



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



FACULTAD DE
QUÍMICO-FARMACOBIOLOGÍA

**ESTANDARIZACIÓN DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO PARA
EL ESTUDIO DE LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO EN
PACIENTES CON LEUCEMIA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN QUÍMICO-FARMACOBIOLOGÍA

P R E S E N T A:

p.QFB. DANIELA ALVARADO CORIA

DIRECTORES DE TESIS:

**DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS
SERGIO GUTIERREZ CASTELLANOS**

**DOCTORA EN CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS
SANDRA GUADALUPE SÁNCHEZ CEJA**

MORELIA, MICH. FEBRERO 2015

A Sofía, mi amiga, inspiración y aliento de vida.

A aquellos que amo y me aman.

A Dios.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por todo aquello que destinó en mi vida, por lo bueno y lo y adverso que me ha llevado a donde estoy, a vivir plena y feliz.

Gracias hermosa Sofi, por ser mi motor, mi amiga incondicional, por tu comprensión, por soportar el tiempo, la lejanía y la ausencia. Por tu fortaleza y tu sonrisa que llena mi vida de amor. Eres admirable mi pequeña.

Gracias papás, que creyeron en mis sueños, gracias por su amor y apoyo a lo largo de mi vida, por su ejemplo y sus lecciones, por ser mi modelo a seguir. Con suerte llegaré a ser tan grande y valioso como ustedes, los admiro y amo mucho.

A mis hermanos Alejandra, Victoria y Mario por todos los buenos momentos, sus palabras de aliento y su apoyo.

A Josué por entrar en mi vida, por quererme tal y como soy, por convencerme de que mis sueños pueden ser realidad y ser parte de ellos. Gracias por estar ahí siempre que lo necesité. Te amo.

Gracias amigos por todas las sonrisas, tropiezos y las aventuras, Angie, Elim, Gaby, Iñaki, Oly, Pattie, Stars e Isabel. Gracias muy especialmente a Jovany el mejor amigo que la vida pudo haberme regalado, te amo.

Al Doctor Sergio y su hermosa esposa Doctora Sandra, qué bello es conocer gente como ustedes, gracias por todo su apoyo y su amistad. Los quiero mucho.

A las lindas personas que he tenido el placer de conocer a lo largo de este trabajo, Qca. Jaqueline, Qca. Nena y Qco. Pablo, por sus atenciones y apoyo y en general a todo el personal del hospital infantil y regional 1 del IMSS que compartieron este camino conmigo.

A los pacientes, a su fortaleza y sus ganas de vivir, por brindar parte de sí mismos para otros. Infinitas gracias.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Citopatología Molecular y Citometría de Flujo de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez" de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo bajo la asesoría del D. en C. Sergio Gutiérrez Castellanos y co-asesoría de la D. en C. Sandra Guadalupe Sánchez Ceja. El trabajo se llevó a cabo con la colaboración del Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital Regional no.1 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) de Morelia, Michoacán, participando por dicha Institución el D. en C. Sergio Gutiérrez Castellanos. Así también se recibió apoyo esencial del Laboratorio de Análisis Clínicos y del departamento de Oncología del Hospital Infantil "Eva Sámano de López" participando por dicho Hospital la Q.F.B. Jaqueline Nava Miranda.

COMITÉ TUTORAL

D.C. Sergio Gutiérrez Castellanos

D.C. Sandra Guadalupe Sánchez Ceja

D.C. Martha Eva Viveros Sandoval

D.C. Carlos Cortes Penagos

E. en Biol. Cel. Virginia Campos Cabrera

EDHL. Judith Esmeralda Prieto Sierra

QFB. Rodrigo Díaz Balcazar

CONTENIDO

	Página
Índice general.	II
Índice de figuras	V
Índice de tablas.	VII
Índice de abreviaturas.	VIII
Resumen.	XI
Abstract.	XII

ÍNDICE GENERAL

	Página
1. Introducción.....	1
1.1 Hematopoyesis.....	1
1.1.1 Definición.....	1
1.1.2 Tejido hematopoyético	1
1.1.3 Microambiente hematopoyético.....	2
1.1.4 Célula madre hematopoyética.....	4
1.1.5 Factores de crecimiento.....	7
1.2 Linfopoyesis.....	7
1.2.1 Desarrollo de Linfocitos B	10
1.2.2 Maduración de Linfocitos T.....	11
1.3 Mielopoyesis.....	12
1.4 Marcadores de superficie en la hematopoyesis.....	13
1.5 Leucemia.....	16
1.5.1 Leucemia aguda.....	16
1.5.2 Leucemia linfocítica aguda.....	17
1.5.3 Leucemia mieloblástica aguda.....	18
1.5.4 Fisiopatología.....	20
1.5.5 Cuadro Clínico.....	21

1.5.6 Datos de laboratorio.....	21
1.6 Compromiso del Sistema Nervioso Central (SNC)	22
1.7 Clasificación.....	23
1.8 Metástasis.....	26
1.8.1 Metástasis leptomeníngea.....	29
1.9 Líquido Cefalorraquídeo.....	32
1.9.1 Secreción.....	32
1.9.2 Presión y circulación.....	33
1.9.3 Absorción.....	34
1.9.4 Composición.....	35
1.9.5 Alteración del líquido cefalorraquídeo.....	35
1.9.5.1 Aspecto.....	35
1.9.5.2 Proteínas.....	37
1.9.5.3 Citología.....	38
1.10 Citometría de flujo.....	38
1.10.1 Fundamento.....	39
1.10.2 Anticuerpo monoclonal.....	41
2. Hipótesis.....	43
3. Justificación.....	44
4. Objetivos.....	45
4.1 Objetivo General.....	45
4.2 Objetivos Específicos.....	45

5. Material y métodos.....	46
5.1 Universo de trabajo	46
5.2 Selección de los pacientes.....	46
5.2.1 Tamaño de la muestra	46
5.2.2 Criterios de selección.....	46
a) Criterios de inclusión.....	46
5.3 Muestra biológica.....	47
5.4 Diseño de estudio	47
5.5 Esquema de trabajo.....	47
5.6 Recolección de líquido cefalorraquídeo.....	48
5.7 Recuento celular.....	48
5.8 Análisis morfológico.....	48
5.9 Análisis de LCR por citometría de flujo.....	49
5.10 Caracterización celular.....	50
5.11 Adquisición y análisis de gráficos.....	52
6. Resultados.....	55
6.1 Objetivo 1.....	55
A Cuenta de células	55
B Cuenta diferencial	56
C Análisis citoquímico.....	57
6.2 Objetivo 2.....	58
a) Evaluación del procedimiento primordial.....	58
b) Evaluación celularidad del sedimento y del tubo.....	60
c) Evaluación inmunotinción CD5 FITC, CD14 PE, CD19 PerCP, LCR obtenido por punción lumbar en medio RPMI 1640.....	63

d) Evaluación inmunotinción CD45, muestra obtenida por Punción Lumbar en medio RPMI 1640.....	65
e) Evaluación inmunotinción CD5 FITC, CD14 PE CD19 PerCP. PBS adicionado con albúmina 5%.....	67
7. Discusión.....	69
8. Conclusiones	74
9. Perspectivas.....	75
10. Bibliografía.....	76

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1.- Desarrollo de la hematopoyesis a lo largo de la vida.	2
Figura 2.- Microambiente hematopoyético.	4
Figura 3.- Hematopoyesis y citocinas que la regulan	6
Figura 4.- Maduración de células B, cambios morfológicos y expresión fenotípica característica.	11
Figura 5.- Maduración de células T, cambios morfológicos y expresión fenotípica característica.....	12
Figura 6.- Cascada de la metástasis.....	27
Figura 7.- Modelos de metástasis.....	28
Figura 8.- Fisiopatología de la metástasis leptomeníngea.....	31
Figura 9.- Circulación del LCR.....	34
Figura 10.- Operación interna de un citómetro de flujo.....	40
Figura 11.- Esquema general de la formación de anticuerpos monoclonales.....	42
Figura 12.- Plot de adquisición de células leucémicas.....	52
Figura 13.- Identificación de los blastos.....	53
Figura 14.- Plot para determinar el porcentaje de células leucémicas positivas para un marcador	54
Figura 15.- Análisis celular del líquido cefalorraquídeo por citometría de flujo (A).....	59
Figura 16.- Análisis celular del líquido cefalorraquídeo por citometría de flujo (B).....	61

Figura 17.- Análisis celular del líquido cefalorraquídeo por citometría de flujo (C).....	62
Figura 18.- Análisis celular del líquido cefalorraquídeo por citometría de flujo (D).....	64
Figura 19.- Análisis celular del líquido cefalorraquídeo por citometría de flujo (E).....	66
Figura 20.- Análisis celular del líquido cefalorraquídeo por citometría de flujo (F).....	68

ÍNDICE DE TABLAS

	Páginas
Tabla 1. Factores de crecimiento que intervienen en la hematopoyesis.....	8
Tabla 2. Cluster of differentiation y moléculas de superficie de algunas células hematopoyéticas maduras.....	14
Tabla 3.Cluster of differentiation (CD) de la célula madre hematopoyética (CMH) células progenitoras.....	15
Tabla 4. Clasificación inmunológica de las neoplasias de precursores linfoide T.....	17
Tabla 5. Clasificación inmunológica de las neoplasias de precursores linfoide B.....	18
Tabla 6. Clasificación FAB de LLA.....	23
Tabla 7. Clasificación FAB de las LAM.....	24
Tabla 8. Clasificación EGIL de las leucemias.....	25
Tabla 9. Frecuencia de Metástasis Leptomeníngea en varios cánceres.....	30
Tabla 10. Componentes del LCR.....	36
Tabla 11. Conteo celular e incidencia.....	56
Tabla 12. Diferencial de muestras negativas.....	56
Tabla 13. Diferencial de muestras positivas.....	57
Tabla 14. Resultados de análisis citoquímico e incidencia.....	57

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

CD	Grupo de diferenciación
C-kit	Factor de crecimiento Kit de la célula madre.
CMH	Célula madre hematopoyética
CPH	Célula precursora hematopoyética
DHL	Deshidrogenasa láctica
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EGIL	Grupo Europeo para Caracterización Inmunológica de Leucemias
EUA	Estados Unidos de América
FAB	Grupo Franco-Americano-Británico
FACS	Sorteo de Células Activadas por Fluorescencia
FEC-G	Factor estimulante de colonias de granulocitos
FEC-GM	Factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos
FEC-M	Factor estimulante de colonias de macrófagos
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FL1	Fluorescencia relativa 1
FSC	luz dispersada hacia adelante o frontal
HCM	Hemoglobina corpuscular media
HGR No.1	Hospital General Regional No.1
IgD	Inmunoglobulina D
IgE	Inmunoglobulina E

IgM	Inmunoglobulina M
Iga	Inmunoglobulina alfa
Igβ	Inmunoglobulina beta
IL- 1R	Receptor de interleucina 1
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-11	Interleucina 11
IL-13	Interleucina 13
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-7	Interleucina 7
IL-8	Interleucina 8
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
Inv	Inversión
JAML	Proteína de unión a la molécula de adhesión.
LA	Leucemia aguda
Lo	Bajo
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LLA	Leucemia linfoide aguda
LLA-B	Leucemia linfoide aguda de estirpe B
LLA-T	Leucemia linfoide aguda de estirpe T
LMA	Leucemia mieloide aguda

MIC	Morfología, Inmunología y Citogenética
MO	Médula ósea
MPO	Mieloperoxidasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Solución básica de fosfatos
PE	Ficoeritrina
PerCP	Perinidin- clorofil- proteína
PMT	Tubos fotomultiplicadores
SNC	Sistema nervioso central
SP	Sangre periférica
SSC	Luz lateral dispersa
TCR	Receptor de células T
TdT	Transferasa desoxinucleotidil terminal.

ESTANDARIZACIÓN DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO PARA EL ANÁLISIS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO EN PACIENTES CON LEUCEMIA

RESUMEN

La leucemia es una enfermedad neoplásica progresiva del sistema hematopoyético. La infiltración leucémica al Sistema Nervioso Central (SNC) representa un factor de mal pronóstico en la evolución de la enfermedad. Estudios sugieren que la citología del LCR presenta limitantes en la identificación de células neoplásicas. El objetivo del presente estudio fue establecer las condiciones de citometría de flujo para identificar las células normales en líquido cefalorraquídeo de pacientes con leucemia. Se incluyeron 31 muestras de LCR de pacientes adultos y pediátricos con leucemia, los cuales se colocaron en medio de cultivo celular y se procesaron para su análisis por citometría de flujo. Resultados: De los 31 casos 3 (9.7%) correspondieron a población adulta y 28 (90.3%) a pediátricos. Las muestras pediátricas se analizaron por citología y se encontraron 3 casos (10.7%) con infiltración y la cuenta diferencial coincidió con la presencia de blastos por tinción de Wright. La muestra de LCR obtenida directamente al tubo que contenía RPMI 1640 al 5% suero humano, fue en la que conservó mejor las características morfológicas de las células. Durante el proceso de inmunotinción, la adición de albúmina al 5% y solución de lisis de glóbulos rojos, presentó mejores características celulares durante la adquisición, menor inespecificidad, mayor cantidad de células viables y poblaciones celulares definidas. Conclusiones: el uso de medio de cultivo RPMI 1640 preservó las características celulares y aumentó el tiempo de viabilidad celular suficiente para su análisis.

FLOW CYTOMETRY STANDARIZATION FOR THE ANALYSIS OF CEREBROSPINAL FLUID IN PATIENTS WITH LEUKEMIA

ABSTRACT

Leukemia is a progressive neoplastic disease of the hematopoietic system. Leukemic infiltration of the Central Nervous System (CNS) represents a poor prognostic factor in the evolution of the disease. Studies suggest that CSF cytology has limitations in identifying neoplastic cells. The aim of this study was to establish the conditions of flow cytometry to identify normal cells in cerebrospinal fluid of patients with leukemia. 31 CSF samples of adult and pediatric patients with leukemia were included, which were placed in cell culture medium and processed for cytometric analysis. Results: Of the 31 cases, three (9.7%) were adults and 28 (90.3%) pediatric. Pediatric samples were analyzed by cytology and 3 cases (10.7%) were found with infiltration and differential counts coincided with the presence of blasts by Wright staining. The CSF sample obtained directly in tube with RPMI 1640 containing 5% human serum, preserve the morphological characteristics of the cells. During Immunostaining process, the addition of 5% albumin and red cell lysis solution, showed better cell characteristics during acquisition, less unspecificity, more viable cells and defined cell populations. Conclusions: The use of RPMI 1640 preserved cell characteristics and increased cell viability sufficient time for analysis.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 HEMATOPOYESIS

1.1.1 DEFINICIÓN:

Se denomina Hematopoyesis (*Hemat = sangre, poyesis = formación*) al mecanismo fisiológico responsable de la formación continua de los distintos tipos de células sanguíneas; eritrocitos, leucocitos y plaquetas, a partir de las células madre presentes en los tejidos hematopoyéticos y que logran su maduración mediante estímulos que promueven su diferenciación. (Mayani y col, 2007; Hirschi, 2012; Gómez ,2003; Sison & Brown, 2011)

1.1.2 TEJIDO HEMATOPOYÉTICO

La hematopoyesis requiere de órganos y tejidos especializados que permitan el constante reemplazo y abastecimiento de las células formes de la sangre. Este proceso durante las primeras semanas de vida embrionaria se lleva a cabo en agrupaciones celulares de saco vitelino denominadas islotes sanguíneos (etapa vitelina), mismos que tienen la capacidad de abastecer la demanda celular hasta el tercer mes de vida. Posteriormente el hígado alcanza su máxima expresión hematopoyética (etapa hepatoesplénica) y reemplaza a los islotes como órgano hematopoyético principal y consecuentemente, la hematopoyesis tiene lugar predominantemente en la médula ósea a partir de la segunda mitad del embarazo y por el resto de la vida (etapa mieloide) (Figura1) (Mayani y col, 2007; Mckenzie, 2009; Campbell & Alfaro, 2005; Ross & Pawlina 2007; Carrillo-Farga& Amador-Guerrero, 2007)

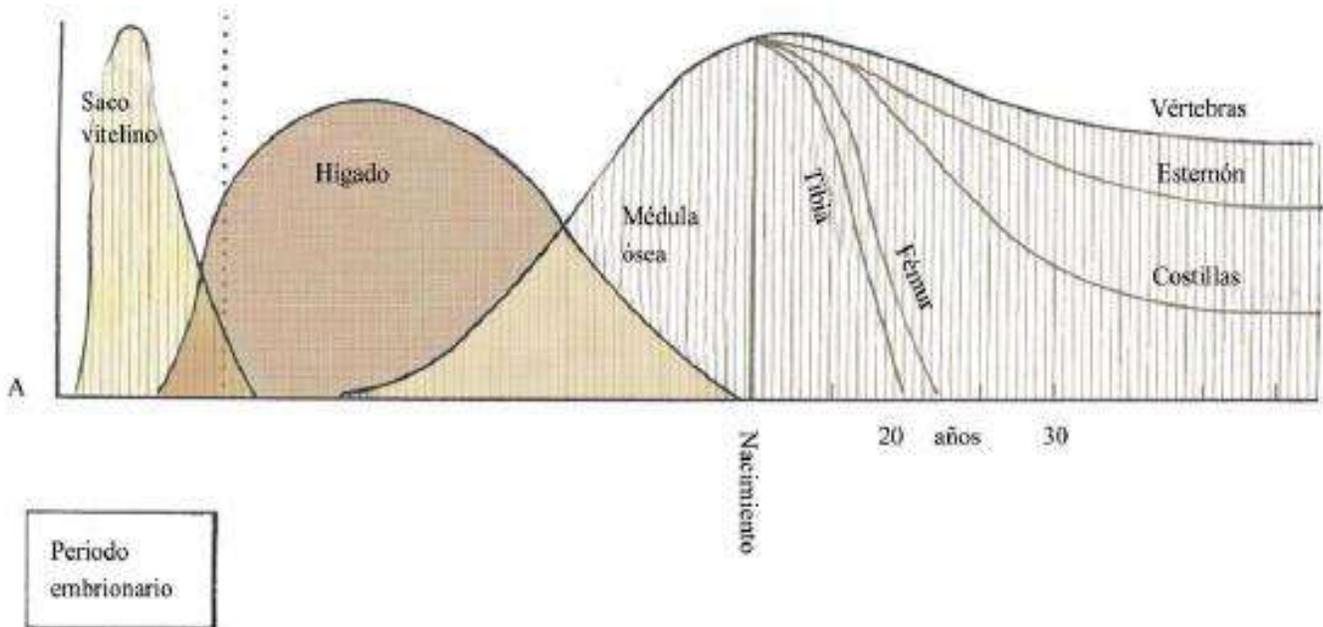


Figura 1. Desarrollo de la hematopoyesis a lo largo de la vida. Los órganos hematopoyéticos mantienen el abastecimiento por periodos durante el desarrollo embrionario, hasta concentrar la producción en médula ósea (Valdés 2007).

1.1.3 MICROAMBIENTE HEMATOPOYETICO

La médula ósea se encuentra en la cavidad medular de los huesos largos, principalmente en la epífisis y en los espacios existentes entre las trabéculas de los huesos esponjosos. Los dos compartimentos principales en la médula ósea comprenden: médula ósea amarilla o grasa

(hematopoyéticamente inactiva) y la medula ósea roja en donde se lleva a cabo el proceso hematopoyético. (Mckenzie, 2009; Mayani y col, 2007)

El microambiente hematopoyético o nicho consiste en una estructura tridimensional altamente organizada, compuesta por células del estroma

(del latín "colchón") y productos del estroma que regulan el mantenimiento, localización y fisiología de las células hematopoyéticas (Konopleva y col, 2009; Lawal & Calvi, 2011; Mayani y col, 2007; Soto Cruz y col, 1999). Los elementos celulares del estroma incluyen células endoteliales, vasculares y reticulares, osteoblastos, osteoclastos, adipocitos, fibroblastos, miocitos y células madre mesenquimales. (Campbell & Alfaro, 2005; Konopleva y col, 2009)

Las células del estroma producen factores solubles y moléculas que interactúan con las moléculas de superficie de las células madre. Estas interacciones contribuyen a la supervivencia, autorenovación, proliferación, diferenciación, quiescencia (inactividad), migración de las células madre hematopoyéticas y células progenitoras hematopoyéticas (Figura 2) (Hoggatt & Pelus, 2010; Scadden, 2007; Sison & Brown, 2011; Mayani y col, 2007).

