



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

ESTANDARIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE DETECCIÓN
DE LA ENFERMEDAD RESIDUAL MÍNIMA POR
CITOMETRÍA DE FLUJO EN PACIENTES PEDIÁTRICOS
DIAGNOSTICADOS CON LAL TIPO B DEL INP.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

SARABIA CRUZ MAURICIO

MÉXICO D.F.



DIRECTOR: EBC LINA TERESA ROMERO GUZMÁN

ASESOR: QFB PATRICIA VIDAL MILLÁN

Agradecimientos.

A la EBC Lina T. Romero Guzmán jefa del departamento de análisis clínicos y estudios especiales (DACEE) del Instituto Nacional de Pediatría (INP) por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo, gracias por su apoyo científico y profesional.

Al Dr. Rogelio Paredes Aguilera jefe del servicio de Hematología del Instituto Nacional de Pediatría por facilitar el acceso a las muestras de sus pacientes y por su invaluable colaboración la cual ha permitido la realización de este trabajo.

A la QFB Fabiola Mújica Guzmán quien formo parte activa en la asesoría de este trabajo, tanto en el desarrollo experimental como en la organización y revisión de la tesis escrita.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por los profesores que aportaron sus enseñanzas y conocimientos y al INP lugar del desarrollo de este trabajo.

Al C. Dr. Edgar Alejandro Medina Torres por su valiosa colaboración en el desarrollo experimental, así como en la revisión y organización de la tesis escrita.

Al M.C. Froylan Mendoza González por su valiosa colaboración en el trabajo experimental, por las enseñanzas y conocimientos transmitidos en el desarrollo de la tesis.

Al personal del laboratorio de hematología por la hospitalidad que me brindo durante el tiempo en el que se realizó este trabajo.

Dedicatorias.

A mis padres, Bernardita Teresa Cruz López y Francisco Sarabia Vásquez, por el apoyo que me brindaron durante mi etapa de estudiante, porque siempre procuraron guiarme por el buen camino gracias a los valores que me han inculcado, por su comprensión y por creer en mí. Gracias.

A mis hermanos, por su apoyo incondicional, sus consejos y su comprensión.

A mis amigos y compañeros de la escuela, por los momentos compartidos en esta aventura y por su apoyo incondicional. Gracias.

A todas aquellas personas que comparten conmigo este triunfo. Simplemente gracias.

Jurado.

Presidente, QFB Patricia Vidal Millán

Secretario, QFB Georgina Ernestina Ríos Olivera

Vocal, EBC Lina Teresa Romero Guzmán

Suplente, QFB Víctor Becerra López

Suplente, QFB Pablo Juárez de los Santos

Abreviaturas.

1. AcMo Anticuerpo Monoclonal
2. CMF Citometría de Flujo
3. ERM Enfermedad Residual Mínima
4. INP Instituto Nacional de Pediatría
5. LAL Leucemia Aguda Linfocítica
6. MO Medula Ósea
7. PCB Precursores de Células B
8. SP Sangre Periférica

Contenido

I.	Resumen.....	1
II.	Introducción.....	2
III.	Marco teórico.....	3
	1. Generalidades de las leucemias.....	3
	1.1. Clasificación de las leucemias.....	3
	1.2. Epidemiología.....	3
	1.3. Factores de riesgo.....	4
	1.4. Diagnóstico.....	4
	1.5. Tratamiento.....	4
	2. Leucemia aguda.....	6
	3. Leucemia aguda linfocítica (LAL).....	6
	3.1. Fisiopatología.....	6
	3.2. Datos clínicos.....	7
	3.3. Clasificación FAB de la LAL.....	7
	4. Leucemia aguda linfocítica tipo B (LAL-B).....	10
	4.1. Linfopoyesis.....	10
	4.2. Desarrollo de las células B.....	11
	5. Fenotipo inmunitario de la LAL.....	12
	6. Inmunofenotipo de la LAL-B.....	13
	6.1. Desoxinucleotidiltransferasa terminal.....	14
	7. Inmunofenotipo en el diagnóstico y clasificación de la LA.....	14
	8. Enfermedad residual mínima.....	15
	8.1. Aplicaciones de la detección de la ERM.....	16
	8.2. Métodos de estudio de la ERM.....	17
	9. Detección de la ERM por citometría de flujo.....	18
	9.1. Inmunofenotipo en la detección de la ERM.....	19
	9.2. Marcadores para el estudio de la ERM en LAL-B.....	20
	9.3. Sensibilidad de técnica.....	24
	9.4. Ventajas y desventajas de la técnica de CMF.....	24
	10. Información clínica del nivel de ERM.....	25
	11. Citometría de flujo.....	26

11.1. Principio de la citometría de flujo.....	26
11.2. Componentes del citómetro de flujo.....	28
11.3. Fluorocromos.....	29
12. Condiciones de la muestra.....	29
13. Análisis estadístico.....	30
13.1. Análisis de regresión y correlación lineal.....	30
13.2. Prueba t de student.....	31
IV. Planteamiento del problema.....	31
V. Objetivos.....	32
VI. Hipótesis.....	32
VII. Diseño experimental.....	33
VIII. Resultados.....	38
IX. Análisis de resultados.....	45
X. Conclusiones.....	46
XI. Perspectivas.....	47
XII. Referencias bibliográficas.....	48

I. Resumen

La leucemia aguda linfocítica (LAL) es una enfermedad que se presenta principalmente en la infancia, con un máximo de incidencia entre los 2 a 5 años. Del 80 al 90% de casos corresponde a precursores de células B. En el Instituto Nacional de Pediatría (INP) la leucemia diagnosticada con mayor frecuencia es la LAL de precursores B (alrededor del 90%).

Afortunadamente, los avances en quimioterapia, radioterapia y en el trasplante de precursores hematopoyéticos han mejorado de forma considerable las posibilidades de supervivencia de los niños afectados con una patología oncológica, sin embargo, el riesgo de recaída continúa siendo un obstáculo para la recuperación del paciente. Por lo tanto, la detección de enfermedad residual mínima (ERM) constituye un procedimiento de gran interés con el objeto de observar la respuesta temprana al tratamiento, adecuar los requerimientos terapéuticos y predecir posibles recaídas al término del tratamiento remisión-inducción.

En los últimos años, técnicas como la citometría de flujo (CMF) han emergido como herramienta de detección de la ERM debido a que poseen una sensibilidad muy superior a la morfología, la cual se logra al analizar un mayor número de células.

El objetivo principal de este trabajo fue la estandarización de la técnica de citometría de flujo para la detección de la enfermedad residual mínima en pacientes pediátricos del Instituto Nacional de Pediatría (INP) diagnosticados con LAL de precursores de células B.

Por tal motivo, se tomó en consideración la existencia de ciertos inmunofenotipos aberrantes presentes en células leucémicas pero ausentes en células de medula ósea normal, por lo que la elección de una combinación adecuada de anticuerpos monoclonales (AcMo) contribuyó a diferenciar células leucémicas de células normales de medula ósea. Por otra parte, la sensibilidad del equipo se determinó con diluciones de muestras de medula ósea (MO) de niños diagnosticados con LAL de precursores de células B en sangre periférica.

Con la combinación elegida de AcMo (CD10FITC, CD38PE, CD45ECD, CD34PC5 y CD19PC7), se encontraron diferencias entre células normales de MO y células leucémicas, destacando en estas últimas (50%), subexpresión de CD38 y sobreexpresión de CD10, lo cual favorece la detección de la ERM. Por otra parte, se concluyó que esta técnica tiene una sensibilidad de 1 en 10^4 adquiriendo alrededor de 300 a 500 mil eventos, y se determinó que al leer una mayor cantidad de eventos existe una probabilidad mayor de detectar células leucémicas, por lo tanto se valida a la técnica como herramienta de detección de la ERM.

II. Introducción

Las leucemias agudas (LA) son un grupo heterogéneo de enfermedades caracterizado por la proliferación progresiva no regulada, y acumulación de precursores hematopoyéticos, malignos, en medula ósea.

En las últimas décadas, los avances en quimioterapia, radioterapia y en el trasplante de precursores hematopoyéticos han mejorado de forma considerable las posibilidades de supervivencia de los niños afectados con alguna patología oncológica. Sin embargo, el riesgo de recaída continúa siendo, en muchos casos, un obstáculo importante para su recuperación.

La enfermedad residual mínima (ERM) consiste en la persistencia de un clon anormal de células, aún en niveles bajos durante o tras finalizar el tratamiento. En este sentido, la detección ERM constituye un procedimiento de gran interés en el seguimiento de pacientes con LA, la cual durante la etapa de mantenimiento tiene un alto valor para predecir la recaída de la leucemia, por lo que hace posible clasificar grupos de alto y bajo riesgo, y por lo tanto establecer terapias más o menos agresivas con base en su evolución.

Se ha observado que pacientes con leucemia aguda en remisión clínica, pueden aún tener una gran carga de células malignas residuales las cuales son indetectables por morfología. No obstante, el uso de técnicas con mayor sensibilidad como la citometría de flujo (CMF), puede permitir una mejor estimación de la carga leucémica y por consiguiente contribuir en la selección de estrategias terapéuticas adecuadas.

La detección de la ERM por medio de CMF se basa en la identificación de inmunofenotipos aberrantes presentes en células leucémicas pero ausentes en células normales hematopoyéticas. Se ha reportado que este método permite la detección de una célula leucémica entre 10 mil células normales de médula ósea, y puede ser aplicado a por lo menos dos tercios de los pacientes con leucemia aguda.

Estudios previos en una larga serie de pacientes han demostrado una fuerte relación entre niveles de ERM durante la remisión clínica y el resultado del tratamiento. Por lo tanto, ensayos de la ERM pueden ser utilizados de manera confiable para evaluar la respuesta temprana al tratamiento (día 19), la cual está relacionada con la probabilidad de recaída.

Otra aplicación de la detección de la ERM se encuentra en el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH) para la evaluación de la eficacia del procedimiento y por lo tanto, para el monitoreo de pacientes post-TCPH.

En el Instituto Nacional de Pediatría (INP), la leucemia aguda linfocítica de precursores de células B es la leucemia diagnosticada con mayor frecuencia (alrededor del 90%), por tal motivo se pretende realizar la detección de la ERM por la técnica de CMF en tales pacientes. Por lo tanto, la implementación de esta prueba implica; la elección de una combinación adecuada de anticuerpos monoclonales que contribuya a diferenciar células leucémicas de células de MO, creación de protocolos de análisis, determinar la sensibilidad de la técnica y finalmente evaluar la técnica como herramienta de detección de la ERM.

III. Marco teórico

1. Generalidades de las leucemias

La leucemia es una enfermedad neoplásica progresiva del sistema hematopoyético caracterizada por la proliferación no regulada de las células progenitoras, no diferenciadas o parcialmente diferenciadas e incluye a un grupo heterogéneo de neoplasias que difieren respecto a su agresividad, célula de origen y respuestas al tratamiento (1).

1.1. Clasificación de las leucemias

La enfermedad se clasifica en dos amplios grupos con base en la agresividad de la enfermedad: 1) aguda, la cual si no se trata provoca rápidamente la muerte, por lo general en el transcurso de meses, 2) crónica, una variante menos agresiva que si no se trata causa la muerte en meses o años.

Estos dos grupos principales además se clasifican en mieloides o linfoides con base en el origen de la clona de la célula leucémica.

En aquellas leucemias, donde predominan las células linfoides la enfermedad se llama leucemia linfoide, a su vez estas se clasifican en, leucemia aguda linfocítica (LAL) y leucemia linfocítica crónica (LLC) y siguiendo criterios morfológicos, cito-químicos, inmunológicos y citogenéticos de las células malignas pueden identificarse subgrupos de estas leucemias (1).

1.2. Epidemiología

En México, el cáncer es la segunda causa de muerte infantil (2 a 15 años) y cada año se registran 4,000 nuevos casos de cáncer de los cuales el 50% se diagnostican como leucemias mientras que el 50% restante se refiere a distintos tipos de cáncer (2).

Cerca del 98% de todas las leucemias infantiles se diagnostican como agudas y aun cuando éstas se presentan en todas las edades, hay un punto máximo de incidencia en

el primer decenio, particularmente entre los 2 a 5 años de edad. Este es seguido por una disminución en la incidencia en el segundo y tercer decenio, a partir de ese momento la incidencia comienza a aumentar y lo hace después de los 50 años, destacando el hecho de que la mayoría de las leucemias agudas de la infancia son de tipo linfóide (75%), mientras que las que se producen en adultos son clásicamente de origen mielóide (1).

1.3. Factores de riesgo

Las factores que originan leucemias hasta el momento se desconocen, generalmente la LAL se presenta en niños previamente sanos. Sin embargo, existe una estrecha relación a padecer leucemia principalmente en relación a factores genéticos, ambientales, biológicos, inmunodeficiencias, entre otros, aunque en la mayoría de los casos no es posible detectar este tipo de asociaciones que desencadenan dicho padecimiento.

1.4. Diagnóstico

El diagnóstico de leucemia se efectúa con el estudio de extendidos de aspirados de médula ósea, empleando tinciones pancromáticas del tipo MayGrunwald-Giemsa, Wright o Romanowsky. Cuando la invasión blástica de la sangre periférica es muy grave, no hay dificultad para establecer el diagnóstico de la leucemia; esto ocurre regularmente en LAL. Idealmente, el aspirado de médula ósea se debe obtener de la punción de la cresta iliaca y se requiere que más del 20% de las células de la médula ósea sean blastos para establecer el diagnóstico certero en el caso de leucemia aguda. Cuando la invasión por blastos de la sangre periférica es masiva, se infiere que hay más de 20% blastos en la médula ósea (1,3).

1.5. Tratamiento

El tratamiento está encaminado no solo a mejorar la calidad y tiempo de vida del paciente, también implica la curación total de la enfermedad, por una parte la quimioterapia tiene como objetivo eliminar el clon leucémico y mientras que la terapia de soporte que incluye el control de las complicaciones al diagnóstico y durante la quimioterapia, el tratamiento puede durar entre 24-36 meses, sin embargo puede que se alargue (4). Las etapas del tratamiento son:

➤ Etapa I. Inducción a la remisión.

Se utiliza una quimioterapia múltiple combinada (4 a 8 medicamentos) con lo que se pretende disminuir la carga leucémica y llegar a la “remisión completa” definida por la presencia de menos del 0.01% de células leucémicas en médula ósea. Entre los medicamentos más utilizados están: la prednisona, vincristina y

L-asparginasa. Alrededor del 97-99% de los pacientes logran la remisión completa en un lapso de 43 días.

➤ Etapa II. Tratamiento dirigido al SNC.

En esta etapa el objetivo es destruir las células que potencialmente se pueden o pudieron introducir al SNC, la presencia de blastos se comprueba mediante la tinción del centrifugado de LCR. La terapia es intracraneal mediante fármacos compatibles con el SNC como dexametasona, hidrocortisona y metotrexato, y solo se realiza cuando se ha comprobado infiltración leucémica.

➤ Etapa III. Intensificación o consolidación pos-inducción

En esta etapa se pretende erradicar completamente las células leucémicas residuales que hayan sobrevivido, esto mediante medicamentos no utilizados durante la inducción como altas dosis de metotrexato parenteral.

➤ Etapa IV. Mantenimiento o terapia continúa de erradicación. Se administra a diario la 6-mercaptopurina por vía oral, y una vez por semana el metotrexato por la misma vía, además de terapia intracraneal, por dos o tres años. De manera periódica, se puede suspender este tratamiento para administrar de nuevo los medicamentos iniciales: vincristina, prednisona, asparginasa o antraciclina.

Si todas las etapas anteriores se completaron o hubo recaída de la leucemia y ésta se trató con éxito, se pasa a una etapa de vigilancia por periodo mínimo de dos años. Lo ideal es que la vigilancia sea de por vida (4,5).

Un porcentaje cercano al 20% de los pacientes va a sufrir una recaída, sobre todo el primer año de vigilancia después de suspendido el tratamiento. La recaída es el principal obstáculo para la curación, los sitios más afectados son la médula ósea, el SNC y los testículos. Si el paciente sobrevive sin recaídas durante siete a 10 años después del diagnóstico se puede considerar técnicamente curado.

El trasplante de células hematopoyéticas, se utiliza cuando el paciente padece de una leucemia difícil de tratar, ha sufrido ya una recaída o cuando el pronóstico inicial es de muy alto riesgo, como en el caso particular de la LA con un cromosoma Filadelfia (Ph+) (4).

