

INTERPRETACION MORFOLOGICA Y CITOLOGICA DE LA LEUCEMIA AGUDA*

Guido Arroyo**, German F. Sáenz**, Eliécer Valenciano**

Key Word Index: Acute leukemia classification, cytochemical criteria for acute leukemia classification, morphological criteria for acute leukemia classification.

Resumen

Con base en criterios estrictamente morfológicos, la leucemia aguda (LA) se ha clasificado en dos grandes grupos: linfoblásticas (LAL) y mieloblásticas (LMA) o no linfoblásticas. El grupo cooperativo de trabajo FAB propuso una clasificación basándose en hallazgos morfológicos y citoquímicos, estableciendo una serie de subgrupos: L_1 , L_2 y L_3 para las LLA, y M_0 , M_1 , M_2 , M_3 , M_4 , M_5 , y M_6 , para las LMA. Para el estudio de las leucemias agudas se recomiendan como útiles las siguientes técnicas citoquímicas que los autores han probado: mieloperoxidasas, Sudán negro B, esterasas específicas (NASDCAE) y no específicas (a NAE y NASDAE), fosfatasa ácida, PAS y ORO. Los hallazgos citoquímicos en los diferentes tipos de leucemias agudas son los siguientes: LLA (L_1 , L_2 , L_3): mieloperoxidasas y Sudán negro B negativos; NASDCAE negativa; NASDAE ligeramente positiva a negativa; a NAE en medio ácido y a NBE presentan positividad con grumo grueso unipolar (linfocitos T); fosfatasa ácida positiva con gránulo polar centrosómico (linfocitos T); PAS positividad con gránulos finos (L_2) y gránulos gruesos o concreciones (mazacotes) (L_1). Negatividad en L_3 ; ORO positivo en L_3 (blastos tipo Burkitt). LMA (M_1): mieloperoxidasas y Sudán negro B positivas; NASDCAE positiva, en raros casos negativa; NSDAE positividad discreta, la cual persiste después de incubación con fluoruro sódico. M_2 : mieloperoxidasas, Sudán negro B, NASDCAE y NASDAE con mayor positividad que en M_1 ; NASDAE persiste después de incubación con fluoruro sódico. M_3 : fuerte positividad con mieloperoxidasas, Sudán negro B y NASDCAE; PAS con positividad difusa. M_4 : mieloperoxidasas, Sudán negro B y PAS con positividad variable con gránulos distribuidos discretamente en el citoplasma. En nuestra experiencia, a NAE es mejor que NASDAE para calificar componente monocítico; a NAE y NASDAE dan inhibición parcial después de incubación con fluoruro sódico; NASDCAE, positiva en la línea granulocítica. El empleo de ambas reacciones es de utilidad en el diagnóstico de esta variedad M_4 . M_5 : mieloperoxidasas pueden ser negativas a positivas. Sudán negro B siempre positivo en nuestra experiencia y PAS de reacción difusa. Estos tres dan granulación esparcida citoplasmáticamente; a NAE fuertemente positiva que se inhibe totalmente o a escasos gránulos con fluoruro sódico. NASDAE, en nuestra experiencia, con menos positividad que a NAE; NASDCAE negativa. M_6 : mieloperoxidasas y Sudán negro B positivas en mieloblastos. PAS y a NAE positivas en eritroblastos tardíos y en sus precursores M_6 : mieloperoxidasas, Sudán negro B, PAS y esterasas específicas y no específicas, negativas. [Rev. Cost. Cienc. Méd. 1983; 4(Sup. 1):31-46].

Introducción

El diagnóstico de leucemia aguda (LA) se realiza efectuando un cuidadoso análisis citomorfológico de sangre periférica y de médula ósea, en preparaciones teñidas con coloran-

* Presentado en el IV Congreso de Microbiología, Parasitología y Patología Clínica, San José, Costa Rica, 28 Nov.—1° Dic. 1982.

** Cátedra de Hematología, Departamento de Análisis Cínicos, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

tes derivados del Romanowsky Recientemente, el grupo cooperativo FAB (Francés— Americano— Británico) (2,6) publicó una nueva clasificación de las leucemias agudas (Cuadro 1) basada en el estudio morfológico de los blastos de sangre periférica y médula ósea, en unión de algunas reacciones citoquímicas que han demostrado ser de gran ayuda en la caracterización de las diferentes variedades de LA.

CUADRO 1
CLASIFICACION MORFOLOGICA DE LAS LEUCEMIAS AGUDAS
(FAB 2,6)

-
1. Leucemia linfoblástica (LLA)
 - L₁: blastos pequeños, monomórficos
 - L₂: blastos grandes, heterogéneos
 - L₃: blastos tipo célula de Bürkitt

 2. Leucemia mieloblástica (LMA)
 - M₁: Leucemia mieloblástica sin maduración
(> 3% de blastos peroxidasa o Sedán positivos o gránulos azurófilos; ± cuerpos de Auer)
 - M₂: Leucemia mieloblástica con maduración
(> 50% células = mieloblastos + progranulocitos)
 - M₃: Leucemia progranulocítica (LPA) — Hipergranular
— Hipogranular o microgranular (M_{3m})
(la mayoría de las células son progranulocitos anormales; cuerpos de Auer frecuentes; algunos en empalizada)
 - M₄: Leucemia mielomonocítica (LMM)
(> 20% componente monocítico; > 20% mieloblastos + progranulocitos)
 - M₅: Leucemia monocítica (LM₀ A) — bien diferenciada (promonocítica, monocítica)
— pobremente diferenciada (monoblástica o histiomonocítica)
 - M₆: Eritroleucemia (EL) (> 50% células = eritroides, anormales; o > 30% células eritroides + 10% de células eritroides bizarras + > 30% mieloblastos y progranulocitos; ± cuerpos de Auer, ± megacariocitos anormales)

 3. Leucemia indiferenciada (LI o M₀): proliferación de células morfológicamente indiferenciadas, que no presentan marcadores citoquímicos.
-

El propósito de la clasificación del FAB es, primordialmente, ayudar a distinguir entre LLA y LMA. No hay una única prueba bioquímica o citoquímica asequible para el diagnóstico de certeza de LA. Sin embargo, la citoquímica puede ser esencial para su clasificación. Se reconocen tres tipos de leucemia linfocítica aguda (Cuadro 2). L₁, es

