



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE MEDICINA

HOSPITAL CENTRAL "DR IGNACIO MORONES PRIETO"

**"EFECTO DE TEMPERATURA Y TIEMPO DE ALMACENAJE DE MUESTRAS
DE LEUCEMIA AGUDA EN EL RESULTADO DEL INMUNOFENOTIPO"**

TESIS QUE PRESENTA:

DRA. JESSICA DE LA VEGA MENDEZ.

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE LA ESPECIALIDAD EN PEDIATRÍA
MÉDICA**

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. MA. DE LOURDES BARANDA CANDIDO

Asesor Clínico

Dra. Cecilia Correa González.

Asesor de Análisis Estadístico

Dr. Roberto González Amaro.

**APOYO TÉCNICO DE LABORATORIO:
QFB MA. VICTORIA RAMIREZ FLORES**

SAN LUIS POTOSÍ, SLP, FEBRERO DEL 2009

**El soporte económico dependió del CO6-FAI-11-9.46 de la UASLP, a través de las
gestiones del Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina
UASLP**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POSOTOSÍ
FACULTAD DE MEDICINA
HOSPITAL CENTRAL "DR IGNACIO MORONES PRIETO"
Departamento de Pediatría

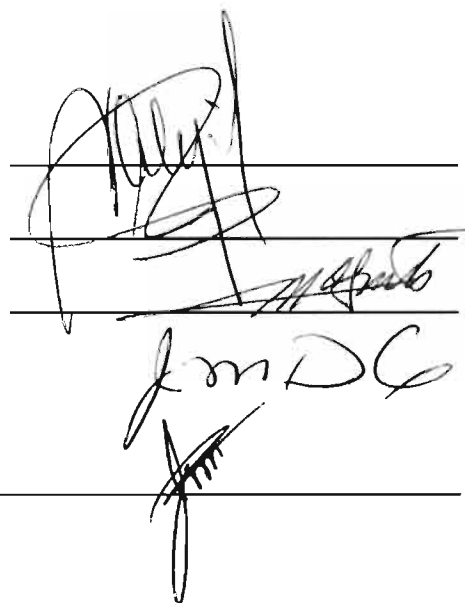
Sinodales:

Dr. Francisco Alejo González.

Dr. Jesús Zermeño Guerra.

Dr. Miguel Ángel Santos Díaz.

JEFE DE LA DIVISIÓN DE PEDIATRÍA
DR José Silvano Medrano Rodríguez



Agradecimientos.

Deseo agradecer la hospitalidad brindada por la magna casa de estudios, la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, que en mi etapa adulta me brindo abrigo.

Agradezco también las enseñanzas y conocimientos proporcionados por los doctores que participaron a lo largo de mi formación primero como medico cirujano y posteriormente en estos tres últimos años de la especialidad de pediatría. Especialmente a la Dra. María de Lourdes Baranda Cándido por sus valiosas aportaciones metodológicas para la realización de esta tesis, sus enseñanzas a lo largo de toda mi formación, su gran calidad humana y su compromiso con la educación.

A mis Padres:

Ing. Pagdo Mallo de la Vega Chávez y Maestra en Educación Margarita Méndez Pineda.

Por el apoyo total e incondicional que siempre me han brindado, por la solida formación que me han proporcionado, por enseñarme a perseverar para alcanzar mis metas.

INDICE

Páginas

1. INTRODUCCION.	4
2. JUSTIFICACION	10
3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	11
4. MATERIALES Y METODOS	11
4.1.Diseño del estudio	11
5. METODOLOGÍA	
5.1.Criterios de inclusión y exclusión	12
5.2.Definición operacional de variables	12
5.3.Recolección de datos	14
5.4.Procesamiento de muestras	14
5.5.Plan de análisis	16
6. ASPECTOS ÉTICOS	17
7. RESULTADOS	18
8. DISCUSIÓN	31
9. CONCLUSIONES	33
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

INTRODUCCIÓN

Las leucemias agudas constituyen el grupo de neoplasias más frecuente en el niño, con 40 nuevos casos anuales por cada millón de niños (hasta los 15 años). De estos el 80% aprox. corresponde a leucemias agudas linfoblásticas (LAL) y el 20% a leucemias agudas mieloblásticas (LAM). La incidencia de LAL es algo mayor en niños entre los 3 y 5 años de edad. La proporción de LAM es mayor en el primer año de vida y en la pubertad. Ambas enfermedades son proliferaciones clonales malignas de células precursoras linfoides o mieloides, en distintos grados de diferenciación, que dan lugar a una invasión de la médula ósea que abarca más del 25% de la celularidad total y e infiltración de hígado, bazo, ganglios linfáticos y otros órganos y tejidos.¹

En otras publicaciones se ha descrito que la leucemia representa el 63% de los cánceres informados en menores de 15 años.²

Para el diagnóstico de las leucemias se requieren de tres tipos de evaluaciones: La evaluación citológica, tanto en sangre periférica como en el aspirado de médula ósea, la evaluación citogenética y por supuesto, la determinación del inmunofenotipo (**IF**) mediante la citometría de flujo.

Los marcadores inmunológicos, al identificar las células por medio de sus características antigénicas, han permitido el estudio de las células hematopoyéticas:

- a) Reconocer estirpes o tipos celulares que difícilmente pueden clasificarse mediante métodos morfológicos y citoquímicos convencionales.
- b) Establecer subgrupos inmunológicos en poblaciones celulares normales y en su contraparte leucémica.
- c) Definir poblaciones celulares con propiedades biológicas específicas.

Por lo tanto, mediante los métodos inmunológicos es posible reconocer antígenos en la membrana o en el citoplasma de las células, algunos de los cuales son específicos para las diferentes líneas celulares.³

El estudio del IF en las células tumorales actualmente se considera una herramienta fundamental para establecer la asignación de linaje de la leucemia aguda y obtener una identificación precisa de los diferentes tipos celulares involucrados, especialmente cuando se trata de una leucemia aguda infantil.

La mayoría de las leucemias son curables, sobre todo, si el diagnóstico y el tratamiento se inician tempranamente. Sin embargo, en los países del tercer mundo donde son más frecuentes estas formas de cáncer no existe el apoyo adecuado para llevar a cabo el análisis inmunofenotípico en el mismo sitio de la toma de muestra. Esto es debido mayormente a que no existe en cada estado de nuestro país un citómetro de flujo ni tampoco los anticuerpos monoclonales que se utilizan para la determinación de la presencia de los diferentes antígenos en las células neoplásicas.⁴

Los antígenos presentes en los precursores de las células hematopoyéticas, así como de las células linfoides, primero aparecen en el citoplasma y posteriormente en la membrana celular. El panel empleado inicialmente para la inmunofenotipificación de las leucemias agudas por citometría de flujo incluía anticuerpos monoclonales (AcMo) que reconocen antígenos de diferenciación de membrana. En años recientes se han sumado AcMo que además reconocen antígenos citoplásmicos o nucleares.⁵

El acMo CD79a identifica a la proteína humana mb-1 de 47 Kd⁶, la cual se demostró que aparece en las etapas muy tempranas de la diferenciación de las células B, precediendo a las cadenas μ citoplásmicas.⁷

Bucheri y cols empleando inmunocitoquímica demostraron que el anticuerpo contra mb-1 citoplásmico era altamente sensible y específico en la identificación de blastos de linaje B. La expresión del CD3 citoplásmico (CD3c) se restringe a células de linaje T y puede ser usado como un marcador diagnóstico para padecimientos malignos de células T inmaduras que no expresan el CD3 en la membrana.⁸

Nguyen y cols demostraron que la citometría de flujo es más sensible que la citoquímica enzimática para identificar mieloperoxidasa citoplásmica (MPOc) en las leucemias de linaje mielóide.⁹

En 1996 se llevó a cabo la primera conferencia latinoamericana de consenso para la tipificación inmunológica de las leucemias, cuyo objetivo fue definir la metodología, que al menor costo posible, no sacrificara la utilidad clínica ni la calidad analítica de los resultados.

En esa conferencia se determinó el empleo de un panel mínimo de 7 anticuerpos para definir a la leucemia aguda linfoblástica de linaje B (LAL b), la leucemia aguda linfoblástica T (LAL T) y la leucemia aguda mieloblástica (LAM).¹⁰

Objetivo	LAL-B	LAL-T	LAM
Definir línea	CD79ac/CD19	CD3c/CD7	MPOc/CD13/CD33
Maduración	CD34/Tdt	CD34/Tdt	CD34/CD15/HLA-DR

Este es el panel mínimo de AcMo que en ese primer consenso demostró mayor concordancia y fue el recomendado para definir la línea y maduración celular.

El diagnóstico de LAL-B, LAL-T o LAM se estableció por la presencia de uno o más de los antígenos asociados a linaje linfóide B, linfóide T y mielóide, respectivamente.

El diagnóstico de leucemia híbrida o de linaje mixto (LALM) se realiza cuando se encuentra la expresión de dos o más antígenos de cada una de las dos estirpes celulares o en la que se demuestra coexpresión de un marcador linfóide y otro mielóide.

Las LAL-B y LAL-T con expresión aberrante son aquellos en donde existe positividad para expresión de un solo antígeno de la línea opuesta o mielóide y LAM con expresión aberrante de un antígeno linfóide.

Mediante la citometría de flujo también es posible determinar el grado de diferenciación de LAL B:

- a) Pre B temprana: Ausencia de expresión de cadenas pesadas μ en citoplasma y de inmunoglobulinas de superficie (Igs)
- b) Pre-B: Presencia de μ citoplásmica pero ausencia de Igs.
- c) Pre B Transicional: Presencia de cadenas pesadas μ de superficie y citoplásmicas y ausencias de cadenas ligeras κ/λ
- d) Células B maduras: Ausencia de cadenas μ citoplásmicas y presencia de Igs.