Con los actuales regímenes de quimioterapia se puede obtener la curación en la mayoría de los pacientes (80%), lo que se explica por dos posibles mecanismos: el primero sería que, al utilizar múltiples medicamentos con diferente mecanismo de acción se puede conseguir la destrucción total de la clona maligna; el segundo mecanismo es que estos fármacos reducen la enfermedad a tal grado que el organismo es capaz, por mecanismos naturales de vigilancia inmune tumoral, de completar la eliminación de las células leucémicas residuales (4,5).

2. Leucemia aguda

Las leucemias agudas (LA) son un grupo heterogéneo de enfermedades caracterizado por la proliferación progresiva no regulada, y acumulación de precursores hematopoyéticos, malignos, en la medula ósea. Se caracteriza por la presencia de muchos blastos y formas inmaduras, pero pocas células en etapas de maduración intermedia.

Esta brecha en la maduración se conoce como hiato leucémico y se distingue porque las células son incapaces de diferenciarse a células sanguíneas funcionales normales y en los estudios inmunológicos se observa que encuentran detenidas en una etapa de maduración específica. Estas células leucémicas aparentemente escapan a la muerte programada (apoptosis). El efecto neto es la expansión de la clona leucémica.

Los parámetros más confiables para definir a las neoplasias y clasificar las leucemias agudas en categorías y subgrupos principales son combinaciones del criterio morfológico del grupo Franco-Americano-Británico (FAB), de reacciones citóquímicas, de sondas inmunológicas, de marcadores celulares, de anormalidades citogenéticas y de genética molecular (1).

3. Leucemia aguda linfocítica (LAL)

La leucemia aguda linfocítica (LAL) es una enfermedad frecuente en niños del mundo occidental, de la cual el 80 al 90% de casos corresponde a precursores de células B (PCB). Se caracteriza por la proliferación maligna de células progenitoras linfoides, las cuales reemplazan al tejido hematopoyético normal en la medula ósea e infiltran los ganglios linfáticos, el bazo, el hígado, y otros órganos. La célula predominante en la medula ósea y en la sangre periférica se puede identificar como un linfoblasto (1).

3.1. Fisiopatología.

La anormalidad básica parece ser la mutación de una sola célula progenitora linfoide que da origen a una clona de linfocitos malignos. Estas células linfoides retienen la capacidad de proliferar de manera no regulada, pero parecen estar detenidas en su secuencia de maduración. Es desconocido el factor desencadenante de la mutación genética leucémica original, pero puede ser una combinación de factores leucemógenos.

El inicio de la enfermedad suele ser abrupto y continua de manera progresiva, los pacientes suelen cursar con anemia, trombocitopenia y neutropenia, frecuentemente refieren fatiga, palidez, fiebre, pérdida de peso, irritabilidad y anorexia; la fiebre se vincula generalmente con una infección concomitante. Hay petequias y equimosis en más de la mitad de los pacientes; la hemorragia franca es menos común. Existe dolor óseo en cerca de 80% de los pacientes que manifiestan hipersensibilidad,

especialmente sobre los huesos largos. Con frecuencia el niño rehúsa caminar o estar de pie. Ocasionalmente los niños tienen síntomas relacionados con afección del SNC, los cuales incluyen cefalea y vomito. Son hallazgos comunes la esplenomegalia, hepatomegalia y linfadenopatía (1).

3.2. Datos clínicos.

La cifra de leucocitos puede estar aumentada, disminuida o ser normal; cerca del 60% de los pacientes presenta leucocitosis causada por abundancia de células linfoides inmaduras. La neutropenia frecuentemente es muy notable aun cuando aumente la cifra total de leucocitos. Habitualmente aparecen células blásticas en la sangre, las cuales son pequeñas con citoplasma escaso, cromatina indistinta y nucléolos ausentes o mal definidos. Regularmente disminuye la cifra de plaquetas. Casi siempre se presenta anemia normocítica-normocrómica, y puede ser intensa.

La médula ósea hiper celular revela reemplazo de las células hematopoyéticas normales por elementos linfoides. Hay 30% o más linfoblastos, pero en realidad la mayoría de los pacientes presenta más de 65% (Cuadro 1).

Los linfoblastos son negativos para peroxidasa y sudán negro B. La reacción PAS suele demostrar una positividad granulosa o en grumos gruesos mientras que el naftol AS-D acetato, alfa-naftil acetato, y alfa-naftil butirato son negativos o levemente positivos en la célula nula de la LAL y la LAL-B. La fosfatasa ácida muestra una reacción positiva localizada intensa en la LAL-T. Sin embargo esta reacción no es diagnóstica de la LAL-T ya que puede verse en la LMA M6 y en la LMA M7, así como en los casos de la LAL-B. En la LAL L3 las vacuolas se tiñen con aceite rojo O, lo cual indica la presencia de lípido (1).

3.3. Clasificación FAB de la LAL.

El grupo Franco-Americano-Británico (FAB) ha definido tres subtipos de LAL (L1, L2, L3), con base en la morfología y heterogeneidad de los linfoblastos de la médula ósea (Cuadro 2). Las características citológicas empleadas para evaluar de los blastos incluyen:

1. Tamaño celular
2. Cromatina nuclear
3. Forma nuclear
4. Nucléolos
5. Cantidad de citoplasma
6. Cantidad de basofilia en el citoplasma
7. Vacuolación citoplásmica

Hasta 10 % de células pueden variar en cada característica específica dentro del subgrupo.

Cuadro 1. Características de los blastos en los subtipos de leucemia aguda linfocítica.

Características	Precursor B temprano	B Común (CALLA)	Célula pre-B	Célula B	Precursor T temprano	Célula T
Rearreglo del gen de:						
Inmunoglobulina	+	+	+	+	-	-
Receptor de célula T (RCT)	-	-	-	-	+	+
Características inmunitarias						
Citoplasmica μ	-	-	+	-	-	-
Ig de membrana	-	-	-	+	-	-
CD19	+	+	+	+	-	-
CD24, CD10	-	+	+	+ (CD10 ordinariamente negativa)	-	-
CD20	-	-	+	+	-	-
CD2, CD7	-	-	-	-	+ (CD2 posiblemente negativa)	+
Tinciones citoquímicas						
TdT	+	+	+	-	+	+
Fosfatasa ácida	-	-	-	-	+	+
Anormalidades citogenéticas	t(4;11), t(9,22)	6q-, t(12p), 12p-, t(9,22)	t(1;19), t(9,22)	t(8;14), t(2;8), t(8;22), 6q-	t(9p), 9p-	t(11,14), 6p-
Subgrupo FAB (más frecuente)	L1, L2	L1,L2	L1	L3	L1,L2	L1, L2

+ Generalmente presente; - generalmente ausente. (Adaptado de: Lee, G.R. et al.: Wintrobe's Clinical Hematology. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993.)

➤ LAL L1

Esta es la LAL más común en niños. Así también parece tener el mejor pronóstico. La clave de este subtipo es la homogeneidad de los linfoblastos. La mayor parte de las células dentro de cualquier caso particular son homogéneas de tamaño, pero la heterogeneidad es compatible con la L1 si todas demás características consideradas sugieren L1.

Los linfoblastos son de tamaño reducido predominantemente, pueden llegar a tener el tamaño de un linfocito pequeño; la cromatina suele estar finamente dispersa, pero puede estar más condensada en las células pequeñas y el patrón de cromatina puede

variar de caso en caso, la forma nuclear es regular con hendiduras o muescas ocasionales. Los nucléolos no son prominentes y pueden estar ausentes. El citoplasma es escaso y sólo ligeramente basófilo (Figura 1).



Figura 1. Leucemia aguda linfocítica L1.

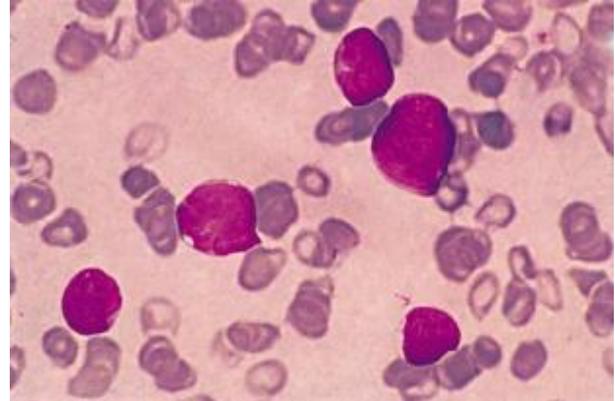


Figura 2. Leucemia aguda linfocítica L2.

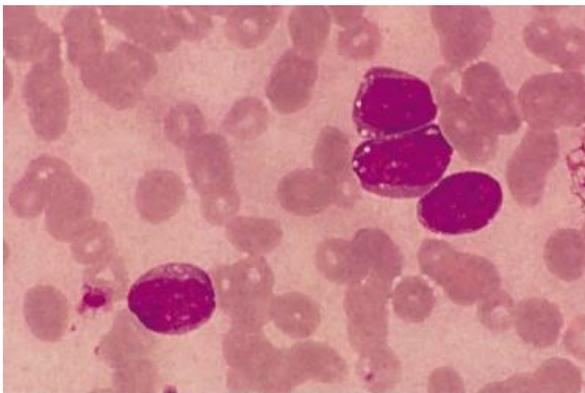


Figura 3. Leucemia aguda linfocítica L3.

➤ **LAL L2**

Ésta es la LAL que se encuentra con mayor frecuencia en adultos. Ocasionalmente las células tienen inclusiones granulares lo que hace difícil distinguir a la L2 de LMA M2, si no se practican tinciones citoquímicas. En contraste con los gránulos en las células mieloides, los gránulos en los linfoblastos son negativos a la peroxidasa y las células son positivas a desoxinucleotidiltransferasa terminal (TdT). Hay una variabilidad considerable en el tamaño de las células dentro de cada caso, pero en general éstas tienen un tamaño dos veces mayor que los linfocitos pequeños. El núcleo es irregular con hendiduras y muescas. El patrón de cromatina en cualquier caso particular es heterogéneo y varía desde finamente reticular hasta condensado. Casi siempre hay nucléolos, pero varían de tamaño y número; frecuentemente son muy grandes. El citoplasma es abundante con basofilia variable.

➤ LAL L3

Esta es la variable más rara de LAL. Se presenta tanto en adultos como en niños. Los linfoblastos son de aspecto similar a los que se encuentran en el linfoma de Burkitt. Las células son grandes con citoplasma abundante intensamente basófilo.

Hay una vacuolización citoplasmica notable. También pueden presentarse vacuolas en linfoblastos en la L1 y en la L2, pero con mucha menor intensidad que en la L3. El núcleo es oval o redondo, con cromatina densa, pero finamente punteada y uno o más nucléolos prominentes.

Cuadro 2. Criterio FAB para subtipos de la LAL.

Características citológicas	L1	L2	L3
Tamaño celular	Predominan las células pequeñas	De tamaño grande, heterogéneo	Grande y homogéneo
Cromatina nuclear	Homogénea en cualquier caso individual	Variable, heterogéneo en cualquier caso	Finamente punteada y homogénea
Forma nuclear	Regular, hendiduras o muescas ocasionales	Irregular, hendiduras y muescas comunes	Regular-oval a redondo
Nuécleolos	No visibles, o pequeños e inconspicuos	Uno o más presente, a menudo grandes	Prominentes, uno o más vesiculosos
Cantidad de citoplasma	Escaso	Variable, a menudo moderadamente abundante	Moderadamente abundante
Basofilia del citoplasma	Ligera o moderada, raramente intensa	Variable; intenso en algunos	Muy intensa
Vacuolización citoplásmica	Variable	Variable	A menudo prominente

Tomado de: McKenzie SB.: Hematología clínica.

4. Leucemia aguda linfocítica tipo B (LAL-B)

Como ya se había mencionado anteriormente de todas las LAL un porcentaje mayor (80-90%) corresponde a precursores de B, por lo tanto, es necesario estudiar las características de tal patología.

4.1. Linfopoyesis.

Se ha establecido que la diferenciación del linaje linfoide progresa gradualmente en la médula ósea, desde progenitores muy primitivos con potenciales múltiples, hasta precursores restringidos que pierden opciones de diferenciación en paralelo con una ganancia de funciones especializadas. A lo largo de este progreso la transcripción del locus de la enzima que recombina los segmentos genéticos VDJ de la inmunoglobulina y del TCR, la recombinasa RAG1, marca a los progenitores linfoides más primitivos denominados ELP (early lymphoid progenitors).

En la médula ósea y el cordón umbilical del ser humano residen una variedad de progenitores multipotentes que no expresan en la superficie ningún marcador de célula sanguínea madura, pero expresan moléculas CD34. La aparición de CD10 y de la enzima desoxinucleotidil-transferasa terminal (TdT) en dichas células es probablemente uno de los eventos iniciales que distinguen a los progenitores linfoides, así mismo, el receptor de quimiocina CXCR4 es sustancialmente expresado en células con actividad precursora linfoide, de tal modo que se especula que podría ser un marcador distintivo de la contraparte de los ELP.

Los posibles progenitores linfoides comunes (PLC) expresan además el receptor de interleucina 7 (IL-7), CD38 y CD45RA, y aunque, tanto en cultivo como in vivo, muestran un potencial residual hacia células T, NK y dendríticas, se diferencian principalmente a linfocitos B.

Por otro lado, células que expresan CD34, CD45RA y CD7, pero no expresan CD10 ni el receptor de IL-7, son altamente eficientes en la generación de células T y NK (6).

4.2. Desarrollo de las células B.

En la ontogenia, el desarrollo de las células B ocurre en el hígado fetal, mientras que después del nacimiento se confina primordialmente a la médula ósea. Aun cuando la información acerca de los eventos de transición a partir de los progenitores multipotentes a los precursores de células B es muy limitada, se han identificado poblaciones funcionales que definen la vía de diferenciación río abajo, iniciando con las células B tempranas hasta la producción de B maduras, que eventualmente serán exportadas a los tejidos linfoides periféricos para cumplir su función de reconocimiento de antígeno, activación y producción de anticuerpos específicos (Ver Cuadro 3 y Figura 4) (6).

Cuadro 3. Desarrollo de células B.

Estadio	CD34	CD19	CD10	cIgM	sIgM
Progenitores linfoides tempranos	+	-	-	-	-
Pro-B	+	+	-/+	-	-
Pre-B I	+	+	+	-	-
Pre-B II	-	+	+	-	-
B inmaduras	-	+	+	+	-
B maduras	-	+	-	+	+

El proceso completo en la médula ósea requiere de la acción concertada de múltiples factores de transcripción, incluyendo Ikaros, PU.1, E2A, EBF y Pax-5. Los dos primeros

actúan paralelamente en el control de la transición de las células troncales a progenitores, mientras que E2A, EBF y Pax-5 regulan secuencialmente el desarrollo de las células B tempranas.

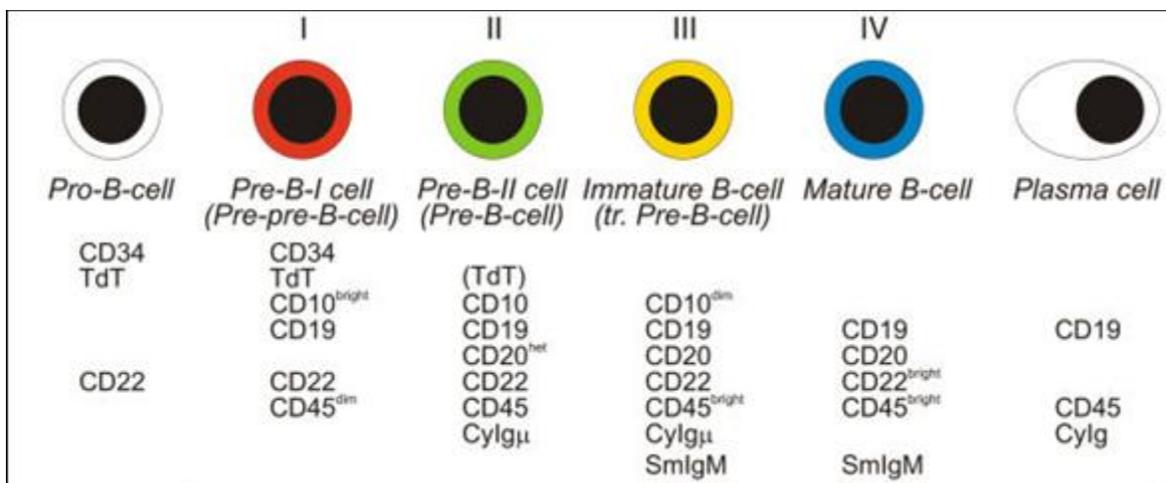


Figura 4. Desarrollo normal de las células B en médula ósea. Tomado de: Van Lochen EG et al: Differentiation Patterns of Normal Hematopoiesis in Human Bone Marrow.