La regulación hematopoyética ocurre a través de tres mecanismos: (1) el humoral, a través de la secreción de citocinas y quimiocinas, (2) la interacción a través de las moléculas de la matriz extracelular y (3) el

contacto célula-célula a través de moléculas de adhesión y morfógenos. (Mayani y col, 2007; Sison & Brown, 2011; Campbell & Alfaro, 2005)

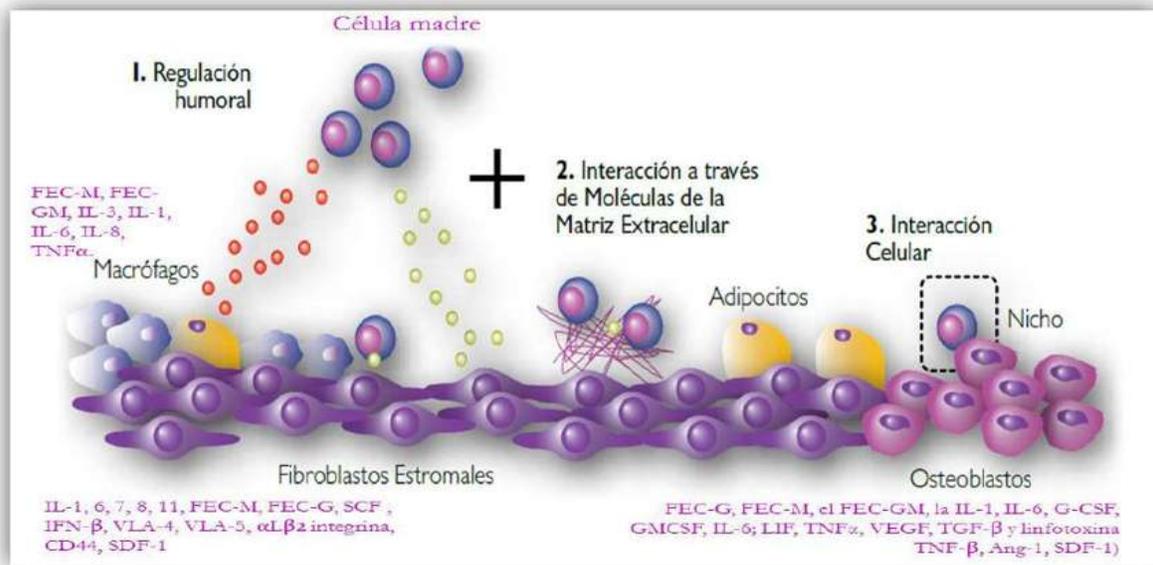


Figura 2. Microambiente hematopoyético. Esquema de los tipos celulares en el microambiente hematopoyético y mecanismo de regulación de la hematopoyesis (Mayani y col. 2007)

1.1.4 CELULA MADRE HEMATOPOYETICA

Las células madre hematopoyéticas (CMH) comprenden el 0.1% de las células contenidas en la médula ósea, se agrupan en el compartimento de células madre de forma indiferenciada, cualidad que le otorga la facultad de madurar y transformarse en cualquier célula de la serie mieloide así como linfoide (Figura 3) (Maclean, Celso, & Stumpf, 2013; Mckenzie 2009; Campbell & Alfaro, 2005). Tienen capacidades multi-potenciales

autoreplicativas y proliferativas, su diferenciación se ve condicionada bajo la influencia estímulos exógenos emitidos por otras células en las que destacan: células del estroma medular, matriz extracelular (fibronectina, vitronectina, laminina, colágeno), moléculas de adhesión (integrinas, inmunoglobulinas, selectinas), citocinas y factores de crecimiento (Maclean y col, 2013; Mayani y col, 2007; Scadden, 2007; Mera y col, 2007). En este punto las CMH progresan a un estadio en el cual se denominan células progenitoras pluripotenciales comprometidas (< 0.5% de la población), estas últimas generan a las células precursoras hematopoyéticas (CPH) representantes de más del 90% de la población celular hematopoyética en donde ya es posible un reconocimiento morfológico y citoquímico característico. Experimentan un proceso de maduración y transformación exclusivo a la serie en la cual van a derivar, para posteriormente migrar hacia los vasos sanguíneos y ser liberados a la circulación (Mayani y col, 2007; Mera y col, 2007).

Las células madre pluripotenciales se diferencian en la medula ósea como células progenitoras mieloides (UFC-GEMM) o linfoides. Las células progenitoras mieloides dan lugar a las unidades formadoras de colonias (CFU) pudiendo producir neutrófilos, monocitos, eosinófilos, basófilos, mastocitos, megacariocitos y eritrocitos. Por otro lado las células progenitoras linfoides dan lugar a células B, células T, células NK y células dendríticas (Campbell & Alfaro, 2005; Mckenzie, 2009; Mayani y col, 2007; Carrillo Farja & Amador Guerrero, 2007).

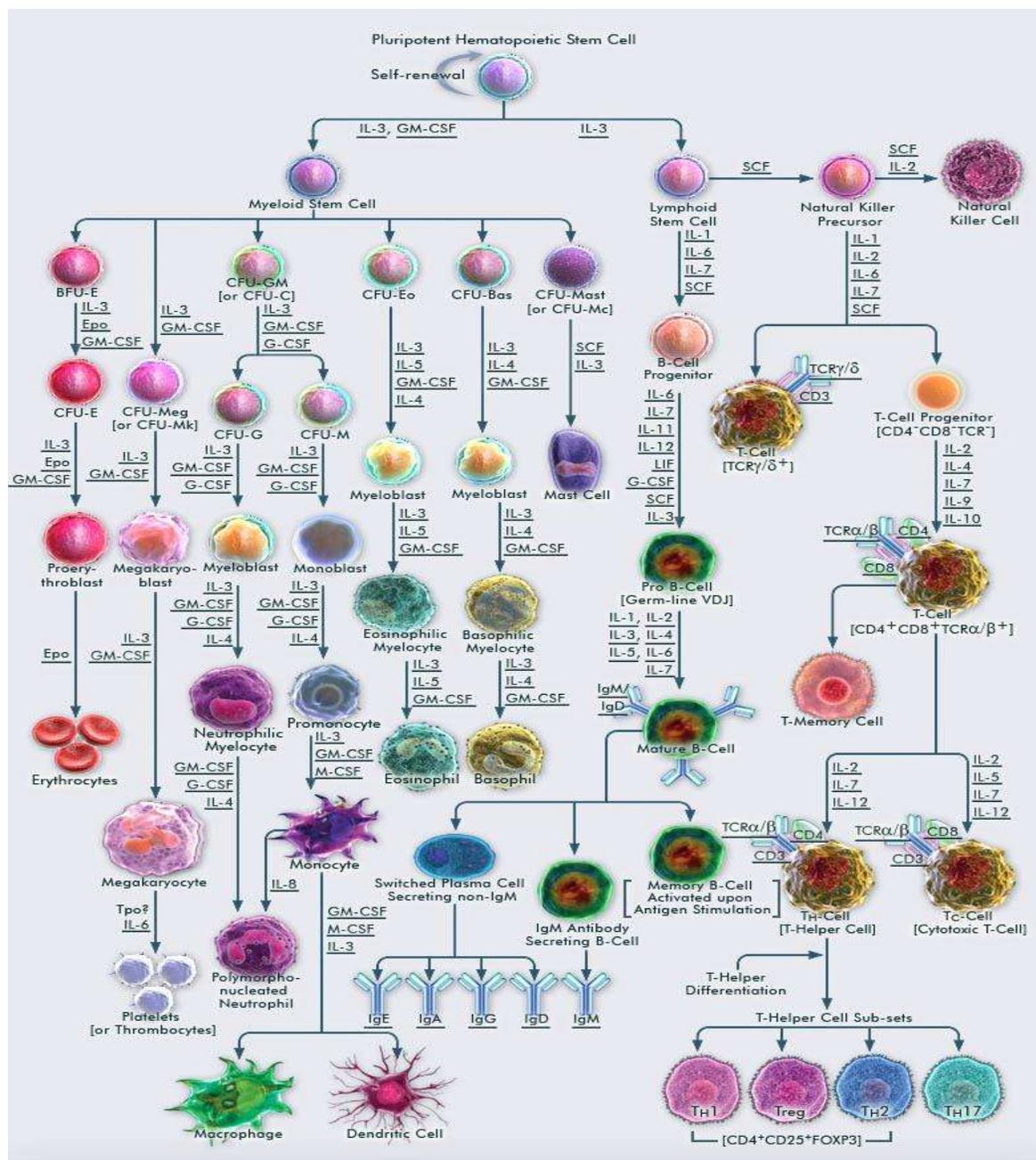


Figura 3. Hematopoyesis y citocinas que la regulan (Affymetrix eBioscience 2007).

1.1.5 FACTORES DE CRECIMIENTO

La supervivencia, autorenovación proliferación y diferenciación de las células progenitoras hematopoyéticas está controlada por glicoproteínas específicas denominadas factores de crecimiento hematopoyéticos. Cada factor desempeña funciones múltiples, comúnmente también denominados citocinas. Son mediadores solubles de ayuda en la comunicación entre las células teniendo efecto sobre otras células del ambiente local, muchos de estos factores actúan en forma sinérgica con otros factores y algunos, estimulan a otras células para que produzcan factores de crecimiento y ejercer un efecto de manera indirecta. Existen dos grupos en los que pueden clasificarse a los factores de crecimiento: factores estimulantes de colonias (FEC) e interleucinas (IL) (Tabla1) (Mckenzie, 2009; Campbell &Alfaro, 2005).

1.2 LINFOPOYESIS

La producción de las células del linaje linfoide (Linfocitos T, Linfocitos B, células NK y algunas categorías de células dendríticas) es un proceso dinámico y complejo el cual está determinado por combinaciones de factores intrínsecos y microambientales que guían la diferenciación de progenitores linfoides a partir de las células madre hematopoyéticas. (Baba y col, 2004; Mayani y col, 2007)

Tabla 1. Factores de crecimiento que intervienen en la hematopoyesis

FACTOR	CÉLULAS ESTIMULADAS	FUENTES DE PRODUCCIÓN	LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA
FEC-M (FEC-1)	Monocitos	Células endoteliales, monocitos, fibroblastos	5q33.1
FEC-G	Todos los granulocitos, megacariocitos, eritrocitos, células progenitoras y blastos leucémicos	Células T, célula endoteliales, fibroblastos	5q23-31
FEC-G	Granulocitos, macrófagos, células endoteliales, fibroblastos y blastos leucémicos	Células endoteliales, placenta, monocitos	17q11-22
IL-1	Estimula la expresión de factores de crecimiento mediante otras células. Interviene en la inflamación	Monocitos, macrófagos, células endoteliales	2q
IL-2	Linfocitos –B y –T	Linfocitos –T	4q
IL-3	Granulocitos, células eritroides, progenitoras multipotenciales y blastos leucémicos.	Células T	5q23-31
IL-4	Células B, T	Células T	5q31
IL-5	Células B, UFC-Eo	Células T	5q31
IL-6	Células B, T, UFC-GEMM, UFC-GM, UFB-E, macrófagos, células neurales, hepatocitos	Fibroblastos, leucocitos, células epiteliales	7p15
IL-7	Células B	Leucocitos	8q12-13
IL-8	Células T, neutrófilos	Leucocitos	4
IL-9	UFB-E, UFC-GEMM	Linfocitos	5q31
IL-11	Células B, T, UFC-GEMM, UGC-GM, macrófagos, UFB-E, UFC-E, megacariocitos, blastos leucémicos	Macrófagos	NI
Eritropoyetina	UFC-E, UFB-E	Riñón, hígado	7q11-22
Ligando de c-kit (“factor de células progenitoras”, FCP; factor de Steel)	Progenitoras primitivas	NI	NI

FEC-G= Factor estimulante de colonias granulocíticas, FEC-M= Factor estimulante de colonias monocíticas,IL= Interleucina,UFC- GEMM= Unidad formadora de colonias granulocítica, eritrocítica monocítica, megacariocítica,UFB-E= Unidad formadora de brotes eritroides, UFC-E= Unidad formadora de colonias eritroides. Tomado de Mckenzie, 2009.

La diferenciación del linaje linfoide progresa gradualmente en la médula ósea desde la célula madre hematopoyética totipotencial hasta precursores restringidos (Baba y col, 2004).

Contrastando éste proceso respecto a la mielopoyesis, es posible notar los pocos cambios morfológicos a lo largo del proceso de maduración del linfocito, por lo que el marcaje de los progenitores linfoides está dado en general por la expresión de factores de transcripción o marcadores de superficie. En la médula ósea una variedad de progenitores linfoides residen en la fracción celular que no expresan en la superficie membranal ningún marcador de célula sanguínea madura, pero expresan moléculas de 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 (Bloom B & Spits H. 2006, Mayani y col, 2007). Estos progenitores expresan además el receptor de interleucina 7 (IL-7), CD38 y CD45RA, y aunque, tanto en vivo como in vitro muestran un potencial residual hacia células T, NK y dendríticas, se diferencian principalmente a linfocitos B (Galy y col, 1995). En tanto que las 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 (Haddad y col, 2004.)

La linfopoyesis suele dividirse en dos fases distintivas: Linfopoyesis independiente de antígeno y linfopoyesis dependiente de antígeno, la primera es llevada a cabo dentro del tejido linfoide primario (médula ósea, timo, hígado fetal, saco vitelino) Este tipo de linfopoyesis comienza con la célula progenitora linfoide y produce como resultado la formación de linfocitos B y T inmunocompetentes (vírgenes). Por otra parte la linfopoyesis

dependiente de antígeno se produce en el tejido linfoide secundario (Medula ósea del adulto, Bazo, Ganglios linfáticos, tejido linfoide relacionado a intestino) donde se lleva a cabo una estimulación antigénica de los linfocitos T y B inmunocompetentes, dando lugar a la formación de linfocitos T y B efectores, responsables de la respuesta inmunitaria a través de la producción de de linfocinas y anticuerpos respectivamente. (Campbell &Alfaro, 2005).

1.2.1 DESARROLLO DE LINFOCITOS B

Posterior al nacimiento, el desarrollo de células B es confinado primordialmente a la médula ósea. Pese a que la información acerca de los eventos de transición a partir de los progenitores linfoides comunes a 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 CD34+ CD19- CD10+ y continuando con pro-B CD34+ CD19+ CD10+, pre B1 grandes CD34+ CD19+ CD10+, pre B11 grandes CD34- CD19+ CD10+ , pre B11 pequeñas CD34- CD19+ CD10+, B inmaduras CD34- CD19+ CD10- sIgM+ hasta la producción de B maduras CD34- CD19+ CD10+ sIgM+ sIgD+, que serán exportadas a los tejidos linfoides periféricos para cumplir su función de reconocimiento de antígeno activación y producción de anticuerpos específicos (Figura 4) (Busslinger, 2004.; Mayani y col, 2007).

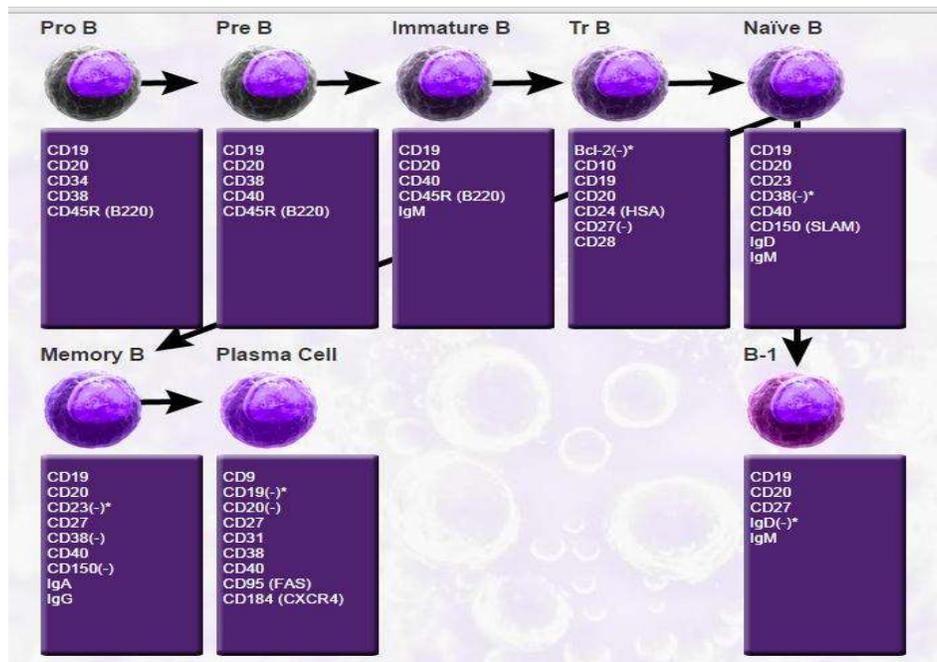


Figura 4. Maduración de células B, cambios morfológicos y expresión fenotípica característica (eBioscience 2014; Erber, 2010)

1.2.2 MADURACIÓN DE LINFOCITOS T

Debido a que el timo no produce progenitores de renovación autóloga, la linfopoyesis de T es mantenida por la importación periódica de progenitores hematopoyéticos a través de la corriente sanguínea (Bhandoola y col, 2003).

Los precursores tímicos mas tempranos residen en la población CD34+ CD1a- CD38lo CD44+ IL-7R+ y a partir de ellos de inicia el proceso de compromiso de estadios intermedios de diferenciación desde células pre-T, células inmaduras CD4unipositivas pequeñas, CD4unipositivas grandes células tempranas doble positivas, hasta timocitos doble positivos CD4+ CD8+ TCR+ (Figura 5) (Mayani y col, 2007; Schwarz y col, 2007).

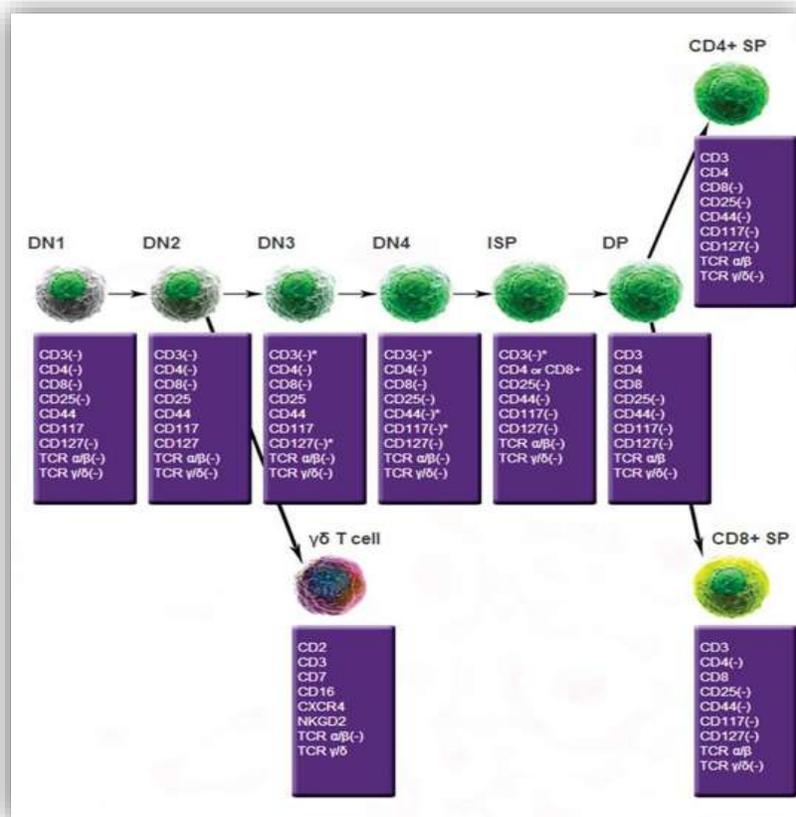


Figura 5. Maduración de células T, cambios morfológicos y expresión fenotípica característica (eBioscience, 2014, Erber, 2010).

1.3 MIELOPOYESIS

La mielopoyesis se efectúa una vez que la célula madre hematopoyética multipotencial da lugar a progenitores comprometidos a la línea mieloide. Los progenitores mieloides (CFU- GEMM BFU-E) son células con una alta capacidad proliferativa, pero incapaces de efectuar auto-renovación y cuyo potencial de diferenciación está restringido a linajes específicos; estas células responden a un determinado tipo y número de citocinas definidas por el receptor que expresa cada progenitor y eventualmente tras el estímulo, son diferenciados a células progenitoras más específicas y diferenciadas precursoras (CFU-E, CFU- Eo, CFU- Ba, CFU- GM). (Quesberry & Colvin, 2001)

La maduración posterior en cada uno de los linajes hematopoyéticos está definida por dos procesos fundamentales: la pérdida definitiva del potencial de auto renovación y la adquisición de la identidad específica. Estos procesos son controlados mediante la detención de genes que mantienen la capacidad de auto-renovación, al tiempo que los genes que regulan la diferenciación son activados. De ésta manera, los progenitores hematopoyéticos se diferencian a células precursoras, a través de una serie de eventos donde grupos de genes en asociación con factores de crecimiento determinan el destino celular, definiendo la identidad y función definitiva de cada célula madura mieloide (Eritrocito, Eosinófilo, Basófilo, Plaqueta y Monocito - macrófago). (Mayani y col, 2007)

1.4 MARCADORES DE SUPERFICIE EN LA HEMATOPOYESIS

Las células sanguíneas así como las hematopoyéticas contienen marcadores específicos en su superficie (Tabla 2). La expresión de marcadores de diferenciación o “Cluster of differentiation” (CD) en la superficie de las células permite confirmar la heterogeneidad de las células hematopoyéticas (Muñoz & Marín, 2005).

Tabla 2 Cluster of differentiation y moléculas de superficie de algunas células hematopoyéticas maduras.

