célula expresa únicamente una fracción de sus genes y los diferentes tipos de células en organismos multicelulares surgen de diferentes grupos de genes que son expresados; sin embargo, las células pueden cambiar el patrón de genes en respuesta a cambios de su ambiente o en respuesta a señales de otras células, (Bruce A et al 1994). En algunas instancias podría originarse en una célula madre común para las líneas mieloide y linfoide y en otras podría representar la manifestación anormal durante la transformación leucémica de los genes que codifican los marcadores de otra estirpe. Algunos autores postulan que en los progenitores pluripotenciales normales existe una fase transitoria de promiscuidad limitada en la expresión génica, hecho que se mantiene en las células que no maduran. (Behm G et al 1999)

3. JUSTIFICACION

El laboratorio de Hematología Especial del Instituto Nacional de Cancerología, tiene a su cargo día a día la responsabilidad diagnóstica de las Leucemias agudas de niños y adultos, para lo cual emplea valiosas herramientas como: la morfología, la citoquímica y la inmunología

En el diagnóstico , tratamiento y seguimiento de pacientes con diagnóstico nuevo de Leucemias linfoblásticas Agudas atendidas en los servicios de Hemato-oncología pediátrica y de adultos del I.N.C. desde Abril de 1999 se ha observado mediante el empleo de anticuerpos monoclonales y el análisis por citometría de flujo, la presencia de marcadores mieloides CD13 y CD33 en un subgrupo de leucemias linfoblásticas agudas ; pero no se conoce la relación que existe entre este fenotipo particular con los datos obtenidos para hallar la frecuencia de leucemias linfoides agudas con expresión de marcadores mieloides y su relación con el recuento total de leucocitos, porcentaje de blastos al diagnóstico y respuesta al tratamiento inicial.

Es por ello que conocer este aspecto de la leucemia linfocítica aguda va ser utilizado en el Instituto Nacional de Cancerología para un mejor diagnóstico, pronóstico y seguimiento del paciente.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

- Identificar los casos de leucemias linfoblásticas agudas con expresión de marcadores mieloides CD13 y/o CD33, presentes en niños y adultos atendidos en los servicios de hemato oncología del Instituto Nacional de cancerología, durante el periodo de Abril de 1999 a Junio del 2000.

Objetivos específicos

- Seleccionar entre los casos de Leucemia Linfoide Aguda aquellos que presentaron expresión de marcadores mieloides CD13 y/o CD33.
- Relacionar los casos encontrados de leucemias linfoblásticas agudas con expresión de CD13 y/o CD33 con el recuento total de leucocitos y porcentaje de blastos.
- Analizar las características morfológicas(clasificación FAB) de las leucemias linfoides agudas con expresión de marcadores mieloides CD13 y CD33.
- Evaluar las coloraciones citoquímicas: mieloperoxidasa (MPO), ácido peryódico de Schiff PAS, fosfatasa ácida y Cloroacetato esterasa en los

casos de leucemias linfoides agudas con expresión de marcadores mieloides.

- Relacionar la expresión de los marcadores mieloides CD13 y/o CD33 presentes en la población de estudio con la presencia de MPO determinada por citoquímica.
- Relacionar la expresión de los marcadores mieloides CD13 y/o CD33 con el linaje de la población blástica y a su vez con el subtipo inmunológico al que pertenecen las leucemias.
- Detectar fenotipos aberrantes (coexpresión anormal) en la población de estudio.
- Relacionar el porcentaje de blastos al momento del diagnóstico con el porcentaje de blastos observados a los 28 días de tratamiento en ambas poblaciones (niños y adultos).

5. MATERIALES Y METODOS

5.1. Población de estudio

La población de pacientes en este estudio comprende todos los niños y adultos con leucemia linfocítica aguda remitidos para inmunotipificación al laboratorio de hematología especial del Instituto Nacional de Cancerología, durante el periodo de Abril de 1999 a junio del 2000. Los datos clínicos incluyen edad y sexo al momento del diagnóstico.

5.2. Inmunofenotipo

En el laboratorio de Hematología especial, en todas las leucemias se realizaron inmunofenotipos para la detección de los antígenos de superficie celular como: el CD45, CD34, HLA-DR, CD10, CD19, IgMs, CD13 y CD33 los cuales fueron detectados por inmunofluorescencia directa mediante anticuerpos monoclonales marcados con FITC, PE, PerCP, de igual forma los antígenos de citoplasma IgMcy, CD79a, CD3 y en algunas ocasiones MPO (antígenos de gran importancia porque determinan el linaje celular y además detectan los verdaderos casos de leucemias mixtas).

La intensidad de la fluorescencia fue analizada en un equipo de Citometría (FASCalibur - Becton Dickinson), en todos y cada uno de los paneles de los casos a estudio se realizaron sistemáticamente controles de isotipo y controles sin marcar para cada una de las técnicas empleadas.

Los resultados se consideraron positivos cuando el antígeno se expresó en > del 20% de los blastos.

5.3. Selección de casos de LLA con expresión de CD13 y/o CD33

La selección se realizó mediante la revisión de datos de todos los inmunofenotipos de los casos de LLA (Abril de 1999 a Junio del 2000) presentes en niños y adultos en los archivos del laboratorio de citometría de flujo del I.N.C, escogiendo todos aquellos casos por categorías de clasificación de la siguiente manera: LLA CD13+/CD33-, LLA CD13-/CD33+, LLA CD13+/CD33+.

5.3.1. Relación del subtipo inmunológico con la expresión de marcadores mieloides CD13 y/o CD33

Se relacionó la expresión de los marcadores mieloides CD13 y/o CD33 con el linaje de la población blástica y a su vez con el subtipo inmunológico al que pertenecen las leucemias (LLA Pre-pre B, B comun , Pre B, y LLA T).

5.3.2. Estudio Morfológico

Se relacionó la clasificación morfológica según el criterio Franco-Británico-Americano(FAB) con la expresión de marcadores mieloides en las dos poblaciones (niños y adultos).

5.3.3 Análisis Citoquímico

Todos los casos de leucemia linfocítica aguda con expresión de marcadores mieloides CD13 y/o CD33 se relacionaron con la presencia de glucógeno, fosfatasa ácida, cloroacetato esterasa y especialmente de MPO determinada por citoquímica.

5.4. Recuento de leucocitos y blastos

Se relacionaron los casos encontrados de Leucemias Linfoblásticas agudas con expresión de CD13 y/o CD33 con el recuento total de leucocitos y el porcentaje de linfoblastos reportados; se cuantificaron los blastos al momento del diagnóstico y a los 28 días del tratamiento.