5. Fenotipo inmunitario de la LAL.

La investigación con marcadores de superficie e intracelulares ha mostrado que los linfoblastos en la LAL varían considerablemente en maduración inmunitaria. En las células linfoides normales, algunos determinantes antigénicos (marcadores de superficie) aparecen en una etapa muy temprana del desarrollo y desaparecen con la madurez, mientras que otros aparecen en las células más maduras. Los anticuerpos monoclonales han demostrado que las células leucémicas pueden tener fenotipos de células normales, pero parecen detenerse en cierta etapa de maduración, así también, un número significativo de leucemias agudas expresa combinaciones inapropiadas de antígenos y hace complicado el diagnóstico (1).

Las LAL fueron las primeras neoplasias en beneficiarse de los estudios inmunológicos, siendo clasificadas inicialmente en B, T o nulas (no T - no B) según expresaran inmunoglobulina de superficie (sIg), formaran rosetas con eritrocitos de carnero (por la presencia del marcador CD2) o carecieran de ambos marcadores, respectivamente (Cuadro 4). Posteriormente, el descubrimiento de un Ag presente en el 70% de las LAL infantiles (cALLA o CD10) permitió definir un nuevo fenotipo, "común", al que pertenecían la mayoría de las LAL nulas. Además, todas las LAL, excepto las sIg+, expresaban la enzima intranuclear transferasa terminal deoxinucleotidílica (TdT). A lo largo de la década de los 80's se obtuvieron numerosos anticuerpos monoclonales (AcMo) que detectan antígenos (Ag) de línea linfóide B y T, demostrándose que la mayoría de las LAL no T - no B (comunes y nulas) son de origen B (7,8).

Cuadro 4. Diferenciación entre la LAL y la LAM mediante inmunofenotipificación.

Leucemia	HLA-DR	CD33	CD13	CD65	CD19	CD10	CD24	CD7	CD2
LMA	+	+	+	+	-	-	-	-	-
LAL-B	+	-	-	-	+	+	+	-	-
LAL-T	-	-	-	-	-	-	-	+	+

6. Inmunofenotipo de la LAL-B

En la diferenciación de células B, los primeros antígenos en aparecer son CD19 en la membrana, CD79a y CD22 a nivel de citoplasma. Inmediatamente después o incluso a la vez aparece CD10 y más tarde CD20. Posteriormente el linfocito B adquiere cadena pesada μ de inmunoglobulina (Ig) en el citoplasma para expresarla finalmente en la membrana, los criterios de clasificación de la LAL-B puede verse en el cuadro 5 (1,7).

Cuadro 5. Clasificación inmunológica de la LAL de línea B.

Fenotipo	HLA-DR	CD19	CD22	CD24	CD10	CD20	cIg- μ	Rearreglo de genes Ig	sIg	TdT
Pro-B	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
B común	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
Pre-B	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
B	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-/+

Tomado de: McKenzie SB.: Hematología clínica.

Los subgrupos de la LAL-B incluyen a la LAL de precursor B temprano o pro B, a la LAL común (cALLA), la LAL-pre B y la LAL-B. La LAL de precursor B temprano se incluía anteriormente en la LAL indiferenciada (LAL-I). Sin embargo, recientemente se encontró que la célula característica en esta LAL tenía el marcador temprano de la célula B, CD19, así como rearreglo de los genes de la inmunoglobulina.

El ensamble de los genes de la inmunoglobulina D-J es el primer acontecimiento genético que identifica a un progenitor de la célula B. La siguiente etapa de maduración de la célula B se identifica por la presencia del antígeno común de la LAL (cALLA) CD10, y el marcador temprano de la célula B CD24. Si la célula neoplásica tiene estos marcadores, la LAL se conoce como la LAL común. Ésta es la más común en niños en el mundo occidental. Parece tener mejor pronóstico de los subtipos inmunitarios. También es el tipo de LAL que se encuentra con mayor frecuencia cuando la leucemia mielocítica crónica (LMC) se transforma en LAL. Cabe mencionar que al referirse a la LAL de precursores de células B (LAL PCB) se incluye a los subgrupos: pro B y B común.

Los siguientes dos grupos de la LAL-B, la pre-B y B se identifican con los antígenos de superficie del linfocito B mencionados antes además del antígeno CD20 que aparece en la célula B más diferenciada (Figura 5)(1).

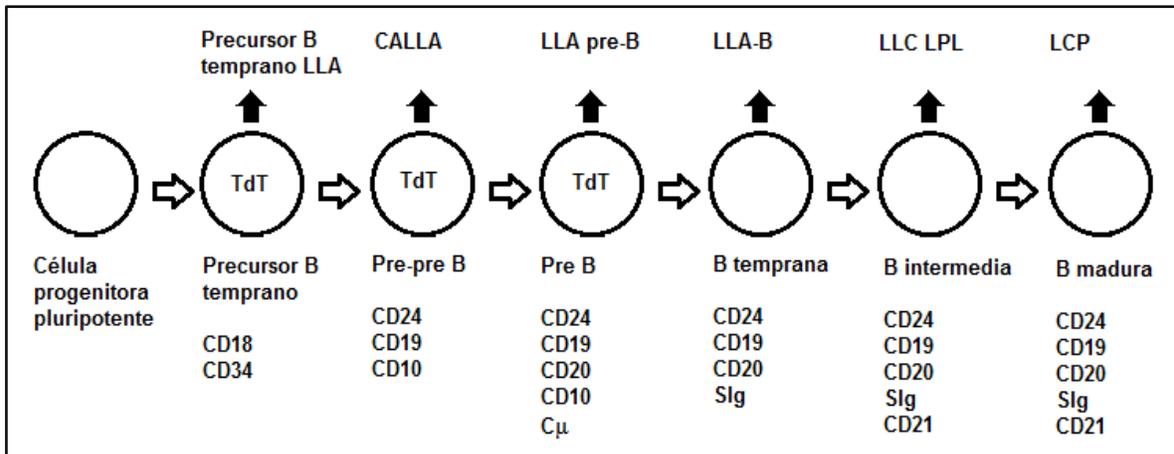


Figura 5. Esquema de maduración normal del linfocito B con contrapartes leucémicas. LLA = leucemia linfocítica aguda; LLC = leucemia linfocítica crónica; LPL = Leucemia prolinfocítica; LCP = leucemia de células peludas; C μ =cadena μ inmunoglobulina citoplasmática; Slg = inmunoglobulina de superficie.

6.1. Desoxinucleotidiltransferasa terminal.

Ciertas enzimas intranucleares han probado ser de utilidad para identificar subtipos celulares. La más importante de éstas es la desoxinucleotidiltransferasa terminal (TdT), una DNA polimerasa que se encuentra en los núcleos celulares. Su presencia se puede determinar por medio de análisis enzimático directo e inmunofluorescencia indirecta o directa con el uso de anticuerpos monoclonales. Esta enzima no está presente en los linfocitos maduros normales, pero puede encontrarse en el 65% de la población tímica normal de linfocitos. Las células positivas a TdT están situadas en la corteza. También se puede encontrar en las células B muy tempranas y en los blastos de la línea celular mieloide inicial. Cerca del 1 a 3% de las células de la médula ósea normal es positivo a TdT. Su valor en la LAL consiste en identificar linfoblastos primitivos de entre células más maduras (1).

7. Inmunofenotipo en el diagnóstico y clasificación de la LA.

El diagnóstico de las leucemias agudas generalmente se hace utilizando criterios clínicos y de laboratorio básico (palidez, fatiga, citopenias, presencia de células blásticas, etc.). El análisis inmunofenotípico tiene como objetivo no el detectar la leucemia aguda, sino asignar el linaje y el estadio de maduración a la proliferación blástica ya establecida. Como ya se había mencionado anteriormente, ciertas combinaciones de anticuerpos pueden definir inmunofenotipos "únicos" que pueden ser de utilidad en la clasificación de la leucemia aguda, así como en la detección de la ERM al distinguir poblaciones normales de precursores hematopoyéticos de proliferaciones leucémicas (7).

Las células del sistema hematopoyético fueron los primeros inmunógenos utilizados en la producción de anticuerpos monoclonales (AcMo), algunos de estos, reaccionan con antígenos (Ag) bien definidos, específicos para cada línea celular e incluso para un estadio madurativo en concreto; otros, sin embargo, detectan antígenos (Ag's) más ampliamente distribuidos, pero pese a ello pueden ser de utilidad diagnóstica dentro del contexto de un panel apropiado de AcMo.

Los estudios inmunofenotípicos también tienen utilidad en el comportamiento de poblaciones linfocitarias, tanto en hemopatías como en el trasplante medular. Por otro lado, los antígenos definidos mediante anticuerpos monoclonales (AcMo) son muchas veces expresión de funciones celulares (adhesión, proliferación, activación, etc.); de ahí que su identificación nos aporte información sobre aspectos funcionales de las células hematopoyéticas.

En los últimos años, varios estudios inmunofenotípicos, han incluido la posibilidad de detectar el producto proteico de algunos oncogenes, como bcl-2, c-myc, o p53 mediante anticuerpos monoclonales apropiados (7).

8. Enfermedad residual mínima.

Una multitud de factores clínicos y biológicos han sido asociados con una respuesta variable al tratamiento en pacientes con leucemia aguda, pero su poder predictivo está lejos de ser absoluto, y su utilidad para guiar decisiones clínicas en pacientes individuales es inherentemente limitada. Una forma de predecir la respuesta al tratamiento, es la medición in vivo de la citorreducción leucémica que provee directamente información sobre la efectividad del tratamiento en cada paciente. Esta información debería de tener gran utilidad clínica, pero estimaciones por técnica de morfología convencional tienen una relativamente baja sensibilidad y precisión: en muchos casos, las células leucémicas pueden ser detectadas en M.O. con certeza solo cuando constituyen el 5% o más del total de la población celular. Estas limitaciones son superadas por métodos para detección de la enfermedad residual mínima (ERM), los cuales pueden ser 100 veces más sensibles que la morfología y permiten una mejor valoración de la respuesta al tratamiento (9,10).

La enfermedad residual mínima (ERM) consiste en la persistencia de un clon anormal, aún en niveles bajos, durante o tras finalizar el tratamiento. La ERM tiene significado pronóstico ya que puede predecir la recaída temprana de la enfermedad, por lo tanto, conocer su presencia nos puede ayudar a plantear estrategias terapéuticas con el fin de prevenir la recaída (3).

Por lo tanto se requiere de técnicas sensibles que permitan evaluar la masa residual y poder así adecuar el tratamiento de consolidación en cada caso específico. Hasta la

fecha no se ha establecido cual es la mejor estrategia para detectar ERM ni el valor clínico de estos hallazgos. Es probable que cada tipo de leucemia o linfoma requiera una estrategia particular en función de sus características inmunofenotípicas y moleculares. Por tanto, son necesarios análisis prospectivos para cada neoplasia, utilizando esquemas terapéuticos uniformes y evaluando simultáneamente distintas metodologías para la detección de las células leucémicas residuales (PCR, inmunofenotipo, FISH).

Dudas iniciales respecto a la utilidad clínica de la detección de la ERM se originaron debido a la distribución heterogénea de la leucemia durante la remisión clínica. Otro problema fue que las señales de la ERM pueden no corresponder a células leucémicas viables con la capacidad de renovación (10).

La leucemia aguda generalmente es considerada en remisión cuando las células neoplásicas componen menos del 5% de la población celular en medula ósea (límite inferior de detección por morfología) y la recuperación hematológica completa en sangre periférica. Sin embargo, pacientes con leucemia aguda pueden tener aproximadamente 10^{12} células malignas en el diagnóstico, estos en remisión bajo este criterio pueden tener 10^{10} células neoplásicas indetectables (3,9). Además de que células residuales frecuentemente no pueden ser detectadas por simple morfología, ya que en pacientes con LAL la morfología de los blastos malignos es indistinguible de los linfocitos precursores.

Mediante el empleo de las actuales técnicas como la citometría de flujo y PCR para determinar ERM, que tienen una sensibilidad 100 veces superior a la citomorfología, es posible identificarla en numerosos pacientes en remisión. La introducción de estas técnicas ha conducido a una nueva definición de remisión en las leucemias según la cual podría considerarse remisión hematológica cuando no se detecta ERM con un umbral de 1 en 10^4 (0,01% de células leucémicas del total de células normales de la médula ósea) (3).

8.1. Aplicaciones de la detección de la ERM.

El estudio de la enfermedad residual mínima (ERM), en distintas neoplasias infantiles, ha ido adquiriendo en los últimos años una importancia trascendental en la detección y seguimiento de pacientes con mayor probabilidad de recaída y como consecuencia, un mal pronóstico a largo plazo.

En adición, estudios de ERM proveen una poderosa herramienta para la valoración de medula ósea o sangre periférica que ha sido obtenida para un trasplante autólogo de células madre hematopoyéticas, y para determinar la eficacia del procedimiento.

Finalmente, estudios de ERM pueden demostrar la presencia de células leucémicas en SNC (Cuadro 6) (9).

Cuadro 6. Posibles aplicaciones del estudio de la ERM en el manejo clínico de la leucemia aguda.

Tiempo de estudio	Objetivo
Durante la inducción de la remisión	Medición de la respuesta temprana al tratamiento
Al final de la inducción de la remisión, continuación temprana	Identificación de pacientes con alto riesgo de recaída
Durante todo el tratamiento	Detección de inminente de recaída
Durante todo el tratamiento	Identificación de células leucémicas en sitios extramedulares (Ejem. SNC)
Antes de la implantación de células madre autólogas	Detección de células leucémicas contaminantes
Antes de la implantación de células madre autólogas	Evaluación de la eficacia del procedimiento

Por otra parte, mediciones de ERM pueden ser usados como punto de comparación para la efectividad de diferentes regímenes quimioterapéuticos.

8.2. Métodos de estudio de la ERM.

Numerosos métodos de monitoreo de ERM en leucemia aguda han sido desarrollados, tales métodos deben cumplir ciertos requisitos que incluyen una elevada sensibilidad, especificidad y reproducibilidad. Los procedimientos que actualmente cumplen estos requisitos son la inmunofenotipificación por citometría de flujo y la reacción de la cadena polimerasa (PCR), además de que en algunos laboratorios consideran la hibridación in situ con fluorescencia (FISH) (3).

Las células leucémicas pueden ser diferenciadas de las células hematopoyéticas normales con base en varias características genéticas y celulares. En primer lugar está el inmunofenotipo de las células anormales, las cuales pueden ser detectadas por citometría de flujo. Con raras excepciones, los linfoblastos leucémicos poseen inmunofenotipos suficientemente distintos para permitir la detección de 1 célula leucémica entre 10 000 células normales (0.01%). Otra característica asociada a leucemia es el rearreglo clonal de los genes de inmunoglobulina (Ig) y del receptor de célula T (TCR). Estos rearreglos resultantes pueden ser detectados en muchos casos por PCR con una sensibilidad de 0.01% a 0.001%. Una tercera característica asociada a leucemia está representada por anormalidades cromosómicas y sus correspondientes genes de fusión, tales como BCR-ABL y TEL-AML1. Menos de una tercera parte de pacientes con LAL tienen células leucémicas con anormalidades genéticas que pueden ser estudiadas en los laboratorios de biología molecular, esto permite la detección de ERM con una sensibilidad que va de 0.1% a 0.001% (14).

En resumen las técnicas más utilizadas son:

- La citometría de flujo (CMF), es técnica utilizada para analizar y definir el perfil inmunofenotípico de las células neoplásicas, así como para establecer presencia de inmunofenotipos aberrantes. Se basa en el empleo de anticuerpos monoclonales específicos, dirigidos contra proteínas de membrana o citoplasmáticas, que llevan apareado un fluorocromo para su detección y visualización mediante un sistema informático apropiado.
- La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es una técnica molecular que permite amplificar secuencias específicas de ADN o ARN expresadas en las células tumorales. Con la RT-PCR se puede analizar el ARN de transcripción expresado en dichas células. Esto nos permite el estudio de los genes alterados por translocaciones primarias.
- Hibridación in situ con fluorescencia (FISH), esta técnica molecular utiliza sondas de ADN acopladas a un fluorocromo, que ponen de manifiesto la presencia o ausencia de un determinado fragmento genético, así como su localización cromosómica. Mediante un microscopio de fluorescencia se capta la imagen de la señal en la célula (3).

