

UTILIZACION DE LAS TECNICAS CITOQUIMICAS EN LA IDENTIFICACION DE LAS LEUCEMIAS AGUDAS*

*Dr. Roberto De Bellis***

*Dr. Ernesto Novoa****

*Tec. Luisa Casalaina*****

*Tec. Susana Tulle*****

*Tec. Cristina Masdeu*****

*Dr. Armando Fattoruso******

Trabajo realizado en la Sección Hematología del Laboratorio de Química y Bacteriología del Servicio de Salud de las Fuerzas Armadas.

INTRODUCCION Y MOTIVO DE ESTUDIO

Desde hace más de una década, se conoce que la leucemia aguda no es una entidad homogénea. Sin embargo, hace relativamente pocos años que se ha adoptado un criterio universal basado en la existencia de numerosos hechos clínicos, citológicos, citoquímicos y citogenéticos que pueden probar claramente su heterogeneidad.

En un principio, los médicos prácticos sólo pudieron valerse de las diferencias clínicas aparentes entre un cuadro de leucemia aguda y otro. Esto no les permitió realizar una clasificación satisfactoria. El próximo paso fue correlacionar estos hechos clínicos con los estudios citológicos de la sangre periférica y la médula ósea en base a las coloraciones de rutina en Hematología: May Grünwald-Giemsa, Wright, etc. Si bien esto mejoró el conocimiento de la leucemia aguda, tampoco permitió, con solamente este tipo de técnicas, establecer un criterio de clasificación definitivo. Aún el observador más avezado ve limitada su posibilidad de diferenciar objetivamente ciertos elementos celulares con el empleo de las coloraciones antedichas. Esto supone que si no recurre a otros medios, deberá valerse de múltiples factores colaterales

de la semiología celular que pueden introducir involuntariamente un grado mayor o menor de subjetividad en el estudio realizado. Es obvio, como lo demostró Hayhoe(1) que no pueden compararse series de enfermos diferentes centros con total seguridad, dado que en muchos casos el diagnóstico citológico establecido no sería compartido unánimemente, como consecuencia de existir una impresión subjetiva que varía entre un observador y otro.

Intentando resolver estas dificultades, el mismo autor, conjuntamente con Quaglino y Doll(2), analizaron la utilidad de las reacciones citoquímicas del Sudan negro, Peroxidasas y P.A.S. (ácido peryódico Schiff). El resultado obtenido evidenció que estas técnicas eran de indudable valor en la definición citológica. Por este método, muy pocos casos permanecen inclasificados y la mayor parte de ellos corresponde al grupo de las leucemias

** Equip. a Tte. 1º

*** Alférez Médico

**** Sgto. Tec. de Lab. Clínico

***** Equip. a Mayor. Médico

a "stem cells" de los anglosajones. Si el tratamiento de las leucemias agudas hubiese permanecido estático, estos adelantos sólo habrían determinado un avance en lo que respecta al criterio empleado para el diagnóstico citológico y la mejor subdivisión de los distintos tipos de leucemia. Sin embargo, con el advenimiento de nuevas drogas, con la puesta en práctica de asociaciones poli-quimioterápicas, con los adelantos en el apoyo hemoterápico y con el control de las complicaciones infecciosas, la leucemia guda, es, entre las entidades oncológicas, una de las que ha registrado un cambio más espectacular en lo que se refiere a su evolución y pronóstico, siendo hoy en día admisible que en un porcentaje no despreciable pueda obtenerse una larga remisión completa y aún la curación de la enfermedad, en ciertos casos.

Dado que es bien sabido que las asociaciones medicamentosas de mayor efectividad son diferentes para cada tipo de leucemia aguda y esto es especialmente notorio en el caso de las leucemias agudas linfoblástica y mieloblástica, creemos obligatorio el empleo de todos los elementos técnicos a nuestro alcance para realizar un diagnóstico exacto, lo que permitirá el mejor plan terapéutico y, por ende, el aumento del porcentaje de supervivencia de los enfermos afectados por este tipo de hemopatía maligna.

