

Tesis de Posgrado

Estudio citoquímico del glucogéno linfocitario en la leucemia linfática crónica pre y post-tratamiento con clorambucil

De Cosen, Rodica H.

1977

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

De Cosen, Rodica H.. (1977). Estudio citoquímico del glucogéno linfocitario en la leucemia linfática crónica pre y post-tratamiento con clorambucil. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1580_DeCosen.pdf

Cita tipo Chicago:

De Cosen, Rodica H.. "Estudio citoquímico del glucogéno linfocitario en la leucemia linfática crónica pre y post-tratamiento con clorambucil". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1977.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1580_DeCosen.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Tesis de doctorado en
CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESTUDIO CITOQUÍMICO DEL GLUCÓGENO LINFOCITARIO
EN LA LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA PRE Y POST-
TRATAMIENTO CON CLORAMBUCIL

Por

Rodica H. de Gosen

Padrino: Dr. Alfredo E. Macchi

1977

1580

Reg. N.º 1580
y. 2

Hospital "PROF. ALEJANDRO POSADAS"
SERVICIO DE HEMATOLOGÍA Y HEMOTERAPIA

Este trabajo de Tesis es dedicado

A mi querida hija LAURA IRIS

AGRADECIMIENTOS

A mi marido

Dr. Julio N. Gosen

Por brindarme en todo momento, a través de los años, su apoyo, su colaboración y especialmente su estímulo, elementos tan necesarios para hacer realidad mi entrañable sueño vocacional de estudiar esta Carrera Universitaria.

A mi Padrino de Tesis

Dr. Alfredo E. Macchi

Por el aporte que su amplia experiencia, su imponderable orientación y su constante colaboración significaron para la realización de este trabajo de investigación.

Al Cuerpo Docente de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Que con su ilimitada paciencia y su profunda vocación por esta disciplina lograron moldear mis vagos y difusos sueños juveniles, para hacerme tomar conciencia que ser un profesional, mucho más que un título, es una permanente necesidad de seguir estudiando y aprendiendo

A mis padres

Que siempre me alentaron y me brindaron su ayuda para que estudiara.

A la Sra. María M. de Reti

Por su colaboración en la mecanografía de los originales.

- INDICE -

I.-	Objetivo	Pag.	1
II.-	Introducción	Pag.	1
III.-	La reacción del Acido-Peryódico-Schiff . . .	Pag.	2
IV.-	La Leucémia Linfática Crónica como entidad patológica	Pag.	7
V.-	El Linfocito	Pag.	10
VI.-	Material y Método	Pag.	25
VII.-	Resultados	Pag.	28
VIII.-	Discusión	Pag.	39
IX.-	Conclusiones	Pag.	45
X.-	Bibliografía	Pag.	47
XI.-	Información Suplementaria	Pag.	52

- I. OBJETIVO : Investigar la presencia de glucógeno citoplasmático en los linfocitos mediante la reacción citoquímica del ácido-peryódico - SCHIFF (PAS) en pacientes con Leucemia Linfática Crónica (LLC) pre- y post- tratamiento con clorambucil.
- II. INTRODUCCION : Considerando que los estudios citoquímicos consisten en identificar y localizar diferentes compuestos químicos dentro de las células, estas pruebas aplicadas a los leucocitos normales y patológicos son de gran interés, pues constituyen :
- 1/ Una ayuda para el diagnóstico diferencial, especialmente en el caso de los distintos tipos de leucemias.
 - 2/ Un método para estudiar la bioquímica intracelular en condiciones normales y su variación en presencia de una patología.
 - 3/ Una orientación para determinar el origen de una célula y la progenie a la que pertenece.
 - 4/ Un parámetro preciso para valorar los efectos de un tratamiento y una metodología, que permite investigar e incursionar en la fisiopatología leucocitaria.

La reacción citoquímica del ácido-peryódico SCHIFF o PAS es utilizada en el diagnóstico diferencial de las leucemias para detectar la presencia de glucógeno intracelular.

El contenido de glucógeno citoplasmático de los linfocitos en las LLC, puesto de manifiesto por la reacción de PAS, merece interpretaciones disímiles; para algunos autores la presencia de glucógeno en los linfocitos es una característica constante de la LLC. (1) (38) (51) (52).

Para otros investigadores la presencia de linfocitos con aumento del glucógeno citoplasmático se daría sólo en ciertos casos de LLC. (11) (39).

Y finalmente se sostiene que no habría diferencia alguna en el contenido de glucógeno entre los linfocitos normales y los que aparecen en las LLC. (69). Estos hallazgos nos indujeron a investigar el contenido de glucógeno citoplasmático de los linfocitos de las LLC, pre- y post- tratamiento con clorambucil, para evaluar su respuesta terapéutica.

III. LA REACCION DEL ACIDO-PERYÓDICO SCHIFF.

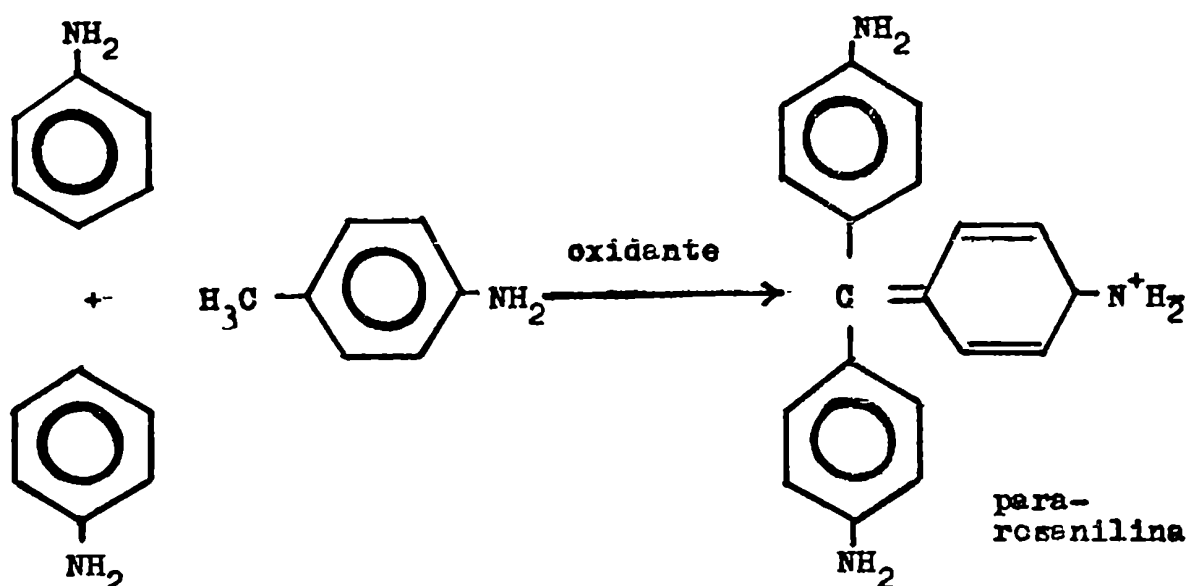
1/ Reseña histórica.

En 1859 Verguin obtuvo un colorante rojo, al que denominó fuchsina (fuchina) al oxidar la anilina con cloruro estánnico. Un año antes Hofmann había obtenido la misma sustancia al tratar la anilina con tetracloruro de carbono, dándole el nombre de rosanilina, demostrando que el colorante se produce a partir de mezclas de anilina y toluidina.

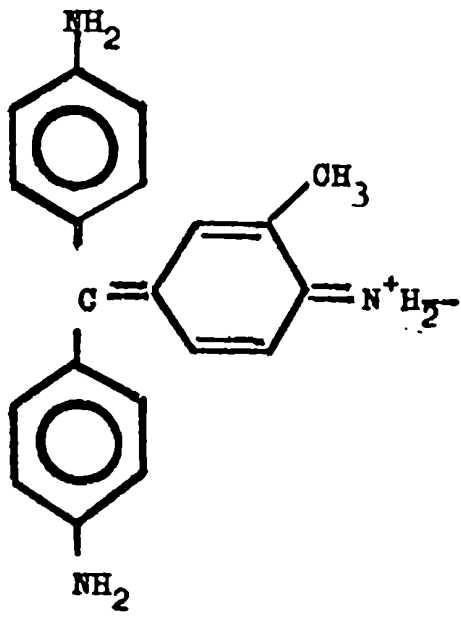
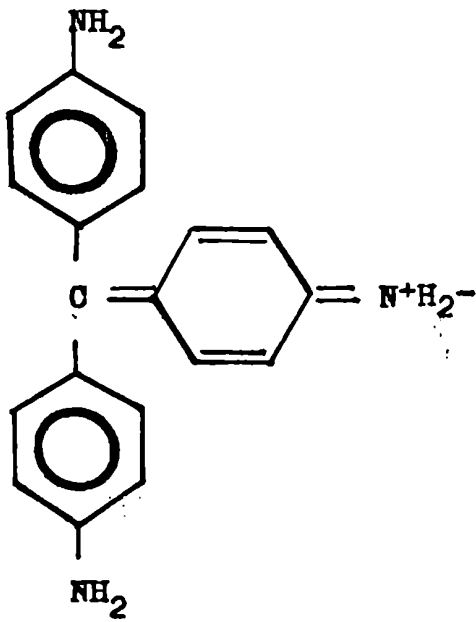
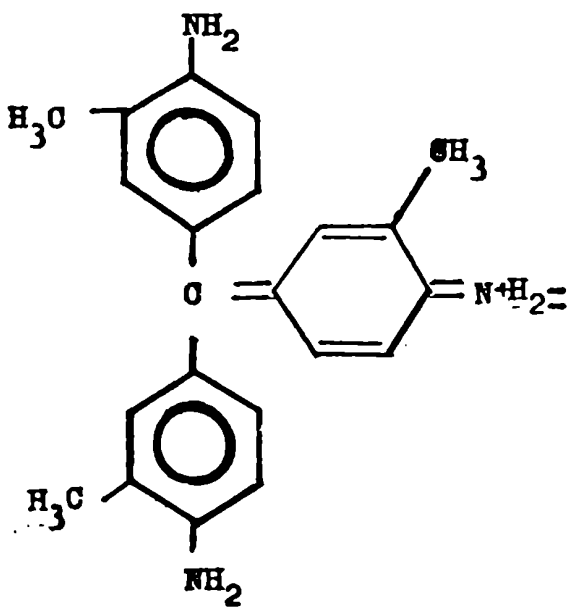
Hofmann fue el primero en advertir que la sal coloreada se reduce dando un derivado incoloro : la leuco-rosanilina.

En 1880 Emil Fischer y Otto Fischer determinaron el esqueleto estructural de la para-rosanilina, al transformarla en trifenil-metano, y la posición de los grupos de amina mediante degradación y síntesis.

La sustancia madre de los colorantes del grupo de la rosanilina se denomina para-rosanilina o para-fuchina y se prepara a partir de una mezcla con un mol de p-toluidina y dos moles de anilina en presencia de un oxidante pudiendo usarse por ej.: cloruro estánnico, cloruro mercuríco, nitrato mercuríco, nitrobenzeno u otro (23).

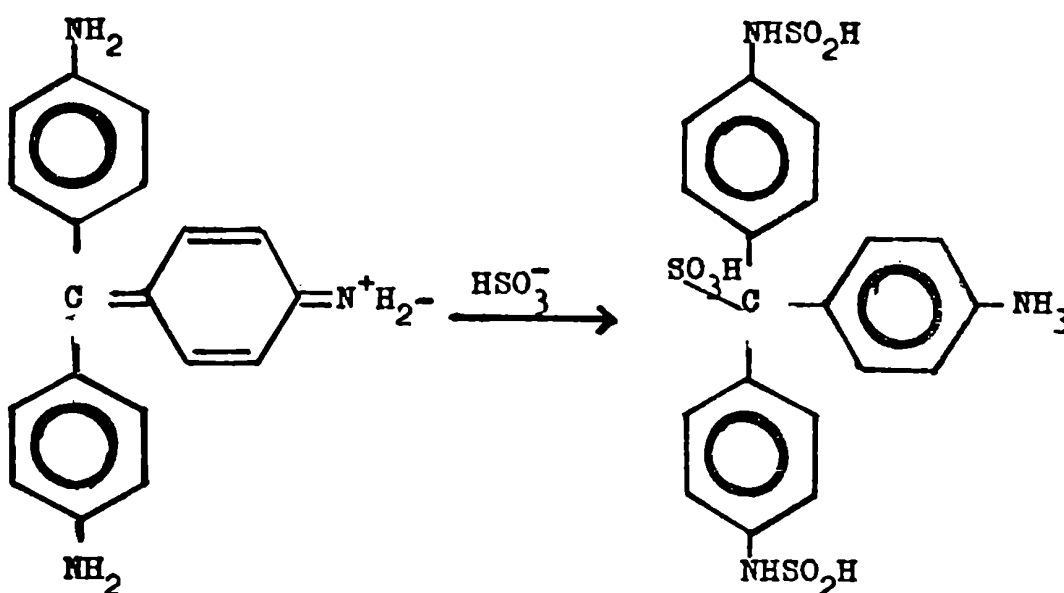


La fuchina básica o fuchsina básica, comercial (como se la denomina comunmente) es una mezcla de tres colorantes de tipo triamino-trifenilmetano : rosanilina, para-rosanilina y magenta II.

ROSANILINAPARA-ROSANILINAMAGENTA II

En 1866 Schiff demostró que la fucsina básica coloreada, transformada mediante anhídrido sulfuroso en un compuesto incoloro : la leuco-fucsina (o Reactivo de Schiff) vuelve a adquirir su color magenta en presencia de aldehídos.

La leuco-fucsina es incolora porque su doble enlace cromóforo fué destruido y perdió su estructura quincide.



para-rosanilina
color púrpura rojizo

ácido N,N-sulfínico de
para - rosanilina
leucobase incolora

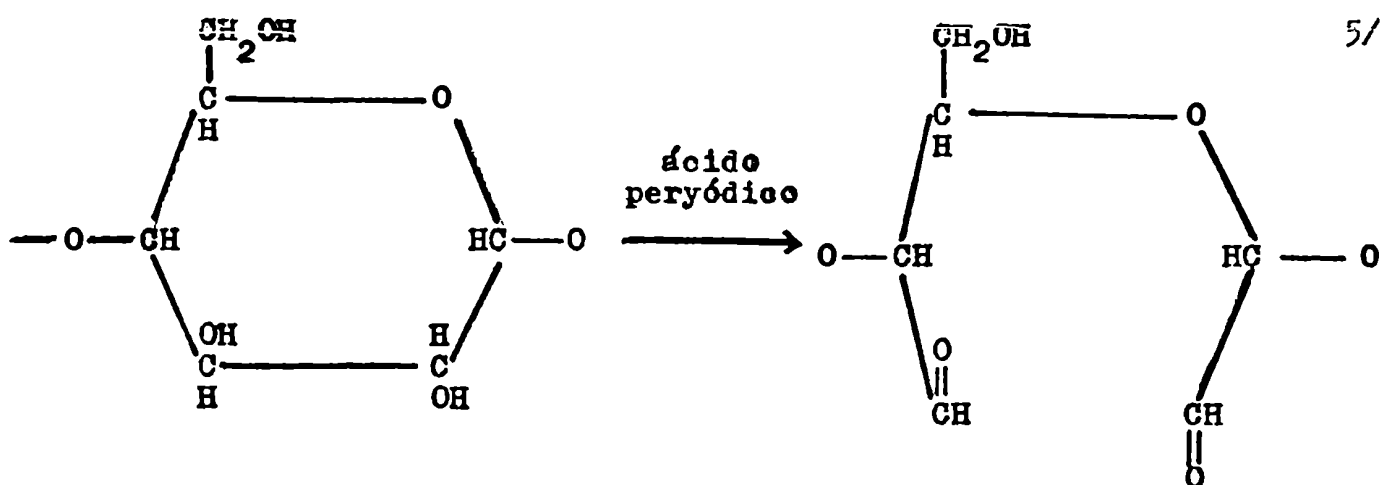
Una nueva oxidación por exposición prolongada a la luz y al aire permite que se reconstituya el doble enlace con la reparación del color. La estructura quincide también puede recuperarse por efecto de los aldehídos, pero en este caso el compuesto aldehídico se uniría al compuesto fucsina-ácido sulfurónico, formándose un compuesto de color púrpura rojizo, cuya estructura molecular está en discusión.

En 1928 Malaprade utilizó por primera vez el ácido peryódico (HIO_4) para la medición química de los polialcoholes.

En 1946 Mc Manus aplicó la reacción del ácido peryódico y el reactivo de Schiff a los estudios histológicos (33).

2/. Fundamento de la reacción.

La técnica del ácido-peryódico Schiff, ideada por Mc Manus se basa en la oxidación de los grupos hidroxilos libres por medio del ácido peryódico con la liberación de grupos aldehídos que dan positiva la reacción de Schiff. Cuando los grupos OH son vecinos, como en los 1,2 glicoles (CHOH-CHOH) el ácido peryódico provoca la rotura del enlace entre los átomos de carbono yuxtapuestos unidos a grupos OH, apareciendo una fórmula de tipo dialdehído. (22).



Es evidente que los monosacáridos como glucosa, galactosa, manosa, metilpentosa, hexosamina, por oxidación con HIO_4 forman grupos aldehídos libres que producen una intensa reacción con el reactivo de Schiff, y por lo general, la intensidad de la reacción del PAS es proporcional al contenido de estos azúcares en la sustancia estudiada.

Dan una reacción de PAS positiva sustancias como : (33)

- a) Polisacáridos : glucógeno,
- b) Mucopolisacáridos neutros,
- c) Mucoproteínas,
- d) Glucoproteínas,
- e) Glucolípidos,
- f) Esfingomiélin.

3/. Utilidad de la reacción de PAS en la citoquímica.

Siendo el propósito de la citoquímica identificar y localizar los diferentes compuestos químicos dentro de la célula, resulta evidente la utilidad de la reacción de PAS para determinar la presencia de sustancias con grupos oxhidrilos (OH) libres intracelulares.

En las células hemáticas la reacción positiva generalmente indica la presencia de glucógeno; esto puede demostrarse en base a la propiedad del glucógeno de ser hidrolizado por la amilasa (16). Si la reacción PAS positiva desaparece cuando la extensión antes de su tinción es sometida a la acción de la amilasa la positividad se debía al glucógeno, pues ningún otro material cambia en la digestión por amilasa.

Cabe señalar, que en las células hemáticas la positividad de la reacción se evidencia en el citoplasma por una coloración rojiza que puede presentarse en forma homogénea o granular (19), siendo su distribución normal la siguiente (26) (28) :

SERIE GRANULOCITICA : presenta desde reacciones PAS negativas del mieloblasto o reacciones intensamente positivas en los polimorfonucleares maduros, con grados intermedios de positividad tanto en forma difusa como granular en las células de madurez intermedia; la positividad de la reacción es directamente proporcional al estado de madurez de la célula.

SERIE LINFOCITICA : Ocasionalmente pueden observarse gránulos positivos, de tamaño y número variables, contra un citoplasma PAS negativo.

MONOCITOS : A menudo se observan gránulos finos o moderadamente gruesos, con o sin una tinción citoplasmática débil o difusa.

MEGACARIOCITOS y PLAQUETAS : Son intensamente PAS positivos.

SERIE ERITROCITICA : No se tiñen en ningún estadio de su desarrollo.

La reacción de PAS de las células hemáticas difiere en caso de enfermedad, de ahí su utilidad como valor diagnóstico.(52).

IV. LA LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA COMO ENTIDAD PATOLÓGICA.

Wintrobe define la leucemia como "un estado morboso, de etiología desconocida y terminación fatal, que se caracteriza por proliferación generalizada de leucocitos y sus precursores en los tejidos del organismo y que por lo general también se acompaña de alteraciones cualitativas y cuantitativas de los glóbulos blancos circulantes de la sangre". (67)

Teniendo en cuenta la rapidez evolutiva de la enfermedad pueden diferenciarse dos formas de leucemias : las agudas de instalación rápida, con rápida aparición de los síntomas y duración de meses, salvo tratamiento exitoso; y las crónicas de instalación lenta, síntomas progresivos y duración que puede extenderse a años. A su vez cada una de estas formas puede subdividirse en base al tipo de leucocito predominante en : linfoblástica, mieloblástica, monocítica o eritrocítica para las agudas y en linfocítica o mielocítica para las crónicas. (26) (28).

Se considera que la leucemia linfática crónica (LLC) se debe a una proliferación neoplásica del tejido linfoide, con un aumento de linfocitos en la sangre periférica. (20) (68).

Este tipo de leucemia es más frecuente en personas mayores de 45 años, con menor incidencia entre los 30 y los 40 años; es una enfermedad rara en niños y jóvenes. (5) (25) (60) (67).

En cuanto a su distribución la LLC predomina en el sexo masculino, constituyendo entre el 60% y el 75% en las series de casos de LLC estudiadas. (5) (25) (46) (67).