9. Detección de la ERM por citometría de flujo.

El descubrimiento de que las células leucémicas expresan inmunofenotipos no expresados por células normales de médula ósea ni de sangre periférica, proporciono una de las primeras oportunidades para el estudio de la ERM. A través de los años, ensayos de ERM basados en inmunofenotipo han sido consistentemente mejorados por avances en la calidad y variedad de anticuerpos y fluorocromos, por el desarrollo del citómetro y por el enorme progreso en informática que ha ocurrido en las últimas décadas (10).

La citometría de flujo permite el análisis simultáneo de varios parámetros celulares. La información del tamaño y granularidad celular, en combinación con la intensidad de expresión de moléculas de superficie e intracelulares, permite identificar un inmunofenotipo que distingue células leucémicas de sus contrapartes normales (10).

Con la actual disponibilidad de reactivos, es raro cuando un adecuado inmunofenotipo no puede ser definido para monitorear ERM. Debido a la posibilidad de cambios inmunofenotípicos, es aconsejable el uso de múltiples paneles de anticuerpos para identificar todas las anormalidades inmunofenotípicas presentes en las células

leucémicas, y así, poder prevenir resultados falsos-negativos de ERM. Incluso se ha sugerido que los estudios de ERM podrían realizarse sin un conocimiento previo del perfil inmunofenotípico de diagnóstico, por lo que se buscan células con inmunofenotipos que se desvíen de los patrones normales establecidos y de la linfopoyesis. Sin embargo, puede dificultarse la interpretación de un resultado negativo sin el conocimiento previo del inmunofenotipo de las células leucémicas, y esta falta de conocimiento evita determinar la sensibilidad de los ensayos de la ERM (10).

9.1. Inmunofenotipo en la detección de la ERM.

Aunque las células leucémicas no presentan antígenos específicos que permitan diferenciarlas de las células normales, excepción hecha de algunas proteínas resultantes de la fusión de dos genes como BCR-ABL, estudios realizados empleando amplios paneles de anticuerpos monoclonales (AcMo) en dobles y triples marcajes, en leucemias agudas, han puesto de manifiesto la existencia de múltiples aberraciones antigénicas con respecto a los patrones fenotípicos detectados en células normales (7).

El hecho de utilizar ciertos paneles de anticuerpos tiene como finalidad poder determinar el linaje celular e identificar el estadio de maduración en el cual se han detenido las células leucémicas.

En este sentido se definen como fenotipos leucémicos:

- a. Infidelidad de línea, se define por la coexpresión en la misma célula de antígenos asociados a dos líneas celulares diferentes (Ej. LAL con antígenos mieloides)
- b. La presencia de asincronismos madurativos en la expresión de antígenos de diferenciación (Ej. LAM cuyas células coexpresan CD34 y CD14, a diferencia de la hematopoyesis normal en la que cuando aparece CD14 ya se ha perdido CD34).
- c. Sobreexpresión o subexpresión de un antígeno.
- d. La detección de células positivas fuera de su localización normal “fenotipo ectópico”(Ej. células TdT+ en LCR).

Con respecto a la frecuencia de fenotipos leucémicos y su aplicabilidad para investigar en ERM, se ha encontrado que están presentes en el 80% de LAM, 95% de LAL de precursores B y 100% de LAL-T. La estrategia para la detección de ERM consiste en investigar el fenotipo al diagnóstico y buscar durante el tratamiento de la enfermedad

la persistencia de células con este fenotipo. Por ello, un problema importante sería la existencia de cambios fenotípicos en la recaída (7).

Esta técnica no presenta falsos positivos, sin embargo, durante el curso de la enfermedad el inmunofenotipo de las células leucémicas puede cambiar, provocando un falso negativo. Muchos de estos cambios se encuentran relacionados con poblaciones mínimas de células leucémicas que pueden ser positivas y negativas para un mismo antígeno, por lo que es importante identificar estas subpoblaciones leucémicas en el seguimiento de la ERM, ya que una recaída puede presentarse como consecuencia de una pequeña cantidad de células leucémicas resistentes a la quimioterapia.

Debido a que, las células leucémicas pueden expresar marcadores de diferenciación leucocitaria en combinación y/o en niveles totalmente distintos al de las células de medula ósea y sangre periférica normal. El reconocimiento de estas diferencias forman las bases para los actuales estudios de inmunofenotipo en la ERM (10).

Para identificar inmunofenotipos para un efectivo estudio de la ERM, se deben de considerar las variaciones en la composición celular e inmunofenotipo de medula ósea normal que ocurren con la edad y la exposición a ciertas drogas. Por ejemplo, precursores linfoides de origen B (o hematogonias) son escasos en la MO de adultos sanos y muy raras en pacientes que han recibido corticosteroides o quimioterapia. En contraste estas células son abundantes en la MO de niños pequeños o de pacientes con alguna malignidad después del trasplante o cese de la quimioterapia. Estas condiciones pueden exponer células normales expresando fenotipos que son indetectables en muestras obtenidas de una persona sana, por tal motivo se requiere un cuidadoso análisis de las células colectadas de medula ósea bajo una variedad de condiciones (10).

9.2. Marcadores para el estudio de la ERM en LAL-B.

Los primeros intentos de estudio de la ERM fueron se vieron obstaculizados por la limitada disponibilidad de AcMo para marcadores de células leucémicas. Después se demostró que estos marcadores eran también expresados por células linfo-hematopoyéticas normales. Por ejemplo, la enzima TdT y CD10 son expresados en hematogonias y en linfoblastos leucémicos. Las hematogonias son particularmente abundantes en la MO de niños pequeños y en MO regenerada después de la quimioterapia o trasplante, donde estas pueden representar de 10 al 20% de las células mononucleadas. Aunque los niveles de expresión de TdT y CD10 pueden ser anormales en algunos casos de leucemia, estos marcadores no deben ser usados solos para identificar células leucémicas en medula ósea. Las células TdT+, CD10+ son

extremadamente raras en sangre periférica, por lo que estudios tempranos sugirieron que un incremento arriba de 0.1% en la proporción de sangre periférica de células TdT+ podría ser considerado como una temprana señal de recaída. Sin embargo, estudios posteriores mostraron que la proporción de células de TdT+ en sangre periférica con frecuencia se eleva en pacientes quienes permanecen en remisión. Se ha demostrado también que CD10 es inadecuado como único marcador para el confiable monitoreo de ERM en sangre periférica (9).

En su trabajo, Campana D. et al. utilizaron diferentes combinaciones de marcadores para el monitoreo de la ERM en pacientes pediátricos con LAL tanto de linaje B como T. Las combinaciones de marcadores utilizados y sus respectivas frecuencias con una sensibilidad de 10^{-4} se pueden observar en el Cuadro 7. El análisis realizado por este grupo de trabajo para la detección de la ERM se muestra en la figura 6. De esta manera, en los gráficos de análisis se encuentran áreas que son siempre blancas en muestras de MO normal, no así con muestras de pacientes con LAL-B en el momento del diagnóstico. Lecturas positivas en estas áreas sugieren leucemia residual (9,10).

Cuadro 7. Combinación de marcadores usados en el monitoreo de la ERM en niños con LAL

Subtipo de leucemia	Combinación de marcadores	Frecuencia (%)
LAL-T	Anti-TdT/CD5/CD3	90 – 95
	CD34/CD5/CD3	30 – 50
LAL linaje B	CD19/CD34/CD10/CD58	40 – 60
	CD19/CD34/CD10/CD38	30 – 50
	CD19/CD34/CD10/CD45	30 – 50
	CD19/CD34/CD10/anti-TdT	30 – 50
	CD19/CD34/CD10/CD22	20 – 30
	CD19/CD34/CD10/CD13	10—20
	CD19/CD34/anti-TdT/anti-IgM	10—20
	CD19/CD34/CD10/CD66c	10—20
	CD19/CD34/CD10/CD33	5 --10
	CD19/CD34/CD10/CD65	5 --10
	CD19/CD34/CD10/CD15	5 --10
	CD19/CD34/CD10/CD21	5 -- 10
	CD19/CD10/CD10/anti-NG2	3-5

Como ya se ha mencionado, los equivalentes normales de células de LAL-B son progenitores de células B que normalmente residen en la MO (pero generalmente son ausentes durante las primeras 2-3 semanas de la inducción a remisión), y pueden encontrarse en bajas proporciones en SP. Las células de LAL-B pueden ser distinguidas de sus contrapartes normales con base en varias moléculas expresadas anormalmente en altos o bajos niveles. Por ejemplo, marcadores asociados a la línea mieloide CD13, CD15, CD33 y CD65, y marcadores asociados a células B maduras como CD21 pueden ser expresados por células de LAL-B CD19+ CD34+, donde los progenitores normales

de células B CD19+ CD34+ no expresan estos marcadores o los expresan muy débilmente. La expresión de CD19, CD10, TdT y CD34 en LAL-B puede ser marcadamente alta o baja, que sus contrapartes normales, por otra parte CD38 y CD45 pueden ser subexpresados en células leucémicas (10).

Las diferencias en la expresión de antígenos entre células leucémicas y células progenitoras normales pueden ser cualitativas, cuantitativas o ambas. Diferencias cualitativas son observadas en la combinación antigénica expresada por células leucémicas pero extremadamente raras por células de medula ósea normal. Un ejemplo CD34/CD19/CD21, la cual es expresada en una proporción de casos de LAL-B, en células normales este fenotipo es encontrado en raras ocasiones, pero la expresión antigénica es usualmente débil, y está muy por debajo de los niveles vistos en células leucémicas. Las diferencias cuantitativas en la expresión de antígenos pueden ser usadas para distinguir blastos leucémicos de subconjuntos de células con fenotipos similares. Por ejemplo, la expresión de CD19, CD10 y CD34 en algunos casos de LAL-B puede ser más de 10 veces mayor que en células progenitoras B (9).

Para la identificación de células inmaduras B resulta útil la simultánea expresión de CD19, CD10 y CD34. Diferencias cuantitativas en la expresión antigénica entre células leucémicas y normales de estos marcadores puede usarse en aproximadamente 30-50% de los casos. (9).

Cuadro 8. Distribución normal de marcadores utilizados en el monitoreo de la ERM de LAL-B.

Marcador	Distribución normal
CD34	Precusores hematopoyéticos, linfoblastos y mieloblastos.
CD45	Todos los leucocitos, ampliamente expresados por eritroblastos tempranos
CD10	Precusores de células B
CD19	Precusores de células B y B maduras
CD20	Precusores tardíos de células B y B maduras
CD22	Precusores de células B y B maduras
CD2	Células de timo y células T maduras, células NK
CD7	Células T, células NK, células madre hematopoyéticas
CD13	Células mieloides y monocitos
CD33	Células mieloides y monocitos, eritroblastos tempranos y megacarioblastos
CD38	Precusores de células B y T, aumento de expresión en linfocitos activados, fuertemente expresado en la diferenciación terminal de células B
CD49f	Células T, monocitos, plaquetas y centro germinal de células B
CD58	Precusores de células B, sobreexpresión en blastos leucémicos de LAL-B
7.1 (NG1)	Reaccionan contra el NG1 en la alteración cromosómica 11q23

En los estudios de Wilson K. et al., sugieren que en un porcentaje (60%) de casos de LAL-B puede monitorearse la ERM mediante la búsqueda de células leucémicas definidas por inmunofenotipo CD34+, CD38 débil y CD19+ (11).

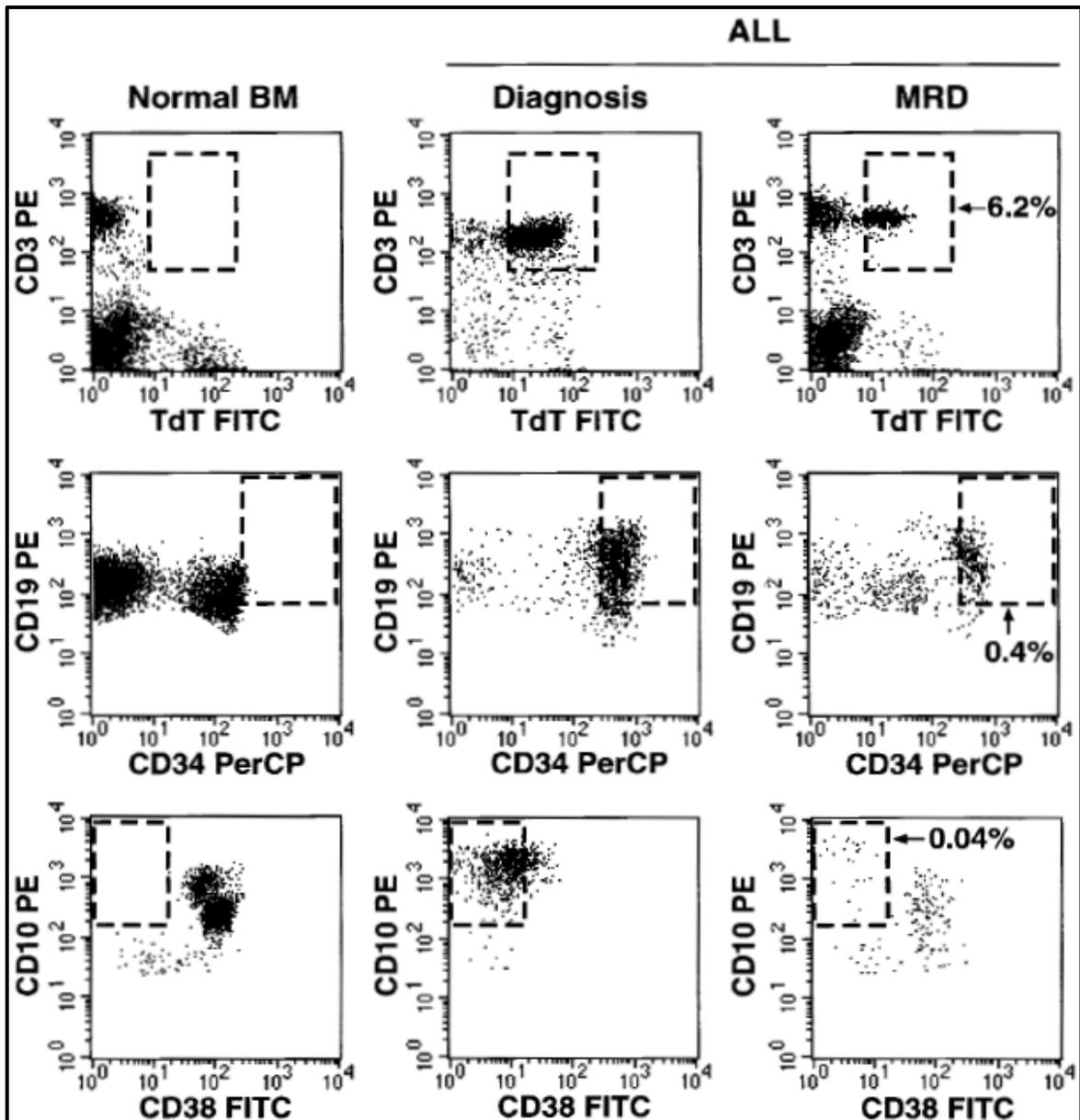


Figura 6. Diferencias en la expresión de antígenos entre células normales y leucémicas. Los gráficos muestran la tinción de células de MO normal y células de pacientes con LAL-T (paneles superiores) y LAL-B (paneles del medio e inferiores) con CD3 y anti-TdT, CD19 y CD34, y CD10 y CD38, respectivamente. En los casos de LAL-B únicamente se muestran las células CD19+. Se muestran áreas encerradas en rectángulos las cuales son siempre blancas en muestras de MO normal. En los tres casos de LAL, muchas células caen en estas áreas. Células de leucemia residual aun fueron detectadas en los tres pacientes durante la remisión clínica, 6 meses después del diagnóstico (paneles de la derecha). El número de eventos adquiridos para las muestras de MO normal fue de 10 000, 156 000 y 143 000 para las combinaciones CD3/TdT, CD19/CD34 y CD10/CD38, respectivamente. En de la ERM los eventos fueron 10 000, 112 000 y 129 000 respectivamente (9). Tomado de Campana D. et al.

Se ha sugerido que un simultáneo análisis de inmunofenotipo e índice de DNA (IDNA) también pueden contribuir al estudio de la ERM.