5.5 Análisis Estadístico

Se determinó la frecuencia de leucemia linfóide aguda con expresión de marcadores mieloides (LLA My+) en la población total de leucemia linfóide aguda en niños y adultos durante el periodo de Abril de 1999 a Junio del 2000.

Para cada una de las variables numéricas (recuento de leucocitos y porcentaje de blastos), se hizo un diagrama de cajas y bigotes ; se determinó la media y la desviación estándar.

Para cada una de las variables categóricas se hicieron gráficas de columnas, líneas, circulares y de dispersión.

6. RESULTADOS

6.1. Descripción General

1. De abril de 1999 a junio del 2000, 141 casos de Leucemia Linfocítica Aguda fueron diagnosticados en el Instituto Nacional de Cancerología: de los cuales 102 se presentaron en niños 102/141 (72.3%) y 39 casos en adultos 39/141 (28.7%).

2. De acuerdo con la inmunotipificación estos 141 casos se clasificaron así:

- LLA Pre Pre B : 76/141 (54%)
- LLA Común : 42/141 (30%)
- LLA Pre B: 13/141 (9%)
- LLA T : 10/141 (7%)

En la tabla No. 4 se observa la clasificación general en Niños vs Adultos.

Tabla No.4 SUBTIPOS INMUNOLÓGICOS DE LLA

(I.N.C. Abril de 1999 - Junio de 2000) (n=141)

	Adultos	Niños	Población total
DIAGNOSTICO	# de casos	# de casos	
LLA COMUN	10/39(25%)	32/102 (31%)	42
LLA PRE B	1/39(2.5%)	12/102 (11%)	13
LLA PRE PRE B	25/39(64%)	51/102 (50%)	76
LLA T TARDIO	3/39(8 %)	7/102(7%)	10
Total de casos	39	102	141

6.2. Población Seleccionada

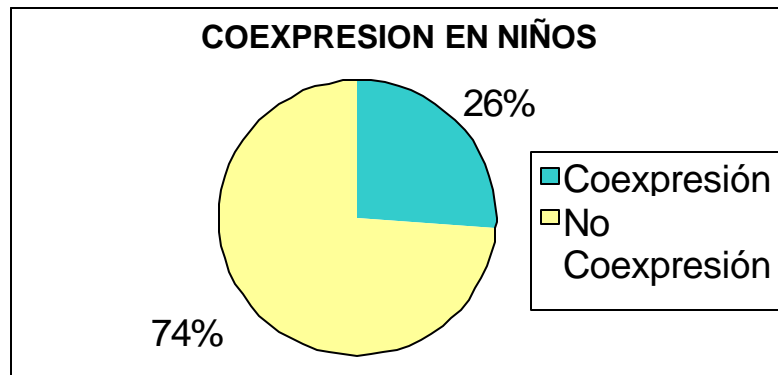
El total de casos de Leucemia Linfocítica Aguda que presentaron coexpresión de marcadores mieloides fue de 48: 27 casos de LLA en niños 27/48 (56%) y 21 casos de LLA en adultos 21/48 (44%).

De estos 48 casos que coexpresaron marcadores mieloides el promedio de recuento de leucocitos fue de $47754.37 \pm 110,046$ y el promedio de porcentaje de blastos fue de $84\% \pm 15\%$ al momento del diagnóstico.

6.3. Coexpresion de marcadores mieloides en LLA

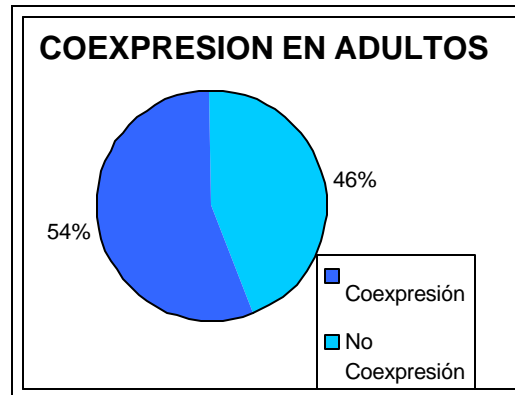
De los 102 casos en niños 27 coexpresaron marcadores mieloides 27/102 (26%).(Gráfica No. 6)

Gráfica No.6



De los 39 casos en adultos 21 coexpresaron marcadores mieloides 21/39 (54%)(Gráfica No.7)

Gráfica No.7



La frecuencia de expresión de marcadores mieloides estratificados de acuerdo con la clasificación inmunológica se presenta en la Tabla No. 5

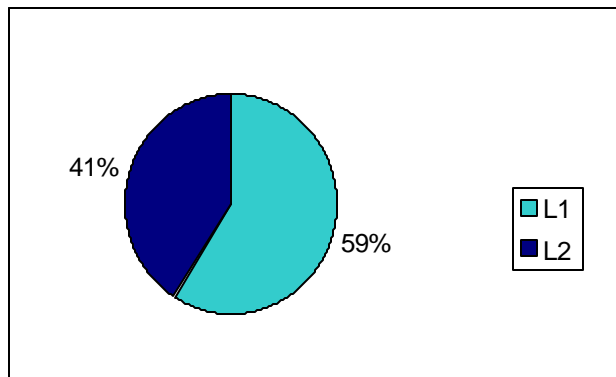
Tabla No.5 Casos de Leucemia linfocítica aguda con marcadores mieloides de acuerdo con edad y subtipo inmunológico (I.N.C. Abril de 1999 - Junio de 2000) (n=48)

DIAGNOSTICO	Adultos		Niños	
	# de casos	%	# de casos	%
LLA My+				
LLA COMUN	6/10	60 %	13/32	40%
LLA PRE B	1/1	100.00%	3/12	25%
LLA PRE PRE B	13/25	52.00%	11/51	21 %
LLA T	1/3	33.33%	0/7	0.00%
Total	21/39	54%	27/102	26%