CUADRO 2
CLASIFICACION DE LAS LEUCEMIAS AGUDAS
DE DIFERENCIACION LINFOIDE
(FAB 2,6)

Características	L ₁	L ₂	L ₃
Tamaño	Pequeño, hasta dos veces el linfocito.	Grande, Heterogéneo en tamaño.	Grande y homogéneo.
Cromatina	Homogénea en cada caso.	Heterogénea.	Finamente punteada y homogénea.
Contorno nuclear	Regular, identaciones ocasionales.	Irregular. Identación.	Regular. Oval o redondo.
Nucleolo	No visible o pequeño.	Uno o más a veces grande.	Prominente o más vesiculoso.
Citoplasma	Escaso.	Variable, a veces moderadamente abundante.	Moderadamente abundante. con múltiples vacuolas que se superponen incluso al núcleo.
Basofilia citoplasmática.	Ligera o moderadamente intensa.	Variable.	Muy intensa.
Vacuolas citoplasmáticas	Variables	Variables	A menudo prominentes.
PAS	Positivas en porcentaje elevado.	Escasamente positivas.	Negativa.

la variedad más común en niños; se caracteriza por blastos pequeños con poco citoplasma y el núcleo bastante regular. Los blastos en L₂ presentan características heterogéneas: la mayoría son células grandes semejantes a la M₁, el núcleo es a menudo irregular, el citoplasma es abundante y uno o más nucleólos prominentes. Esta forma es más común en adultos y presenta problemas para su diferenciación con la L₁ (Cuadro 3). La L₃, presenta blastos homogéneos, grandes y de citoplasma basófilo, siendo los hallazgos morfológicos idénticos a los que se observan en las células del linfoma de Burkitt.

CUADRO 3

SISTEMA DE PUNTUACION PARA DIFERENCIAR L₁ y L₂, SEGUN MODIFICACION FAB (2, 6, 10)

(L ₁)	+	Alta relación núcleo/citoplasma de $\geq 75\%$ de las células.
(L ₂)	-	Baja relación núcleo/citoplasma de $\geq 25\%$ de las células.
(L ₁)	+	Nucleolos: 0 a 1 (pequeño) $\geq 75\%$ de las células.
L ₂	-	Nucleolos: 1 ó más (prominentes) $\geq 25\%$ de las células.
L ₂	-	Células grandes ≥ 50 por ciento de las células.
L ₂	-	Membrana nuclear irregular $\geq 25\%$ de las células.

No se valoran:	Criterios intermedios o indeterminados. Membrana nuclear regular $\geq 75\%$ < 50 por ciento de células grandes.
Se consideran:	L ₁ : Si hay de 0 a 2 puntos positivos. L ₂ : Si hay de 1 a 4 puntos negativos.

La mayoría de las categorías de LMA pueden ser reconocidas en las preparaciones teñidas. La M₁ muestra una clara diferenciación mieloblástica-promielocítica y, a menudo, más allá de esos dos estadios, con mielocitos anormales y neutrófilos agranulados o de tipo Pelger. La eritropoyesis, si está presente, también aparece anormal. La M₄ muestra cuadros similares a la M₂, pero con un componente monocítico manifiesto, particularmente en sangre periférica. La M₂, M₄ y la M₆ deben ser distinguidas de la anemia refractaria con exceso de blastos y de la leucemia mielomonocítica crónica, particularmente en pacientes ancianos. La M₃ sería reconocida por su cuadro morfológico característico: predominio de progranulocitos densamente granulados en la médula ósea, a menudo con múltiples cuerpos de Auer; en algunos casos los gránulos son menos abundantes, siendo esta variedad la llamada M₃ microgranular (15). El núcleo es típicamente bilobulado con un aspecto monocitoide. El reconocimiento de M₁ y M₅ puede necesitar la demostración citoquímica de una diferenciación mieloide. La M₁ da el aspecto de ser pobremente diferenciada a pesar de que algunas veces la presencia de un solo cuerpo de Auer hace el diagnóstico más fácil.

La M₅ tiende a presentarse como una forma inmadura caracterizada por grandes blastos con un abundante citoplasma de tinte grisáceo. La forma bien diferenciada de M₅ puede a menudo ser identificada en sangre periférica. La variedad M₆ presenta eritroblastos bizarros y a menudo un alto número de eritroblastos en sangre periférica con una concomitante población blástica que no infrecuentemente muestra cuerpos de Auer únicos. La denominada leucemia indiferenciada (LI o M₆) está constituida por una proliferación de células morfológicamente indiferenciadas que tienen la característica de no poseer marcadores citoquímicos.

Las tinciones citoquímicas de las células leucémicas ofrecen mucha información útil. Los extendidos de sangre periférica y médula ósea poseen la ventaja de no estar seccionados

—a diferencia con lo que sucede con los cortes histológicos—: es fácil ver la estructura detallada de la célula. Además, las técnicas emplean breves tiempos de fijación y de tinción y los reactivos parecen penetrar bien la pared celular. Básicamente las reacciones tintoriales que se usan para identificar células leucémicas son de dos tipos: enzimáticas y químicas. En el grupo de técnicas enzimáticas se encuentran las de las mieloperoxidasas, esterasas específicas y no específicas y fosfatasas leucocitarias alcalinas y ácidas; en las no enzimáticas, la de PAS, rojo oleoso O (ORO) y Sudán Negro B. El detalle de estas reacciones se encuentra en el Anexo 1 de esta revisión.

