

# Estudio cooperativo de la leucemia aguda en Costa Rica Caracterización citoquímica

Guido Arroyo\*  
 German F. Sáenz\*  
 Eliécer Valenciano\*  
 Elías Jiménez F.\*\*  
 Rafael Jiménez B.\*\*  
 Luis Mora B.\*\*

Jorge Elizondo C.\*\*\*  
 Carlos A. Páez M.\*\*\*  
 Luis F. Vásquez C.\*\*\*  
 German Sánchez H.\*\*\*\*  
 Mariano Castillo R.\*\*\*\*

## RESUMEN

El material estudiado estuvo constituido por frotis de médula ósea y sangre periférica de 252 pacientes con leucemia aguda. Las preparaciones se examinaron antes de iniciar el tratamiento de la leucemia. Las extensiones de médula ósea y de sangre periférica se examinaron al microscopio óptico tras tinción con Wright. Asimismo, se realizó un estudio citoquímico que incluía tinciones para peroxidasa, lípidos, PAS, NASDAE, NASDAE + NaF,  $\alpha$ NAE y NASDCAE.

Se calificó el grado de las reacciones sobre 100 blastos, tomándose para la caracterización citoquímica la positividad de al menos un 5% de los mismos. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: LLA. (L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>), 44% (111/252); niños 71.8% (79/110); adultos 22.5% (32/142); todos los casos fueron negativos para peroxidasa, sudan y cloroacetato esterasas en tanto que fueron todos PAS positivos de 1 a 4+. LMA. (M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>) 30% (75/252); niños 11% (12/110); adultos 44.3% (63/142); peroxidasa 95% positivos (71/75); Sudan 100% positivos (75/75); blastos invariablemente PAS negativos. LPA. (M<sub>3</sub>) 3% (8/252), niños 1.8% (2/110); adultos 4.3% (6/142), peroxidasa, sudan, PAS y NASDCAE positivos 100% (8/8). LMM. (M<sub>4</sub>) 5% (12/252), niños 1.8% (2/110), adultos 7.0% (10/142), peroxidasa y

sudan 100% positivos (12/12), PAS positivos 83% (10/12). LMOA. (M<sub>5</sub>), 6% (15/252), niños 1.8% (2/110), adultos 9.2% (13/142), peroxidasa negativa 33% (5/15), 93% Sudan positivas (14/15), PAS 93% positivas (14/15). Empleando NASDAE/NASDAE + NaF confirmamos la utilidad de la inhibición en la clasificación de esta leucemia. EL. (M<sub>6</sub>), 1% (3/252), niños 0.9% (1/110), adultos 1.4% (2/142), eritroblastos patológicos PAS positivos 100% (3/3).

LL. 11% (28/252), niños 10.9% (12/110), adultos 11.3% (16/142) lo que habría disminuido ostensiblemente 4.8% si a todos los casos se les hubiera podido efectuar la reacción de ambas esterasas, el patrón tomado para leucemia indiferenciada fue: Peroxidasa, Sudan, PAS y esterasas negativas.

## INTRODUCCION

La calificación de la variedad citológica de la leucemia aguda es de capital interés práctico, puesto que una adecuada caracterización es fundamental para establecer el pronóstico y la escogencia del protocolo terapéutico (2,3,5,6,8). Realizar una clasificación de la leucemia aguda en base exclusivamente de hallazgos citomorfológicos puede ser un procedimiento equivocado, pues el pleomorfismo, la atipia y la inmadurez celulares pueden inducir a un error diagnóstico

\* Cátedra de Hematología, Departamento de Análisis Clínicos, Facultad de Microbiología, Hospital San Juan de Dios.

\*\* Laboratorio de Investigación, Hospital Nacional de Niños.

en algunas ocasiones. Para obviar estos problemas se deben efectuar análisis citoquímicos, que usualmente permiten caracterizar los blastos, dada su distinta actividad enzimática, como consecuencia del proceso leucémico. Por otra parte, se sabe que como consecuencia del metabolismo celular alterado, hay cursos clínicos diferentes y respuesta variable al tratamiento (24). La citoquímica nos permite estudiar un tejido tan heterogéneo como lo es el hemopoyético, gracias a su capacidad de discriminación celular por las características metabólicas propias de cada línea celular.

