



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
DELEGACIÓN SUR DEL DISTRITO FEDERAL
UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI**

**RELACIÓN ENTRE LAS ALTERACIONES POR CITOMETRÍA DE FLUJO SEGUN LAS
ESCALAS CFM Y RED CON EL ÍNDICE PRÓNOSTICO INTERNACIONAL (IPSS-R) EN
PACIENTES CON SÍNDROME MIELODISPLÁSICO**

T E S I S

QUE PRESENTA:

DRA. LINDA KARELY ALVAREZ FAVIEL

PARA OBTENER EL DIPLOMA DE LA ESPECIALIDAD EN

HEMATOLOGIA

**ASESORES: M. EN C. CARLOS ROBERTO HERNANDEZ PEREZ
M. EN C. LAURA JOSEFINA RABELO CARRASCO**



Ciudad de México

Febrero 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



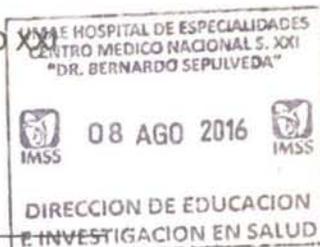
UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UMAE HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CMN SIGLO XXI



DOCTORA DIANA GRACIELA MENEZ DÍAZ
JEFE DE LA DIVISIÓN DE EDUCACIÓN EN SALUD
UMAE HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CMN SIGLO XXI

DR. LUIS ANTONIO MEILLON GARCÍA
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE ESPECIALIZACIÓN EN HEMATOLOGÍA
UMAE HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CMN SIGLO XXI

DR. CARLOS ROBERTO HERNÁNDEZ PÉREZ
ASESOR DE TESIS
MÉDICO ADSCRITO AL SERVICIO DE HEMATOLOGÍA
UMAE HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CMN SIGLO XXI

Dictamen de Autorizado

Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud **3601** con número de registro **13 CI 09 015 184** ante COFEPRIS
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES DR. BERNARDO SEPULVEDA GUTIERREZ, CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI,
D.F. SUR

FECHA **15/07/2016**

M.C. CARLOS ROBERTO HERNANDEZ PEREZ

P R E S E N T E

Tengo el agrado de notificarle, que el protocolo de investigación con título:

Relación entre las alteraciones por citometría de flujo según las escalas CFM y RED con el índice pronóstico internacional (IPSS-R) en pacientes con síndrome mielodisplásico

que sometió a consideración de este Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud, de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores, cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de Ética y de investigación, por lo que el dictamen es **A U T O R I Z A D O**, con el número de registro institucional:

Núm. de Registro

R-2016-3601-155

ATENTAMENTE

DR. (A) CARLOS FREDY CUEVAS GARCÍA

Presidente del Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud No. 3601

IMSS

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme permitido concluir otra meta y guiarme a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza y mi luz cuando más lo necesite.

A mi madre que ha estado presente en cada uno de los momentos más importantes de mi vida, por los valores inculcados y enseñarme a tener fe en Dios, por su dedicación y amor que me ha brindado desde pequeña y alentarme a salir adelante.

A mi abuelita Alex, que aunque ya no este físicamente, por quererme y por haber estado pendiente de mi bienestar.

A mis tías Blanquí, Diana y tío Roberto que estuvieron presentes para darme su apoyo en los momentos más difíciles para que pudiera lograr mis metas.

A mi abuelita Elvia, tíos, y primos que crecieron conmigo y me han brindado su cariño de manera incondicional.

A Carlos que me apoyo desde el inicio de la especialidad, por su paciencia y respeto a mi carrera.

Al doctor Carlos Hernández por sus enseñanzas y haberme brindado la oportunidad de realizar mi tesis, por su tiempo y dedicación a este proyecto.

A la Maestra Laura Rabelo que sin duda siempre mostro disponibilidad e interés para que este proyecto fuera posible.

A cada una de las personas que fueron parte de estos cuatro años de mi residencia, profesores, compañeros y amigos, con quienes compartí momentos de enojo, felicidad y tristeza, de quienes aprendí muchas cosas, y que sin duda fueron parte de esencial de esta etapa.

Alvarez Faviel Linda Karely

1. Datos de alumno	
Apellido Paterno	Alvarez
Apellido materno	Faviel
Nombre (s)	Linda Karely
Teléfono	55 27 60 39 81
Universidad	Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad o escuela	Facultad de Medicina
Carrera	Hematología
Número de Cuenta	513218420
2. Datos de los asesores	
Apellido paterno	Hernández
Apellido materno	Pérez
Nombre (s)	Carlos Roberto
Apellido paterno	Rabelo
Apellido materno	Carrasco
Nombre (s)	Laura Josefina
3. Datos de la tesis	
Título	Relación entre las alteraciones por citometría de flujo mediante las escalas CFM Y RED con el índice pronóstico internacional (IPSS-R) en pacientes con Síndrome mielodisplásico
Subtítulo	
Numero de Paginas	55
Año	2017
Número de registro	R-2016-3601-155

INDICE

I.	Resumen.....	7
II.	Introducción.....	8
III.	Planteamiento del problema.....	21
IV.	Justificación.....	21
V.	Hipótesis.....	22
VI.	Objetivos.....	22
VII.	Metodología.....	23
VIII.	Análisis estadístico.....	28
IX.	Aspectos Éticos.....	29
X.	Resultados.....	30
XI.	Discusión.....	37
XII.	Conclusiones.....	41
XIII.	Bibliografía.....	42
XIV.	Anexos.....	47

RELACIÓN ENTRE LAS ALTERACIONES POR CITOMETRÍA DE FLUJO SEGÚN LAS ESCALAS CFM Y RED CON EL ÍNDICE PRONOSTICO INTERNACIONAL (IPSS-R) EN PACIENTES CON SÍNDROME MIELODISPLÁSICO.

I. RESUMEN

Antecedentes:

El Síndrome mielodisplásico (SMD) comprende un grupo de enfermedades heterogéneas de origen clonal mielode, manifestada por citopenias, y con riesgo de progresión a leucemia mielode aguda (LMA). En los últimos años la citometría de flujo ha sido validada como herramienta diagnóstica del SMD, siendo la estrategia más comúnmente usada la escala CFM que evalúa alteraciones relacionadas con el compartimiento CD34+, con una sensibilidad y especificidad del 80%, sin embargo su valor pronóstico aún sigue en estudio. La escala RED que evalúa el compartimiento eritroide, ha sido empleado con fines diagnósticos, sin embargo su implicación pronóstica aún no.

Material y métodos: Cohorte retrospectiva, que incluyó 32 pacientes mayores de 18 años de edad en periodo de Enero 2015 a Marzo 2016, con diagnóstico confirmado por morfología y citogenética de Síndrome mielodisplásico primario, a quienes se realizó Citometría de flujo de la muestra de medula ósea inicial y se determinó el puntaje según la Escala CFM y RED. Se asignaron a grupos de la escala CFM según el puntaje obtenido, Grupo 1 con 7 pacientes (21.8%), Grupo 2 24 pacientes (75%) y el grupo 3 con 1 paciente (3.13%). Para los grupos de la Escala RED el grupo 1 solo era el 3.5%, grupo 2 21.9% y en el grupo 3 el 75%. El análisis estadístico entre el puntaje obtenido por la escala CFM y RED con el IPSS-R se realizó con la prueba estadística Rho de Spearman, usando el paquete estadístico SPSS 23.

Resultados: Según con el objetivo principal del estudio no se encontró correlación entre los grupos de la escala CFM con el índice pronóstico IPSS-R ($Rho= 0.194$, $p= 0.323$), ni con ningún otra variable clínica. Se encontró correlación entre los grupos de la escala RED y el IPSS-R ($Rho=0.442$, $p= 0.019$). Del total de pacientes el 42.8% de los pacientes que no tenían IPSS-R bajo y muy bajo se encontraron en el grupo 3. Es decir que los pacientes que tienen puntajes de 6 y 7 (grupo 3) se correlacionan negativamente con el IPSS-R bajo y muy bajo ($Rho= -0.442$, $p=0.018$).

Conclusiones: La Escala CFM no mostro correlación con el índice pronóstico IPSS-R; sin embargo los grupos de la Escala RED si se correlacionaron con el IPSS-R, de esta manera los pacientes con puntaje RED alto (7 puntos) se relacionan con no tener un IPSS-R bajo y muy bajo, pero no podemos decir estadísticamente que un RED alto significa que el IPSS será alto y muy alto.

II. INTRODUCCIÓN

Los síndromes mielodisplásicos (SMD) representan un grupo de enfermedades hematológicas de origen clonal mieloide, con un espectro de presentación relativamente heterogéneo, caracterizadas por citopenias, displasia en uno o más de los linajes celulares y hematopoyesis ineficaz. El principal problema clínico en estas patologías es la morbilidad causada por las citopenias y el potencial de evolucionar a leucemia mieloide aguda¹.

Analizando esta definición se deduce la existencia de un evento que produce un grupo de células madre hematopoyéticas genéticamente idénticas (clona) con la capacidad de expandirse por la adquisición de ventajas de supervivencia, pero también bloqueando sus mecanismos de diferenciación lo que les impide producir células sanguíneas maduras (son las que circulan en la sangre contenida en cada uno de los vasos sanguíneos). De esta manera se ha mencionado la paradoja del SMD que consiste en una médula ósea hiper celular y la sangre periférica deficiente de células (citopenias), es decir, la ocurrencia de muerte celular intramedular o apoptosis²⁻⁵.

En la población general, la incidencia de SMD es aproximadamente 4.8 casos por 100,000 personas por año. El SMD es raro entre los niños, adolescentes y adultos jóvenes; con una incidencia en menores de 40 años de 0.2 por 100,000 personas al año. Sin embargo en individuos entre 70 y 79 años, la incidencia aumenta a 29.6 por 100,000 personas, incrementándose aún más en personas de 80 o más años de edad con una incidencia de hasta 55.8 por 100,000 personas⁶.

En México se carece de información amplia de los SMD. El registro mexicano de enfermedades hematológicas (REMEDEH) es una plataforma que se creó para el registro en línea de enfermedades hematológicas iniciando con SMD. El primer estudio multicéntrico mexicano de SMD y el tercero más grande en Latinoamérica fue realizado entre el 25/10/2012 y el 17/12/2013 e incluyó cuatro hospitales de tercer nivel de la Ciudad de México, los cuales registraron 329 casos, de los que 40% fueron hombres y 60% mujeres (relación H/M 1:1.5). Dentro de los datos relevantes se encontró que sólo el 36% presentó macrocitosis, se identificaron comorbilidades en el 63% de los pacientes y de éstos, el 32% tuvo 2 o más. En este registro se encontraron diferencias importantes comparado con lo publicado en series extranjeras en las siguientes variables: mayor proporción de mujeres, de individuos menores de 60 años (41.9%), de

trombocitopenia grave, de SMD hipoplásicos y de Citopenia refractaria con displasia multilineal (CRDM)⁷.