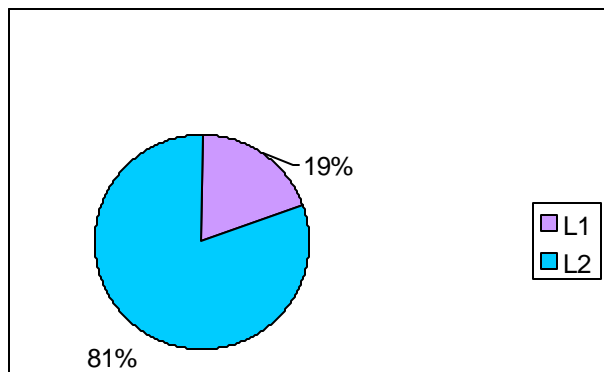
6.4. Clasificación morfológica FAB

Según la clasificación FAB los 48 casos de estudio presentaban características de L1 y L2, con porcentajes diferentes en cada población (gráfica No. 8 y gráfica No.9)

Gráfica No.8 Clasificación FAB de las LLA My+ en Niños



Gráfica No.9 Clasificación FAB de las LLA My+ en Adultos



6.5. Categorías de expresión de los Marcadores mieloides

En cuanto a los marcadores mieloides, se obtuvo:

27 casos expresaban eran **CD13+/CD33-** es decir 27/48 (55.37%)

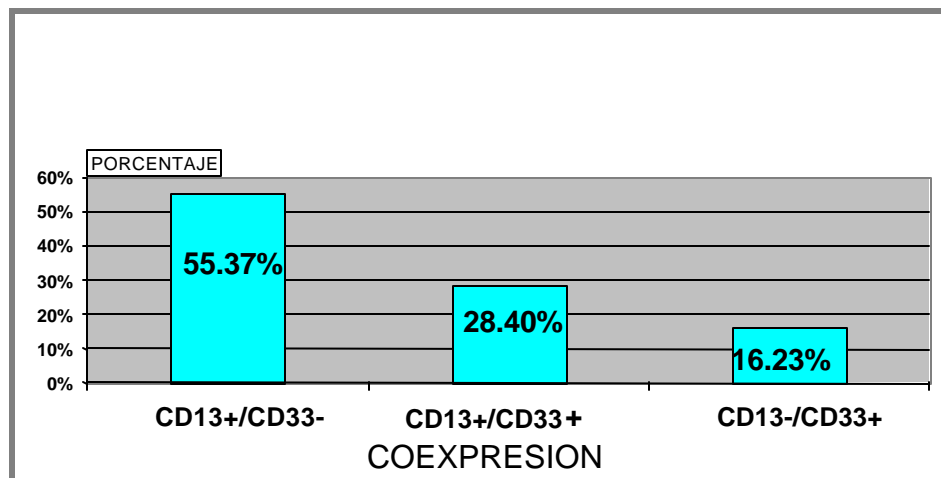
6 casos expresaban sólo **CD33+/CD13-** es decir 6/48 (16.23%)

15 casos coexpresaban **CD13+/ CD33+**, es decir 15/48 (28.40%)

(Gráfica No.10)

Gráfica No. 10 Expresión de CD13 y CD33 en LLA

(I.N.C Abril de 1999 - Junio de 2000) (n=48)



De acuerdo con las tres categorías de expresión de marcadores mieloides y los subtipos inmunológicos se detecta 6 casos con expresión de CD33, 15 casos de CD13 y CD33 y 27 casos con expresión de CD13(Tabla No.6)

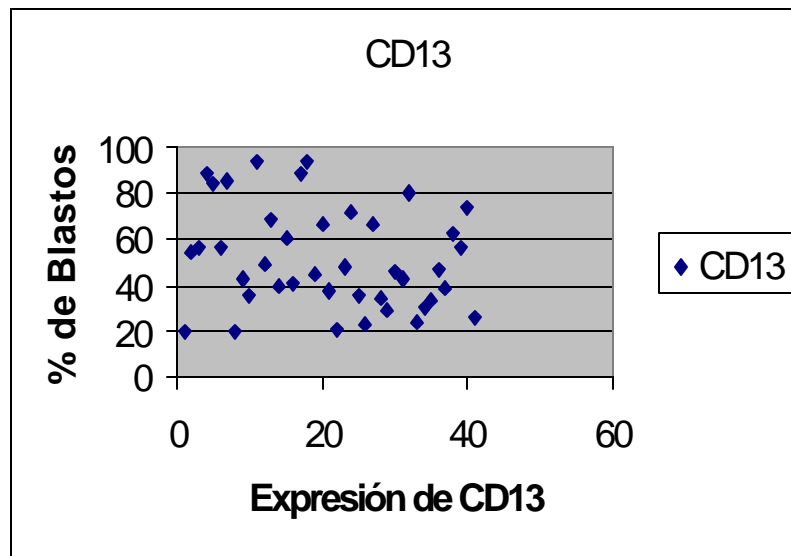
Tabla No. 6 Categorías de expresión de marcadores mieloides y subtipos inmunológicos

(I.N.C Abril de 1999 - Junio de 2000)

	NINOS			ADULTOS		
	CD13	CD33	CD13 y CD33	CD13	CD33	CD13 y CD33
Pre Pre B	8	1	2	5	3	5
Comun	6	0	7	4	2	0
Pre B	2	0	1	1	0	0
T Tardío	0	0	0	1	0	0
Total	16	1	10	11	5	5

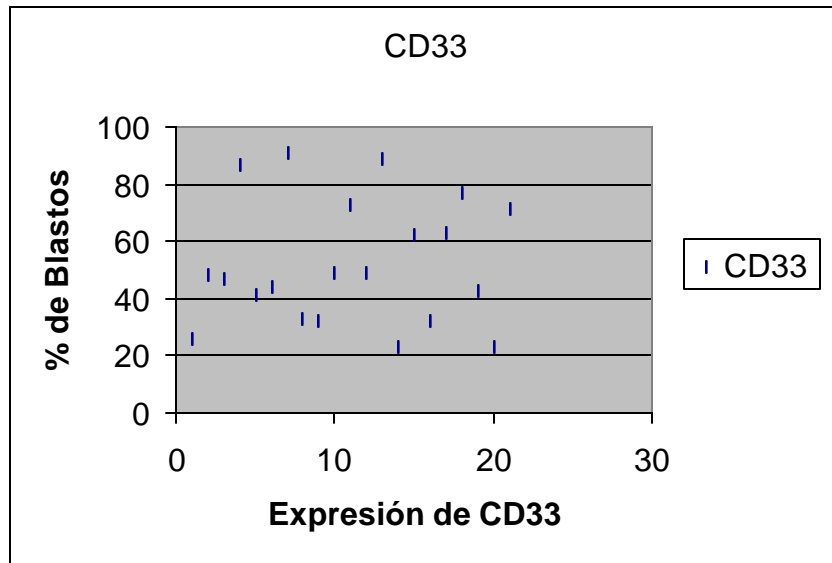
En la gráfica No. 11 se puede observar que 37/48 casos presentaron positividad para CD13 entre un 20% y un 98%