El propósito de este trabajo cooperativo de carácter analítico y epidemiológico es tratar de obtener un mejor criterio para la clasificación de la leucemia aguda, establecer subclasificaciones de las mismas, basadas en la clasificación morfológica y citoquímica propuesto por el Grupo Francés-Americano y Británico (FAB). Creemos que este abordaje puede ser de gran utilidad para la aplicación de protocolos específicos de tratamiento.

## MATERIAL Y METODOS

El material estudiado estuvo constituido por frotis de médula ósea y sangre periférica de 252 pacientes con leucemia aguda, obtenido de los hospitales San Juan de Dios, Calderón Guardia y Nacional de Niños, en un período comprendido entre marzo de 1978 y junio de 1981. Las preparaciones fueron examinadas antes de iniciar algunas de las combinaciones terapéuticas empleadas en el tratamiento de las leucemias. Los frotis fueron teñidos con el colorante de Wright. Las tinciones citoquímicas tradicionales fueron mieloperoxidasas, reacción del ácido periódico Schiff (PAS) y sudán negro, siguiéndose para todas las pautas analíticas preconizadas por Hayhoe y Flemans (10). Las esterasas estudiadas fueron: específicas (NASDCAE o naftol AS D cloroacetato esterasa), y no específicas (NASDAE o naftol AS D acetato esterasa) y la misma reacción anterior adicionándole fluoruro de sodio (NASDAE + NaF). También se empleó  $\alpha$ -NAE ( $\alpha$ naftil ASD acetato esterasa). Para las esterasas se siguieron los instructivos y los reactivos de la Casa Sigma, E.E.U.U.

Para calificar el grado de las reacciones de

peroxidadas, sudán y PAS se hizo en cada caso cómputo sobre 100 blastos, tomándose como pauta para la caracterización citoquímica al menos un 5% de blastos positivos (3,24). El grado de positividad de las reacciones de peroxidadas y sudán negro se estableció como sigue (2): 0 ausentes,  $\pm$  a 1 reacción débil; 2+ actividad moderada; 3 a 4+ fuerte actividad. La del PAS, de la siguiente manera (2): 0 ausente,  $\pm$  a 1+ gránulos ocasionales; 2+ moderado número de gránulos; 3 a 4+ anillos o bloques presentes. También se efectuó el índice del PAS en los linfoblastos, de acuerdo a lo propuesto por algunos autores (15), finalmente, la de NASDAE y NASDAE + NaF calificándoseles como sigue: 0-1+ de 0 a 5 gránulos; 1-2+ de 5 a 10 gránulos; 2+ de 10 a 20 gránulos; 3+ más de 20 gránulos (2). Durante el desarrollo del trabajo se usaron controles normales de las diferentes líneas celulares.

La clasificación que se utilizó en este trabajo corresponde a la preconizada por el grupo FAB. (Ver cuadro en página 182).

## RESULTADOS Y COMENTARIOS

En el cuadro 1 se anotan los resultados de los 252 casos de leucemia aguda estudiados de acuerdo con su distribución por sexo y el Hospital remitente, observándose que el 45% de los pacientes fueron niños y el resto adultos, siendo la relación total masculino/femenino de 1.15. En el cuadro 2 se comparan las diferentes variedades de leucemia aguda en relación a su frecuencia según edad de los pacientes, notándose que en niños la mayor frecuencia fue de las variedades linfoblásticas, en tanto que lo fue de granulocíticas en mayores de 15 años. No se tuvo oportunidad de caracterizar ningún caso de  $L_3$ . En el cuadro 3 se señala la proporción de casos de acuerdo a la clasificación citoquímica utilizada en este trabajo, evidenciándose que aproximadamente el 75% de todas las leucemias fueron linfoblásticas y mieloblásticas y un porcentaje importante de las indiferenciadas. En el cuadro 4 se indican los hallazgos citoquímicos en 110 leucemias agudas no linfocíticas de acuerdo con los tres procedimientos analíticos de

escrutinio. En el cuadro 5 se hace una estimación cuantitativa del grado de reacción obtenido en 96 casos de leucemia aguda en los cuales fue posible realizar las siete reac-

ciones citoquímicas o tintoriales que formaron parte de nuestro protocolo diagnóstico.