Otro marcador que puede dar información adicional es el 7.1 (NG1) que reacciona con el homólogo humano de la rata proteoglicano condroitin sulfato (NG2), que aparece específicamente en el reconocimiento de células leucémicas definidas por la anormalidad 11q23 y está ausente en células hematopoyéticas normales, este marcador es resultado de la desregulación en la expresión de genes. Ciertos estudios han demostrado que este marcador es lo suficientemente sensible para detectar una célula leucémica entre 10 000 células hematopoyéticas normales por citometría de flujo (9).

Es importante destacar que en el estudio de la ERM, es esencial realizar un análisis detallado de las características inmunofenotípicas de las células leucémicas del paciente en el momento del diagnóstico.

9.3. Sensibilidad de técnica.

Bajo condiciones ideales (10^7 o más células) la sensibilidad de la citometría de flujo es similar al de la PCR. Sin embargo, durante el análisis de ERM en muestras clínicas, el número de células que pueden ser analizadas por cada grupo de marcadores es usualmente menor de 1×10^6 , por lo que la sensibilidad aproximada sería 1 célula blanco entre 10^4 a 10^5 células (10). Además, un alto nivel de sensibilidad puede ser logrado solo con el uso de marcadores que son fuertemente asociados con células leucémicas (9).

La CMF tiene el potencial para una muy precisa cuantificación de ERM (Figura 7). En experimentos con una serie de diluciones de células de LAL-B sangre periférica, el estimado del contenido de células en cada mezcla fue extremadamente preciso ($r^2 = 0.999$) (10,12).

9.4. Ventajas y desventajas de la técnica de CMF.

Debido a su amplia disponibilidad, la citometría de flujo es probablemente el método más accesible para la detección de la ERM. Una ventaja específica de la CMF sobre los ensayos basados en PCR es que permite la cuantificación directa de la ERM, en vez de una extrapolación de cantidad de los productos de PCR. Esta característica hace que la cuantificación sea más fácil y típicamente más precisa. Por otra parte, el análisis por CMF permite establecer el estatus de células hematopoyéticas no leucémicas (10).

La citometría de flujo también tiene algunas limitaciones. La sensibilidad de detección, tal como la detección de 1 célula leucémica entre 10^5 o más células, es difícilmente

lograda constantemente por CMF comparada con la PCR. Otra limitación es que el inmunofenotipo de las células puede cambiar durante la evolución de la enfermedad, lo que puede afectar en el monitoreo de la ERM y dar un falso negativo como resultado, en estos casos se recomienda el uso de una múltiple combinación de marcadores (10).

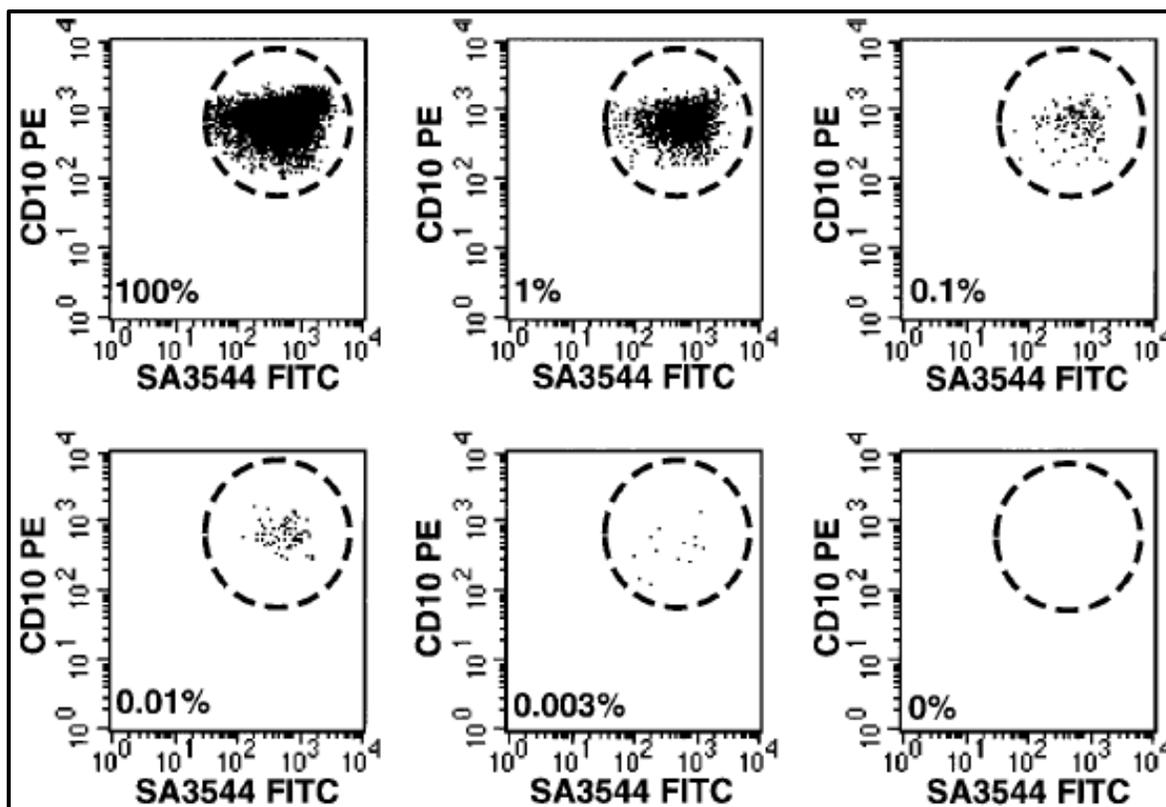


Figura 7. Sensibilidad de la detección de la ERM por citometría de flujo. Células de LAL fueron diluidas con células de sangre periférica en los porcentajes indicados. Las células fueron marcadas con CD10 PE y KOR-SA3544 FITC. Hasta 600 000 eventos fueron adquiridos para cada dilución. El área dentro de los círculos es blanca con muestras normales, pero incluye a las células leucémicas en este caso.

10. Información clínica del nivel de ERM.

El 0.01% es el umbral comúnmente utilizado para definir ERM positiva, simplemente porque este representa el límite característico de detección en la rutina para CMF. Trabajos previos han demostrado que este umbral puede ser clínicamente informativo. Por ejemplo, se ha encontrado que pacientes quienes tienen ERM $\geq 0.01\%$ en MO durante el tratamiento (en especial al día 19 de la inducción a la remisión), tienen un alto riesgo de recaída (13,14).

Cada vez existe mayor consenso en que sería deseable realizar el estudio de ERM en la LAL al final de la inducción, al final de la consolidación, a los 12 meses de tratamiento y tras finalizarlo, pues la detección de ERM nos aporta una valiosa información sobre la predicción del curso clínico de la enfermedad y nos permitiría adoptar estrategias terapéuticas en consecuencia (3).

11. Citometría de flujo.

La CMF es un método automatizado, multiparamétrico y cuantitativo que analiza las señales dispersión de luz y fluorescencia producidas por una célula al pasar por un haz de luz, estas medidas son realizadas mientras las células (o partículas) pasan una a la vez, a una velocidad de 500 a 4000 células por segundo.

La citometría de flujo fue introducida en el laboratorio clínico en la década los años 80. La evolución de la CMF se produjo como resultado del desarrollo de los anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales conjugados con un fluorocromo permiten el estudio de las propiedades físicas y biológicas de una célula. Con la ayuda de la citometría de flujo ha mejorado la capacidad para el diagnóstico de ciertos estados patológicos para el establecimiento de sus etapas, y para vigilar sus intervenciones terapéuticas.

Otras aplicaciones clínicas son:

- Análisis de subpoblación de linfocitos, fue la aplicación clínica que condujo al ingreso de la citometría de flujo en el laboratorio clínico.
- Inmunofenotipificación de leucemias y linfomas.
- Análisis de ploidia del DNA.
- Estudios de apoptosis y producción de citocinas.

11.1. Principio de la citometría de flujo.

Al pasar la célula a través del haz laser, dispersa la luz en ángulos diferentes y los fluorocromos (en caso de que el antígeno este presente) la absorben y la emiten nuevamente a una longitud de onda distinta (fluorescencia). La luz se esparce en ángulos diferentes; la dispersión hacia delante también llamada Forward Scatter (FS) define el tamaño de la célula y la dispersión lateral también llamada Side Scatter (SS) define la granularidad o complejidad celular. La intensidad de fluorescencia es proporcional a la cantidad de antígeno presente sobre la célula o dentro de ella (Figura 8).

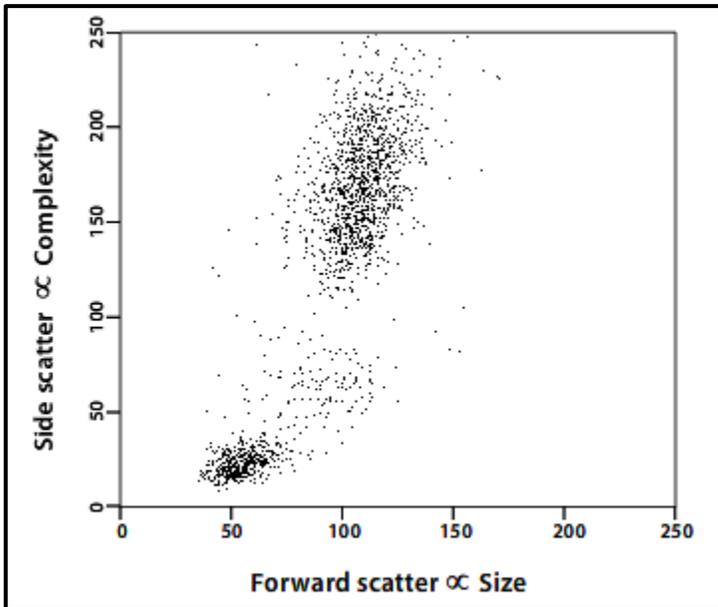


Figura 8. Histograma que representa la distribución de los leucocitos en SP (Tamaño vs Complejidad).

La CMF proporciona información de manera rápida y sensible sobre diferentes características físicas y químicas de células en suspensión, siendo esta información de tipo cualitativo, cuantitativo e individual. Las propiedades físicas celulares como tamaño (FS) y complejidad interna (SS) permite el reconocimiento de poblaciones celulares considerando características morfológicas que en conjunto con el uso de AcMo conjugados a diferentes fluorocromos nos permiten observar subpoblaciones celulares basados en fenotipos mediante el reconocimiento de proteínas dispuestas en la membrana e intracelularmente (Figura 9)(15).

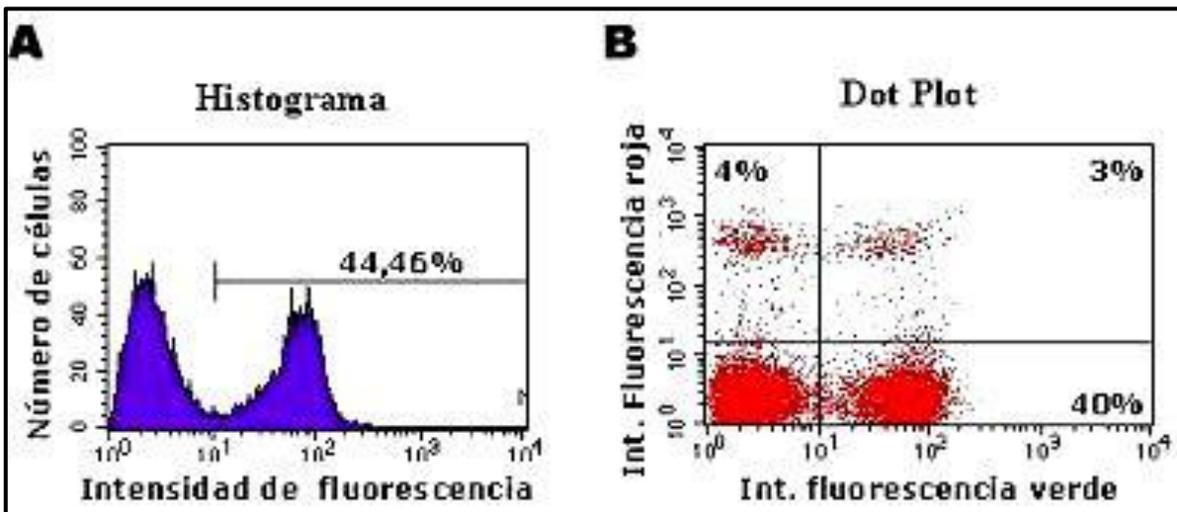


Figura 9. (A) Histograma que representa la intensidad de fluorescencia que es directamente

proporcional a la cantidad de antígeno presente. (B) Diagrama de puntos (DotPlot), representación simultánea de dos parámetros.

11.2. Componentes del citómetro de flujo.

Los componentes básicos de un citómetro de flujo son el sistema hidráulico, el sistema óptico, sistema detector de señales, y el sistema informático (Ver Figura 10).

- Sistema hidráulico: Tiene la responsabilidad del movimiento de la muestra a través de la cámara de flujo desde su aspiración hasta su descarte como desecho. Mediante un enfoque hidrodinámico se crea una suspensión de células simples dentro una vaina líquida. Las células pasan a través del haz láser en fila única a una velocidad aproximada de 500 a 4000 células por segundo.
- Sistema óptico: Consiste de una fuente de excitación y un sistema para generar y coleccionar las señales luminosas. El sistema de excitación consiste en un láser (láser de ion de argón con luz monocromática de 488 nm), lentes y prismas para dirigir el rayo. Las características importantes de la luz láser son su alta radiación, estabilidad y pureza espectral.
- El sistema de colección consiste en espejos ópticos y filtros para encaminar determinadas longitudes de onda hacia detectores ópticos determinados.
- Sistema electro-informático: Convierte las señales de dispersión de luz y fluorescencia en señales eléctricas y las procesa para su análisis.

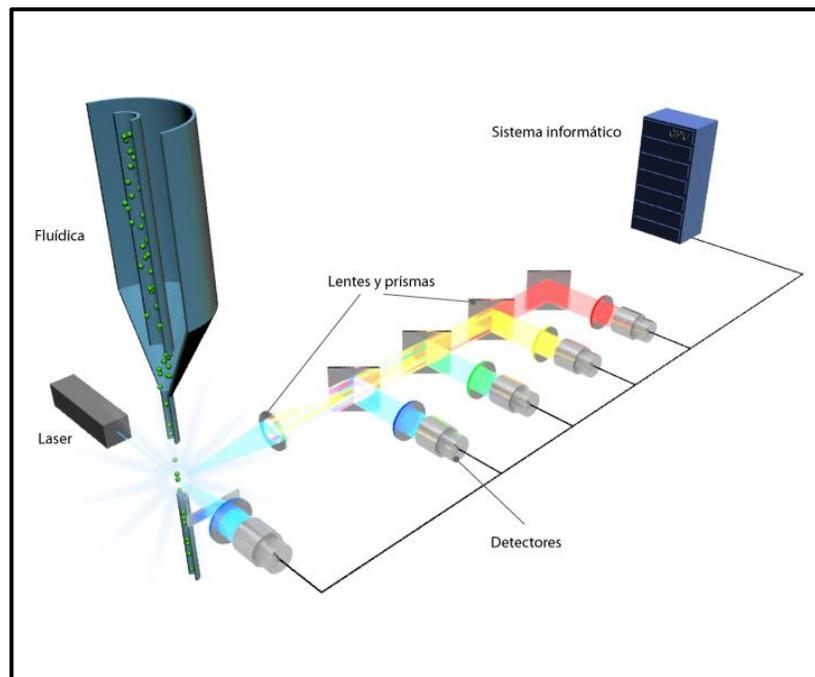


Figura 10. Componentes de citómetro de flujo.

11.3. Fluorocromos.

Son moléculas que absorben luz de determinada longitud de onda y la emiten a otra de mayor longitud de onda. Se caracterizan por sus espectros de excitación y de emisión, por lo que su uso está condicionado por el tipo de laser del que disponga el citómetro y de la longitud de onda a la que se exciten, por ejemplo, en un láser con una longitud de onda de 488 nm, los fluorocromos utilizados deberán ser capaces de ser excitados a esta longitud de onda y además emitir en longitudes lo más lejanas posibles entre ellas (Tabla 9).

Cuadro 9. Fluorocromos utilizados para laser de ion Argón con longitud de onda de 488 nm.

Nombre	Abreviatura	Excitación (nm)	Emisión (nm)	Fluorescencia
Isotiocianato de fluoresceína	FITC	488	525	FL1
Ficoeritrina	PE	488	575	FL2
Ficoeritrina-Rojos Texas	ECD	488	615	FL3
Ficoeritrina-Cianina 5	PC5	488	675	FL4
Ficoeritrina-Cianina 7	PC7	488	767	FL5
Yoduro de propidio	PI	493	610	FL3

12. Condiciones de la muestra.

Para mayor confiabilidad en los resultados, la muestra en estudio debe de cumplir ciertas características para poder ser procesada.