Esta subclasificación no repercute en los esquemas terapéuticos empleados, sin embargo dentro de los factores pronósticos de las LAL-B se anota al inmunofenotipo, considerándose que el peor pronóstico se asocia con aquellas células B maduras en niños y en adultos, en tanto que el mejor pronóstico se asocia con las de células pre B tempranas, particularmente cuando expresan el CD10.

En el 2005 se realizó un estudio para determinar el valor pronóstico del inmunofenotipo pre B con sus variantes en la respuesta temprana al tratamiento de la leucemia aguda linfoblástica, y se observó una tendencia clínica a mejor respuesta cuando el antígeno CD10 esta

presente, pero no se demostró significancia estadística por lo que el inmunofenotipo pre-B con sus variantes no influyó en la respuesta temprana a la quimioterapia.¹¹

En otros estudios se ha informado que los niños con el subtipo pre B transicional tienen un pronóstico muy favorable.

En diciembre del 2005, se publicó la segunda conferencia latinoamericana en la tipificación inmunológica de las leucemias.⁴ La diferencia principal entre la primera y la segunda conferencia fue que en esta última se reorganizó la utilidad clínica del inmunofenotipo para el diagnóstico, clasificación y monitorización (cambios en la progresión de la enfermedad, evaluación de la respuesta al tratamiento y detección de enfermedad residual mínima) de los pacientes con síndromes mielodisplásicos.

En ese segundo consenso se acordó que los laboratorios que realizaran la inmunotipificación de las leucemias agudas deberían ser capaces de reconocer:

- a) LLA de linaje T
- b) LLA de linaje precursor de células B.
- c) LMA
- d) Leucemias agudas bifenotípicas.

En el caso de LLA de células T se requería la expresión de CD3 citoplásmico y por positividad para por lo menos uno de los siguientes antígenos: CD2 y/o CD7.

El grado de maduración se definió como la presencia de CD34, TdT y la intensidad de la expresión de CD45.

Los marcadores que se encontraron altamente específicos para cada linaje fueron: CD3 para células T, CD19 y CD79a para células B, y mieloperoxidasa para células mieloides.

Estudios previos efectuados en sangre periférica de voluntarios sanos, almacenada a 4°C, muestran que los antígenos de los linfocitos B son estables por lo menos durante 14 días.^{12,13} También se han estudiado muestras de leucemias linfocíticas crónicas que se mantuvieron a bajas temperaturas mostrando persistencia de CD19 y CD45 durante 3 días.¹⁴

Por otra parte, el almacenamiento de células madre a temperatura ambiente, altera la detección de CD34, mientras que a 4°C. la presencia de CD34 no se modifica sustancialmente.¹⁴

Si los antígenos de superficie en células sanguíneas humanas sanas y de leucemias linfocíticas crónicas persisten cuando menos 48-72 horas sin cambios importantes en los antígenos de superficie, es crucial conocer el comportamiento de las leucemias agudas que se presentan con más frecuencia, tienen una mayor posibilidad de cura y afectan a la población pediátrica. De esta manera si el análisis inmunofenotípico de la muestra se retrasa por algún motivo (extravío temporal de la muestra, obtención en un lugar alejado del centro de análisis, etc.) podría ser posible encontrar antígenos específicos de líneas celulares que evitarían traumatizar al paciente para obtener una nueva muestra, además de permitir hacer el diagnóstico y por ende, iniciar tan pronto sea posible el tratamiento del enfermo.

Por lo que el propósito del estudio que planteamos fue evaluar la persistencia de los antígenos que determinan el linaje de la leucemia en muestras de médula ósea y sangre periférica almacenadas a temperatura ambiente por diferentes períodos de tiempo, tratando de igualar las condiciones que sufre una muestra cuando es extraviada o mal transportada ya sea por una compañía de mensajería o por una ambulancia.

JUSTIFICACIÓN

La clasificación por fenotipos inmunológicos tiene especial relevancia en las LAL, y actualmente el estudio de los marcadores celulares se considera un requisito indispensable para corroborar el diagnóstico de la enfermedad. El análisis inmunofenotípico tiene como objetivo el reconocer la estirpe celular y asignar el linaje a la proliferación blástica establecida, así como clasificarla en distintos subtipos y tiene además valor pronóstico. Este estudio permite analizar simultáneamente antígenos citoplásmicos y de membrana, así como tamaño y complejidad de las células neoplásicas. En los países del tercer mundo no existe el apoyo adecuado para llevar a cabo el análisis inmunofenotípico en el mismo sitio de la toma de muestra, debido al alto costo de mantenimiento de la infraestructura necesaria (un citómetro de flujo, diversos anticuerpos monoclonales) y la ausencia de personal entrenado en su manejo y análisis.

Las muestras de los pacientes deben ser enviadas a un centro en donde se lleve a cabo este análisis y esto se hace mediante bolsas refrigerantes, pero las compañías de mensajería entregan los paquetes con las bolsas refrigerantes a temperatura ambiente y días después de que se envió la muestra, y en la mayoría de las veces se requiere volver a puncionar al paciente para la obtención de la misma.

No existen estudios en la literatura que evalúen si una muestra de sangre periférica y medula ósea de un paciente en el que hace el diagnóstico clínico de leucemia todavía es posible analizarla días después de haberse tomado para establecer el linaje de la leucemia.

Es importante determinar si todavía es posible detectar los antígenos de la población leucémica días después de haberse tomado la muestra para evitar más gastos al paciente y hacer una clasificación, pronóstico, tratamiento y seguimiento de los pacientes con leucemia aguda de manera precoz.

OBJETIVOS:

1. Determinar la presencia de los diferentes antígenos de membrana e intracelulares presentes en las células neoplásicas de la muestra al momento de ser obtenida del paciente.
2. Determinar la persistencia de estos antígenos en la muestra mantenida a temperatura ambiente (18 a 25° C) 24, 48, 72, 96 horas dependiendo de la disponibilidad y viabilidad de la muestra.
3. Comparar los valores obtenidos en la primera determinación y en los tiempos subsecuentes.

HIPÓTESIS

- Los antígenos de las células neoplásicas, ya sea presentes en la membrana plasmática o en su interior, permanecen estables días después de haber sido obtenida la muestra mantenida a temperatura ambiente.

MATERIALES Y MÉTODOS

- **Tipo de Estudio:** Prospectivo, longitudinal, comparativo.
- **Lugar de Realización**
 1. Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”
 2. Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
- **Universo de Estudio**
- Muestras de sangre periférica y médula ósea obtenidas de niños con diagnóstico de leucemia aguda, internados en las salas de pediatría del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”.

Criterios de Selección de la Muestra

Criterios de inclusión.

- Paciente de sexo femenino y masculino hasta los 18a de edad.
- Diagnóstico de leucemia aguda

Criterios de exclusión.

- Muestra de sangre o médula ósea con datos de coagulación.
- Muestra de pacientes que fueron previamente tratados con esteroides u otro medicamento para tratamiento de leucemia.

Criterios de eliminación.

- Disponibilidad de muestra (volumen de muestra disponible para efectuar las determinaciones)
- Pacientes en que las determinaciones de laboratorio no se pudieron llevar a cabo, falla en la energía eléctrica o falta de disponibilidad de los anticuerpos.

Cálculo del Tamaño de Muestra Estudiada:

Se analizaron todas las muestras provenientes de pacientes pediátricos con leucemia aguda que lleguen durante un año al departamento de inmunología para estudio de inmunofenotipo.

DEFINICION OPERACIONAL DE LAS VARIABLES.

Variables Independientes:

Temperatura:

Escala de medición de intervalo.

Factor intrasujetos que cuenta con 1 solo nivel, la muestra se mantiene a una temperatura entre 18 y 25gdos C.

Tiempo:

Escala de medición de intervalo.

Factor intrasujetos que cuenta con 5 niveles, día 0 o inicial, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas.

Variables Dependientes:**1) Células positivas para marcadores de leucemias agudas:**

Escala de medición continua, de razón.

Células tumorales leucémicas provenientes de precursores de linfocitos T, B o células mieloblásticas y que dependiendo de la línea celular a la cual pertenezcan, poseen en su superficie los receptores detectados por los anticuerpos monoclonales CD2, CD3, CD4, CD8, CD10, CD13, CD14, CD19, CD20, CD22, CD33, CD34, CD45, CD56, HLA-DR. e IgS (IgM e IgD), y también se encuentran de manera intracelular los siguientes antígenos: CD79a, MPO, TdT.

METODOLOGÍA.

Como antecedente importante podemos comentar que en el Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina, de la UASLP; sitio donde se llevó a cabo el análisis inmunofenotípico; se tienen más de 10 años de experiencia en la tipificación de leucemias. Los datos de los tres años previos a la realización de este estudio lo demuestran: - En el 2005 se analizaron 58 muestras, de las cuales 36 resultaron de pacientes pediátricos: 27 fueron provenientes del hospital central, 7 del IMSS y 2 de hospitales particulares. Durante el 2006 se recibieron en total 47 muestras, 30 muestras de pacientes pediátricos: 22 provenientes del hospital central, 7 del IMSS y 1 de otro hospital. En el año 2007 se recibieron 43 muestras, 27 muestras de pacientes pediátricos: 21 provenientes del hospital central, 4 del IMSS y 2 de otros hospitales.

Muestras de pacientes

Se recolectaron para análisis 69 muestras anticoaguladas de pacientes pediátricos con diagnóstico de leucemia aguda de las cuales 27 (39%) fueron sangre periférica, obtenida mediante venopunción, y 42 (61%) médula ósea obtenida de la cresta ilíaca posterosuperior. Se prefirió la muestra que presentara más del 20% de células anormales de acuerdo a los lineamientos del FAB y el instituto **Nacional de Cáncer** (National Cancer Institute) ⁶

Condiciones de almacenaje

Después de una primera determinación se mantuvo la muestra a temperatura ambiente (entre 18 y 25° C.) y se repitió el análisis a las 24, 48, 72, 96 horas para los antígenos presentes dependiendo de la disponibilidad y viabilidad de la muestra ya que en ocasiones la cantidad obtenida fue escasa, principalmente en muestras de médula ósea.