Célula Sanguínea	Marcador de Superficie (CD)
Neutrófilo	CD10, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD16/CD32, CD31, CD33, CD62L, CD64, CD66b, CD88, CD114, CXCR2, CXCR1, GR-1, JAML, TLR2.
Basófilo	CD13, CD44, CD54, CD63, CD69, CD107a, CD123, CD193, CD203c, TLR4, FcεRIα, IgE.
Eosinófilo	CD15, CD23, CD49d, CD52, CD53, CD88, CD129, CD183, CD191, CD193, CD244, CD294, CD305, C3AR, FcεRIα, Galectina- 9, MRP-14, Siglec- 8, Siglec- 10.
Linfocito B	CD19, CD20, CD22, CD23, CD40, CD45R/B220, CD69 CD70, CD79a (Igα), CD79b (Igβ), CD80, CD86, CD93, CD138 (Syndecan-1), CD252 (OX40L), CD267, CD21/ CD35 (CR2/CR1), CD137 (4-1BB), CD268 (BAFF-R), CD279/PD-1, IgD, IgM.
Linfocito T	CD4, CD84 (CXCR4), CD193 (CCR3), CD194 (CCR4), CD197 (CCR7), CD278 (ICOS), CDw198.
(Th2)	(CCR8), CRTH2, Tim- 1, IL- 1R. Expresión del factor de transcripción GATA3, c-Maf, GM- CSF y los productos de las citocinas: IL- 4, IL-5, IL-6, IL10, 1L-13.
Megacariocito	CD9, CD31, CD41, CD42b, CD51, CD61, CD62 (P- Selectina).
Eritrocito	CD24, Ter 119, CD235a.

Tomado de Mckenzie ,2009.

La célula madre hematopoyética tiene una morfología linfoblastoide, la cual expresa los antígenos: CD34, CD90, CD133, CD93 (C1Rqp), Ly- 6^a/E (Sca-1), CD110 (CMpl), CD111, CD17 (C-kit), CD105 (Endoglin), TGF-βRI, TGF-βRI II, CD202b (Tie2/Tek), CD243 (MDR-1), CD135 (Fik-2), CD338, CD271 (NGFR), CD184 (CXCR4), CD150 (SLAM), CD309 (VERGFR2), carece de la expresión de los antígenos de linajes específicos, como CD3, CD8, CD9, CD20, CD33, CD38, CD71, glicoforina A, entre otros ("BioLegend Cell Markers," 2013; Mayani y col, 2007; Muñoz Marín, 2005).

Las células progenitoras hematopoyéticas comparten ciertas características inmunofenotípicas con las células madre hematopoyéticas, como la expresión del antígeno CD34, sin embargo, presentan patrones de expresión de marcadores celulares muy particulares, de acuerdo al linaje que pertenecen. El antígeno CD34 participa en la adhesión de los progenitores hematopoyéticos a las células estromales del microambiente hematopoyético. La tabla 3 señala los marcadores de diferenciación de las células progenitoras hematopoyéticas(Soto Cruz y col, 1999 Mayani y col, 2007).

Tabla 3. Cluster of differentiation (CD) de la célula madre hematopoyética (CMH) y células progenitoras..

Células hematopoyéticas	Antígenos de superficie
Células madre hematopoyética	CD34+, CD38-, CD33-, CD71-, HLA-DR -, Thy-1+, CD90+, CD117+, CD133+, CD49+
Progenitores pluripotenciales	CD34+, CD38+/-, CD33+/-, CD45-, CD71-, HLA-DR +, Thy-1-
Progenitores mieloides	CD34+, CD38+, CD33+, CD45+, CD71-, HLA-DR +, Thy-1-
Progenitores eritroides	CD34+, CD38+, CD33-, CD45-, CD71+, HLA-DR +, Thy-1-
Progenitores linfoides T	CD34+, CD38+, CD2+, CD5+, CD7+, CD10+, HLA-DR+
Progenitores linfoides B	CD34+, CD38+, CD45+, CD10+, CD19+, HLA-DR +

Tomado de Soto-Cruz y col, 1999

1.5 LEUCEMIA

La leucemia es una enfermedad neoplásica progresiva del sistema hematopoyético caracterizado por la proliferación no regulada de las células progenitoras pluripotenciales o comprometidas con un linaje mieloide o linfoide, que reemplaza las células hematopoyéticas normales en la médula ósea (Mackenzie, 2009; Campbell & Alfaro, 2005; Buitrón-Santiago y col, 2010; González-Salas y col, 2012; Novoa, Núñez, Carballo, & Lessa, 2013; Ortega Sánchez, Zwaan & Heuvel-Eibrink, 2011).

Estas enfermedades difieren respecto a su agresividad, célula de origen, características clínicas, tiempo de progresión y respuestas al tratamiento.

1.5.1 LEUCEMIA AGUDA

Las leucemias agudas (LA) confieren a un grupo heterogéneo de enfermedades caracterizado por la proliferación progresiva no regulada y acumulación de precursores inmaduros en la médula ósea, cuyo principal rasgo es el de ser de progresión rápida. Se ha clasificado a las leucemias agudas según la estirpe celular afectada, ya sea de la línea mieloide o linfoide. (Mckenzie, 2009; Campbell & Alfaro, 2005; González-Salas y col, 2012; Mejía Aranguré, Ortega Álvarez, & Fajardo Gutiérrez, 2005; Mejía-Aranguré y col, 2000; Ortega -Sánchez, Osnaya- Ortega, & Rosas-Barrientos, 2007; Zwaan & Heuvel-Eibrink, 2011).

1.5.2 LEUCEMIA LINFOCITICA AGUDA

La Leucemia linfoblástica aguda (LLA) es la neoplasia más común en la infancia, constituyendo un 35 a 40% de los cánceres de la edad pediátrica. Pese a su mayor incidencia en niños, es posible encontrarla en todas las edades (Campbell & Alfaro, 2005).

Tabla 4. Clasificación inmunológica de las neoplasias de precursores linfoides T

Clasificación inmunológica de las neoplasias de precursores linfoides T		
Línea T	Estadio	Definición
LLA T CD7+ CD3c+	proT (T I)	CD2- CD5- CD8-CD4- TDT+CD34+/-
	preT (T II)	CD2+ y/o CD5+ y/o CD8+ CD1a-MCD3- CD99+
	T intermedia o cortical (T III)	CD1a+CD34-
	T madura (T IV)	CD4+CD8+CD3m+
	TCR $\alpha\beta$ o TCR $\gamma\sigma$	CD3m+ CD1a- TCR $\alpha\beta$ + o TCR $\gamma\sigma$ +

En la LLA una célula progenitora linfoides sufre una alteración genética ó adquirida cuya consecuencia es una expansión clonal con interrupción de la diferenciación celular, crecimiento descontrolado e invasión de la médula ósea, donde posteriormente se disemina a sangre periférica, bazo, ganglios y el resto de los tejidos. Debido a la detención del desarrollo madurativo en la célula leucémica linfoides, ésta comparte muchas características fenotípicas con las células progenitoras linfoides (Campbell & Alfaro, 2005; Monroy y col, 2012).

La LLA puede clasificarse en base a las características morfológicas-citoquímicas y se subclasifica según el perfil inmunológico, citogenético y molecular. Citoquímicamente los linfoblastos muestran negatividad para la mieloperoxidasa, cloroacetoesterasa y Sudan Negro y positividad frecuente para la reacción de PAS con patrones de gránulos finos o gruesos en bloque o lacunar. Fenotípicamente es posible identificar a precursores linfoides mediante la expresión de marcadores moleculares que determinan su identidad tal y como se muestra en las tablas 4 y 5 (Faderl & Kantarjian 2011; Monroy y col, 2012).

Tabla 5. Clasificación inmunológica de las neoplasias de precursores linfoides B

Clasificación inmunológica de las neoplasias de precursores linfoides B		
Línea B	Estadio	Definición
Precursor B CD19+CD22c+ CD79a+	Pro B Común Pre B	CD10 – CD34++ HLADR+ CD20- CD10++ cadena μ – CD34+ CD10+ Cadena μ + CD34- CD20+ TdT- CD10+ CD34- K + o λ +
Madura B CD19+CD22+ CD79a+		

1.5.3 LEUCEMIA MIELOBLASTICA AGUDA

La LMA comprende un grupo heterogéneo de leucemias agudas derivadas de precursores mieloides transformados malignamente. Esta enfermedad afecta en un porcentaje mayor a la población adulta. En el sistema de clasificación FAB están subdivididas en ocho grupos LMA-M0 a LMA-M7, según la línea celular predominante y el grado de diferenciación celular. En contraste a la LLA, la LMA al diagnóstico es altamente heterogénea con diversas subpoblaciones distintas de la clona leucémica. El diagnóstico FAB de la LMA mínimamente diferenciado (LMA-M0) y LMA

megacarioblástica (LMA-M7) no se puede efectuar usando criterios morfológicos solamente. En estas leucemias, la falta de las características de diferenciación mieloide (incluyendo actividad de la mieloperoxidasa, MPO), y citomorfológicas es con frecuencia indistinguible de la LLA. Para ello la aplicación del inmunofenotipo o microscopia ultraestructural deben ser realizados (Walter & Estey, 2011; Monroy y col, 2012; Campbell & Alfaro, 2005).

Unas pocas propuestas para la clasificación inmunológica de la LMA se han hecho, pero aun no son ampliamente usadas. Los marcadores inmunológicos que son importantes para el diagnóstico de la LMA, incluyen CD13, CD33, CD65 y MPO con patrones de expresión ampliamente mieloide. Implícitamente todos los casos de LMA son positivos para los marcadores CD13 y CD33. En una minoría de casos, las células con LMA expresan sólo uno de esos antígenos. La MPO es el marcador mieloide totalmente específico para la diferenciación de línea mieloide. Sin embargo algunos casos de LMA-MO, LMA-M5 y LMA M7 pueden ser negativos a la MPO. Finalmente, la expresión de CD117 en las leucemias agudas es virtualmente específica para la LMA debido a que aproximadamente 70% de los casos de LMA son CD117+, mientras casi todos los casos de LLA son negativos a CD117 (>95%). Una diferenciación adicional se puede lograr con CD34 (células inmaduras), TdT (probablemente también células inmaduras), CD14 (células monocíticas, LMA-M4 y LMA-M5), CD15 y CD66c (células granulocíticas), CD41/CD61 y CD42 (células megacariocíticas, LMA-M7) y glicoforina A (CD235a) y antígeno H (células eritroides, LMA-M6) (Walter & Estey, 2011, Monroy y col, 2012; Campbell & Alfaro, 2005).

1.5.4 FISIOPATOLOGIA

La fisiopatología de la LA es compleja e involucra diversos factores que incluyen genéticos, inmunes y ambientales, con una relación estrecha y compleja entre ellos. Los factores genéticos de la LA han sido estudiados ampliamente pudiendo clasificar de acuerdo con la anomalía genética específica en prácticamente todos los casos de pacientes diagnosticados. Sin embargo, la comprensión de cómo las alteraciones genéticas colaboran para inducir la transformación leucémica sigue siendo poco clara (Gallegos-Arreola y col, 2013)

Los genes alterados en la leucemia pueden ser resultado de: recombinación anormal (cromosómica, translocación, inversión, inserción), pérdida de material genético (supresión), ganancia de material genético (duplicación), presencia de copias adicionales de ciertos cromosomas (hiperdiploidia). Estas alteraciones favorecen la activación de oncogenes que codifican las proteínas que controlan la proliferación de las células, la apoptosis o ambos (Gallegos-Arreola y col, 2013; Romero & Jiménez, 2002). Cuando un oncogén se activa por mutación, la proteína codificada se modifica estructuralmente de modo que aumenta su actividad de transformación, por lo tanto permanece en estado activo, transmitiendo señales continuamente a través de la unión de tirosina cinasa. Estas señales inducen el crecimiento celular incesante, en general, los productos de los oncogenes pueden estar clasificadas en seis categorías: factores de transcripción, remodelación de la cromatina, factores de crecimiento, transductores de señales y reguladores de la apoptosis (Campbell & Alfaro 2005).

1.5.5 CUADRO CLÍNICO

Los pacientes con leucemia presentan un cuadro clínico variable y de evolución relativamente corto. Los signos y síntomas clásicos suelen agruparse en 3 síndromes: anémico, hemorrágico y febril.

En el síndrome anémico la proliferación de los blastos a nivel medular provoca un desplazamiento del tejido hematopoyético normal y un trastorno en el microambiente medular, causando una anemia progresiva y por consiguiente palidez de piel y mucosas, disnea de esfuerzo, cefalea, irritabilidad, somnolencia, taquicardia y ocasionalmente insuficiencia cardíaca. La acentuada disminución de las plaquetas por destrucción y desplazamiento de los megacariocitos es la principal causa del síndrome hemorrágico, la epistaxis es frecuente también puede manifestarse en piel y mucosas en forma de púrpura, petequias y equimosis de intensidad y extensión variables (Gallegos-Arreola y col, 2013; Campbell & Alfaro 2005).

La infiltración de la médula ósea produce neutropenia periférica lo cual condiciona una susceptibilidad alta a infecciones, presentando cuadro febril en general asociado con otros síntomas que desvían la atención hacia otras posibles patologías. Frecuentemente ocurre dolor en los huesos debido a la alta presión intraósea.

1.5.6 DATOS DE LABORATORIO

Se detecta leucocitosis al diagnóstico en más del 50% de los pacientes. En un 20% la cifra de leucocitos excede las 10,000/uL. La mayoría de los pacientes presentan anemia normocítica hiporregenerativa. Suele haber

trombocitopenia debida al fracaso medular, pero en las LMA promielocíticas, puede asociarse a la coagulopatía de consumo. Hiperuricemia se detecta en más de 50% de los pacientes. En el 3% de las LLA y en el 1% de las LMA se objetiva alteración del líquido cefalorraquídeo con aumento de la presión intracraneal, hiperproteínorragia y descenso de la glucosa (Romero & Jiménez, 2002).

1.6 COMPROMISO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC)

La leucemia es una enfermedad que no se origina en el SNC por lo que la presencia en el LCR indica un trasiego de los blastos desde la médula ósea o el timo, al espacio subaracnoideo. El paciente leucémico con compromiso del SNC puede ser asintomático o bien presentar signos y síntomas secundarios a hipertensión endocraniana, tales como vómitos, cefalea, irritabilidad, rigidez de nuca, papiledema y compromiso de nervios craneales, en especial terceros, cuartos y sextos par. Por compromiso de la médula espinal puede haber dolor dorsal y en extremidades inferiores con dificultad en la marcha. Otra manifestación de leucemia de SNC más frecuente en la recaída, es el síndrome de obesidad hipotalámico, en el que por destrucción del núcleo ventromedial del hipotálamo se produce hiperfagia, sobrepeso e inclusive diabetes insípida (Galati y col, 2012; Lazarus y col, 2006; Coronel, 2005).

1.7 CLASIFICACIÓN

-FAB

En 1976, el grupo Franco- Americano- Británico (FAB) estableció criterios diagnósticos para la clasificación de la leucemia aguda (LA) mediante las características citomorfológicas y citoquímicas, distinguiendo dos grupos principales: leucemia linfoblástica aguda (LLA) y la leucemia mieloblástica aguda (LMA). Se asignaron tres clases a LLA, según sus características citológicas y el grado de heterogeneidad, Fueron designadas L1 (tipo más común en pediátricos), L2 (grupo heterogéneo más común en adultos) y L3 (Tabla 6) (grupo homogéneo raro con citomorfología de linfoma de Burkitt) (Gralnick, Galton, Catovsky, Sultan, & Bennett, 1977). De acuerdo a la línea celular predominante y el grado de diferenciación celular las LMA fueron clasificadas inicialmente en 6 tipos (M1 a M6), posteriormente con el uso de anticuerpos monoclonales dieron a dicha clasificación dos tipos más (M0 y M7) (Tabla 7) (BENNET y col, 1985; Cuneo y col, 1995; Neame y col, 1986; Zwaan & Heuvel-Eibrink. 2011)

Tabla 6. Clasificación FAB de la LLA

Clasificación FAB de LLA			
Característica	L1	L2	L3
Tamaño celular	Pequeño	Moderado Heterogéneo	Moderado Homogéneo
Cromatina nuclear	Homogénea	Heterogénea	Homogénea
Contorno nuclear	Regular	Irregular, indentaciones	Regular redondo- oval
Nucléolos	No visible	Visible	Evidente
Citoplasma	Escaso	Variable Abundante	Moderado Abundante
Basofilia citoplasmática	Ligera moderada	Variable	Intensa
Vacuolas citoplasmáticas	Variable	Variable	Prominente

Adaptado de Mckenie 2009; Abdul, 2011

Tabla 7. Clasificación FAB de las LAM

CLASIFICACIÓN FAB DE LAS LAM ²⁰			
Subtipos	Celularidad	Citoquímica	
		MPO	ANAE
M0 mínimamente diferenciada	Indiferenciada	-	-
M1 Con escasa maduración	Blastos > 90% CNE	+	-
M2 Con maduración	Blastos 30-90% CNE	+	-
M3 Promielocítica	Promielocitos > 30%	+	-
M4 Mielomonocítica	Monocitos 20-80%	+	-
M5a Monocítica indiferenciada	Monoblastos > 80% células monocíticas	-/+	+
M5b Monocítica diferenciada	Monoblastos <80% células monocíticas	+/-	+
M6 Eritroleucemia	Mieloblastos >30% CNE	+	-
M7 Megacariocítica	Megacarioblastos >30%**	-	-

MPO: mieloperoxidasa, ANAE: alfa-naftil acetato esterasa, CNE: células no eritroides.

** Positiva para marcadores mieloides: CD13, CD33.*

*** Positiva para marcadores de serie megacariocítica: CD41 CD61.*

Adaptado de Mckenie 2009; Abdul, 2011

-MIC

En los años 80's, surgió una nueva clasificación (MIC; Morfología, inmunología y citogenética) que pretendía diferenciar entidades según características citológicas, inmunológicas y citogenéticas, que tuvieran diferente pronóstico (Romero & Jiménez 2002)

-OMS

La clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de los tumores de los tejidos linfoides y hematopoyéticas surge del consenso de un grupo de expertos convocados al Consejo Asesor Clínico (CAS). Dicho consejo, clasifica y establece criterios diagnósticos utilizados para leucemia aguda, entre otros, Esta clasificación, utiliza toda la información disponible

en la morfología, citoquímica, inmunofenotipo, genética y características clínicas de dicha enfermedad (Vardiman y col, 2009; Abdul, 2011).

- EGIL

El grupo Europeo para caracterización inmunológico de leucemias (EGIL) publicó en 1995, el perfil inmunofenotípico de la leucemia aguda, En la tabla 8 se muestra el perfil inmunofenotípico de la LLA de estirpe B y T (Abdul, 2011).

Tabla 8. Clasificación EGIL de las leucemias

CLASIFICACION EGIL DE LAS LEUCEMIAS					
Linfoblástica B			Linfoblástica T		
<i>Frecuencia</i>	<i>Subtipos</i>	<i>Marcadores Inmunológicos</i>	<i>Frecuencia</i>	<i>Subtipos</i>	<i>Marcadores Inmunológicos</i>
5%	LAL B1 o pro-B	CD79a+ y/o CD 22+ y/o CD19+,CD34+	15%	LAL T1 o pro-T	+ CD 7 Y CD3 citoplasmático, CD34+
60%	LAL B2 o común	CD79a+ y/o CD 22+ y/o CD19+,CD34± CD 10+	15%	LAL T2, pre-T	A lo anterior añadir + CD 2 y/o CD 5 y/o CD8.
15%	LAL B3 o pre- B	CD79a+ y/o CD 22+ y/o CD19+, Cad μ intracitoplasmatica	Más frecuente	LAL T3, tímico-cortical	+ CD1a
3%	LAL B4 o maduros	CD79a+ y/o CD 22+ y/o CD19+, Ig Sup+	Más frecuente	LAL T4, madura	Demostración de la existencia de CD 3 de sup en ausencia de CD 1a.

Adaptado de Dorantes y col, 2013; Abdul, 2011.

1.8 METASTASIS

La metástasis (del griego *metastatis* – mudarse de lugar o transferencia) es un proceso extraordinariamente complejo en el cual la célula neoplásica es capaz de desprenderse del tejido de origen, trasladarse y en determinado momento, instalarse en otro tejido y proliferar (Figura 6). Para colonizar con éxito un sitio secundario, la célula neoplásica debe completar una serie secuencial de pasos los cuales incluyen típicamente la separación del tejido primario, invasión a través de los tejidos circundantes y las membranas basales, la entrada y la supervivencia en la circulación; los vasos linfáticos o en el espacio peritoneal y el asentamiento en el órgano diana, para posteriormente acceder por medio de la extravasación en el tejido circundante, sobrevivir en el microambiente extranjero, proliferar e inducir angiogénesis; a su vez que elude la muerte por apoptosis o bien la respuesta inmunológica (Drappatz y col, 2007; Hunter y col, 2008).