Llamó la atención el hecho que la LLC es poco frecuente en el Japón, y que este es el único tipo de leucemia que no se ve asociada a la exposición excesiva de radiaciones, siendo notable la ausencia de LLC en los sobrevivientes de la bomba atómica y entre los pacientes tratados con rayos X por espondilitis. (54) (55) (60) (62) (67) (68).

El estudio de los familiares de pacientes leucémicos reveló que los enfermos con LLC tenían parientes en primer grado padeciendo la misma enfermedad con mayor frecuencia que en otras clases de leucemia; esto hace suponer la existencia de factores genéticos. (20) (25).

Las manifestaciones clínicas suelen ser muy variables, el comienzo de la enfermedad es muy insidioso; su descubrimiento puede ser accidental. El primer hallazgo más frecuente es una linfocitosis persistente inexplicable, eventualmente acompañada de leucocitosis. (5) (67).

En la mayoría de los casos el síntoma más frecuente es la adenopatía en cuello, axilas, ingle; estas adenomegalias pueden ser muy notables.

Suele haber esplenomegalia entre leve y moderada y en menor proporción hepatomegalia. (46) (67).

Las lesiones cutáneas se encuentran con mayor frecuencia en la LLC que en las otras clases de leucemias; y el Herpes Zoster es más común en estos pacientes que en los normales.

La infiltración pulmonar, gastrointestinal, del sistema nervioso y síndrome mediastinal se observan con cierta frecuencia.

Los hallazgos de laboratorio indican un recuento de leucocitos que puede variar entre $7000 / \text{mm}^3$ y $978.000 / \text{mm}^3$ aunque en la mayoría de los casos se mantiene alrededor de $100.000 / \text{mm}^3$; los linfocitos constituyen entre el 90% y el 99% de estos leucocitos.

La anemia puede ser leve, o no existir, agravándose en las etapas finales, siendo a veces de tipo hemolítico auto-inmune con prueba de Coombs positiva.

El diagnóstico se confirma mediante punción-aspiración de la médula ósea (MO), en la que se encuentra un aumento importante de linfocitos, que llegan a constituir entre el 70% y el 95% de los elementos del medulograma, siendo su valor normal comprendido entre el 10% y el 20%.

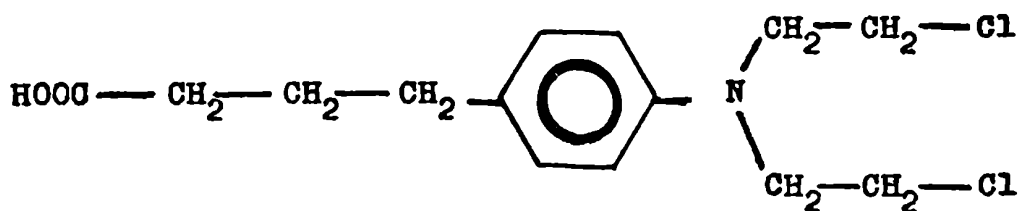
La cantidad de plaquetas es generalmente normal o levemente baja; una disminución muy marcada es índice de insuficiencia medular.

Un gran porcentaje de pacientes con LLC tienen hipogamma-globulinemia, lo que condiciona una tendencia aumentada a las complicaciones infecciosas. (2) (42).

En las etapas finales de la enfermedad, la anemia cada vez más severa, la trombocitopenia intensa, las hemorragias y las infecciones recurrentes, conducen a la invalidez y a la muerte. El cuadro nunca evoluciona hacia una leucemia aguda aunque la enfermedad se hace más agresiva. (5) (60) (67).

La conducta terapéutica a seguir es variable, según el estado del paciente; si la enfermedad se encuentra estacionada, se sugiere una conducta expectante sintomática; en caso contrario se utilizan agentes quimioterapéuticos.

Los quimioterápicos utilizados son agentes alquilantes polifuncionales que poseen dos o más grupos terminales alquilo, que pueden ser cíclicos o insaturados o bien convertirse en estas formas. Estos grupos son inestables y pueden unirse a otras moléculas a través de un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre. En las concentraciones terapéuticas utilizadas se cree que esta reacción ocurre preferentemente con el ácido desoxirribonucleico (ADN). Los grupos reactivos de los agentes alquilantes atacarían a los grupos fosfato de las cadenas de ADN, inactivando en última instancia al ADN. Se utilizan varias clases de agentes alquilantes; pero en el caso de la LLC el más usado es el ácido p-NN-di-2-cloroetilamino-fenil-butírico. (clorambucilo).



CLORAMBUCILO

El clorambucilo es una mostaza aromática similar a la mostaza nitrogenada, pero menos tóxica que ésta. (67).

El pronóstico de la enfermedad es difícil de hacer, pues los cálculos de supervivencia dependen del momento en que se hace el diagnóstico en relación con el comienzo de la enfermedad. Estudios realizados al respecto desde el momento del diagnóstico, dieron una sobrevivencia media de 6 años, que se prolongó a 9 años al excluir los que murieron por causas ajenas a la enfermedad. (5).

V. EL LINFOCITO.

El linfocito fué descrito por primera vez en 1770 por William Hewson, en sus estudios sobre la estructura de los órganos linfáticos. Hewson lo denominó así por haberlo encontrado en la linfa, en el conducto torácico, en los ganglios linfáticos y también en la sangre, siendo un nombre descriptivo, no reflejando ninguna otra característica particular de la célula.(20).

En 1879 cuando Ehrlich introduce las técnicas de coloración diferencial para frotis fijados, los investigadores comienzan a estudiar el origen y las funciones del linfocito suscitándose grandes polémicas que habrían de durar unas siete décadas durante las cuáles no se obtuvo ninguna información definitiva.

El auge de la tecnología moderna con la utilización de los radioisótopos y de la radioautografía permitiendo la marcación a nivel celular, ofrece nuevas posibilidades en el estudio del linfocito.

En 1957 James Gowans demuestra por primera vez que el linfocito puede circular de la sangre a la linfa y viceversa.

Las experiencias demostraron que los linfocitos no son células en la etapa final de su desarrollo sino que son capaces de transformarse en elementos inmaduros que pueden proliferar al ser expuestos al estímulo apropiado. Nowell demuestra este fenómeno "in vitro" en 1960, utilizando un extracto de habas : phytohemaglutinina; mientras que en 1962 Porter, Cooper y Gowans lo observan "in vivo", utilizando antígenos (Ag) específicos, involucrando al linfocito en las reacciones inmunológicas. (59).

La bursa de Fabricius en las aves y trabajos realizados tanto en aves como en mamíferos permitieron postular que :

- a) El linfocito constituye el componente principal de un sistema inmunológico definido.
- b) Todas las células denominadas "LINFOCITO" de igual morfología al microscopio óptico, no eran necesariamente iguales en cuanto a su origen, fisiología, función, vida media y otras características.

1/ MORFOLOGIA (Microscopía óptica).

El linfocito de la sangre periférica es una célula pequeña, generalmente de 10 μ m o menos de diámetro, aunque también hay formas con diámetros entre 10 μ m y 20 μ m (47) (67). El tamaño del linfocito en los extendidos de sangre dependería del grado de estiramiento celular. A pesar que los linfocitos con un diámetro inferior a 10 μ m pueden parecer del tamaño de los eritrocitos, esto se debería a que están menos aplastados, pues se ha demostrado que el volumen de un linfocito es alrededor de 300 μ m³, o sea tres veces superior al volumen de un eritrocito normal. (31)

La célula teñida con colorante de Wright presenta un núcleo de color azul purpúreo intenso compuesto por aglomeraciones de cromatina; el núcleo de borde bien definido puede ser redondo, ovalado, arriñonado o indentado y se encuentra colocado en forma excéntrica generalmente no se observan nucleolos al microscopio óptico. El citoplasma basófilo de color celeste puede formar un borde fino alrededor del núcleo, o ser muy abundante; habitualmente no hay gránulos en el citoplasma, aunque a veces se pueden observar granulaciones azurófilas de color violeta rojizo intenso; pudiendo aparecer cuerpos rojos neutros. (47) (67).

Los linfocitos dan negativa la reacción de las peroxidasas y de la fosfatasa alcalina, y está en discusión los resultados obtenidos con la reacción del ácido-peryódico de Schiff (PAS) y de la fosfatasa ácida.

El linfocito es una célula de mucha movilidad "in vitro" y se desplaza en forma característica adquiriendo el aspecto de un espejo de mano, con el núcleo en el extremo anterior arrastrando detrás al citoplasma. (67).

2/ ULTRAESTRUCTURA.

Contrariamente a lo que se podría suponer dada la morfología al microscopio óptico, el linfocito normal de la sangre periférica al ser examinado al microscopio electrónico, en cortes seriados, presenta aspectos bastantes variados, constituyendo un grupo heterogéneo de células.

La relación núcleo:citoplasma es variable; el núcleo está envuelto por una membrana compuesta por dos capas concéntricas, que toman contacto en los poros; la cromatina se condensa debajo de la membrana nuclear, pero también se pueden observar agregados cromatínicos en el cuerpo del núcleo; frecuentemente se observa un nucleolo en el linfocito aunque no aparece en todos los cortes. (22) (26) (67).

El citoplasma de los linfocitos visto al microscopio electrónico se caracteriza por ser pobre en organelas. Se observa un aparato de Golgi poco desarrollado, uno o dos centríolos, algunas mitocondrias grandes, alguna hilera de retículo endoplásmico, y a veces algunos lisosomas. (26) (67). Pueden aparecer cuerpos o granos densos en el citoplasma, que podrían estar constituidos por glucógeno; y otras clases de estructuras granulares, probablemente correspondientes a las granulaciones azurófilas que se observan al microscopio óptico. (26) (67).

Algunos autores diferenciaron linfocitos que presentaban varios cuerpos densos enclaustrados en un área restringida del citoplasma, de otros linfocitos con cuerpos densos dispersos en todo el citoplasma. (65).

Al microscopio electrónico la membrana celular aparece lisa, bilaminar, con algunas microvellosidades.

Con el microscopio "stereoscan" se detectan dos clases de linfocitos por su morfología superficial:

- a) Linfocitos relativamente lisos con o sin digitaciones superficiales. (43)
- b) Linfocitos con una complicada estructura vellosa (43).

Aunque otros investigadores, utilizando diversas tecnologías, llegaron a la conclusión que estas estructuras superficiales se debían a artificios de técnica. (40).

C). CIRCULACIÓN LINFOCITARIA.

El estudio de la circulación linfocitaria es importante para dilucidar la función y la fisiología de éstas células.

Gowans fue el primero en demostrar en ratas, que había una recirculación de linfocitos normales entre la linfa y la sangre.

Un drenaje continuo de la linfa del conducto torácico en ratas producía una disminución importante en el número de linfocitos sanguíneos, que se corregía al reinyectar la linfa drenada en la sangre. (67).

Linfocitos marcados e inyectados en forma endovenosa en ratas eran encontrados luego en el conducto torácico. (67).

La aparición en el conducto torácico de linfocitos con cariotipo femenino XX, previamente transfundidos en hombres fué una evidencia concluyente de la recirculación linfocitaria en humanos. (45).

Estos resultados indujeron a pensar que el conducto torácico es una pieza importante en el circuito que permite la recirculación de los linfocitos entre la sangre y la linfa.

Estudiando el contenido en linfocitos de la linfa que entra y que sale del ganglio linfático, se observó que la primera tenía pocos linfocitos, mientras que la segunda era rica en linfocitos.

Post infusión continua de timidina - H^3 en ganglios linfáticos poplíteos en ovejas se obtuvo tan solo un 4% de linfocitos marcados sobre el total de linfocitos de la linfa que salía del ganglio, concluyéndose que los ganglios linfáticos aportaban relativamente pocos linfocitos recién formados a la linfa eferente. (43).

La inyección de linfocitos marcados en la sangre era seguida por una gran acumulación de linfocitos marcados en la parte profunda de la corteza de los ganglios linfáticos, de las placas de Peyer y de la pulpa blanca del bazo alrededor de la arteriola central. (67).

En estudios de cortes seriados al microscopio electrónico de las vénulas postcapilares de los ganglios linfáticos se observaron linfocitos pasando a través de las células endoteliales de las vénulas hacia los espacios perivasculares. (34).

Estas observaciones permitieron concluir que la recirculación de los linfocitos se haría de la sangre a los órganos linfáticos como ganglios linfáticos, bazo, placas de Peyer, de éstos al conducto torácico por los vasos linfáticos eferentes, y finalmente del conducto torácico a la circulación venosa cerrando el circuito.

El timo parecería estar excluido de este circuito circulatorio. (67).

D). VIDA MEDIA LINFOCITARIA.

Tratándose de células como los linfocitos que presentan como características la capacidad de reproducirse y de mantener un número constante en la sangre periférica; el término "vida media" debe utilizarse con cuidado, pues en el primer caso se referiría al período intermitótico, y en el segundo caso, al período comprendido entre la división y la muerte celular, pues esta eliminación celular post división sería necesaria para que el número total de células se mantenga constante.

En 1954 Ottensen mediante la administración a ciertos pacientes de fósforo radio-activo (P^{32}) y el estudio de la radioactividad del ácido desoxirribonucleico (ADN) de los linfocitos aislados de la sangre periférica, dedujo la existencia de dos poblaciones linfocitarias, una de vida corta, de 2 a 3 días y otra de vida larga de 200 a 300 días de duración. (67).

Estudios realizados en ratas mediante inyecciones continuas de timidina tritiada durante largos períodos, permitieron llegar a la conclusión que en la sangre periférica el 66% de los linfocitos eran de vida larga y los restantes de vida corta; en el conducto torácico el 90% de los linfocitos eran de vida larga; en los ganglios linfáticos mesentéricos el 75% de los linfocitos eran de vida larga y en el bazo el 25% de los linfocitos eran de vida larga; casi todos los linfocitos pequeños de la médula ósea y del timo eran de vida corta. (67).

Experiencias estudiando la sobrevida linfocitaria por coloración supravital, timidina-tritiada y autoradiografía en ratones, demostraron que el 17% de los linfocitos sanguíneos eran células de vida corta; que los linfocitos de vida larga eran formados por un grupo heterogéneo de células con valores de vida media variando de algunas semanas a varios meses y que la frecuencia de muerte celular intravascular de los linfocitos de vida corta era 10 veces mayor que la de los linfocitos de vida larga. (44).

En el hombre la mayoría de los linfocitos circulantes son de vida larga, de tres meses a diez años, algunas de estas células pueden sobrepasar los 20 años de vida. El promedio de vida de los linfocitos de vida corta se calcula de 3 a 4 días. Todos los linfocitos de la médula ósea y del timo y el 20% de los linfocitos de otros órganos pertenecen a los linfocitos

de vida corta. El 80% de los linfocitos de los órganos periféricos pertenecen a los linfocitos de vida larga. (2) (43) (67).

E). PRODUCCIÓN DE LINFOCITOS.

En el adulto normal se calculó que el número de linfocitos de la sangre periférica se mantiene constante entre 1500 y 3500 /mm³. (19).

Muchos linfocitos de vida larga recirculan continuamente entre la sangre y la linfa a través de los espacios linfocides periarteriolares del bazo y la parte profunda de la corteza de los ganglios linfáticos. El drenaje continuo del conducto linfático, la irradiación continua de la sangre o de la linfa, la administración de un suero antilinfocitario, provocan una disminución celular local en éstas áreas, que vuelven a poblarse muy lentamente (43) sin embargo la cantidad de los linfocitos de vida corta no parecen estar afectados en forma significativa por ninguno de estos procedimientos. Por lo tanto la producción de linfocitos involucra por un lado : una producción relativamente lenta en pequeña escala de linfocitos recirculantes de vida larga y una producción continua, rápida y en gran escala de linfocitos de vida corta. (43).

La falta de modificación en el número de linfocitos circulantes de vida corta en animales timectomizados, permitió deducir la importante intervención del tejido linfoide restante (ganglios linfáticos, bazo, médula ósea) en la producción de éstas células.

Estudios realizados en base a la cantidad de células en mitosis en los tejidos linfáticos, calculando el índice mitótico y utilizándolo para estimaciones aproximadas del tiempo necesario para renovar todas las células dentro de una población, dieron un promedio de 2,40 días para los centros germinativos de los folículos linfáticos de los ganglios linfáticos, 1,79 días para los centros germinativos del bazo y 8,66 días para los cordones de Billroth. La actividad mitótica de las células en la zona cortical de los folículos linfáticos y de las zonas paracorticales era extremadamente reducida. (67).

La administración de timidina - H^3 (tritiada) incorporada a la molécula de ADN celular durante la fase de síntesis del ADN, en forma aislada o continua, permitió estudiar la tasa de aparición de linfocitos marcados en los distintos tejidos linfáticos.

Después de una sola dosis de timidina tritiada, una gran proporción de células de los centros germinativos de los folículos linfáticos ganglionares y de la pulpa blanca del bazo aparecían marcadas.

La magnitud de la producción linfocitaria de los ganglios linfáticos y del bazo presenta una gran variación dependiendo de estímulos adecuados (presencia de antígenos). Estos órganos que son relativamente inactivos antes del nacimiento y carecen de centros germinativos en animales crecidos en condiciones estériles, exhiben una rápida respuesta proliferativa, frente al estímulo adecuado (presencia de antígeno).

Sin embargo animales crecidos en forma estéril, siguen teniendo linfocitos recién formados en la sangre, más aún, linfocitos de vida corta siguen apareciendo en la sangre después de la extirpación del timo, del bazo, de gran cantidad de ganglios linfáticos y de una gran porción del intestino, indicando la presencia de otra fuente de producción linfocitaria.

Numerosos linfocitos aparecen en forma difusa en el parénquima de la médula ósea (MO) constituyendo entre el 10 y el 20% de las células nucleadas medulares. El 100% de los linfocitos de la MO aparecen marcados después de 4 días de infusión continua de timidina tritiada en ratas. (43) (67).

Aunque muchos de los linfocitos de la MO parecen desintegrarse "in situ", otros son volcados al torrente sanguíneo. Estudios al microscopio electrónico mostraron pequeños linfocitos pasando entre las células endoteliales de los sinusoides medulares. La administración selectiva de timidina - H^3 intramedular en animales permitió observar la aparición de linfocitos marcados sólo en la MO al principio, luego en la sangre y a los pocos días en el bazo y en menor proporción en los ganglios linfáticos, las placas de Peyer y algunos escasos en el timo (43). Algunos autores sugieren que estas células actuarían como células linfáticas madres, emigrando al timo, donde originarían linfocitos timo dependiente o a la bursa de Fabricio de las aves o a su equivalente en los mamíferos (placas de Peyer), originando linfocitos bursa-dependientes. (67).

La MO es un órgano con una linfopoyesis muy activa, que actúa sin necesitar un estímulo externo y no se ve afectada por la extirpación de otros órganos linfáticos, ni por el vaciamiento de contenido linfocitario recirculante. (43) (67).

La extirpación del timo en ratones recién nacidos, provocaba una disminución en la cantidad de linfocitos sanguíneos y de los órganos linfáticos. (61).

Los linfocitos tímicos se observan en el feto humano a las nueve semanas de gestación; su origen esta en discusión. Aunque algunos investigadores piensan que los linfocitos tímicos se originarían a partir de las células epiteliales del timo, la mayoría de los investigadores se inclinan hacia la teoría del origen extratímico de estos linfocitos que se originarían a partir de células que habrían emigrado a partir de tejidos hematopoyéticos como la MO o el hígado fetal. (67)

La efectividad de transplantes tímicos en el síndrome de Di George, provocado por una aplasia tímica debida a una falta en el desarrollo de la tercera y cuarta bolsa faríngea con la subsecuente falta de epitelio tímico es una prueba en favor de una célula precursora de estos linfocitos, que sería extratímica.

La corteza tímica presenta una alta tasa de producción linfocitaria con un alto índice mitótico. La actividad mitótica de los linfocitos tímicos es mayor durante el período neonatal y decrece luego, sobretodo durante el período de involución.

La actividad mitótica de la médula tímica es muy reducida. Postinfusión continua de timidina-tritiada, el 100% de los linfocitos tímicos aparecieron marcados entre los 6 y 7 días. (67)

Se conocen varios factores que influyen sobre la linfopoyesis tímica, los corticoesteroides adrenales retardan o inhiben la linfopoyesis tímica, la adrenalectomía o un funcionamiento deficiente de las glándulas adrenales se ve asociada a un aumento del tamaño del timo y de la actividad mitótica de los linfocitos tímicos, el "stress" produce una atrofia tímica probablemente mediante el estímulo de la producción corticoesteroidea adrenal; la testosterona y los estrógenos también producen una involución tímica. Otras hormonas, como la hormona del crecimiento y la tiroxina producen un aumento en el tamaño del timo. (61) (67).