En base a lo anteriormente expuesto, hemos comenzado aplicar en nuestro medio este tipo de estudio sistemáticamente desde hace varios años. Creemos de interés exponer las conclusiones que hemos extraído en la Sección Hematología del Laboratorio Central de Química y Bacteriología del S.S.F.F.A.A.

MATERIAL Y METODOS

En el período de doce meses comprendido entre noviembre de 1977 y noviembre de 1978, se realizaron 438 estudios de médula ósea de los cuales 88 fueron complementados con técnicas citoquímicas de Sudán negro, P.A.S. y fosfatasas alcalinas leucocitarias.

En todos los casos se estudió la médula ósea obtenida por punción aspirativa, a nivel de la región esternal, acromial, o de espina ilíaca pósterosuperior.

Conjuntamente, se efectuó un estudio citológico y hematimétrico de sangre periférica. La coloración de rutina empleada para el estudio citológico fue el May Grunwald-Giemsa, observándose los detalles técnicos descritos por Levy y Lortholary(3) en su manual "Cytologie pratique du sang".

Las técnicas citoquímicas empleadas fueron:

Sudán negro B la descripción de Sheehan y Storez(4), para la cual utilizamos los siguientes reactivos:

a) negro sudán B: 300 mg. diluídos en 100 ml. de alcohol etílico absoluto.

b) fenol cristalizado 16 ml., diluídos en 30 ml. de alcohol etílico absoluto, a lo cual se agregan 300 mg. de Na₂HPO₄ disueltos en 100 ml. de agua destilada.

c) solución de trabajo: 40 ml. de solución tampón con 60 ml. de solución de negro sudán B, se mezclan y luego se filtra (conservación hasta dos meses y medio).

Manipulación:

1) fijar las láminas secadas al aire en vapores de formol durante 5 minutos.

2) enjuagar en agua corriente 5 minutos.

3) sumergir en solución de trabajo la lámina durante una hora.

4) enjuagar en etanol al 70% brevemente, y posteriormente enjuagar 2 minutos con agua corriente.

5) secar y contracolorar con May Grunwald-Giemsa. P.A.S. (según la técnica de Mc. Manus modificada).

Reactivos:

a) solución de ácido peryódico: disolver 5 gr. de cristales de ácido peryódico en agua destilada (puede conservarse tres meses si se protege de la luz).

b) fucsina básica: disolver 5 gr. de fucsina básica en 500 ml. de agua destilada tibia, filtrar dicha solución y saturarla con SO₂ lentamente mediante ebullición durante media hora; colocar 2 gr. de carbón activado, agitar algunos minutos hasta que se aclare y filtrar

inmediatamente, pasando la solución a un frasco oscuro.

Manipulación:

- 1) las láminas secadas al aire se sumergen 10 min. en una sol. de 10 ml. de formol al 40% con 90 ml. de etanol.
- 2) lavar brevemente con agua corriente.
- 3) sumergir en sol. de ácido peryódico durante 10 min.
- 4) lavar y secar la lámina.
- 5) sumergir en fucsina básica durante 30 min.
- 6) lavar con agua corriente 5 min.
- 7) contracolorar con Hematoxilina de Harris 10 min.
- 8) enjuagar y secar

Fosfatasa alcalina leucocitaria:

Reactivos:

- a) solución stock: disolver 10,5 gr. de 2 amino-2 metil propanol - 3 diol en 500 ml. de agua destilada.
- b) solución de trabajo: se prepara mezclando 25 ml. de la solución tampón precedente con 5 ml. de HCl (0, 1N) y diluyendo en 100 ml. de agua destilada.
- c) verde de metilo: en solución al 2% en agua destilada.