Gráfica No.11 % de positividad para CD13



En la Gráfica No.12 se puede observar el % de blastos que expresaron el marcador CD33

Gráfico No. 12 % de positividad para CD33

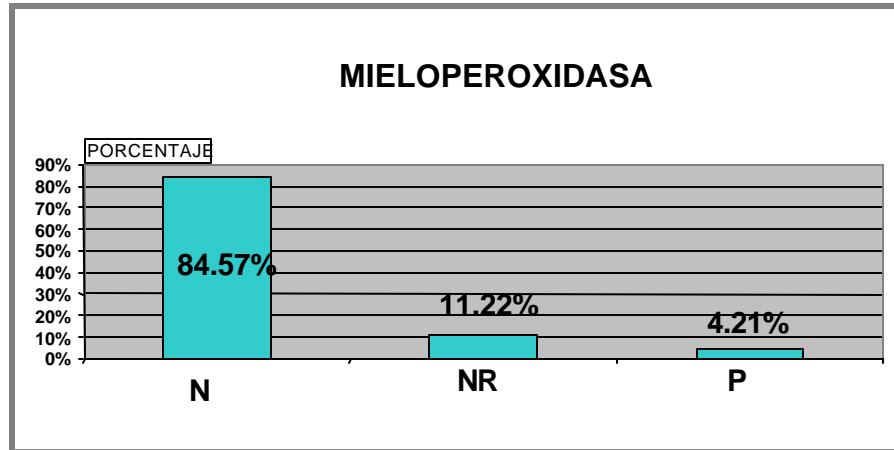


6.6 Citoquímica

En la gráfica No.13 se observó que un alto porcentaje de casos de LLA fue negativo (84,5) para mieloperoxidasa.

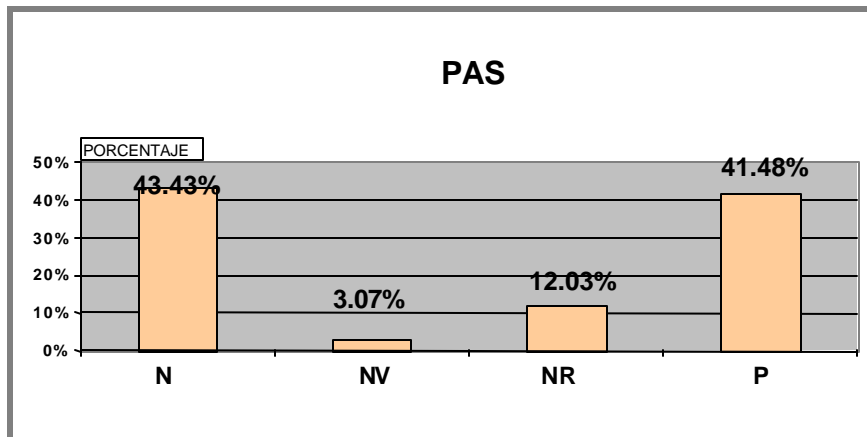
Con respecto a la coloración citoquímica PAS es importante resaltar que un porcentaje similar de LLA reaccionó positiva y negativamente (gráfica No.14)

**Gráfica No.13 Expresión de MPO en LLA My+
(I.N.C. Abril de 1999 - Junio de 2000)**



N= negativo
NR= no realizado
P= positivo

Gráfica No. 14 Determinación de PAS en LLA My+



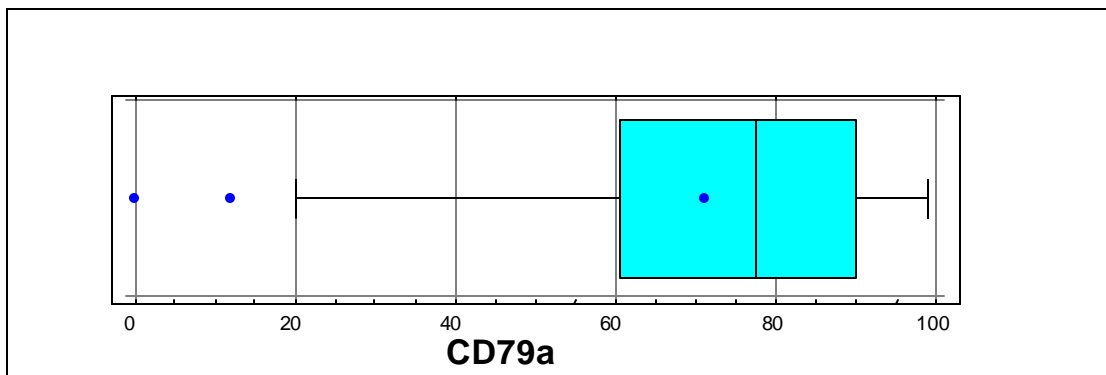
N= negativo
NV= no valorable
NR= no realizado
P= positivo

Sólo un 4.1% y 14.71% de los casos se encontraron positivos para CAE y FA respectivamente y la gran mayoría no se realizó.

6.7. Expresión de CD79a

La mediana de CD79a es de 71.8(61 - 90), (Gráfica No.15)

Gráfico No. 15 Expresión de CD79a en blastos de LLA My+



6.7. Recuentos leucocitarios y porcentaje de blastos en leucemia linfoide aguda con presencia de marcadores mieloides

Por otra parte se relacionó el recuento de leucocitos con las tres categorías de expresión (Ver Gráfica No 16 y tabla No.7).