Detección de antígenos de superficie

El análisis se realizó en las muestra obtenidas directamente no hubo necesidad de separar poblaciones celulares mediante gradiente de centrifugación debido a que no encontramos tejido necrótico, células del estroma o grasa que pudiesen interferir con la interpretación del estudio.

Las muestras se examinaron de la siguiente manera:

1. Después de la evaluación de la viabilidad de la muestra, se ajustará la concentración celular de la misma con buffer de fosfatos a 1×10^6 /ml.
2. De la suspensión celular se tomaron 100 microlitros se colocaron en un tubo de ensaye, un tubo para cada anticuerpo monoclonal marcado con diferentes fluorocromos (fluoresceína, ficoeritrina o PerCP Becton Dickinson San Jose California). Se utilizaron un control de isotipo (control negativo) y anticuerpos en contra de los siguientes antígenos de superficie: CD2, CD3, CD4, CD8, CD10, CD13, CD14, CD19, CD20, CD22, CD33, CD34, CD45, CD56, HLA-DR. e IgS (IgM e IgD)
3. Se dejaron incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad para evitar que los fluorocromos disminuyeran su intensidad.
4. Se les agregó 2 ml de solución lisadora (Facs BD Lysing Solution de Becton Dickinson San Jose California 8 ®), se incubaron durante 15 minutos.
5. Se lavaron con buffer de fosfatos (PBS).
6. Finalmente se resuspendieron en 0.5 ml de PBS.

Detección e antígenos intracelulares

Los puntos 1 y 2 del procedimiento anterior se llevaron a cabo de la misma manera.

La cantidad de muestra para detectar los antígenos intracelulares fue de 120 a 150 microlitros

- Se lisaron y fijaron con 2 ml de solución lisadora, se permeabilizó la membrana celular mediante el uso de una solución de saponina al 0.1% en PBS, Se incubaron durante 20 minutos a 4°C.
- Se retiró el exceso de la solución permeabilizadora mediante centrifugación a 1000 rpm se decantó el sobrenadante y resuspendieron las células, se agregó a cada tubo el anticuerpo a detectar: CD79a, MPO, TdT, y control de isotipo. Se incubarán durante 30 minutos a 4°C en oscuridad.
- Al finalizar el tiempo de incubación se les agregó 0.5 ml de la solución de saponina.

- Las muestras así procesadas se mantuvieron en refrigeración o con hielo hasta que se analizaron en el citómetro de flujo

Citometría de flujo

- El análisis se realizó con un citómetro FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA) con el programa Cell Quest.
- Se identificó la población neoplásica mediante la intensidad de la expresión de CD45, este marcador es de utilidad para propósitos de detectar en las diferentes poblaciones las células inmaduras o blastos. Es importante señalar que las células que expresan CD45 en baja intensidad son células inmaduras⁷
- Las células marcadas fueron electrónicamente seleccionadas por su baja fluorescencia a CD45 para detectar en ellas los diferentes antígenos utilizados en el marcaje.
- Se adquirieron cuando menos 30,000 eventos (células) para cada anticuerpo utilizado. El estadio de maduración de las células se definió en función de la presencia de CD34, HLADR y CD45 low.
- Los resultados se expresaron como porcentaje de células positivas, se registró también la intensidad media de fluorescencia que es un indicador indirecto de la cantidad de moléculas del antígeno que se encuentran en la célula neoplásica.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

- El análisis estadístico se realizó usando el programa GraphPad InStat 3 version3.06.
- Se efectuó un análisis descriptivo de los resultados, así como análisis comparativo de la determinación inicial y la obtenida a las diferentes horas posteriores a la toma de la muestra.
- Se utilizó para esto la prueba de ANOVA de medidas repetidas
- Se realizó el análisis descriptivo (media, desviación estándar) para examinar todas las variables de estudio.
- El análisis de varianza de medidas repetidas se utilizó para los datos recolectados en 5 intervalos de tiempo (basal, 24, 48, 72 y 96 horas) para probar la variabilidad de los antígenos presentes en las células leucémicas que aun resultaban positivas a través del paso del tiempo.

- El uso de ANOVA de medidas repetidas reduce el error e incrementa el poder de análisis en muestras pequeñas. Existe además una correlación entre las medidas a través del tiempo para cada variable porque provienen de la misma muestra.
- La significancia estadística se estableció con valor de $p < 0.05$.

ASPECTOS ÉTICOS:

- Se trató de una investigación en donde se utilizó la misma muestra de sangre que el médico hematólogo obtuvo del paciente para determinar el diagnóstico morfológico e inmunofenotípico de leucemia.
- Esta muestra es enviada de rutina al departamento de Inmunología para determinar el linaje de la leucemia y en base a los antígenos encontrados se decide el abordaje terapéutico a seguir, por lo que prácticamente no implicó ningún riesgo extra para el paciente a la toma de sangre o médula ósea que de cualquier manera se debe tomar para el estudio habitual de la enfermedad y que de otra manera se desecharían como lo marca la Norma Oficial Mexicana NOM-87-ECOL-1995. Sin embargo, dado que la sangre y médula ósea son considerados “tejidos humanos”, se solicitó a los familiares (padres del paciente) que firmaran un consentimiento informado de aceptación para que la muestra pudiera ser utilizada para este estudio.

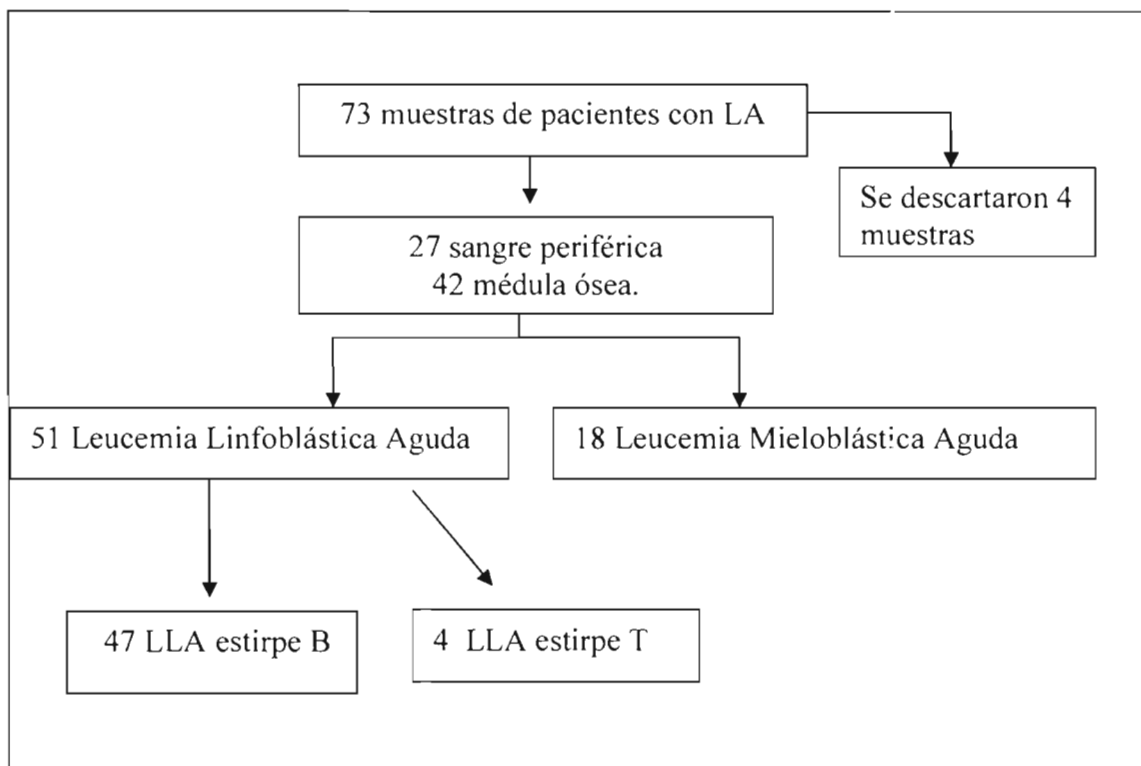
RESULTADOS.

Se analizaron 69 muestras de sangre para realizar el inmunofenotipo según la reactividad a los anticuerpos del panel de cada estirpe celular para leucemias, de las cuales 27 (39%) fueron obtenidas de sangre periférica y 42 (61%) de médula ósea. 51 (74%) de las muestras fueron de leucemia linfoblástica aguda y de estas 47 (92%) de estirpe B y solo 4 (8%) de estirpe T. Las 18 (26%) muestras restantes resultaron ser leucemias mieloblásticas agudas.

Se recibieron cuatro muestras más que no fueron incluidas en el estudio ya que la determinación de viabilidad celular en el primer examen fue muy baja (de 35 a 15%).

Estos pacientes recibieron tratamiento principalmente con esteroides sistémicos a dosis elevadas antes de obtener la muestra.

Se determinaron los diferentes antígenos presentes en las líneas celulares leucémicas de estirpe mieloide y linfoide, tanto de superficie celular (CD13, CD33, CD34, CD19, CD 10, CD 20, CD22, CD2, HLA-DR, CD14, Igs) como intracelulares (Tdt, MPO, cd79a) según el segundo Consenso para la Determinación del Inmunofenotipo de Malignidades Hematológicas.