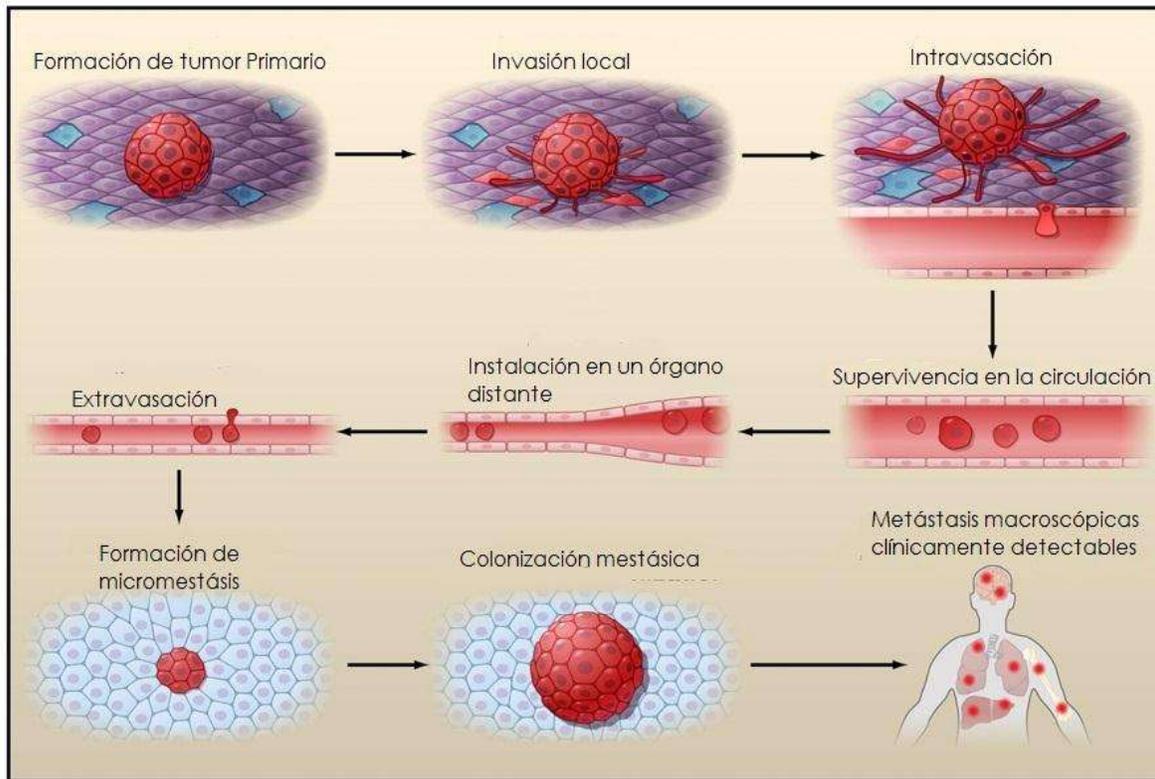


Figura 6. Cascada de la metástasis. Las células neoplásicas desarrollan capacidades adaptativas proliferando e invadiendo tejidos distantes al de su origen (Valastyan & Weinberg, 2011).

Se han desarrollado varios modelos para intentar explicar el mecanismo del proceso de metástasis (figura 7). Sin embargo, pese a las numerosas aportaciones sigue existiendo un déficit en cuanto a la comprensión de las complejidades biológicas y patológicas en las que se basa este proceso debido a su complejidad, ya que no sólo comprende la biología de la célula tumoral sino también del organismo en que reside (Hunter y col, 2008).

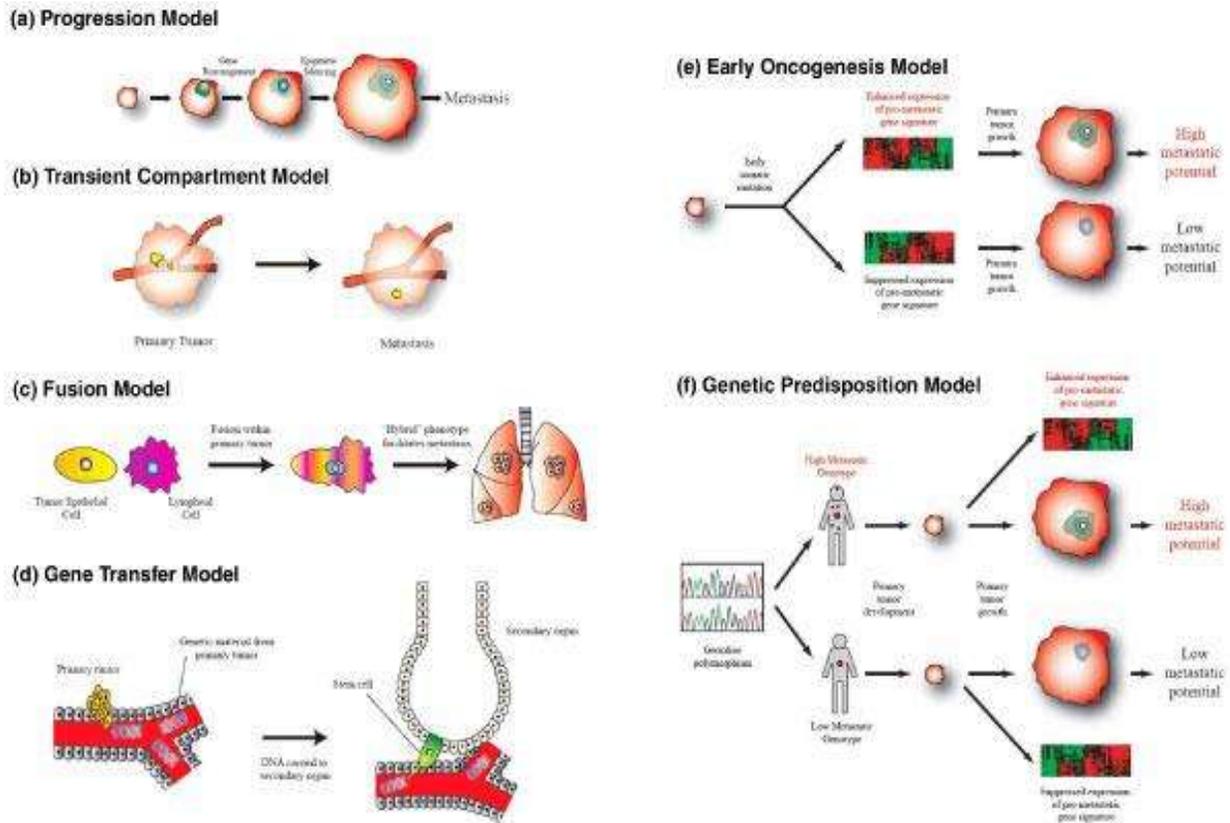


Figura 7. Modelos de metástasis. (a) modelo de progresión. Una neoplasia primaria adquiere un fenotipo metastásico progresivo. (b) modelo de compartimentos transitoria. Todas las células viables en un tumor adquieren capacidad metastásica, pero debido a eventos epigenéticos de posición y / o aleatorios. (c) Modelo de fusión. Para obtener un fenotipo totalmente metastásico, una célula tumoral debe adquirir ciertas características de las células linfoides (por ejemplo, la degradación proteolítica, la capacidad de intra y extravasado). (d) Gen. Una característica de malignidad es la presencia de ADN del tumor en el torrente sanguíneo. Este ADN, que lleva las mutaciones somáticas asociadas con la neoplasia, se lleva al sitio secundario. Posteriormente, el ADN tumoral es absorbida por las células madre en el órgano distante, que dotan a la célula madre con propiedades malignas. (e) Modelo oncogénesis Temprana. El potencial metastásico de cualquier tumor primario se establece temprano en su evolución, presumiblemente como consecuencia de la mutación somática. (f) Modelo predisposición genética. El potencial metastásico de cualquier tumor primario se ve alterada por el fondo genético sobre el que surge. Es decir, un individuo será más o menos susceptibles a la diseminación del tumor como consecuencia de polimorfismo constitucional. Tomado de Hunter y col 2008.

1.8.1 METASTASIS LEPTOMENINGEA

La metástasis leptomeníngea es una grave complicación del cáncer, es dada cuando las células neoplásicas irrumpen las leptomeninges, llegando al líquido cefalorraquídeo; donde se asientan y crecen en cualquier lugar a lo largo del neuroeje de manera difusa. Tal infiltración por cualquier neoplasia maligna da lugar a una elevada mortalidad y morbilidad. Generalmente ocurre en una etapa tardía de la enfermedad (Hunter y col, 2008; Bomgaars y col, 2002; O`Meara y col, 2007)

Es difícil obtener estimaciones fiables de la incidencia de éste tipo de metástasis debido al diagnóstico deficiente durante la complicación y al tipo de cáncer en cuestión, las cifras estimadas generalmente son obtenidas mediante el número de casos reportados de pacientes diagnosticados y adicionalmente por la detección post-mortem durante la autopsia, donde el número de casos generalmente dobla la cifra en comparación con la estimación de casos clínicamente diagnosticados. En la tabla 9 Se observan algunos tipos de cáncer que producen metástasis leptomeníngea y su respectiva incidencia (Hunter y col, 2008; Bomgaars y col, 2002; O`Meara y col, 2007)

.

Tabla 9. Frecuencia de Metástasis Leptomeningea (LM) en varios Cánceres

Frecuencia de Metástasis Leptomeningea (LM) en varios Cánceres		
Cáncer	Porcentaje Desarrollado LM	Características
Carcinoma		
Pecho	5	La incidencia puede estar aumentando, más común con el carcinoma lobulillar infiltrante.
SCLC	9-25	La incidencia está aumentando, el riesgo aumenta con la duración de la supervivencia.
NSCLC	¿?	Menos común que el de pecho, probablemente más común en general que SCLC LM
Melanoma	23	50% en la autopsia
Leucemia		
AML	< 5	10% sin profilaxis, asociada con una alta cantidad de glóbulos blancos en la sangre, LDH elevada, enfermedad extramedular al momento del diagnóstico, y con morfología monocítica
ALL	11	30% sin la profilaxis, asociado con fenotipo de células T, Burkitt morfología, y recuento elevado de glóbulos blancos al momento del diagnóstico
CLL	Poco común	Puede ocurrir durante la crisis blástica
Linfoma		
NHL	4-10	Asociado con histiocítico difuso e histología linfocítica, afectación de la médula ósea
HD	Poco común	-
Total	8.6	LM presente en la autopsia en 56 de 649 cerebros examinados en el MSKCC

AML = leucemia mielógena aguda; ALL = leucemia linfocítica aguda; CLL = leucemia linfocítica crónica; HD = enfermedad de Hodgkin; LDH = deshidrogenasa del ácido láctico; MSKCC = Memorial Sloan-Kettering Cancer Center; NHL = linfoma no Hodgkin; NSCLC = no cáncer de pulmón de células pequeñas; SCLC = cáncer de pulmón de células pequeñas.

Entre los varios mecanismos propuestos para la metástasis leptomeningea se puede destacar a la vía hematológica como la diseminación más común hacia las meninges debido a que el sistema nervioso central (CNS) está altamente vascularizado recibiendo 20% del flujo sanguíneo. No obstante, cualquiera que fuese el mecanismo de entrada, una vez que las

células neoplásicas introducen en las leptomeninges, éstas se dispersan a lo largo de el espacio subaracnoideo en el neuroeje por el flujo constante del líquido cefalorraquídeo. (Figura 8) (Hunter y col, 2008; DeAngelis y col, 2008; O`Meara y col, 2007)

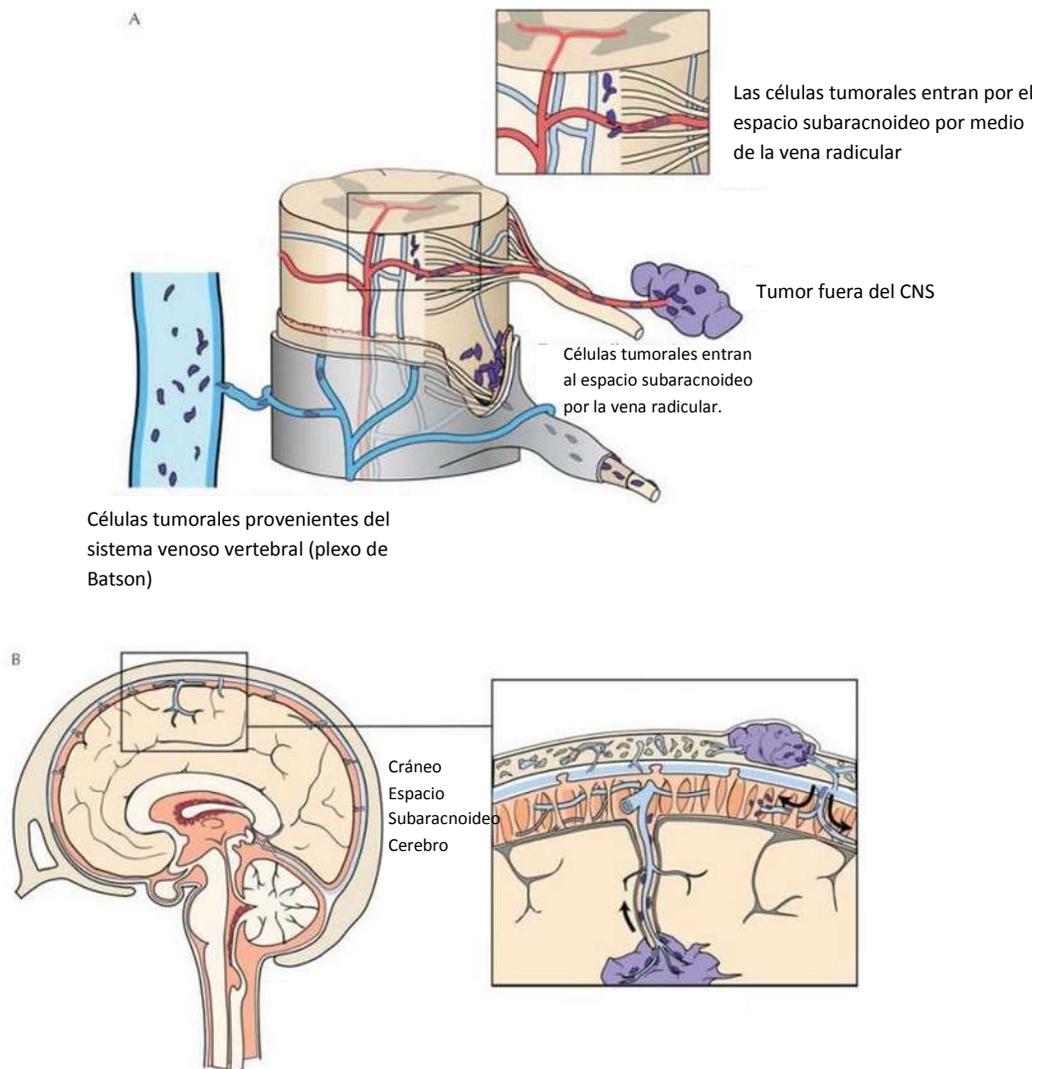


Figura 8. Patofisiología de la metastasis leptomeníngea. Las células neoplásicas atraviesan la barrera hematoencefálica por el espacio subaracnoideo usando diferentes vías (DeAngelis y col, 2009).

Dada la infiltración al SNC, los signos y síntomas son altamente diversos de acuerdo al tipo de cáncer en cuestión, principalmente si éste constituye un tumor sólido y a la zona afectada del neuroeje. (Hunter y col, 2008; Bomgaars y col, 2002; O`Meara y col, 2007)

.

1.9 LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO

El líquido cefalorraquídeo, (LCR) es una sustancia dinámica y metabólicamente activa, la cual comprende la mayor parte de los fluidos extracelulares del SNC y es responsable de numerosas e importantes funciones. Entre ellas, clásicamente se describen brindar soporte mecánico al cerebro y la remoción de los metabolitos. Además de esto, se sugiere una actividad importante en el desarrollo, la homeostasis, y la reparación del sistema nervioso central. (Desenhammer y col., 2006; Orescovic, Klarica 2010)

1.9.1 SECRECIÓN

El LCR es un líquido incoloro y transparente, está contenido en los ventrículos cerebrales así como en los espacios subaracnoideos craneales y espinales. El volumen total comprende alrededor de 150 mL, distribuidos en aproximadamente 25mL y 125 mL en el espacio ventricular y subaracnoideo respectivamente. Predominantemente es secretado por el plexo coroideo en un 70% y un 30% en el epéndimo a razón de 0,35 mL/minuto o 500 ml/día (Sakka, Coll & Chazal, 2011; Sevillano-García y col, 2011). La secreción es finamente regulada por múltiples factores.

Variaciones en la presión e interacciones entre inervación colinérgica, adrenérgica, serotoninérgica y peptídica autónoma representan los principales factores que afectan la secreción y disminución de producción de LCR. Simultáneamente, enzimas, transportadores de membrana y el equilibrio ácido base entre otros, modifican y mantienen en lo posible la composición, entrada y salida de moléculas para lograr la estabilidad y equilibrio requerido (Sakka, coll & Chazal, 2011).

1.9.2 PRESIÓN Y CIRCULACIÓN

El espacio por donde circula el LCR consiste de un sistema hidráulico muy dinámico, la presión que ejerce durante su circulación determina la presión intracraneal así como la homeostasis (Sakka, Coll & Chazal, 2011; Sevillano-García y col, 2011)

La presión del LCR está definida como la presión intracraneal en posición prona, internamente es el resultado del equilibrio dinámico entre la secreción, absorción y la resistencia a fluir. El valor fisiológico que se otorga a la presión del LCR varía de acuerdo al individuo y el método de determinación entre 10 a 15mmHg y 3 a 4 mmHg en niños (Sakka, Coll & Chazal, 2011).

La circulación del LCR y su regulación es responsable de la homeostasis cerebral. El fluido circula desde los sitios de secreción hasta los sitios de absorción de acuerdo con un flujo unidireccional rostrocaudal en las cavidades ventriculares y una vez en los espacios subaracnoideos adopta un flujo multidireccional (Figura 9). El flujo del LCR es pulsátil, correspondiente a la onda del pulso sistólico en la arteria coroidea. (Sakka, Coll & Chazal, 2011; Deisenhammer y col, 2006)

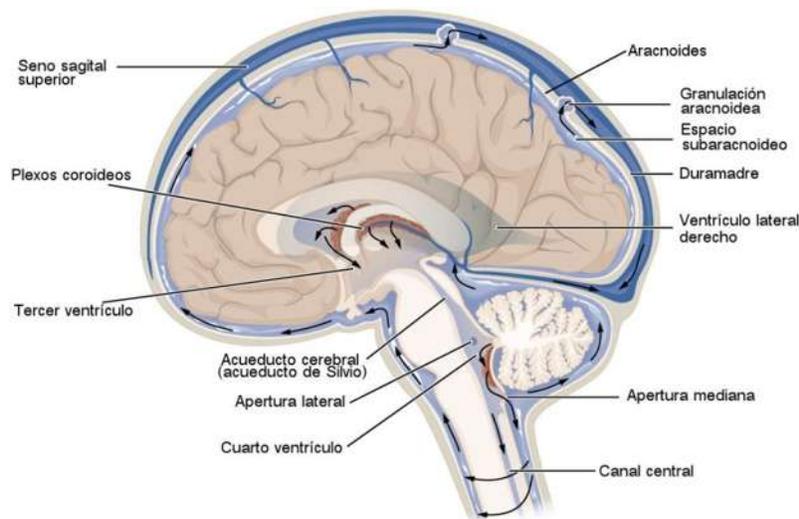


Figura 9. Circulación del LCR. El plexo coroideo en los cuatro ventrículos producen CSF, que se distribuye a través del sistema ventricular y luego entra en el espacio subaracnoideo a través de la mediana y aberturas laterales. El LCR se reabsorbe a la sangre en las granulaciones aracnoideas, donde la membrana aracnoides emerge en los senos derales. (Tomado de OpenStax Anatomy and Physiology)

El volumen circulante de LCR varía de acuerdo a la edad; en recién nacido existe de 40 a 60 ml; en niños de 60 a 100 ml; adolescentes de 80 a 120 ml y en adultos oscila entre los 150 ml (Sevillano-García y col., 2011).

1.9.3 ABSORCIÓN

La producción de LCR es constante, por lo que es necesario eliminar el excedente circundante, proporcionando equilibrio y evitando complicaciones fisiológicas en el encéfalo. La absorción del LCR se lleva a cabo en las vellosidades aracnoideas que se continúan con los senos venosos derales, estas vellosidades actúan como válvulas unidireccionales que permiten la salida del líquido hacia el espacio vascular pero no a la inversa; cuando la presión venosa se incrementa a niveles superiores con respecto a la del LCR, se cierra el acceso y por tanto la sangre no ingresa

al ducto que contiene al LCR , si la presión del LCR es mayor, las válvulas se abren permitiendo la salida del liquido hacia los senos venosos (Snell, 2001; Sakka, Coll & Chazal, 2011; Sevillano-García y col., 2011).

1.9.4 COMPOSICIÓN

El LCR es similar a un ultrafiltrado plasmático transparente con un bajo contenido de proteínas y baja celularidad (Terlizzi, 2006). El contenido de electrolitos es conformado por Sodio, Potasio Calcio y Cloro. Presenta variaciones en la concentración con respecto a la del plasma, encontrando cifras mayores en Sodio, Cloro y Magnesio y menores en Potasio y Calcio. (Sevillano-García y col., 2011; Sakka, Coll & Chazal 2011). También está constituido por distintos fosfatos y moléculas orgánicas en las que figura la glucosa, lactato y algunas proteínas y enzimas como globulinas y lactato deshidrogenasa entre otros (Tabla 10).