Interpretación Morfológica de la Leucemia Aguda

En la leucemia aguda la cromatina nuclear puede ser reticular o no, los nucleolos ausentes o presentes y el color del nucleolo y la morfología de los mismos puede variar con la tinción. Todos estos cambios se pueden inducir simplemente cambiando la tinción empleada sobre la misma población blástica. Las características citoplasmáticas se usan menos frecuentemente para distinguir células blásticas. Sin embargo, los cuerpos de Auer o los gránulos citoplasmáticos son decisivos en un diagnóstico dado, estando ellos también sujetos a las variaciones técnicas de la tinción panóptica. Estas observaciones enfatizan un número de preguntas fundamentales acerca del criterio morfológico en el diagnóstico de LA. Existen al menos dos abordajes o criterios del problema diagnóstico. El primero busca los criterios más sutiles con los colorantes del Romanowsky. Sin embargo, la lista de características morfológicas no en todos los casos sirve para la aplicación de los criterios diferenciales entre células inmaduras a pesar de que el origen del espécimen o la compañía de células normales pueda determinar el diagnóstico. Los proponentes de este punto de vista consideran que la morfología es más un arte que una ciencia por lo que, particularmente, la distinción morfológica entre linfoblastos y mieloblastos “mejor debe ser vista que descrita” (20). Tan y Lamberg (20) citaron como alentador un 94 por ciento de reproducibilidad en el diagnóstico morfológico de LA cuando los mismos casos fueron examinados por un mismo investigador a diferentes tiempos. Esto, sin embargo, confirma precisión, no exactitud, y atestigua más el arte de aplicar criterios reproducibles que la aceptación general de estos criterios citomorfológicos diagnósticos. Respecto del problema de exactitud, Lee *et al.* (8), como parte de un grupo de estudio de LA, remitieron de nuevo 42 casos de LA a diferentes instituciones para un re-diagnóstico. Diez de 33 casos (30%) fueron reclasificados. En nueve de 42 (21%) se falló en dar algún acuerdo sobre el diagnóstico y solamente en 13 de los 42 casos (31%) se obtuvo acuerdo unánime. Estas observaciones sugieren fuertemente que el criterio diagnóstico puede no ser aplicado uniformemente, sea dentro de una institución o de institución a institución. Así, mientras el criterio morfológico derivado de la experiencia con una tinción podría ser utilizado uniformemente, no puede garantizarse su aplicación a un material tratado con otro derivado del Romanowsky.

El segundo abordaje ha sido establecido en base a tinciones citoquímicas que suplementan la información morfológica obtenida de frotis teñidos con Romanowsky (Cuadro 2). Esta conducta ha sido criticada como simplemente un procedimiento que confirma lo que se ve en las tinciones panópticas (22). Un serio problema surge, sin embargo, cuando el hematólogo observa un frotis teñido que le sugiere un diagnóstico, y las tinciones histoquímicas son contradictorias. Aún invocando que el abordaje ci-

toquímico son contradictorias. Aún invocando que el aborde citoquímico admite “una cierta falta de lógica”, el verdadero valor de la información citoquímica se daría por el número de veces en que se confirmara el diagnóstico obtenido por el material teñido por Romanowsky. En este sentido la mejor investigación dirigida para evitar las “trampas” de ambos métodos fue hecha por Hyhoe *et al.* (7). En este estudio, 25 muestras de M.O. teñidas con May-Grünwald-Giemsa, fueron analizadas en conjunto con las tinciones citoquímicas de PAS, Sudán negro B y peroxidasa. Fueron utilizados métodos estadísticos para derivar 11 características morfológicas. Sobre esta base, se obtuvieron cuatro subgrupos diagnóstico de LLA. Sin embargo, en este estudio la relación núcleo-citoplasma fue la única característica definida por el Romanowsky. Investigaciones previas han asumido que todas las tinciones de Romanowsky producen características similares dentro de una población blástica dada (20). Otras observaciones (20) documentan que esta asunción es incorrecta, pues se han demostrado características morfológicas marcadamente diferentes de los blastos cuando se emplean diferentes tinciones de Romanowsky, siendo la relación núcleo-citoplasma (20) la única característica constante no afectada por las diferentes tinciones Romanowsky tal y como ya lo habían advenido Hayhoe *et al.* (7). Se ha señalado que la tinción de May-Grünwald-Giemsa presenta la mayor variabilidad citomorfológica respecto a las características panópticas del Romanowsky (20).

Interpretación Citoquímica

Leucemia Linfocítica Aguda (L₁, L₂, L₃):

Los blastos son negativos para el Sudán negro B, peroxidasa y naftol — ASD — cloroacetato esterasa. El diagnóstico de LLA no se puede hacer con certeza hasta que el Sudán negro B o la reacción de las peroxidasa se hayan efectuado y se demuestre que los blastos son totalmente negativos. En unos pocos casos de L₂ se observan escasos gránulos azurófilos, pero estos son Sudán negro B y peroxidasa negativos. La NASDA puede ser débilmente positiva y no hay inhibición con fluoruro sódico. La reacción de ANAE (alfa-naftil esterasa ácida) puede ser muy positiva con localización unipolar, reaccionando con mayor intensidad los blastos de LLA-T y pre-T. En LLA No-B No-T, la ANAE se encuentra en un positivismo variable, mucho menor que en LLA-T (87%). En las LLA la fosfatasa ácida se caracteriza por su gran positividad, con una característica disposición centrosómica, encontrándosele en los linfoblastos T y pre-T en un 90 por ciento de los casos, mientras que la técnica es negativa en aproximadamente 90 por ciento de los casos de leucemia No-T (4). El uso combinado del PAS y la fosfatasa ácida es empleado por algunos autores para diferenciar los blastos de la forma LLA No-T No-B, de los de LLA-T. De esta suerte se encuentra que los blastos son fuertemente positivos a la fosfatasa ácida y PAS negativos aproximadamente en un 75 por ciento de los casos de LLA-T, hallándose lo contrario en los pacientes con la forma común No-T No-B (4). La tinción de PAS ha suscitado una gran polémica sobre su empleo en el estudio de la leucemia aguda y en modo muy particular en la LLA. Desde las publicaciones de Hayhoe *et al.* (7) la gran mayoría de los casos de LLA muestran una positividad al PAS en bloques de diferente tamaño (mazacotes). El número de blastos positivos puede ser muy variable pero es sin duda significativo. El autor argumenta que los linfoblastos en ocasiones pueden ser PAS negativos, siendo esto un hecho más bien raro, puesto que se encuentra este tipo de hallazgo en menos de un 5 por ciento de los casos. Otros autores señalan cifras de LLA PAS positivos

CUADRO 4
CLASIFICACION DEL FAB DE LAS LEUCEMIAS AGUDAS (12)
CARACTERIZACION CITOQUIMICA

	REACCIONES CITOQUIMICAS					
	PAS	Peroxidasas o Sudán negro B	NASDAE	NASDA + NaF	NASDCAF	Lisozima
L ₁	+++/-	-	+/-	+/-	-	-
L ₂	+++/-	-	+/-	+/-	-	-
L ₃	+++/-	-	+/-	+/-	-	-
M ₁	+/-	+	+	+	+++/+	-
M ₂	+	+++	++	++	++	+
M ₃	+	+++	++	++	+++	+
M ₄	++/+	++	+++	++/+	***	++
M ₅	++/+	+/-	+++	+/-	-	+++
M ₆	++/0*		+++/0*		***	

+ = 3% de células positivas.