Cuadro 1. Diagrama de flujo del proceso de recolección de datos para esta revisión

Los antígenos que resultaron positivos de cada muestra de sangre periférica y médula ósea se determinaron nuevamente a las 24, 48, 72 y 96 horas manteniendo la muestra a una temperatura entre 18 y 25° C.

Variable	Basal Media(SD)	24 horas Media(SD)	48 horas Media(SD)	72 horas Media(SD)	96 horas Media(SD)	F/Fr	Pos hoc
CD19	69.8 (18.3)	51.8 (29.1)	32 (29.7)	23.6 (25.5)	17.9 (19.4)	102.86*	1-3, 4, 5 2-4, 2-5 3-5*
CD10	80.3 (13.2)	75.2 (17.7)	71.2 (19.3)	67.6 (23.1)	62.6 (22.9)	59.33*	1-2, 3, 4, 5 2-5, 3-5*
CD20	48.8 (29.5)	41.2 (33.2)	36.9 (34.1)	29.8 (33.3)	24.8 (33.6)	22.53*	1-4, 5 2-5
CD2	55.4 (24.9)	51.2 (23.6)	41.9 (27.6)	17.4 (10.8)	13.8 (10.9)	18.77*	1-4, 1-5*
CD13	77.9 (21.2)	73.4 (21)	63.4 (26)	60.1 (27.6)	56.1 (29.7)	7.56*	1-3, 4, 5 2-5*
CD22	40.4 (5.1)	22.1 (4.6)	10.3 (2.4)	7.8 (2.3)	5 (1)	67.35*	1-3, 4, 5 2-4, 5 3-5*
CD33	75.6 (20.2)	68.1 (23.6)	60 (31.1)	52.7 (36.2)	46.8 (36.9)	6.1*	1-4, 5 2-5*
CD34	62.6 (22.3)	58.5 (25)	48.7 (28)	41.6 (25)	35.4 (25)	33.2*	1-3, 4, 5 2-3, 4, 5 3-5*
HLA DR	77.4 (17.1)	69.1 (22.4)	60.1 (25.2)	51.9 (27.8)	45.8 (29.6)	115.05*	1-3, 4, 5 2-4, 5 3-5*
Tdt	75.6 (13.9)	66.4 (18)	62.8 (23.8)	46 (30.7)	39.4 (30.7)	14.8*	1-4, 5 2-4, 5 3-4, 5*
MPO	64.1 (20.4)	58.8 (24.8)	53.9 (19.7)	53.9 (27.4)	50.5 (25.7)	3.3*	1-5*
CD79a	63 (16.6)	54.8 (23.9)	49.2 (23.9)	37 (29.4)	33.4 (30.6)	8.4*	1-4, 5 2-4, 5*

* $p < 0.05$. *Tabla 1. Permanencia de positividad de los antígenos intra y extracelulares del panel de leucemias a diferente tiempo en muestra de médula ósea.*

La tabla 1 muestra las medias y las desviaciones estándar de los antígenos intracelulares y extracelulares que se obtuvieron de las muestras de médula ósea. Todos los antígenos, como es esperado, van disminuyendo conforme el paso del tiempo, se observa que el número de células que permanecen positivas para cada anticuerpo no es la misma en los 5 diferentes intervalos de tiempo.

Podemos observar que para los antígenos CD19, CD13, CD22, CD34 y HLA DR existe una diferencia significativa entre la medición basal comparada con la medición realizada a las 48 horas.

Para los antígenos CD20, CD2, CD33, TDT y 79a. procedente de muestra de médula ósea se observa una diferencia significativa entre la medición basal con respecto a la medición realizada a las 72 horas.

Para el antígeno CD10 existe una diferencia significativa en la medición basal con respecto a la medición de las 24, 48, 72 y 96 horas.

El antígeno MPO muestra una diferencia significativa con respecto a la determinación realizada a las 96 horas, pero no existe ninguna variación en el número de células que resultan positivas para este anticuerpo en la comparación de la medición basal con respecto a las 24, 48 y 72 horas.

Lo anterior también se puede observar de forma grafica en las figs 1, 2 y 3.

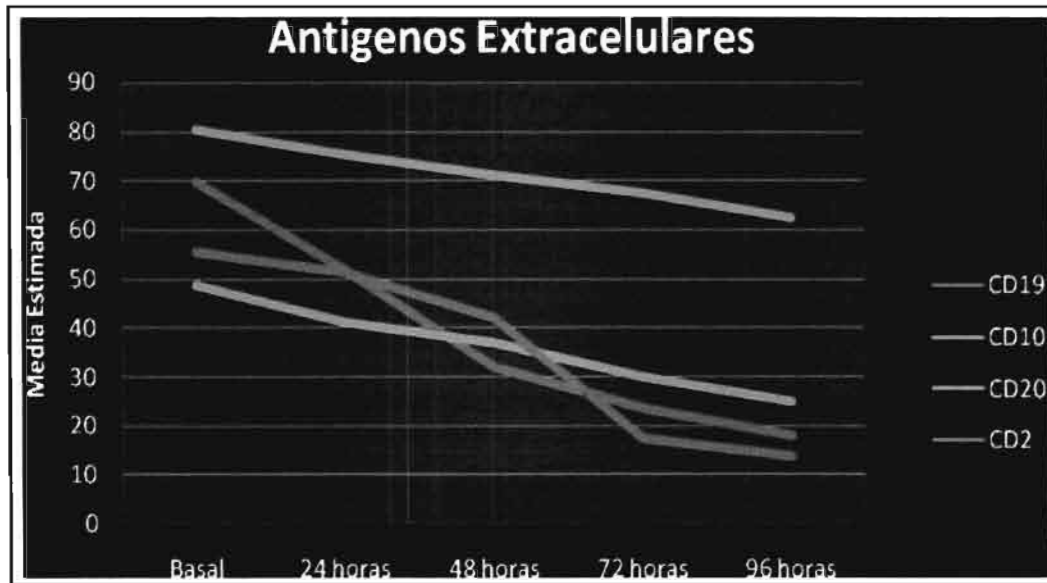


Fig1. Media estimada a diferente tiempo de los antígenos presentes en la membrana celular de las células leucémicas procedentes de médula ósea.

En esta gráfica podemos observar la media estimada para cada antígeno a través del tiempo. Observamos que el antígeno CD10 es el que se expresa por más tiempo, ya que a las 96 horas continúa siendo positivo hasta en un 63%. Mientras que CD19, CD20 y CD2 continúan siendo positivos en menor porcentaje, en un 17%, 25%, y 18% respectivamente.

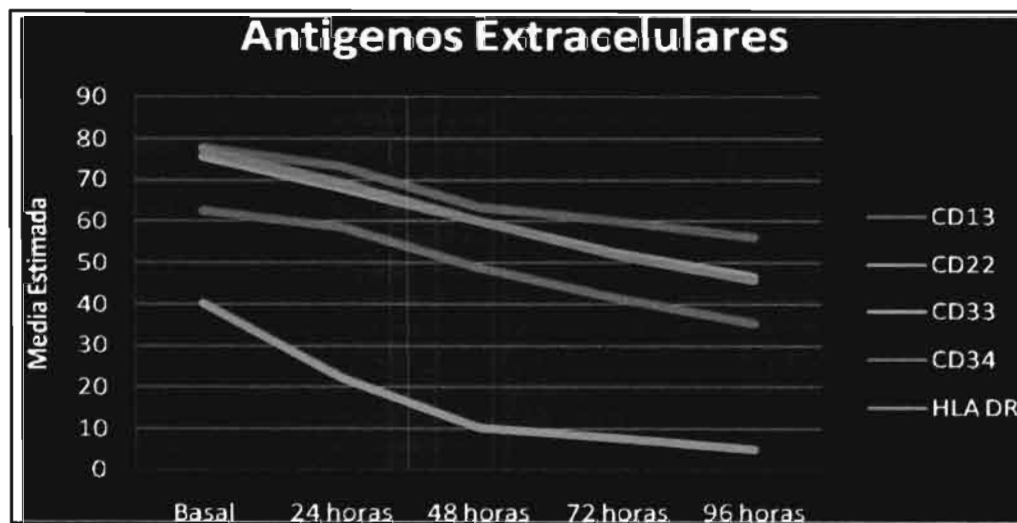


Fig1.1 Media estimada a diferente tiempo de los antígenos presentes en la membrana celular de las células leucémicas procedentes de médula ósea.

En esta gráfica podemos observar que el antígeno CD13 es el que se expresa por más tiempo, ya que a las 96 horas, el 56% de las células continúan siendo positivas. La expresión de CD22 cae dramáticamente del tiempo basal a las 48 horas (de 40 a 10%) y para las 96 horas es del 5%. La expresión de CD33, CD34, HLA DR disminuyen con el paso del tiempo, pero se mantiene aún positivo a las 96 horas. (47, 35 y 46% respectivamente).

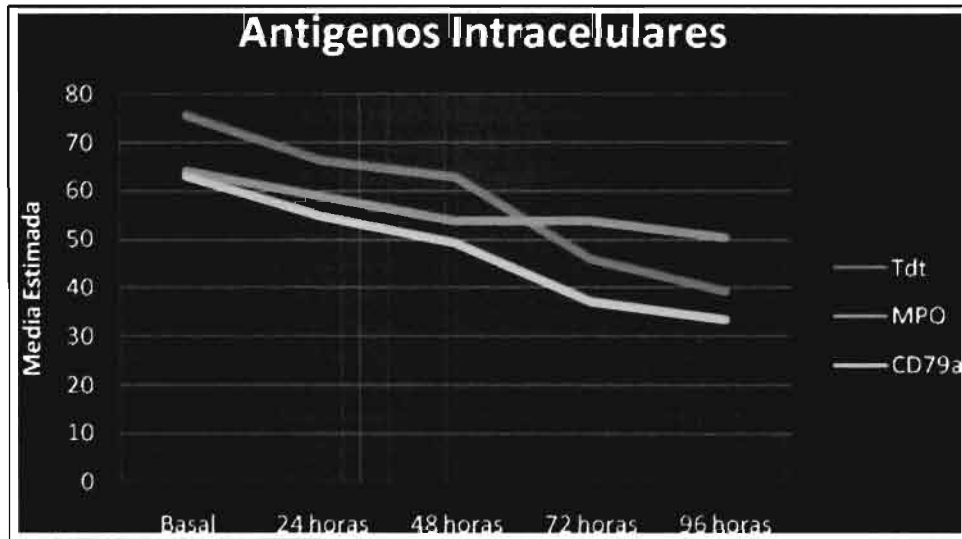


Fig2. Media estimada a diferente intervalo de tiempo para antígenos intracelulares en muestra de médula ósea.