Manipulación:

- 1) láminas secadas al aire, se sumergen en una mezcla de formol al 35% 10 ml. y

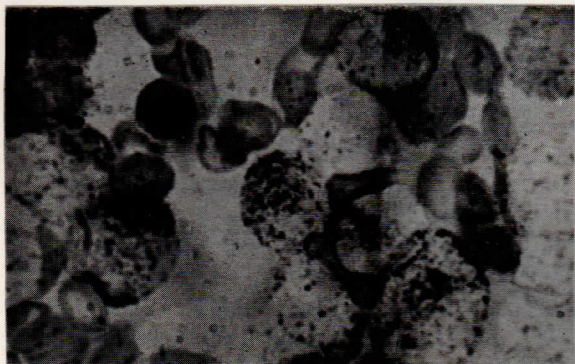


Fig. 1.- Leucemia aguda mieloblástica. Sudan negro positivo intenso.

alcohol metílico absoluto 90 ml. Esta mezcla debe conservarse a 20°C y utilizarse a temperatura de 0 a 4°C.

- 2) preparar el sustrato mezclando: alfa-naftil-fosfato de sodio 35 mg., Brentamine-fast-garnet 35 mg. y solución de trabajo 35 ml.

3) el sustrato se vierte directamente sobre las láminas dejándose a temperatura ambiente durante 10 min. (debe ser utilizado inmediatamente luego de su preparación).

- 4) enjuagar las láminas al agua 10 seg.
- 5) contracolorar con verde de Metilo 10 min.

En todos los casos que se practicó un estudio citoquímico, se controló con láminas testigo, hecho que debe ser estrictamente respetado para la correcta interpretación de los resultados.

RESULTADOS

De 438 estudios de médula ósea 350 no presentaron alteraciones morfológicas compatibles con el cuadro citológico de una hemopatía mayor. Los 88 restantes, pertenecieron a pacientes a los que se les hizo el diagnóstico de una hemopatía maligna y a los que posteriormente se siguió con estudios seriados en el transcurso del tratamiento citostático.

Los enfermos estudiados en este período de tiempo, presentaron leucemias agudas clasificables en cuatro grupos: linfoblásticas, mieloblásticas (incluyendo 1 .a. promielocítica), mielomonocíticas e indiferenciadas.

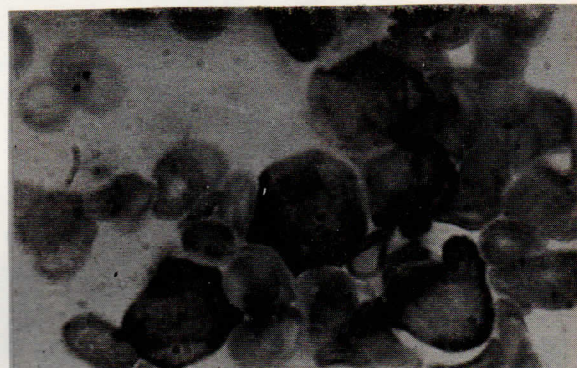


Fig. 2.- Leucemia aguda indiferenciable. P.A.S. negativo

Con la coloración de May Grunwald-Giemsa, teniendo en cuenta como hecho saliente para la clasificación de las células leucémicas los siguientes elementos:

L.A. linfoblástica:

- a) relación núcleo-citoplasmática elevada.
- b) nucléolos en número de 1 ó 2.
- c) cuerpos de Auer ausentes.
- d) porcentaje superior al normal de linfocitos en la médula ósea.

L.A. mieloblástica:

- a) células blásticas de tamaño más regular.
- b) número de nucléolos mayor de 2 (3 a 5).
- c) gránulos azurófilos presentes.
- d) cuerpos de Auer presentes.
- e) promielocitos casi siempre presentes, y en algunos casos predominantes.

L.A. mielomonocítica:

- a) núcleo con aspecto de contorno geográfico.
- b) formas monocíticas en porcentaje muy superior al normal en sangre periférica.
- c) número de nucléolos con tendencia a ser elevado (3 a 5).
- d) cuerpos de Auer presentes.
- e) promielocitos en menor número que en la 1.a. mieloblástica pura.
- f) menor grado de trombocitopenia inicial que otras leucemias agudas.