++ = 25% de células positivas.

+++ = 50% de células positivas.

* En eritroblastos.

** En mieloblastos.

Los encuadrados indican resultados característicos.

de hasta un 60 por ciento (5). Arroyo *et al.* (1) manifiestan en su trabajo que la tinción de PAS fue de gran ayuda en la clasificación de la LLA, pues todos los casos de LLA fueron positivos en menor o mayor grado, con el glucógeno distribuido en gránulos o bloques, siendo en estos casos invariablemente negativos, en L₁ y L₂, las peroxidasas, el Sudán negro B y las esterasas específicas y no específicas. No obstante al no ser la positividad al PAS una característica exclusiva de los linfoblastos (4, 15), son de gran utilidad las técnicas para detectar esterasas que sabemos son marcadores de las líneas granulocítica y monocítica. Algunos autores han tratado de correlacionar la intensidad de la reacción del PAS con las variedades de LLA, encontrándose aquella muy elevada en las formas No-T, No-B. y descendida en LLA-T (11). En la L₃, el PAS es negativo (10).

La lisozima sérica (muramidasa) en las LLA se encuentra en valores sumamente bajos, los cuales tienden a normalizarse después de una remisión completa.

Leucemia mieloblástica aguda (variedad M₁):

De acuerdo al criterio de Hayhoe (7), más del 5 por ciento de los blastos y usualmente más del 85 por ciento de ellos, presentan una intensa tinción positiva granular citoplasmática o yuxtannuclear con el Sudán negro B; generalmente las peroxidasas tienen este mismo patrón citoquímico. El estudio del tipo de tinción que muestran los mieloblastos

inmaduros o los progranulocitos muy jóvenes, es importante. Ocasionalmente los blastos fallan en la demostración de estas reacciones si ellos no muestran ningún desarrollo de gránulos azurófilos. Pero también tenemos casos en que no se observan gránulos con el colorante de Wright y sin embargo estos blastos son peroxidasa y Sudán negro B positivos. La NADSCAE es positiva en los granulocitos y sus precursores, aunque si estos últimos son muy inmaduros y carecen de gránulos azurófilos, esta esterasa puede ser totalmente negativa. La NASDA puede ser débilmente positiva y no se inhibe con el fluoruro sódico. Por otra parte, la alfa-naftil-acetato o la alfa-naftil-butirato-esterasa (no específicas) son negativas. En lo que respecta a la muramidasa se pueden obtener valores normales o en el límite alto. Es frecuente encontrar en M_1 una débil positividad a la fosfatasa ácida. La tinción de PAS en casos esporádicos puede ser difusa o con finos y escasos gránulos en algunos pocos blastos. La fosfatasa alcalina es usualmente baja, lo que sugiere que los neutrófilos derivan de los blastos leucémicos (21, 22). Los bastones de Auer son mieloperoxidasa, Sudán negro B, PAS, NADSCAE y fosfatasa ácida positivos.

Variedad M_2 :

La mieloperoxidasa, el Sudán negro B, y NADSCAE tienen mayor positividad que en la M_1 . Empleando como sustrato a NAE o la a NBE se obtienen resultados negativos. La muramidasa sérica se encuentra ligeramente elevada.

Variedad M_3 :

Presenta gruesas y abundantes granulaciones que ocupan la mayoría del citoplasma y en ocasiones cubren el núcleo (tipo hipergranular). La positividad es muy fuerte a las peroxidasas, Sudán negro B y NASDCAE. Son negativas las estererasas a NAE y a NBE. La reacción al PAS es variable en intensidad. Los valores de muramidasa sérica son bajos. Frecuentemente se observan cuerpos de Auer en empalizada, disposición característica de esta variedad, así como la morfología nuclear aberrante y el hecho de que es de curso grave o fulminante, caracterizado por sangrado por coagulopatía de consumo el cual es más severo de lo que podría esperarse de acuerdo al grado de trombocitopenia.

Variedad M_4 :

Las peroxidasas y el Sudán negro B son positivos, con gránulos finos distribuidos por el citoplasma, en menor cantidad que en la serie granulocítica. De acuerdo a la proporción en que se encuentran el componente monocítico y el granulocítico, las reacciones serán positivas en menor o mayor cuantía. La a NAE es positiva en los monocitos y su empleo se recomienda en lugar de NASDA por ser más específica (16, 19, 20), observándose mejor el componente monocítico. Para diferenciar mejor las líneas granulocítica-monocítica es preferible el emplear una combinación de técnicas tales como a NAE o NASDA con NADSCAE (1, 13, 16, 21, 22, 24). La lisozima sérica frecuentemente está elevada, más de 50 $\mu\text{g/ml}$, y existe marcada lisozimuria (21).

Variedad M_5 :

Las mieloperoxidasas pueden ser negativas aproximadamente en la mitad de los casos (6). El Sudán negro B demostró tener mayor sensibilidad en base a un trabajo previo (1). Con ambas tinciones se observa una granulación fina, difusamente esparcida por el citoplasma, siendo esto válido también para la tinción de PAS. En cuanto a la NASDCAE, la gran mayoría son negativas; sin embargo, nosotros obtuvimos a veces reacciones débilmente positivas (1). Con NASDAE, o preferiblemente con a NAE, la reacción es muy po-

positiva, inhibiéndose total o parcialmente con fluoruro de sodio con presencia de escasos gránulos después de la incubación. El mismo resultado se obtiene con alfa-naftil-butirato que también es un sustrato muy sensible para detectar la actividad esterásica en monocitos y precursores. Esta reacción cobra importancia en las leucemias que presentan blastos sin diferenciación, pues nos permite hacer la diferencia entre leucemia monocítica aguda pobremente diferenciada de otras leucemias no linfocíticas, en donde esta esterasa no se inhibe luego de la incubación con fluoruro de sodio. Por consiguiente al ser esta esterasa marcadora de la línea monocítica, esta reacción tiene especial importancia (1, 2, 3, 5, 7, 12, 13, 14, 16, 18, 19, 21, 22, 23). En esta leucemia se encuentran valores muy elevados de muramidasa en suero y orina (21).