1.9.5 ALTERACIONES DEL LÍQUIDO CEFALORRAQUIDEO

1.9.5.1 ASPECTO.

El aspecto normal del LCR es limpio e incoloro, también denominado “agua de roca”, no precipita, ni coagula. Las alteraciones en el aspecto son:

-Turbidez. EL enturbecimiento generalmente se debe al aumento en la cantidad de células resultado de un proceso infeccioso, con predominio en polimorfonucleares. Varía desde turbidez leve a purulento según el agente patológico y la evolución (Sevillano- García y col, 2011).

Tabla 10. Componentes del LCR

Componente	Concentración
Albúmina	10-30 mg/dL
Calcio	2,1-2,7 mEq/L
Cloruro	115-130mEq/L
Glucosa	50-80 mg/dL
Lactato	9-26 mg/dL
Lactato-deshidrogenasa	0-25 UI/L (37°C)
LEUCOCITOS	
Adultos	0-5 células mononucleares/μL
Neonatos	0-30 células mononucleares/ μL
DIFERENCIAL	
-Adultos	
Linfocitos	60% +/- 20%
Monocitos	30% +/- 15%
Neutrófilos	2% +/- 4%
-Neonatos	
Linfocitos	20% +/- 15%
Monocitos	70% +/- 20%
Neutrófilos	4% +/- 4%
Proteínas totales	15-45 mg/dL
Adultos > de 60 años	15-60 mg /dL
Neonatos	15-100 mg /dL
IgG	>5
IgA	>5
IgM	>5

-Color

Rojo (hemorrágico) puede ser de distintas etiologías:

1. *Traumático*: Por rotura de un vaso sanguíneo a su paso por el espacio subdural. (Sevillano-García y col., 2011).
2. *Hemorragia subaracnoidea*. No siempre resulta en color rojo. Se confirma por medio de centrifugación que muestra un sobrenadante amarillento intenso y un botón de eritrocitos. (Sevillano-García y col., 2011).
3. *Hemorragia intraventricular*. Coloración rojiza por hemorragias intrapaenquimatosas con inundación ventricular (Sevillano-García y Col, 2011)

1.9.5.2 PROTEINAS

La proteinorraquia es el aumento en el volumen de las proteínas en el LCR. Este aumento puede sugerir una modificación de la integridad de la barrera que divide a los vasos sanguíneos del líquido cefalorraquídeo, rompiendo el equilibrio y permitiendo el acceso de proteínas desde torrente sanguíneo, sin embargo este aumento también puede deberse a múltiples factores como el peso, género, hipotiroidismo, consumo de alcohol, tabaquismo y patologías como infecciones síndromes neoplásicos, entre otros (Seyfer y col, 2002; Deisenhammer et y col, 2006).

1.9.5.3 CITOLOGÍA.

En condiciones normales el LCR debe contener una cantidad menor o igual a 5 células por mililitro, de predominio linfocitario (linfocitos 93-97%; polimorfonucleares 1-3%; monocitos 0,5-1%).

Pleiocitosis. El aumento del contenido celular en el LCR puede clasificarse según el número y predominio celular en leve, moderada o intensa.

1.10 CITOMETRIA DE FLUJO

La citometría de flujo en leucemias, es utilizada para detectar los antígenos contenidos en células leucémicas mediante el uso de anticuerpos monoclonales conjugados con distintas sustancias fluorescentes llamadas fluorocromos (Saxena & Anand, 2008). La realización de un diagnóstico mediante este método es característicamente interpretativo, debido a las múltiples variables que emite el estudio (complejidad, tamaño, intensidad de la expresión, región en la que se expresa, etc.) y que proporcionan en conjunto información que determina la clasificación de la célula). La sensibilidad de la citometría de flujo es de 1×10^{-3} a 10^{-4} , es decir detecta 1 célula maligna en 1000 o hasta 10000 células normales (Coustan- Smith y col, 2002; Juárez- Velázquez & Pérez-Vera, 2012).

1.10.1 FUNDAMENTO

La citometría de flujo mide simultáneamente y analiza múltiples características físicas de las células, a medida que fluyen las células a través de un haz de luz. Las propiedades medidas incluyen el tamaño, granularidad o complejidad y la intensidad de fluorescencia. Un citómetro de flujo se compone de tres sistemas principales: de fluido óptico y electrónico (Figura 10)(Coustan-Smith y col, 2002; Juárez-Velázquez & Pérez-Vera, 2012).

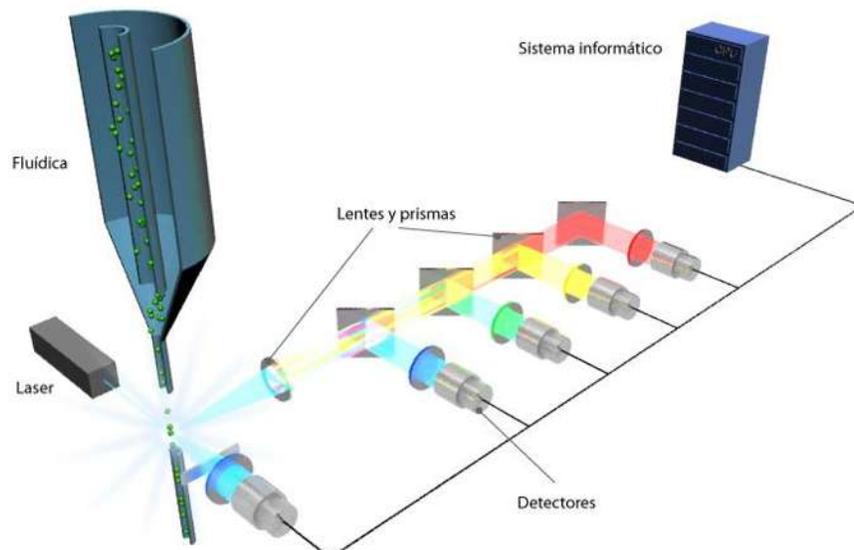


Figura 10. Operación interna de un citómetro de flujo. Se muestran los 3 componentes principales ; El sistema de fluidos inyecta la muestra, el sistema óptico incide un rayo láser a cada célula por separado y el sistema de detección clasifica de acuerdo al tamaño, complejidad y emisión de la fluorescencia (biotechspain)

El sistema de fluidos inyecta la muestra en un flujo con presión y velocidad específicas (LO, MED, HI), haciéndolo pasar por un pequeño orificio. Las células serán incididas por un láser, que producirá una dispersión o desviación de la luz, dando origen a dos tipos de señales; side scatter (SSC) y forward scatter (FSC) lateral y frontal respectivamente, además de la emisión de la fluorescencia. La medida en que esto ocurre depende de las propiedades físicas de la célula; la luz dispersada en forma frontal es proporcional al área de superficie celular o tamaño. La luz dispersada lateralmente es proporcional a la complejidad o granularidad celular. El sistema óptico consiste en un láser, una serie de filtros ópticos, espejos y detectores de señales (fotomultiplicadores y fotodiodos). Una vez que el haz de luz ha incidido sobre la célula las señales FSC, SSC y fluorescencia emitida son desviados a tubos fotomultiplicadores (PMT-SSC, PMT-FL1, PMT-FL2, PMT-FL3, PMT-FL4, etc.) y las señales emitidas son recolectadas por un fotodiodo. Todas las señales son dirigidas a sus detectores por un sistema de espejos y filtros de luz. El sistema electrónico convierte las señales de luz detectadas en señales electrónicas que pueden ser procesados por el computador. Los datos recogidos de cada célula o evento, son almacenados en el ordenador y localizados en gráficos. (Givan y col, 2000)

Un fluorocromo o compuesto fluorescente absorbe energía de la luz en un rango de longitudes de onda característica. Esta absorción de la luz hace que un electrón del fluorocromo se eleve a un nivel de energía más alto. Esta transición de la energía se denomina fluorescencia. Más de un fluorocromo se puede utilizar simultáneamente si cada uno se excita a una misma longitud de onda y si las longitudes de onda pico de emisión no son muy cercanas uno del otro. La combinación de isotiocianato de fluoresceína (FITC) y ficoeritrina (PE) responde a estos criterios. La cantidad de señal fluorescente detectada es proporcional al número de moléculas

de fluorocromo unidas a la célula, Cuando un fluorocromo se conjuga con un anticuerpo monoclonal, se puede utilizar para identificar un tipo de célula particular sobre la base de los marcadores de superficie antigénicos individuales de cada célula (Givan y col, 2000).

1.10.2 ANTICUERPO MONOCLONAL

Los anticuerpos son glucoproteínas mediadoras de la inmunidad humoral, estos inician sus efectos al unirse a los antígenos. Los anticuerpos monoclonales, son moléculas de afinidad específica frente a un determinante antigénico. Es decir, son anticuerpos que se producen de líneas celulares llamadas hibridomas. Estos hibridomas son seleccionados específicamente según el anticuerpo requerido, cuentan con la característica de ser inmortales, pues se producen a partir de una función celular (hibridación celular somática) entre una célula B murina normal productora de anticuerpos y una línea de mieloma. (Figura 11) Entre las aplicaciones de los anticuerpos monoclonales está la identificación de los marcadores fenotípicos únicos de un tipo celular particular, en este caso células leucémicas. Actualmente existen varios cientos de anticuerpos que se han asignado en contra de grupo de diferenciación (CD) o antígeno por el diagnóstico de diferentes tipos de leucemia (Abbas, Lichtman, & Pillai. 2012; Asgarian Omran y col, 2007; Machado, Téllez, & Castaño, 2006).

La utilidad en la tipificación celular a través del antígeno CD45 se basa en que es una proteína expresada de manera constitutiva en todas las células hematopoyéticas, que incrementa su densidad en los estadios finales de la hematopoyesis en los diferentes linajes celulares leucocitarios y permanece de manera estable en células maduras.

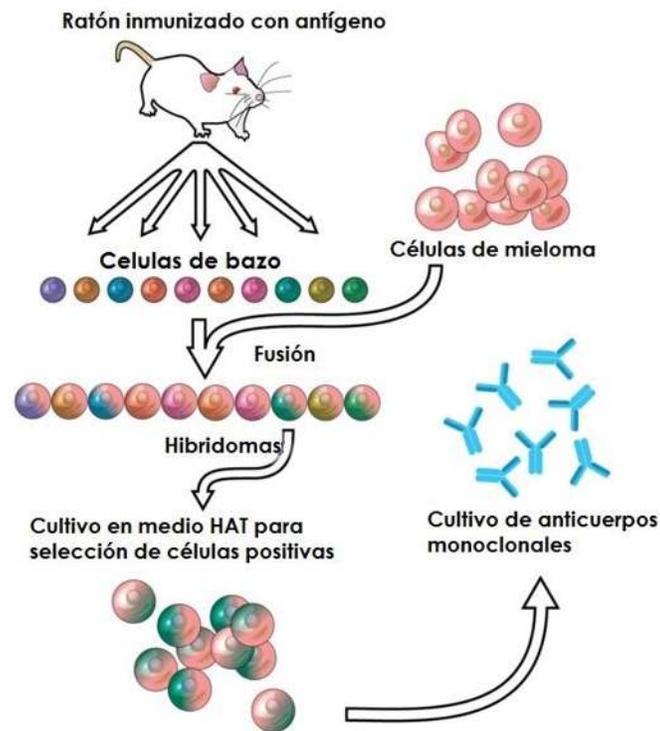


Figura 11. Esquema general de la formación de anticuerpos monoclonales. Las células retadas con antígeno son retiradas del bazo y son fusionadas con células de mieloma. La selección de las células que expresan el anticuerpo de interés se realiza por cultivo celular y posteriormente son recolectados.

Por otro lado, las células eritroides y las plaquetas pierden la expresión de éste antígeno a lo largo de la diferenciación. Se sabe que la intensidad de expresión CD45 no es la misma en todos los glóbulos blancos normales, que en las diferentes neoplasias hematológicas, situación que contribuye a la distinción entre los diferentes tipos celulares y la identificación de las poblaciones (Collino, Rodríguez, Sastre, Heller, & Fernández, 2006).

2. HIPÓTESIS

El LCR amortiguado con medio de cultivo celular conserva mejor las propiedades morfológicas y fenotípicas.

3. JUSTIFICACION

El estudio del LCR en los pacientes con leucemia, es un parámetro que se realiza al diagnóstico de la enfermedad y durante el tratamiento. Se sabe que la presencia de células neoplásicas en el SNC, es un indicador de mal pronóstico, es decir, que los requerimientos terapéuticos serán más severos en dosis e intensidad. El análisis del LCR se realiza en forma protocolaria de acuerdo a los esquemas de tratamiento; la metodología utilizada es convencionalmente la citología, determinando la cantidad y tipo de células. Para el análisis morfológico, se realiza en un frotis celular mediante tinción de Wright, el cual es considerado como estándar de oro para determinar infiltración al sistema nervioso central, sin embargo, este método, presenta limitaciones en muchos casos debido a la similitud morfológica entre linfocitos y monocitos normales con blastos leucémicos. Agregado a esto, se sabe que el LCR presenta una viabilidad de 30 minutos posterior a su extracción por punción lumbar, por lo que el procesamiento de la muestra idealmente debe ser inmediato, aumentando significativamente la probabilidad de encontrar células neoplásicas de morfología reconocible. La citometría de flujo ha surgido como un método alternativo para caracterizar específicamente el tipo de células; pues es un método con mayor sensibilidad y especificidad.

Actualmente, se realizan muchos estudios tratando de definir las condiciones metodológicas para el estudio del LCR por citometría de flujo; sin embargo, aún no se ha logrado establecer un método que reúna las características de conservación de las células y el análisis inmunológico. Es por ello que en el presente estudio se pretende establecer un método por citometría de flujo que permita identificar adecuadamente a las células del LCR

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Establecer las condiciones de citometría de flujo para identificar las células normales y leucémicas en líquido cefalorraquídeo de pacientes con leucemia.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar mediante análisis morfológico y citoquímico del líquido cefalorraquídeo.
2. Evaluar la celularidad mediante citometría de flujo con diferentes medios de conservación y transporte, para identificar los linfocitos y monocitos en el LCR.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 UNIVERSO DE TRABAJO.

Pacientes consecutivos con diagnóstico de leucemia que ingresaron al Servicio de Oncología Pediátrica del Hospital Infantil de Morelia "Eva Sámano de López Mateos" y al Servicio de Medicina Interna del Hospital General Regional No. 1 del IMSS, a los cuales se les realizó estudio de control del Sistema Nervioso Central mediante punción lumbar.

5.2 SELECCIÓN DE LOS PACIENTES

5.2.1 TAMAÑO DE LA MUESTRA

. Se incluyeron 31 pacientes con diagnóstico de leucemia que ingresaron al servicio de oncología por tratamiento y estudios de control.

5.2.2 CRITERIOS DE SELECCIÓN

a) CRITERIOS DE INCLUSIÓN.

Pacientes con diagnóstico de leucemia con estudios de control por tratamiento.

Pacientes con diagnóstico de novo.

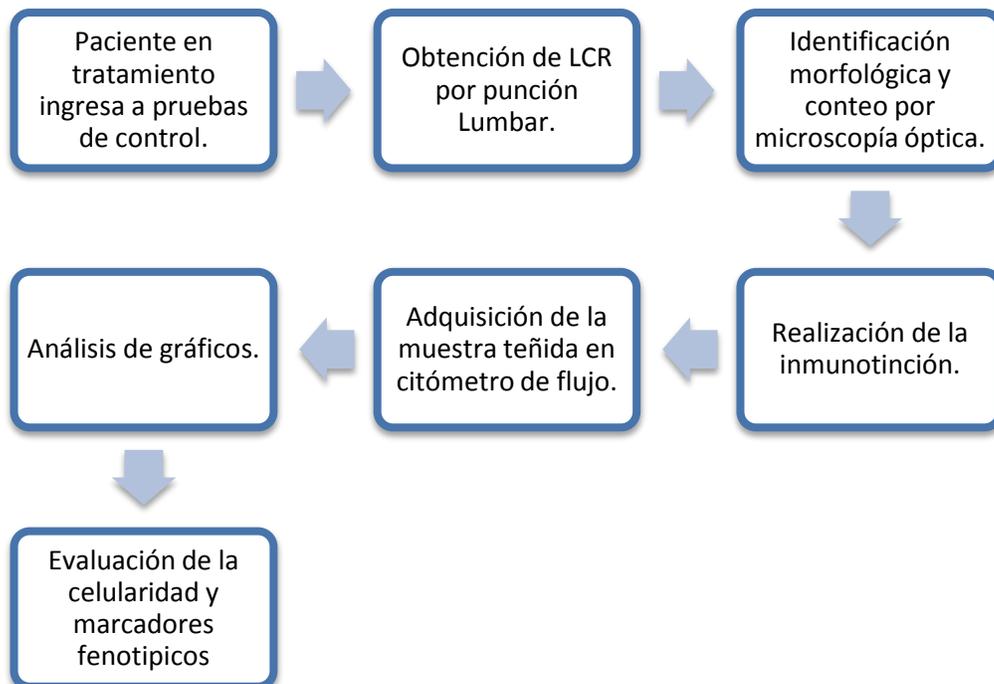
5.3 MUESTRA BIOLÓGICA

Se incluyeron 31 muestras de LCR de pacientes pediátricos y adultos con diagnóstico de leucemia que ingresaron al servicio de oncología durante el periodo de enero - septiembre de 2014.

5.4 DISEÑO DEL ESTUDIO

Transversal, experimental

5.5 ESQUEMA DE TRABAJO



5.6 RECOLECCION DEL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO (LCR)

Las muestras de LCR fueron obtenidas mediante punción lumbar entre las vértebras L3 y L4, bajo anestesia general en los niños y anestesia local en los adultos. La muestra se depositó por goteo en tubos de vidrio estériles con taparroscas de capacidad de 5 mL. Se recolectaron alrededor de 40 gotas (aprox. 2 mL) por muestra y se enviaron al área de laboratorio para determinación morfológica y bioquímica.

5.7. RECUENTO CELULAR

La muestra de LCR se homogenizó de manera suave para evitar lesionar las células, posteriormente se tomaron 10 μ L con pipeta automática, punta estéril y se en cámara de Cova nueva. Luego se analizó en microscopio óptico con objetivo 40X identificando y contando la cantidad de leucocitos y eritrocitos. Los casos positivos se consideraron cuando se encontró ≥ 5 células/ μ L.

5.8 ANÁLISIS MORFOLÓGICO.

1. La muestra de LCR se centrifugó a 1200 rpm durante 5 min. Se decantó el sobrenadante y se obtuvo el botón celular, el cual se resuspendió en aproximadamente 50 μ L y se colocó una gota gruesa en portaobjetos. Se dejó evaporar a temperatura ambiente y se tiñó con colorante de Wright. Luego, se realizó la cuenta diferencial en el microscopio óptico en objetivo

de inmersión a 100X. La presencia de blastos identifica los pacientes con infiltración leucémica al sistema nervioso central (SNC).

5.9 ANÁLISIS DEL LCR POR CITOMETRÍA DE FLUJO

La muestra de LCR para análisis por citometría se recolectó por tres procedimientos distintos:

a) Se obtuvo una alícuota de la muestra proporcionada para análisis citoquímico, y se transfirió a tubo Eppendorf estéril que contenía 1 mL de medio de cultivo celular MEM Eagle sin L-glutamina con amortiguador HEPES 25 mM y bicarbonato de sodio (In vitro, S.A México, DF.). Se colocó en un contenedor con hielo y se transportó al laboratorio clínico para su análisis por citometría de flujo.

b) Se obtuvo una parte del botón celular utilizado para el análisis morfológico, colocándolo en tubo Eppendorf como se describe en el apartado "a" y se transportó para su análisis por citometría de flujo igual que en el apartado "a".

c) La muestra de LCR se obtuvo directamente de la punción lumbar, se recolectó aproximadamente 1 mL (20 gotas) por goteo en tubo de vidrio estéril con tapón que contenía 1mL de medio de cultivo celular RPMI 1640 con 200 mM L-glutamina, 25 mM de glucosa, 15 mM HEPES y bicarbonato de sodio . Se colocó en hielo y se transportó para su análisis como se describe en el apartado "a".