La proliferación de linfocitos tímicos no se ve afectada por la inyección de antígenos, la extirpación de órganos linfáticos, la timectomía parcial y los injertos de timo. (61)

Estudios utilizando cromosomas marcados e injertos de timo permitieron observar linfocitos de origen tímico en ganglios linfáticos y bazo.

El estudio del desarrollo de los órganos linfoides, de la linfopoyesis y estudios experimentales en sistemas animales, permitieron profundizar más en cuánto al origen del linfocito.

La timectomía provocaba una disminución en la cantidad de linfocitos circulantes y una desaparición de pequeños linfocitos en la pulpa blanca del bazo.

La extirpación de la bursa de Fabricius de las aves, una estructura homologada a las placas de Peyer del intestino delgado de los mamíferos, era seguida de una ausencia de los centros germinativos de los folículos linfoides, la inyección de linfocitos provenientes de la bursa era seguida de la aparición de los centros germinativos.

Basándose en estas experiencias y muchas otras observaciones, Good propuso una teoría según la cuál el linfocito se originaría a partir de una célula madre indiferenciada multipotencial, pudiendo formarse en la MO fetal, el hígado fetal o el área vascular del saco vitelino; esta célula madre sería capaz de diferenciarse según el tejido especializado con el que estaría en contacto.

Los componentes del tejido tímico, del tejido de la bursa (o su equivalente en los mamíferos) proveerían el medio ambiente necesario para dicha diferenciación; para recalcar el papel preponderante de estas estructuras en la diferenciación celular, tanto la bursa o sus estructuras equivalentes, en los mamíferos, como el timo, la MO, son denominadas órganos linfoides primarios o centrales. Estos órganos linfoides primarios sirven para poblar y mantener áreas bien definidas en los tejidos linfoides secundarios o periféricos como los ganglios linfáticos y el bazo.

Se considera que el timo mantiene la población linfocitaria de las áreas paracorticales de los ganglios linfáticos y la pulpa blanca del bazo, y la bursa o su equivalente en los mamíferos sería responsable de poblar y mantener los folículos linfáticos de los ganglios linfáticos y del bazo.

Se demostró (67) la existencia de una migración continua de células capaces de dividirse rápidamente desde la médula ósea al timo, donde presumiblemente se diferenciarían.

Las células producidas en el timo a su vez migrarían hacia las estructuras linfáticas periféricas en áreas timo-dependientes, contribuyendo probablemente al reservorio de linfocitos de vida larga. (67).

En aves también se demostró la migración de células de la bursa de Fabricius a los órganos linfoides periféricos. (67).

4/. FUNCIÓN.

Hasta no hace mucho se desconocía la función del linfocito. En 1956 Yoffey señalaba que "si el linfocito no es precursor de otras células y posee un ciclo de vida propio e independiente, tarde o temprano se debería poder demostrarle alguna función especial que le sea propia". (59).

La demostración "in vitro" de la capacidad de los linfocitos de transformarse en células inmaduras en presencia de phito-hemaglutinina, y la observación "in vivo" de este mismo fenómeno en presencia de estímulos adecuados como antígenos específicos, asociados a la enfermedad de los redrejos por transplante, descrita por Billingham, y producida en ratones, pollos y ratas recién nacidos al inyectar linfocitos pequeños inmunológicamente competentes, involucraron al linfocito en las reacciones inmunológicas. (59).

Se puede definir la inmunidad como el conjunto de mecanismos fisiológicos que permiten al animal reconocer las entidades extrañas a su ser, y neutralizarlas, eliminarlas o metabolizarlas con o sin lesiones de los tejidos propios. (33).

Muchos trabajos experimentales con respecto a los tejidos, tipos celulares, productos elaborados, mecanismos de acción del sistema inmunológico, fueron realizados durante las décadas de 50 y del 60, prolongándose hasta nuestros días. Los trabajos de Metcalf en ratones timectomizados involucrando a éste órgano en la producción de linfocitos y la respuesta inmunológica (59) y los estudios de Glick sobre la bolsa de Fabricio, órgano linfoide de la cloaca de la gallina, resultaron eventos claves para adelantar en la comprensión del mecanismo inmunitario. En 1966 Cooper realizó una serie de experiencias, combinando timectomía y o burssectomía quirúrgicas con la destrucción de los tejidos linfoides periféricos mediante irradiación, en pollos recién nacidos, obteniendo los siguientes resultados:

- 1) Timectomía + irradiación. En estos animales la bolsa de Fabricio permanece intacta. Estos animales presentan deficiencia de linfocitos circulantes, y otros tejidos linfoides no poseen la población normal, relativamente importante de linfocitos pequeños. Su capacidad de desarrollar reacciones alérgicas tardías y de rechazar homoinjertos de piel disminuye considerablemente. Sin embargo tienen niveles normales de inmunoglobulinas γG y γM y sus tejidos presentan una cantidad normal de células plasmáticas. No hay crecimiento y la muerte es temprana. Experimentalmente estos modelos son equivalentes a ratones timectomizados al nacer; su paralelo en patología humana es la alinfoplasia tímica pura.

- 2) Bursectomía + irradiación. El timo de estos animales queda intacto. En estas aves, la cantidad de linfocitos pequeños en sangre periférica y tejidos linfoides es normal; pero en los tejidos linfoides no hay folículos germinativos ni células plasmáticas. No hay inmunoglobulinas γG ni γM en sangre, y no aparecen anticuerpos circulantes, incluso después de estímulos antigénicos potentes. Se rechazan los homoinjertos de piel y aparecen reacciones normales de huésped contra injerto. El equivalente humano de este modelo experimental es la agammaglobulinemia de tipo Bruton.
- 3) Timectomía + bursectomía + irradiación. Se obtiene una suma de los defectos mencionados en los dos modelos experimentales anteriores. Hay linfopenia, atrofia considerable del tejido linfoide, falta de linfocitos pequeños, centros germinativos y células plasmáticas. No se desarrollan anticuerpos ni inmunoglobulinas; no se observa sensibilidad tardía y se toleran los homoinjertos cutáneos. El equivalente humano es la agammaglobulinemia de tipo suizo. Los resultados de estas experiencias establecen claramente las bases anatómicas para la dualidad del mecanismo inmunológico y el papel preponderante de los linfocitos en este mecanismo. (33).

Sin embargo la respuesta inmunológica a muchos antígenos patógenos no puede iniciarse sin las etapas previas de fagocitosis y "procesamiento antigénico" por parte de los macrófagos, mientras que ciertas reacciones inmunológicas dependen de los componentes fagocíticos del sistema reticuloendotelial y del sistema de complemento. La contribución del sistema linfocitario a la defensa del organismo se realiza mediante la llamada inmunidad humoral o inmediata, la inmunidad celular o mediata y el aporte de células con memoria. (18).

La inmunidad humoral o inmediata se debe a la presencia de anticuerpos representados por las inmunoglobulinas. Las células productoras de inmunoglobulinas corresponden a los linfocitos B o bursa-dependientes o su equivalente en los mamíferos. Estos linfocitos B en presencia de un estímulo antigénico originarían los plasmoblastos y luego los plasmocitos que son células muy activas en la síntesis de anticuerpos. Estas células perdieron la capacidad de dividirse y no se observan en la sangre. (18) (36) (67).

La inmunidad celular o mediata incluye las manifestaciones que se expresan a través de linfocitos dependientes del timo o los llamados linfocitos T. Este tipo de inmunidad se inicia en forma más tardía con la identificación del antígeno por receptores de la superficie celular del linfocito T produciéndose luego una serie de fenómenos que se exteriorizan con la liberación de sustancias activas que intervienen en el proceso como el factor inhibitorio de la migración

de macrófagos, citotoxinas, quimio-toxina, sustancia de estimulación blastogénica de los linfocitos, interferón; que actúan acumulando macrófagos y estimulando su capacidad funcional, produciendo liberación de sustancias que provocan la destrucción celular directamente, reclutamiento de nuevos linfocitos e inhibición de la síntesis viral.

Estos linfocitos T participarían en las reacciones de rechazo de injertos y tumores, hipersensibilidad tardía y activación de macrófagos para promover la resistencia a la infección. También estos linfocitos T cooperarían con los linfocitos B para facilitar de alguna manera su función inmunológica. (3) (18) (67).

Cuando una sustancia extraña o antígeno se pone por primera vez en contacto con un organismo se desencadena una serie de fenómenos metabólicos y celulares que conducen a la activación del sector humoral o celular de la inmunidad, pero al mismo tiempo producirá el archivo o memoria de la información recibida en ese contacto de tal manera que contactos posteriores de ese antígeno específico con el huésped ya sensibilizado producirá de nuevo los mismos fenómenos biológicos pero con mayor rapidez; se pudo demostrar que células con memoria eran linfocitos T. (7) (18).

Los estudios sobre el origen y la función de los linfocitos sugieren la existencia de dos tipos diferentes de linfocitos: Los linfocitos B y los linfocitos T con propiedades, origen y funciones diferentes, aunque resultan morfológicamente indistinguibles tanto al microscopio óptico como al microscopio electrónico.

El desarrollo de técnicas que permiten diferenciarlos ha sido uno de los progresos más notables en el campo de la inmunología.

Los linfocitos T :

- 1º forman in vitro rosetas con hematíes de carnero. (29)
- 2º son lisados por el suero antitimocito. (29)
- 3º dan una reacción negativa con el ácido-peryódico-Schiff. (11)
- 4º dan una reacción de Fosfatasa ácida positiva, (11) (58)
- 5º dan una respuesta positiva cultivados en presencia de PHA (fitohemaglutininas). (66)
- 6º Las células T exhiben una mayor movilidad electroforética ($1.33 \mu\text{m}/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$) con grupos fosfatos y sulfhidrilos periféricos escasos o ausentes, y un número de grupos carboxilos susceptibles al ácido-M-acetilneuramínico mayores que en las células B. (37)
- 7º Son negativos a las coloraciones inmunoflorescentes. (53)
- 8º Al microscopio electrónico "stereoscan" presentan una superficie lisa. (48).

Los linfocitos B :

- 1º forman in vitro rosetas con hematíes sensibilizados por anticuerpos antihematíes y complemento. (20)
- 2º pueden ser estudiados mediante la conjugación de complejos inmunofluorescentes con las inmunoglobulinas de superficie. (20) (53).
- 3º dan una reacción positiva con el ácido-peryódico-Schiff. (11)
- 4º dan una reacción de fosfatasa-ácida negativa. (11)
- 5º no responden al estímulo de la PHA (fitohemaglutinina). (66)
- 6º exhiben una movilidad electroforética más lenta ($0.90 \mu\text{m}/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$) presentando grupos fosfatos y sulfhidrilos en la superficie celular con gran cantidad de grupos aminos cargados positivamente, y grupos α - carboxilos susceptibles al ácido-M-acetilneuramínico inferiores que en los linfocitos T. (37)
- 7º al microscopio electrónico "stereoscan" presentan una superficie vellosa. (48)

Los valores normales de linfocitos T y B, calculados en base a la formación de rosetas con eritrocitos de carnero o con hematíes humanos sensibilizados por anticuerpos antihematíes y complemento fueron los siguientes (30):

<u>Linfocitos B</u>	$27.5\% \pm 4.4$	o	$477/\mu\text{l} \pm 188.$
<u>Linfocitos T</u>	$60.6\% \pm 4.0$	o	$1049/\mu\text{l} \pm 386.$
<u>Linfocitos O</u>	no forman rosetas de ningún tipo.		
	11.9%	o	$206/\mu\text{l}$

5/ MORFOLOGIA DEL LINFOCITO EN LA LEUCÉMIA LINFÁTICA CRÓNICA.

Varias han sido las tentativas de diferenciar los linfocitos leucémicos de los normales.

El linfocito leucémico visto al microscopio óptico coloreado mediante el método de May-Grúnwald-Giemsa, presenta al igual que el linfocito normal un citoplasma basófilo: celeste con un halo más claro alrededor del núcleo que generalmente no contiene granulaciones, aunque a veces puede presentar escasas granulaciones azurófilas irregularmente distribuidas; esta franja citoplasmática puede ser muy escasa, o aparecer más abundante en ambos tipos de linfocitos. (67)

El núcleo redondo, ovalado o a veces ligeramente escotado, suele aparecer en los linfocitos leucémicos como replegado sobre si mismo. El núcleo, paquicromático presenta una concentración cromatínica periférica con condensaciones grandes intranucleares distribuidas en forma irregular, siendo similar en los linfocitos patológicos como en los normales.

Lo que llama la atención en los extendidos de sangre periférica de pacientes con leucémia linfática crónica es la aparición de numerosas células rotas, denominadas "sombras nucleares". (67)

Algunos autores trataron de diferenciar los linfocitos leucémicos de los normales, e incluso distintos tipos de leucémias en cuanto al tamaño celular, pero linfocitos de distinto tamaño se encuentran aún en frotis de adultos normales, y el tamaño del linfocito visible al microscopio óptico dependería mucho del grado de estiramiento. (46) (68)

Por lo tanto al microscopio óptico habría más similitudes que diferencias. (44)

6/. ULTRAESTRUCTURA DEL LINFOCITO EN LLC.

NUCLEO.

En general los núcleos de los linfocitos leucémicos presentan una condensación cromatínica en la periferia nuclear, no presentando diferencias con los núcleos de los linfocitos normales. El análisis de la proporción heterocromatina-eucromatina fué similar en linfocitos leucémicos y normales. La observación de un número mayor de poros en la membrana nuclear de los linfocitos leucémicos no resultó ser significativa al realizar el estudio estadístico.

Tanto los linfocitos leucémicos como los normales presentaron un nucleolo. (57)

CITOPLASMA.

El aparato de Golgi, cuando existía, era compuesto por unas pocas vesículas, pero generalmente se encontraba poco desarrollado tanto en los linfocitos normales como en los leucémicos.

Se observaron centriolos en el 24,3% de los linfocitos normales y el 28% de los linfocitos leucémicos, aunque la diferencia no resultó ser significativa.

Ambas células presentaron escasas mitocondrias de morfología similar, un retículo endoplasmático rugoso, corto; disperso en el citoplasma celular. Se encontró un retículo endoplasmático largo con una cantidad moderada de ribosomas con mayor frecuencia en los linfocitos leucémicos.

Un retículo endoplasmático liso se observó raramente en ambos linfocitos.

Tanto los linfocitos leucémicos como los normales contenían ribosomas sueltos en el citoplasma y también polirribosomas.

Ambos tipos de células presentaban a veces gránulos dispersos en el citoplasma, de formas variables, redonda, ovalada, en forma de bastón, a veces con membranas limitantes visibles y otras veces con límites no definidos, células de ambos grupos contenían gránulos de glucógeno. (57)

Por lo tanto el estudio comparativo al microscopio electrónico de linfocitos leucémicos y normales no revela ninguna diferencia morfológica y / o estructural entre ambas células. (44) (57)

VI. MATERIAL y MÉTODO.A/ MÉTODO.

- 1/ Se utilizaron para teñir frotis de sangre periférica secados al aire
 - α : no coloreados
 - β : previamente coloreados con May-Grünwald-Giemsa o Giemsa solo, en cuyo caso se realizó una decoloración previa a la reacción de PAS, sumergiendo el frotis 30 min. en metanol. (27)
- 2/ Reactivos :
 - a) Fijador : Metanol.
 - b) Oxidante: Acido peryódico al 1%.
 - c) Solución de Schiff : según el método de Coleman-de Tomasi (33). Se disuelve 1 g. de fucsina básica en 200 ml de agua destilada a 100° C; se agita y se enfría hasta 50° C, se añade 20 ml de HCl normal. Se enfría hasta 25° C y se añade 1 g de metabisulfito anhidro de sodio o potasio ($\text{Na}_2 \text{S}_2 \text{O}_5$, $\text{K}_2 \text{S}_2 \text{O}_5$). Se añaden 2 g de carbón activado, se agita y se guarda 24 horas en la oscuridad. Se filtra recogiendo el colorante en un frasco ámbar. Se conserva en la oscuridad entre 0 y 4° C. Antes de usarse debe llevarse a temperatura ambiente.(33)
 - d) Reductor : Se disuelven 2,5 g de metabisulfito de sodio en 500 ml de agua destilada y se añade 30 ml de ácido clorhídrico normal.
 - e) Colorante de contraste : Hematoxilina al 2%.
- 3/ Técnica de tinción de PAS según Hotchkiss. (38)
 - a) Se cubre el frotis de sangre con metanol durante 15 min. Se lava con agua corriente.
 - b) Se cubre el frotis con el reactivo oxidante durante 10 min. Se lava con agua corriente.
 - c) Se cubre el frotis con el Reactivo de Schiff durante 1 hora en la oscuridad.
 - d) Se cubre el frotis con el reactivo reductor durante 10 min. Se lava con agua corriente.
 - e) Se cubre el frotis con el reactivo colorante de contraste durante 10 min. Se lava con agua corriente.
 - f) Se deja secar al aire.
 - g) Se observa al microscopio óptico con la lente de inmersión (100 x).
- 4/ Cada extendido tiene un frotis control, que luego de la fijación y previo a la tinción es expuesto durante 30 min. a 37° C a una solución filtrada de diastasa salivar.
- 5/ Se realizó una evaluación semi cuantitativa contando 100 linfocitos consecutivos y clasificándolos en 4 grados de

positividad en cuanto a su contenido en gránulos de glucógeno PAS positivos, según el método de Mitus. (38) Fig. No 1, A, B, C.

	Grado
Células sin gránulos	0
Células conteniendo de 1 a 9 gránulos	1
Células con 10 o más gránulos	2
Células con gránulos muy gruesos y/o grandes bloques.	3

Multiplicando el número de linfocitos de cada grado por el valor respectivo y sumando los resultados obtenidos de las 100 células se obtiene un índice de intensidad de la reacción de PAS (1) que puede variar de cero (0) (cuando ninguna célula presenta gránulos PAS positivos) a 300 (cuando las 100 células consecutivas observadas son de grado 3); siendo este índice un parámetro semicuantitativo del contenido en glucógeno celular.

B/ MATERIAL.

Los controles normales fueron constituídos por 20 adultos sanos (10 hombres y 10 mujeres) dadores de sangre.

Entre el grupo de pacientes con LLC diagnosticada mediante exámen físico, exámen de la sangre periférica, de la médula ósea y a veces de la biopsia ganglionar, se seleccionaron aquellos que no habían recibido ningún tratamiento antileucémico, o bien aquellos de los que se conservaban frotis de sangre periférica realizados antes del tratamiento.

Luego se estudió el resultado de la reacción de PAS en extendidos de sangre periférica de cada uno de los pacientes después de 60 días (como mínimo) de tratamiento con clorambucil.

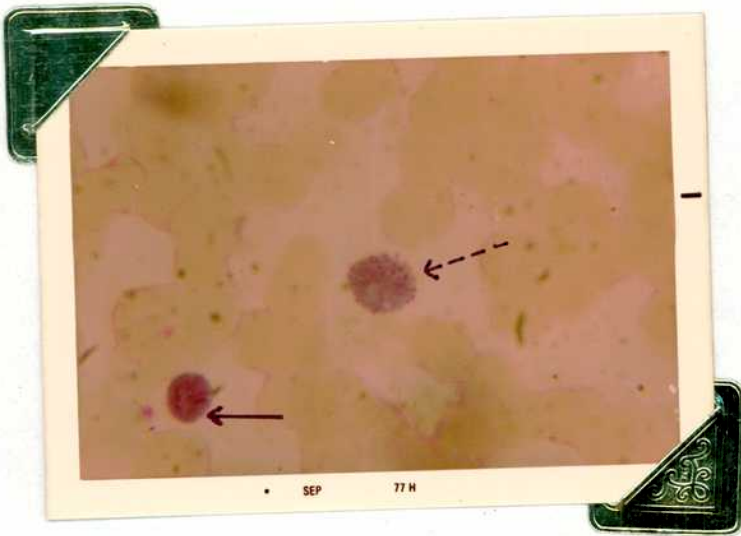
En estas condiciones fueron estudiados 16 hombres y 4 mujeres con LLC, cuyas edades oscilaban entre los 45 y los 73 años.

Fueron descartados todos aquellos pacientes con LLC que además padecían de anemia hemolítica autoinmune o de diabetes, debido al incremento de la positividad del PAS en los linfocitos, observada en estas patologías. (32) (64)



74

A.- Linfocito de Grado 1 en un Paciente con Leucemia Linfática Crónica. En el citoplasma se observa un gránulo PAS + .