Gráfica No.16 Recuento de Leucocitos al diagnóstico en LLA My+

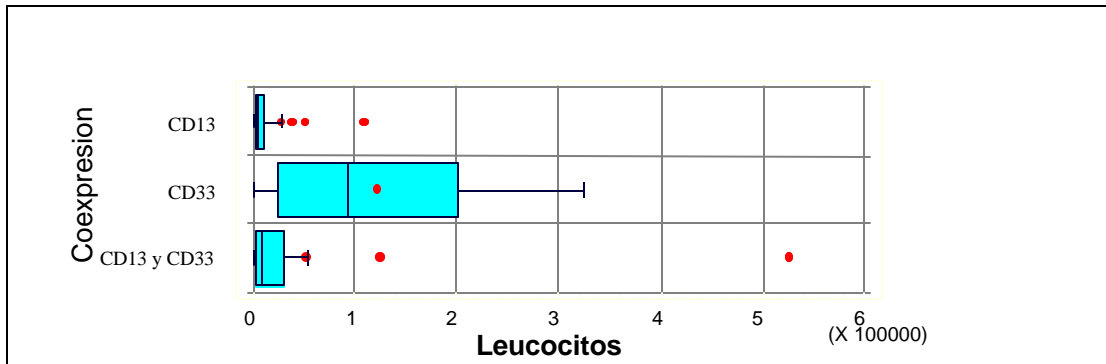


Tabla No. 7 Promedio de Leucocitos en las tres categorías de expresión de los marcadores mieloides

COEXPRESION	n	MEDIANA	RANGO
CD13	27	4100	1100 - 110000
CD33	6	93050	1710 -324000
CD13 Y CD33	15	7900	1420 - 526000

En la gráfica No.17 y tabla No 8 se puede observar que el % de blastos a los 28 días de tratamiento en las tres categorías; la población con CD33+ no respondió de igual forma con respecto a las otras dos categorías.

Gráfica No. 17 % de blastos a los 28 días de tratamiento vs coexpresión de marcadores mieloides

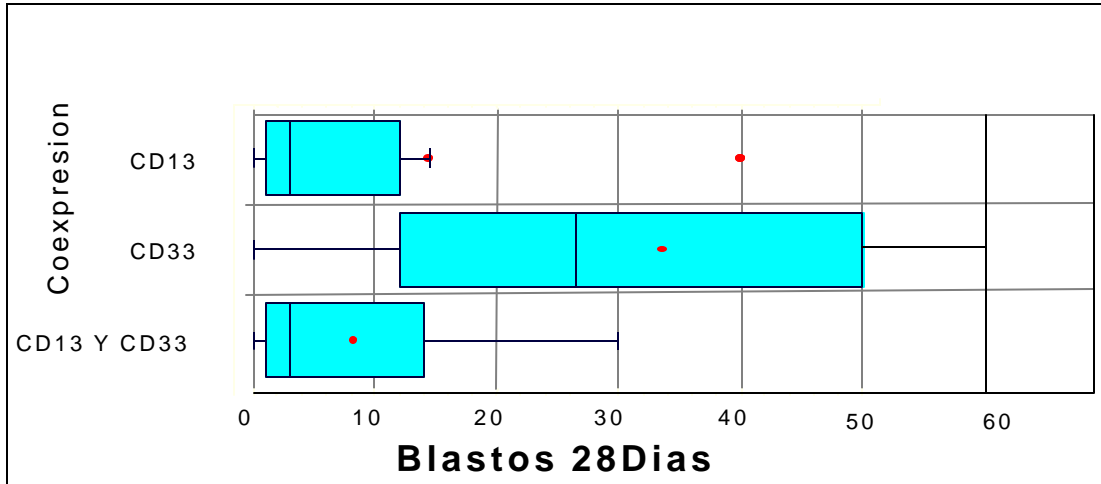
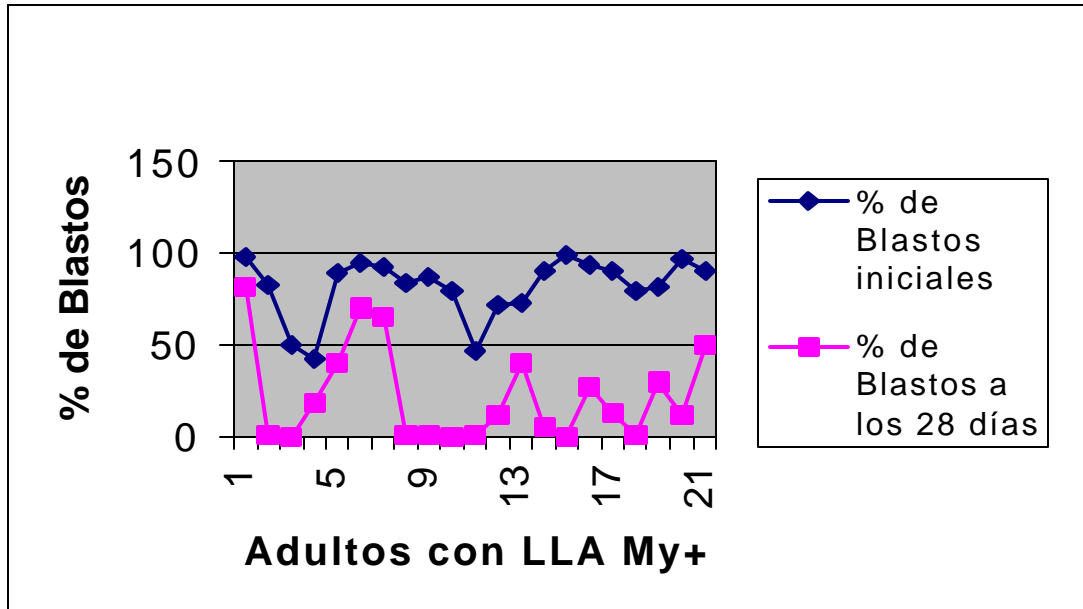


Tabla No. 8 % de blastos a los 28 días

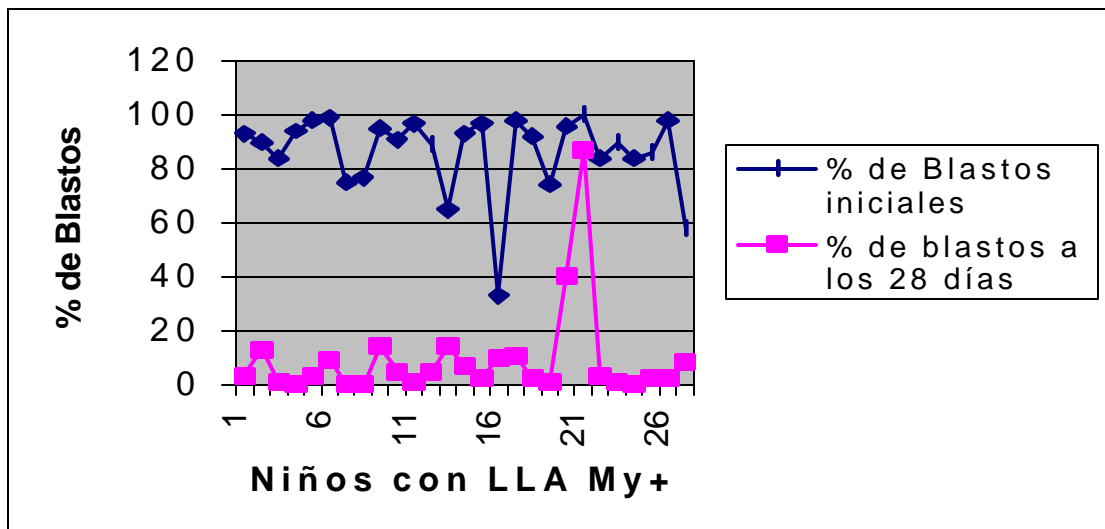
COEXPRESION	n	MEDIANA	RANGO
CD13	27	3	0 - 14
CD33	6	26.5	0 - 60
CD13 Y CD33	15	3	0 - 30