- La muestra debe de ser preferentemente MO, aunque la SP con un conteo alto de blastos (mayor al 80%) también puede ser usada, la sangre periférica puede ser usada en casos donde no se pueda obtener una adecuada muestra de medula ósea (Ej. Fibrosis).
- El volumen también es importante, primero, se debe de evitar la dilución de la muestra con sangre periférica y el volumen ideal de medula ósea para CMF es de 2 a 5 mL.
- El anticoagulante ideal es EDTA con una concentración 1.0 mg/mL, aunque también se puede usar heparina y ACD.
- Una vez extraída la muestra debe almacenarse a una temperatura de 18-25°C, y debe de procesada dentro de las 6 horas siguientes.

- El paciente debe de estar en remisión completa, menos de 5% de células blasticas (por morfología) en médula ósea.
- La muestra debe de ser remitida siempre y cuando la medula ósea este reconstituida, posterior a un ciclo terapéutico o al trasplante de aspirado de medula ósea.

13. Análisis estadístico.

13.1. Análisis de regresión y correlación lineal.

El análisis de regresión consiste en emplear métodos que permitan determinar la mejor relación funcional entre dos o más variables relacionadas, todo esto con el objeto de predecir una variable en función de la otra.

Una relación funcional entre dos variables se expresa mediante una función matemática. Si X es la variable independiente e Y es la variable dependiente, una relación tiene la forma:

$$Y = f(X)$$

Un diagrama de dispersión es un gráfico que muestra la intensidad y el sentido de la relación entre dos variables de interés. Los diagramas de dispersión no sólo muestran la relación existente entre variables, sino también resaltan las observaciones individuales que se desvían de la relación general.

En un análisis de regresión simple interviene una sola variable independiente, a su vez este análisis puede ser de regresión lineal en donde la función es una combinación lineal de los parámetros.

Una relación estadística entre dos variables a diferencia de la relación funcional, no es una relación perfecta, las observaciones no caen exactamente sobre la curva de relación entre las variables. La dispersión de datos alrededor de la línea representa la variación aleatoria.

El análisis de correlación estudia el grado de asociación de dos o más variables. El coeficiente de correlación de Pearson es un índice que mide la relación lineal entre dos variables aleatorias cuantitativas, y es independiente de la escala de medida de las variables.

El valor del índice de correlación varía en el intervalo [-1,1]:

- Si $r = 1$, existe una correlación positiva perfecta. El índice indica una dependencia total entre las dos variables denominada *relación directa*: cuando una de ellas aumenta, la otra también lo hace en proporción constante.

- Si $0 < r < 1$, existe una correlación positiva.
- Si $r = 0$, no existe relación lineal. Pero esto no necesariamente implica que las variables son independientes: pueden existir todavía relaciones no lineales entre las dos variables.
- Si $-1 < r < 0$, existe una correlación negativa.
- Si $r = -1$, existe una correlación negativa perfecta. El índice indica una dependencia total entre las dos variables llamada *relación inversa*: cuando una de ellas aumenta, la otra disminuye en proporción constante.

13.2. Prueba t de student.

La prueba t de student se utiliza para contrastar hipótesis sobre medias en poblaciones con distribución normal. Es una prueba en la que el estadístico utilizado tiene una distribución t de student si la hipótesis nula es cierta. Se aplica cuando la población estudiada sigue una distribución normal pero el tamaño de la muestra es demasiado pequeño como para que el estadístico en el que está basada la inferencia esté normalmente distribuido, utilizándose una estimación de la desviación típica en lugar del valor real.

En una distribución t cada curva t tiene forma de campana con centro en 0 y a diferencia de la distribución Z está más dispersa que la curva normal estándar.

En muchas ocasiones no se conoce σ y el número de observaciones en la muestra $n < 30$. En estos casos se puede utilizar la desviación estándar de la muestra s como una estimación de σ , pero no es posible usar la distribución Z como estadístico de prueba. Al utilizar el estadístico de prueba t se puede estimar y probar una media y una diferencia de medias (independiente y pareada).

Los intervalos de confianza y las pruebas de significación para la media de una población normal se basan en la media muestral, la cual es un estimador insesgado de la media desconocida.

IV. Planteamiento del problema

Alrededor del 98% de todas las leucemias infantiles se diagnostican como agudas, de estas un mayor porcentaje (75%) son de tipo linfocítica. La leucemia aguda linfocítica (LAL) es una enfermedad que se presenta principalmente en la infancia, con un máximo de incidencia entre 2 a 5 años. De esta, un 80 al 90% de casos corresponde a precursores de células B de mayor frecuencia en niños del mundo occidental. En el Instituto Nacional de Pediatría (INP) la leucemia diagnosticada con mayor frecuencia es la LAL de precursores de células B (alrededor del 90 %).

En los últimos años, las posibilidades de supervivencia de niños con leucemia han aumentado gracias a los avances en medicina, sin embargo, el riesgo de recaída continúa siendo un obstáculo para la recuperación del paciente, por tal motivo, la detección de la enfermedad residual mínima(ERM) se ha vuelto un elemento importante en la evaluación de la respuesta temprana al tratamiento, selección de estrategias terapéuticas adecuadas, y en el seguimiento de pacientes con LAL-B ya que permite predecir la aparición de posibles recaídas después de haber terminado el tratamiento de remisión-inducción y durante la etapa de mantenimiento.

V. Objetivos

Objetivo general.

1. Estandarizar la técnica de citometría de flujo para la detección de la enfermedad residual mínima en pacientes pediátricos con leucemia aguda linfocítica de precursores de células B.

Objetivos particulares.

2. Seleccionar los marcadores adecuados para la detección de la enfermedad residual mínima en la leucemia aguda linfocítica de precursores de células B.
3. Con base en los marcadores elegidos, elaborar un protocolo para el análisis de poblaciones celulares.
4. Elaborar un protocolo de trabajo empleando a la citometría flujo (CMF) para la detección de la enfermedad residual mínima en pacientes con diagnóstico de leucemia aguda linfocítica de precursores de células B.
5. Determinar la sensibilidad de la técnica para la detección de la enfermedad residual mínima por citometría de flujo.
6. Evaluar el procedimiento por citometría de flujo como método de detección de la enfermedad residual mínima en pacientes pediátricos con leucemia aguda linfocítica de precursores de células B.

VI. Hipótesis

La identificación de ciertos inmunofenotipos presentes en células leucémicas pero ausentes en células normales de medula ósea, puede ser de gran ayuda en la detección de la enfermedad residual mínima al diferenciar poblaciones de precursores hematopoyéticos normales de proliferaciones leucémicas. Por lo

tanto, la selección de marcadores para identificar con anticuerpos monoclonales, puede ayudaren la detección por citometría de flujo de células leucémicas, y por consiguiente, en la detección de la enfermedad residual mínima.

VII. Diseño experimental

➤ **Tipo de estudio**

Descriptivo transversal.

➤ **Población de estudio**

Pacientes pediátricos de nuevo ingreso del servicio de Hematología del Instituto Nacional de Pediatría, diagnosticados con LAL mediante morfología y confirmados con LAL de precursores de células B.

➤ **Criterios de inclusión y exclusión.**

Inclusión.

- Pacientes de nuevo ingreso con diagnóstico de LAL de precursores B confirmado por morfología e inmunofenotipo.
- Edad de 2 a 17 años
- Que no hayan recibido tratamiento previo a la toma del aspirado de medula ósea para el estudio de inmunofenotipo.

Exclusión.

- Pacientes con LAL-T o LAM
- Pacientes mayores de 17 años
- Con tratamiento previo al estudio de inmunofenotipo

Eliminación

- Muestras coaguladas
- Muestras con más de 24h de almacenamiento
- Muestras refrigeradas

➤ **Variables**

- Anticoagulante utilizado
- Temperatura de almacenamiento de la muestra
- Tiempo de procesamiento de la muestra
- Carga celular de la muestra
- Cantidad de anticuerpo a utilizar
- Condiciones de incubación

- Relación blastos células normales

➤ **Materiales.**

1. Pipetas automáticas de 10, 50, 200 y 1000µL.
2. Puntas para pipeta automática.
3. Tubos de 12x75 para citómetro de flujo.
4. CXP Software de Beckman Coulter (2006).

Reactivos.

1. Isoton II Beckman Coulter.
2. Fluoroesferas Flow-Check Beckman Coulter.
3. Fluoroesferas Flow-Set Beckman Coulter.
4. Kit reactive Immunoprep Beckman Coulter:
 - Reactivo A, para lisar eritrocitos
 - Reactivo B, estabilizar las células
 - Reactivo C, para fijar la membrana celular
5. PBS 1x (AMRESCO)
6. Anticuerpos monoclonales acoplados a un fluorocromo, para el ajuste del equipo:
 - Controles de isotipo IgG mouse FITC, PE, ECD, PC5 y PC7
 - CD45 FITC, PE, ECD, PC5 y PC7
 - CD19FITC, CD4PE, CD3ECD y CD45PC5 (para verificar la compensación)
7. Anticuerpos monoclonales: CD10 FITC; CD34, CD38, CD7 y CD2 conjugados a PE; CD45 ECD; CD20, CD13 y CD33 conjugados a PC5 y CD19 PC7.

Equipo.

- Equipo TQ-Prep Beckman Coulter.
- Citómetro de Flujo F500 Beckman Coulter.

➤ **Método.**

Calibración del citómetro de flujo F500.

1. Con las fluoroesferas Flow-Check se verifica diariamente el correcto funcionamiento del equipo. del sistema óptico (alineación del láser), además de comprobar el flujo adecuado del sistema hidrodinámico.

2. Con los controles de isotipo IgG (FITC, PE, ECD, PC5 y PC7), se establecieron los valores de trabajo del voltaje de detección para cada uno de los detectores utilizados para capturar las señales fluorescentes emitidas por cada fluorocromo empleado en el estudio y con ello establecer el valor basal de fluorescencia, a la vez que se descartan las uniones inespecíficas antígeno-anticuerpo.
3. Con las fluoroesferas Flow-Set, se calibraron los detectores Forward Scatter (FS) y Side Scatter (SS) los cuales miden el tamaño y la complejidad celular respectivamente.
4. Finalmente el proceso de compensación, se llevó a cabo mediante el ajuste de voltajes de cada fotodetector. La verificación se realizó con una muestra de sangre teñida (positivas para el fluorocromo que se quiere detectar) y sin teñir (negativas), con la finalidad de establecer los parámetros de detección que garanticen el poder distinguir poblaciones positivas de negativas.

Estandarización de la metodología CMF para la detección de la ERM.

1. Elección de una combinación de anticuerpos.

Se eligió una combinación de anticuerpos para determinar la sensibilidad del equipo tomando en cuenta que la muestra de médula ósea se diluyó en sangre periférica, por lo tanto se consideró lo siguiente:

- Inmunofenotipo de las células leucémicas: CD10 (+), CD34 (+), CD45 (débil), CD20 (generalmente negativo) y CD19 (+)
- Inmunofenotipo de los linfocitos B maduros en SP: CD10 (-), CD34 (-), CD45 (fuerte), CD20 (+) y CD19 (+)

Además, también se eligió una combinación de anticuerpos monoclonales que nos permitiera discriminar células normales de médula ósea de células leucémicas para la detección de la ERM, destacando que en células leucémicas se puede hallar la sobreexpresión de CD10 y subexpresión de CD38.

2. Creación de protocolos de análisis con el CXP Software de BeckmanCoulter (2006).

La creación de protocolos se basó en la combinación de anticuerpos monoclonales elegida, y debido a que se eligieron dos combinaciones diferentes, fue necesaria la creación de un protocolo para determinar la sensibilidad de la técnica y otro para la detección de la ERM.

3. Determinación la sensibilidad del equipo.

La sensibilidad se determinó con el uso de diluciones seriadas, partiendo de una suspensión de células de MO diluidas en sangre periférica, con una relación de 1 blasto por cada 10 células normales. A partir de la dilución inicial se preparan por diluciones 1:10 hasta tener una dilución que contenga un blasto por cada 100 000 células normales. La cantidad de células por muestra se determinó al realizar una biometría hemática y en el caso de las muestras de MO se tomó en cuenta el porcentaje de blastos del reporte del inmunofenotipo.

Cuadro 10. Marcaje de muestras.

Tubo	Muestra	Vol. muestra	Volumen de anticuerpo				
			CD10 FITC	CD34 PE	CD45 ECD	CD20 PC5	CD19 PC7
1	Control (negativo) SP	100 µL	20µL	20µL	10µL	10 µL	10 µL
2	Control (LAL-B) MO	100 µL	20µL	20µL	10µL	10 µL	10 µL
3	Control (sano) MO individuo sano	100 µL	20µL	20µL	10µL	10 µL	10 µL
4	Diluciones	100 µL	20µL	20µL	10µL	10 µL	10 µL

4. Marcaje de las células.

Los marcadores elegidos para la determinación de la sensibilidad así como para la detección de la ERM están presentes en la superficie celular, por lo que el marcaje de las células se llevó a cabo de la siguiente manera:

- En tubos para citómetro flujo previamente rotulados (dilución, control positivo y control negativo, según fuese el caso) se incubaron las células con la combinación de anticuerpos seleccionada.
La cantidad de muestra y de los diferentes anticuerpos monoclonales que se usaron se establecieron de acuerdo a las indicaciones provistas por el fabricante.
- Se emplearon 100 µL de muestra y se agregaron las combinaciones de anticuerpos monoclonales para cada tubo, de acuerdo a la cuadro 10. Se incubaron 30 min a temperatura ambiente protegidos de la luz, mientras que la cantidad de AcMo depende del protocolo de tinción indicado por el fabricante. En el caso de las muestras utilizadas para la detección de la ERM no se realizaron diluciones puesto que el análisis fue cualitativo.
- Posteriormente los tubos fueron introducidos al equipo TQ-Prep Beckman Coulter para lisar los eritrocitos.

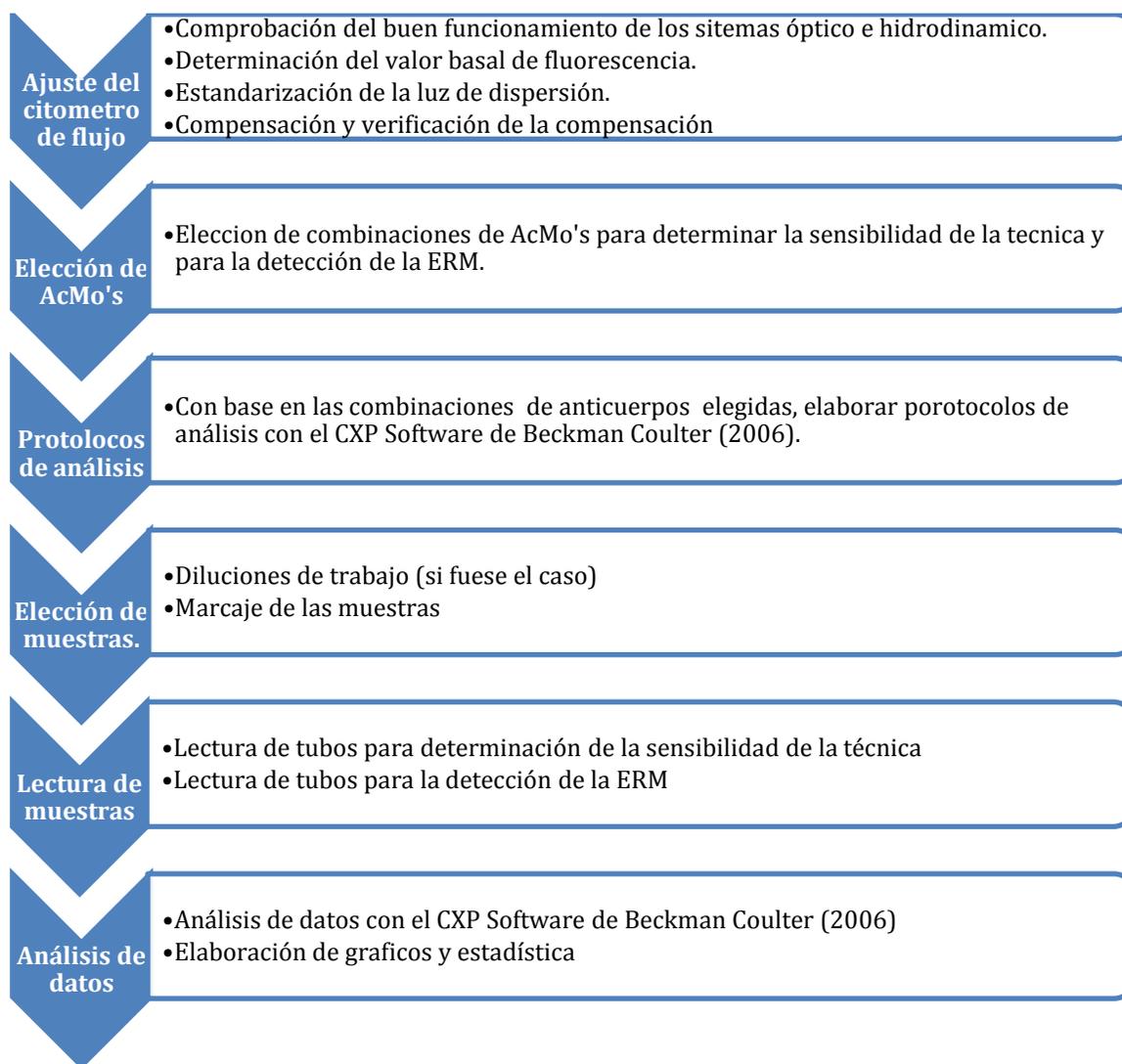
- Los tubos están listos para leerse en el citómetro.