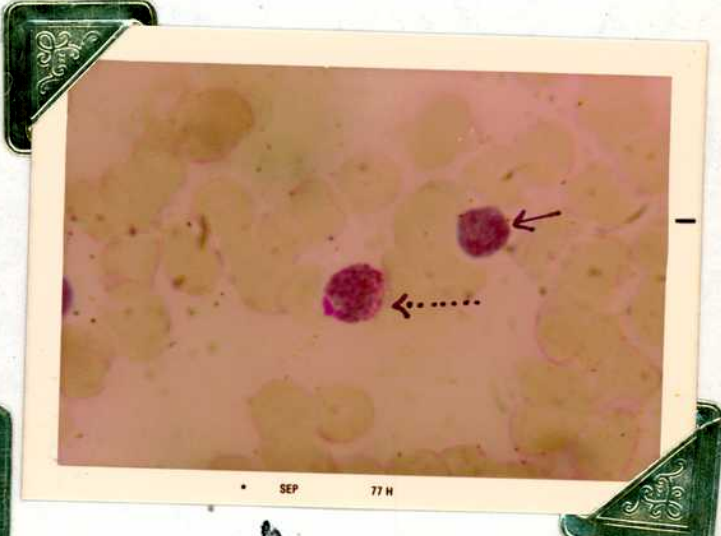


74

B.- Linfocito de Grado Cero (→) sin gránulos PAS + en el citoplasma. y Linfocito de Grado 2 (---→) con más de 10 gránulos PAS + , En un Paciente con Leucemia Linfática Crónica.



a



b

74

C.-a) Linfocitos de Grado Cero (→) sin gránulos PAS + , y Linfocito de Grado 3 con gránulos muy gruesos, PAS +. (···→).
b) Linfocito de Grado Cero (→) sin gránulos PAS +, y Linfocito de Grado 3 con bloques PAS + (····→).
En un Paciente con Leucemia Linfática Crónica.

Fig. N°1.- A,B,C.- Microfotografías de frotis de sangre periférica de Pacientes con Leucemia Linfática Crónica. 100X.-

RESULTADOS.

- A) Se investigó el origen de la sustancia PAS positiva de los linfocitos sometiendo los extendidos de sangre periférica a la acción de la amilasa previamente a su coloración por el Acido-peryódico-Schiff. Los resultados obtenidos en todos los casos demostraron que la reacción de PAS se negativizaba post-tratamiento con amilasa permitiendo concluir que la sustancia PAS positiva de los linfocitos era glucógeno.
- B) Para analizar los resultados obtenidos en los tres grupos : Normales, Pacientes con LLC pre-tratamiento y Pacientes con LLC post-tratamiento se consideró:

a) El Índice de Intensidad de la reacción de PAS según el método de Mitus (38) descrito en Material y Método.

b) El porcentaje de células PAS positivas.

En cada caso se contaron 100 linfocitos seguidos en un extendido de sangre periférica, anotando la cantidad de linfocitos PAS positivos y el grado de positividad de cada célula.

I) Los resultados obtenidos en el grupo Normal demostraron:

1º) La presencia de linfocitos PAS positivos de grado 0, 1, 2 y 3 (Tabla I).

2º) Valores de Índice de Intensidad comprendidos en un rango entre 8 y 30 (Tabla I) (Tabla III) (Fig.1), con un Índice promedio $X_N = 18,9$, una desviación standard $DS_N = 5.68$ y un error standard $ES_N = 1.27$ (Tabla VI).

3º) Un porcentaje de linfocitos PAS positivos comprendidos en un rango entre 7% y 22% (Tabla III) (Fig.3), con un porcentaje promedio: $X_{N\%} = 14,2$, una desviación standard $DS_{N\%} = 4.1$ y un error standard $ES_{N\%} = 0.91$ (Tabla V).

II) Los resultados obtenidos en el grupo de Pacientes con LLC pre-tratamiento demostraron :

1º) La presencia de linfocitos PAS positivos de grado 0, 1, 2 y 3.

2º) Valores de Índice de Intensidad comprendidos en un rango entre 98 y 213 (Tabla II) (Tabla IV) (Fig.2), con un índice de promedio $X_{LLC-pre} = 148.40$, una desviación standard $DS_{LLC-pre} = 25.70$ y un error standard $ES_{LLC-pre} = 5.5$ (Tabla VI).

3º) Un porcentaje de linfocitos PAS positivos comprendido en un rango entre 67% y 97%. (Tabla IV) (Fig.3) con un porcentaje promedio $X_{LLC-pre\%} = 81.4$, una desviación standard $DS_{LLC-pre\%} = 9.2$ y un error standard $ES_{LLC-pre\%} = 2.05$ (Tabla V).

III) Los resultados obtenidos en el grupo de Pacientes con LLC post-tratamiento demostraron :

1º) La presencia de linfocitos PAS positivos de grado 0, 1, 2 y 3.

2º) Valores del Índice de Intensidad comprendidos en un rango entre 6 y 65 (Tabla II) (Tabla IV) (Fig.1) con un índice promedio $X_{\text{LLC-post}} = 30,50$, una desviación standard: $DS_{\text{LLC-post}} = 16.48$ y un error standard $ES_{\text{LLC-post}} = 3.6$ (Tabla VI).

3º) Un porcentaje de linfocitos PAS positivos comprendido en un rango entre 6% y 42% (Tabla IV) (Fig.3), con un porcentaje promedio $X_{\text{LLC-post}\%} = 19.7$, una desviación standard: $DS_{\text{LLC-post}\%} = 9.3$ y un error standard $ES_{\text{LLC-post}\%} = 2.08$ (Tabla V).

C) Para verificar si las diferencias observadas entre los tres grupos estudiados eran significativas se comparó:

1º) El grupo Normal con el grupo de Pacientes con LLC pre-tratamiento mediante el test de Student

a) En cuánto al Índice de Intensidad de la reacción de PAS se obtuvo una $t = 21.51$ para 38 grados de libertad con una $p < 0.001$ pudiendo deducir que la diferencia entre ambos grupos era altamente significativa.

b) En cuánto al porcentaje de linfocitos PAS positivos se obtuvo una $t = 29.08$ para 38 grados de libertad con una $p < 0.001$ pudiendo deducir que la diferencia entre ambos grupos era altamente significativa.

2º) El grupo de Pacientes con LLC pre-tratamiento con el mismo grupo post-tratamiento mediante el test de Student para muestras pareadas.

a) En cuánto al Índice de Intensidad de la reacción de PAS se obtuvo una $t = 23.14$ para 19 grados de libertad con una $p < 0.001$ pudiendo deducir que la diferencia entre ambos grupos era altamente significativa.

b) En cuánto al porcentaje de linfocitos PAS positivos se obtuvo una $t = 86.87$ para 19 grados de libertad con una $p < 0.001$ pudiendo deducir que la diferencia era altamente significativa.

3º) El grupo Normal con el grupo de Pacientes con LLC post-tratamiento mediante el test de Student.

a) En cuánto al Índice de Intensidad de la reacción de PAS se obtuvo una $t = 2.90$ para 38 grados de libertad con una $p < 0.01$.

- b) En cuanto al porcentaje de linfocitos PAS positivos se obtuvo una $t = 2.38$ para 38 grados de libertad con una $p < 0.05$.
- D) Por lo tanto según el análisis de los resultados se puede deducir que :
- 1º) La sustancia PAS positiva de los linfocitos : es glucógeno.
 - 2º) En todos los grupos estudiados : Normal, Pacientes con LLC pre-tratamiento y Pacientes con LLC post-tratamiento, se observan linfocitos de grado 0, 1, 2 y 3.
 - 3º) Tanto el Índice de Intensidad de la reacción de PAS como el porcentaje de linfocitos PAS positivos en los Pacientes con LLC pre-tratamiento son significativamente superiores a los respectivos valores encontrados en los adultos normales.
 - 4º) Tanto el Índice de Intensidad de la reacción de PAS como el porcentaje de linfocitos PAS positivos en los Pacientes con LLC disminuyen significativamente después del tratamiento.
 - 5º) Tanto el Índice de Intensidad de la reacción de PAS como el porcentaje de linfocitos PAS positivos en los Pacientes con LLC-post-tratamiento, si bien en algunos casos alcanzan valores normales, el grupo en conjunto sigue manteniendo una diferencia significativa a un nivel de $p < 0.01$ con respecto al grupo control en el caso del Índice de Intensidad y a un nivel de $p < 0.05$ con respecto al grupo control en cuánto al porcentaje de linfocitos PAS positivos.

Fig. 2.- Distribución del Índice de Intensidad de la Reacción de PAS en Normales y en Pacientes con LLC pre y post-tratamiento. Cada rayita (-) representa el Índice de Intensidad de la Reacción de PAS de un individuo. Los puntos (●) representan la Media de cada grupo.

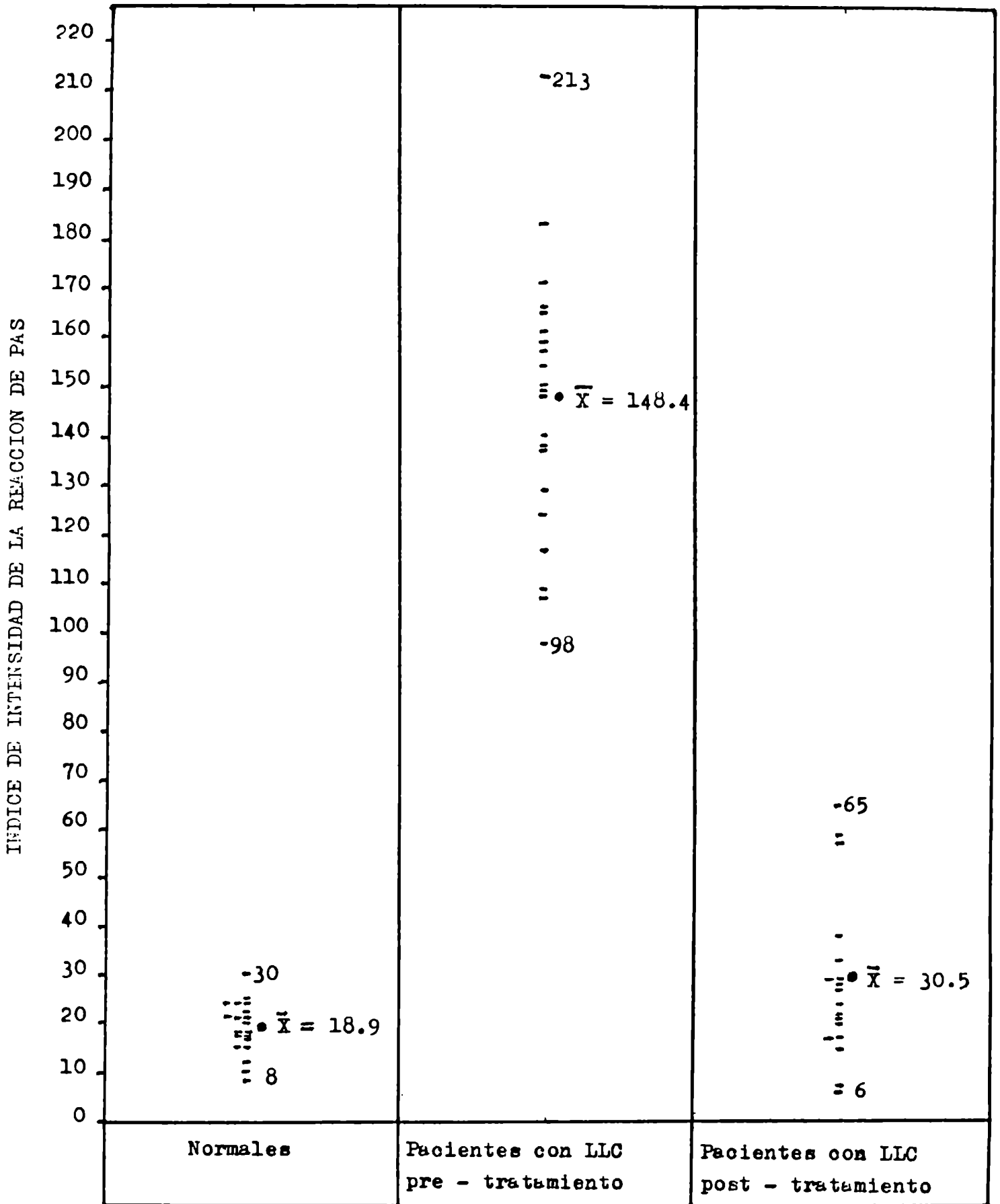
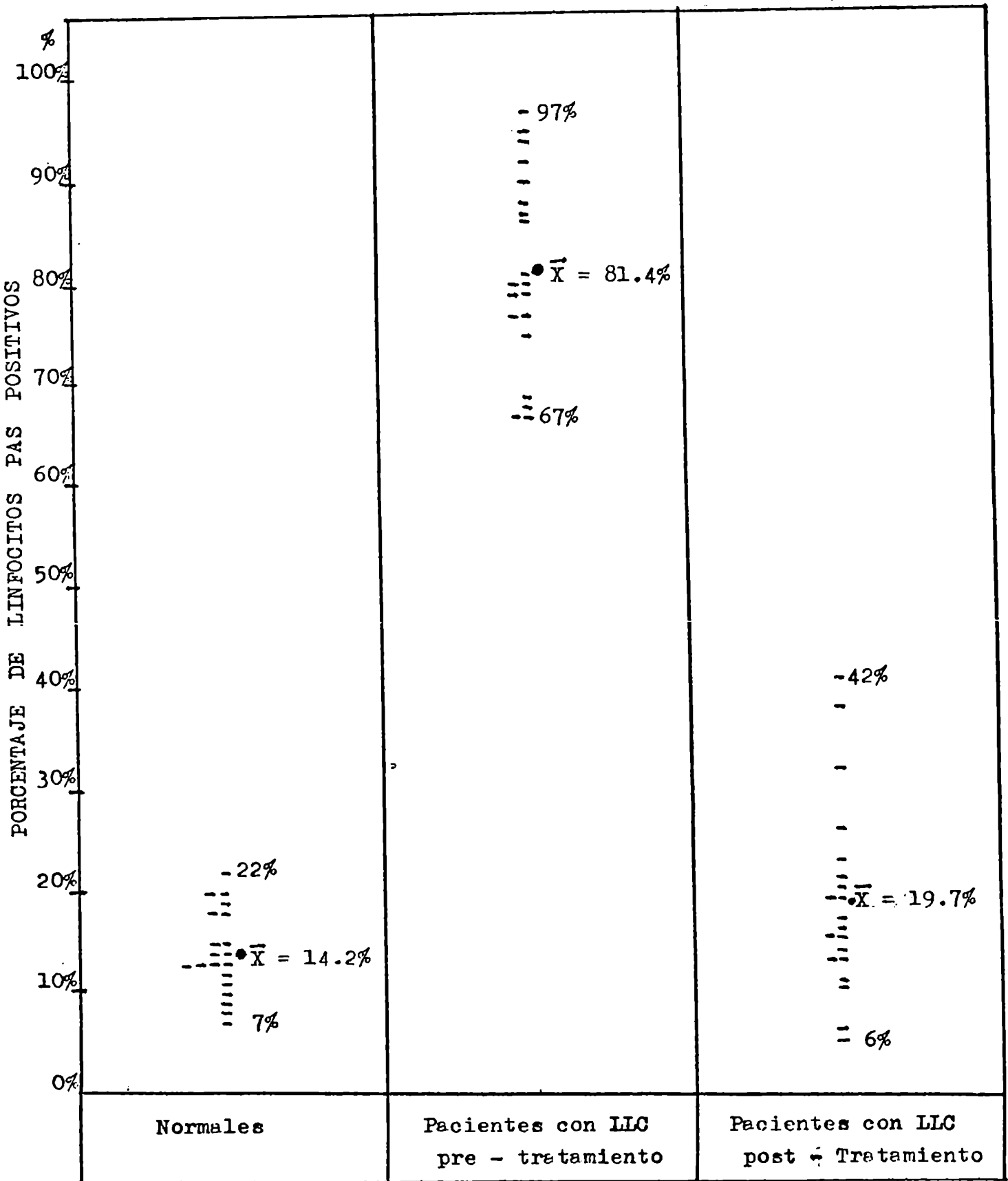


Fig.3.- Distribución del Porcentaje de Linfocitos PAS + en Normales y en Pacientes con LLC pre y post-tratamiento. Cada rayita (-) representa el Porcentaje de Linfocitos PAS + de un individuo. Los puntos (●) representan la Media de cada grupo.



T A B L A I.

VALORES OBTENIDOS EN LOS ADULTOS NORMALES.

N = Normal G = Grado C= Número de Células I = Índice de Intensidad

N ₁			N ₂			N ₃			N ₄		
G	C	I	G	C	I	G	C	I	G	C	I
0 x	86 =	0	0 x	85 =	0	0 x	89 =	0	0 x	88 =	0
1 x	9 =	9	1 x	9 =	9	1 x	4 =	4	1 x	6 =	6
2 x	3 =	6	2 x	3 =	6	2 x	5 =	10	2 x	6 =	12
3 x	2 =+	6	3 x	3 =+	9	3 x	2 =+	6	3 x	0 =+	0
<hr/>			<hr/>			<hr/>			<hr/>		
21			24			20			18		
=====			=====			=====			=====		

N ₅			N ₆			N ₇			N ₈		
G	C	I	G	C	I	G	C	I	G	C	I
0 x	81 =	0	0 x	93 =	0	0 x	87 =	0	0 x	87 =	0
1 x	16 =	16	1 x	6 =	6	1 x	10 =	10	1 x	10 =	10
2 x	3 =	6	2 x	1 =	2	2 x	3 =	6	2 x	2 =	4
3 x	0 =+	0	3 x	0 =+	0	3 x	0 =+	0	3 x	1 =+	3
<hr/>			<hr/>			<hr/>			<hr/>		
22			8			16			17		
=====			=====			=====			=====		

N ₉			N ₁₀			N ₁₁			N ₁₂		
G	C	I	G	C	I	G	C	I	G	C	I
0 x	92 =	0	0 x	87 =	0	0 x	78 =	0	0 x	87 =	0
1 x	5 =	5	1 x	10 =	10	1 x	16 =	16	1 x	11 =	11
2 x	2 =	4	2 x	2 =	4	2 x	4 =	8	2 x	2 =	4
3 x	1 =+	3	3 x	1 =+	3	3 x	2 =+	6	3 x	0 =+	0
<hr/>			<hr/>			<hr/>			<hr/>		
12			17			30			15		
=====			=====			=====			=====		

N ₁₃			N ₁₄			N ₁₅			N ₁₆		
G	C	I	G	C	I	G	C	I	G	C	I
0 x	90 =	0	0 x	80 =	0	0 x	80 =	0	0 x	82 =	0
1 x	5 =	5	1 x	16 =	16	1 x	16 =	16	1 x	13 =	13
2 x	5 =	10	2 x	4 =	8	2 x	4 =	8	2 x	3 =	6
3 x	0 =+	0	3 x	0 =+	0	3 x	0 =+	0	3 x	2 =+	6
<hr/>			<hr/>			<hr/>			<hr/>		
15			24			24			25		
=====			=====			=====			=====		

N ₁₇			N ₁₈			N ₁₉			N ₂₀		
G	C	I	G	C	I	G	C	I	G	C	I
0 x	86 =	0	0 x	85 =	0	0 x	82 =	0	0 x	91 =	0
1 x	11 =	11	1 x	9 =	9	1 x	15 =	15	1 x	8 =	8
2 x	2 =	4	2 x	6 =	12	2 x	3 =	6	2 x	1 =	2
3 x	1 =+	3	3 x	0 =+	0	3 x	0 =+	0	3 x	0 =+	0
<hr/>			<hr/>			<hr/>			<hr/>		
18			21			21			10		
=====			=====			=====			=====		

T A B L A II.

VALORES OBTENIDOS EN LOS PACIENTES CON LEUCEMIA LINFATICA CRONICA

PRE Y POST TRATAMIENTO.