Con referencia al porcentaje de blastos a los 28 días de tratamiento se observó que en los adultos los recuentos no disminuyen tanto como en los niños (gráfica No.18 y 19).

Gráfica No.18 Porcentaje de reducción de blastos a los 28 días de tratamiento en adultos (I.N.C. Abril de 1999 - Junio de 2000) (n=21)



Gráfica No. 19 Porcentaje de reducción de blastos en LLA en niños a los 28 días de tratamiento (I.N.C. Abril de 1999- Junio de 2000) (n=27)



6.9. Leucemias bifenotípicas

De los 48 casos de LLA con expresión de marcadores mieloides 2 son verdaderas leucemias bifenotípicas (presentes en adultos), en la tabla No. 9 se presentan todas sus características evaluadas, es importante resaltar que no presentaron una buena respuesta al tratamiento.

Tabla No.9 Leucemias bifenotípicas

Paciente	Coexpresión	Morfología	PAS	MPO	Leucocitos	% B.I	% B.P.T
1	CD13+/CD33-	L1	+	+	39400	98	82
2	CD13+/CD33+	L2	+	+	1420	81	30

%B.I: porcentaje de blastos iniciales

%B.P.T: porcentaje de blastos post tratamiento (a los 28días)

7.DISCUSION

En este trabajo se realizó un estudio retrospectivo de todos los casos de leucemia linfocítica aguda con expresión de marcadores mieloides en niños y adultos durante el periodo de Abril de 1999 a Junio del 2000 en el Instituto Nacional de Cancerología.

Durante este periodo, el 54% de las leucemias linfocíticas agudas en los adultos presentaron marcadores mieloides y en los niños se presentaron en un 26%, cabe destacar que, la expresión de antígenos mieloides en leucemia linfocítica aguda aparece mas frecuente en la población adulta que en la población pediátrica (Ching P et al.1991).

Según (Ching P et al.1991) la frecuencia de leucemia linfocítica aguda con expresión de marcadores mieloides en niños es de un 3.5% a 22%, sin embargo recientes autores (Putti C et al.1998) mencionan que la tercera parte de la población total con leucemia linfocítica aguda en niños expresa marcadores mieloides, acorde a esto, en nuestra población pediátrica encontramos que un 26% de Leucemias Linfocíticas Agudas expresan marcadores mieloides.

Con respecto a la población adulta muchos autores (Sobol R et al.1987), (Childs C et al,1989), (Guyotat D et al.1990), (Drexler H et al.1991), (Boucherix C et al.1994) y (Lauria F et al.1994) han reportado que el rango

promedio de expresión de marcadores mieloides en adultos con leucemia linfocítica aguda oscila entre un 10% a un 54%, acorde a esto en nuestra población adulta encontramos que el 54% de las leucemias linfocíticas agudas en adultos expresan marcadores mieloides.

La frecuencia de la expresión de los marcadores mieloides se presentó en todos los subtipos inmunológicos de leucemia linfocítica aguda de linaje B, en particular en el subtipo Pre-pre B y exceptuando el subtipo de células B madura, tal como lo mencionan (Putti C et al.1998); en nuestro estudio tan solo encontramos un caso de leucemia linfocítica aguda de linaje T, algunos autores mencionan que la expresión de estos marcadores es menos frecuente en las leucemias linfocíticas agudas de linaje T con respecto a las leucemias linfocíticas agudas de linaje B (Matutes E et al 1997)

Con relación a la morfología se dice (Ching P et al 1991) que aproximadamente un 36% de los casos con expresión de marcadores mieloides en leucemias linfocíticas agudas en niños corresponde a una morfología L2, en nuestra población pediátrica se encontró que el 41% de los casos con Leucemia Linfocítica Aguda con expresión de marcadores mieloides tienen características morfológicas de L2.

En adultos el 19% corresponden a morfología L1 y el 81% a morfología L2, este dato se relaciona con los reportes de algunos autores, los cuales mencionan que la gran mayoría de los casos con expresión de marcadores mieloides en LLA, presentan una morfología L2 (Davey F et al. 1990).

Por otra parte en la mayoría de estudios, la morfología L1 ha sido usualmente vinculada con un mejor pronóstico mientras que la morfología L2 refleja un pronóstico mas precario sin importar el grupo de riesgo al que se asigne el paciente (Smith M et al. 1996).

En relación a las categorías de expresión de marcadores mieloides se encontró que la mayoría de los casos de la población seleccionada expresaban solo el marcador CD13, seguido de aquellos casos que expresaban ambos marcadores CD13 y CD33, por último una pequeña población, pero muy significativa expresó el marcador CD33.

El porcentaje de positividad de los blastos está igualmente disperso en aquellos casos que expresaron CD13 y aquellos que expresaron CD33.

En relación a la mieloperoxidasa, 2 casos reaccionaron positivamente, es decir que un 1.4% de la población corresponde a verdaderas leucemias bifenotípicas, acorde a esto algunos autores (Schmitt G et al 1988) indican que la frecuencia de leucemias bifenotípicas es de un 2.9%.

De la población a estudio, el 43% de los casos fueron positivos para PAS, comparado con el marcador de linaje B(CD79a), todos los casos fueron positivos exceptuando el caso de linaje T, es decir que este marcador es altamente sensible comparado con el PAS, ya que este último se caracteriza por ser una coloración poco específica.

Con respecto al recuento de leucocitos, se encontró que: los casos CD33+/CD13- presentaban recuentos elevados, los casos que expresaban los dos marcadores mieloides CD13+/CD33+ presentan recuentos normales

y aquellos casos con expresión de CD13+/CD33- es decir la mayoría tenían recuentos de leucocitos bajos. Según la literatura se dice que aproximadamente el 19% de los casos con expresión de marcadores mieloides poseen recuentos >50.000 leucocitos/ul (Putti C et al.1998).