5.10 CARACTERIZACIÓN CELULAR

Para realizar la caracterización se estableció el siguiente protocolo:

a)

Se colocó aproximadamente 0.5 mL de LCR en tubo que contenía 1 mL de medio de cultivo MEM Eagle sin L-glutamina con amortiguador HEPES 25 mM y bicarbonato de sodio (In vitro, S.A México, DF.). Después se centrifugó a 1200 rpm durante 5 min. Luego se eliminó el sobrenadante con pipeta pasteur o automática dejando 50 μ L de sobrenadante y se adicionó 300 μ L de PBS. Posteriormente se dividió la muestra en alícuotas de 150 μ L en dos tubos rotulados como "A" y "B" y después se tiñeron como se describe a continuación:

"A": 4 μ L CD5 FIT-C, 4 μ L CD14 PE y 3 μ L CD19 Per CP

"B": 4 μ L CD15 FIT-C, 4 μ L CD38 PE y 3 μ L CD45 Per CP

Después se incubaron en obscuridad a temperatura ambiente durante 20 min y luego se adicionaron 500 μ L de PBS a cada uno. Posteriormente se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos y se decantaron con pipeta automática. Por último se resuspendieron con 250 μ L de PBS y se adquirieron en el citómetro.

b) Se realizó el mismo procedimiento como se describe en el apartado “a” pero se omitió la inmunotinción, para identificar la inespecificidad antígeno-anticuerpo.

c) Se utilizó el mismo procedimiento como se describe en el apartado “a” pero para la adquisición en el citómetro se usaron perlas calibradoras, para descartar el efecto posible de las alteraciones celulares.

d) Se utilizó el mismo procedimiento como se describe en el apartado “a,” pero se sustituyó el medio de cultivo celular MEM por RPMI 1640 suplementado con 200 mM L-glutamina, 25 mM de glucosa, 15 mM HEPES y bicarbonato de sodio, suero humano al 5%, vancomicina. Se tiñó la muestra en el tubo “A” con el panel de anticuerpos: CD5-FITC (4 μ L), CD14-PE (4 μ L) y CD19-PerCP (3 μ L); el tubo “B” se usó como control o blanco, por lo que se omitieron los anticuerpos.

e) El procedimiento se realizó como en “d”, pero se usó CD45- PerCP (4 μ L) y se adicionó con solución de lisis de glóbulos rojos (FACS lysis solution, Becton Dickinson) al final de la inmunotinción, como lo describe el fabricante.

f) El procedimiento realizado fue como en “d” pero se utilizó solución de PBS al 5% de albúmina sérica bovina, para las incubaciones de los anticuerpos y lavados celulares.

5.11 ADQUISICIÓN Y ANÁLISIS DE GRÁFICOS

Las muestras fueron adquiridas y se analizaron como se describe a continuación:

1) Se adquirieron en el Citómetro de Flujo FACSCalibur como mínimo 1000 eventos presentes en las muestras de LCR; se estableció un límite de 10,000 eventos por cada tubo o dada la baja celularidad, se adquirió la muestra hasta que se agotó. Se usó el programa CellQuest pro (Becton Dickinson, Franklin Lakes, Estados Unidos) para el análisis de gráficos. Cada tubo del panel de anticuerpos empleados generó 6 gráficos de puntos diferentes. Una vez adquirida la muestra, se realizó el análisis de los gráficos de puntos como se describe a continuación:

1) El gráfico de puntos de la figura 12 A y B nos muestran las células adquiridas, según tamaño (FSC) y complejidad (SSC) de la célula. A partir de este gráfico se seleccionó la región 1 (R1), donde se localizó al complejo de células de interés.

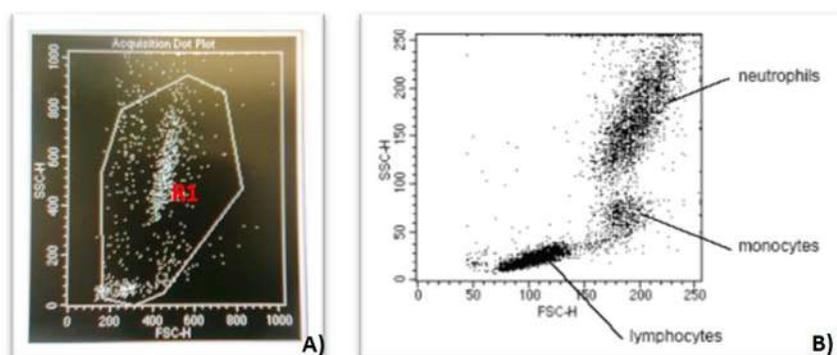


Figura 12.- Plot de adquisición de células leucémicas. A) Distribución celular de las poblaciones leucocitarias B) Representación esquemática (tomado de ilustraciones de manuales Becton Dickinson®)

2) La figura 13 se graficó tomando como base la región R1, cada “dotplot” o gráfico de puntos se evaluó de manera que se identificara de acuerdo a la expresión de las moléculas marcadas con anticuerpos en función del tamaño y complejidad que presentaron. De este gráfico se selecciona la región 2 (R2), la cual identifica a las posibles células leucémicas presentes en la muestra.

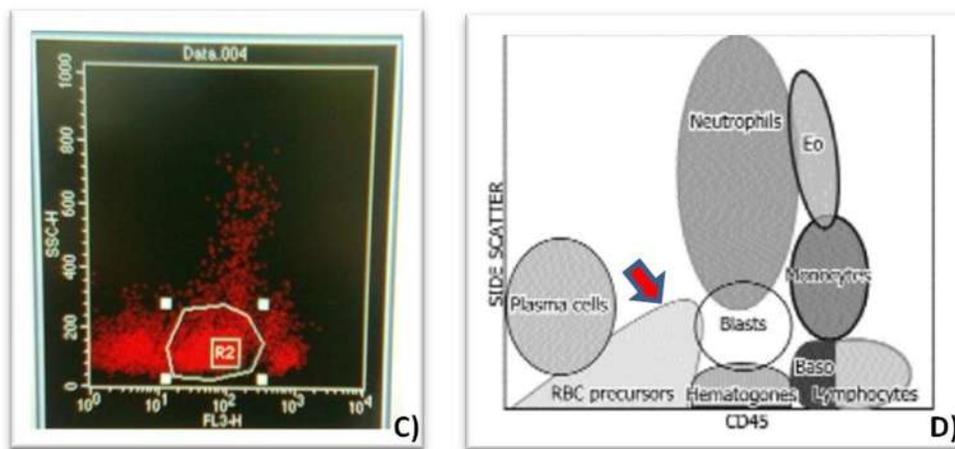


Figura 13.- Identificación de los blastos. C) Distribución celular de acuerdo a la expresión de CD45 y complejidad celular D) Representación esquemática (tomado de ilustraciones de manuales Becton Dickinson)

3) La figura 14 ilustra la región R2 graficada en cuadrantes, según la expresión de los marcadores antigénicos. Es decir para el detector FL1-PMT observamos el resultado de los antígenos unidos al anticuerpo con fluorocromo FITC y para el detector FL2-PMT se presentan las células que se unieron al anticuerpo marcado con el fluorocromo PE. De los cuadrantes que se observaron, en el caso del ejemplo gráfico (Fig. E): UL nos representa las células positivas únicamente para el marcador CD2 y negativas para CD3. De esta manera se dice que la presencia o ausencia

de las células según el cuadrante es positivo, negativo o doble positivo para el anticuerpo monoclonal.

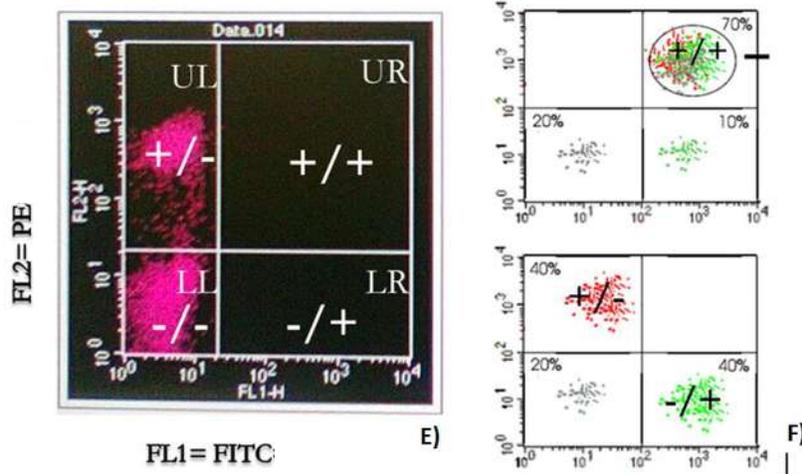


Figura 14.- Plot para determinar el porcentaje de células leucémicas positivas para un marcador (CD). C) Distribución celular en relación a la expresión del marcador antigénico unido al anticuerpo con su respectivo fluorocromo D) Representación esquemática (tomado de ilustraciones de manuales Becton Dickinson®)

6. RESULTADOS

6.1 Objetivo 1

Determinar mediante análisis morfológico del tipo de células en el líquido cefalorraquídeo.

A. Cuenta de células

De las 31 muestras 3 (9.67%) correspondieron a población adulta y 28 (90.3%) a pediátricos.

En 28 de las 31 muestras se contaron por microscopía óptica en fresco; 25 de ellas (89.28%) presentaron en promedio entre 1 y 4 células por mm^3 y se consideraron como negativas. En 3 casos (10.71%) se encontraron 12, 22 y 360 células por mm^3 , y se consideraron positivas para infiltración al sistema nervioso central (SNC). En la tabla 11 se muestra el número de células encontradas y su frecuencia.

Tabla 11. Frecuencia y cuenta celular.

Cuenta de Células		
Células por mm ³	Número de Casos	Positivo/negativo
1	8	Negativo
2	11	Negativo
3	5	Negativo
4	1	Negativo
12	1	Positivo
22	1	Positivo
360	1	Positivo

Cuenta en cámara de Cova, se descartan eritrocitos.

Muestra positiva = >5 cel/mm³

B. Cuenta Diferencial

De los 28 casos que presentaron células, en 25 casos no se observó la presencia de blastos o polimorfonucleares, solamente presentaron linfocitos. Los 3 casos restantes presentaron blastos leucémicos. Las tablas 12 y 13 muestran el conteo diferencial de las muestras designadas como negativas y positivas.

Tabla12. Diferencial de muestras negativas

Muestras Negativas		
Número de casos Negativos	Tipo de Célula	%
25	Linfocitos	100
	Polimorfonucleares	0
	Blastos	0

Tabla 13. Análisis diferencial de muestras positivas

Muestras Positivas			
Tipo de Célula	Caso 1	Caso 2	Caso 3
Linfocitos	52%	92%	96%
Polimorfonucleares	0%	0%	0%
Blastos	48%	2%	4%
Eosinófilos	0%	6%	0%

C. Análisis citoquímico.

Se evaluaron 28 casos (90.32%) por análisis citoquímico. De éstos se encontró que los niveles de proteínas no rebasaron los niveles de referencia en el 100% de los casos. En cuanto a niveles de glucosa se obtuvo en 14 casos (50%) valores debajo del nivel de referencia y 1 caso (3.57%) por encima del valor límite de referencia. Los resultados se esquematizan en la tabla 14 de Resultados de análisis citoquímico e incidencia.

Tabla 14. Resultados de análisis citoquímico e incidencia.

Resultados de análisis citoquímico e incidencia							
	Proteínas			Casos	Glucosa		
	10-19 mg/dL	20-30 mg/dL	>30mg/dL		30-50 mg/d	80-60 mg/dL	>60mg/dL
Casos	17	9	28	14	12	2	

Proteínas

Valor mínimo obtenido = 11mg/dL

Valor máximo obtenido = 99mg/dL

Glucosa

Valor mínimo obtenido = 39 mg/dL

Valor máximo obtenido = 70mg/dL

6.2. Objetivo 2

Evaluación de la celularidad mediante citometría de flujo con diferentes medios de conservación y transporte.

a) Evaluación del procedimiento primordial

Para analizar las características celulares de tamaño (FSC) y complejidad (SSC) por citometría de flujo, las células del líquido cefalorraquídeo (LCR) se procesaron como se describe en el apartado "a" de caracterización celular, encontrando que la población celular se desplazó predominantemente a la izquierda del gráfico de puntos, en donde normalmente se ubica el detritus celular, así como dispersión de puntos en todo el cuadrante, indicando complejos celulares o células en proceso de apoptosis (Figura 15-A). Al evaluar la expresión de CD19, se observó que el 54.90% expresaban el marcador (Fig. 15-B, región 2). Para definir el subtipo de células, se analizó la expresión de CD14 (monocitos) y CD5 (linfocitos) en la población de células CD19 (región 2), encontrando 5.64% y 11.35% de inespecificidad mostrándose en las figuras 15-C y 15-D, respectivamente. La forma de distribución de las células en los gráficos de la figura 15-C, D, E y F son característica de reacción inespecífica (cola de cometa).

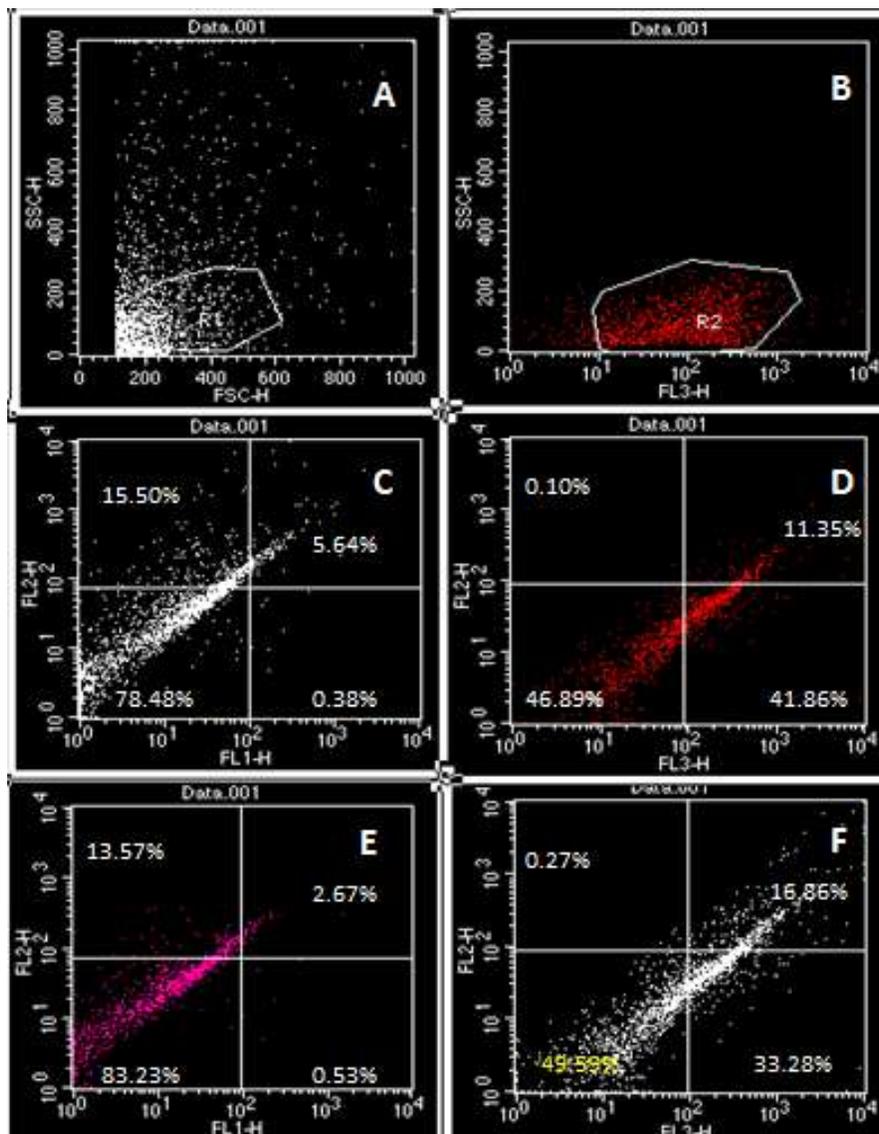


Figura 15. Análisis celular del liquido cefalorraquideo por citometría de flujo (A). Los leucocitos del LCR se tiñeron con los anticuerpos CD5-FITC, CD14-PE y CD19-PerCP. En A se observa la población celular en base a sus características de tamaño y complejidad. En B se observa la expresión de las células teñidas con el flurocromo Per-CP-FL3 (CD-19). En C se presentan las células del cuadrante A, analizando la expresión de las células teñidas con FITC-FL1 (CD5) y PE-FL2 (CD14). En D se analizan las células teñidas con PercP-FL3 (CD19) y PE-FL2 (CD14), previamente seleccionadas en la región 2 de B. En E se determina la expresión de FITC-FL1 (CD5) y PE-FL2 (CD14), seleccionadas de las regiones R1 y R2. En F se presenta la expresión de PerCP-FL3 (CD19) y PE-FL2 (CD14) de la región R1 de A.

b) Evaluación celularidad del sedimento y del tubo.

Para la evaluación celular por citometría, las muestras se procesaron como se describe en "c" del apartado caracterización celular. En la muestra tomada del tubo se observó una dispersión inespecífica, pero una mejor asociación de las células que definió a la población celular (Figura 16-A) en contraste con la figura 17 de la muestra tomada del botón celular, donde se observaron células más dispersas e inespecificidad en su expresión, oscilando entre 15.6 al 22.2%. Asimismo, persiste la distribución celular en forma de cola de cometa en ambos. (Fig. 16 y Fig. 17)

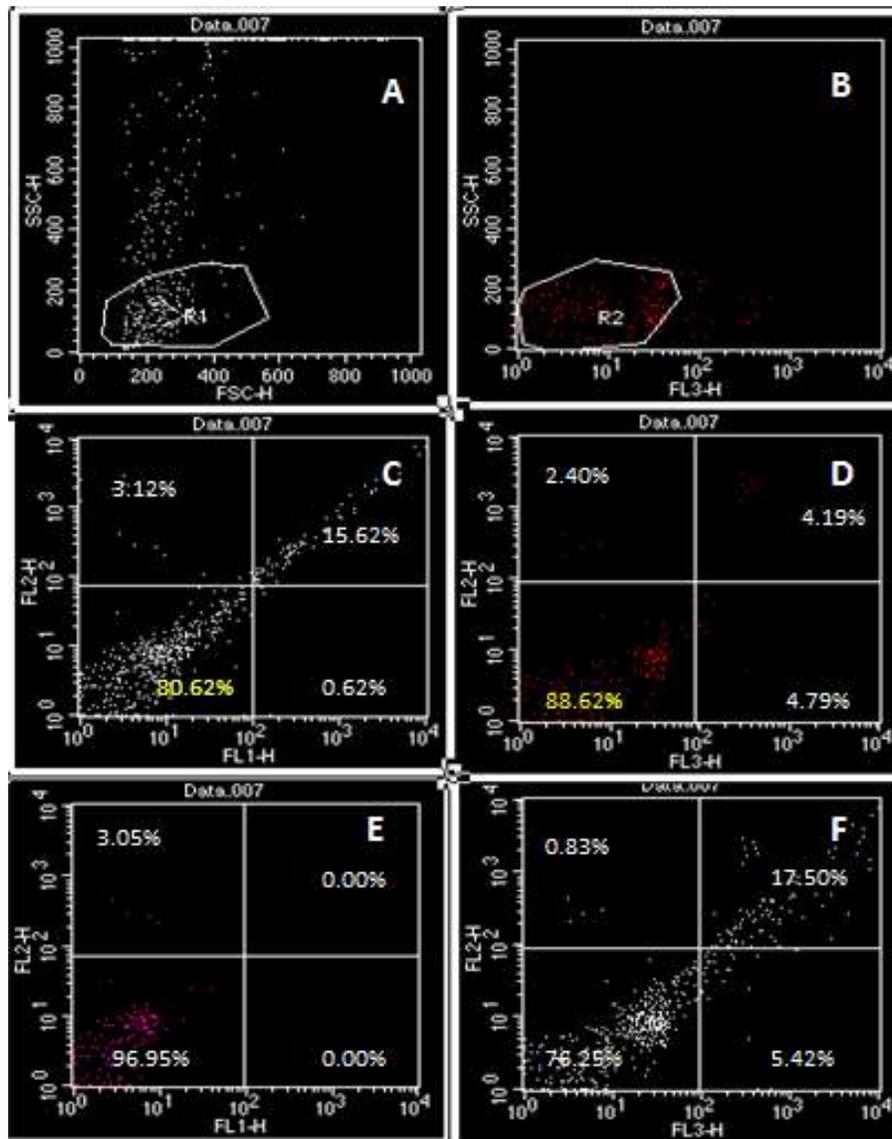


Figura 16. Análisis celular del líquido cefalorraquídeo por citometría de flujo (B). Los leucocitos del LCR se evaluaron sin tinción con anticuerpos, para determinar la autofluorescencia. En A se observa la población celular en base a sus características de tamaño y complejidad. En B se observa la expresión inespecífica para FL3, fuera de la región R2. En C, D y F se observa inespecificidad de las células en los detectores de FL1, FL2 y FL3. En E se determina la expresión de FL1 y FL2, seleccionadas de las regiones R1 y R2.