P = Paciente G = Grado C = Número de Células I = Índice de Intesidad

Paciente Nº 1

Paciente Nº 2

<u>Pre-tratamiento</u>			<u>Post-tratamiento</u>		
G	C	I	G	C	I
0 x 33 =		0	0 x 85 =		0
1 x 33 =		33	1 x 12 =		12
2 x 18 =		36	2 x 1 =		2
3 x 16 =+		<u>48</u>	3 x 2 =+		<u>6</u>
		117			20
		=====			=====

<u>Pre-tratamiento</u>			<u>Post-tratamiento</u>		
G	C	I	G	C	I
0 x 31 =		0	0 x 93 =		0
1 x 45 =		45	1 x 7 =		7
2 x 19 =		38	2 x 0 =		0
3 x 5 =+		<u>15</u>	3 x 0 =+		<u>0</u>
		98			7
		=====			=====

Paciente Nº 3

Paciente Nº 4

<u>Pre-tratamiento</u>			<u>Post-tratamiento</u>		
G	C	I	G	C	I
0 x 21 =		0	0 x 88 =		0
1 x 46 =		46	1 x 8 =		8
2 x 16 =		32	2 x 3 =		6
3 x 17 =+		<u>51</u>	3 x 1 =+		<u>3</u>
		129			17
		=====			=====

<u>Pre-tratamiento</u>			<u>Post-tratamiento</u>		
G	C	I	G	C	I
0 x 19 =		0	0 x 84 =		0
1 x 16 =		16	1 x 8 =		8
2 x 28 =		56	2 x 8 =		16
3 x 37 =+		<u>111</u>	3 x 0 =+		<u>0</u>
		183			24
		=====			=====

Paciente Nº 5

Paciente Nº 6

<u>Pre-tratamiento</u>			<u>Post-tratamiento</u>		
G	C	I	G	C	I
0 x 33 =		33	0 x 83 =		0
1 x 15 =		15	1 x 6 =		6
2 x 22 =		44	2 x 10 =		20
3 x 30 =+		<u>90</u>	3 x 1 =+		<u>3</u>
		149			29
		=====			=====

<u>Pre-tratamiento</u>			<u>Post-tratamiento</u>		
G	C	I	G	C	I
0 x 25 =		0	0 x 79 =		0
1 x 40 =		40	1 x 10 =		10
2 x 21 =		42	2 x 5 =		10
3 x 14 =+		<u>42</u>	3 x 6 =+		<u>18</u>
		124			38
		=====			=====

Paciente Nº 7

Paciente Nº 8

<u>Pre-tratamiento</u>			<u>Post-tratamiento</u>		
G	C	I	G	C	I
0 x 13 =		0	0 x 80 =		0
1 x 41 =		41	1 x 13 =		13
2 x 39 =		78	2 x 5 =		10
3 x 7 =+		<u>21</u>	3 x 2 =+		<u>6</u>
		140			29
		=====			=====

<u>Pre-tratamiento</u>			<u>Post-tratamiento</u>		
G	C	I	G	C	I
0 x 23 =		0	0 x 58 =		0
1 x 19 =		19	1 x 29 =		29
2 x 27 =		54	2 x 9 =		18
3 x 31 =+		<u>93</u>	3 x 4 =+		<u>12</u>
		166			59
		=====			=====

Paciente Nº 9

Paciente Nº 10

<u>Pre-tratamiento</u>			<u>Post-tratamiento</u>		
G	C	I	G	C	I
0 x 32 =		0	0 x 86 =		0
1 x 37 =		37	1 x 13 =		13
2 x 21 =		42	2 x 1 =		2
3 x 10 =+		<u>30</u>	3 x 0 =+		<u>0</u>
		109			15
		=====			=====

<u>Pre-tratamiento</u>			<u>Post-tratamiento</u>		
G	C	I	G	C	I
0 x 8 =		0	0 x 82 =		0
1 x 30 =		30	1 x 10 =		10
2 x 57 =		114	2 x 7 =		14
3 x 5 =+		<u>15</u>	3 x 1 =+		<u>3</u>
		159			27
		=====			=====

T A B L A II.

Paciente Nº 11

<u>Pre-tratamiento</u>			<u>Post-tratamiento</u>		
G	C	I	G	C	I
0	x 3 =	0	0	x 78 =	0
1	x 23 =	23	1	x 13 =	13
2	x 32 =	64	2	x 7 =	14
3	x 42 =+	<u>126</u>	3	x 2 =+	<u>6</u>
		213			33
		=====			=====

Paciente Nº 12

<u>Pre-tratamiento</u>			<u>Post-tratamiento</u>		
G	C	I	G	C	I
0	x 23 =	0	0	x 76 =	0
1	x 26 =	26	1	x 8 =	8
2	x 29 =	58	2	x 9 =	18
3	x 22 =+	<u>66</u>	3	x 7 =+	<u>21</u>
		150			47
		=====			=====

Paciente Nº 13

<u>Pre-tratamiento</u>			<u>Post-tratamiento</u>		
G	C	I	G	C	I
0	x 21 =	0	0	x 84 =	0
1	x 39 =	39	1	x 10 =	10
2	x 24 =	48	2	x 6 =	12
3	x 16 =+	<u>48</u>	3	x 0 =+	<u>0</u>
		137			22
		=====			=====

Paciente Nº 14

<u>Pre-tratamiento</u>			<u>Post-tratamiento</u>		
G	C	I	G	C	I
0	x 14 =	0	0	x 73 =	0
1	x 31 =	31	1	x 11 =	11
2	x 35 =	70	2	x 11 =	22
3	x 20 =+	<u>60</u>	3	x 5 =+	<u>15</u>
		161			48
		=====			=====

Paciente Nº 15

<u>Pre-tratamiento</u>			<u>Post-tratamiento</u>		
G	C	I	G	C	I
0	x 20 =	0	0	x 94 =	0
1	x 31 =	31	1	x 6 =	6
2	x 30 =	60	2	x 0 =	0
3	x 19 =+	<u>57</u>	3	x 0 =+	<u>0</u>
		148			6
		=====			=====

Paciente Nº 16

<u>Pre-tratamiento</u>			<u>Post-tratamiento</u>		
G	C	I	G	C	I
0	x 10 =	0	0	x 80 =	0
1	x 32 =	32	1	x 13 =	13
2	x 52 =	104	2	x 5 =	10
3	x 6 =+	<u>18</u>	3	x 2 =+	<u>6</u>
		154			29
		=====			=====

Paciente Nº 17

<u>Pre-tratamiento</u>			<u>Post-tratamiento</u>		
G	C	I	G	C	I
0	x 12 =	0	0	x 89 =	0
1	x 40 =	40	1	x 5 =	5
2	x 27 =	54	2	x 6 =	12
3	x 21 =+	<u>63</u>	3	x 0 =+	<u>0</u>
		157			17
		=====			=====

Paciente Nº 18

<u>Pre-tratamiento</u>			<u>Post-tratamiento</u>		
G	C	I	G	C	I
0	x 5 =	0	0	x 67 =	0
1	x 27 =	27	1	x 14 =	14
2	x 60 =	120	2	x 14 =	28
3	x 8 =+	<u>24</u>	3	x 5 =+	<u>15</u>
		171			57
		=====			=====

Paciente Nº 19

<u>Pre-tratamiento</u>			<u>Post-tratamiento</u>		
G	C	I	G	C	I
0	x 20 =	0	0	x 86 =	0
1	x 30 =	30	1	x 8 =	8
2	x 42 =	84	2	x 5 =	10
3	x 8 =+	<u>24</u>	3	x 1 =+	<u>3</u>
		138			21
		=====			=====

Paciente Nº 20

<u>Pre-tratamiento</u>			<u>Post-tratamiento</u>		
G	C	I	G	C	I
0	x 6 =	0	0	x 61 =	0
1	x 37 =	37	1	x 18 =	18
2	x 43 =	86	2	x 16 =	32
3	x 14 =+	<u>42</u>	3	x 5 =+	<u>15</u>
		165			65
		=====			=====

N O R M A L E S

Nº de Caso	Nº de Células con- tadas	Indice de Intensidad de la Reacción de PAS	% de Células PAS positivas
Caso Nº 1	100	21	14%
Caso Nº 2	100	24	15%
Caso Nº 3	100	20	11%
Caso Nº 4	100	18	12%
Caso Nº 5	100	22	19%
Caso Nº 6	100	8	7%
Caso Nº 7	100	16	13%
Caso Nº 8	100	17	13%
Caso Nº 9	100	12	8%
Caso Nº 10	100	17	13%
Caso Nº 11	100	30	22%
Caso Nº 12	100	15	13%
Caso Nº 13	100	15	10%
Caso Nº 14	100	24	20%
Caso Nº 15	100	24	20%
Caso Nº 16	100	25	18%
Caso Nº 17	100	18	14%
Caso Nº 18	100	21	15%
Caso Nº 19	100	21	18%
Caso Nº 20	100	10	9%

TABLA III.- Valores del Índice de Intensidad de la reacción de PAS y el porcentaje de linfocitos PAS positivos , encontrados en 20 dadores de sangre normales.

PACIENTES CON LEUCEMIA LINFATICA CRONICA

Nº de Caso	Nº de Células contadas	<u>PRE-TRATAMIENTO</u>		<u>POST-TRATAMIENTO</u>	
		Indice de PAS	% de Células PAS positivas	Indice de PAS	% de Células PAS positiva
Caso Nº 1	100	117	67%	20	15%
Caso Nº 2	100	98	69%	7	7%
Caso Nº 3	100	129	79%	17	12%
Caso Nº 4	100	183	81%	24	16%
Caso Nº 5	100	149	67%	29	17%
Caso Nº 6	100	124	75%	38	21%
Caso Nº 7	100	140	87%	29	20%
Caso Nº 8	100	166	77%	59	42%
Caso Nº 9	100	109	68%	15	14%
Caso Nº 10	100	159	92%	27	18%
Caso Nº 11	100	213	97%	33	22%
Caso Nº 12	100	150	77%	47	24%
Caso Nº 13	100	137	79%	22	16%
Caso Nº 14	100	161	86%	48	27%
Caso Nº 15	100	148	80%	6	6%
Caso Nº 16	100	154	90%	29	20%
Caso Nº 17	100	157	88%	17	11%
Caso Nº 18	100	171	95%	57	33%
Caso Nº 19	100	138	80%	21	14%
Caso Nº 20	100	165	94%	65	39%

TABLA IV.- Valores del Índice de Intensidad de la reacción de PAS y el porcentaje de linfocitos PAS positivos, encontrados en 20 Pacientes con Leucemia Linfática Crónica pre y post-tratamiento.

20	2000	14.2 %	4.1	0.91	7%	a	22%
20	2000	81.4 %	9.2	2.05	67%	a	97%
20	2000	19.7 %	9.3	2.08	6%	a	42%

TABLA VI

INDICE DE INTENSIDAD DEL ACIDO PERIODICO SCHIFF (PAS)

Nº Total de Casos	Nº Total de Óculas contadas	MEDIA X	DESVIACION STANDARD DS	ERROR STANDARD ES	RANGO
20	2000	-18.9	5.68	1.27	8% a 30%

VIII. DISCUSIÓN.

El porcentaje bajo de linfocitos PAS positivos en el grupo Normal : $\bar{X}_{N\%} = 14,2\%$, el porcentaje elevado de linfocitos PAS positivos en el grupo de Pacientes con LLC pre-tratamiento: $\bar{X}_{LLC\ pre\%} = 81,4$ y su disminución en este mismo grupo post-tratamiento $\bar{X}_{LLC\ post\%} = 19,7$ concuerdan con los valores respectivos del Índice de Intensidad de la reacción de PAS.

El estudio semicuantitativo del contenido de glucógeno en los linfocitos de adultos normales con un índice promedio de $\bar{X} = 18,9$ y un rango de 8 a 30 concuerda con los valores bajos obtenidos en linfocitos de controles normales, por otros autores, $\bar{X} = 31$, rango de 14 a 58 (51); $\bar{X} = 34$, rango 20 a 55 (38); $\bar{X} = 28,2$ rango 12 a 68 (1).

Los resultados semicuantitativos del contenido de glucógeno en los linfocitos de pacientes con LLC con un índice promedio elevado de $\bar{X} = 148,4$ y un rango de 98 a 213 concuerda con los valores altos referidos por la bibliografía en los linfocitos de pacientes con LLC : $\bar{X} = 103$, rango de 75 a 174 (38); $\bar{X} = 103$ rango 65 a 140 (51).

Muy pocos autores estudiaron el contenido del glucógeno linfocitario en pacientes con LLC post-tratamiento, encontrando una disminución del contenido de glucógeno con un índice promedio de $\bar{X} = 51$ y un rango de 19 a 104, (51) coincidiendo con nuestros resultados, que arrojaron un promedio de $\bar{X} = 30,50$ y un rango de 6 a 65 en los pacientes con LLC post-tratamiento, aunque en este caso tanto el promedio como los valores límites del rango fueron inferiores.

Es interesante observar que el aumento del contenido de glucógeno linfocitario no es exclusivo de la LLC, observándose valores igualmente elevados en otras patologías como en los linfosarcomas, la enfermedad de Hodgkin, la Mononucleosis infecciosa, en las supuraciones crónicas, la colitis ulcerosa, en los tumores epiteliales malignos, en la diabetes mellitus. (32) (38) (51) (64).

Estos resultados sugieren la existencia de alteraciones metabólicas responsables del aumento del glucógeno citoplasmático en los linfocitos, alteraciones no necesariamente iguales en las diversas patologías.

El aumento del índice del PAS en linfocitos normales cultivados "in vitro", en un medio con glucosa previa a su transformación; podría ser el índice de un cambio en la actividad

funcional del linfocito, precediendo a la formación de anticuerpos y explicando el aumento del PAS en las patologías no linfoproliferativas. (49) (64)

Un índice de PAS elevado, y la ausencia de una elevación en el contenido de glucógeno de linfocitos de pacientes con LLC, cultivados "in vitro" en un medio con glucosa, sugiere alguna alteración del metabolismo como consecuencia de un cambio neoplásico fundamental en la célula. (49) (64)

Los estudios mediante prueba de tolerancia a la glucosa en adultos normales, en enfermos con diversas patologías y en pacientes con LLC no padeciendo de diabetes, dieron resultados anormales en el 71% de los pacientes con LLC, siendo normales en los otros dos grupos, pudiendo correlacionarse los resultados anormales con índices elevados de PAS en los linfocitos de los pacientes con LLC insinuando un metabolismo anormal de los hidratos de carbono en esta patología. (32)

El hecho que células morfológicamente idénticas como los linfocitos normales y los de la LLC presentan variaciones bioquímicas muy marcadas, como el aumento considerable del glucógeno citoplasmático en caso de LLC sugiere que la aberración metabólica sería un reflejo de la patología imperante.

Los estudios sobre glicólisis y respiración en leucocitos revelaron diferencias notables entre los leucocitos normales y los leucocitos leucémicos. La producción de ácido láctico resultó ser $45,2 \mu\text{M}$ por 10^8 leucocitos por hora en leucocitos normales, mientras que su valor descendió a $4,8 \mu\text{M}$ por 10^8 leucocitos por hora en los casos de LLC; el consumo de oxígeno desde $44 \mu\text{M}$ por 10^8 células por hora en los normales, descendió a $1,1 \mu\text{M}$ por 10^8 células por hora en los casos de LLC; y la utilización de glucosa de $21 \mu\text{M}$ por hora en los normales llegó a $2,9 \mu\text{M}$ en los casos de LLC. (63)

Los estudios sobre enzimas como la fosforilasa, la UDPG glucosiltransferasa o la α - D - glucosidasa involucradas en la síntesis o el catabolismo del glucógeno, resultaron normales en los linfocitos de las LLC, lo que permitiría deducir que el almacenamiento del glucógeno en estos casos se debía a otro defecto metabólico. (8)

Marcando linfocitos normales y linfocitos de pacientes con LLC con glucosa - $1 - \text{C}^{14}$ se pudo comprobar que el metabolismo de la glucosa estaba disminuido en las células leucémicas con respecto a las normales.

La cantidad de $^{14}\text{CO}_2$ producido, como indicador de la glicólisis oxidativa en su totalidad, la producción de intermediarios glicolíticos, la cantidad total de azúcar utilizada y el por ciento utilizado a través del ciclo de la Hexosa Monofosfato fueron significativamente inferiores en los linfocitos leucémicos que en los normales. (8) (24)

Por otro lado el total de la glicólisis aeróbica como todos los pasos que conducen desde la glucosa al ácido láctico a través de las enzimas : hexoquinasa, fosfohexosaisomerasa, fosfo-fructosa-kinasa, aldolasa, triosafofosatoisomerasa, piruvatokinasa y láctico dehidrogenasa fueron inferiores en los linfocitos leucémicos que en los normales, considerándose a la hexokinasa como la enzima limitante. (63)

El hecho que el linfocito leucémico presenta un defecto en la utilización de la glucosa a través del ciclo de la hexosamonofosfato podría provocar la acumulación de algún intermediario glicolítico que podría ser utilizado en el ciclo de la gluco-génesis celular, resultando en una síntesis patológica de glucógeno. Por ej. la glucosa - 6 - fosfato acumulada podría transformarse mediante la fosfoglucomutasa en glucosa - 1 - fosfato y entrar en el ciclo de la síntesis de glucógeno. Por otro lado se sabe que los niveles de la enzima glucógeno sintetasa (UDPG glicosiltransferasa) dependen de los niveles de glucosa - 6 - P. (8) De esta manera se podría explicar la acumulación de glucógeno en estos linfocitos leucémicos. La falla en el metabolismo de los azúcares podría ser en última instancia debida a una alteración a nivel de la síntesis proteica de enzimas debidas a modificaciones en los ácidos nucleicos celulares. Estudios sobre los ácidos desoxirribonucleicos (ADN) de los linfocitos normales y leucémicos demostraron que la cantidad total de ADN era igual en ambas células.

Estudios sobre los ácidos ribonucleicos (ARN) en linfocitos de LLC y normales demostraron que la cantidad total de ARN era igual en ambas células.

Estudios sobre las distintas clases de ARN en linfocitos leucémicos y normales demostraron que la cantidad total de r - ARN era igual en ambas células, pero en los linfocitos leucémicos había mayor cantidad (4%) de un ARN de bajo peso molecular (4 - 10 S) con respecto al encontrado en las células normales. (0.4%). Por distintos métodos se verificó que este ARN de bajo peso molecular no provenía de la escisión de la molécula de ARN de alto peso molecular.

La síntesis de ARN resultó ser normal en los linfocitos leucémicos, pero se encontró un ARN de alto peso molecular mucho más estable que el normal.

Al estudiar la actividad ribosomal se encontró que ésta era de 16 a 23% en los linfocitos de la LLC, mientras que los valores obtenidos en linfocitos normales eran de 43 a 44%; por lo tanto en la LLC habría una disminución en la formación de polisomas con la consecuente disminución en la síntesis proteica. (4)

Estos resultados son compatibles con la disminución en la producción de globulinas que se observa en la LLC y también con la actividad disminuida de enzimas del ciclo de la hexosa monofosfato con la posible utilización de los intermediarios glicolíticos en el ciclo de la glucogénesis resultando en la acumulación de glucógeno detectada en los linfocitos de la LLC.

Algunos teorías sugieren que la acumulación de glucógeno intracitoplasmático inhibiría el normal funcionamiento de la maquinaria sintetizadora de inmuno globulinas con la consecuente hipogamma-globulinemia. (44)

Estos linfocitos por lo tanto además de las anormalidades metabólicas con respecto al glucógeno intracelular, a la presencia de ciertos ARN anormales y una actividad ribosomal disminuída también, presentan otros tipos de anormalidades.

La asociación de patologías auto-inmunes con las LLC, la mayor sensibilidad a infecciones bacterianas, afecciones virósicas, la presencia de hipogammaglobulinemia sugieren una incompetencia inmunológica en estos linfocitos. (20) (42) (54).

La inmunización de controles normales y pacientes con LLC con antígenos de Salmonella produjo en los primeros síntesis de anticuerpos no detectada en los pacientes con LLC, no observándose en los linfocitos leucémicos la adherencia de las bacterias a la superficie linfocitaria, "in vitro" post inmunización como manifestación visible de la reacción : Ag - Ac observada en los linfocitos normales, sugiriendo la pérdida de una importante función biosintética de los linfocitos leucémicos. (6)

La aparición de mitosis en cultivos de linfocitos normales y leucémicos al ser expuestos a antígenos como Escherichia coli "in vitro" indicaría que la inmunidad adquirida previamente a la aparición de la enfermedad no esta afectada.

La falta de mitosis en cultivos de linfocitos leucémicos al ser expuestos "in vitro" a antígenos desconocidos como Salmonella comercial, mientras que se observan mitosis en linfocitos normales en las mismas condiciones, indican un defecto biológico básico del linfocito de la LLC para activar nuevos sistemas inmunológicos. (7)

La falta de respuesta a la fitohemaglutinina es otra característica detectada en los linfocitos de la LLC. (20) (42) (54) (56).

La demostración de la existencia de dos clases de linfocitos en la sangre periférica, morfológicamente iguales, pero diferentes en cuanto a su origen, funciones, diversas características, fisiología, cantidad, denominados linfocitos B y linfocitos T (15) abre un nuevo enfoque en este estudio.

Varios estudios en cuanto a las características de los linfocitos T y B demostraron que en las LLC los linfocitos eran linfocitos B, encontrándose una población de linfocitos T normales diluidos en la gran población de linfocitos B leucémicos. (10) (13) (17) (41) (53) (55)

Pero otras investigaciones estudiando a fondo las características de los linfocitos en las LLC, en algunos pocos casos, 1 caso sobre 11 (10) y otros 11 casos (9), encontraron que los linfocitos leucémicos presentaban las características de los linfocitos T. Llama la atención que los pocos casos de LLC descriptos en Japón donde generalmente no se observa LLC son precisamente LLC a linfocitos T. (9)

Los estudios inmunológicos y citoquímicos de los linfocitos de las LLC presentaron diversas características según la clase de linfocitos en cuestión; los linfocitos T presentaban una reacción de PAS negativa y una reacción de fosfatasa ácida positiva, mientras que los linfocitos B presentaban una reacción de PAS positiva y una reacción de fosfatasa ácida negativa. (11)

La existencia de LLC a linfocitos T es probablemente la explicación de reacciones de PAS negativas o disminuidas encontradas por algunos autores, aunque de acuerdo a los casos descriptos en la literatura este tipo de LLC es mucho menos común que la LLC a linfocitos B.