Encontramos que el 29% de nuestros casos correspondieron a leucemias agudas linfoblásticas; el 39% fueron 1.a. mieloblásticas; el 3% mielomonocíticas y en el 29% restante no pudo determinarse por el criterio citomorfológico clásico el tipo de leucemia aguda.

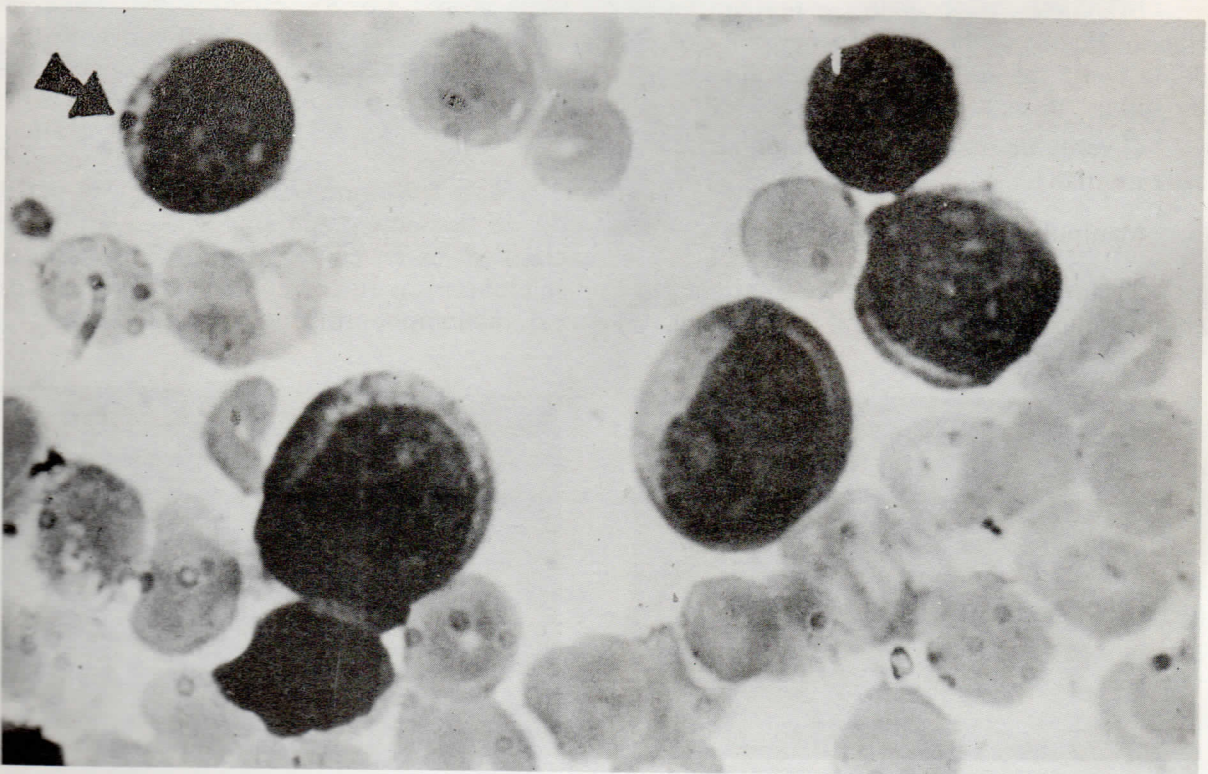


Fig. 3.- Leucemia aguda mieloblástica. (May Grünwald-Giemsa). Bastón de Auer.

Los parámetros citoquímicos de lectura para cada tipo de leucemia aguda se expresan a continuación:

L.A. linfoblástica:

- a) 5% o menos de células sudán negro positivas.
- b) reacción de P.A.S. positiva, presentándose en los blastos como gránulos positivos con un fondo citoplasmático negativo.
- c) fosfatasas alcalinas leucocitarias en score normal o elevado.

L.A. mieloblástica:

- a) más del 5% de blastos sudán negro positivos (siempre).
- b) más del 60% son positivos en esta reacción (generalmente).
- c) reacción de P.A.S. negativa.
- d) fosfatasa alcalina leucocitaria: score normal o bajo.