Variedad M₆:

Los eritroblastos normalmente son PAS negativos y permanecen siéndolo en varias enfermedades, incluyendo la anemia megaloblástica. Sin embargo, en la EL algunos de los precursores eritrocíticos en todos los estadios de maduración anormal muestran una fuerte positividad a la tinción de PAS. Esta es granular en los eritroblastos jóvenes y difusa en los estadios más maduros. La ausencia de eritroblastos PAS positivos no excluye el diagnóstico de eritroleucemia. En todo caso, lo usual es encontrar más de un 85 por ciento de eritroblastos PAS positivos con grumos y gránulos en esta enfermedad. Estas células muestran una actividad aumentada de a NAE y a NBE (7). Se ha indicado positividad a esta reacción en los eritroblastos de la anemia por deficiencia de hierro, en talasemia y en la anemia sideroblástica o anemia refractaria con dishematopoyesis (7). Esta última entidad clínica forma parte de un grupo heterogéneo, como forma crónica del síndrome de Di Guglielmo.

Finalmente en la eritroleucemia un número aumentado de células inmaduras de estirpe granulocítico son positivas a todas las reacciones citoquímicas que caracterizan a los mieloblastos.

Discusión y Conclusiones

Para el diagnóstico de leucemia aguda la combinación de las características citomorfológicas con tinciones histoquímicas, permite obtener un panorama discriminatorio de la línea celular incriminada. La citoquímica reduce en gran parte las subjetivas interpretaciones de la citomorfología, permitiéndose llegar a un diagnóstico de certeza que asegure la aplicación del protocolo terapéutico adecuado. Desde un punto de vista morfológico el diagnóstico de LA se hace en frotis de sangre periférica, como también de aspirados de médula ósea. Rara vez se requiere biopsia de médula ósea para demostrar la infiltración leucémica cuando los aspirados no son exitosos. Esta situación puede ocurrir como resultado de una densa infiltración celular y/o un incremento de fibras de reticulina. El diagnóstico de LA no siempre puede ser sencillo o claro. Los casos de LLA siempre muestran una médula ósea hiper celular casi totalmente reemplazada por células blásticas indiferenciadas con varios grados de homogeneidad. En formas aleucémicas es esencial obtener un buen espécimen de médula ósea (aspirado o biopsia), a fin de excluir la anemia aplásica. En casos con leucocitosis y células linfocíticas atípicas debe ser considerada la posibilidad de una mononucleosis infecciosa, particularmente si los otros elementos sanguíneos no se hayan afectados y hay una historia sugestiva de fiebre, faringitis y linfadenopatía

cervical. La LMA presenta pocos problemas diagnósticos cuando la población celular predominante en médula ósea es a base de blastos con o sin comprometimiento significativo en sangre periférica. Sin embargo, varias formas de LMA, como aquellas con una maduración significativa granulocítica o monocítica y/o con marcada dismielopoyesis (por ejemplo M_2 , M_4 y M_6 de la clasificación del FAB), pueden presentar problemas en su distinción con estados dismielopoyéticos o con desórdenes mieloproliferativos atípicos (2, 6, 22). Un mínimo requerimiento para un diagnóstico de LMA sugerido por el grupo FAB es la presencia de al menos 50 por ciento de células leucémicas en la médula ósea. Ellas podrían ser mieloblastos más promielocitos (M_1 — M_3) o monoblastos más promonocitos o monocitos anormales (M_5) o una mezcla de ellos (M_4). En casos de duda la aspiración de la médula ósea debe repetirse. La presencia de cuerpos de Auer es un hallazgo único en LMA y su demostración es útil en la solución de un problema diagnóstico determinado. La histiocitosis maligna, es una condición hematológica maligna que ocasionalmente presenta problemas diferenciales con LMA pues recuerda a la leucemia monocítica (M_5). Sin embargo, en la histiocitosis maligna siempre hay como regla células anormales monocítico-macrofágicas que muestran todos los grados de maduración desde promonocitos hasta macrófagos hiperfagocíticos totalmente desarrollados, en tanto que en las dos formas de M_5 del FAB, el cuadro predominante es un monomorfismo. Desde el punto de vista citológico, se puede usar un determinado número de reacciones a fin de definir más exactamente las LMA de las LLA, así como las variedades de las primeras. Las pruebas más útiles para distinguir M_1 y M_5 de M_2 son las tinciones de peroxidasa y Sudán negro B (ambas positivas en M_1) y la Naftol-ASD-acetato esterasas (NASDA) sensible al NaF (positiva en M_5), siendo ambas negativas en todas las formas de LLA. Otras pruebas citológicas proveen una información adicional la cual puede ser útil en casos individuales. Por ejemplo, la actividad de lisosima demostrada en los propios blastos o en el suero es una característica de las formas diferenciadas de leucemia monocítica (M_4 y M_5), pero podría ser negativa en el tipo monoblástico. La reacción de PAS, a pesar de la opinión de algunos hematólogos, es de valor para la diferenciación de las variedades de LLA. Se ha señalado que esta reacción es negativa en el 20-30 por ciento de las formas de LLA (4, 5), particularmente en casos de una bien definida naturaleza linfocítica, por ejemplo, LLA—T y LLA—B. En un trabajo previo, Arroyo *et al.* (1), han indicado la bondad del PAS en el diagnóstico de LLA. En forma similar otros autores señalan lo mismo (2, 6, 7). Catovsky, contrario de otros autores (4), señala el PAS negativo para la L_3 . En la ausencia de otras reacciones positivas un PAS positivo puede ser usado para sostener el diagnóstico morfológico de LLA. En algunos casos la M_4 ó la M_5 pueden mostrar una moderada granulación. La reacción de las fosfatasa ácida es moderada a fuertemente positiva en algunos casos de LMA, particularmente en la M_5 . El patrón de reacción en estos casos es difuso en todo el ámbito del citoplasma. En contraste, en una pequeña proporción de casos de LLA, particularmente aquellos con marcadores de células T, la reacción es fuerte y localizada en la zona de Golgi en la mayoría de los blastos. El valor de esta reacción en LLA es relevante solamente si las reacciones citológicas específicas para enzimas mieloides (peroxidasa y NASDCAE) son negativas. Las reacciones de peroxidasa y Sudán negro B también son útiles no sólo para detectar cuerpos de Auer, sino también para el reconocimiento de neutrófilos maduros con una deficiencia en gránulos primarios (los cuales contienen peroxidasa); esta anomalía se ha visto en M_2 , M_4 y M_6 , así como también en síndromes mielodisplásicos, por lo que su presencia sugiere una maduración granulocítica defectuosa. Estos neutrófilos agranulares presumiblemente derivan de un clono leucémico o preleucémico (12).