Por lo tanto en las LLC a linfocitos B encontramos una población de linfocitos leucémicos de vida larga (12), metabólicamente anormales, cargados de glúcogeno, que no responden al estímulo de la fitohemaglutinina y que son inmunológicamente incompetentes, pudiendo deducir que en la mayoría de los casos la LLC se debería a una proliferación monoclonal de células con características de linfocitos B. Quedaría por dilucidarse si estos linfocitos leucémicos con características de linfocitos B provienen realmente de un linfocito B que debido a cambios neoplásicos fundamentales sufrió alguna alteración en su comportamiento normal, o si se trataría de alguna célula linfocitaria, con algunas características semejantes a las de los linfocitos B, que normalmente se encuentran en muy escaso número en el organismo y que por algún cambio neoplásico aparece en gran cantidad en esta patología.

La reducción del glucógeno de los linfocitos de la LLC post-tratamiento con un antimitótico como el clorambucilo, podría tomarse como un índice del efecto de la medicación, quedando por dilucidar los mecanismos de acción de dicha droga.

IX. CONCLUSIONES.

Se investigó la presencia de glucógeno citoplasmático en los linfocitos sanguíneos mediante la reacción citoquímica del ácido-peryódico-Schiff, PAS, calculando el porcentaje de linfocitos PAS positivos y realizando un análisis semicuantitativo de la reacción mediante un índice de intensidad calculado en base a la cantidad de gránulos de glucógeno presentes en los linfocitos, en 20 adultos sanos (10 hombres y 10 mujeres) y 20 pacientes con leucemia linfática crónica, LLC, (16 hombres y 4 mujeres), pre y post-tratamiento mínimo de 60 días con un agente quimioterápico, que actúa a nivel del ácido desoxirribonucleico : el clorambucilo.

En el grupo Normal se encontró un porcentaje de linfocitos PAS + bajo, con un promedio de 14.2% que aumentó a 81.4% en el grupo de Pacientes con LLC pre-tratamiento, descendiendo a un promedio de 19.7% post-tratamiento. El aumento del porcentaje de linfocitos PAS + en el grupo de pacientes con LLC pre-tratamiento con respecto al grupo normal fué estadísticamente significativo con un valor de $p < 0.001$. La diferencia en el porcentaje de linfocitos PAS + entre el grupo de pacientes con LLC pre y post-tratamiento también fué estadísticamente significativa con un valor de $p < 0.001$. El porcentaje de linfocitos PAS + en los pacientes con LLC post-tratamiento mantuvieron una diferencia significativa a un nivel de $p < 0.05$ con respecto al grupo normal.

En el grupo Normal se encontró un índice promedio bajo de 18.9 que aumentó a un índice promedio de 148.4 en el grupo de pacientes con LLC pre-tratamiento, descendiendo a un índice promedio de 30,50 después del tratamiento. La elevación del índice en los pacientes con LLC pre-tratamiento con respecto a los valores normales fué estadísticamente significativa con un valor de $p < 0.001$. La diferencia entre los valores del índice de los pacientes con LLC pre y post-tratamiento fué estadísticamente significativa con un valor de $p < 0.001$. Los valores obtenidos en los pacientes con LLC post-tratamiento, aunque aparentemente se acercaron a los valores normales al ser comparados estadísticamente se encontró una diferencia significativa a un nivel de $p < 0.01$.

Estos resultados permiten aseverar que :

- Iº En los adultos normales la cantidad de glucógeno citoplasmático de los linfocitos sanguíneos es baja.
- IIº En 20 pacientes con LLC la cantidad de glucógeno citoplasmático de los linfocitos sanguíneos fué elevada, haciendo pensar en la presencia de algún trastorno metabólico subyacente directamente relacionado a la transformación neoplásico celular.

III^o El descenso en la cantidad de glucógeno citoplasmático en los linfocitos leucémicos post-tratamiento es muy útil del punto de vista terapéutico:

- 1/ Para valorar la eficacia de la medicación.
- 2/ Para investigar el efecto de nuevas drogas.
- 3/ Para la elección de la medicación más eficaz en cada caso y cambiar el esquema terapéutico cuando sea necesario.

Considerando la investigación de la fisiopatología linfocitaria, la Reacción de PAS :

- a/ Indicaría la presencia de variaciones bioquímicas importantes detectadas en células aparentemente idénticas en cuanto a su morfología tanto al microscopio óptico, como al microscopio electrónico y su retorno a la normalidad post-tratamiento.
- b/ Sería un método útil, relativamente simple y poco costoso para detectar la presencia de células anómalas.
- c/ Serviría para detectar aberraciones metabólicas como manifestación de la patología neoplásica subyacente.
- d/ Indicaría la existencia de una etiología diferente en aquellos casos de LLC con reacción de PAS disminuída o negativa, citados por varios autores. (11) (39) (69)

Siendo especialmente interesante en estos casos la evaluación del efecto de la medicación y del esquema terapéutico más eficaz para profundizar en las posibles causas etiopatogénicas.-



Lic. Rodiea H. de Cesen



Dr. Alfredo E. Mæchi

BIBLIOGRAFIA.

-
- 1/ Astaldi G. and L.Verga.- The Glycogen Content of the Cells of Lymphatic Leukaemia.- *Acta haemat.* 17, 129: 1957.
 - 2/ Bernard J. - J.P. Lévy.- *Manual de Hematología*. Terray-Masson S.A., Barcelona. Cap.XII. 1975.
 - 3/ Billingham R.E.- The Role of the Lymphocyte in Transplantation Immunity. *Anat. Rec.* 165, 121; 1969.
 - 4/ Billington R.and R.F.Itzhaki.- Studies on Nucleic Acids in Lymphocytes of Chronic Lymphocytic Leukaemia. *Acta haemat.* 54, 242; 1975.
 - 5/ Boggs D.R., S.A.Sofferan, M.M.Wintrobe and G.E.Cartwright.- Factors influencing the duration of Survival of Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *Am.Journ. of.Med.* 40, 243: 1966.
 - 6/ Brody J.I, L.Beizer.- Immunologic Incompetence of the Neoplastic Lymphocyte in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Annals of Internal.Medicine* 64, 1237; 1966.
 - 7/ Brody J.I., F.A.Oski.- Immunologic Memory of the Normal and the Leukemic Lymphocyte. *Annals of Internal.Medicine* 67, 573: 1967.
 - 8/ Brody J.I., F.A.Oski and D.E.Singer.- Impaired Pentose Phosphate Shunt and Decreased Glycolytic Activity in Lymphocytes of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Metabolic Pathway ? Blood* 34, 421 : 1969.
 - 9/ Brouet J.C., G.Flandrin, M. Sasportes, J.L.Preud 'Homme M.Seligmann.- Chronic Lymphocytic Leukaemia of T-Cell origin.- *The Lancet* 390, November 1975.
 - 10 / Brown G., M.F.Greaves.- Expression of Human T and B Lymphocytes Cellsurface Markers on Leukaemic Cells. *The Lancet* 753, September 1974.
 - 11 / Catovsky D., J.Galetto, A.Okos, E.Miliani and D.A. Galton.- Cytochemical Profile of B and T Leukaemic Lymphocytes with Special Reference to acute Lymphoblastic Leukaemia. *J.Clin. Path.* 27, 767 : 1974.
 - 12 / Catovsky D., P.J.L.Holt : T. or B Lymphocytes in Chronic Lymphocytic Leukaemia.- *The Lancet* 976, October 1971.
 - 13 / Catovsky D., E.Miliani, A.Okos, D.A.C.Galton.- Clinical Significance of T-Cells in Chronic Lymphocytic Leukaemia. *The Lancet* 751, September 1974.
 - 14 / Claësson M.H.- Death of Blood Lymphocytes Studied by supravital Dye Exclusion and ³H-Thymidine. Autoradiography.- *Scand.J.Haematol.* (1975) 15, 256.
 - 15 / Clot J., H.Massip and O.Mathieu.- In Vitro Studies on Human B and T Cell Purified Populations. *Immunology.*- 29, 445: 1975.
 - 16 / Conn E.E.y P.K.Stumpf. *Bioquímica fundamental*, Cap.2, Segunda Edición Editorial Limusa-Wiley S.A., Mexico, 1969.

- 17/ Cooper D.A., V.Petts, E.Luckhurst, J.C.Biggs and R.Penny.-
T. and B.Cell Populations in Blood and Lymph Node in Lym-
phoproliferative Disease. Br.J.Cancer 31, 550: 1975.
- 18/ Craddock C.G., R.Longmire and R.Mc Millan.- Lymphocytes
and the immune response. The New Eng.J. of Med.285, p.324;
1971.
- 19/ Dacie J.V. y S.M.Lewis.- Hematología Práctica. 2ª edición.
Ediciones Toray S.A., Barcelona. 1970 (Cap.V).
- 20/ Dameshek W.- Chrocin Lymphocytic Leukemia, an Accumulative
Disease of Immunologically Incompetent Lymphocytes. Blood.
XXIX.No.4, 566: 1967.
- 21/ Di Fiore M.S.H.-Diagnóstico Histológico. Segunda Edición.
Editorial "El Ateneo", Buenos Aires, 1949.
- 22/ De Robertis E.D.P., W.W.Nowinsky y F.A.Sáez.- Biología Cé-
lular. Octava Edición. Edit. "El Ateneo", Bs.As.1970.(Cap.7).
- 23/ Fieser L.F.,y M.Fieser.- Química Orgánica, Segunda Edición,
Editorial Grijalbo S.A., Mexico D.F.1960 (Cap.XXXVI).
- 24/ Frei J.,C.Borel, G.Horvath, B.Cullity and A.Vannotti.-
Enzymatic Studies in the Different Types of Normal and Leu-
kemic Human White Cells. Blood 18, 317; 1961.
- 25/ Gunz F.W., J.P.Gunz, A.M.O.Veale, C.J.Chapman & I.B.Houston.-
Familial Leukaemia : A Study of 909 Families. Scand.Journ.
Haematology 15, 117: 1975.
- 26/ Hayhoe F.G.J. and J.C.Cawley.- Acute Leukaemia: Cellular
Morphology, Cytochemistry and Fine Structure. Clinics in
Haematology 1, 1,49 February 1972.
- 27/ Hayhoe F.G.J., D.Quaglino and R.J.Flemans.- Consecutive Use
of Romanowsky and Periodic.Acid.Schiff Techniques in the Study
of Blood and Bone-Marrow Cells. Brit.J.Haemat.6, 23: 1960.
- 28/ Hayhoe F.G.J., D. Quaglino and R.Doll: The Cytology and Cyto-
chemistry of Acute Leukaemias.Chap.1. Her Majesty's Stationery
Office. London 1964.
- 29/ Jamra M., D.H.B.Pozzi, Ch.C.Musatti, M.E.A.Tolnai,N.Figueiredo
Mendes. Linfocitos T y B. Sangre 20(3), 273: 1975.
- 30/ Jonsson V.- Influence of Prednisone and Cytostatics on Human
Blood B-T and- O Lymphocytes in Diseases. Scand.J.Haematol.
15, 109: 1975.
- 31/ Kaung D.T. and M.Ott.- Are Normal Lymphocytes Small ? The Lancet,
August 30, 414, 1975.
- 32/ S.A.Lisker, J.I.Brody and L.H.Beizer.- Abnormal Carbohydrate
Metabolism in Patients with Malignand Blood Dyscrasias.- The
Am.J.of the Med.Sciences. 62, 282: Sept.1966.

- 33/ Lynch J.M., S.S.Raphael, L.D.Mellor, P.D.Spare y M.J.H. Inwood.- Métodos de Laboratorio. Segunda edición. Edit. Interamericana. México 1972.
- 34/ Manaster J., J. Frühling and P. Stryckmans.- Kinetics of Lymphocytes in Chronic Lymphocytic Leukemia. I Equilibrium Between Blood and a "Readily Accessible Pool". Blood 41 No.3, 425: 1973.
- 35/ Maximow A.A. y W. Bloom.- Tratado de Histología. Editorial Labor S.A. Argentina, 1947.
- 36/ Mc.Gregor D.D.- The Role of Lymphocytes in Antibody Formation and Delayed-Type Hypersensitivity.- Anat.Rec. 165, 117: 1969.
- 37/ Mehrishi J.N., K. Zeiller.- T and B Lymphocytes: Striking Differences in Surface Membranes. British Medical Journal 1, 360: 1974.
- 38/ Mitus W.J., L.J. Bergna, I.B. Mednicoff and W. Dameshek.- Cytochemical Studies of Glycogen Content of Lymphocytes in Lymphocytic Proliferations. Blood 13, 748: 1958.
- 39/ Najman A., E. Sonsino, A. Buu-Hoï, G. Duhamel et R. André. La coloration par le PAS des lymphocytes dans la leucémie lymphoïde chronique. Confrontation avec la culture de lymphocytes. Nouv. Rev. Franc. d'Haematol. 9, 737: 1969.
- 40/ Newell D.G., S. Roath and T.L. Smith.- The Scanning Electron Microscopy of Normal Human Peripheral Blood Lymphocytes.- British Journal of Haematology, 1976, 32, 309.
- 41/ Nowell P., R. Daniele, D. Rowland Jr., L. Winger.- T and B Lymphocytes in Chronic Lymphocytic Leukemia.- The New England Journal of Medicine 295, 504: 1976.
- 42/ Oppenheim J.J., J. Whang and E. Frei.- Immunologic and Cytogenetic Studies of Chronic Lymphocytic Leukemic Cells.- The Journal of Hematology. XXVI, No.2, 121: 1965.
- 43/ Osmond D.G.- The Non-Thymic Origin of Lymphocytes. Anat.Rec. 165, 109: 1969.
- 44/ Perera J.B., G.D. Pegrum.- The Lymphocyte in Chronic Lymphatic Leukaemia.- The Lancet, 1207, June 15, 1974.
- 45/ Perry S. G.L. Irvin III, and J. Whang.- Studies of Lymphocyte Kinetics in Man. Blood. Vol. 9, No.1, Jan 1967.
- 46/ Peterson L.C., C.D. Bloomfield, R.D. Sundberg, K.J. Gajil-Peczalska and R.D. Brunning.- Morphology of Chronic Lymphocytic Leukemia and its Relationship to Survival.- The Amer. Jour. of Medicine 59, 316, Sept. 1975.
- 47/ Planches d'Hématologie SANDOZ. Sandoz S.A., Bale (Suisse), 1952. Printed in Switzerland by Frobenius.Ltd. Basle.
- 48/ Polliack A., N. Lanpen, B.D. Clarkson and E. De Harven.- Identification of Human B and T Lymphocytes by Scanning Electron Microscopy. The Journal of Experimental Medicine. 138, 607: 1973.

- 49/ Quaglino D. and D.C.Cowling.- Cytochemical Studies on Cells from Chronic Lymphocytic Leukaemia and Lymphosarcoma Cultured with Phytohaemagglutinin.- Brit.J. Haemat. 10, 353: 1964.
- 50/ Quaglino D, D.Cowling and F.G.J.Hayhoe.- Cytochemical and autoradiographic studies on normal and leukemic cells in shortterm tissue cultures. Brit.J.Haemat. 10, 417 : 1964.
- 51/ Quaglino D. and F.G.J. Hayhoe.- Observation on the Periodic Acid-Schiff Reaction in Lymphoproliferative Diseases.J.Path. Bact. 78, 521 : 1959.
- 52/ Qualino D. and F.G.J.Hayhoe.- Periodic-Acid-Schiff Positivity in Erythroblasts with Special Reference to Di Guglielmo's Disease. Brit.J.Haemat. 6, 26: 1960.
- 53/ Rowlands D.T.Jr., R.P.Daniele, P.C.Nowell, H.A.Wurzel.- Characterization of Lymphocytes Subpopulations in Chronic Lymphocytic Leukemia. Cancer 34, pag.1962: 1974.
- 54/ Rubin D; K.Havemann, and W.Daneshek.- Studies in Chronic Lymphocytic Leukemia; Further Studies of the Proliferative Abnormality of the Blood Lymphocyte.- Blood 33, 313: 1969.
- 55/ Rudders R.A.- B Lymphocyte Subpopulation in Chronic Lymphocytic Leukemia.- Blood 47, No.2 229: 1976.
- 56/ Schrek R., I.Hines.- Effect of Phytohaemagglutinin on Lymphocytes From Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia.- Arch.Path.83, 58: 1967.
- 57/ Schumacher H.R.- T.K.Maugel and K.D.Davis.- The Lymphocyte of Chronic Lymphatic Leukemia.-Cancer 26, 895: 1970.
- 58/ Schwarze E.W.- T-Cell Origin of Acid Phosphatase-Positive Lymphoblasts. Lancet, p.1264. December 20, 1975.
- 59/ Schwarz M.R.- Symposium on The Life History of Lymphocytes.- Anat.Rec. 165, 105: 1969.
- 60/ Stewart Alice M.- Epidemiology of Acute and Chronic Leukaemias. Clinics in Haematology Volum 1, Number 1,3. Februar 1972.
- 61/ St.Pierre R.L.- The Thymus as a Lymphoid Organ. Anat. Rec.165, 113: 1969.
- 62/ Stuart Roath.- Observations on The Aetiology of Acute Leukaemia.- Clinics in Haematology Volum 1, Number 1, 23, Feb. 1972.
- 63/ Valentine W.H.- The Metabolism of the Leukemic Leukocyte.- Amer.J.Med.28, 699: 1960.
- 64/ Vaughan Jones R., G.P.Geffi and H.S.R.Hutt.- Lymphocyte Glycogen Content in various Diseases.J.Clin.Path.15, 36: 1962.
- 65/ Watanabe Y., N.Tamaoki, S.Habu, Y.Tashiro, S.Akatsuka and Y.Enomoto.- Fine Structural Study on Human T and B Lymphocytes.- Acta Haem.Jap.37, 655 : 1974.

- 66/ Winkelstein A. and C.G.Craddock.- Comparative Response of Normal Human Thymus and Lymph Node Cells to Phytohaemagglutinin in Culture. Blood, Vol. 29. No 4. 594, 1967.
- 67/ Wintrobe M.M.- Clinical Haematology. Seventh Edition 1974. Lea & Febiger, Philadelphia.
- 68/ Zacharski Leo R. and James W. Linman.- Chronic Lymphocytic Leukemia Versus Chronic Lymphosarcoma Cell Leukemia. Am. J. Med, 47, 75: 1969.
- 69/ Zittoun R., R. Smadja, M. Guillerm, et J. Bousser.- La coloration par le PAS du lymphocyte normal et leucémique. Path. Bid. 15, 508: 1967.

INFORMACION SUPLEMENTARIA

DEPARTAMENTO DE RADIOBIOLOGIA

COMISION NACIONAL DE ENERGIA ATOMICA

AÑO

1978

Sean estas líneas testimonio de mi reconocimiento:

Al Dr. Rómulo L. Cabrini por autorizar la realización de las mediciones microespectrofotométricas de este trabajo , en el Departamento de Radiobiología de la Comisión Nacional de Energía Atómica, y por el aporte de su amplia erudición científica.

Al Dr. Claudio Conti por el asesoramiento en la revisión bibliográfica , por la capacitación técnica en la utilización del microespectrofotómetro y por su riguroso control de los resultados obtenidos.

Para corroborar cuantitativamente los hallazgos semicuantitativos precedentes en cuanto al aumento del glucógeno linfocitario en pacientes con LLC pre-tratamiento con respecto a un grupo normal y su disminución post tratamiento, se realizaron determinaciones microespectrofotométricas. (2)

También se efectuaron mediante microespectrofotometría mediciones cuantitativas de Acido-Desoxirribonucleico (ADN) linfocitario en normales y en pacientes con LLC sin tratamiento para investigar otro parámetro más con el objeto de esclarecer las anomalías metabólicas celulares de esta patología. (1)

I. MATERIAL Y MÉTODO.

MATERIAL.

A/ Para las mediciones de glucógeno linfocitario se utilizaron frotis de sangre periférica de

1º/ 10 adultos normales (5 hombres y 5 mujeres) dadores de sangre que constituyeron el grupo normal.

2º/ 10 pacientes con LLC (8 hombres y 2 mujeres) pre- y post-tratamiento con clorambucil.

En cada caso se midió el glucógeno de 100 células linfocitarias consecutivas.

B/ Para las mediciones de ADN linfocitario se utilizaron frotis de sangre periférica de :

1º/ 10 adultos normales (5 hombres y 5 mujeres) dadores de sangre que constituyeron el grupo normal.

2º/ 10 pacientes con LLC (8 hombres y 2 mujeres) sin tratamiento.

En cada caso se midió el ADN de 20 linfocitos consecutivos y de 10 neutrófilos segmentados consecutivos.