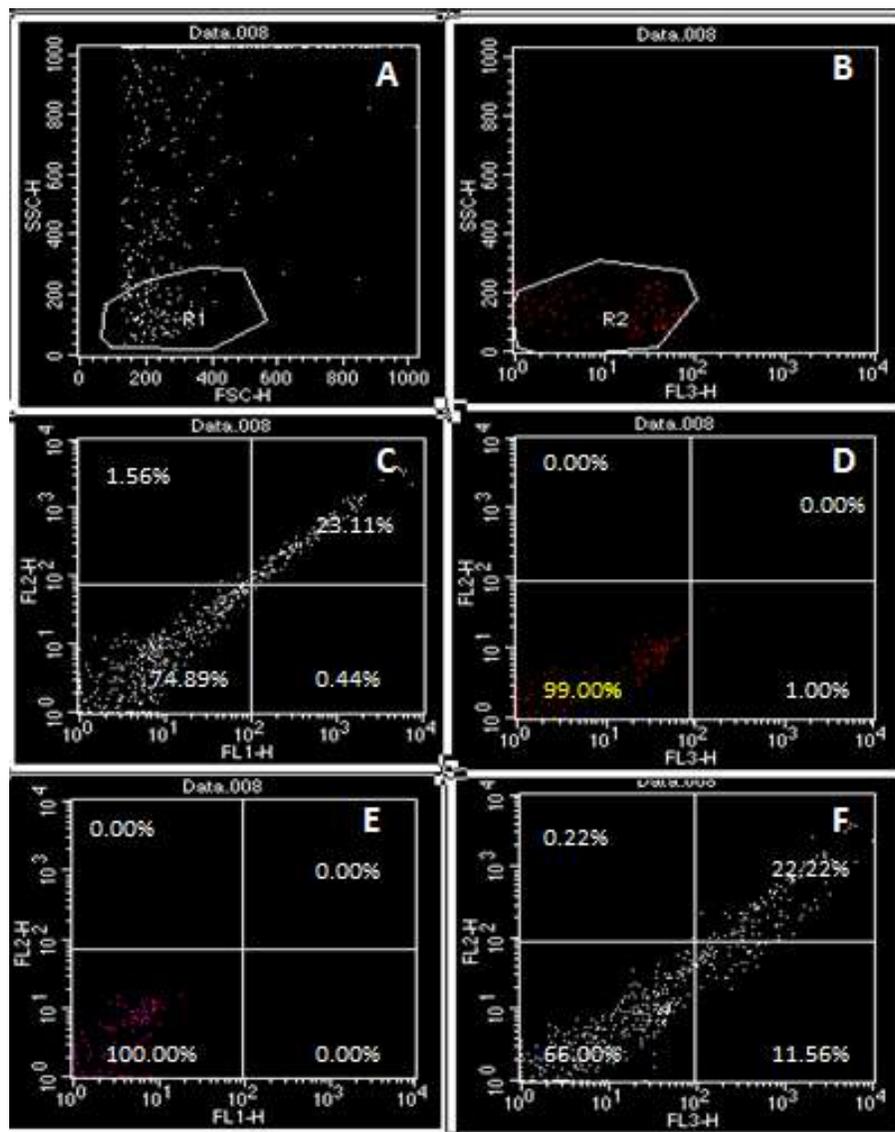


Figura 17. Análisis celular del líquido cefalorraquídeo por citometría de flujo(C). Los leucocitos del LCR de una muestra previamente centrifugada se evaluaron sin tinción con anticuerpos, para determinar la autofluorescencia y el efecto de la centrifugación. En A se observa la población celular en base a sus características de tamaño y complejidad. En B se observa la expresión negativa para FL3, dentro de la region R2 . En C, D y F se observa inespecificidad de las células en los detectores de FL1, FL2 y FL3. En E se determina la expresión de FL1 y FL2, seleccionadas de las regiones R1 y R2.

c) Evaluación inmunotinción CD5 FITC, CD14 PE, CD19 PerCP, LCR obtenido por punción lumbar en medio RPMI 1640.

La muestra fue tomada de la punción lumbar y se procesó como se describe en "d" del apartado "Caracterización celular". En A se obtuvo una importante cantidad de células con tendencia a la izquierda y dispersión difusa. Se observó inespecificidad menor y poblaciones CD 14 (+) con elevado porcentaje en C, D, E y F de la figura 18 obteniendo desde 58.35% hasta un 63.90% para este anticuerpo. Así mismo se observó una agrupación CD 5 (+) en la figura 18-C correspondiente a un 2.4% de la población total y un 1.27% de población positiva para CD19 de la figura 18-F. Por tanto se infirió la presencia predominante de células monocíticas (CD14+), y poblaciones pequeñas de CD5 + y CD 45+ correspondientes a linfocitos de linaje T.

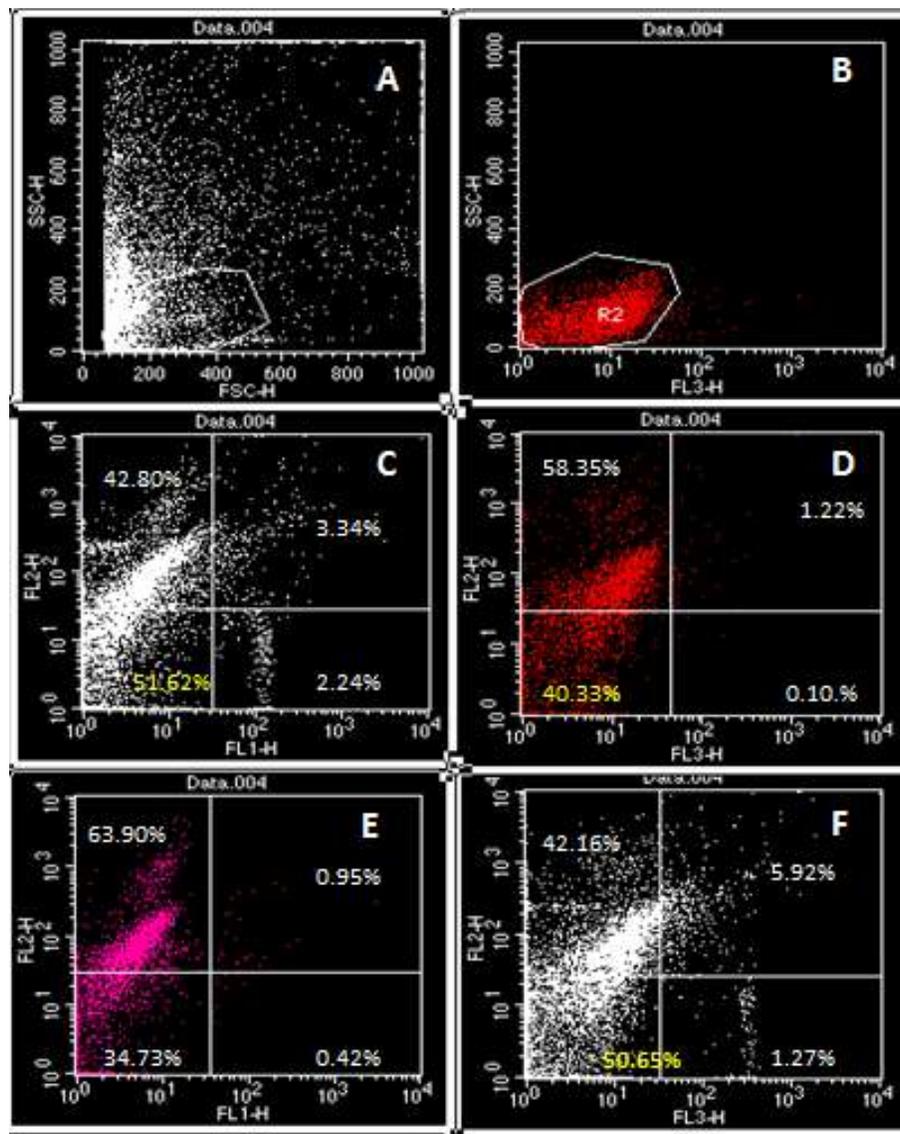


Figura 18. Análisis celular del liquido cefalorraquideo por citometría de flujo (D). Los leucocitos del LCR se tiñeron con los anticuerpos CD5-FITC, CD14-PE y CD19-PerCP. En A se observa la población celular en base a sus características de tamaño y complejidad. En B se observa la expresión de las células teñidas con el fluorocromo Per-CP-FL3 (CD-19). En C se presentan las células del cuadrante A, analizando la expresión de las células teñidas con FITC-FL1 (CD5) y PE-FL2 (CD14). En D se analizan las células teñidas con PercP-FL3 (CD19) y PE-FL2 (CD14), previamente seleccionadas en la región 2 de B. En E se determina la expresión de FITC-FL1 (CD5) y PE-FL2 (CD14), seleccionadas de las regiones R1 y R2. En F se presenta la expresión de PerCP-FL3 (CD19) y PE-FL2 (CD14) de la región R1 de A.

d) Evaluación inmunofluorescencia CD45, muestra obtenida por Punción Lumbar en medio RPMI 1640.

La muestra se tomó de la punción lumbar y se procesó tal y como se describe en “e” del apartado “Caracterización celular”. En la figura 19-A se observa una población bien definida y poca dispersión inespecífica. La población seleccionada en R2 resultó CD45+ (FL3). Y se corroboró por el comportamiento que se observa en las figuras 19-D y F, presentando hasta un 93.95% de positividad para población CD45+. También se encontró que el comportamiento de cola de cometa obtenida en casos anteriores disminuyó considerablemente.

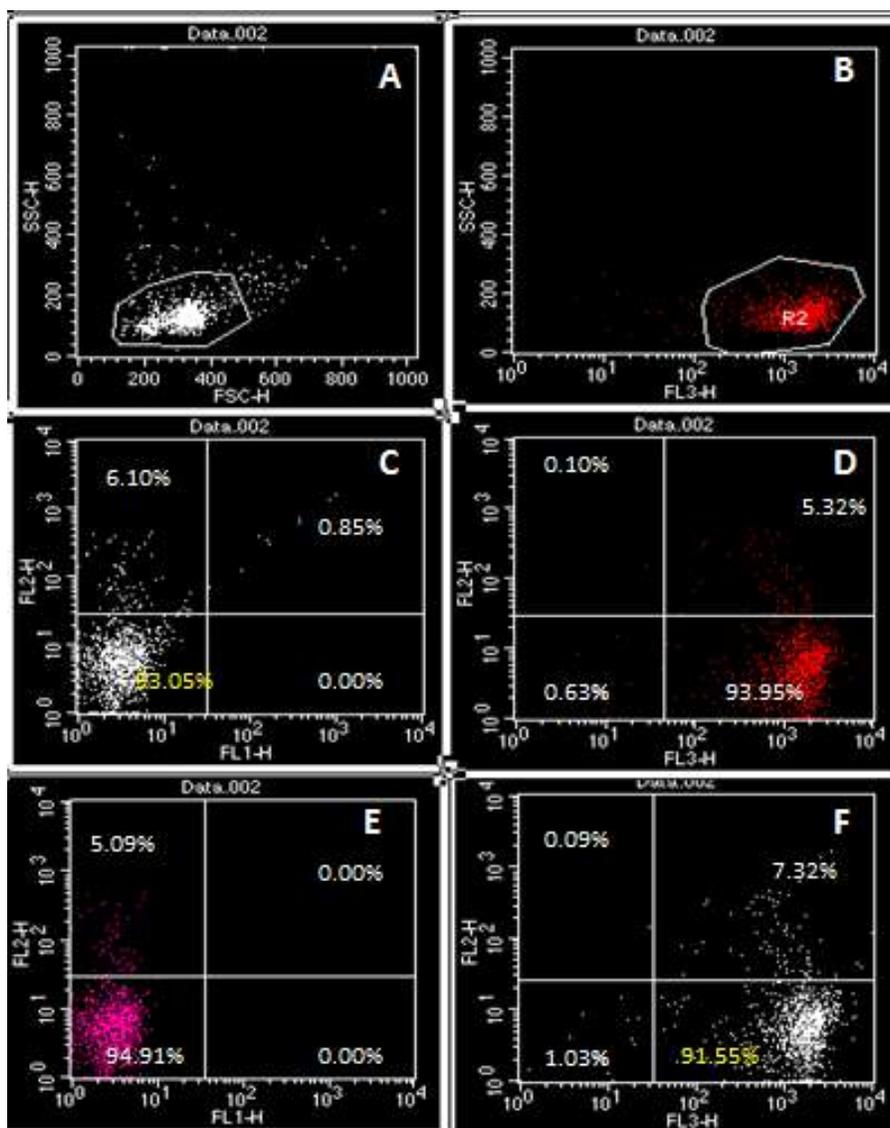


Figura 19. Análisis celular del líquido cefalorraquídeo por citometría de flujo (E). Los leucocitos del LCR se tiñeron con los anticuerpos CD5-FITC, CD14-PE y CD19-PerCP. En A se observa la población celular en base a sus características de tamaño y complejidad. En B se observa la expresión de las células teñidas con el fluorocromo Per-CP-FL3 (CD-19). En C se presentan las células del cuadrante A, analizando la expresión de las células teñidas con FITC-FL1 (CD5) y PE-FL2 (CD14). En D se analizan las células teñidas con PercP-FL3 (CD19) y PE-FL2 (CD14), previamente seleccionadas en la región 2 de B. En E se determina la expresión de FITC-FL1 (CD5) y PE-FL2 (CD14), seleccionadas de las regiones R1 y R2. En F se presenta la expresión de PerCP-FL3 (CD19) y PE-FL2 (CD14) de la región R1 de A.

**e) Evaluación inmunofluorescencia CD5 FITC, CD14 PE CD19 PerCP. PBS
adicionado con albúmina 5%.**

La muestra fue obtenida por punción lumbar y se procesó tal y como se describe en "f" del apartado "Caracterización celular". Como se observa en la figura 20-A, se obtuvieron una cantidad importante de eventos viables seleccionados en la Región R1, así como desplazados hacia la zona de detritus y otros con dispersión inespecífica en todo el cuadrante. En la región R2 de la figura 20-B se obtuvo un 33.40% de eventos negativos para CD45 (FL3). También se observó un alto porcentaje de células CD14 + (FL2) en C, D, E y F de la figura 20; donde el CD14+ de la figura 20-C corresponden a 40.61% del total adquirido y 54,78% de la figura 20-D de la población seleccionada en la región R2. Estas características describen que la población es perteneciente al linaje monocítico.

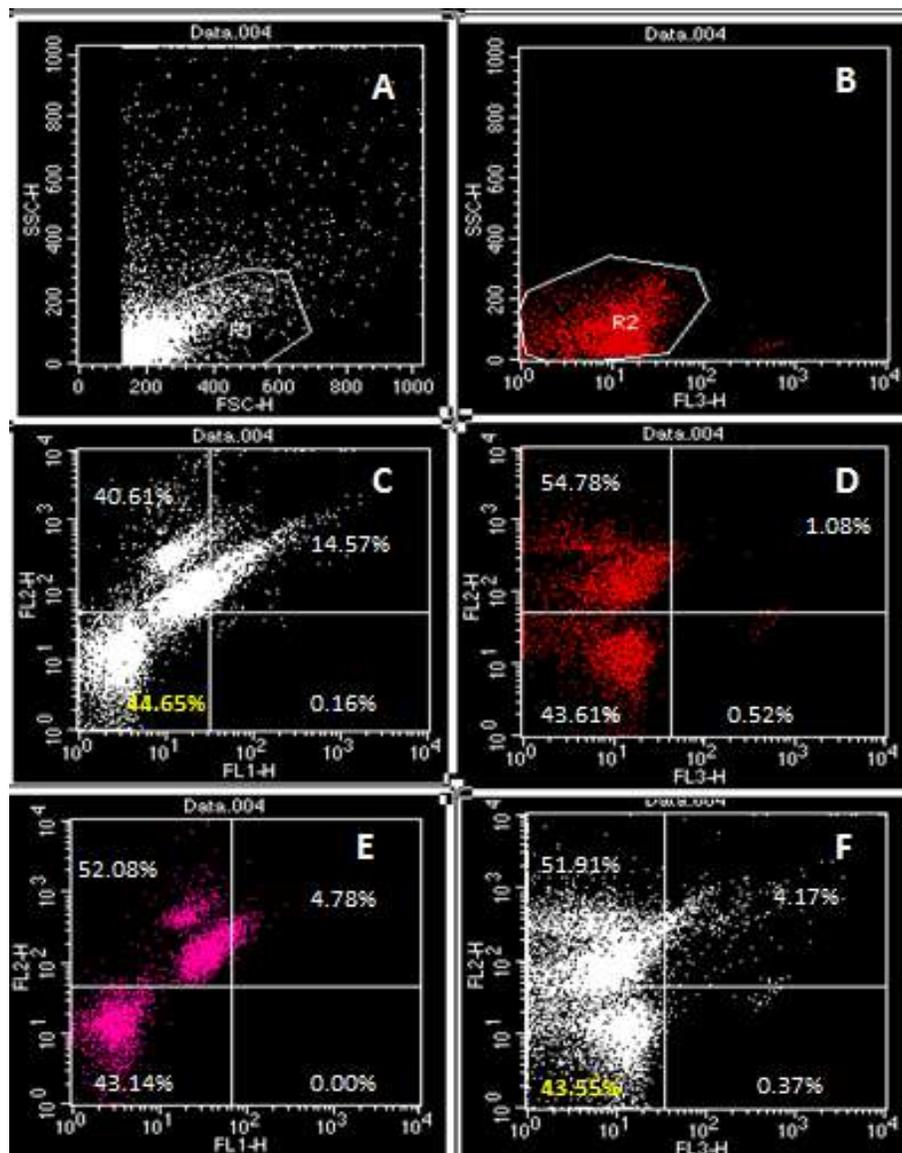


Figura 20. Análisis celular del líquido cefalorraquídeo por citometría de flujo (F). Los leucocitos del LCR se tiñeron con los anticuerpos CD5-FITC, CD14-PE y CD19-PerCP. En A se observa la población celular en base a sus características de tamaño y complejidad. En B se observa la expresión de las células teñidas con el fluorocromo Per-CP-FL3 (CD-19). En C se presentan las células del cuadrante A, analizando la expresión de las células teñidas con FITC-FL1 (CD5) y PE-FL2 (CD14). En D se analizan las células teñidas con PercP-FL3 (CD19) y PE-FL2 (CD14), previamente seleccionadas en la región 2 de B. En E se determina la expresión de FITC-FL1 (CD5) y PE-FL2 (CD14), seleccionadas de las regiones R1 y R2. En F se presenta la expresión de PerCP-FL3 (CD19) y PE-FL2 (CD14) de la región R1 de A.

7. DISCUSION

La cuenta celular del líquido cefalorraquídeo se ha considerado como diagnóstico de infiltración del Sistema Nervioso Central (SNC) en pacientes con leucemia aguda (Gallati y col, 2012). El valor normal sugerido de leucocitos es de <5 células por μL (de Graaf y col, 2011; Hazem y col, 1993). Galati y col, (2012), afirman que la citología convencional aunque es el estándar de oro para la detección de blastos en Líquido cefalorraquídeo (LCR), no es un método de diagnóstico certero, debido a la baja sensibilidad y especificidad que presenta y eso comúnmente se ve reflejado en casos falsos positivos o bien en reportes falsos negativos. En el presente estudio, se realizaron 28 citologías (90.31%) y se logró determinar una correlación entre la cuenta celular con la infiltración en SNC, ya que se encontró que 3 casos (10.71%) con cuentas celulares positivas reportadas, coincidieron con el hallazgo de blastos durante el análisis de la tinción con Wright, mientras que en el resto de las muestras analizadas no se detectaron anomalías.

Por otro lado Glass y col (2013) realizaron autopsias de pacientes con enfermedades hematológicas y encontraron que en 40% de los pacientes que en vida se les reportó citología negativa, presentaban infiltración de blastos en SNC, lo cual sugiere la necesidad de considerar la utilización de técnicas adicionales que aumenten la sensibilidad del estudio del LCR. Por esto, Glantz y col proponen que debe extraerse por lo menos 10.5 mL de LCR y este debe ser procesado inmediato a su extracción para evitar la degradación por acción enzimática y cambios en la presión. Adicionalmente sugieren que si la citología resultase negativa, debe repetirse el procedimiento y que es necesaria la evaluación de otros

parámetros para completar el diagnóstico. En nuestro estudio la citología fue realizada una sola vez, el volumen de muestra obtenido, fue de 1.5 a 2 mL como máximo y el lapso entre la extracción de la muestra y el análisis citológico osciló entre los 10 y 30 min, condición que probablemente influyó en nuestros resultados, ya que además de la poca cantidad de muestra utilizada según estudios de Graaf y col (2011) La cuenta de leucocitos disminuyó rápidamente después de la toma de muestra donde aproximadamente el 50% de la perdida celular se efectúa durante la primera hora.