ABORDAJE INICIAL DEL PACIENTE CON SOSPECHA DE SÍNDROME MIELODISPLÁSICO

El estudio del paciente con sospecha de síndrome mielodisplásico requiere considerar el tipo de citopenia (anemia, neutropenia y/o trombocitopenia), la duración de la misma, la cuenta de reticulocitos, una cuidadosa evaluación del frotis de sangre periférica, así como de la morfología de la medula ósea, y orientar el interrogatorio (historial transfusional y comorbilidades), con la finalidad de descartar otras potenciales causas de las citopenias.

Además el aspirado de medula ósea con tinción de azul de prusia para hierro y una biopsia de hueso son necesarias para evaluar el porcentaje de blastos, la celularidad, el número y displasia en los megacariocitos, la presencia o ausencia de sideroblastos en anillo, la presencia de hemosiderina y de fibrosis, esta última llegando a estar presente en aproximadamente 5 a 10% de los casos de SMD al momento del diagnóstico. El estudio citogenético de la muestra de medula ósea debe realizarse, debido a su importancia pronóstica. Otros estudios de laboratorio útiles incluyen niveles séricos de eritropoyetina, vitamina B12 y folatos, ferritina, B2-microglobulina, lactato deshidrogenasa (LDH), hormona estimulante de la tiroides, T3, T4, TORCH, serología para VHB, VHC y VIH.

Dentro de los estudios adicionales, la identificación de clonas de hemoglobinuria paroxística nocturna es importante en ciertos casos ya que la asociación con SMD puede estar presente en cerca del 20%. El estudio de HLA cuando muestra la presencia del antígeno DR15, principalmente en los casos de SMD Anemia Refractaria (AR), es un indicador pronóstico de respuesta favorable a la terapia inmunosupresora. La citometría de flujo es una prueba diagnóstica que puede ser útil en el abordaje inicial al identificar la presencia de displasia, así como para el diagnóstico diferencial e incluso aportando información pronóstica, como se mencionara más adelante.

De manera ideal se debe complementar el caso con estudios moleculares de genes identificados como recurrentemente afectados en 90% de los pacientes con SMD¹.

DIAGNOSTICO DEL SINDROME MIELODISPLASICO

La característica patológica que define a los síndromes mielodisplásicos es la displasia de la médula, la cual representa la base de la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de estas enfermedades¹⁹. Esta clasificación proporciona a los médicos una herramienta muy útil para la definición de los diferentes subtipos de SMD y determina el pronóstico individual^{20, 21}.

Para ayudar a proporcionar coherencia en las pautas de diagnóstico de SMD, un grupo de trabajo realizó un consenso internacional recomendando los criterios diagnósticos mínimos para esta enfermedad incluyendo dos prerrequisitos: 1) citopenias estables (por lo menos 6 meses sin un cariotipo específico o displasia bilinaje, en cuya presencia solo son necesarios 2 meses de citopenias estables); 2) la exclusión de otras enfermedades como razón primaria de displasia y/o citopenias. Además, el diagnóstico requiere de por lo menos uno de los tres criterios relacionados a SMD: 1) Displasia (igual o mayor al 10% en uno o más de los tres principales linajes de la médula; 2) cuenta de blastos de 5 a 19%; y 3) cariotipo específico asociado a SMD²².

La propuesta de la OMS, sin embargo ha levantado cierta preocupación con respecto a los criterios diagnósticos mínimos. El diagnóstico de SMD es sencillo si las anomalías son claramente objetivas, es decir, un aumento de blastos y/o si están presentes sideroblastos en anillo y/o anomalías citogenéticas clonales. Sin embargo, el diagnóstico de un SMD de bajo grado es un reto ya que carece de estos marcadores diagnósticos específicos^{23, 24}.

Varios estudios pueden ayudar a confirmar el diagnóstico de SMD, entre los que se incluyen la citometría de flujo, la histopatología e inmunohistoquímica de la biopsia de hueso y el análisis de marcadores moleculares²².

CLASIFICACION DIAGNÓSTICA DEL SINDROME MIELODISPLASICO

Con respecto al subtipo de síndrome mielodisplásico son varias las clasificaciones que se han utilizado hasta la actualidad. Desde la descripción por Leube en 1900 de un paciente con anemia macrocítica severa con evolución a leucemia aguda, le siguieron varios reportes de pacientes con anemia macrocítica, citopenias, alteraciones morfológicas de los precursores mieloides, aumento del número blastos y riesgo de evolución a leucemia aguda. En 1953 se introdujo el término de anemias refractarias, que englobaban a un grupo de anemias con características bien definidas, diferentes a las anemias refractarias congénitas. En la década de 1970 Saarni y Linman reconocieron a la enfermedad como un trastorno primario de la médula ósea, caracterizado por hiperplasia de la médula ósea y hematopoyesis ineficaz^{8, 9}. A mediados de la década de 1970 un grupo internacional constituido por médicos y patólogos conformaron el grupo cooperativo Franco-Americano-Británico (FAB), quienes en 1976 acuñaron el término “Síndromes mielodisplásicos” en una serie de capítulos sobre las leucemias agudas. Surgieron dos subgrupos: Leucemia mielomonocítica crónica (LMMC) y Anemia Refractaria con Exceso de Blastos (AREB)¹⁰.

En el año de 1980 esta clasificación fue ampliada y posteriormente publicada. La primera clasificación publicada fue en 1982 por el Grupo FAB, elaborada mediante criterios morfológicos de fácil obtención y reproducibilidad. En ellas se distinguían 5 categorías con reconocido valor pronóstico. Es una clasificación morfológica que tiene en cuenta el porcentaje de blastos en sangre periférica y médula ósea, el número absoluto de monocitos, la presencia de bastones de Auer y la cantidad de sideroblastos en anillo¹¹. En 1990 la OMS propone revisar la clasificación, la cual estuvo basada en un estudio que incluyó 1600 pacientes del registro de SMD de la universidad de Dusseldorf, con diagnóstico de SMD primario¹². En el 2001 en su 3° edición la OMS incluyó numerosos cambios que tiene como objetivo separar entidades que, a pesar de tener un comportamiento biológico y clínico propios, eran incluidas hasta ahora dentro de un mismo subtipo. En primer término disminuyó el porcentaje de blastos requeridos para hacer el diagnóstico de leucemia mieloides aguda de 30 a 20%. De esta manera se eliminó la subcategoría Anemia refractaria con excesos de blastos en transformación (AREB-T) y LMMC y a esta última la reclasifica dentro de otra categoría de desórdenes mielodisplásicos/mieloproliferativos¹³. Así, la anemia refractaria (AR), en la que solo deben

existir rasgos diseritropoyéticos, se subdivide en dos grupos de acuerdo a la presencia (ARSA) o ausencia (AR) de sideroblastos en anillo. El nuevo subtipo citopenia refractaria con displasia multilineal (CRDM) incluyó todas las bicitopenias y pancitopenias refractarias con displasia de al menos dos líneas celulares. Los casos con displasia mieloide o megacariocítica aislada pasaron a engrosar el grupo de SMD no clasificables. La anemia refractaria con exceso de blastos (AREB) se subdividió en dos grupos según la proporción de blastos en médula ósea o en sangre periférica, lo cual como demostraron Sanz et al. Tiene valor pronóstico¹⁴. Finalmente el síndrome 5q-, se consideró una entidad propia. Se da la inclusión de la LMMC como síndrome mielodisplásico/Mieloproliferativo (SMD/SMP), sin embargo se reportan casos de LMMC con leucopenia y monocitosis que deberían ser clasificados como SMD según algunos expertos, pero aún no hay consenso¹³.

En el 2008 la OMS en su 4° edición propone nuevos cambios aún vigentes, agregando nuevas entidades y clasifica los SMD y SMP^{15, 16}. El primer cambio notable de esta nueva clasificación es el término de Citopenia Refractaria con Displasia Unilineal (RCUD). Teniendo en cuenta que hay algunos pacientes con neutropenia y displasia solo limitada a neutrófilos y sus precursores o con trombocitopenia y displasia solo en megacariocitos. Se agregan entonces la Anemia refractaria (AR), la neutropenia refractaria (NR) y la trombocitopenia refractaria (TR). La anemia refractaria con sideroblastos en anillo debe distinguirse de la citopenia refractaria con sideroblastos en anillo y displasia multilineal¹⁵.

En resumen, con el mejor estudio de este grupo de patologías, se han podido identificar características clínicas y fisiopatológicas que permiten afinar su clasificación siendo actualmente considerados 7 subtipos por la OMS: Citopenia refractaria con displasia unilineal; Anemia refractaria con sideroblastos en anillo (ARSA); Citopenia refractaria con displasia multilineal (CRDM); Anemia refractaria con exceso de blastos tipos 1 o 2 (AREB-1, AREB-2); SMD asociado a delección aislada del brazo largo del cromosoma 5 (SMD con del5q) y el SMD no-clasificado^{17, 18}. (ANEXO 1).

PRONOSTICO DEL SINDROME MIELODISPLASICO

El curso clínico de los pacientes con SMD se caracteriza por dos escenarios: el desarrollo de citopenias progresivas o transformación a leucemia mieloide aguda (LMA). La estimación de la supervivencia y/o el riesgo de desarrollar LMA está cambiando y es un reto debido a la heterogeneidad incluso dentro de los subgrupos de SMD. La clasificación de la OMS ya reconoce que un mayor porcentaje de blastos y la presencia de displasia multilineal por morfología (displasia en el linaje eritroide, megacariocito y mieloide) en la médula ósea (MO) se asocian con un mal pronóstico²⁵.