ANEXO

Generalidades sobre los Procedimientos Citoquímicos en el Diagnóstico de Leucemia Aguda

I. Mieloperoxidasas:

La peroxidasa celular transfiere hidrógeno de la bencidina u otro sustrato al peróxido de hidrógeno, produciéndose un derivado azul o verde del sustrato en el sitio de actividad de la enzima. Las mieloperoxidasas son enzimas que se encuentran en plantas y bacterias. Están formadas por una proteína unida a un grupo prostático, el cual se haya formado por un anillo de hemoporfirina. Las encontramos en las granulaciones azurófilas de las series granulocítica y monocítica (21,22), y en ocasiones se observan en el citoplasma de células indiferenciadas, totalmente desprovistas de gránulos al Romanowsky. En los granulocitos, se observan mieloperoxidasas cuando se desarrolla la granulación. Los linfocitos y sus precursores son, por el contrario, negativos. El valor de esta reacción es para el diagnóstico de LMA y, por lo tanto, para la exclusión de la LLA. En el diagnóstico diferencial se toma como límite de seguridad un 5 por ciento de mieloblastos positivos (7). En los monocitos se observa una tenue positividad en forma de pequeña granulación. Algunos monoblastos muy indiferenciados son negativos (1). Las técnicas para mieloperoxidasas a nivel ultra estructural ha permitido un mejor diagnóstico de los casos de LMA muy indiferenciados, con sudanofilia negativa o débilmente positiva (21, 23). En los cortes histológicos la tinción de mieloperoxidasas no se puede realizar (21) debido a la presencia de peróxido, el cual inhibe la reacción.

II. Tinción del Sudán negro B:

El Sudán negro B es una sustancia colorante neutra de la serie diazoica que tiñe diversos lípidos, como esteroides, grasas neutras y en particular, fosfolípidos (9). Aunque el mecanismo de la reacción no se conoce con exactitud, sí sabemos que el grado de sudanofilia corre paralelo, generalmente, con la reacción de las mieloperoxidasas. Aparentemente tiñe en los neutrófilos los gránulos azurófilos y los específicos, contrario a las peroxidadas que se encuentran únicamente en los gránulos azurófilos (12). Se observa una reacción positiva en los mieloblastos y en todos los elementos maduros de la serie granulocítica, siendo la intensidad de la coloración mayor conforme más maduros son los elementos de esta línea. En los monocitos y sus precursores se obtiene una respuesta positiva al Sudán negro B, pero la imagen es de gránulos dispersos por el citoplasma. En los mieloblastos muy maduros esta reacción se localiza en posición yuxtannuclear en la zona del aparato de Golgi. La línea linfocítica es negativa para esta tinción. Esta reacción no se puede efectuar en cortes histológicos, puesto que con la deshidratación se eliminan los fosfolípidos tisulares.

III. Esterasas:

Son enzimas hidrolíticas capaces de degradar al sustrato naftol AS- D o alfa naftol de sus ésteres, acoplándose luego estos a colorantes diazoicos. En el campo de la patología hematológica cuatro sustratos para estas enzimas han demostrado ser útiles: el naftol—

ASD—cloracetato (NASDCAE) que es específico para serie granulocítica y el naftol—ASD—acetato (NASDAE), el α naftil acetato (α —NAE) y el α naftil butirato (α —NBE) que determinan esterases inespecíficas.

a) Naftol—ASD—cloroacetato (NASDCAE)

Con este sustrato son positivas las células de estirpe granulocítico, manifestándose su actividad en los gránulos azurófilos y en los bastones de Auer. La intensidad de la reacción enzimática es mayor conforme avanza el estadio madurativo celular. La reacción es negativa para los linfocitos y monocitos y sus precursores, y generalmente esto es también válido para las series eritrocítica y megacariocítica. En algunas LMA (M_1) que presentan blastos muy indiferenciados la NASDCAE puede ser negativa y la mieloperoxidasa y el Sudán negro B positivos; o sea que la positividad no siempre es paralela, como lo es generalmente entre las dos técnicas no enzimáticas citadas. Su empleo a nivel tisular es de gran valor para diferenciar tejido granulocítico, tal como sucede con las masas tumorales del cloroma y en los procesos de granulopoyesis extramedular.

b) Naftol—ASD—acetato (NASDAE)

Con este sustrato se obtiene una marcada positividad con la línea monocítica y menos intensa en la granulocítica. Sin embargo, esta esterasa inespecífica puede presentar positividad de distinto grado con todas las células hemáticas (21). Se convirtió en una reacción particularmente útil al introducirse en la reacción el fluoruro sódico. Con este, se inhibe la actividad previamente positiva de los monocitos, mientras que permanece inalterable en las células granulocíticas y en el resto de las células hemáticas. Este hecho cobró importancia en el diagnóstico de la $LM_0 A (M_5)$, pues en los mieloblastos (M_1 y M_2) y en la LPA (M_3) no se presenta ninguna inhibición enzimática luego del tratamiento con el fluoruro sódico.