L.A. mielomonocítica:

- a) más del 5% de los elementos pero menos del 50% muestran débil positividad al sudán negro.
- b) reacción de P.A.S. habitualmente negativa, puede ser positiva en forma difusa, sin gránulos tipo linfoblástica.

Los resultados que obtuvimos nos permitieron precisar que el 41% de los casos correspondieron a leucemias linfoblásticas, mientras que el 44% fueron mieloblásticas, el 3% mielomonocíticas y el grupo de las indiferenciadas descendió al 12%.

DISCUSION

Si comparamos la identificación citológica de una leucemia aguda por las tinciones clásicas con la que podemos realizar complementando el estudio por medio de reacciones citoquímicas, observamos que hay una disminución significativa del grupo de las indiferenciadas en base a hechos objetivables para **todos los observadores por igual e independientemente de la subjetivación individual.**

Como además el grupo que se ha visto enriquecido en nuestra experiencia, una vez realizada la citoquímica, ha sido el de la 1.a. linfoblástica, y esta es la variante de mejor pronóstico, particularmente en el niño, cuando se realiza una terapéutica adecuada, creemos que es una razón suficiente para implantar la obligatoriedad moral de este tipo de examen antes de proponer ningún plan de tratamiento antileucémico.

Tenemos sobrados ejemplos de casos en los que por la existencia de hechos notorios del punto de vista citológico, en la primer lámina observada, se descarta el realizar otras técnicas complementarias; sin embargo, insistimos en que todos los casos deben ser estudiados en la misma forma por obvio que parezca el diagnóstico inicial.

Han transcurrido ya 15 años desde que Hayhoe, Quaglino y Doll establecieron las bases fundamentales para identificar racionalmente las leucemias agudas aparentemente indiferenciadas; la microscopía electrónica y otras técnicas más recientes, como el estudio de receptores de membrana, no han permitido aún mejorar estos resultados. Esperamos, sin embargo, que en los próximos años ello se logrará e insistimos en la necesidad de continuar aplicando toda nueva técnica que surja para ampliar las posibilidades diagnósticas y mejorar los resultados terapéuticos.

SUMMARY

A historic revision of cytochemistry in acute leukaemias is made.

438 studies of the bone marrow (myelogram) corresponding to the period Nov., 77-Nov., 78 were carried out.

The techniques used are described.

The results obtained are compared with the classical techniques (may Grunwald-Giemsa).

The importance of the complementary cytochemical study which improves the possibilities of diagnosis, therapeutics and prognosis in acute leukaemia is emphasized.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- HAYHOE, F.G.J. Leukaemia: Research and clinical practice. London, Churchill, 1960.
- 2.- HAYHOE, F.G.J.; QUAGLINO, D. y DOLL, R. The cytology and cytochemistry of acute leukaemia A study of 140 cases. M.R.C. special report series, N° 304, Her majesty's stationery office, 1964.
- 3.- LEVY, J.P.; LORTHOLARY, P. Cytologie pratique du sang et des organes hemopoietiques. Paris, France; Editions Doin, 1966, pag. 29-30.
- 4.- HAYHOE, F.G.J.; FLEMANS, R.I. Atlas de cytologie hematologique. Paris, France; Flammarion, pag. 316.

SUMMARY

A critical revision of cytochemistry in acute leukaemias is made. 438 studies of the bone marrow (myelogram) corresponding to the period Nov. 77 - Nov. 78 were carried out.

The techniques used are described. The results obtained are compared with the classical techniques (May-Grunwald-Giemsa).

The importance of the complementary cytochemical study which improves the possibilities of diagnosis, therapeutic and prognostic in acute leukaemia is emphasized.

DISCUSION

Se compararon los resultados obtenidos por los métodos de una técnica aguda por los métodos clásicos con la que podemos realizar comparaciones cuando el estudio por medio de técnicas citológicas observamos que hay una distinción significativa del grupo de las células incluidas en una técnica objetiva para todos los observadores por igual e independientemente de la subjetividad individual.