\*\*\* Servicio de Hematología, Sección de Medicina, Hospital San Juan de Dios.  
 \*\*\*\* Servicio de Hematología, Hospital Calderón Guardia.  
 Trabajo subvencionado por la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica.

**Cuadro 1**  
**Distribución de los 252 pacientes leucémicos según el sexo y el hospital de referencia**

	Número de casos Hombres/Mujeres	Total
Nacional de Niños	58/56	114 (45%)
San Juan de Dios	50/33	83 (33%)
Calderón Guardia	27/28	55 (22%)

**Cuadro 2**  
**LEUCEMIA AGUDA - FRECUENCIA SEGUN EDAD**

	L <sub>1</sub> ,L <sub>2</sub> (LLA)	M <sub>1</sub> ,M <sub>2</sub> (LMA)	M <sub>3</sub> (LPA)	M <sub>4</sub> (LMM)	M <sub>5</sub> (LM <sub>c</sub> A)	M <sub>6</sub> (EL)	LI
Menores de 15 años	71.8% (79/110)	11% (12/110)	1.8% (2/110)	1.8% (2/110)	1.8% (2/110)	0.9% (1/110)	10.9% (12/110)
Mayores de 15 años	22.5% (32/142)	44.3% (63/142)	4.3% (6/142)	7.0% (10/142)	9.2% (13/142)	1.4% (2/142)	11.3% (16/142)

**Cuadro 3**  
**CLASIFICACION CITOQUIMICA DE 252 CASOS DE LEUCEMIA AGUDA DE ACUERDO AL GRUPO FAB**

TIPO DE LEUCEMIA						
L <sub>1</sub> ,L <sub>2</sub>	M <sub>1</sub> ,M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>	M <sub>6</sub>	LI
44% (111/252)	30% (75/252)	3% (8/252)	5% (12/252)	6% (15/252)	1% (3/252)	11% (1.8%)* (28/252)

\* Porcentaje que corresponde a verdaderas leucemias indiferenciadas al encontrarse 6 casos cloroacetato negativos en los últimos 126 casos estudiados de leucemias agudas.

**Cuadro 4**  
**Reacciones al sudan, peroxidadas y PAS**  
**en 110 casos de leucemia no linfocítica**

LEUCEMIA AGUDA				
	M <sub>1</sub> ,M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>
Sudan	100% (75/75)	100% (8/8)	100% (12/12)	93% (14/15)
Peroxidasas	95% (71/75)	100% (8/8)	100% (12/12)	67% (10/15)
PAS	0% (0/75)	100% (8/8)	83% (10/12)	93% (14/15)

**Cuadro 5**  
**CUANTIFICACION DE LAS REACCIONES CITOQUIMICAS**  
**EN 96 CASOS DE LEUCEMIA AGUDA**

	TIPO DE LEUCEMIA					
	L <sub>1</sub> ,L <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub> ,M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>	M <sub>6</sub>
Peroxidasas	0	+/+	+/+	+/+	0/+	+*
Sudan Negro-B	0	±/+	+/+	+/+	+/+	+*
PAS	+/+	0	+	±/+	±/+	+/+**
NASDAE	0/+	+	+/+	+++	+++	+*
NASDAE + NaF	0/+	+	+/+	+/+	0	+*
αNAE	0	0/±	0	0/+	+/+	0
NASDCAE	0	++/+	+	+	±/+	+*

\* Positividad en los mieloblastos

\*\* Eritroblastos patológicos

### 1. Leucemia Linfocítica Aguda (L<sub>1</sub>,L<sub>2</sub>,L<sub>3</sub>)

Este grupo estuvo constituido por el mayor número de pacientes 44% (111/252) (cuadro 3) con un 71.8% (79/110) en niños (cuadro 2), en tanto que en adultos los valores fueron 22.5% (32/142) (cuadro 2). Todos los casos fueron completamente negativos para las peroxidadas y el sudan negro.

La positividad al PAS varió de acuerdo a la intensidad de la reacción, de 1 a 4+,

presentándose desde unos pocos gránulos, hasta blastos con anillos perinucleares y bloques de glucógeno. Algunos fueron ligeramente positivos con NASDAE, sin presentar inhibición con NASDAE + NaF y dieron negativa la reacción para cloroacetato esterasas (cuadro 5). Seis casos 5.4% (6/111) correspondieron a la subvariedad L<sub>2</sub>, con las características morfológicas y citoquímicas de este tipo

de leucemia. Recientemente se ha caracterizado la variedad  $L_2$ , en base a los hallazgos morfológicos que se aplican en el sistema de puntuación para  $L_1$  y  $L_2$  según modificación FAB (4). Tal y como se desprende del cuadro 3 no se estudió ningún caso compatible con  $L_3$ .