En esta gráfica observamos que la expresión de MPO se mantiene relativamente estable, a las 96 horas se encuentra presente en el 51%. Los niveles de expresión del anticuerpo Tdt y CD79a a las 96 horas caen a 39.5 y 33.4% respectivamente.

Variable	Basal	24horas	48hrs	72hrs	96hrs	F	Fr	Pos hoc
	Media (SD)	Media (SD)	Media (SD)	Media (SD)	Media (SD)			
CD19	80.9 (12.1)	54.7 (26.4)	44.2 (24.4)	31 (22.6)	26.3 (18.9)		67.4*	1-3, 1-4, 1-5, 2-4, 2-5, 3-5*
CD10	73.1 (23)	69.9 (24,7)	67.1 (23.8)	63.5 (24.6)	64.9 (22.1)	5.28*		1-4, 1-5*
CD20	61.2 (22.5)	53.3 (22.6)	49.5 (22.4)	46.6 (19.9)	47.5 (21.2)	10.2*		1-2, 1-3, 1-4, 1-5*
CD13	80.1 (24.5)	79.2 (25.2)	77.2 (25.4)	76.7 (26)	74.7 (27.3)		20.4*	1-5, 2-5*
CD22	68.4 (15)	47 (31.2)	34.6 (25.9)	23.3 (20.6)	18.2 (19.7)		33*	1-4, 1-5, 2-5*
CD33	66.9 (26.1)	63 (28.1)	52 (29.8)	48.7 (29.4)	46.2 (27.7)	11.16*		1-3, 1-4, 1-5, 2-4, 2-5.*
CD34	66.5 (23)	61.4 (21.4)	59.8 (21.4)	50.9 (19.7)	45.1 (18.5)	14.16*		1-4, 1-5, 2-4, 2-5, 3-5.*
HLA DR	82.3 (14)	79.8 (15.3)	74.6 (16.9)	68.5 (21.4)	60.6 (27)		58.8*	1-3, 1-4, 1-5, 2-4, 2-5.*
Tdt	59 (19)	47.4 (24.5)	40.9 (21.9)	30.7 (18.9)	27.7 (18.3)		23.13*	1-4, 1-5, 2-5*
MPO	69.5 (26.5)	60.8 (33.4)	66.4 (28.8)	63.3 (28)	59.5 (28.5)	0.81		
CD79a	60.7 (14.5)	55.8 (20.8)	56 (19.5)	43.9 (24.8)	35.9 (28.5)		20.2*	1-4, 1-5, 2-5*

* $p < 0.05$.

Tabla 2. Permanencia de positividad de los antígenos intra y extracelulares del panel de leucemias a diferente tiempo en muestra de sangre periférica.

En la tabla 2 observamos la expresión de los antígenos intra y extracelulares procedente de muestra de sangre periférica y analizados a diferente tiempo. Podemos observar que en todos los antígenos existe una diferencia significativa, es decir, la expresión o positividad de los mismos se modifica con el paso del tiempo, excepto en MPO donde estadísticamente no se observa diferencia alguna. Por lo que se puede asumir que la expresión de MPO se mantiene prácticamente sin cambios hasta las 96 horas.

Se observa que existe una diferencia significativa en la expresión de CD19, CD33 y HLA DR en el tiempo basal comparado a las 48 horas. Lo que nos indica que la expresión de estos antígenos es igual de manera inicial con respecto a las 24 horas pero no a las 48 horas. Sin embargo la expresión de CD19 no es igual a la de CD33 y HLA DR, estos últimos continúan siendo positivos de forma importante incluso hasta las 96 horas comparadas con la expresión de CD19 a ese mismo tiempo.

Se observa que existe una diferencia significativa en la expresión de CD10, CD22, CD34, Tdt y CD79a entre la medición basal y la medición a las 72 horas

Existe una diferencia en la expresión del antígeno CD20 de manera inicial con respecto a las 24 horas.

El antígeno CD13 aun continúa su expresión de manera importante hasta las 96 horas, existe una diferencia significativa entre la medición inicial y la medición de las 96 horas, pero no existe variación en las determinaciones previas.

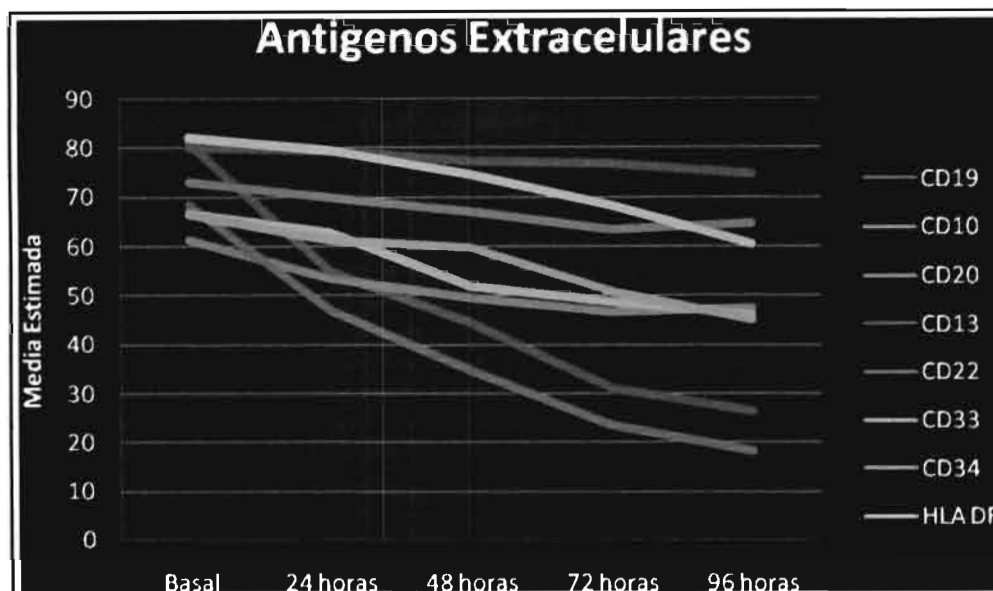


Fig3. Media estimada a diferente intervalo de tiempo para antígenos extracelulares en sangre periférica.

En esta figura podemos observar que la expresión de CD10, CD13, HLA DR se conservan de forma importante hasta las 96 horas. El CD33, CD34 y CD20 también mantienen su expresión, sin embargo para los antígenos CD22 y CD19 aunque a las 96 horas aun se siguen expresando, lo hacen de manera muy pobre (26 y 18%).

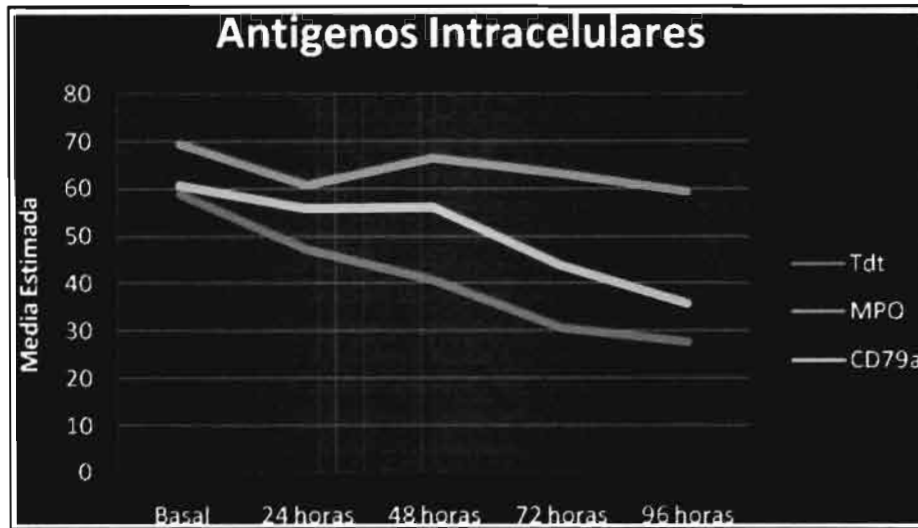


Fig 4. Media estimada a diferente intervalo de tiempo para antígenos intracelulares en médula ósea.

En la figura 4 podemos observar que existe una expresión importante de MPO incluso hasta las 96 horas, y la cual se mantiene prácticamente de manera constante. Para Tdt y CD79a se observa, como es esperado, que la expresión no es igual para los diferentes intervalos de tiempo y para las 96 horas cae a un 28 y 36% respectivamente.

Durante la realización de este estudio se observó que, aun cuando de manera estadística existe variaciones con respecto a la expresión de los antígenos dependiendo del tiempo transcurrido y se reportaba que no es igual medir un antígeno a la hora 0 que a la hora 24, 48, 72 o 96, algunos anticuerpos continuaban persistentemente muy positivos. Por lo anterior, a continuación se expone una gráfica con los porcentajes de la expresión de los antígenos tanto en médula ósea como en sangre periférica según la evaluación de dos investigadores.