Por otra parte en los niños, la respuesta a la inducción es del 90%, lo que sugiere una buena respuesta al tratamiento, a pesar de la expresión de marcadores mieloides. Esto se relaciona con la literatura actual, la cual afirma que los marcadores mieloides no son de pronóstico adverso en la población infantil (Putti C et al.1998),(Ching P et al.1991), (Ching P et al.1993), por el contrario, en adultos la respuesta a la inducción fue de un 38%,lo que sugiere una respuesta pobre al tratamiento, es decir que la presencia de marcadores mieloides en esta población es probablemente de pronóstico adverso, tal como lo indican algunos estudios(Cabrera M et al.1990),(Michael J et al.1994).

En los dos casos de Leucemias bifenotípicas, ninguno llegó a remisión completa a los 28 días de tratamiento. Según la literatura las leucemias bifenotípicas son de pronóstico pobre ya que no presentan buena respuesta al tratamiento (Matutes E et al.1997).

Es importante destacar que en los adultos, se presentaron la mayoría de los casos con expresión de CD33; presentaron recuentos leucocitarios altos al momento del diagnóstico y no respondieron a la inducción , lo que indica que la presencia de este marcador es de pronóstico adverso.

Los resultados de este trabajo permiten conocer la frecuencia de los casos de leucemia linfocítica aguda con expresión de marcadores mieloides (LLA My+) del Instituto Nacional de Cancerología y algunas asociaciones interesantes que existen entre las categorías de expresión de los marcadores mieloides, la citoquímica, los recuentos leucocitarios, el porcentaje de blastos al momento del diagnóstico y la respuesta al tratamiento en niños y adultos.

8.CONCLUSIONES

1. La frecuencia de leucemias linfoides agudas con expresión de marcadores mieloides (LLA My+) es mayor en adultos que en niños, en el Instituto Nacional de Cancerología.
2. En las leucemias linfoides agudas con expresión de marcadores mieloides en niños predomina la morfología L1 mientras que en los adultos predomina la L2.
3. El 5% de las leucemias linfoides agudas de adultos presentaron mieloperoxidasa y expresión de marcadores mieloides es decir que pertenecen a verdaderas leucemias bifenotípicas.
4. La reacción Fosfatasa Acida es negativa en el único caso LLA de linaje T y resultado positiva en cuatro casos de LLA de linaje B, en el resto de los casos no se evaluó esta coloración por creerse innecesaria, estos datos no se correlacionan, ya que la Fosfatasa ácida es una coloración citoquímica que evalúa la presencia de linajes T y no de linajes B.
5. El 43% de los casos fueron positivos para PAS, comparado con el marcador de linaje B(CD79a), todos los casos fueron positivos exceptuando el caso de linaje T, con una mediana de 71.8 +/- 24.5, es decir que este marcador es altamente sensible comparado con el PAS, ya que este ultimo se caracteriza por ser una coloración poco específica.

6. La expresión de marcadores mieloides se presentó en los subtipos inmunológicos principalmente en el grupo de los precursores B (Pre-Pre B, común, Pre B) y tan solo un caso pertenecía a el grupo de precursores T
7. Los casos con expresión de CD33 presentan recuentos altos de leucocitos, los casos con expresión de CD13 y CD33 presenta recuentos leucocitarios normales y la expresión de CD13 se encuentra acompañada de recuentos leucocitarios bajos.
8. La respuesta a la inducción en los niños con leucemia linfocítica aguda que expresaron marcadores mieloides fue buena, lo que sugiere que la presencia de estos marcadores en leucemia linfocítica aguda no es de pronóstico adverso en los niños.
9. La respuesta a la inducción en los adultos con LLA que expresaron marcadores mieloides fue mala, (lo que sugiere que la presencia de estos marcadores en LLA es de pronóstico adverso en los adultos).
10. Las Leucemias bifenotípicas no respondieron al tratamiento a los 28 días lo que indica pronóstico adverso.
11. De acuerdo con la categoría CD33+/CD13-, 5 casos se presentaron en adultos y 1 en niños, esta pequeña subpoblación del estudio muestra recuentos >50000 leucocitos, de estos casos ninguno consiguió remisión completa a los 28 días de tratamiento, es decir que probablemente este marcador es de pronóstico adverso.

9.RECOMENDACIONES

1. Continuar realizando sistemáticamente el estudio de marcadores mieloides en leucemias linfoides agudas de niños y adultos; ampliar el número de casos para hacer la asociación de las categorías de marcadores mieloides (CD13+/CD33-, CD13+/CD33+ y CD13-/CD33+) con los recuentos de leucocitos, incluyendo en el informe de citometría el conteo de leucocitos correspondiente.
2. Evaluar la sobrevida a los 5 años de estos casos para determinar el verdadero pronóstico (bueno o adverso) que no puede ser conclusivo con la sola respuesta a la inducción.
3. Implementar sistemáticamente la MPO por citometría en los casos con expresión de marcadores mieloides, debido a que esta es mas específica que la realizada por citoquímica y de este modo se pueden detectar los casos de leucemias bifenotípicas verdaderas y hacer su seguimiento a los 5 años.

la expresión del antígeno CD33 en leucemias linfoides agudas hiperleucocitarias , se encuentran relacionadas con el cromosoma y la t(4;11) es necesario hacer estudios que relacionen en niños y adultos estas anomalías genéticas

10.BIBLIOGRAFIA

Borowitz. M, Guenther K, Shults K, Stelzer G: Immunophenotyping of acute leukemia by flow cytometric analysis. Use of CD45 and right - angle light scatter to gate on leukemic blasts in three-color analysis (1993); Am J Clin Pathol; 100: 534- 540.

Bruce. A, Dennis B, Julian L, Martin R, Keith R, James D : Control of gene expression (1994), Molecular biology of The Cell, 401.

Cabrera. M ; Immunologic classification of acute lymphoblastic leukemia (1990), American Journal of pediatric Hematology/Oncology 12 (3): 283 - 291.

Ching. P, Susana. C; Characterization of childhood acute leukemia with multiple myeloid and lymphoid markers at diagnosis and at relapse (1991) Blood; 78: 1327- 1337.

Ching. P, Frederick G, William. M; Clinical and biologic relevance of immunologic marker studies in childhood acute lymphoblastic leukemia (1993), Blood ; 82: 343 - 362.