El Sistema Internacional de Puntaje Pronóstico (IPSS) definido en 1997, se basó en tres indicadores clínicos que consisten en el porcentaje de blastos en MO, citogenética y el número de citopenias en sangre periférica. El IPSS reconoce cuatro diferentes grupos de riesgo (Bajo, intermedio-1, intermedio-2 y alto), que se diferencian por un incremento en el riesgo de muerte y de transformación a LMA. El sistema de puntuación proporciona información pronóstica en pacientes recién diagnosticados con SMD, orienta la toma de decisiones de tratamiento y es útil en la selección de pacientes para ensayos clínicos. Sin embargo surgió evidencia de que el puntaje asignado a cada subgrupo citogenético y los puntos de corte de los otros componentes del IPSS debían ser redefinidos. Por lo que en el año 2012, se hizo un ajuste del antiguo sistema de clasificación pronóstica internacional (IPSS, *international prognostic scoring system*), llamado IPSS-R o IPSS-revisado, el cual incluye los siguientes aspectos a evaluar: estudio citogenético, porcentaje de blastos en la médula ósea y el nivel de hemoglobina, plaquetas y neutrófilos. Cada uno aportando un puntaje para finalmente clasificar al paciente en un grupo de riesgo: Muy bajo, Bajo, Intermedio, Alto y Muy alto, teniendo una posibilidad de supervivencia global que va de 8.8 años para el muy bajo en comparación a 0.8 años para el muy alto²⁶⁻²⁸. (ANEXO 2).

Aunque todavía no se encuentren incluidos en el IPSS-R, los estudios sobre análisis moleculares y citometría de flujo (CF), han mostrado que estas técnicas pueden identificar subgrupos de riesgo incrementando la posibilidad de afinar el pronóstico y por tanto el tratamiento de los pacientes con SMD²⁵.

CITOMETRIA DE FLUJO EN EL SINDROME MIELODISPLASICO

La aplicación de la citometría de flujo (CF) para el estudio del SMD está basado en el concepto de que las alteraciones sutiles en la hematopoyesis que no son reconocidas por la morfología, se pueden determinar mediante esta técnica. Esto tiene consecuencias tanto para el diagnóstico y el pronóstico de los pacientes con SMD^{20, 29}.

La CF es un método fiable para la evaluación cuantitativa y cualitativa de las células hematopoyéticas y desempeña un papel cada vez más importante en el diagnóstico y manejo de las hemopatías malignas^{30, 31}. Varios estudios han evaluado la citometría de flujo como una herramienta de diagnóstico potencial para el SMD^{29, 32-35}. Para llegar a ser clínicamente aplicable, el análisis por citometría de flujo debe basarse en parámetros con suficiente especificidad y sensibilidad, los datos deben ser reproducibles por diferentes operadores y los resultados deben ser de fácil comprensión para los médicos^{24, 36-37}.

En 2009, el grupo de trabajo del European LeukemiaNet en Citometría de Flujo para SMD publicó directrices relativas a los métodos recomendados para la toma de muestras de células, manipulación y procesamiento³⁶. En 2012 se publicó un artículo por el mismo grupo de trabajo que describe un panel de anticuerpos combinados para estudiar los linajes mielomonocítico y eritroide³⁸. El conocimiento de los patrones de maduración normal relacionados a la edad y los niveles de expresión de marcadores de linaje es obligatorio para poder evaluar la médula ósea por CF³⁹. No hay un único marcador por citometría de flujo específico para SMD, pero la presencia de múltiples anomalías predice un trastorno clonal.

Múltiples sistemas de puntuación para SMD por citometría de flujo describen la evaluación de diversos marcadores y diferentes estrategias de puntuación. Un ejemplo de un sistema de puntuación, que aplica la mayor parte de los marcadores recomendados se muestra en la escala de Wells adaptado por Cutler. Hay superposición entre la mayoría de los sistemas de puntuación en: la cuantificación de aberraciones en el linaje celular mielomonocítico, el análisis de la expresión de marcadores específicos de linaje y la presencia de marcadores de linaje no específicos; el análisis de porcentaje de células progenitoras mieloides y sus niveles de expresión de antígenos y la presencia de marcadores asíncronos y marcadores de linaje no específicos. Hay una amplia gama de sistemas de puntuación que van desde aquellos que incluyen pocos parámetros hasta los más complejos, con una sensibilidad y especificidad que

va desde 69 a 98% y 78 a 93%, respectivamente^{33, 40-42}. Parece no haber asociación entre la cantidad de parámetros y la sensibilidad y especificidad del score por citometría de flujo.

Un estudio realizado utilizando la escala de Wells (FCSS) mostró que los pacientes con SMD y dispoiesis severa en la CF tenían peor pronóstico en comparación con los pacientes sin alteraciones o con anomalías leves. Estudios anteriores han demostrado que el FCSS se correlaciona con la clasificación de la OMS y el IPSS y tiene valor pronóstico para el comportamiento clínico del SMD. El FCSS combinado con el IPSS-R fue un mejor predictor de la supervivencia global de los pacientes con SMD, lo que indica que el análisis por citometría de flujo es fundamental para el refinamiento pronóstico en el SMD²⁵.

Debido a que el compartimiento de células CD34+ es particularmente perturbado en los SMD, los parámetros relacionados con CD34+ son buenos candidatos para la identificación de marcadores diagnósticos para esta enfermedad⁴³⁻⁴⁵.

Aberraciones inmunofenotípicas consistentemente reportadas en el compartimiento de células CD34+ en SMD son: un incremento de la población CD34 comprometida al linaje mieloide, una disminución de los progenitores de células B, la co-expresión de antígenos mieloides tempranos y tardíos, la expresión de antígenos linfoides y la expresión anormal de CD45. Se ha informado en estudios previos que los datos para tres de estos parámetros (porcentaje de mieloblastos, porcentaje de progenitores de células B y la expresión de CD45 en los mieloblastos) junto con la evaluación de la dispersión lateral (SSC) en los granulocitos son reproducibles en muchos laboratorios cuando se miden por métodos que aseguren poca variabilidad inter-operador, y cuando se combinan son capaces de diferenciar correctamente a los pacientes con SMD de los pacientes con citopenias no clonales^{36,40, 44}. Siendo la estrategia diagnóstica más comúnmente usada, la escala por citometría de flujo (CF) que incluye cuatro parámetros que se describen más adelante.

La mayoría de los sistemas de puntuación por citometría de flujo se han desarrollado y validado en cohortes de pacientes con SMD, comparando aquellos con SMD de los pacientes con citopenia(s) no clonales y controles normales. La citometría de flujo es capaz de identificar diferentes categorías dentro las subcategorías de la OMS en SMD. Esto se demuestra por la detección de displasia mieloide en pacientes en los que la citomorfología solamente observó

displasia eritroide y megacariocítica. Es de destacar que la diseritropoyesis y dismegacariopoyesis no son evaluados por los sistemas de puntuación mencionados.

Hasta hace poco, la evaluación del linaje de células eritroides por citometría de flujo fue difícil debido a la falta de validación de los marcadores y problemas técnicos. Hoy en día marcadores como CD45, CD71, CD235a, CD36, CD117 y CD105 se aplican para estudiar el linaje de células eritroides⁴⁶⁻⁴⁸. Una escala eritroide (SCORE RED) que evalúa marcadores eritroides específicos por citometría de flujo y el nivel de hemoglobina, reveló que la sensibilidad y especificidad era mayor al 80%⁴⁹.

El análisis por CF de los megacariocitos se enfrenta a dificultades técnicas debido a su escasez en las muestras. Se están haciendo esfuerzos para superar estos problemas mediante el análisis de los trombocitos. Los estudios de validación están en curso.

En resumen, la citometría de flujo tiene una alta sensibilidad y especificidad en la detección de displasia mielomonocítica y eritroide. Sin embargo, nunca debe ser interpretada como una única herramienta de diagnóstico en los SMD. Los resultados por citometría de flujo necesitan ser incluidos en un reporte de diagnóstico integrado, junto con los resultados de citomorfología, citogenética y/o análisis moleculares¹⁸. De acuerdo con la clasificación de la OMS, actualmente el SMD sólo se puede diagnosticar cuando se han excluido otras causas de citopenias/displasia³⁰.

ESCALA POR CITOMETRIA DE FLUJO (SCORE CFM)

La escala por citometría de flujo (CF) definida como la combinación de cuatro parámetros que evalúan el compartimiento CD34+: 1. Porcentaje de progenitores mieloides CD34 positivos en todas las células nucleadas; 2. Porcentaje de progenitores de células B dentro del compartimiento CD34 positivo; 3. Nivel de expresión de CD45 en progenitores mieloides CD34 positivo (en relación con el nivel de expresión de CD45 en linfocitos); 4. Canal pico de dispersión de la luz lateral de los granulocitos (en relación al canal pico de dispersión de luz lateral de los linfocitos). A cada anomalía se le asigna 1 punto, y dos puntos o más se asocia con diagnóstico de SMD¹² (VER ANEXO 3).

Dicha escala surgió de un estudio multicéntrico con 797 pacientes con citopenias de 6 instituciones, cuyo objetivo fue desarrollar y validar una puntuación de citometría de flujo para el diagnóstico del síndrome mielodisplásico. Se analizaron cuatro parámetros reproducibles, ya mencionados previamente. El estudio comprendió un "grupo de aprendizaje" (n = 538) para definir a cada marcador y una "cohorte de validación" (n = 259) para confirmar su valor diagnóstico. En comparación a las citopenias no clonales, los pacientes con síndrome mielodisplásico tenían aumentado el tamaño del clúster relacionado a mieloblastos, disminución del tamaño del clúster relacionado con células progenitoras B, expresión aberrante de CD45 y reducción de la dispersión lateral de granulocitos (P <0.001). Para definir la puntuación de la citometría de flujo, estos cuatro parámetros se combinaron en un modelo de regresión y el peso de cada variable se estimó a partir de los coeficientes de ese modelo. En la cohorte de aprendizaje un correcto diagnóstico de síndrome mielodisplásico se formuló en 198/281 casos (sensibilidad 70%), mientras que los 18 resultados falsos positivos se observaron entre los 257 controles (especificidad 93%). El sesenta y cinco por ciento de los pacientes sin marcadores específicos de displasia (sideroblastos en anillo y anomalías citogenéticas clonales) fueron clasificados correctamente. Un valor alto de la puntuación de citometría de flujo se asoció con displasia multilineaje (P = 0.001), dependencia transfusional (P = 0.02), y citogenética adversa (P = 0.04). La sensibilidad y especificidad en la cohorte de validación (69% y 92%, respectivamente) fueron comparables a las de la cohorte de aprendizaje¹².