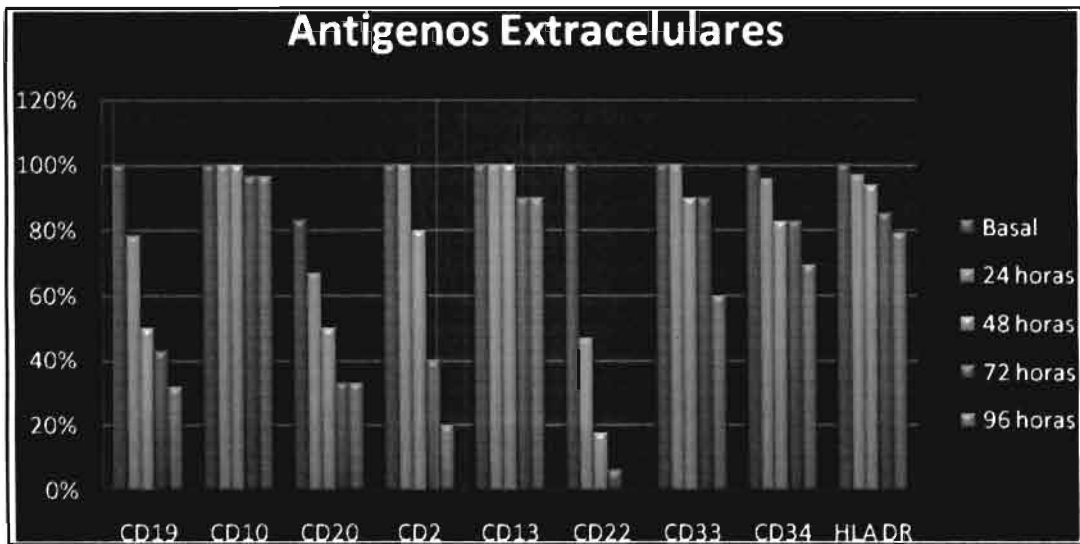


Fig 5. Porcentaje de antígenos extracelulares positivos presentes en células leucémicas en médula ósea a diferentes intervalos de tiempo.

En esta gráfica se observa que el CD10, CD13, HLA DR continúan expresándose de manera importante (hasta en un 80%) hasta las 96 horas. CD33 y CD34 también continúan siendo positivos hasta en un 60 y 70%. La expresión de CD19, CD20, CD22 y CD2 es muy baja a las 96 horas, entre el 20% y 30%. CD22 inclusive no se observa positivo a las 96 horas.

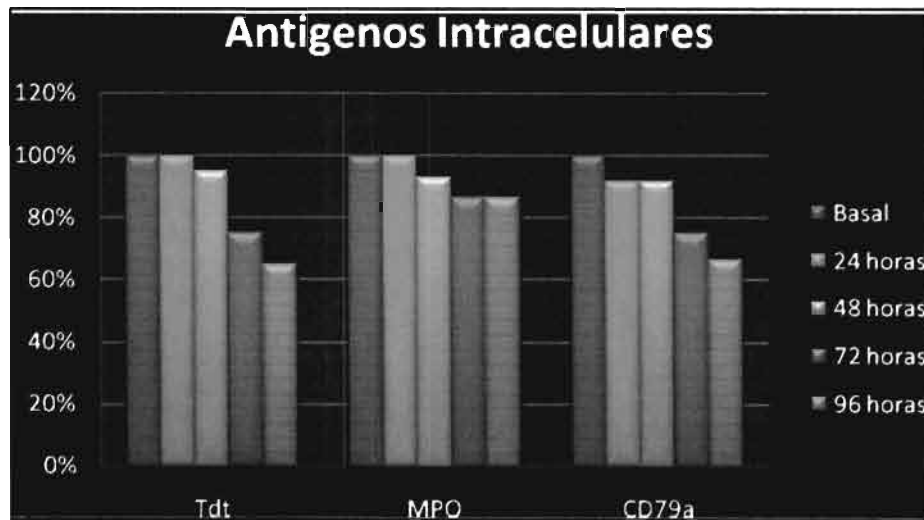


Fig 6. Porcentaje de antígenos intracelulares positivos presentes en células leucémicas en médula ósea a diferentes intervalos de tiempo.

En esta gráfica se observa la expresión de antígenos intracelulares presentes en células leucémicas de muestra de médula ósea. Se observa que a las 96 horas la expresión de MPO continúa de forma importante. La expresión de Tdt y CD79a a las 96 horas es de un 65 y 66% respectivamente.

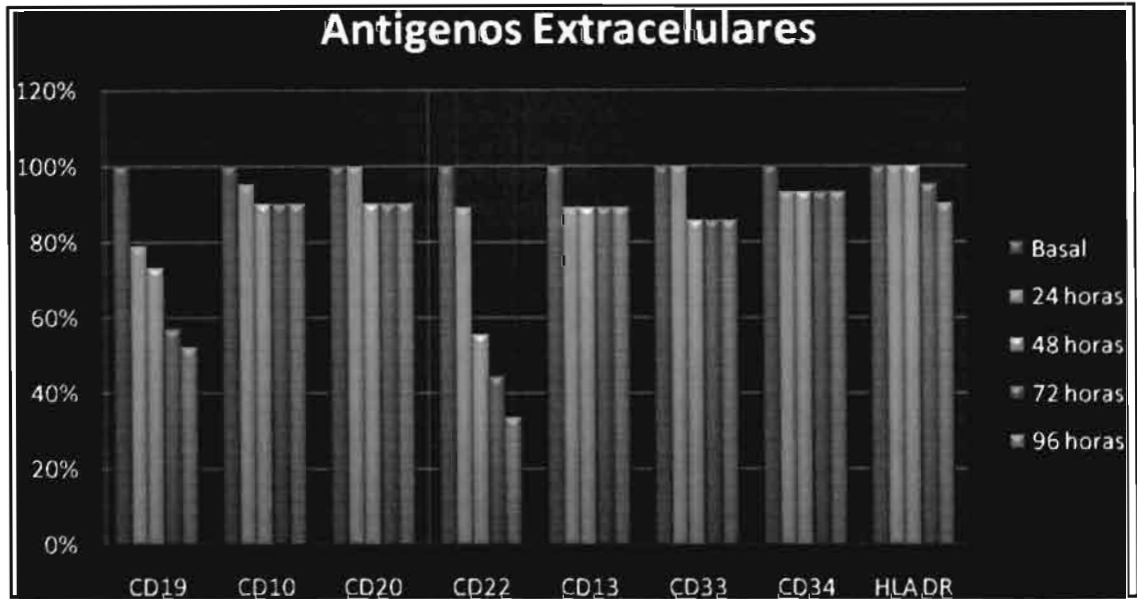
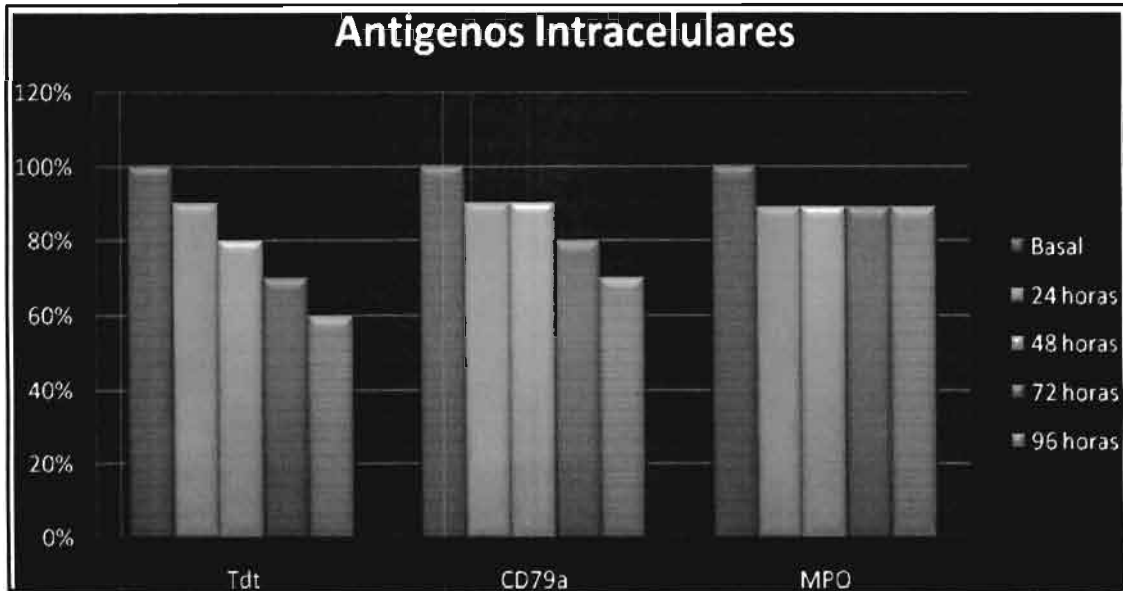


Fig 7. Porcentaje de antígenos intracelulares positivos presentes en células leucémicas en sangre periférica a diferentes intervalos de tiempo.

En esta gráfica se observa que en muestras de sangre periférica la expresión de CD10, CD20, CD13, CD33, CD34 y HLA DR se mantienen de forma importante hasta las 96 horas (90%, 90%, 89%, 86%, 93% y 95% respectivamente.)



f

Fig8. Porcentaje de antígenos intracelulares positivos presentes en células leucémicas de sangre periférica a diferentes intervalos de tiempo.

Para los antígenos intracelulares presentes células de muestras de sangre periférica al igual que lo observado en medula ósea, la expresión de MPO disminuye del tiempo basal a las 24 horas, pero se mantiene estable a las 24, 48, 72 y 96 horas en un 86%. La expresión de Tdt y CD79a cae a un 60 y 70% a las 96 horas.