## 2. Leucemia Granulocítica Aguda ( $M_1$ y $M_2$ )

Se encontraron 75 casos de este tipo de leucemia, constituyendo un 30% (75/252) de la muestra estudiada (cuadro 3). La mayoría de los casos estuvo constituido por mieloblastos morfológicamente inmaduros (sin diferenciación,  $M_1$ ) siendo el remanente a base de población blástica con ligera maduración ( $M_2$ ). Las peroxidadas fueron positivas (1 a 4+) en el 95% (71/75) de los casos y, el 100% (75/75), fueron positivos al sudan (1 a 4+) (cuadros 4 y 5). Nuestros resultados con la tinción de PAS muestran que los mieloblastos fueron completamente negativos a la presencia de glucógeno.

Comprobamos que no hay inhibición en cuanto a la positividad al NASDAE al incubar las preparaciones con fluoruro de sodio, y encontramos una ligera positividad de los blastos con  $\alpha$ NAE. La positividad con NASDCAE fue de 2 a 4+. En lo referente a su distribución etaria, en adultos constituyeron el 44.3% (63/142) de las leucemias agudas, mientras lo fue del 11% (12/110) en el grupo de niños.

## 3. Leucemia Progranulocítica ( $M_3$ )

Este tipo de leucemia comprendió el 3% de los casos (8/252) (cuadro 3). Los blastos presentaron siempre un citoplasma intensamente hipergranular y algunos con cuerpos de Auer característicamente dispuestos en forma de empalizada. El núcleo de morfología irregular con nucleolos evidentes. El grado de reacción fue de 1 a 3+ para las peroxidadas y el sudan; y de 1+ para el PAS (cuadro 5) con un 100% de positividad (8/8) a las tres tinciones (cuadro 4). Dos casos (2/8) correspondieron a la subvariedad hipogranular, con un patrón citoquímico de menor intensidad y pocos cuerpos de Auer.

La frecuencia según la edad fue en niños de 1.8% (2/110) y en adultos de 4.3%

(6/142) (cuadro 2).

## 4. Leucemia mielomonocítica ( $M_4$ )

Esta variedad granulocítica la encontramos en el 7.0% (10/142) del grupo de adultos, y en niños en el 1.8% (2/110) (cuadro 2). Esta leucemia morfológicamente heterogénea, comprendió el 5% (12/252) de los casos (cuadro 3). Fue equivalente la positividad al sudan y a las peroxidadas, de 1 a 3+, (12/12) con un 100%, en tanto que la reacción de PAS fue negativa en dos casos (10/12), dando una positividad del 83% (cuadro 4).

La  $\alpha$ NAE fue débil y la NASDCAE positiva 1+ (cuadro 5).

## 5. Leucemia monocítica aguda ( $M_5$ )

La frecuencia en adultos fue de 9.2% (13/142) y en niños 1.8% (2/110) (cuadro 2). En esta leucemia las peroxidadas algunas veces fueron negativas con un 33% (5/15), por el contrario, el sudan negro demostró una positividad del 93% (14/15) (cuadro 4), con una reacción difusa, difundida por el citoplasma, característica de los monoblastos, siendo esto válido también para la tinción de PAS. Dos de los casos (2/15) correspondieron a la subvariedad histiomonocítica, dando un perfil citoquímico semejante a las monocíticas bien diferenciadas.

Efectuamos la reacción de NASDAE y NASDAE + NaF, confirmándose lo encontrado por otros autores (2,3,6,7,8,18,19, 20,21,23,24,26) en cuanto a la inhibición de esta enzima por NaF. Usamos también el sustrato de  $\alpha$ NAE que fue positivo (1 a 3+) en los monoblastos. Todos los casos fueron negativos por cuerpos de Auer (cuadro 5).