5. Adquisición de las muestras y análisis de datos.

Con los protocolos elaborados, se procedió a leer las muestras en el citómetro de flujo. Para la detección de la ERM se adquirieron hasta 15 000 eventos, por otra parte, para la determinación de la sensibilidad e adquirieron un mínimo de 300 000 hasta 500 000 eventos para poder detectar células leucémicas en las diluciones mayores.

Los datos de adquisición fueron analizados con el CXP Software de Beckman Coulter (2006), posteriormente estos resultados fueron analizados con el programa estadístico SPSS.

➤ Diagrama de flujo



➤ **Diseño estadístico**

- Validación del método mediante un análisis de regresión lineal entre la cantidad esperada de blastos a detectar (teórico) y la cantidad detectada en la práctica.
- Prueba t de student, para determinar si hay diferencias significativas en los porcentajes de detección entre una población y otra.

VIII. Resultados

➤ **Determinación de la sensibilidad de la técnica.**

Apoyados en los reportes existentes en la literatura y con los ensayos montados en el laboratorio, la combinación de anticuerpos elegida para determinar la sensibilidad de la técnica fue:

- CD10 FITC, CD34 PE, CD45 ECD, CD20 PC5 y CD19 PC7

El protocolo de análisis para determinar la sensibilidad de la técnica se basó en la separación de poblaciones celulares de acuerdo a la presencia o ausencia de los marcadores elegidos en células malignas y células B maduras de SP (Figura 11). En el gráfico de tamaño contra granularidad (FS vs SS) las células leucémicas se superponen a los linfocitos, por lo que al discriminar aquellas células cuyo inmunofenotipo no corresponde al de una célula leucémica obtenemos una región (Fig.11 ventana E) en la que solo se observan células leucémicas. El efecto de dilución de MO en SP se puede observar en la figura 12.

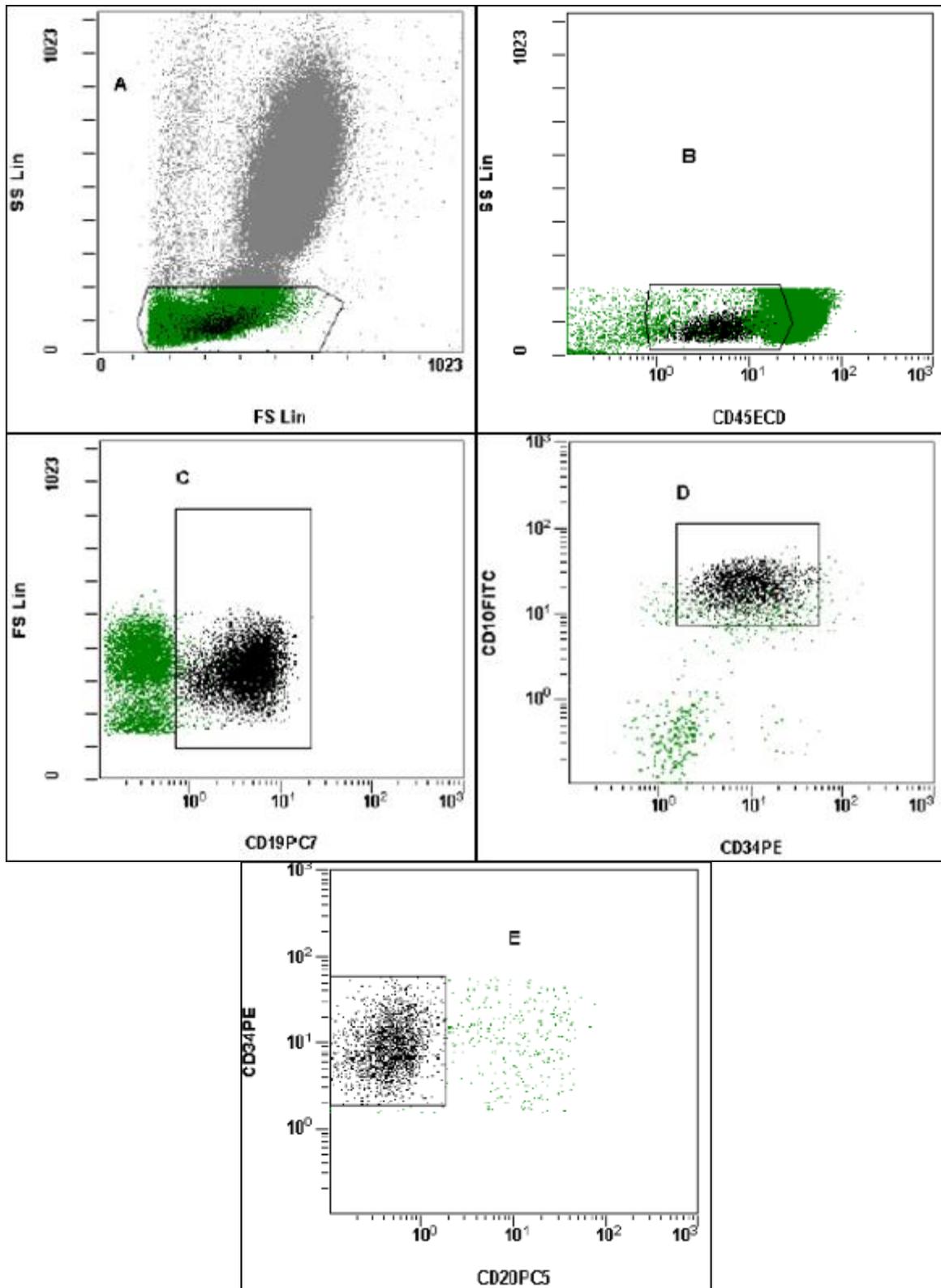


Figura 11. Protocolo de análisis para la determinación de la sensibilidad. En el grafico FS vs SS se eligió la región de los mononucleares (A), de A se eligen la células CD45 débil(B), de B se eligen las células CD19 (+) (C), de C se eligen las células CD10 (+) y CD34 (+) (D), y por último, de D se eligen las células CD20 (-).

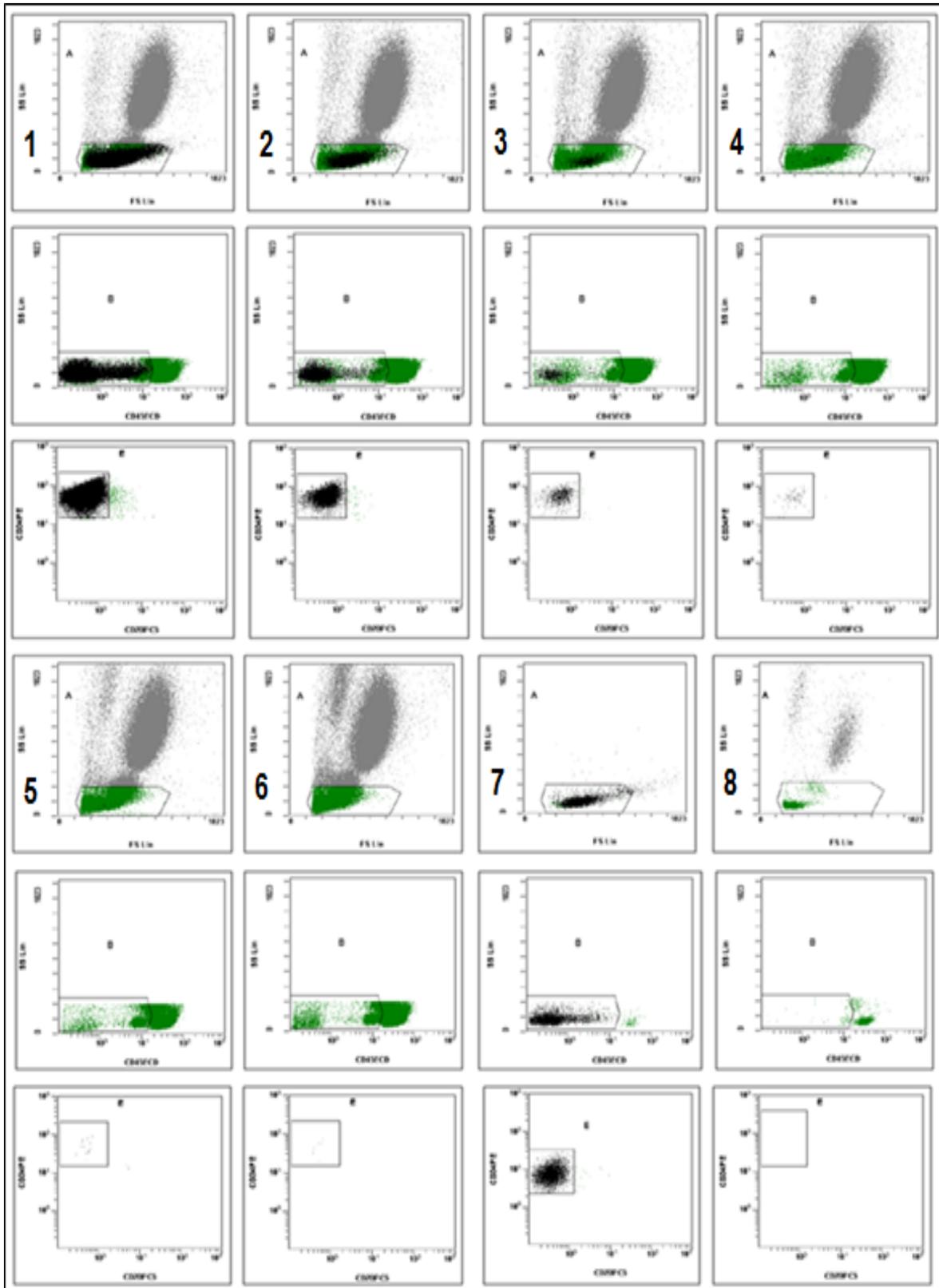


Figura 12. Gráficos de dispersión obtenido de las diluciones seriadas 1:10 de blastos de LAL de precursores B, 1-6 diluciones de mayor a menor, 7 positivo (MO paciente) y 8 negativo (SP sano).

Para la validación del método se realizaron diluciones seriadas de 5 muestras de MO de pacientes que cumplían con los criterios previamente mencionados. Se realizó un análisis de regresión lineal y correlación entre el número esperado de células (teórico) y el número de células detectadas (experimental), obteniéndose valores de r^2 muy próximos a 1 (Cuadro 11).

Cuadro 11. Estimado del contenido de células leucémicas.

Muestra	No. de eventos	r^2
1	3.0×10^5	0.9828
2	3.0×10^5	0.9860
3	3.0×10^5	0.9998
4	3.0×10^5	0.9895
5	5.0×10^5	0.9997

Se decidió evaluar el número de eventos adquiridos y pasar de 300 000 a 500 000 eventos y evaluar una dilución de $1/5 \times 10^4$, para dicho ensayo se prepararon nuevas diluciones y se evaluó cada muestra por triplicado. (Cuadro 13, Figura 13).

Cuadro 13. Porcentaje de detección (5×10^5 eventos).

Dilución	CN/Blasto	B/ 5.0×10^5 e (teórico)	B/ 5.0×10^5 e (practico)	% detección
1:10	3	129228	129709	100.37%
1:10 ²	31	15608	15673	100.41%
1:10 ³	313	1594	1689	105.96%
1:10 ⁴	3129	160	135	84.51%
1:5x10 ⁴	15647	32	29	90.76%
1:10 ⁵	31294	16	13	81.37%

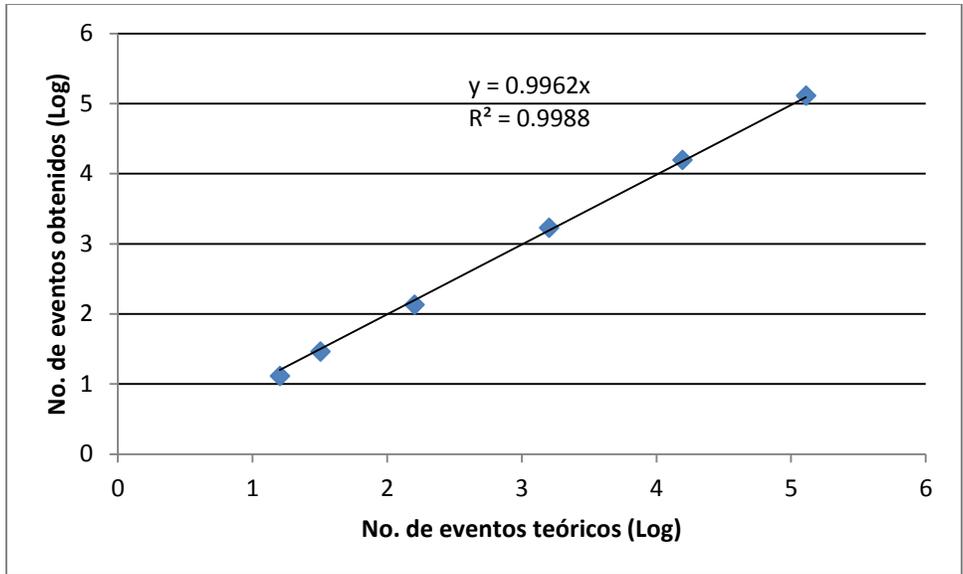


Figura 13. Gráfico de validación de la detección de células leucémicas (blastos) diluidas en sangre periférica de pacientes clínicamente sanos.

Por otra parte, con 10 muestras de MO de pacientes sanos se realizaron las diluciones $1:10^4$ y $1:10^5$, la dispersión de tales datos respecto al número de eventos adquiridos y a la dilución se observa en el gráfico de distribución de poblaciones de la figura 14.

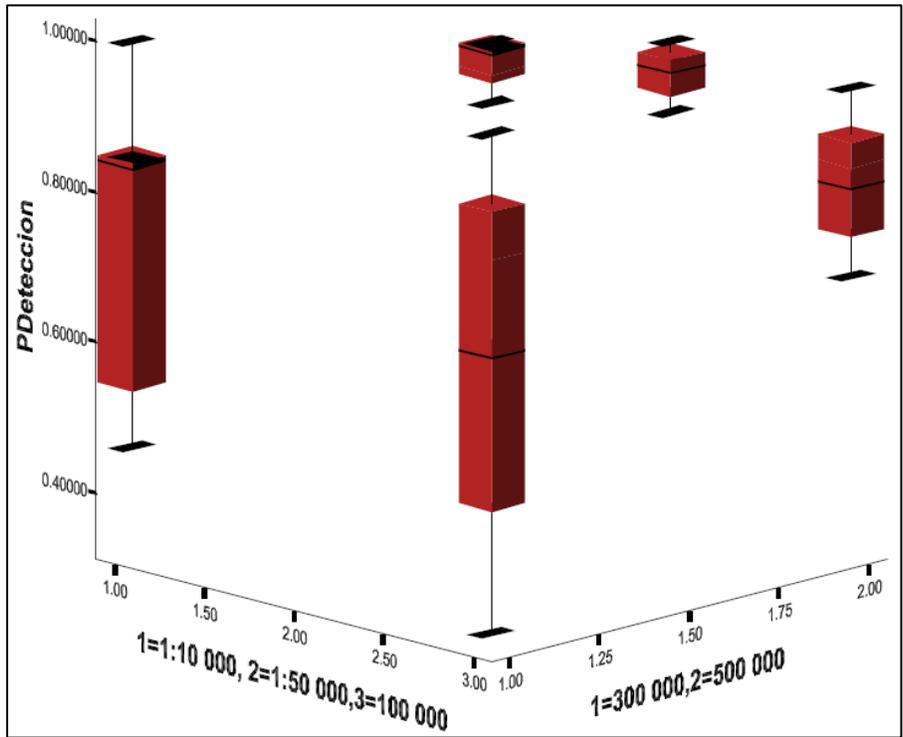


Figura 14. Distribución de porcentajes de detección de células leucémicas, respecto a la dilución y al número de eventos adquiridos.