MÉTODO.

A/ Para la tinción del glucógeno linfocitario se siguió el método de tinción de PAS según Hotchkiss (38) descrito anteriormente.

B/ Para la tinción del ADN se siguió el método de Feulguen.(33)

1) REACTIVOS:

a) Fijador : Metanol.

b) Hidrolizante : Acido clorhídrico 5N

c) Solución de Schiff : según el método de Coleman- de Tomasi (33) descrito anteriormente en Material y Método (VI, A, 2,c) pero sin añadir carbón activado.

d) Reductor : se utilizó el mismo reductor descrito en Material y Método (VI, A, 2, d).

2) TECNICA DE TINCIÓN.

- a) se cubre el extendido de sangre periférica con el reactivo fijador durante 3 minutos. Se lava con agua corriente.
- b) se cubre el extendido con el reactivo hidrolizante a temperatura ambiente durante 35 minutos. Se lava con agua corriente.
- c) Se cubre el extendido con el reactivo reductor durante 5 minutos. Se lava con agua corriente.

Los núcleos se observan de color rojo violáceo.

Las zonas ocupadas por los nucleolos se observan incoloras.

Para las determinaciones cuantitativas tanto de glucógeno como de ADN se utilizó : un microespectrofotómetro Zeiss Cytoscan con platina automática para realizar barridos bidireccionales con luz monocromática con filtro interferencial de 5600 Å con condensador 0.22 y lente de inmersión de 100 X. El aceite de inmersión fué previamente probado para seleccionar aquél que producía el menor efecto de dispersión de luz. El aceite de inmersión utilizado tenía un índice de refracción de 1.568.

II. RESULTADOS.

A) Los resultados obtenidos con respecto al glucógeno linfocitario, expresados en unidades arbitrarias de sustancia PAS positiva (U.A. PAS (+)) fueron los siguientes:

I. NORMALES.

1º Para cada normal se midió la cantidad de glucógeno por linfocito, contándose 100 linfocitos consecutivos.

Para un caso se realizó un histograma representando el contenido de glucógeno por linfocito expresado en U.A.PAS (+) en función de la frecuencia celular para los 100 linfocitos considerados (Fig.Nº : 1a).

Teniendo en cuenta todas las mediciones realizadas en los 10 normales se observó que el valor máximo de glucógeno por linfocito fue 8.4 U.A.PAS (+) y el valor mínimo fue: cero U.A.PAS (+).

2º Para cada Normal se consideró :

- a) El porcentaje de linfocitos PAS positivos Tabla Ia
- b) El Índice de Intensidad de la reacción de PAS calculado según el método de Mitus (33) descrito anteriormente en Material y Método (VI) (Tabla Ia)
- c) El contenido de glucógeno de 100 linfocitos consecutivos obtenido mediante la suma del contenido de glucógeno de cada linfocito medido con el citoespectrofotómetro y expresado en U.A.PAS +. (Tabla Ia).

3º En cuanto a los normales (Tabla Ia)

- a) El porcentaje promedio de linfocitos PAS positivos fue de $\bar{X}_{N\%} = 11$ con una desviación standard $DS_{N\%} = 2.44$, un error standard $ES_{N\%} = 0.77$ y un rango comprendido entre 7% y 15%.
- b) El índice de intensidad de la reacción de PAS, dió un promedio $\bar{X}_{I.N} = 15$, con una desviación standard $DS_{I.N} = 2.9$, un error standard $ES_{I.N} = 0.91$ y un rango comprendido entre 10 y 21.
- c) El contenido de glucógeno de 100 linfocitos consecutivos expresado en U.A.PAS (+) para los 10 normales (Fig.4 a) dió un $\bar{X} = 32.9$ U.A.PAS (+), con una desviación standard $DS_{N.A.A.PAS +} = 9.6$, un error standard $ES_{N.U.A.PAS +} = 3.03$, y un rango comprendido entre 8.8 U.A.PAS (+) y 43.3 U.A. PAS (+).

II. Pacientes con LLC pre-tratamiento

1º Para cada paciente con LLC pre tratamiento se midió la cantidad de glucógeno por linfocito contándose 100 linfocitos consecutivos. En un caso se realizó un histograma representando el contenido de glucógeno por linfocito expresado en U.A.PAS (+) en función de la frecuencia celular para los 100 linfocitos considerados.(Fig.2a)

Teniendo en cuenta las mediciones realizadas en 1000 linfocitos de los 10 pacientes con LLC pre-tratamiento, en los 10 casos se observaron linfocitos carentes de glucógeno y linfocitos con un contenido de glucógeno superior a los valores máximos encontrados en normales (8.8 U.A. PAS +). El valor máximo de glucógeno por linfocito fué de 46,4 U.A. PAS (+).

- 2º Para cada Paciente con LLC pre-tratamiento se consideró:
- El porcentaje de linfocitos PAS positivos (calculado anteriormente en Resultados VI).
 - El Índice de Intensidad de la reacción de PAS (calculado anteriormente en Resultados VI).
 - El contenido de glucógeno de 100 linfocitos consecutivos obtenido mediante la suma del contenido de glucógeno de cada linfocito medido con el citoespectrofotómetro y expresado en U.A. PAS +. Los resultados obtenidos se observan en la tabla IIa.
- 3º En cuánto a los Pacientes con LLC pre-tratamiento (Tabla IVa)
- El porcentaje promedio de linfocitos PAS positivo fué :
 $\bar{X}_{\text{LLC-pre}\%} = 75\%$ con una desviación standard : $DS_{\text{LLC-pre}\%} = 6.8$, un error standard $ES_{\text{LLC-pre}\%} = 2.5$ y un rango comprendido entre 67% y 88%.
 - El Índice de Intensidad de la reacción de PAS dió un promedio $\bar{X}_{\text{LLC pre II}} = 130$, con una desviación standard $DS_{\text{LLC pre II}} = 17,8$, un error standard $ES_{\text{LLC-pre II}} = 5.63$ y un rango comprendido entre 98 y 157.
 - El contenido de glucógeno de 100 linfocitos consecutivos de los 10 Pacientes con LLC pre-tratamiento, expresado en U.A. PAS (+) (Fig.4a) dió un promedio $\bar{X} = 972,7$ U.A. PAS (+), con una desviación standard $DS = 172,6$, un error standard $ES = 54.62$ y un rango comprendido entre 658.2 U.A. PAS (+) y 1218.2 U.A. PAS (+).

III. Pacientes con LLC post-tratamiento.

- 1º Para cada Paciente con LLC post-tratamiento se midió la cantidad de glucógeno por linfocito contándose 100 linfocitos consecutivos. Para un caso se realizó un histograma representando el contenido de glucógeno por linfocito, expresado en U.A. PAS (+) en función de la frecuencia celular para los 100 linfocitos considerados. (Fig.3a).

Teniendo en cuenta las mediciones realizadas en 1000 linfocitos de los 10 Pacientes con LLC post-tratamiento, en los 10 casos se observaron linfocitos carentes de glucógeno, y en 9 casos se observaron linfocitos con un contenido de glucógeno superior a los valores máximos encontrados en normales (8.8 U.A. PAS (+)). El valor máximo de glucógeno por linfocito fué de 20,4 U.A. PAS (+). Este valor es in-

ferior al valor máximo encontrado en estos Pacientes pre-tratamiento (46.4 U.A. PAS (+)).

- 2º) Para cada Paciente con LLC post-tratamiento se consideró:
- El porcentaje de linfocitos PAS positivos (calculado anteriormente en Resultados VI),
 - El Índice de Intensidad de la reacción de PAS (Calculado anteriormente en Resultados VI).
 - El contenido de glucógeno de 100 linfocitos consecutivos obtenido mediante la suma del contenido de glucógeno de cada linfocito medido con el citoespectrofotómetro y expresado en U.A. PAS (+). Los resultados obtenidos se observan en la Tabla IIa.
- 3º) En cuánto a los Pacientes con LLC post-tratamiento (Tabla Va)
- El porcentaje promedio de linfocitos PAS positivos fué $\bar{X}_{LLC \text{ post}\%} = 13\%$ con una desviación standard $DS_{LLC \text{ post}\%} = 4,3$, un error standard $ES_{LLC \text{ post}\%} = 1.36$ y un rango comprendido entre 6% y 21%.
 - El Índice de Intensidad de la reacción de PAS dió un promedio de $\bar{X}_{LLC \text{ post II}} = 19$, con una desviación standard $DS_{LLC\text{-postII}} = 9$, un error standard $ES_{LLC\text{post II}} = 2.84$ y un rango comprendido entre 6 y 38.
 - El contenido de glucógeno de 100 linfocitos consecutivos de los 10 Pacientes con LLC post-tratamiento expresado en U.A. PAS (+) dió un promedio $\bar{X}_{LLC \text{ post U.A.}} = 83$ U.A. PAS (+), con una desviación standard $DS_{LLC \text{ post U.A.}} = 32$, un error standard $ES_{LLC \text{ post U.A.}} = 10.12$ y un rango comprendido entre 33.2 U.A. PAS (+) y 142.8 U.A. PAS (+).

IV). Las diferencias entre los tres grupos: Normal y Pacientes con LLC pre y post-tratamiento con respecto al porcentaje de linfocitos positivos y a la medición semicuantitativa del glucógeno linfocitario mediante el índice de intensidad de la reacción de PAS fueron analizadas estadísticamente en Resultados VI.

Para verificar si las diferencias observadas entre los tres grupos estudiados en cuanto al contenido cuantitativo del glucógeno linfocitario mediante citoespectrofotometría y expresadas en U.A. PAS (+), eran significativas :

- Se comparó el grupo Normal con el grupo de Pacientes con LLC pre-tratamiento mediante el test de Student, encontrándose una $t = 16.27$ para 18 grados de libertad con una $p < 0.001$; resultado que confirma la diferencia altamente significativa entre ambos grupos.
- Se comparó el grupo de pacientes con LLC pre- y post-tratamiento mediante un test de Student para muestras pareadas, obteniéndose un valor de $t = 46.53$ para

9 grados de libertad con una $p < 0.001$, resultado que confirma la diferencia altamente significativa entre el grupo de Pacientes con LLC pre-tratamiento y el mismo grupo de Pacientes post-tratamiento.

3º) La comparación del grupo Normal con el grupo de Pacientes con LLC post-tratamiento mediante el test de Student dió un valor de $t = 1.47$ para 18 grados de libertad, siendo la diferencia entre ambos grupos significativa a un nivel de $p < 0.2$.

B). Los resultados obtenidos en cuánto a la cantidad de ADN celular expresados en unidades arbitrarias de ADN (U.A. de ADN) fueron los siguientes :

1º) Normales.

En el extendido de sangre periférica de cada uno de los 10 normales, coloreado según el método de Feulguen, se midió mediante citoespectrofotometría la cantidad de ADN de 20 linfocitos consecutivos y de 10 neutrófilos segmentados consecutivos. Los resultados obtenidos expresados en U.A. de ADN fueron muy homogéneos tanto en el caso de los linfocitos, cuyos valores oscilaron entre 1.6 U.A. de ADN y 3.0 U.A. de ADN, como en el caso de los neutrófilos, cuyos valores oscilaron entre 1.4 U.A. de ADN y 2.4 U.A. de ADN.

En la fig.5a A se puede observar el ejemplo de un histograma del contenido de ADN linfocitario expresado en U.A. de ADN en función de la frecuencia celular en un caso normal y en la Fig.6a A se puede observar un histograma representando el contenido de ADN de los neutrófilos, en U.A. de ADN en función de la frecuencia celular en el mismo caso normal anterior.

En la tabla VIa se pueden observar las medias, las desviaciones standards y los errores standards del contenido de ADN, expresado en U.A. de ADN, de los linfocitos y de los neutrófilos de cada uno de los 10 casos normales.

En el caso de los linfocitos normales observamos que las medias tienen un valor de : $\bar{X} = 2.0$ o $\bar{X} = 2.1$, con desviaciones standards que varían entre $DS = 0.17$ y $DS = 0.33$ y errores standards que varían entre $ES = 0.03$ y $ES = 0.07$.

En cuánto a los neutrófilos normales los valores de las medias encontrados fueron : $\bar{X} = 1.9$ o $\bar{X} = 2.0$, con desviaciones standards oscilando entre $DS = 0.19$ y $DS = 0.27$ y errores standards variando entre $ES = 0.06$ y $ES = 0.08$.

2º) Pacientes con LLC sin tratamiento.

En el extendido de sangre periférica de cada uno de los 10 Pacientes con LLC sin tratamiento, coloreado según el método de Feulguen, se midió mediante citoespectrofotometría la cantidad de ADN de 20 linfocitos consecutivos y de 10 neutrófilos segmentados consecutivos. Los resultados obtenidos

expresados en unidades arbitrarias de ADN (U.A. de ADN) fueron muy homogéneos tanto en el caso de los linfocitos, cuyos valores oscilaron entre 1.6 U.A. de ADN y 3.0 U.A. de ADN, como en el caso de los neutrófilos cuyos valores oscilaron entre 1.5 U.A. de ADN y 2.5 U.A. de ADN. Estos resultados fueron muy similares a los resultados obtenidos en los 10 casos normales.

En la Fig. 5a B se represento mediante un histograma el contenido de ADN linfocitario en U.A. de ADN en función de la frecuencia celular en un paciente con LLC sin tratamiento.

En la Fig. 6a B se puede observar el histograma del contenido de ADN en U.A. de ADN de los neutrófilos del mismo paciente anterior. Los otros 9 casos de pacientes con LLC sin tratamiento presentaron histogramas similares.

En el caso de los linfocitos de los Pacientes con LLC sin tratamiento los valores de las medias fueron : $\bar{X} = 2.0$, $\bar{X} = 2,1$ o $\bar{X} = 2.2$ con desviaciones standard oscilando entre 0.19 y 0.37 y errores standard variando entre 0.04 y 0.08. En cuanto a los neutrófilos de estos Pacientes los valores de las medias encontrados fueron $\bar{X} = 1.8$, $\bar{X} = 1.9$ o $\bar{X} = 2.0$ con desviaciones standard oscilando entre 0.17 y 0.29 y errores standard variando entre 0.05 y 0.09 (Tabla VII a).

Mediante un análisis de la varianza de los 40 grupos :

- 10 grupos de linfocitos en 10 casos normales
- 10 grupos de neutrófilos en 10 casos normales
- 10 grupos de linfocitos en 10 Pacientes con LLC sin tratamiento,
- 10 grupos de neutrófilos en 10 Pacientes con LLC sin tratamiento.

Se obtuvo un valor de $F(3,36) = 0.6\hat{3}$ comprobando que las diferencias entre los distintos grupos no son significativas.

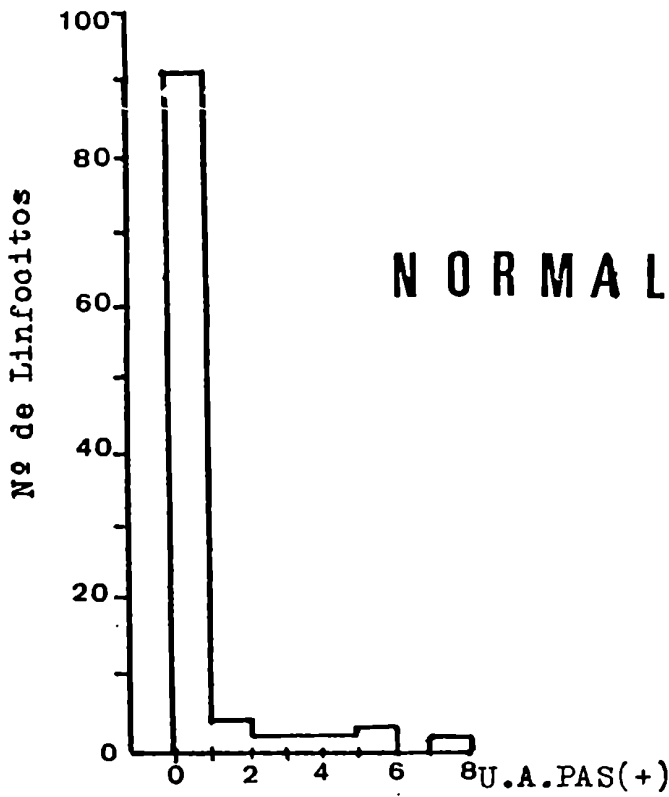


FIG.1a.-Frecuencia de la distribución del contenido de glucógeno, expresado en Unidades Arbitrarias PAS(+), por cada linfocito en un caso Normal

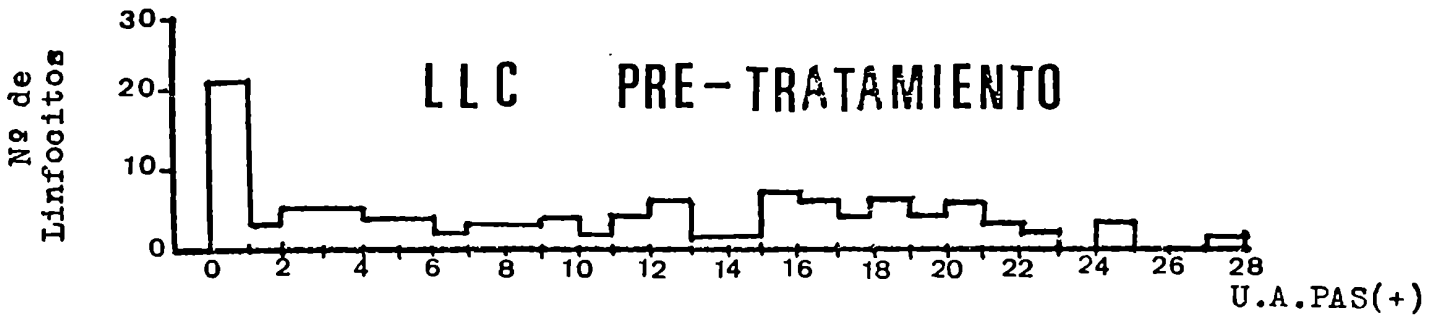


FIG.2a.-Frecuencia de la distribución del contenido de glucógeno, expresado en Unidades Arbitrarias PAS(+), por cada linfocito en un Paciente (Nº3) con Leucemia Linfática Crónica Pre-Tratamiento.