## 6. Eritroleucemia (Síndrome de Di Guglielmo) ( $M_6$ )

Se encontraron tres casos únicamente (3/252) lo que da 1% de prevalencia de esta leucemia en los 252 casos protocolizados (cuadro 3). En niños la frecuencia fue de 0.9% (1/110) y en adultos de 1.4% (2/142) (cuadro 2).

Citoquímicamente los blastos de serie roja (algunos tri o tetranucleados), tenían gruesos bloques de glucógeno PAS posi-

tivo (3+) (cuadro 5), detalle que es característico en esta entidad, encontrándose además mieloblastos aumentados, algunos con cuerpos de Auer. La diseritropoyesis siempre fue relevante.

**7. Leucemia Indiferenciada**

Las leucemias agudas, cuyas características citoquímicas fueron negativas para las peroxididasas, el sudan y el PAS, fueron clasificadas como indiferenciadas, constituyendo el 11% (28/252) de los casos (cuadro 3). No se pudo practicar las reacciones de NASDCAE y NASDAE a

todos los casos, pues al inicio del trabajo no teníamos los reactivos necesarios. En la actualidad a las leucemias que dan este patrón citoquímico, les practicamos NASDCAE, método que identifica a la línea granulocítica. Aplicando el anterior criterio citoquímico preconizado por el grupo FAB (2,3), y con base en seis casos (6/126) plenamente estudiados se obtuvo 4.8% de positividad. La frecuencia de la LI de acuerdo con el criterio de negatividad al PAS, sudan y peroxididasas, fue en menores de 15 años de 10.9% (12/110) y en mayores de 11.3% (16/142) (cuadro 2).

**CLASIFICACION MORFOLOGICA DE LAS LEUCEMIAS AGUDAS  
(de (3), ligeramente modificada)**

**1. Leucemia linfoblástica (LLA)**

- L<sub>1</sub> : blastos pequeños, monomórficos
- L<sub>2</sub> : blastos grandes, heterogéneos
- L<sub>3</sub> : blastos tipo célula de Bürkitt

**2. Leucemia mieloblástica (LMA)**

- M<sub>1</sub> : Leucemia mieloblástica sin maduración
- M<sub>2</sub> : Leucemia mieloblástica con maduración
- M<sub>3</sub> : Leucemia progranulocítica (LPA) { hipergranular  
hipogranular
- M<sub>4</sub> : Leucemia mielomonocítica (LMM)
- M<sub>5</sub> : Leucemia monocítica (LM<sub>o</sub>A) { bien diferenciada (promonocítica-monocítica)  
pobremente diferenciada (monoblástica o histiomonocítica)
- M<sub>6</sub> : Eritroleucemia (EL)

**3. Leucemia Indiferenciada (LI):** proliferación de células morfológicamente indiferenciadas que no tienen marcadores citoquímicos.

**DISCUSION**

El diagnóstico de Leucemia Aguda (L.A.) depende del aspecto morfológico de los blastos teñidos con derivados del Romanowsky en M.O. y sangre periférica. Tres criterios comúnmente usados y aceptados para distinguir blastos de diferentes L.A. son: 1) Relación núcleo-citoplasma, 2) patrón de la cromatina nuclear y

3) aspectos de los nucleólos. La presencia de gránulos citoplasmáticos, cuerpos de Auer o núcleos con hendiduras prominentes pueden clarificar problemas diagnósticos. Frecuentemente, los blastos de L.A. no poseen ninguna característica que los distinga. Así, el hematólogo debe confiar en un criterio menos específico o proceder a efectuar tinciones citoquímicas. La tinción de Romanowsky puede producir expresiones

altamente variables de al menos dos de tres de las características apuntadas arriba (22).

De acuerdo con nuestra experiencia, apoyada por otros autores (1,2,3,6,8,14,16,17,18,19,20,21,22,23,25,27), la combinación de las características citomorfológicas y de reacciones citoquímicas en el estudio de los diferentes tipos de L.A., constituye para un laboratorio hematológico el mejor aborde diagnóstico y disminuye mucho las dificultades subjetivas que éste puede entrañar si se utiliza sólo el estudio morfológico. El número de tinciones citoquímicas empleadas puede ser limitada, y en nuestra experiencia el PAS, combinado con las reacciones de NASDCAE y  $\alpha$ NAE y sudan negro o peroxidasa ofrecen la necesaria información diagnóstica que se necesita en la mayoría de los casos.