El resultado de la prueba t de student, con un nivel de significancia de 0.05 y un valor resultante de $\alpha=0.002$ (datos no mostrados), confirmó la existencia de diferencias significativas en porcentaje de detección de blastos entre las muestras en las cuales se adquirieron 300 000 y 500 000.

➤ **Detección de la ERM**

Para diferenciar células leucémicas de células normales de MO, apoyados en trabajos previos de grupos de investigación, se eligió la siguiente combinación anticuerpos:

- CD10 FITC, CD38 PE, CD45 ECD, CD34 PC5 y CD19 PC7

El protocolo análisis para la detección de la ERM (Figura 15) se basó en la expresión diferencial de los marcadores de superficie previamente mencionados, seleccionando las poblaciones de interés y discriminando gradualmente células respecto a su expresión antigénica (CD45, CD19, CD34, CD10 y CD38) hasta obtener solo las células de interés, de tal manera que áreas que son blancas en muestras de MO de individuos sanos, en muestras de pacientes las células leucémicas se encuentran en tales áreas.

Con la combinación elegida se marcaron un total de 10 muestras de MO de pacientes diagnosticados con LAL de precursores B, además, se marcaron 2 muestras de MO de individuos sanos para hallar diferencias respecto a los pacientes, de esta manera se lograron identificar diferencias en la expresión antigénica de ciertos marcadores, los resultados se pueden observar en el cuadro 15.

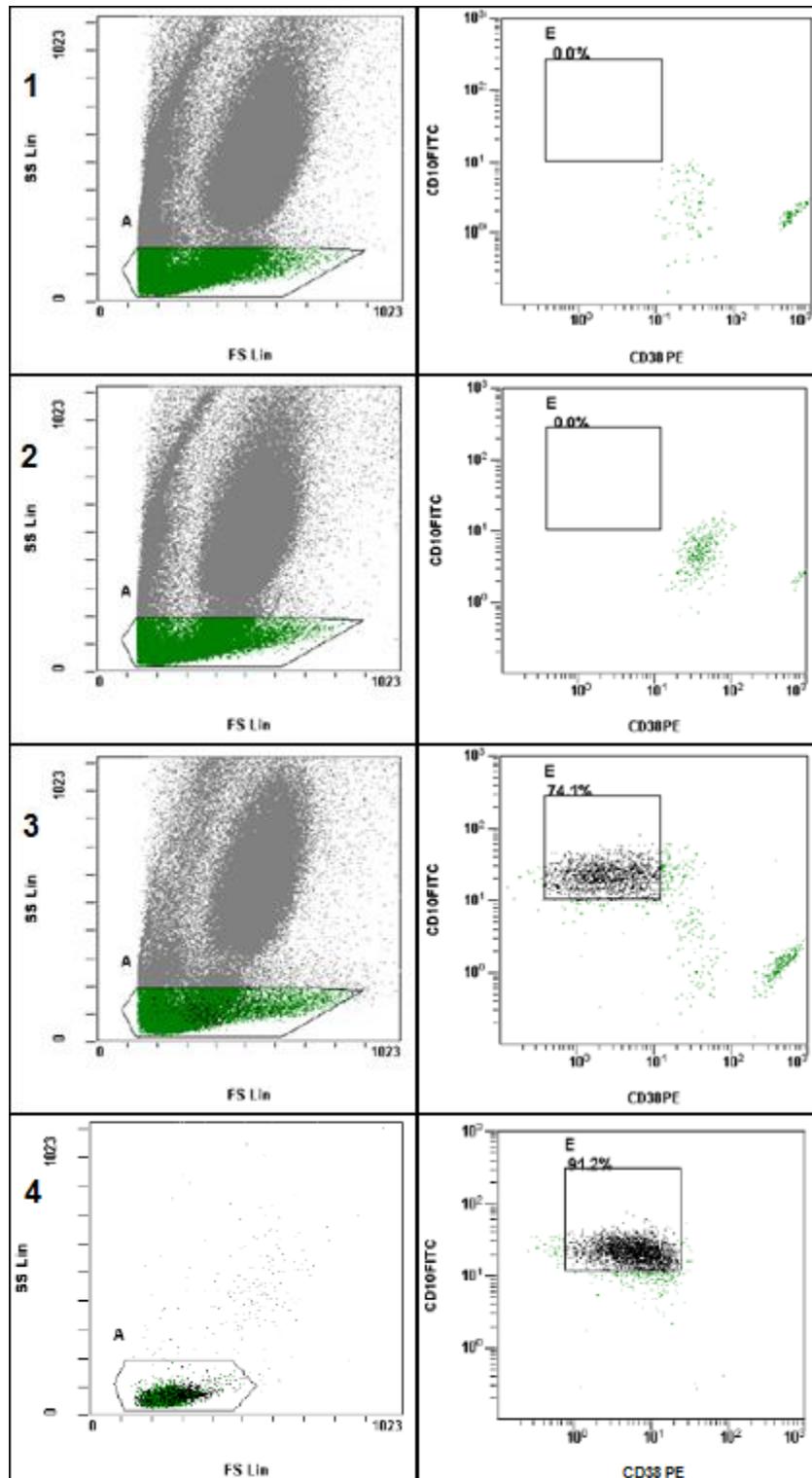


Figura 15. Detección de la ERM. Las poblaciones mostradas en los gráficos de la derecha muestran células CD45 (débil), CD19 (+) y CD34 (+), 1 y 2 son muestras de MO de individuos sanos, 3 es un paciente en recaída y 4 es un paciente de nuevo ingreso (blastos>90%). En la ventana E se encuentran las células leucémicas, las cuales son CD10 (fuerte) y CD38 (débil).

Cuadro 15. Diferencias halladas en MO de pacientes respecto a MO de individuos sanos.

Diferencia encontrada	Porcentaje de muestras
Sobreexpresión de CD10 y subexpresión de CD38	50 %
No se hallaron diferencias en la expresión de CD10 y CD38	30 %
Expresión aberrante, CD10 (-) y CD33 (+)	20 %

IX. Análisis de resultados

Debido a que tanto blastos malignos como no malignos se superponen a la región de linfocitos en el gráfico de tamaño contra granularidad, para discriminar células leucémicas de células normales de MO se empleó la tinción con anti-CD45, ya que este marcador de superficie se expresa diferencialmente entre los blastos y los linfocitos; siendo las células inmaduras o blastos las que presentan una expresión débil de este marcador.

Al emplear en conjunto la expresión de los marcadores CD19, CD34 y expresión diferencial de CD45 (expresión débil en blastos) nos aseguramos de seleccionar la población de células de origen B inmaduras.

Finalmente buscamos la expresión de los marcadores CD10 y CD38, con lo que podemos diferenciar a las células leucémicas de blastos normales de origen B.

Con este análisis elegimos solo células con fenotipo CD45 (débil), CD19 (+) y CD34 (+) (Figura 16), ya sean blastos malignos o blastos normales de origen B. De esta manera, se encontró que en el 50% de las muestras analizadas, las células leucémicas CD45 (débil), CD19 (+) y CD34 (+) presentan sobreexpresión de CD10 (fuerte) y subexpresión de CD38 (débil), por lo que se pueden diferenciar de sus contrapartes normales las cuales son CD10 (+) y CD38 (+), tal como se reporta en la literatura.

Adicionalmente se encontró en el 20% de las muestras analizadas un inmunofenotipo aberrante CD10 (-) y CD33 (+), por lo que el uso de estos marcadores en las muestras de pacientes con LAL-B de precursores B, puede ser un criterio más para el seguimiento de ERM.

Mediante el análisis de regresión lineal y correlación, correspondiente al número esperado y el número detectado de blastos leucémicos, se puede observar que el estimado del contenido de células en cada dilución fue muy preciso, obteniéndose así valores de r^2 muy próximos a 1 (figura 14), por lo que existe una relación directamente proporcional entre las dos variables. De esta manera se valida el método como herramienta para la detección de células con algún inmunofenotipo de interés, en nuestro caso células leucémicas de LAL de precursores B.

Sin embargo se observó que en diluciones mayores ($1/10^4$ y $1/10^5$) existían variaciones en los porcentajes de detección en aquellas muestras en las que se adquirieron 300 mil eventos totales (Figura 15). La dispersión de los datos se reduce considerablemente en las mismas diluciones cuando se adquirieron 500 mil eventos totales.

Esto se explica debido a que las diluciones en las que se observan la mayor discordancia entre el valor teórico de blastos a detectar contra los blastos detectados, son las más diluidas por lo tanto al leer pocos eventos tenemos menos probabilidades capturar un evento positivo, lo cual se remedia cuando aumentamos el número de eventos adquiridos totales.

Respecto a la sensibilidad lograda con el equipo, se encontró que en muestras en las cuales teóricamente sabíamos que por cada 100 mil eventos había aproximadamente de 1 a 4 células leucémicas, el equipo logró, en la mayoría de los casos, una detección por arriba de 80%, no obstante, para fines de diagnóstico se requiere de la adquisición de un número significativo de eventos (células), es decir, idealmente de 10^6 hasta 10^7 de células se deberían de analizar para poder dar un diagnóstico adecuado, sin embargo, en muestras clínicas el número de células que pueden ser analizadas es mucho menor a 10^6 , principalmente al final del tratamiento de inducción a remisión, por lo tanto, en este trabajo, la sensibilidad lograda fue 1 célula leucémica en 10^4 células normales adquiriendo de 300 mil a 500 mil eventos.

X.Conclusiones

Primeramente, se estableció que para la obtención de resultados más confiables, es necesario cuidar de la fase pre analítica, así la muestra debe ser procesada bajo condiciones adecuadas, destacando: tiempo de procesamiento no mayor a 24 horas, no ser refrigerada y mantenerse a temperatura ambiente antes de ser procesada, además, es recomendable ajustar el número de células entre 8 mil a 10 mil por μL , para mantener el equilibrio antígeno-anticuerpo de acuerdo a la cantidad de anticuerpo que indica el fabricante.

Con el panel de anticuerpos elegido (CD10FITC, CD38PE, CD45ECD, CD34PC5 y CD19PC), en un 70% de las muestras se logró diferenciar células leucémicas de sus contrapartes normales en MO (precursores de células B o hematogonias), por lo que la detección de la ERM y por lo tanto el monitoreo de pacientes es posible con la búsqueda de células que presenten los inmunofenotipos aberrantes hallados, por una parte CD10 (fuerte) y CD38 (débil) presente en el 50% de las muestras, y CD10 (-) y CD33(+) presente en el 20% de las muestras. En caso del 30% de las muestras en las cuales no se pudo diferenciar con claridad células leucémicas de células normales,

sería recomendable poner a prueba otros anticuerpos monoclonales que nos ayuden para tal fin.

Se estableció que existen diferencias estadísticamente significativas al adquirir 300 mil o 500 mil eventos totales, por lo que se deben adquirir al menos 500 mil eventos con esto se observa menor variabilidad en los porcentajes de detección los cuales en su mayoría resultaron por arriba del 80% en nuestro ensayo tipo curva; por lo tanto al adquirir una cantidad mayor de eventos existe una probabilidad mayor de detectar células leucémicas.

También, se observó que mediante este método se puede lograr una sensibilidad de hasta 1 en 10^5 células, sin embargo, para fines de diagnóstico se requiere leer como mínimo 10^6 células para alcanzar esta sensibilidad, lo que resulta poco factible considerando que las muestras clínicas de MO llegan a disminuir notablemente su número de células después de finalizar el tratamiento remisión a la inducción, además de que involucra un mayor gasto de reactivos. Por lo tanto, la sensibilidad admitida para esta técnica es de 1 célula leucémica en 10^4 células normales adquiriendo no menos de 500 mil eventos totales dependiendo de la carga celular de la muestra.

XI. Perspectivas

Aplicar el protocolo para ERM para dar seguimiento de laboratorio en conjunto con la clínica de hemato-oncología para establecer la utilidad de la prueba.

Establecer los tiempos en los cuales el medico solicite el estudio la detección de la ERM.

XII. Referencias bibliográficas

1. McKenzie SB. Hematología clínica. 2ª ed. México: Manual moderno; 2009.
2. CNN México (2012, febrero). Cómo reconocer las señales que advierten sobre leucemia en niños, [en línea]. México DF: Juárez A. Disponible en: <http://mexico.cnn.com/salud> [2012, 4 de febrero]
3. López AR, Raya SJ, Martínez PB, Cabrera RR, Rodríguez L Estudio de la enfermedad mínima residual en el cáncer infantil. *Oncología*. 2004; 27 (10): 569-578.
4. Jaime PJ, Gómez AD. Hematología: la sangre y sus enfermedades. 2ª ed. Ed. McGraw Hill-Interamericana; 2009. 77-82.
5. Ruiz AG. Fundamentos de hematología. 4ª ed. México: Ed. Médica Panamericana; 2009. 143-156.
6. Mayani H, Flores F. E. Pelayo R., Montesinos J., Flores G. P., Chávez G. A. Hematopoyesis. *Cancerología*. 2007; 2: 95 -70.
7. Ruiz AG, San Miguel. Actualización en leucemias. 1ª ed. México: Ed. Médica Panamericana; 1996.65-70.
8. Orfao A, Ortuno F, De Santiago M, Lopez A, SanMiguel J. Immunophenotyping of acute leukemias and myelodysplastic syndromes. *Cytometry*. 2004; 58A:62-71.
9. Campana D, Coustan SE. Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. *Cytometry*. 1999; 38: 139-152.
10. Campana D, Biondi A, Van Dongen J. Minimal residual disease. En: Ching-HonPui. *Childhood leukemias*. 2ª ed. USA: Cambridge University Press; 2006. 679-702.
11. Wilson K, Case M, Minto L, Bailey S, Bown N, Jesson J, et al. Flow minimal residual disease monitoring of candidate leukemic stem cells defined by the immunophenotype, CD34⁺ CD38^{low} CD19⁺ in B-lineage childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2010; 95(4): 679-683.
12. Irving J, Jesson J, Virgo P, Case M, Minto L, Eyre L, et al. Establishment and validation of a standard protocol for the detection of minimal residual disease in B lineage childhood acute lymphoblastic leukemia by flow cytometry in a multi-center setting. *Haematologica* 2009; 94(6): 870-874.
13. Campana D. Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Hematology*. 2010; 1: 7-12.
14. Campana D. Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *SeminHematol*. 2009; 46 (1): 100-106.
15. Gerardo C, Rodríguez C, Sastre D, Heller V. Utilización estratégica de CD45 en la identificación de células blasticas por citometría de flujo. *Acta BioquimClinLatonoam* 2006; 40(2): 173-180.

16. Van Lochen EG, Van Der Velden VHJ, Wind HK, Marvelde JG, Westerdaal NAC, Van Dongen JJM. Immunophenotypic Differentiation Patterns of Normal Hematopoiesis in Human Bone Marrow: Reference Patterns for Age-Related Changes and Disease-Induced Shifts. *Cytometry* 2004; 60B: 1-13.
17. Coustan-Smith E, Ribeiro R, Stow P, Zhou Y, Pui CH, Rivera G, et al. A simplified flow cytometric assay identifies children with acute lymphoblastic leukemia who have a superior clinical outcome. *Blood*. 2006; 108(1): 97-102.
18. Piñan FM. El linfoblasto en la leucemia linfocítica aguda: morfología y citoquímica. *Haematologica*. 2002; 87(1): 259-262.
19. Chen JS, Coustan-Smith E, Suzuki T, Neale G, Mihara K, Pui CH, et al. Identification of novel markers for monitoring minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2001; 97(7): 2115-2120.
20. Freund M. *Hematología; guía práctica para el diagnóstico microscópico*. 11^a ed. Ed. Medica Panamericana; 2011. 95-100.
21. Welner RS, Kincade PW, Pelayo R. Linfopoyesis temprana en médula ósea adulta. 2007; 26 (3): 135-144.