Tomando en cuenta lo anterior los puntajes por citometría de flujo se correlacionan con las categorías de riesgo del IPSS y el IPSS-R. Sin embargo, las puntuaciones por CF dentro de las

categorías de riesgo validadas son heterogéneas. Esto significa, que dentro de las categorías de riesgo específicas IPSS y IPSS-R, la CF es capaz de identificar diferentes categorías de riesgo en base a la cantidad de aberraciones. La presencia de múltiples anomalías por CF reveló un riesgo pronóstico pobre dentro de los SMD de bajo riesgo por IPSS-R. Por otra parte la presencia de progenitores mieloides aberrantes por CF en pacientes con <5% de blastos por citomorfología impacta negativamente en el pronóstico. Finalmente en pacientes con displasia unilínea la CF puede identificar displasia multilineal lo cual se asocia a un peor pronóstico^{41, 50-51}.

Con el aumento de la disponibilidad de terapias modificadoras de la enfermedad en los SMD existe una creciente necesidad de herramientas que pueden predecir la respuesta al tratamiento y pueden guiar las decisiones de tratamiento. Uno de los primeros estudios que abordan este tema evalúa la presencia de células progenitoras mieloides aberrantes para predecir la respuesta a los agentes estimulantes de la eritropoyesis. Se ilustra que la presencia de progenitores mieloides aberrantes por CF actúa como un biomarcador importante de fracaso del tratamiento⁴⁵. Los pacientes con células progenitoras anormales por CF no muestran respuesta o la duración de la misma es corta a la eritropoyetina, con o sin factor estimulante de colonias de granulocitos. Por otra parte, en pacientes con SMD de riesgo alto en manejo con terapia hipometilante, la CF ha demostrado valor adicional en la predicción de la respuesta al tratamiento y los resultados se correlacionan con la supervivencia⁵². Pacientes con respuesta al tratamiento después de tres ciclos revelan una significativa disminución en el número de alteraciones por CMF en comparación con pacientes sin respuesta a la terapia.

La presencia de los progenitores mieloides aberrantes al inicio de la terapia, con independencia del porcentaje de células progenitoras, se correlaciona significativamente con falta de respuesta. Además, un número bajo de aberraciones al inicio de la terapia se correlaciona con una supervivencia global significativamente mayor. Los estudios que evalúan el papel de la CF en la predicción de la respuesta al tratamiento, por ejemplo, agentes inmunomoduladores, están en curso.

CITOMETRIA DE FLUJO EN LA DETECCION DE DISERITROPOYESIS (ESCALA RED)

Varios grupos han publicado escalas de citometría de flujo útiles para el diagnóstico o pronóstico de los síndromes mielodisplásicos, basados principalmente en la detección de alteraciones en el linaje mielomonocítico y linfoide; muy pocos se refieren específicamente al compartimiento eritroide. Sin embargo, las alteraciones en la expresión de CD71 (receptor de transferrina), CD36 (receptor de trombospondina) o CD235a (glicoforina-A) han sido durante mucho tiempo reportados en SMD. De hecho, varios autores han hecho hincapié en la especificidad y la consistencia de la disminución de la expresión de CD71 en los pacientes con SMD^{32, 34, 35,51}.

En el 2013 se publicó un estudio prospectivo, que evaluó las alteraciones en el linaje eritroide, con el objetivo de proponer una herramienta sencilla por citometría de flujo, reproducible y útil dentro del estudio diagnóstico de pacientes con sospecha de SMD. Este estudio comprendió dos etapas que corresponden a las fases I y III del proceso de desarrollo de pruebas diagnósticas⁴⁹.

En un primer paso, se compararon cuatro marcadores de superficie en los eritroblastos entre 53 pacientes con SMD y 46 controles, que permitió identificar el coeficiente de variación (CV) de CD71 y CD36 como herramientas discriminativas altamente sensibles para el diagnóstico de SMD. Usando un algoritmo simple que incluyó la combinación de los dos CV (CD 71 y CD 36) y el grado de anemia (VER ANEXO 4), la escala por CF fue capaz de predecir el diagnóstico correcto en 80% de los pacientes de una cohorte más amplia de 110 pacientes en el segundo paso del estudio. Curiosamente, ambos CV están correlacionados negativamente con los niveles de Hemoglobina (Hb), lo que indica que este enfoque será particularmente exitoso para pacientes con anemia, que representan la mayoría de los pacientes con sospecha de SMD. De hecho, 16 de los 20 pacientes con SMD para quienes la escala RED era menor a 3 no tenían anemia. Nueve de estos pacientes tenían un CV anormal y podrían, por tanto, haber sido diagnosticados si hubieran tenido anemia. De los cuatro pacientes restantes que tenían anemia, dos fueron diagnosticados con síndrome 5q-. Por el contrario, los dos pacientes sin SMD, clasificados como falsos positivos con un score RED > o igual a 3, fueron diagnosticados inicialmente como síndrome mielodisplásico no clasificado, no tenían anemia y presentaban trombocitopenia moderada. En estos pacientes con displasia leve o ausente, no había ningún elemento para el diagnóstico de SMD, y después de 6 meses de seguimiento se les considero

que finalmente no tenían SMD. En el mismo estudio se combinaron los resultados de la escala RED con los de la escala de CF Ogata, alcanzando una sensibilidad muy alta en el diagnóstico de SMD, ya que el 88% de los pacientes fueron correctamente clasificados⁴⁹ Muy recientemente, el equipo del Laboratorio de Munich Leukemia demostró que con un seguimiento más largo, la mitad de los pacientes con anomalías por CF y sin prueba de mielodisplasia por citomorfología o citogenética, desarrollaron la enfermedad abiertamente, reforzando el papel de la CF en el diagnóstico precoz de SMD⁵³.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Cuál es la relación de las alteraciones en la citometría de flujo, según las Escalas CFM y RED, con el índice pronóstico internacional IPSS-R en pacientes con síndrome mielodisplásico primario?

IV. JUSTIFICACION

El síndrome mielodisplásico es un grupo de enfermedades sumamente heterogéneas clínicamente, aunque no se conoce su incidencia en población mexicana se estima que es más frecuente que la leucemia aguda; de acuerdo, al estudio publicado por el grupo mexicano para el estudio de SMD se encontró que es más frecuente en adultos jóvenes entre 40 y 60 años.

En el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social, se tienen 20 casos nuevos por año, con una prevalencia de 130 pacientes atendidos en la clínica de SMD, llamando la atención que 40% de ellos son menores de 60 años de edad. Por lo que ante este panorama epidemiológico, el diagnóstico y estratificación pronóstica ha sido de suma importancia para establecer el tratamiento.

El IPSS-R es un índice pronóstico que ha demostrado su utilidad en numerosos estudios, mientras que la citometría de flujo es una herramienta útil para el diagnóstico, con una sensibilidad de 70-90%. En este hospital se realiza de manera rutinaria el estudio de las muestras de medula ósea al diagnóstico de pacientes con citopenias, siguiendo la estandarización de EURO FLOW por lo que es posible calcular el puntaje según las aberraciones fenotípicas detectadas en la muestra. Por este motivo podemos determinar la escala CF y definir tres grupos de riesgo: grupo 1 0-1 puntos, grupo 2 2-3 puntos y grupo 3 4 puntos, esperando que al compararlos con la nueva clasificación pronóstica de SMD, IPSS-R, el grupo 1 se relacione con riesgo muy bajo y bajo, el grupo 2 a riesgo intermedio y el grupo 3 a riesgo alto y muy alto.

El objetivo del estudio es evaluar si el grado de displasia por citometría de flujo se relaciona clínicamente con las categorías del IPSS-R que incluye diversos parámetros clínicos, en especial para los casos cuya presentación clínica es difícil de estadificar. Por tanto, se propone que la citometría de flujo además de ser un método de diagnóstico tenga implicaciones pronósticas.

V. HIPÓTESIS

HIPÓTESIS PRINCIPAL

Los puntajes obtenidos mediante las escalas CFM y RED se relacionan con el índice pronóstico internacional IPSS-R en pacientes con síndrome mielodisplásico primario.

VI. OBJETIVOS

GENERAL:

Evaluar la relación de las alteraciones en la citometría de flujo, según las escalas CFM y RED, con el índice pronóstico internacional IPSS-R en pacientes con síndrome mielodisplásico primario.

ESPECIFICOS:

- Determinar si los puntajes obtenidos con las escalas CFM y RED se relacionan con los riesgos según la escala pronóstica IPSS-R en pacientes con síndrome mielodisplásico.
- Determinar si un puntaje de 4 puntos en la escala CFM y de 6-7 puntos en la escala RED se relacionan con mayor dependencia transfusional.

VII. METODOLOGIA

Diseño del estudio

Estudio de cohorte retrospectiva.

Población de estudio

Pacientes con diagnóstico confirmado de por morfología y citogenética de Síndrome mielodisplásico primario a los que se realizó Citometría de flujo de la muestra de medula ósea inicial, y se determinó el Score FCM y RED, en el hospital de Especialidades Centro Médico Nacional siglo XXI, en el periodo de Enero del 2015 a Marzo del 2016.

A. Criterios de Selección

1. Criterios de Inclusión

Pacientes mayores de 18 años sin límite superior.

De cualquier género.

Que contaban expediente clínico.

Con diagnóstico de SMD con estudio citogenético y citometría de flujo al diagnóstico.

2. Criterios de Exclusión

Pacientes en los que no se dispuso del expediente físico para realizar el análisis.

Que no contaban con protocolo de estudio completo.

Cariotipo sin crecimiento o algún problema técnico para su realización.

3. Criterios de Eliminación

Pacientes con citopenias secundarias a deficiencias de folatos, vitamina B12 y hierro, infecciones, enfermedades autoinmunes, hipotiroidismo, que recibieron quimioterapia y/o radioterapia, con hiperesplenismo, hepatopatía y otras enfermedades hematológicas.

Tamaño de la muestra

Según estudios previos donde se han utilizado escalas por citometría de flujo los puntajes elevados se presentaron en 25% de los pacientes con SMD, identificando a los pacientes con IPSS-R alto y muy alto.

Considerando un α de 5% y un poder de 80% para una variable dicotómica escala CF igual a 4 puntos o menor de 4 puntos, que en el caso de estar presente identificara a 25% de los pacientes que corresponden a IPSS-R alto y muy alto, y tomando en cuenta que se espera tener un paciente con estas características versus dos pacientes con un puntaje menor de 4 puntos, el tamaño de la muestra necesario para rechazar la hipótesis nula es de 21 pacientes con puntaje de 4 puntos versus 42 pacientes con puntaje menor de 4 puntos, en total 63 pacientes.