En relación con el presente trabajo deseamos señalar algunas consideraciones. En la leucemia mieloblástica, con blastos sin ningún grado de maduración ( $M_1$ ), las tinciones de peroxidasa y sudan negro fueron de gran ayuda en el diagnóstico, mostrándose un buen grado de paralelismo en cuanto a la positividad de ambas reacciones. Sin embargo encontramos que todos los casos fueron positivos al sudan, no así la de las peroxidasa (95%), lo que le da al sudan un más alto grado de sensibilidad y de valor analítico. En forma similar a lo observado por nosotros, Flandrin (8), señala también que las reacciones de sudan y peroxidasa pueden no ser enteramente concordantes. Hay otras opiniones como las de Bennett et al. (3) que indican que la reacción de las mieloperoxidasas, o alternativamente el sudan negro B, son positivas en todas las leucemias mieloides. El principal objetivo de ambos métodos es hacer a diferenciación entre leucemia mieloblástica y la leucemia linfocítica aguda (especialmente con la  $L_2$ ), en la cual los resultados son negativos.

Se connotaba como de leucemia indiferenciada cuando el patrón citoquímico obtenido es negativo para las peroxidasa, el sudan y el PAS. En la actualidad, cuando se obtiene un patrón así, debe realizarse la tinción de NASDCAE que es una enzima marcadora de la serie granulocítica (8,17,19,21,27), siendo positiva en la gran mayoría de leucemias previamente señaladas como indiferenciadas.

Sabemos que la mieloperoxidasa es uno

de los diferentes marcadores de las células granulocíticas (19). Está presente en granulocitos neutrófilos y eosinófilos y en menor grado en los monocitos; constituye una metaloenzima que se encuentra en los gránulos primarios, no específicos o azurófilos.

La mieloperoxidasa se va perdiendo en los gránulos específicos o secundarios de los granulocitos y en los gránulos azurófilos que ocasionalmente se ven en las células linfoides; en consecuencia esto es útil para identificar células de las líneas granulocítica y monocítica. El hallazgo de actividad mieloperoxidásica en ambas líneas es indicativa de su común origen medular. Debemos estar seguros al interpretar la tinción de las mieloperoxidasas, de que las células examinadas sean neoplásicas y no células residuales normales, por lo que debemos evaluar solamente aquellas células con características nucleares inmaduras de tipo blasto.

Algunas leucemias de la línea granulocítica, tienen la particularidad de ser totalmente agranulares y su verdadera estirpe, no se puede determinar con el microscopio óptico, aun cuando apliquemos una combinación de estudio morfológico más técnicas citoquímicas. El empleo del microscopio de transmisión en estas circunstancias, es útil para observar la ultraestructura celular, pues nos permite poner en evidencia una incipiente granulogénesis característica de la naturaleza mieloides y también mediante el empleo de la citoquímica ultraestructural, estudiar la actividad peroxidásica en la cisterna perinuclear, en el retículo endoplásmico y en los gránulos que empiezan a formarse.

La tinción del sudan ha sido conocida como muy específica para grasas neutras y fosfolípidos, considerándose a la sudanofilia de los leucocitos como una combinación química aún no explicada de los colorantes con los constituyentes citoplasmáticos lipoides (14). No tuvimos ninguna reacción positiva al PAS en nuestros casos de leucemia mieloblástica, tal como ha sido reportado por algunos autores.

La tinción de PAS fue de gran ayuda en la clasificación de la leucemia linfocítica aguda. Todos nuestros casos fueron positivos en menor o mayor grado (1,6,8,15,17,18), con el glucógeno distribuido en gránulos y bloques.

El patrón citoquímico del PAS que encontramos en leucemia monocítica aguda ( $M_5$ ) y mielomonocítica ( $M_4$ ), fue característico de estas leucemias, con presencia de una granulación fina y difusa. La positividad al PAS no es una característica exclusiva de los linfoblastos (7,16) por lo que son de gran utilidad las técnicas para detectar esterasas que son marcadoras de las líneas granulocítica y monocítica y por lo tanto sirven para diferenciar estas células que son también PAS positivas.

Con base en los resultados obtenidos con la reacción del PAS, tenemos que concluir que esta es una determinación valiosa en la identificación de la leucemia linfoblástica.