Si empleamos las tinciones enzimáticas NASDCAE y NASDA en asociación, podemos obtener información de utilidad para identificar el componente monocitoide en la LMM (2, 13, 14, 19, 21, 22).

c) Alfa—naftil acetato esterasa (α —NAE)

En nuestro criterio (1) este sustrato es más específico que NASDAE, para identificar serie monocítica, y muchos autores (18, 21) coinciden con ello, considerándolo como el más específico para el diagnóstico de la $LM_0 A$. Con la α —NAE la reacción es intensa en la serie monocítica y es negativa o no se puede valorar en mieloblastos y linfoblastos. Por otra parte, en la eritroleucemia y en la anemia megaloblástica pueden verse gruesos gránulos de α —NAE en los eritroblastos anormales. Utilizando este sustrato a pH 5,8 (3) y con una incubación prolongada, se obtiene una granulación unipolar de α —NAE en el citoplasma de linfocitos, posiblemente de células T. En la actualidad se considera a la alfa-naftil acetato esterasa ácida (ANAE) como una técnica de gran aplicación en el estudio de los linfocitos (4). La actividad de esta enzima es semejante a la de la fosfatasa ácida, la cual siempre se ha considerado un buen marcador de linfocitos T. Algunos autores no obstante, han señalado que la reproductibilidad de la ANAE es menor en este sentido (21). En los monocitos se obtiene reacción positiva a la ANAE que es sensible al fluoruro sódico, siendo los linfoblastos de LLA—T resistentes a esa acción inhibitoria.

d) Alfa-naftil butirato esterasa (α -NBE)

A este sustrato se le ha señalado como muy sensible para el estudio de la serie monocítica. Este procedimiento se ha empleado, a la par de las fosfatasa ácidas, en el diagnóstico de la tricoleucemia. En la actualidad no tenemos experiencia con este sustrato.

IV. Muramidasa o lisozima:

Esta enzima de naturaleza hidrolítica se encuentra en las granulaciones azurófilas de monocitos y granulocitos. En el suero se detecta después de la degranulación o destrucción celular. La determinación de la muramidasa se puede hacer por métodos turbidimétricos o técnicas histobacterianas. Gralnick (6) examinó el suero de 38 pacientes antes del tratamiento y que tenían diagnóstico de leucemia aguda no linfocítica. Los pacientes se dividieron en tres grupos basándose en los niveles de lisozima en el suero: menos de 15 $\mu\text{g/ml}$, de 15 a 34 $\mu\text{g/ml}$ y más de 84 $\mu\text{g/ml}$. En el grupo con niveles de lisozima bajos a normales (menos de 15 $\mu\text{g/ml}$), y que morfológicamente correspondían a LMA, no hubo remisiones. Por el contrario, se obtuvo 100 por ciento de remisiones en el grupo con niveles de lisozima altos (más de 84 $\mu\text{g/ml}$) y que correspondían a leucemias con un componente monocítico predominante. El único grupo, en el que los pacientes sobrevivieron más allá de 60 semanas, los niveles de lisozima se encontraban entre 15 y 84 $\mu\text{g/ml}$.

V. Fosfatasa ácida:

Es una enzima hidrolítica que actúa desdoblado ésteres de fosfato en medio ácido, a pH 5,0. La encontramos en mayor o menor concentración en casi todas las células sanguíneas. En lo que respecta a granulocitos, se encuentra principalmente en los gránulos neutrófilos primarios y puede estar ausente, o la reacción es menos intensa, en los gránulos secundarios y terciarios (3, 4, 7). Esta técnica se emplea fundamentalmente para la identificación de linfocitos T, localizándose la actividad fosfatásica en la zona paranuclear. Los linfoblastos de la LLA—T presentan generalmente un gránulo único fuertemente positivo en localización centrosómica. Los blastos de la LLA—B y de la forma LLA no T y no B, manifiestan una actividad menor y de manera dispersa en el citoplasma.

VI. Acido periódico—Schiff (PAS):

El ácido periódico actúa oxidando grupos glicoles y compuestos afines aldehídos, luego estos reaccionan con el reactivo de Schiff (leocofucsina) liberando fucsina, la que irá a teñir a las estructuras celulares que poseen el compuesto que sufre la acción oxidante, siendo en las células sanguíneas y de la médula ósea el glucógeno la sustancia responsable de esta reacción.

En las LLA (L_1 ó L_2) la reacción PAS positiva se manifiesta en forma de gruesas concreciones de glucógeno que pueden ser únicas o en variable número y tamaño (L_1), o en finos gránulos, algunas veces perinucleares (L_2) (7, 11, 13). En algunos casos esporádicos, los mieloblastos leucémicos pueden presentar una tinción débil y difusa, la cual se va acentuando a partir del progranulocito y obtiene su máxima expresión en el neutró-

fillo maduro. En algunos de los linfocitos circulantes se pueden observar de 1 a 2 gránulos PAS positivos. En los monocitos la positividad se manifiesta por gránulos finos, dispersos por el citoplasma o por una tinción difusa en el trasfondo citoplasmático.

VII. Rojo oleoso O (ORO):

Es un colorante diazoico que tiñe selectivamente las grasas neutras de un color rosado, dando dos tipos de positividad granular y globular (17). En los linfoblastos de la variedad L₃, y en las células de su contrapartida linfomatoso (linfoma de Bürkitt), la reacción positiva se localiza principalmente en la zona en donde se observa la característica vacuolización citoplasmática perinuclear.

ABSTRACT

Based upon strictly morphological criteria, acute leukemia (AL) has been classified in two broad categories: lymphoblastic (ALL) and mieloblastic (AML), or non-lymphoblastic. A classification based on both morphologic and citochemical findings has been proposed by the French —American— British (FAB) cooperative group, thus establishing several subgroups for the main categories. These are L₁, L₂ and L₃ and L₃ for ALL and M₀, L₁, M₂, M₃, M₄, M₅, and M₆ for AML. The following cytochemical tests have been studied by the authors, and are recommended for acute leukemia studies: mieloperoxidases, Sudan Black B, specific esterases (NASDCAE), and non-specific esterases (a NAE and NASDAE), acid phosphatase, PAS and ORO. The cytochemical findings in the different acute leukemias are as follows; in ALL (L₁, L₂, L₃) mieloperoxidase and Sudan Black are negative; NASDCAE is negative; NASDAE is slightly positive or negative; acid a NAE and a NBE are positive, with heavy unipolar granulation (T lymphocytes); acid phosphatase is positive, with centrosomic polar granules (T lymphocytes); PAS is positive, with, fine granules (L₂) or heavy granules (L₁). In L₃, PAS is negative, but ORO is positive (Bürkitt type lymphoblasts). In the acute mieloblastic leukemias, in M₁ the mieloperoxidase and Sudan Black B are positive, NASDCAE is positive, although in rare cases it may be negative; NASDAE is discretely positive, and persists after sodium fluoride incubation. In M₂ the mieloperoxidases, Sudan Black B, NASDCAE and NASDAE are more strongly positive than in M₁, and NASDAE persists after sodium fluoride incubation. In M₃, mieloperoxidases, Sudan Black B and NASDCAE are strongly positive, PAS is diffusely positive. In M₄ mieloperoxidases, Sudan Black B and PAS present variable positivity, with discretely distributed granules throughout the cytoplasm. In our experience, a NAE is better than NASDAE in monocyte component classification; a NAE and NASDAE are partially inhibited after sodium fluoride incubation; NASDCAE is positive in the granulocytic series. Both cytochemical reactions are useful in classifying this M₄ - M₅ variety of leukemia; and mieloperoxidases may be positive or negative. In our experience, Sudan Black B is always positive, and PAS is diffusely reactive. These three reactions will show evenly distributed cytoplasmic granulation; a NAE is strongly positive, and will be totally or almost totally with sodium fluoride incubation. NASDAE, in our experience, is less strongly positive than a NAE; and NASDCAE is negative. In M₆,