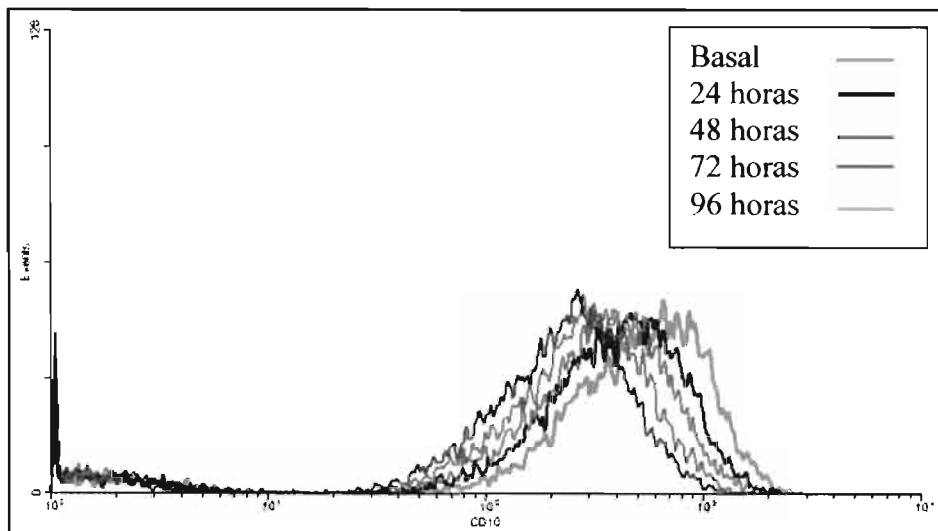


Fig 9. Células leucémicas positivas para CD10 a diferente intervalo de tiempo.

La figura 9 representa una gráfica de la expresión de CD10 a diferentes intervalos de tiempo. Como podemos observar a las 96 horas la expresión se mantiene de forma importante, esto se puede observar mejor en la siguiente figura.

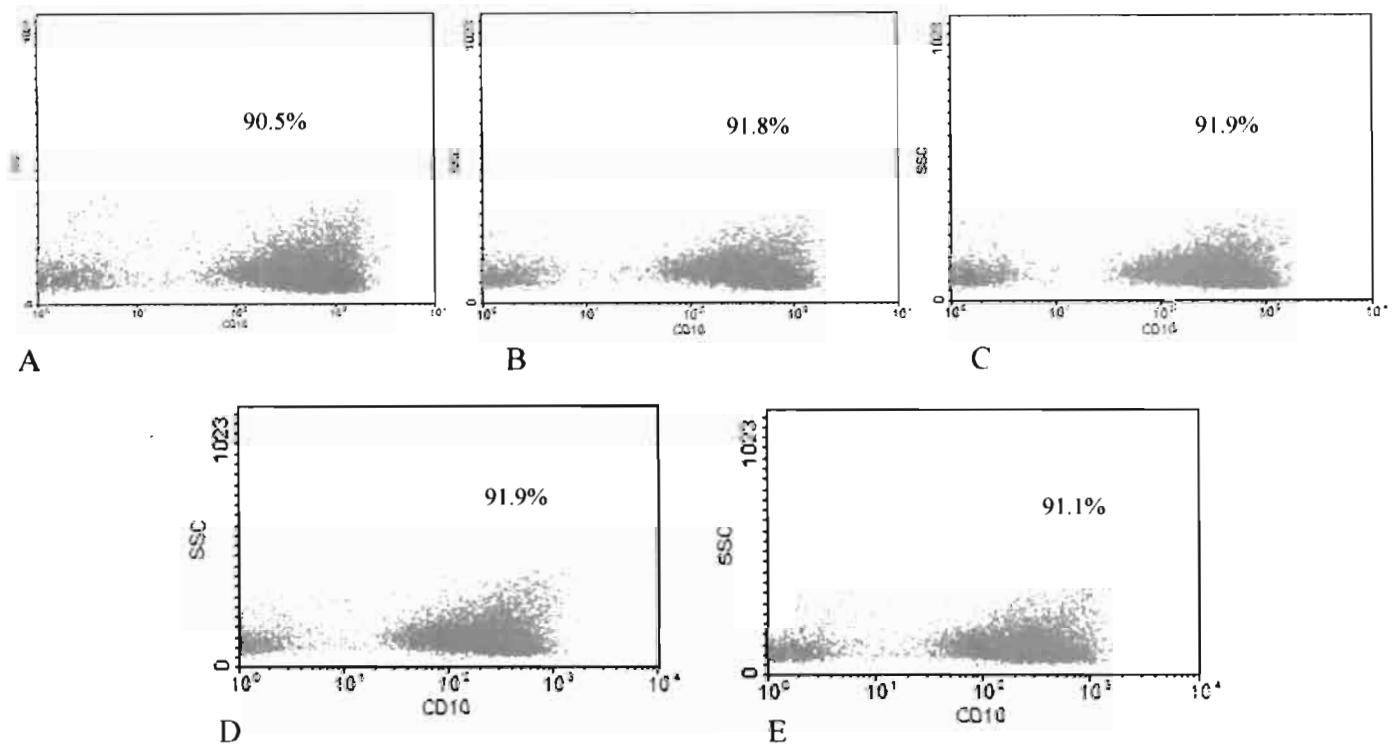


Fig 10. Positividad para el antígeno CD10 a diferente intervalo de tiempo. A tiempo basal, B 24 horas, C 48 horas, D 72 horas, E 96 horas.

La figura 10 representa una gráfica donde se observa hacia la izquierda la cantidad de células que presentan expresión para CD10 y podemos observar que esta se mantiene de forma importante y estable hasta las 96 horas.

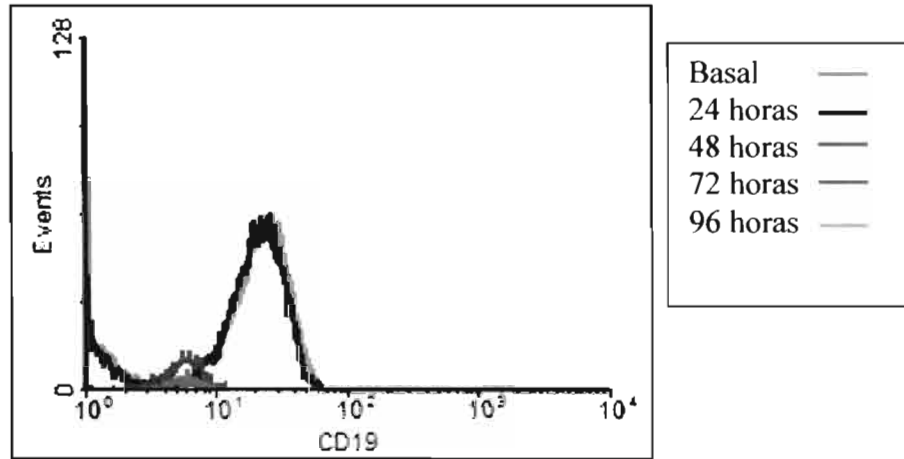


Fig 10. Expresión de CD19 a diferente intervalo de tiempo.

La figura 10 representa un histograma de la expresión de CD19 a diferentes intervalos de tiempo. Como podemos observar a las 96 horas la expresión se mantiene las primeras 24 horas, y disminuye de forma importante para las 48, 72 y 96 horas.

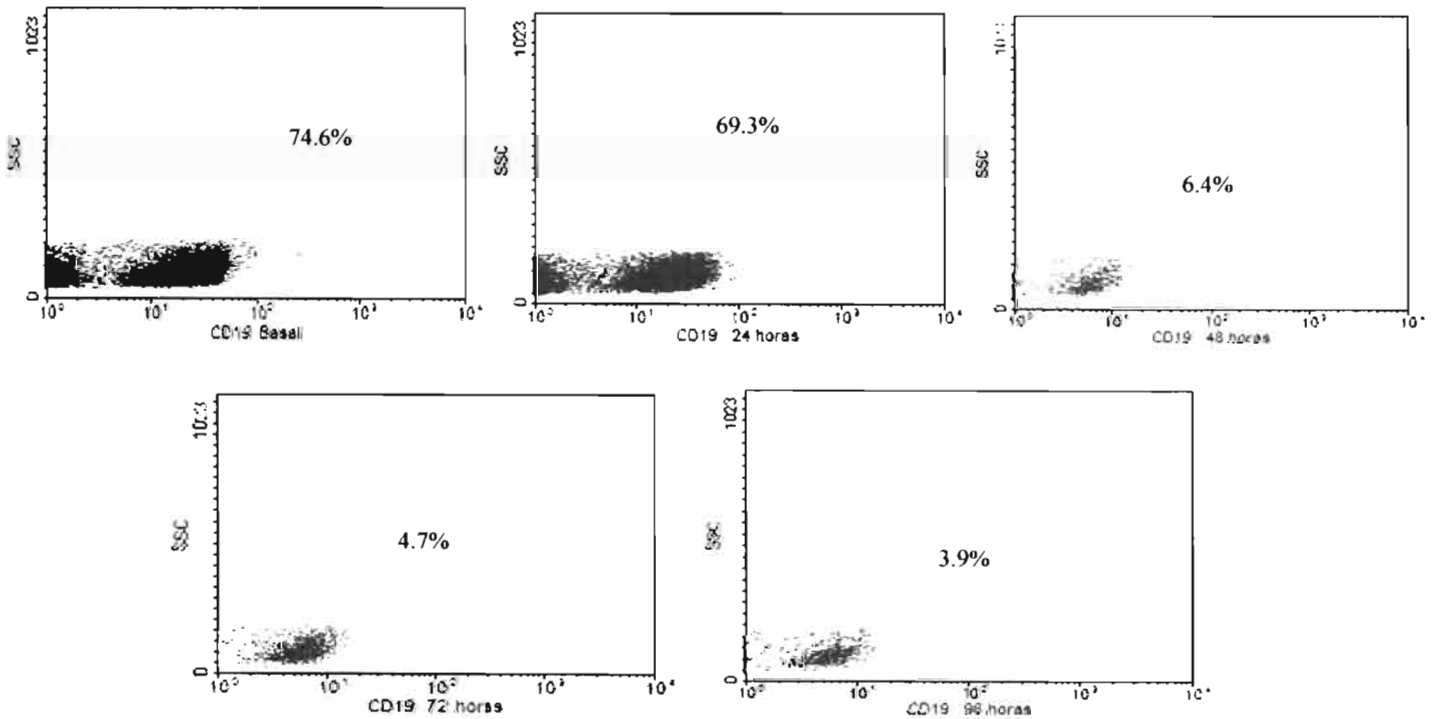


Fig 11. Positividad para el antígeno CD19 a diferente intervalo de tiempo.