Las esterasas son enzimas identificables en el citoplasma de las células granulocíticas y monocíticas. Existen dos clases de esterasas, las llamadas específicas o Naftol AS-D cloroacetato esterasa (NASDCAE) que es una enzima que predomina en los granulocitos y las no específicas o alfa naftil AS-D acetato esterasa ( $\alpha$ NAE) y Naftol AS-D acetato esterasa (NASDAE) o NASDAE + NaF que caracterizan a la línea monocítica.

La importancia de efectuar la reacción de NASDAE + NaF en aquellas leucemias con blastos sin diferenciación, radica en que nos permite distinguir entre leucemia monocítica aguda pobremente diferenciada de las otras leucemias no linfocíticas. Nuestros casos de leucemia monoblástica nos permitieron confirmar la importancia de emplear esta técnica de inhibición enzimática en la caracterización de esta entidad, al obtener una inhibición total o un cambio de la tinción inicial. Los gránulos abundantes y teñidos intensamente de la tinción, se transforman en unos pocos después de la incubación con NaF.

Las reacciones de NASDAE/NASDAE + NaF y de  $\alpha$ NAE para leucemia monoblástica fueron en su mayoría positivas, siendo negativas en las otras leucemias de este grupo.

Creemos que el número de leucemias indiferenciadas de nuestro estudio hubiera disminuido ostensiblemente si a todos los casos se les hubiera podido efectuar la reacción de las esterasas específicas y no específicas partiendo del hecho reconocido que para clasificar una leucemia aguda como indiferenciada el patrón citoquímico inicial debe ser negativo para peroxidasa-sudan-PAS

y ambas esterasas.

Finalmente debemos considerar la bondad de la citoquímica, ya que los métodos de tinción químicos, así como los que emplean marcadores enzimáticos, indiscutiblemente han probado ser útiles en el diagnóstico y clasificación de las leucemias agudas (1,2,3, 6,7,8,9,13,15,17,18,19,20,21,23,24).

En nuestro país, en un trabajo publicado en 1970 (11) se indicaba que en menores de 15 años el total de leucemia "no especificada" asociado con "leucemia indiferenciada" era del 43% y en mayores de 15 años, de 38.6%. Nuestros hallazgos en lo referente a leucemia indiferenciada señalados en los cuadros 2 y 3 demuestran claramente que por la aplicación de técnicas citoquímicas se logra reducir en gran medida el porcentaje señalado de este tipo de leucemia, obteniéndose valores mucho más bajos (4.8%).

La frecuencia según la edad de leucemia linfoblástica y mieloblástica en niños, es ligeramente inferior a lo indicado en un trabajo realizado por Jiménez (12). Si comparamos los porcentajes en mayores de 15 años para estas leucemias (cuadro 2), con los indicados en un estudio cooperativo efectuado en 1970 (11), notamos una considerable diferencia en su incidencia, lo que viene a reafirmar el hecho de que la aplicación de la citoquímica mejora definitivamente la identificación de la variedad de leucemia aguda, por lo que de no practicarse la citoquímica, la inseguridad diagnóstica por el simple estudio morfológico es muy apreciable (22).

## BIBLIOGRAFIA

1. Bennett, J.M. and Dutcher, T.F. The cytochemistry of acute leukemia: observations on glycogen and neutral fat in bone marrow aspirates. *Blood* 33: 341, 1969.
2. Bennett, J.M. and Reed, C.E. Acute leukemia cytochemical profile: Diagnostic and clinical implications. *Blood Cells* 1: 101, 1975.
3. Bennett, J.M., Catowsky, D., Marie-Therese Daniel, Flandrin, G., Galton, D.A.G., Gralnick, H.R. and Sultan, C. Proposals for the classification of the acute leukemias. *Brit. J. Haematol.* 33: 451, 1976.
4. Bennett, J.M., Catowsky, D., Flandrin, G., Galton, D.A.G., Gralnick, H.R., Sultan, C.: The French-American-British (F.A.B.) cooperative group: "The morphological classification of acute lymphoblastic leukemia: concordance