Crist. W, Shuster J, Look T, Borowitz M, Behm F, Bowman P, Frankel L, Pullen J, Krance R, Steuber P, Camitta B, Amylon M, Link M, Land V: Current results of studies of immunophenotype (1992) Leukemia 6: 162

Das. G, Advani S, Nair C, Gopal R, Saikia T, Ashok K, John B, Dhond S: Acute leukemia with coexpression of lymphoid and myeloid phenotypes (1987). Hematology Oncology 5, 3, 189 -96.

Davey. F, Mick R, Nelson D, MacCallum J, Sobol R, Royston I, Cuttner J, Ellison R, Bloomfield C (1990). Leukemia ; 2: 420 - 426.

Di Noto. R, Lo pardo C, Schiavone E,Manzo C, Vacca C, Ferrara F,Del Vecchio L: Stem cell factor receptor (c-Kit, CD117) is expressed on blast cells from most immature types of acute promyelocytic leukaemia (1996), Br J Haematol; 92: 562 - 654.

Ebstein. W;Uber die acute Leukaemie and Pseudoleukamie. (1889) Dtsch Arch Klin Med 44: 343.

Elaine. C, Frederick. G, Joaquin. S; Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukaemia (1998), The Lancet; 351: 550-554.

Elizabeth A, Flow cytometry : Basic concepts and clinical applications in immunodiagnosics (1993), Clinical Laboratory Science, 6:177-182.

Fatih. M, Harland. N, Paul. S; Clinical features and treatment outcome of children with myeloid antigen positive acute lymphoblastic leukemia: a report from the children's cancer group (1997), The american society of hematology; 90: 28-35.

Fawcett. D; Tratado de histología. Editorial Interamericana McGRAW -HILL. 12 edición . España. 1995

Behm. G,Campana. D; Immunophenotyping studies of childhood hematologic malignancies (1999), Departments of Pathology and Laboratory Medicine (FGB), and Hematology-Oncology(DC),St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN

Gaipa. G, Biondi. A, Orfao. A; Flow cytometric analysis of normal B cell differentiation: a frame of reference for the detection of minimal residual disease in precursor- B- ALL (1999), *Leukemia* ; 13: 419-427.

Greaves. M, Janossy. G; Leukaemia biphenotypic (1983), *The lancet*; 19: 1178-1179

Jennings. D and Foon. K; Recent advances in flow cytometry: Application to diagnosis of hematologic malignancy (1997), *Blood*;90: 2863-2892.

Kantarjian. HM: Adult acute lymphoblastic leukemia: critical review of current knowledge. (1994) *Am J Med* 97: 176.

Killick. S, Matutes E, Powles R, Hamblin M, Swansbury J, Treleaven J, Zomas A, Atrá A, Catovsky D: Outcome of biphenotypic acute leukemia. (1999) *Haematologica* 84,4, 699 - 706.

Kishimoto. T, Goyert S, Kikutani H: Leucocyte typing VI: white cell differentiation antigens (1997). Garland Publishing, New York

Laura. E, Sulak M, Charlotte N, Clare M, Barbara A, Morale M, Kathryn I, Hansen M and Milka M; Biphenotypic acute leukemia in adults(1990), *Human Pathology*; 94: 54-58.

Ma. W, Hu Z, Drexler H: Sensitivity of diferent methods for the detection of myeloperoxidase in leukemia cells (1994), *Leukemia* 8, 2, 336 -42

Matutes. E, Contribution of immunophenotype in the diagnosis and classification of haemopoietic malignances (1995), *J Clinical Pathology* ; 48:194 - 197.

Matutes. E, Morilla R, Farahat N, Carbonell F, Swanssbury J, Dyer M, Catovsky D; Definition of acute biphenotypic leukemia (1997), *Haematologica* ; 82 :64-76

Michael. J, Jeroma R; Pronostic Significance of the surface antigens expressed by leukemic cells (1994), *Leukemia and lymphoma*; 13:15-22.

Orfao. A, Janos K, Jan W, Gratama, Eva K, Pablo M, Juana C, Rosana R: Flow cytometric detection of intracellular myeloperoxidase, CD3 and CD79a interaction between monoclonal antibody clones, fluorochromes and sample preparation protocols (2000). *Journal of Immunological Methods*, 242, 1: 53 - 65

Peter. B, Praniti. S, George. B; Simultaneous or sequential expression of lymphoid and myeloid phenotypes in acute leukemia (1985), *Blood*; 65: 142-148.

Putti. C, Rondelli R, Gracia C, Aricó M, Sainati L, Conter V, Cesare G, Angelo C, Consolini R, Pession A, Zanesco L, Maserà G, Biondi A and Basso G: Expression of Myeloid markers lacks prognostic impact in children treated for acute lymphoblastic leukemia: Italian experience in AIEOP- ALL 88-91 Studies (1998). *Blood*, 92: 795 - 801.

Reuss. B, Buhning H, Schmidt H, Muller C: AML: immunophenotypic heterogeneity and pronostiv significance of c-Kit expression(1994). *Leukemia* 8: 258 - 263.

Robbins. L, Kumar V, Cotran S: Enfermedades de los leucocitos, los ganglios linfáticos y el bazo (1995): Patología estructural y funcional, 5ª edición, 695 - 743.

Rothe. G, Schmitz. G; Concensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies(1996), Leukemia ;10 :877-895.

Schmitt. A; Childhood biphenotypic leukemia: detection of mixed lymphoid and myeloid populations in bone marrow specimens (1988), Human Pathology; 19: 651-658.

Smith. M, Arthur D, Camitta B: Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia (1996), Journal of Clinical Oncology 14(1): 18-24.-

Stasi. C, Taylor. G, Venditti. G; Contribution of immunophenotypic and genotypic analyses to the diagnosis of acute leukemia(1995), Ann Hematol; 71:13-27.

Sulak. L, Clare C, Morale B, Hansen K, Montiel M; Biphenotypic acute leukemia in adults (1990), Am J Clin Pathol; 94: 54- 68.

Tucker. W; Fates of human B-cell precursors (2000); Blood; 96: 9-23.

Valverde. L, Matutes E, Farahat N: c-Kit receptor (CD117) expression in acute leukemia (1996); Ann Hematol 72: 11- 15.

Willman. M.D and Cherly L; Acute leukemias: A paradigm for the integration of new technologies in diagnosis and classification (1999); Modern Pathology; 12: 218-228.