Estrategia de Estudio

Se incluyeron todos los pacientes con diagnóstico de síndrome mielodisplásico primario, que contaban con protocolo de estudio completo y estudio de citometría de flujo al diagnóstico, durante el periodo de Enero de 2015 a Marzo 2016.

Se obtuvo el expediente clínico de cada caso y se registraron los datos demográficos, y clínicos de importancia para nuestro estudio. Se revisó el subtipo de síndrome mielodisplásico al que corresponde de acuerdo a la OMS 2008, así como la clasificación pronóstica IPSS-R.

Las muestras para análisis por inmunofenotipo fueron obtenidas por aspirado de medula ósea en pacientes con diagnóstico de Síndrome mielodisplásico, y fueron procesadas y analizadas dentro de un periodo de 24 horas posterior a la toma de la muestra, con una solicitud previamente requisitada con los datos clínicos del paciente.

El estudio de displasia en medula ósea por Citometría de flujo de pacientes con diagnóstico de síndrome mielodisplásico fue realizado en el laboratorio de Hematología especial de la UMAE del hospital de Especialidades de Centro médico nacional siglo XXI del IMSS, centro de referencia de pacientes con enfermedades hematológicas, incluyendo los SMD tanto para diagnóstico como para el tratamiento.

El estudio de displasia por poblaciones celulares incluyó la serie eritroide, mielóide (granulocitos y blastos) y monocitoide, se utilizó el panel de anticuerpos aceptado a nivel internacional con el estándar de 4 colores. Los tubos se rotularon con números progresivos y se añadieron 100 μ L

(concentración de células de $10^7/\mu\text{L}$) de muestra de médula ósea, adicionando los anticuerpos conjugados a distintos fluorocromos, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. En las muestras con número de células insuficientes se agregaron cantidades mayores de muestras a los tubos, quedando registrado en el informe. Los tubos se agitaron por 10 segundos y se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad; posteriormente se realizó la lisis de los hematíes con 1 mL de solución de lisis diluida 1/10 en agua destilada del producto "FACSllysing solution" (BDB, San Jose CA USA), e incubación durante 10 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Al término se centrifugó a 2000 rpm durante 5 min, se decantó el sobrenadante y se lavó con 2 mL de PBS pH 7.4 y se volvió a centrifugar a 2000 rpm 5 min, posteriormente se decantó nuevamente el sobrenadante y se resuspendió con 350 μL de PBS pH 7.4.

En el caso de los antígenos intracelulares después de haber incubado con el anticuerpo para el antígeno de superficie, se adicionó 100 μL del reactivo A de la solución Intrasure (solución fijadora de formaldehído), y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, posteriormente se lisaron los eritrocitos con 2 mL de solución de lisis durante 10 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 2000 rpm por 5 min, se decantó el sobrenadante y se adicionó 50 μL de reactivo B (solución permeabilizante) y 10 μL de anticuerpo para el antígeno intracelular, se mezcló e incubó por 15 minutos a temperatura ambiente, se adicionaron 2 mL de PBS pH 7.4, se centrifugó a 2000 rpm 5 min, y finalmente se decantó el sobrenadante y se resuspendió con 350 μL de PBS pH 7.4.

Se procedió a la lectura y análisis, empleando el método recomendado por el grupo EuroFlow 2012 con el equipo FACSCANTO II de 4 colores y con el Software de adquisición y análisis de datos BD Diva. El análisis de los compartimientos hematopoyéticos en las muestras de médula ósea con CF se evaluó bajo una visión de teoría de conjuntos en la siguiente forma: a) se identificó de forma inicial la distribución celular por medio de análisis de tamaño FSC (Forward light scatter) contra complejidad SSC (Sideward light Scatter) que tiene dos propósitos, el primero es obtener un primer conjunto de acuerdo a la distribución celular sobre el cual se realizara el análisis (células nucleadas), y el segundo es que se depuran las poblaciones de detritus celulares que pudieran interferir en el análisis, b) posteriormente se utilizó CD45 contra complejidad (SSC), lo que nos agrupa cada compartimiento de acuerdo a su desarrollo o

madurez (Serie eritroide, granulocitos, monocitos, linfocitos y área de progenitores), c) se realizaron combinaciones de marcadores para analizar cada uno de los compartimientos. El panel que se ocupó para caracterizar los síndromes mielodisplásicos se apega a los estándares de grupos internacionales de Citometría de flujo como el grupo Euroflow 2012. Las combinaciones de anticuerpos para cada tubo fueron:

CD2/CD19/CD45/CD34, CD7/CD5/CD45/CD34, MPO/CD117/CD45/CD34,
CD64/CD14/CD45/CD34, HLADR/CD33/CD45/CD34, CD38/CD11c/CD45/CD34,
CD16/CD11b/CD45/CD34, CD36/CD4/CD45/CD34, CD71/CD13/CD45/CD34,
CD56/CD123/CD45/CD34, CD15/CD45/CD34.

ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO PARA LA OBTENCIÓN DE LA ESCALA CFM Y RED

Escala citometría de flujo multiparametrica (CFM)

En el dot plot de tamaño (FSC) contra complejidad (SSC), se seleccionaron todas las células nucleadas (P2), eliminando las células muertas. Se creó cada una de las regiones en el dot plot de SSC contra CD45 de cada población dependiendo de su complejidad (eritrocitos, linfocitos, monocitos, granulocitos y progenitores). De la región P2 en el dot plot de FSC contra SSC, se seleccionó toda la región de linfocitos, monocitos y progenitores (P3).

Se creó un nuevo dot plot de CD34 contra CD45 mostrando sólo la región P3, en el cual se seleccionaron las células CD34+ (P4); estas células CD34+ se exhiben en otro dot plot de CD45 contra SSC, dentro de las cuales las células con menor complejidad y baja expresión de CD45 son los progenitores linfoides B (llamado B-progenitor related cluster) con CD19+ y CD13-, CD33-, mientras que los que tuvieron una mayor complejidad y una mayor expresión de CD45 son los mieloblastos (llamados myeloblast related-cluster) con CD19- y CD13+, CD33+.

A partir del análisis por citometría de flujo, se analizaron cuatro parámetros cada uno de los cuales equivale a un punto en la escala CFM: (i) porcentaje total de mieloblastos en todas las células nucleadas; (ii) porcentaje total de células progenitoras linfoides B en todas las células CD34+; (iii) Relación CD45 linfocito/mieloblasto (definido como la intensidad media de fluorescencia, IMF, de CD45 en la población de linfocitos entre la IMF de CD45 en los mieloblastos CD34+) y (iv) la relación del canal máximo en SSC de granulocitos a linfocitos

(definido como el número máximo de granulocitos en SSC entre el número máximo de linfocitos en SSC).

Escala RED

Se obtuvo el coeficiente de variación en la población de eritrocitos a partir de dos histogramas con los marcadores CD71 FITC (Ficoeritrina) y CD36 FITC, posteriormente se realizó una correlación entre el coeficiente de variación y la hemoglobina de los pacientes. Con ello se obtuvo un puntaje para definir la presencia de displasia.

VIII. ANALISIS ESTADISTICO

Se determinó la relación entre las variables cualitativas ordinales, escala CFM e IPSS-R, así como entre las variables escala RED e IPSS-R, empleando la prueba estadística Rho de Spearman, considerando sin asociación un valor de 0, asociación positiva un valor cercano a +1, y asociación negativo un valor cercano a -1. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$. El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS23.

IX. ASPECTOS ETICOS

El presente estudio se apega a las normas éticas vigentes. De acuerdo a la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud se trata de un estudio sin riesgo, ya que se emplearán técnicas y métodos de investigación documental retrospectivos y no se realiza una ninguna intervención o modificación intencionada en las variables fisiológicas, psicológicas y sociales de los individuos que participan en el estudio.

Se cuidará la confidencialidad de la manera siguientes: No se incluirán nombres ni identificadores de pacientes en este estudio; Se empelaran los expedientes clínicos que se encuentran en el archivo del hospital de especialidades, así como una base de datos del laboratorio de citometría de flujo, en el que se asignará un número de folio.

Se incluye carta de consentimiento para solicitar en los pacientes que se encuentren en la consulta externa, su autorización para obtención de los datos. El consentimiento lo solicitará un médico diferente al investigador.

Consideraciones de la Norma e Instructivos Institucionales

Este estudio se ajusta a las normas e instructivos institucionales en materia de investigación científica, por lo tanto se realizará hasta que haya sido aprobado por el comité local de investigación.

X. RESULTADOS

En el servicio de Hematología del Hospital de Especialidades “Dr. Bernardo Sepúlveda Gutiérrez”, del Centro Médico Nacional siglo XXI del IMSS, se realizó el diagnóstico de primera vez de síndrome mielodisplásico primario en 32 pacientes, durante el periodo comprendido de Enero de 2015 a Marzo de 2016.

Analizamos retrospectivamente estos 32 casos considerando sus características y las pruebas clínicas realizadas al momento del diagnóstico. Las variables analizadas se muestran en la tabla 1.

La mediana de edad de los pacientes estudiados fue de 71 años, siendo mayores de 60 años el 84% y menores de esta edad el 16%. En cuanto al género no hubo diferencia significativa, 53% fueron hombres y 47% mujeres, con una relación H: M de 1.1

El subtipo de SMD que predominó en este grupo de pacientes fue la CRDM (68.8%), el resto comprendió CRDU (6.3%), AREB 1 (12.5%) y AREB 2 (12.5%).

El subtipo de SMD se relacionó con el nivel de hemoglobina ($Rho = -0.404$, $p = 0.022$), el porcentaje de blastos en medula ósea ($Rho = 0.685$, $p = 0.0001$) y la citogenética ($Rho = 0.720$, $p = 0.0001$). Así los pacientes con SMD con displasia unilínea y multilinea tuvieron un porcentaje de blastos más bajo en medula ósea. Mientras que los pacientes con AREB 1 y AREB 2 tuvieron una media de hemoglobina más baja, así como una citogenética más desfavorable.

El porcentaje de blastos en medula ósea como se mencionó, se relacionó con la citogenética ($Rho = 0.590$, $p = 0.001$), entonces los pacientes con citogenética buena (71.4%), intermedia (17.9%), mala (7.1%) y muy mala (3.6%) tuvieron una media de blastos de 1%, 6%, 10% y 8%, respectivamente.