- among observers and clinical correlations". *Brit. J. Haemat.* 47: 553, 1981.
5. Boggs, D.R., Wintrobe, M.M., Cartwright, G.E. The Acute Leukemias. *Medicine* 41: 163, 1962.
  6. Catovsky, D., Sultan, C. and Bennett, J.M. Classification of acute leukemia. *Ann. Inter. Med.* 87: 740, 1977.
  7. Catovsky, D. Acute leukemia Chap. 12, 431-477 pp.; en: *Postgraduate Haematology*, 2nd. Edit. William Heinemann. Medical Books Ltd., London, 1981.
  8. Flandrin, G. and Bernard, J. Cytological classification of acute leukemias a survey of 1400 cases. *Blood Cells* 1: 7, 1975.
  9. Hayhoe, F.G.J., Quaglino, D. and Doll, R. The cytology and citochemistry of acute leukemias. Meidal Research Council, Special Report Series, N9304. London, Her Majesty's stationary office, 1974.
  10. Hayhoe, F.G.J. and Flemans, R.J. An Atlas Haematological Citology. Part. 4, 316-317 pp., Edit. Wolfe Medical Books, 1969.
  11. Jiménez, E., Martínez, M.A., Quesada, E., Elizondo, J., Zomer, M. y Cordero, R. Estudio cooperativo de leucemias en Costa Rica. *Acta Méd. Cost.* 13: 43, 1970.
  12. Jiménez, E. Capítulo de leucemia aguda, en: Elizondo, J., *Hematología*, (texto en prensa), 1981.
  13. Lee, S.L., Livings, D., James, W. et al. The morphologic classification of acute leukemias. *Cancer chemother Rep.* 16: 151, 1962.
  14. Lillie, R.D. and Burtner, H.J. Stable sudanophilia of human neutrophil leucocytes in relation to peroxidase and oxidase. *J. Histochem. Cytochem.* 1: 8, 1953
  15. Mitus, W.J., Bergna, L.J., Mednicoff, I.B. and Dameshek, W. Cytochemical studies of glycogen content of lymphocytes in lymphocytic proliferations. *Blood.* 13: 748, 1958.
  16. Palutke, Margarita and Tablazka, Pamela. Cytochemical and immunological aspects of the acute lymphocytic leukemias. (As related to FAB classification). *Ann. Clin. Lab. Sci.* 10: 269, 1980.
  17. Quaglino, D. La citochimica delle leucemie e dei linfomi. *La Ricerca Clin. Lab.* 12: 5, 1970.
  18. Shaw, M.T. The cytochemistry of acute leukemia: A diagnostic and prognostic evaluation. *Semin. Oncol.*, 3: 219, 1976.
  19. Strauchen, J.A. Enzymatic markers in hematologic malignancy. *Lab. Manag.*, 18: 33, 1980.
  20. Straus, D.J., Merterlsmann, R., Koziner, B., McKenzie, Susan, De Harven, E., Arlin, Z.A., Kempin, S., Broxmeyer, H., Moore, M.A.S., Menendez-Botet, Celia, J., Gee, T.S. and Clarkson, B.D. The Acute monocyte leukemias: Multidisciplinary studies in 45 patients. *Medicine*, 59: 49, 1980.
  21. Sundström, C. and Nilsson, K. Cytochemical profile of human haematopoietic biopsy cells and derived cell lines. *Brit. J. Haematol.*, 37: 489, 1977.
  22. Tan, H.K. and Lamberg, J.D. Diagnosis of acute leukemia. Variability of morphologic criteria. *Am. J. Pathol. Clin.* 68: 440, 1977.
  23. Villegas, A., Espinos, D., Martínez, R., Alvarez-Sala, J.L. Morfología y citoquímica de la leucemia aguda. *Sangre* 26 (5-c): 963-981, 1981.
  24. Villegas, A., Maluenda, P., Butron, R. and Espinos, D. Citoquímica de las leucemias agudas no linfoblásticas. *Sangre* 24: 431, 1979.
  25. Weinberg, J.B. and Hammar, S.P. Blast cell leukemia with IgM monoclonal gammopathy and intracytoplasmic vacuoles and Auer-body-like inclusions. *Am. J. Clin. Pathol.* 71: 151, 1979.
  26. Wintrobe, M.M. *Clinical Hematology* (Seventh edition). Philadelphia, Lea and Febiger. pp.225-229, 1478-1479, 1974.
  27. Yam, L.T., Li, C.Y. and Crosby, W.H. Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. *Am. J. Clin. Pathol.* 55: 283, 1971.