DISCUSION.

Se encuentra descrito en la literatura que generalmente, la viabilidad celular y la expresión de antígenos se mantienen hasta por lo menos 24 horas en sangre periférica o medula ósea a temperatura ambiente en un tubo que contenga heparina, ácido etilenediaminatetraacético (EDTA) o ácido citrato dextrosa.¹⁸ Los requerimientos de la muestra para el análisis en el citómetro de flujo dependen de la celularidad de la muestra, la viabilidad de las células en la muestra y el tipo de análisis realizado. Se requieren aproximadamente 1×10^6 células/ul (100 000 total) para cada anticuerpo monoclonal que se utiliza. Bajo condiciones de celularidad normal, se requieren para realizar el panel de leucemias de 10 a 20 ul de sangre periférica y 3 a 4 ul de medula ósea, sin embargo eso depende de la cantidad de estudios realizados.

Algunos investigadores han estudiado los efectos de almacenamiento en diferentes condiciones de los marcadores de superficie presentes en los linfocitos los cuales han sido detectados por anticuerpos monoclonales. Kahan et al¹⁹ encontraron que una muestra de sangre periférica mantenida a 4° C expresaba marcadores de células T a niveles comparables con los controles. Otros grupos^{20, 21} han encontrado una reducción del 40 al 60% de porcentaje de células T y células T cooperadoras en muestras de sangre periférica almacenada por un día a 4° C.

Prince et al¹³ encontraron que los antígenos CD3, CD4, CD8 y HLA mostraban una reducción del 40 al 60% después de almacenar las muestras de sangre periférica durante 14 días a 4° C.

Gutensohn K et al¹⁵ analizaron el antígeno CD34 manteniendo la muestra a temperatura ambiente (20± 2 ° C) y a 4° C. durante 24 horas encontrando una disminución del 25 al 27% de la expresión del antígeno que se encontraba a temperatura ambiente, mientras que no hubo cambios en aquel que se almacena a 4° C.

Schmidtke G et al¹⁴ almacenaron muestras de sangre periférica por 3 días a 4° C para el análisis de los antígenos CD19 y CD45 y encontraron que no existía cambios en la expresión de los mismos.

Sin embargo no existen estudios previos que determinen que ocurre con la expresión de los antígenos marcadores de leucemia aguda después de 4 días de almacenamiento a una temperatura ambiente, es por eso la razón de este estudio.

En nuestro estudio los antígenos que con mayor frecuencia se detectaron a través de los diferentes intervalos de tiempo fueron para leucemia linfoblástica: CD10, CD19, CD2, CD20, CD22, CD34, CD79a, HLA-DR y TdT, en leucemia mieloblástica: CD13, CD33, CD34, HLA-DR y MPO.

Observamos la permanencia de los antígenos intra y extracelulares de ambas muestras se modifica con el paso del tiempo. Observamos que la expresión de MPO se mantiene prácticamente sin cambios hasta las 96 horas tanto en muestra de sangre periférica como de médula ósea. Esto mismo es lo que se observó tanto de forma estadística como de manera clínica.

Los antígenos que se mantienen positivos por más tiempo son CD10, CD33, HLA DR, CD34, CD13 y MPO tanto en muestra de sangre periférica como en muestra de médula ósea.

Para el antígeno CD10 se observó que aunque estadísticamente no es igual analizar la muestra inicialmente que a las 24, 48, 72 o 96 horas, el antígeno continúa siendo positivo de manera importante hasta las 96 horas, como se puede observar en las graficas de citometría de flujo Figs. 9 y 10.

El antígeno CD19 disminuye de forma importante a partir de las 48 horas, en algunas muestras aún persistía positivo hasta las 96 horas.

Los antígenos CD20, Tdt y 79a persisten positivos a las 96 horas por lo que es posible realizar la determinación de inmunofenotipo a este intervalo de tiempo.

Se observó que los antígenos CD2 y CD22 para las 96 horas disminuían de manera importante su expresión, de hecho para las 96 horas el CD2 ya no se expresaba en muestra de médula ósea.

Se encontró que los antígenos de muestra de médula ósea mostraban una expresión menor que aquellos tomados de muestra de sangre periférica. Es posible que los nutrientes presentes en el plasma en el que permanecen en suspensión las células permitan la viabilidad persistente de los antígenos encontrados, sin embargo se requiere realizar estudios posteriores para analizar este hecho.

CONCLUSIONES

Aún cuando no es recomendable transportar o almacenar muestras de pacientes con leucemia aguda a temperatura ambiente durante largos períodos de tiempo, en este estudio se observó que la mayor parte de los antígenos detectados inicialmente permanecieron positivos.

Nuestros resultados sugieren que una muestra mantenida a temperatura ambiente durante 48-96 horas no debe de ser desechada ya que podría proveer importante información acerca del tipo de leucemia a la que el médico se enfrenta.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Catvosky D, Matutes E. The classification of acute leukemia. *Leukemia* 1992; Supl 2:1-6.
2. Pui CH. Childhood Leukemias. *N Engl J Med* 1995; 332:1618-1630.
3. Ruiz Arguelles GJ, et al. Citometría de flujo en la inmunotipificación de las leucemias agudas. *Rev. Invest Clin* 1993; 45:93.
4. Ruiz-Arguelles A. Report of the second Latin American consensus conference for flow cytometric immunophenotyping of hematological malignancies. *Cytometry B Clin Cytom.* 2006; 70: 39-44
5. Piedras J, Barrales O, López X. Clasificación de las leucemias agudas de acuerdo con el consenso de la primera conferencia latinoamericana en la tipificación inmunológica de las leucemias. *Rev Invest Clin* 2000; 52(5):524-528.
6. Van Noesel CJM, van Lier RAW, Cordell JL, Tse AGD, et al. The membrane IgM-associated heterodimer on human B cells is a newly defined B cell antigen that contains the protein product of the mb-1 gene. *J Immunol* 1991; 146:3881-8.
7. Mason DY, Cordell JL, Tse AGD, et al. The IgM-associated protein mb-1 as a marker of normal and neoplastic B cells. *J Immunol* 1991; 147:2474-82
8. Buccheri V, et al. Mb-1: a new marker for B lineage lymphoblastic leukemia. *Blood* 1993; 82:853-7.
9. Nguyen PL, Olszak I, et al. Myeloperoxidase detection by three color flow cytometry and by enzyme cytochemistry in the classification of acute leukemia. *Am J Clin Pathol* 1998; 110:163-9.

10. Ruiz-Arguelles A, Duque R, et al. Report on the First Latin American Consensus Conference for Flow Cytometric Immunophenotyping of Leukemia. *Clinical Cytometry* 1998; 34:39-42.
11. Correa LC, Mandeville Peter B, Manrique J, et al. Valor pronostico del inmunofenotipo en la respuesta temprana de la leucemia aguda linfoblástica pre-B en niños. *Gac Med Mex* 2005; 141(6):477-482.
12. Menke-Mollers I, Burrichter H, Schiene K, Kruger J. Lymphocytogams in relation to storage time of CPDA1 whole blood concentrates. *Beitr Infusionsther* 1992; 30:140-144.
13. Prince HE, Arens L. Effect of storage on lymphocytes surface markers in whole blood units. *Transplantation* 1986; 41:235-238.
14. Schmidtke G, Schmucker U, Brittinger G, Hoffkes HG. Comparative flow cytometric study of clonal excess in leukaemic peripheral blood from patients suffering from chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL) by different antibodies, staining techniques and the effects of blood storage. *Clin Lab Haematol* 1999; 21:103-112.
15. Gutensohn K, Hummel K, Sputtek A, Cassens U, Kuhn P. Storage of peripheral blood stem cell samples alters flow cytometric CD34+ results. *Beitr Infusionsther Transfusionsmed.*1996; 33:170-174.
16. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. The morphological classification of acute lymphoblastic leukaemia concordance among observers and clinical correlations. *Br J Haematol.* 1981; 47:553-561.
17. Borowitz MJ, Guenther KL, Shults KE, Stelzer GT. Immunophenotyping of acute leukemia by flow cytometric analysis. Use of CD45 and right-angle light scatter to gate on leukemic blasts in three-color analysis. *Am J Clin Pathol.* 1993; 100:534-540.

18. Riley R, Massey D, et al. Immunophenotypic analysis of acute lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol Clin N Am* 2002;16:245-299.
19. Kahan A, Kahan A, Amor B, Lymphocyte subpopulations during blood storage. *Arch Intern Med* 1984;144:2101.
20. Light JA, Metz S, Oddenino K, et al. Donor-specific transfusion with diminished sensitization. *Transplantation* 1982; 34:352.
21. Dzik WH, Neckers L. Mononuclear cell surface antigens during storage of banked blood. *Transplantation* 1984; 38:67.