Presentaron dependencia transfusional de concentrados eritrocitarios 62.5% de los pacientes, encontrando que la citogenética además de relacionarse con el subtipo y porcentaje de blastos en la medula ósea, se relacionaba con la dependencia transfusional ($Rho = -0.400$, $p = 0.035$). En los pacientes con citogenética buena e intermedia el 31.2% y 14.29%, respectivamente, tenían dependencia transfusional, mientras que el 39.29% y 3.57% no la tenían; aquellos con citogenética mala y muy mala (10.7%) todos tenían dependencia transfusional. La dependencia

transfusional también estuvo relacionada con el nivel de hemoglobina ($Rho= 0.661$, $p=0.000$), el porcentaje de blastos en la médula ósea ($Rho= -0.351$, $p=0.049$), subtipo de SMD ($Rho= -0.512$, $p= 0.003$) y como se mencionó previamente con la citogenética.

A todos los pacientes se les realizó el análisis de una muestra de médula ósea por medio de citometría de flujo para determinar el puntaje tanto en la escala CFM como en la escala RED. Sin embargo, en 4 de ellos no se contó con el estudio citogenético por lo que no fue posible calcular el riesgo pronóstico según IPSS-R y no fueron incluidos en el análisis de correlación con las escalas de la citometría de flujo.

Tabla 1. Características clínicas al diagnóstico de los pacientes con Síndrome Mielodisplásico primario.

Característica	Número	Porcentaje/Máximo-Mínimo/Desviación estándar
Número de pacientes	32	
Sexo		
Hombres	17	53.1%
Mujeres	15	46.8%
Edad	71	24-90
Cifra de hemoglobina gr/dl (DE)	9 gr/dl	±3.20
Cifra de neutrófilos	1180 x10 ³ /μL	200-4100
Cifra de Plaquetas	40000 x10 ³ /μL	5000-457000
Deshidrogenasa láctica U/L (DE)	489.9 U/L	±162.87
Porcentaje de blastos en MO	2 %	0-18
Citogenética		
Buena	20	71.4%
Intermedia	5	17.9%
Mala	2	7.1%
Muy Mala	1	3.6%
Subtipo SMD		
CRDU	2	6.3%
CRDM	22	68.8%
AREB-1	4	12.5%
AREB-2	4	12.5%
IPSS-R		
Muy bajo	1	3.6%
Bajo	14	50%
Intermedio	5	17.9%
Alto	3	10.7%
Muy alto	5	17.9%
Dependencia transfusional		
Si	20	62.5%
No	12	37.5%
Puntaje en la escala CFM (DE)	2	±0.77
Puntaje en la escala RED	7	2-7

ANÁLISIS CON LA ESCALA CFM

A 32 pacientes se les realizó el estudio de citometría de flujo y se calculó el puntaje CFM, teniendo una distribución en los tres grupos resultantes de la siguiente manera: Grupo 1 (0-1 puntos) con 7 pacientes (21.8%), Grupo 2 (2-3 puntos) 24 pacientes (75%) y el grupo 3 (4 puntos) con 1 paciente (3.13%).

Al realizar el análisis de correlación entre la variable escala CFM con el IPSS-R no se identificó relación con significancia estadística ($Rho= 0.194$, $p= 0.323$). Cuando se correlacionó con otras variables clínicas como hemoglobina, blastos en la médula ósea, citogenética, dependencia transfusional, entre otras, no se encontró significancia estadística. Tampoco se encontró relación entre el puntaje CFM de 4 puntos con la dependencia transfusional ($Rho= 0.139$, $p= 0.448$).

ANÁLISIS CON LA ESCALA RED

Se evaluó también la escala RED en los 32 pacientes, teniendo una distribución en los grupos resultantes de la siguiente manera: grupo 1 (<3 puntos), 3.5%, grupo 2 (3-5 puntos) 21.9% y grupo 3 (6-7 puntos) 75% (24 de 32 pacientes) (Figura 1).

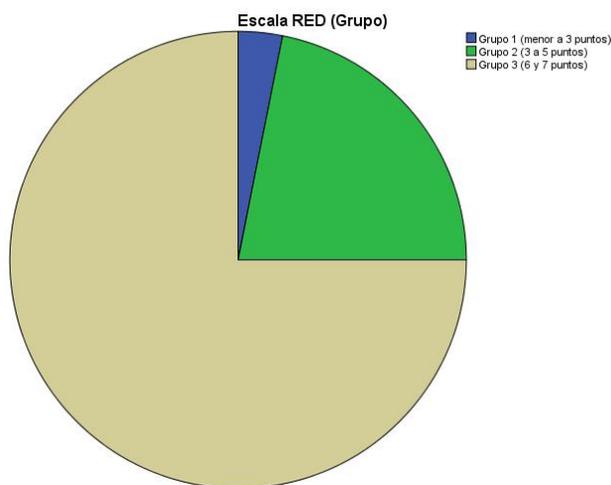


Figura 1. Distribución de los pacientes con SMD primario según la escala por citometría de flujo RED.

Se encontró una correlación positiva entre los grupos de la escala RED y el IPSS-R ($Rho=0.442$, $p= 0.019$). Del total de pacientes, 42.8% que tenían IPSS-R intermedio, alto y muy alto se encontraron en el grupo 3. Es decir que los pacientes que tienen puntajes de 6 y 7 (grupo 3) se correlacionan negativamente con el IPSS-R bajo y muy bajo ($Rho= -0.430$, $p= 0.022$). Entonces un puntaje RED bajo (menor de 6) se relaciona con mayor probabilidad de IPSS-R bajo y muy bajo, es decir, buen pronóstico.

Los 3 grupos en la escala RED se correlacionaron negativamente con la dependencia transfusional ($Rho= -0.445$, $p=0.009$) y el nivel de hemoglobina ($Rho= -0.645$, $p=0.000$) y positivamente con la edad ($Rho= 0.372$, $p=0.036$).

Encontrándose que aquellos pacientes que pertenecen al grupo 3 (6 y 7 puntos) tienen correlación positiva con el nivel de hemoglobina ($Rho= 0.447$, $p=0.0001$), y por lo tanto con la dependencia transfusional ($Rho= 0.6411$, $p=0.0001$).

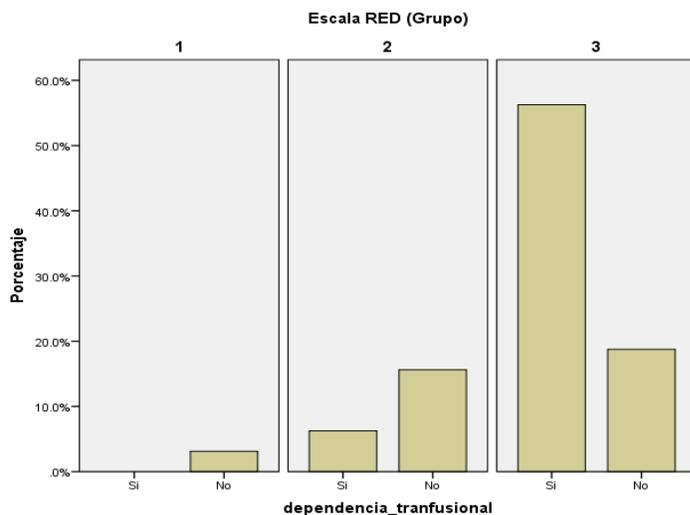


Figura 2. Dependencia transfusional según el puntaje en la escala RED, grupo 1 (<3 puntos), grupo 2 (3-5 puntos), grupo 3 (6-7 puntos).

En el grupo 2 que incluyo 7 pacientes, la mediana de edad fue de 67 años (46-74) y en el grupo 3 que comprendió el 75% de los pacientes fue de 75 años (24-90). Encontrando que la mayor parte de la población de mayores de 60 años se encuentra en el grupo 3, lo cual indica que hay una correlación positiva con la edad y el grupo en la escala RED ($Rho=0.372$, $p=0.036$).

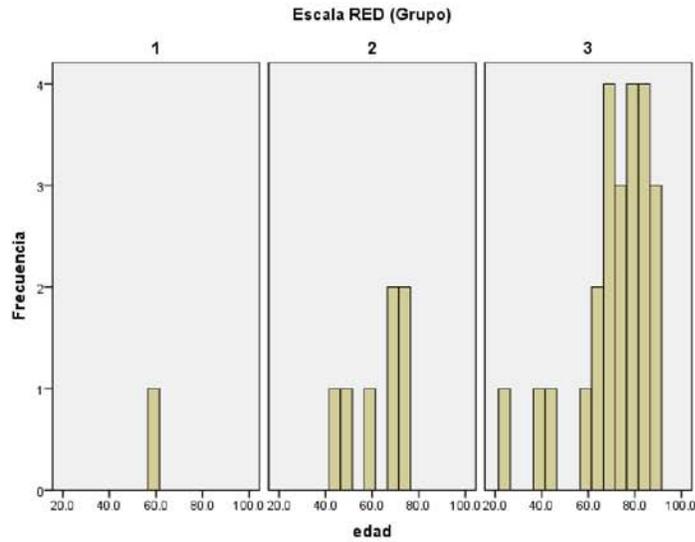


Figura 3. Distribución por edad de los pacientes con SMD en los grupos de la escala RED.

El IPSS-R bajo y muy bajo se correlacionó positivamente con los grupos de RED ($Rho= 0.433$, $p=0.021$), y negativamente con los puntajes 6 y 7 ($Rho= -0.430$, $p= 0.022$) y con el IPSS- R alto y muy alto ($Rho= -0.679$, $p= 0.000$).

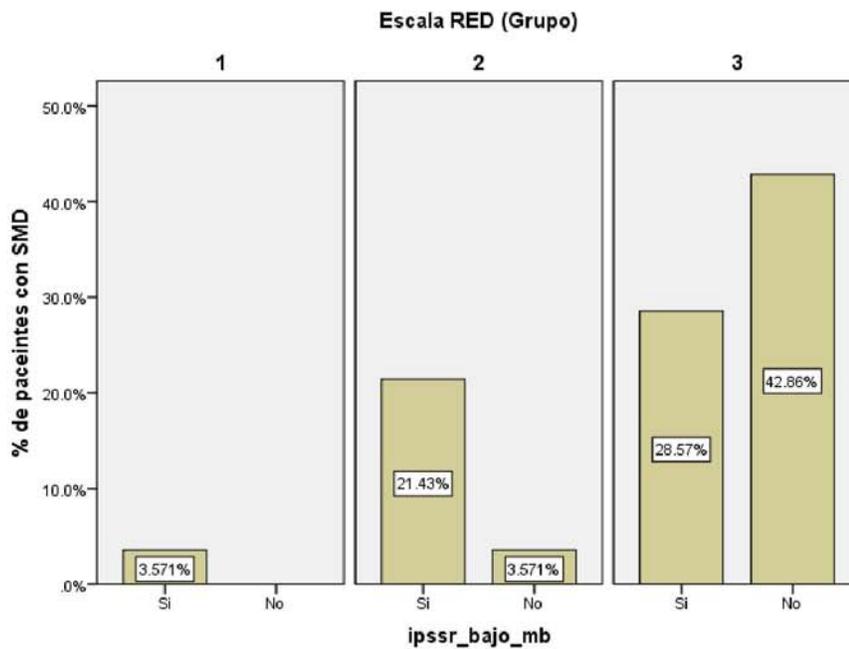


Figura 4. Distribución de los pacientes con SMD de riesgo IPSS-R bajo y muy bajo según los grupos de la escala RED.