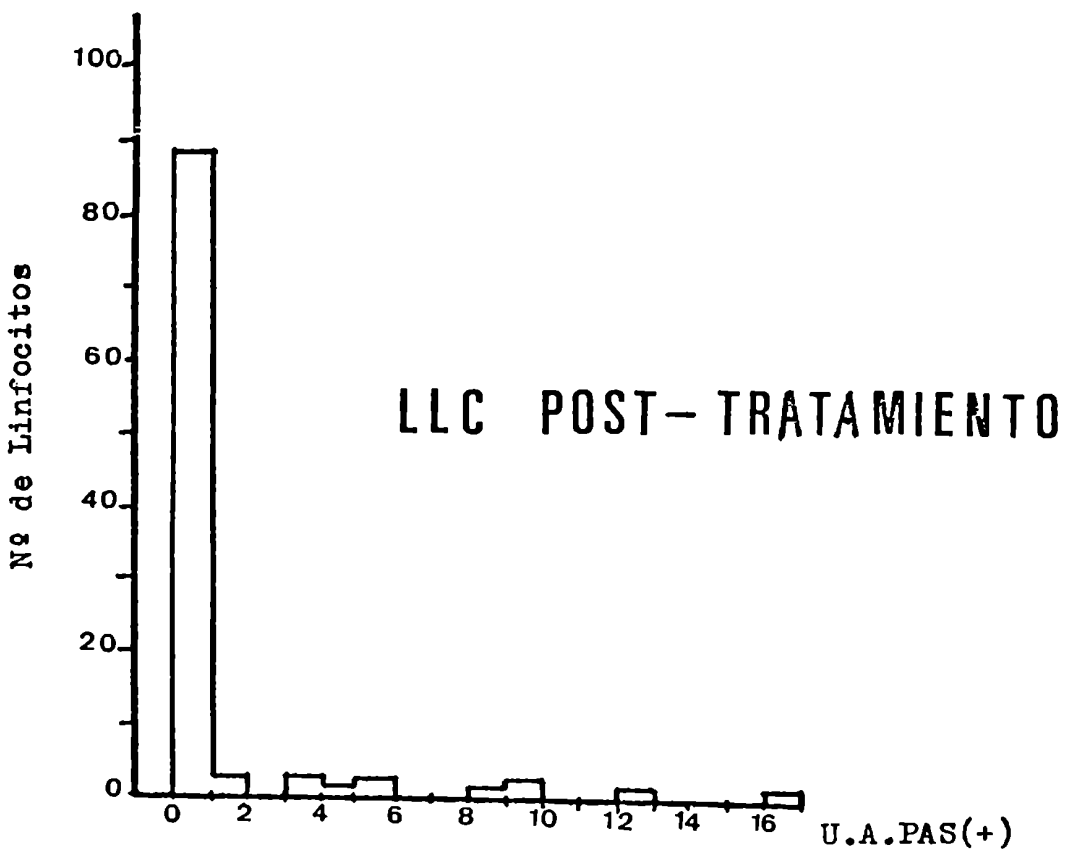
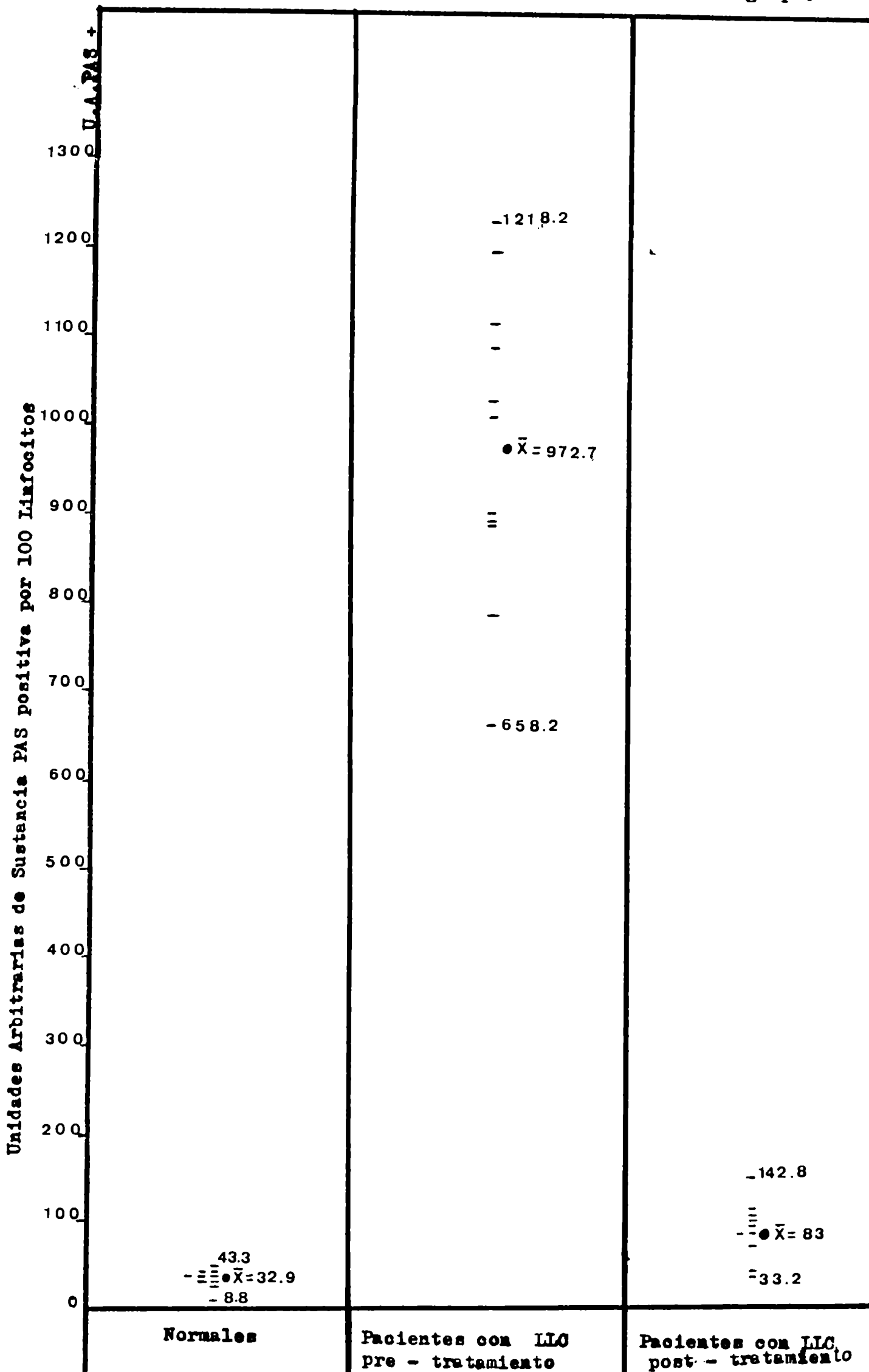


FIG.3a.-Frecuencia de la distribución del contenido de glucógeno, expresado en Unidades Arbitrarias PAS(+), por cada linfocito en un Paciente(Nº3) con Leucemia Linfática Crónica Post-Tratamiento con clorambucilo.

Fig. 4a. Distribución del contenido de glucógeno expresado en Unidades Arbitrarias PAS + por 100 linfocitos en Normales y en Pacientes con LLC pre y post-tratamiento. Cada rayita (-) representa el valor correspondiente a un individuo. Los puntos (•) representan la Media de cada grupo.



N O R M A L E S

Nº de Caso	Nº de Células contadas	Indice de Intensidad de la reacción de PAS	% de Linfocitos PAS positivos	U.A. PAS (+) Linfocitos
Caso Nº 1	100	14	9%	32.4
Caso Nº 2	100	16	14%	43.0
Caso Nº 3	100	10	7%	8.8
Caso Nº 4	100	17	11%	40.8
Caso Nº 5	100	12	8%	25.2
Caso Nº 6	100	15	10%	35.6
Caso Nº 7	100	18	12%	34.0
Caso Nº 8	100	21	15%	43.3
Caso Nº 9	100	14	11%	32.0
Caso Nº 10	100	16	13%	34.0

TABLA Ia.- Resultados encontrados en 10 dadores de sangre normales.

PACIENTES CON LEUCEMIA LINFATICA CRONICA

Nº de Caso	Nº de Células contadas	Indice de Intensidad de la reacción de PAS		% de Linfocitos PAS positivos		U.A. PAS (+)/100 Linfocitos	
		Pre-tratam.	Post-tratam.	Pre-tratam.	Post-tratam.	Pre-Tratam.	Post-T
Caso Nº 1	100	117	22	67%	15%	1023.7	80
Caso Nº 2	100	98	7	69%	7%	886.0	34
Caso Nº 3	100	129	17	79%	12%	1083.7	80
Caso Nº 5	100	149	29	67%	17%	881.8	83
Caso Nº 6	100	124	38	75%	21%	781.6	142
Caso Nº 9	100	109	15	68%	14%	658.2	108
Caso Nº 13	100	137	22	79%	16%	1192.4	99
Caso Nº 15	100	148	6	80%	6%	1218.2	33
Caso Nº 17	100	157	17	88%	11%	1105.0	64
Caso Nº 19	100	138	21	80%	14%	896.8	105

TABLA IIa.- Resultados encontrados en 10 Pacientes con Leucemia Linfática Crónica pre y post-tratamiento.

Indice de PAS	10	1000	130	17.8	5.63	98	a	157
.A.PAS(+)/100 Infocit	10	1000	972.7	172.6	54.62	658.2	a	1218.2

TABLA Va
PACIENTES CON LLC POST-TRATAMIENTO

LINFOCITOS

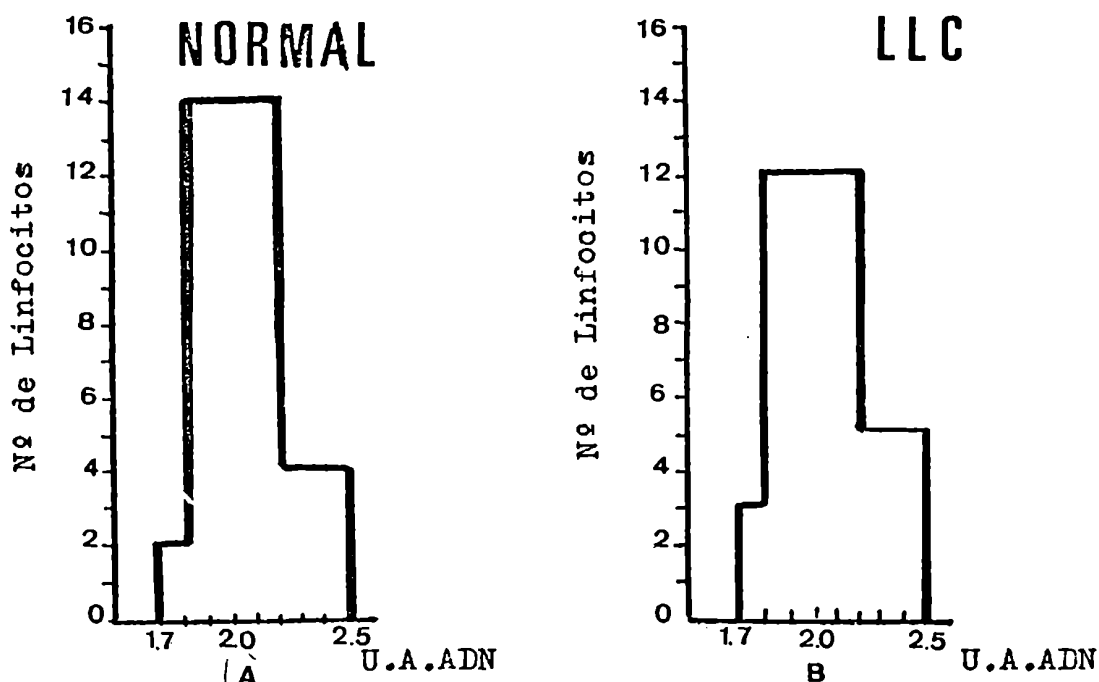


FIG. 5a.-Frecuencia de la distribución del contenido de ADN, expresado en unidades arbitrarias de ADN por cada linfocito A) en un caso Normal; B) en un paciente (Nº 10) con Leucemia Linfática Crónica sin Tratamiento

NEUTRÓFILOS

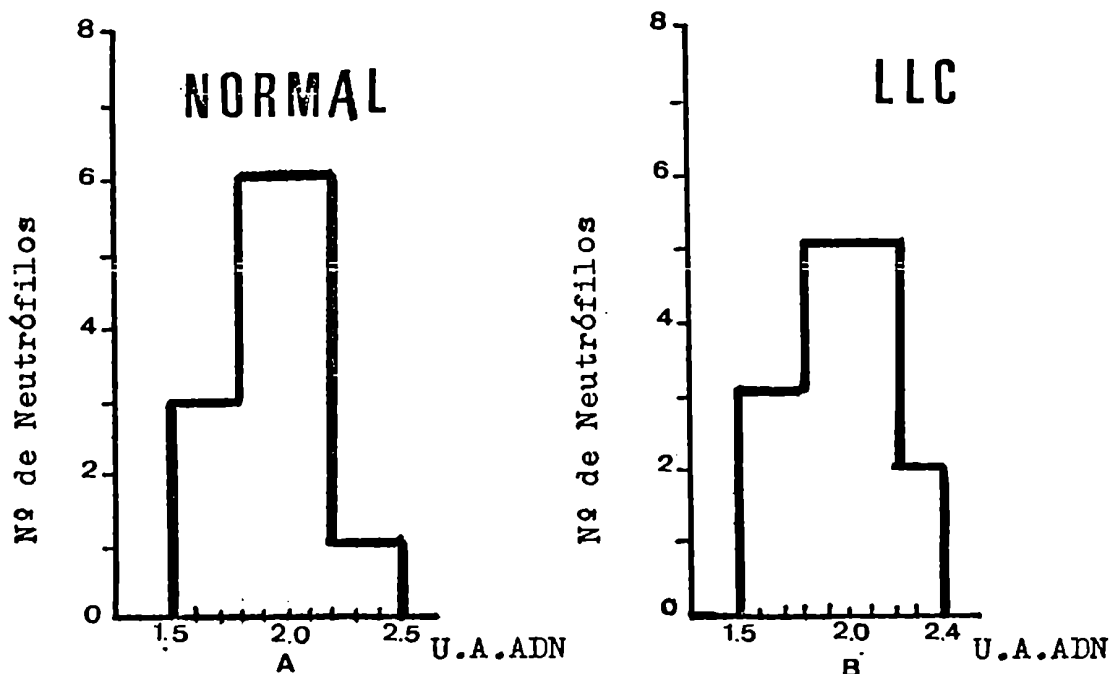


FIG. 6a.-Frecuencia de la distribución del contenido de ADN, expresado en unidades arbitrarias de ADN por cada neutrófilo A) en un caso Normal; B) en un paciente (Nº 10) con Leucemia Linfática Crónica sin tratamiento

Caso Nº 1	20	2.0	0.17	0.03	1.7 a 3.0
Caso Nº 2	20	2.1	0.30	0.06	1.7 a 2.5
Caso Nº 3	20	2.0	0.17	0.03	1.6 a 3.0
Caso Nº 4	20	2.1	0.18	0.04	1.7 a 2.5
Caso Nº 5	20	2.1	0.27	0.06	1.7 a 2.8
Caso Nº 6	20	2.0	0.18	0.04	1.7 a 2.4
Caso Nº 7	20	2.1	0.27	0.06	1.7 a 2.6
Caso Nº 8	20	2.1	0.19	0.04	1.8 a 2.4
Caso Nº 9	20	2.0	0.19	0.04	1.8 a 2.5
Caso Nº 10	20	2.1	0.33	0.07	1.8 a 2.5

TABLA VIa.- Resultados estadísticos obtenidos a partir de las mediciones cuantitativas mediante citoespectrofotometría del ADN de los Linfocitos, y expresados en Unidades Arbitrarias de ADN.

N O R M A L E S
NEUTROFILOS SEGMENTADOS

Nº de Caso	n	MEDIA X	DESVIACION STAN- DARD DS	ERROR STANDARD ES	RANGO
Caso Nº 1	10	1.9	0.20	0.06	1.5 a 2.3
Caso Nº 2	10	1.9	0.23	0.07	1.7 a 2.2
Caso Nº 3	10	2.0	0.23	0.07	1.6 a 2.2
Caso Nº 4	10	1.9	0.20	0.06	1.7 a 2.3
Caso Nº 5	10	1.9	0.27	0.08	1.7 a 2.4
Caso Nº 6	10	2.0	0.23	0.07	1.5 a 2.5
Caso Nº 7	10	1.9	0.21	0.06	1.5 a 2.2
Caso Nº 8	10	2.0	0.19	0.06	1.4 a 2.2
Caso Nº 9	10	2.0	0.24	0.07	1.7 a 2.2
Caso Nº 10	10	1.9	0.24	0.07	1.6 a 2.3

TABLA VIIa.- Resultados estadísticos obtenidos a partir de las mediciones cuantitativas mediante citoespectrofotometría del ADN de los neutrófilos segmentados, y expresados en Unidades Arbitrarias de ADN

so N° 2	20	2.0	0.25	0.05	1.8 a 3.0
so N° 3	20	2.2	0.37	0.08	1.8 a 2.3
so N° 4	20	2.0	0.21	0.04	1.8 a 2.5
so N° 5	20	2.1	0.25	0.05	1.8 a 3.0
so N° 6	20	2.0	0.27	0.06	1.8 a 2.4
so N° 7	20	2.1	0.23	0.05	1.8 a 3.0
so N° 8	20	2.0	0.20	0.04	1.8 a 2.4
so N° 9	20	2.0	0.21	0.04	1.8 a 2.4
so N° 10	20	2.1	0.19	0.04	1.8 a 3.0

TABLA VIIIa.- Resultados estadísticos obtenidos a partir de las mediciones cuantitativas mediante citoespectrofotometría del ADN de los linfocitos, y expresados en Unidades Arbitrarias de ADN.

PACIENTES CON LLC SIN TRATAMIENTO
NEUTROFILOS SEGMENTADOS

de Caso	n	MEDIA \bar{X}	DESVIACION STAN- DARD DS	ERROR STANDARD ES	RANGO
so N° 1	10	1.9	0.27	0.08	1.6 a 2.3
so N° 2	10	1.9	0.17	0.05	1.6 a 2.3
so N° 3	10	1.9	0.20	0.06	1.6 a 2.3
so N° 4	10	1.9	0.21	0.06	1.7 a 2.3
so N° 5	10	2.0	0.24	0.07	1.6 a 2.4
so N° 6	10	2.0	0.29	0.09	1.6 a 2.3
so N° 7	10	1.9	0.26	0.08	1.7 a 2.3
so N° 8	10	1.8	0.27	0.08	1.7 a 2.3
so N° 9	10	1.9	0.18	0.05	1.7 a 2.4
so N° 10	10	1.9	0.23	0.07	1.6 a 2.3

TABLA IXa.- Resultados estadísticos obtenidos a partir de las mediciones cuantitativas mediante citoespectrofotometría del ADN de los neutrófilos segmentados, y expresados en Unidades Arbitrarias de ADN

III. CONCLUSIÓN.

Los resultados cuantitativos en cuanto al contenido de glucógeno linfocitario en Normales, Pacientes con LLC pre-tratamiento y Pacientes con LLC post-tratamiento coincidieron con los resultados obtenidos mediante el método semicuantitativo de Hotchkiss (33) pudiendo concluir que

- I^o En los adultos normales la cantidad de glucógeno citoplasmático de los linfocitos sanguíneos es baja ($\bar{X} = 32.9$ U.A. PAS (+) para 100 linfocitos).
- II^o En 10 Pacientes con LLC pre-tratamiento, la cantidad de glucógeno citoplasmático de los linfocitos sanguíneos fué elevada ($\bar{X} = 972.7$ U.A. PAS (+) para 100 linfocitos.)
- III^o En los mismos 10 Pacientes con LLC post-tratamiento se observó una disminución significativa del glucógeno citoplasmático de los linfocitos sanguíneos con respecto a los valores obtenidos pre-tratamiento. ($\bar{X} = 83$ U.A. PAS (+) por 100 linfocitos).

La diferencia entre este grupo y el normal siguió siendo significativa a un nivel de $p < 0.1$.

Los resultados cuantitativos en cuanto al contenido de ADN linfocitario en los 10 Pacientes con LLC sin tratamiento fué similar al contenido de ADN de los neutrófilos segmentados de los mismos Pacientes y al contenido de ADN de los linfocitos y de los neutrófilos segmentados de 10 casos Normales.

Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos por Billington (4) mediante estudios bioquímicos del ADN linfocitario en Pacientes con LLC expuestos anteriormente en la Discusión IX, sugiriendo que la anomalía etiopatológica no estaría a nivel de la cantidad de ADN linfocitario.

- Los resultados estadísticos obtenidos (Tabla Xa) al comparar:
- 1^o.- El grupo Normal y el grupo de Pacientes con LLC pre-tratamiento, mediante el test de Student, fueron iguales en los tres métodos utilizados: Método Semicuantitativo mediante el Índice de Intensidad de la Reacción de PAS ; el Porcentaje de linfocitos PAS + y el Método cuantitativo citoespectrofotométrico, encontrándose en todos los casos una diferencia altamente significativa entre ambos grupos con un valor de $p < 0.001$.
 - 2^o.- El grupo de Pacientes con LLC pre y post-tratamiento mediante el test de Student para muestras pareadas fueron iguales en los 3 Métodos utilizados, encontrándose en todos los casos una diferencia altamente significativa con un valor de $p < 0.001$.

3º.- El grupo Normal con el grupo de Pacientes con LLC post-tratamiento mediante el test de Student varió según el método utilizado. Aunque los valores encontrados en este grupo de Pacientes se acercaron a los valores normales la diferencia con el grupo normal siguió siendo significativa a un nivel de:

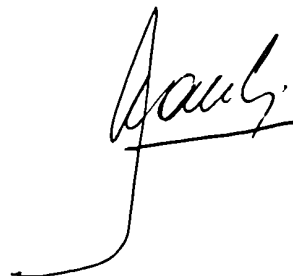
- a: $p < 0.01$ al utilizar el Método Semicuantitativo.
- b: $p < 0.05$ considerando el Porcentaje de linfocitos PAS +.
- c: $p < 0.2$ al utilizar el Método cuantitativo citoespectrofotométrico.

Normales y Pacientes con LLC pre-tratam.	Test de Student	$P < 0.001$	$P < 0.001$	$P < 0.001$
Pacientes con LLC pre y post tratamiento	Test de Student para muestras pareadas	$P < 0.001$	$P < 0.001$	$P < 0.001$
Normales y Pacientes con LLC post-tratam.	Test de Student	$P < 0.01$	$P < 0.05$	$P < 0.2$

TABLA Xa.- Resultados estadísticos obtenidos al comparar entre sí los tres grupos : Normales, Pacientes con LLC pre tratamiento y Pacientes con LLC post-tratamiento, según el Método utilizado.



Lic. Rodica H. de Cosen



Dr. Alfredo E. Macchi

BIBLIOGRAFIA SUPPLEMENTARIA.

- 1/ Ris H. y Mirsky A.- Quantitative cytochemical determination of ADN with the Feulgen nuclear reaction. J. Gen. Physiol. 33, 125.- 1949.-
- 2/ Vernier J.M y N.Daugeras.- Evaluation quantitative du glycogène hépatique par histophotométrie.- Histochemie, 32, 307. 1972.