La citometría de flujo facilita la detección y caracterización de una amplia variedad de células debido a su elevada sensibilidad y especificidad. Los límites de detección de la citometría de flujo en infiltración al SNC por enfermedades hematológicas supera en 86% al análisis citomorfológico convencional y se han encontrado casos de análisis por citometría positivos con reportes de análisis citológicos negativos (de Graaf y col, 2011; Klvisäkk y col, 2003; Galati y col, 2013). Pese a estas observaciones, se considera a la citología convencional parte fundamental e irremplazable en el diagnóstico de infiltración al SNC, por lo que se sugiere el uso de citometría y citología de manera complementaria, aumentando el nivel de detección desde un 17 a un 86%. Por lo anterior y a propósito del presente trabajo se efectuaron distintos procesos con el fin de establecer un método por citometría de flujo que proporcione condiciones favorables a la muestra de LCR y complemente a la citología convencional y por tanto provea una mayor fiabilidad en el resultado. De Graaf y col (2011), propusieron para evitar la pérdida celular la adición de un medio de transporte (RPMI 1640 con HEPES, L-Glutamina, Penicilina/Estreptomicina en suero fetal bovino inactivado por calor y heparina) a la muestra de LCR que funcionó como amortiguador preservando las células por un lapso de

hasta 5 horas con una mínima alteración celular. De manera similar en este estudio, se usaron los medios de cultivo MEM- Eagle (Minimal Escencial Medium Eagle sin L-glutamina con amortiguador HEPES 25 mM y bicarbonato de sodio In vitro, S.A México, DF.) en 16 casos (51.51%) y RPMI 1640 suplementado con 200 mM L-glutamina, 25 mM de glucosa, 15 mM HEPES y bicarbonato de sodio, suero humano al 5% y vancomicina a los 15 casos restantes (48.38%), debido a que la muestra debía ser trasladada al menos 30 min. desde el Hospital infantil de Morelia al HGR No. 1 de Morelia . La preservación de las células mediante el uso de estos medios fue considerable, sin embargo durante su análisis persistió la presencia de detritus celular en cantidades importantes e inmunotinciones inespecíficas, especialmente durante los primeros casos en las muestras conservadas en MEM- Eagle, esta condición se pudo atribuir a que las muestras contenidas en MEM-Eagle fueron obtenidas del tubo usado para análisis morfológico y citoquímico, no como en el caso de las muestras contenidas en RPMI 1640 obtenidas por goteo directamente de la punción lumbar (PL) que supone una menor manipulación y por tanto menor daño; presentando mejores características pero sin excluir cierto porcentaje de inespecificidad y células dañadas. Comparado con estudios realizados por Graaf y col (2011), se observa un comportamiento similar. En las imágenes presentaron un plot de adquisición excluyendo la población no leucocitaria y el detritus con el uso de CD45 PerCP contra la complejidad presentando una porción considerable de detritus tal y como aconteció en nuestro estudio; También los anticuerpos monoclonales que usaron para la caracterización celular fueron similares a los empleados en este trabajo.

A lo largo del estudio se pudo observar en los gráficos de puntos o dotplots, mejoría en el tamaño y complejidad y reducción de la inespecificidad. Esto atribuido a las modificaciones realizadas al método primordialmente

utilizado. Concordando con el estudio de Graaf y col (2011), el uso del medio RPMI mejoró la viabilidad y conservación celular y también se encontró que el uso de solución de lisis de glóbulos rojos (FACS lysis solution, Becton Dickinson), disminuyó el background (ruido de fondo) permitiendo agrupaciones visibles y más definidas. Pese a las mejoras obtenidas, no se podía explicar el comportamiento inespecífico a manera de cola de cometa. Se relacionó este suceso a el uso de Solución básica de fosfatos (PBS) en los lavados durante el tratamiento de la muestra, que probablemente rompía las células por su composición; para ello, se incluyó albumina bovina a la solución PBS sugiriendo que estabilizaría la osmolaridad y tonicidad necesarias para disminuir el daño de las células del LCR y efectivamente se obtuvo una reducción considerable de la inespecificidad en contraste con casos anteriores.

La caracterización de células mediante la citometría de flujo fue efectuada por medio de la utilización de anticuerpos monoclonales, para lo cual se utilizaron anticuerpos monoclonales marcados con los fluorocromos isotiocianato de fluoresceína (FitC) ficoeritrina (PE) y Perinidin chlorophyll Protein Complex (PerCP), con la intención de identificar los distintos linajes contenidos en las muestras de LCR: CD 5 para linfocitos B, CD14 para monocitos, CD11b para granulocitos , CD 19 para linfocitos B y CD45, que según Lacombe y col (1997), este marcador permite discriminar blastos leucémicos de células residuales normales y excluirlas del análisis fenotípico. Para el anticuerpoCD11 no obtuvo un resultado satisfactorio debido a que se usó en muestras que expresaron alta inespecificidad y no fue evaluado en análisis posteriores. Con el uso de estos anticuerpos se pudieron identificar células de linaje linfocítico y monocítico de manera satisfactoria.

Según Deisenhammer y col (2006) El valor citoquímico de glucosa y proteínas en patologías denominadas en general como metástasis leptomeníngea mantienen una relación proteína por encima de los valores normales y glucosa por debajo del valor de referencia. En este trabajo se encontraron 14 casos en los que se encontró la glucosa por debajo del nivel de referencia pero que no cumplían la relación antes mencionada; solo se halló un caso con esta relación y que además tuvo cuenta celular positiva y blastos hallados en la tinción con Wright.

8. CONCLUSIONES

- ◆ El uso de medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 200 mM L-glutamina, 25 mM de glucosa, 15 mM HEPES y bicarbonato de sodio, suero humano al 5% y vancomicina , disminuye el daño por factores físicos extrínsecos y aumenta el tiempo de viabilidad celular suficientemente para su análisis.
- ◆ El uso de la citometría de flujo con anticuerpos monoclonales, identifica a las células del LCR, linfocitos T, monocitos, linfocitos B, respectivamente.

9. PERSPECTIVAS

El empleo de los anticuerpos monoclonales utilizados en este estudio, sirvió como un filtro primario para la identificación de linajes celulares, linfocíticos y monocíticos. El panorama y caracterización celular pueden ser ampliados con la instauración de diversos paneles de anticuerpos monoclonales para una mejor identificación de las poblaciones celulares en el LCR, aludiendo a la importancia que representa esta caracterización no solo en enfermedades hematológicas, sino en diversas patologías que afectan al SNC.

Es necesario un seguimiento del método propuesto y la búsqueda de factores que mejoren las condiciones de la muestra, así como la implementación en los análisis de rutina de laboratorio, complementando el diagnóstico por citomorfología.

El uso de la citometría de flujo en conjunto con análisis inmunofenotípicos y moleculares del LCR proporcionaría una herramienta diagnóstica importante para el manejo y atención terapéutica del paciente, permitiría una visión más concreta del tipo de clona que afecta al SNC y la posibilidad de la instauración de un tratamiento personalizado y dirigido. Además abriría la posibilidad de nuevos estudios acerca de esta condición, permitiendo la caracterización, clasificación y tratamiento de acuerdo al tipo de leucemia, agresividad, clínica del paciente, etc.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Abbas, A. K., Lichtman, H., & Pillai, S. (2012). *Inmunología celular y molecular* (7th ed.). El sevier.
2. Affymetrix eBioscience. (2012). *Hematopoiesis from Pluripotent Stem Cell*. Retrieved March 2, 2014, from <http://www.ebioscience.com/resources/pathways/hematopoiesis-from-pluripotent-sem-cells.htm>
3. Asgarian Omran, H., Shabani, M., Shahrestani, T., Sarafnejad, A., Khoshnoodi, J., Vossough, P., ... Shokri, F. (2007). Immunophenotypic Subtyping of Leukemic Cells from Iranian Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia: Association to Disease Outcome. *Iran.J.Immunol*, 4(1), 15–25.
4. Baba Y, Pelayo R, Kincade PW. Relationships Between hematopoietic stem cells and lymphocyte progenitors. *Trends Immunol* 2004; 25: 645-649•
5. BENNETT, J. M., CATOVSKY, D., DANIEL, M. T., FLANDRIN, G., GALTON, D. A. G., GRALNICK, H. R., & SULTAN, C. (1985). Proposed Revised Criteria for the Classification of Acute Myeloid Leukemia A Report of the French-American-British Cooperative Group. *Annals of Internal Medicine*, 103(4), 620–625. doi:10.7326/0003-4819-103-4-620
6. Bhandoola A, Sambandam A, Allman D, Meraz A, Schwarz B. Early T lineage progenitors: new insights, but old questions remain. *J Immunol* 2003; 171: 5653-5658

7. *BioLegend Cell Markers*. (2013). BioLegend. Retrieved DEC 08, 2014, from https://www.biolegend.com/cell_markers
8. Bloom B & Spits H. 2006. Development of human lymphoid cells. *Annu Rev Immunol* 2006; 24: 287-320
9. Buitrón-Santiago, N., Arteaga- Ortiz, L., Rosas- López, A., Aguayo, Á., López- Karpovitch, X., & Crespo-Solís, E. (2010). Experiencia del INCMNSZ en pacientes adultos con leucemia mieloide aguda. Cohorte 2003-2008. *Revista de Investigación Clínica*, 62(2), 100–108.
10. Busslinger M. Transcriptional control of early B Cell development. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 55-79
11. Campbell, M. & Alfaro, J. (2005). Cap.12 Leucemias Agudas. En "Hematología Fisiopatología y Diagnóstico (pp. 299 - 319) Talca, Chile: Editorial Universidad de Talca.
12. Coronel Morán, R. del C. (2005). Importancia del laboratorio en el diagnóstico y pronóstico de leucemia aguda linfoblástica de la infancia. *Acta Pediatr Méx*, 26(3), 129–136.
13. Coustan-Smith, E., Sancho, J., Behm, F. G., Hancock, M. L., Razzouk, B. I., Ribeiro, R. C., Campana, D. (2002). Prognostic importance of measuring early clearance of leukemic cells by flow cytometry in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 100(1), 52–58. doi:10.1182/blood-2002-01-0006
14. Cuneo, A., Ferrant, A., Michaux, J. L., Boogaerts, M., Demuynck, H., Orshoven, A. V., Hernandez, J. (1995). Cytogenetic profile of minimally differentiated (FAB M0) acute myeloid leukemia: correlation with clinicobiologic findings [see comments]. *Blood*, 85(12), 3688–3694.

15. de Graff, M., de Jongste, A., Kraan, J., Boonstra, J., Smitt, P. & Gratama, J. (2011), Flow Cytometric Characterization of Cerebrospinal Fluid Cells. International Clinical Cytometry Society, 80B, pp. 271 - 281
16. Diverio, D., Pandolfi, P., Rossi, V., Biondi, A., Pelicci, P., & Lo-Coco, F. (1993). Monitoring of treatment outcome in acute promyelocytic leukemia by RT-PCR. *Leukemia*, 8 Suppl 2, S63–5.
17. Dorantes-Acosta, E., Medina-Sansón, A., Dávila-Rodríguez, M. I., & López-Martínez, B. (2013). Clasificación inmunológica de las leucemias agudas linfoblásticas del Hospital Infantil de México Federico Gómez, de acuerdo al EGIL (European Group for the Immunological Classification of Leukemia). *Gaceta Mexicana de Oncología*, 12(3), 136–142.
18. Erber. (2010). *Diagnostic Techniques in Hematological Malignancies*. Cambridge University Press.
19. Fajardo-Gutiérrez, A., Juárez-Ocaña, S., González-Miranda, G., Palma-Padilla, V., Carreón- Cruz, R., & Mejía Aranguré, J. M. (2007). Incidencia general y específica de cáncer en niños derechohabientes del IMSS. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, 45(6), 579–592.
20. Galati, D., Di Noto, R. & Del Vecchio, L. (2013), Diagnostic strategies to investigate cerebrospinal fluid involvement in haematological malignancies. *Leukemia Research*, 37, pp. 231 - 237
21. Gallegos-Arreola, M. P., Borjas-Gutiérrez, C., Zúñiga- González, G. M., Figuera, L. E., Puebla-Pérez, A. M., & García-González, J. R. (2013). Pathophysiology of Acute Lymphoblastic Leukemia. In J. M. Mejía-Arangure (Ed.), *Clinical Epidemiology of Acute Lymphoblastic Leukemia - From the Molecules to the Clinic*. InTech. Retrieved from <http://www.intechopen.com/books/clinical-epidemiology-of-acute->

lymphoblastic-leukemia-from-the-molecules-to-the-clinic/pathophysiology-of-acute-lymphoblastic-leukemia

- 22.** Galy A, Travis M, Cen D, Chen B. Human T, B, Natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity* 1995; 3: 459-473
- 23.** Gerardo Collino, C. J., Rodríguez, C., Sastre, D., Heller, V., & Fernández, E. (2006). Utilización estratégica de CD45 en la identificación de células blásticas por citometría de flujo. *Acta Bioquím Clín Latinoam*, 40(2), 173–180.
- 24.** Givan, A. L., Melamed, M. R., & Shapiro, H. (2000). *Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide*. San Jose, CA: Becton, Dickinson and Company.
- 25.** Gómez, A. R. M. (2003). *Atlas de morfología celular, alteraciones y enfermedades relacionadas*. Pontificia Universidad Javeriana.
- 26.** González-Salas, W. M., Olarte-Carrillo, I., Gutiérrez-Romero, M., Montaño-Figueroa, E. H., Martínez-Murillo, C., & Ramos-Peñafiel, C. O. (2012). Frecuencia de leucemias agudas en un hospital de referencia. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, 50(2), 167–171.
- 27.** Galnick, H. R., Galton, D. A. G., Catovsky, D., Sultan, C., & Bennett, J. M. (1977). Classification of Acute Leukemia. *Annals of Internal Medicine*, 87(6), 740–753.
- 28.** Haddad R, Guardiola P, Izac P, Thibault C, Radich J et al. Molecular characterization of early human T/NK and B-lymphoid progenitor cells in umbilical Cord blood. *Blood* 2004; 104: 3918-3926

29. Hirschi, K. K. (2012). Hemogenic endothelium during development and beyond. *Blood*, 119(21), 4823–4827. doi:10.1182/blood-2011-12-353466
30. Hoggatt, J., & Pelus, L. M. (2010). Eicosanoid regulation of hematopoiesis and hematopoietic stem and progenitor trafficking. *Leukemia*, 24(12), 1993–2002. doi:10.1038/leu.2010.216
31. Juárez-Velázquez, R., & Pérez-Vera, P. (2012). Citometría de flujo en la evaluación de enfermedad mínima residual en leucemia linfoblástica aguda. *Acta Pediatr Mex*, 33(4), 198–206.
32. Kivisakk, P., Mahad, D., Callahan, M., Trebst, C., Tucky, B., Wei, T., et al. (2003), Human cerebrospinal fluid central memory CD4+ T cells: Evidence for trafficking through choroid plexus and meninges via P-selectin. *PNAS*, 100 (14), pp. 8389 - 8394
33. Konopleva, M., Tabe, Y., Zeng, Z., & Andreeff, M. (2009). Therapeutic targeting of microenvironmental interactions in leukemia: mechanisms and approaches. *Drug Resistance Updates : Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*, 12(0), 103–113. doi:10.1016/j.drug.2009.06.001
34. Lane, S. W., Scadden, D. T., & Gilliland, D. G. (2009). The leukemic stem cell niche: current concepts and therapeutic opportunities. *Blood*, 114(6), 1150–1157. doi:10.1182/blood-2009-01-202606
35. Lawal, R. A., & Calvi, L. M. (2011). The Niche as a Target for Hematopoietic Manipulation and Regeneration. *TISSUE ENGINEERING: Part B*, 17(6), 415–422.
36. Machado, N. P., Téllez, G. A., & Castaño, J. C. (2006). Anticuerpos monoclonales: desarrollo físico y perspectivas terapéuticas. *Infectio*,

- 10(3). Retrieved from
<http://www.revistainfectio.org/site/portals/0/ojs/index.php/infectio/articloe/view/174>
- 37.** MacLean, A. L., Celso, C. L., & Stumpf, M. P. H. (2013). Population dynamics of normal and leukaemia stem cells in the haematopoietic stem cell niche show distinct regimes where leukaemia will be controlled. *Journal of The Royal Society Interface*, 10(81), 20120968. doi:10.1098/rsif.2012.0968
- 38.** Mahmoud, H., Rivera, G., Hancock, M., Krance, R., Kun, L., Mehm, F., et al. (1993), Low leukocyte counts with blast cells in cerebrospinal fluid of children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 329 (5), pp. 314-319
- 39.** Mayani, H., Flores-Figueroa, E., Pelayo, R., Montesinos, J. J., Flores-Guzmán, P., & Chávez-González, A. (2007). Hematopoyesis. *Cancerología*, 2, 95–107.
- 40.** McKenzie, S. B. (2009). *Hematología Clínica* (2a ed.). México: Manual Moderno.
- 41.** Mejía Aranguré, J. M., Ortega Álvarez, M. C., & Fajardo Gutiérrez, A. (2005). Epidemiología de las leucemias agudas en niños. Parte 1*. *Rev Med IMSS*, 43(4), 323–333.
- 42.** Mejía-Aranguré, J. M., Fajardo-Gutiérrez, A., Bernáldez-Ríos, R., Paredes-Aguilera, R., Flores-Aguilar, H., & Martínez-García, M. del C. (2000). Incidencia de las leucemias agudas en niños de la ciudad de México, de 1982 a 1991. *Salud pública de México*, 42(5), 431–437.

43. Muñoz Marín, L. (2005). *Aportación del Análisis inmunofenotípico en la caracterización de la leucemia aguda y la identificación de subgrupos moleculares*. (Doctoral). Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona España.
44. Neame, P. B., Soamboonsrup, P., Browman, G. P., Meyer, R. M., Benger, A., Wilson, W. E., ... McBride, J. A. (1986). Classifying acute leukemia by immunophenotyping: a combined FAB- immunologic classification of AML. *Blood*, 68(6), 1355–1362.
45. Novoa, V., Núñez, N. A., Carballo, O. G., & Lessa, C. F. (2013). Inmunofenotipos aberrantes en leucemias agudas en una población hospitalaria de Buenos Aires. *Medicina (Buenos Aires)*, 73(1), 9–16.
46. Oreskovic, D. & Klarica, M., The formation of cerebrospinal fluid: nearly a hundred years of interpretations and misinterpretations. "Brain Research Reviews, 64 (2). pp. 241 – 262
47. Ortega Sánchez, M. A., Osnaya Ortega, M. L., & Rosas Barrientos, J. V. (2007). Leucemia linfoblástica aguda. *Med Int Mex*, 23, 26–33.
48. Pui, C.H., Mahmoud, H., Rivera, G., Hancock, M., Sandlund, J., Behm, F., et al. (1998), Early Intensification of Intrathecal Chemotherapy Virtually Eliminates Central Nervous System Relapse in Children With Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood*, 92 (5), pp. 411 - 415
49. Real Academia Española. Diccionario de la lengua española. (2001). Madrid, España. Retrieved from <http://www.rae.es/>
50. Romero, A., & Jiménez, R. M. (2002). Leucemias agudas. *Medicina de Familia*, 3(1), 40–48.

51. Sakka, L., Coll, G. & Chazal, J. (2011), Anatomy and physiology of cerebrospinal fluid. *European Annals of Otorhinolaryngology, Head and Neck diseases*, 128, pp. 309 – 316
52. Sánchez Segura, M., Rivero Jiménez, R., Marsán Suárez, V., Martínez Machado, M., Espinosa Martínez, E., González Otero, A., Hernández Ramírez, P. (2000). Inmunofenotipaje en el diagnóstico de síndromes linfocíticos y mieloproliferativos. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 16(3), 198–205.
53. Saxena, R., & Anand, H. (2008). Flow cytometry in acute leukemia. *Indian J. Hematol. Blood Transfus*, 24(4), 146–150.
54. Scadden, D. T. (2007). The stem cell niche in health and leukemic disease. *Best Practice & Research. Clinical Haematology*, 20(1), 19–27. doi:10.1016/j.beha.2006.11.001
55. Schwarz BA, Sambandam A, Maillard I, Harman BC, Love PE, Bhandoola A. Selective thymus settling regulated by cytokine and chemokine receptors. *J Immunol* 2007; 178: 2008-2017
56. Sevillano-García, M.D., Cacabelos-Pérez, P., Cacho-Gutiérrez, J. (2011), Alteraciones del líquido cefalorraquídeo y de su circulación: hidrocefalia, pseudotumor cerebral y síndrome de presión baja. *Medicine*, 10 (71). pp 4814 - 4824
57. Sison, E. A. R., & Brown, P. (2011). The bone marrow microenvironment and leukemia: biology and therapeutic targeting. *Expert Review of Hematology*, 4(3), 271–283. doi:10.1586/ehm.11.30
58. Soto Cruz, I., Cáceres Cortés, J. R., Mendoza Rincón, J. F., & Weiss Steider, B. (1999). *Las citocinas en la Hematopoyesis y el sistema*

inmunológico: Mecanismos Celulares y Moleculares (Primera.). México: Plaza y Valdés.

59. Terlizzi, R., Platt, S. (2009), The function, composition and analysis of cerebrospinal fluid in companion animals: Part II – Analysis. *The Veterinary Journal*, 180 (1), pp. 15 - 32
60. Valastyan, S., & Weinberg, R. A. (2011). Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms. *Cell*, 147(2), pp. 275–292.
61. Vardiman, J. W., Thiele, J., Arber, D. A., Brunning, R. D., Borowitz, M. J., Porwit, A., ... Bloomfield, C. D. (2009). The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*, 114(5), 937–951. doi:10.1182/blood-2009-03-209262
62. Zwaan, M., & Heuvel-Eibrink, M. M. van. (2011). Pediatric Acute Myeloid Leukemia. In M. Antica (Ed.), *Acute Leukemia - The Scientist's Perspective and Challenge* (pp. 235–277). InTech. Retrieved from <http://www.intechopen.com/books/acute-leukemia-the-scientist-s-perspective-and-challenge/pediatric-acute-myeloid-leukemia>.