Los puntajes de 6 y 7 no se correlacionaron con IPSS-R alto y muy alto, pero si correlacionaron con IPSS-R bajo y muy bajo ($Rho = -0.430$, $p = 0.022$) así como con los grupos de la escala RED ($Rho = -0.995$, $p = 0.000$).

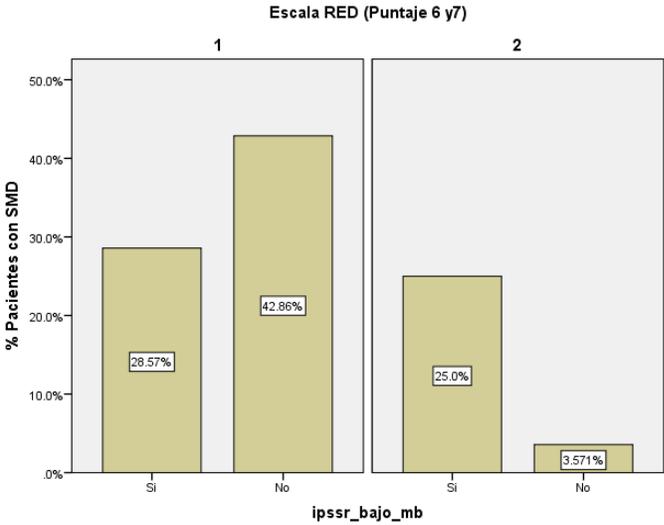


Figura 5. Distribución de los pacientes con SMD de riesgo pronóstico IPSS-R bajo y muy bajo, según el puntaje alto (6 y 7 puntos) en la escala RED.

XI. DISCUSIÓN

En los últimos años han surgido estudios que han evaluado el valor diagnóstico de la citometría de flujo en pacientes con síndrome mielodisplásico primario, que van desde los más complejos a los más sencillos, demostrando su utilidad con una sensibilidad y especificidad que va de 69 a 98% y 78 a 93%, respectivamente. Sin embargo, su implicación pronóstica aún no ha sido claramente establecida. Por lo que el objetivo de este estudio fue evaluar la correlación de las alteraciones en la citometría de flujo mediante la escala CFM y RED con el IPSS-R y de esta manera establecer su valor pronóstico.

Consideramos que la citometría de flujo además de ser un método altamente reproducible, puede ser aplicado en centros hospitalarios donde no se cuente con estudio citogenético de la médula ósea, con la finalidad de apoyar el diagnóstico citomorfológico, pero que también puede tener una implicación pronóstica. En el Hospital de Especialidades del CMN SXXI se cuenta con el panel de anticuerpos estandarizados según el European LeukemiaNet para la determinación de estas escalas en pacientes con sospecha de síndrome mielodisplásico.

Las características de los pacientes analizados en nuestro estudio son similares a las que han reportado múltiples estudios realizados en Estados Unidos y Europa occidental, donde la enfermedad se presenta principalmente en pacientes mayores de 71 años (53.12%), representando el 40% de nuestra población pacientes entre 40 y 70 años, con ligero predominio en hombres con respecto a las mujeres (1.1:1), y siendo el subtipo de SMD más frecuente la displasia multilineaje (68.8%), con un IPSS-R bajo en 50% de los pacientes.

A pesar de existir criterios bien establecidos para el diagnóstico de SMD, sigue siendo un reto el poder establecerlo por las múltiples dificultades que se pueden presentar como la presencia de hipocelularidad, escaso material para análisis y casusas secundarias (no clonales). Esta dificultad para diagnosticar a los SMD llevo a la búsqueda de otros métodos, como la citometría de flujo con una sensibilidad y especificidad alta.

Desde entonces han surgido múltiples sistemas de puntuación por CFM que han apoyado a su diagnóstico, y algunos de ellos han hecho la correlación con los índices pronósticos (Wells et al, 2003; van de Loosdrecht y otros, 2008; Scott et al, 2008)^{33,29}. Basados en el concepto de que alteraciones sutiles que no pueden ser detectadas por morfología puedan ser reconocidas

por citometría de flujo. Un sistema de puntuación de citometría de flujo (FCSS) fue desarrollado por Wells et al (2003)³³, y mostró que los pacientes con displasia severa tenían peor pronóstico que los pacientes con SMD con o sin alteraciones leves (Van de Loosdrecht et al, 2008; Scott et al, 2008)²⁹. Estudios anteriores han demostrado que la FCSS se correlaciona con la clasificación de la OMS y el IPSS y tienen valor pronóstico para el comportamiento clínico del SMD (Wells et al, 2003; van de Loosdrecht y otros, 2008; Scott et al, 2008; Kern et al, 2010; Matarraz et al, 2010; Chu et al, 2011)^{33,51}. Alhan et al. 2014, evaluó la escala FCSS combinada con el IPSS-R encontrando que fue un mejor predictor de la supervivencia global de los pacientes con SMD que el IPSS-R por sí solo, lo que indica que el análisis de citometría de flujo es decisivo para redefinir el pronóstico²⁵.

Ogata diseñó un sistema de puntuación para el diagnóstico de SMD de bajo grado basado en el compartimiento de células CD34+, obteniendo una sensibilidad del 58% y especificidad del 100%, no obstante el valor de este sistema en la evaluación pronóstica no fue descrita⁴⁴. Siendo en el 2012 cuando el grupo del estudio Europeo del LeukemianNET (Della Porta) llevó a cabo un estudio de validación multicéntrico con la escala CFM, integrando cuatro parámetros que evalúan las células CD34+, mostrando una mayor sensibilidad y especificidad (70% y 92% respectivamente), y su expresión se correlaciona con la gravedad de la enfermedad (confirmando una fuerte relación con el fenotipo mielodisplásico). Encontrando con dicha escala que un valor alto de puntuación por citometría de flujo se asoció con displasia multilineal ($P = 0.001$), dependencia transfusional ($P = 0.02$), y citogenética adversa ($P = 0.04$)⁴². Tomando en cuenta lo anterior los puntajes por citometría de flujo se correlacionan con las categorías de riesgo del IPSS y el IPSS-R. Sin embargo, las puntuaciones por citometría de flujo dentro de las categorías de riesgo validadas son heterogéneas⁴². Esto significa, que dentro de las categorías de riesgo específicas IPSS y IPSS-R, la citometría de flujo es capaz de identificar diferentes categorías de riesgo en base a la cantidad de aberraciones.

Posteriormente han surgido otras escalas que han evaluado la expresión anormal de inmunofenotipos asociados con la diferenciación/proliferación y la expresión sincrónica de inmunofenotipos no específicos del estadio en células CD34+, los cuales se correlacionaron positivamente con el IPSS ($Rho 0.498$, $p < 0.001$) en todos los pacientes con SMD estudiados²⁵. Sin embargo no hubo correlación del IPSS con SMD de bajo grado o alto grado²⁵.

Debido a lo expuesto anteriormente, se decidió emplear la escala CFM, por su sencillez y reproducibilidad, empleando los cuatro parámetros que evalúan el compartimiento de células CD34+, asignando a cada una de los parámetros 1 punto, y siendo agrupados para finalidades de nuestro estudio en tres grupos de riesgo basados en el número de alteraciones que presentaban para así relacionarlos con los grupos de riesgo del IPSS-R⁴².

En nuestro estudio no se encontró correlación entre la escala por CFM de 28 pacientes con SMD primario y el índice pronóstico IPSS-R, y ni con ninguna otra de las variables clínicas analizadas, y por lo tanto la dependencia transfusional no se vio correlacionada con un puntaje de 4 puntos.

Como mencionamos la mayoría de los sistemas de puntuación se basan en las alteraciones inmunofenotípicas de los compartimientos mielomonocítico y linfocítico, y muy pocas han surgido para evaluar el compartimiento eritroide, sin embargo como sabemos las alteraciones a este nivel son muy frecuentes en pacientes con SMD, y se han relacionado con anemia, la cual se reporta en casi la totalidad de los pacientes. Mathis et al en el 2013 evaluó la escala RED demostrando tener una sensibilidad del 80% para el diagnóstico de SMD, y por lo tanto decidimos emplearla estableciendo tres grupos dentro de esta y correlacionarlos con el IPSS-R.

Así mediante la prueba de correlación estadística Rho de Spearman, se demostró relación de los Grupos RED (1, 2 y 3) con el IPSS-R (Rho 0.442, $p=0.019$). Se vio que conforme el puntaje dentro de los grupos es mayor, el porcentaje de pacientes con IPSS-R intermedio, alto y muy alto también es mayor. Esto significa clínicamente que al diagnosticar a un paciente con SMD con un puntaje menor a 6 (25% de los casos), indicará que se encuentra en el grupo de riesgo pronóstico favorable, aún sin disponer del estudio citogenético.

El IPSS-R bajo y muy bajo se correlacionó con los diferentes grupos de la escala RED (Rho=0.433, $p=0.021$), con aumento de prevalencia en los diferentes grupos, teniendo el porcentaje más alto en los pacientes del grupo 3 (28.5%), sin embargo hay que considerar que este grupo incluye el mayor número de pacientes. Y por lo tanto la prevalencia de pacientes de riesgos IPSS-R intermedio, alto y muy alto es menor, conforme es menor el puntaje RED. En el grupo 3 (6 y 7 puntos) el 42.86% eran pacientes con IPSS-R intermedio, alto y muy alto.

La edad también se encontró correlacionada positivamente con los grupos de la escala RED (Rho= 0.372, p=0.036), así aquellos con puntajes menores a 6 tuvieron una mediana de edad de 67 años, mientras que con puntajes de 6 y 7 la mediana fue de 75 años.