mieloperoxidases and Black Sudan B are positive in the mieloblasts; PAS and a NAE are positive in late erythroblasts and their precursors. In M₀ the mieloperoxidases, Black Sudan B, PAS, and specific and non—specific esterases are all negative.

Bibliografía

1. Arroyo, G., Sáenz, G. F., Jiménez, R. L., Elizondo, J., Páez, C., Vásquez, L., Sánchez, G., Castillo, M., Valenciano, E. Estudio cooperativo de la leucemia aguda en Costa Rica. Caracterización citoquímica. *Acta Méd. Cost.* 1982; (en prensa).
2. Bennett, J. M., Catovsky, D., Daniel, M. T., Flandrin, G., Galton, DAG., Gralnick, H. R., Sultan, C. Proposals for the classification of the acute leukemias. *Brit. J. Hematol.* 1976; 33:451—458. 451—458.
3. Boggs, D. R., Wintrobe, M. M., Cartwright, G. E. The acute leukemias. *Medicina* 1962; 41:163— 166.
4. Catovsky, D. Acute Leukemia. IN: *Posgraduate Hematology*, 2nd ed. William Heinemann, Medical Books Ltd., London, 1981:431—477.
5. Flandrin, G. and Bernard, J. Cytological classification of acute leukemias. A survey of 1400 cases. *Blood Cells* 1975; 1:7—15.
6. Gralnick, H., Galton, D. A. G., Catovsky, D., Sultan, C., Bennett, J. Classification of acute leukemias. *Ann. Intern. Med.*, 1977; 87:740—753.
7. Hayhoe, F. G. I., Quaglino, D., Doll, R. *The cytology and citochemistry of acute leukemias*. Medical Research Council Special Report Series, No. 304, Her Majesty's Stationary Office, London 1964:11—23.
8. Lee, S. L., Livings, D., James, W. The morphologic classification of acute leukemias. *Cancer Chem. Rep.* 1962; 16:151—155.
9. Lillie, R. D., Burtner, H. J. Stable sudanophilia of human neutrophil leucocytes in relation to peroxidase on oxidase. *J. Histochem Cytochem.* 1953; 1:8—26.
10. Maldonado, J., Ramírez, G., Artacho, M. C. Clasificación clínico-morfológica de las leucemias agudas. *Sangre* 1981; 26:946—962.
11. Mitus, W. J., Bergna, L. J., Mednicoff, L. B., Dameshek, W. Cytochemical studies of glycogen content of lymphocyte in Lymphocytic proliferations. *Blood* 1958; 13:748—756.
12. Nelson, D. A. Leococytic Disorders. IN: *Clinical Diagnosis and Management*. (J. B. Henry, Ed.). W. B. Saunders, Co., Pha., 16 Ed., 1979: 1956—1065.
13. Quaglino, D. La citochimica delle leucemie e dei linfomi. *La Ricerca Clin. Lab.* 1970; 12:5—65.
14. Rozenszajn, L., Leibovich, M., Shohan, D., Epstein, J The esterase activity in megaloblast, leukemic and normal haematopoietic cells. *Br. J. Haemat.*, 1968; 14:605—610.
15. Savage, R. A. Hoffman, G. C., Lucas, F. U. Morphology and cytochemistry of “microgranular” acute promyelocytic leukemia (FAB M₆m). *Am. J. Clin. Pathol.* 1981; 75:548—552.
16. Shaw, M. T. The cytochemistry of acute leukemia: A diagnostic and prognostic evaluation. *Semin. Oncol*, 1976; 3:219—228.
17. Shaw, M. T., Klemp, V. A. Cytochemical staining w ith oil red O and for B—glucoronidase in the diagnosis of acute leukemia. *Am. J. Clin Pathol.* 1974; 61:169-172.
18. Strauchen, J. A. Enzymatic markers in hematologic malignancy. *Lab. Mang.*, 1980; 18:33—38.
19. Strauss, D. J., Merter Ismann, R., Koximer, B., McKenzie, S., De Harven, E., Arlin, Z. A., Kempin, S, Broxmeyer, H., Moore, M. A. S., Menéndez-Botet, C. J., Gee, T. S., Clarkson, B. D. The acute monocyte leukemias: Multidisciplinary studies in 45 patients *Medicine* 1980; 59:409— 425.

20. Tan, H. K., Lamberg, J. D. Diagnosis of acute leukemia variability of Morphologic criteria. *Am. J. Pathol. Clin.* 1977; 68:440—448.
21. Villegas, A., Maluenda, P., Butrón, R., Espinós, D. Citoquímica de las leucemias agudas no linfoblásticas. *Sangre* 1979; 24:431—445.
22. Villegas, A., Espinós, D., Martínez, R., Alvarez—Sala, J. L. Morfología y citoquímica de la leucemia aguda. *Sangre* 1981; 26:963—981.
23. Wintrobe, M. M. *Clinical Hematology* (Seventh edition). Philadelphia, Lea and Febiger 1974; 225—229, 1478—1479.
24. Woessner, S. Contribución de la citoquímica al diagnóstico hematológico. *Medicine* 1978; 10: 573-577.