La dependencia transfusional se correlacionó negativamente, y conforme el puntaje en los grupos aumentó la independencia transfusional disminuyó (Rho= -0.0454, p=0.009). Los pacientes que obtuvieron puntajes de 6 y 7 tuvieron mayor dependencia transfusional. Así el 90% de pacientes del grupo 3 tiene dependencia transfusional, y solo el 10% en aquellos que se encontraron en los grupos 1 y 2. Mientras que la independencia transfusional es igual entre los que tiene puntaje menor a 6 y los que tiene 6 y 7 puntos.

Dentro de las variables clínicas analizadas además se encontró que el subtipo de SMD se relaciona con el nivel de hemoglobina, el porcentaje de blastos en medula ósea, la citogenética y la dependencia transfusional. La dependencia transfusional aumenta principalmente en los pacientes que tienen un pronóstico más desfavorable (AREB 1 y AREB 2), donde además la citogenética es más adversa. En nuestro estudio los pacientes con SMD con displasia unilínea tenían citogenética buena e intermedia, mientras que pacientes con AREB 1 y AREB 2 tuvieron citogenética de buena a muy mala y en este grupo de pacientes todos tenían dependencia transfusional. Sin embargo en el grupo de pacientes con displasia multilineal el 37.5% tenían dependencia transfusional mientras que el 31.25% no la tenían, lo cual puede estar en relación a otros factores desfavorables como la citogenética y porcentaje de blastos.

XII. CONCLUSIONES

1. Los síndromes mielodisplásicos comprenden un grupo de enfermedades heterogéneas de origen clonal, caracterizadas por citopenias, dispoiesis y hematopoyesis ineficaz. Con alta morbilidad asociada y riesgo de progresión a leucemia mieloide aguda.
2. El diagnóstico en muchas ocasiones es difícil porque no se cuenta con el protocolo de estudio completo para descartar citopenias de origen no clonal, o debido a condiciones inherentes a la médula como hipocelularidad, dificultades para obtener una muestra adecuada. Así como no tener acceso a estudios de citogenética.
3. La citometría de flujo es un método que ha demostrado su utilidad como apoyo en el diagnóstico, y también con implicaciones pronósticas que se han evaluado mediante escalas que detectan patrones anormales de expresión en el componente mielomonocítico, encontrando correlación con los diferentes índices pronósticos.
4. La Escala CFM se estratificó en 3 grupos con base en el número de alteraciones que presentaban, sin embargo no se encontró relación con el índice pronóstico IPSS-R.
5. La escala RED también se dividió en 3 grupos dependiendo del número de alteraciones. Tomando en cuenta que el componente eritroide se afecta en la mayor parte de los pacientes, esto asociado a la presencia de anemia.
6. Los pacientes con puntaje RED alto (6 y 7 puntos) se relacionan con IPSS-R intermedio, alto y muy alto. Por lo que podemos decir que si tenemos un paciente de novo con Síndrome mielodisplásico y un puntaje RED menor a 6 puntos (25% de los casos), se espera que este sea de riesgo IPSS-R muy bajo o bajo.

XIII. BIBLIOGRAFIA

1. National Comprehensive Cancer Network Clinical Practice Guidelines in Oncology. Myelodysplastic Syndromes. 2016.
2. Flores E, Montesinos J, Flores P, Gutierrez G, Arana R, Castillo S, et al. Functional analysis of myelodysplastic syndromes-derived mesenchymal stem cells. *Leuk Res* 2008; 32: 1407-1416.
3. Komeno Y, Kitaura J y Kitamura T. Molecular bases of myelodysplastic syndromes: lessons from animal models. *J Cell Physiol* 2009; 219: 529-534.
4. Bejar R, Levine y Ebert B. Unraveling the molecular pathophysiology of myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* 2011; 29(5): 504-515.
5. Greenberg P. Molecular and genetic features of myelodysplastic syndromes. *Int J Lab Hematol* 2012; 34: 215-222.
6. National Cancer Institute. SEER Cancer Statistics Review 1975-2010: Section 30- Myelodysplastic Syndromes (MDS), Chronic Myeloproliferative Disorders (CMD) and Chronic Myelomonocytiv Leukemia (CMML). 2012.
7. Registro Mexicano de enfermedad hematológicas (REMEDEH): un estudio de casos multicéntrico de casos con Síndromes mielodisplásicos (SMD) en adultos. *Rev Hematol Mex* 2014; 15: Suplemento 1.
8. Steensma D.P. The changing classification of myelodysplastic síndromes: what's in a name? *Hematology* 2009; 645-655.
9. Hellström-LyMBERG E. Myelodysplastic Syndromes: An historical perspective. *Hematology* 2008; 42.
10. Rami S. et al. MD. Myelodysplastic Syndromes Classification and Risk Stratification. *Hematol Oncol Clin North Am* 2010; 24: 443-457.
11. Bennet JM et al. Proposals for the classification of the MDS. *BJH* 1982; 51:189-199.
12. Steensma D, MD and Bennett J. M, MD. The Myelodysplastic Syndrome: Diagnosis and treatment *Mayo Clinic Proc* 2006; 81 (1): 104-130.
13. Mufti J G et al. Diagnosis and classification of myelodysplastic síndrome: international Working Group on Morphology of myelodysplastic síndrome. *Haematologica* 2008; 93 (11).

14. Vardiman, J.W, Harris. N.L The World Health Organization (WHO). Classification of the myeloid neoplasm. *Blood* 2002; 100: 2292-2302.
15. WHO classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Introduction and overview of the classification of the myeloid neoplasm 2008; 4th Edition.
16. Reirter A et al. Molecular basis of myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Haematologica* 2009; 94 (12).
17. Swerdlow S, Campo E, Lee N, Jaffe E, et al (Eds): WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4a edición. IARC. Lyon 2008. Pags 88-107.
18. Malcovati L, Hellström-Lindberg E, Bowen D, Adès L, Cermak J, Del-Cañizo C, et al. Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the European leukemianet. *Blood* 2013; 122(17): 2943-2964.
19. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009; 114(5):937-51. 2.
20. Malcovati L, Della Porta MG, Pascutto C, Invernizzi R, Boni M, Travaglino E, et al. Prognostic factors and life expectancy in myelodysplastic syndromes classified according to WHO criteria: a basis for clinical decision making. *J Clin Oncol*. 2005; 23 (30):7594-603. 3.
21. Malcovati L, Della Porta MG, Cazzola M. Predicting survival and leukemic evolution in patients with myelodysplastic syndrome. *Haematologica*. 2006; 91(12):1588-90.
22. Valent P, Horny HP, Bennett JM, et al. Definitions and standards in diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: consensus statements and report from working conference. *Leuk Res* 2007; 31: 727-736.
23. Ramos F, Fernandez-Ferrero S, Suarez D, Barbon M, Rodriguez JA, Gil S, et al. Myelodysplastic syndrome: a search for minimal diagnostic criteria. *Leuk Res*. 1999; 23(3):283-90.
24. Vardiman JW. Hematopathological concepts and controversies in the diagnosis and classification of myelodysplastic syndromes. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2006:199-204.

25. Alhan C, Westers TM, Cremers EMP, et al. High flow cytometric scores identify adverse prognostic subgroups within the revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 2014; 167:100-9.
26. Greenberg P, Cox C, LeBeau M, Fenaux P, Morel P, Sanz G, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997; 89(6): 2079-2088.
27. Greenberg P, Tuechler H, Schanz J, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood* 2012; 120: 2454-2465.
28. Shanz J, Tüchler H, Solé F, Mallo M, Luño E, Cervera J, et al. New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database emerge. *J Clin Oncol* 2012; 30(8): 820-829. : s.n.
29. Van de Loosdrecht AA, Westers TM, Westra AH, et al. Identification of distinct prognostic subgroups in low- and intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes by flow cytometry. *Blood* 2008; 111:1067-77.
30. Vardiman J. The classification of MDS: from FAB to WHO and beyond. *Leuk Res* 2012; 36:1453-8.
31. Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood*. 2008; 111(8):3941-67.
32. Stetler-Stevenson M, Arthur DC, Jabbour N, Xie XY, Molldrem J, Barrett AJ, et al. Diagnostic utility of flow cytometric immunophenotyping in myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2001;98 (4):979-87.
33. Wells DA, Benesch M, Loken MR, Vallejo C, Myerson D, Leisenring WM, Deeg HJ. Myeloid and monocytic dyspoiesis as determined by flow cytometric scoring in myelodysplastic syndrome correlates with the IPSS and with outcome after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2003; 102(1):394-403.
34. Della Porta MG, Malcovati L, Invernizzi R, Travaglino E, Pascutto C, Maffioli M, et al. Flow cytometry evaluation of erythroid dysplasia in patients with myelodysplastic syndrome. *Leukemia*. 2006; 20(4):549-55.

35. Malcovati L, Della Porta MG, Lunghi M, Pascutto C, Vanelli L, Travaglino E, et al. Flow cytometry evaluation of erythroid and myeloid dysplasia in patients with myelodysplastic syndrome. *Leukemia*. 2005; 19(5):776-83.
36. Van de Loosdrecht AA, Alhan C, Bene MC, Della Porta MG, Drager AM, Feuillard J, et al. Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: report from the first European LeukemiaNet working conference on flow cytometry in myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2009; 94(8): 1124-34.
37. Maecker HT, McCoy JP Jr, Amos M, Elliott J, Gaigalas A, Wang L, et al. A model for harmonizing flow cytometry in clinical trials. *Nat Immunol*. 2010; 11(11):975-8.
38. Westers TM, van der Velden VHJ, Alhan C, et al. Implementation of flow cytometry in the diagnostic work-up of myelodysplastic syndromes in a multicenter approach: report from the Dutch working party on flow cytometry in MDS. *Leuk Res* 2012; 36:422-30.
39. Van Lochem EG, van der Velden VHJ, Wind HK, et al. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytom Part B Clin Cytom* 2004; 60:1-13.
40. Ogata K, Della Porta MG, Malcovati L, Picone C, Yokose N, Matsuda A, Yamashita T, Tamura H, Tsukada J, and Dan K. Diagnostic utility of flow cytometry in low-grade myelodysplastic syndromes: a prospective validation study. *Haematologica* 2009; 94:1066-1074.
41. Van de Loosdrecht AA, Ireland R, Kern W, et al. Rationale for the clinical application of flow cytometry in patients with myelodysplastic syndromes: position paper of an international consortium and the European LeukemiaNet working group. *Leuk Lymphoma* 2013; 54:472-5.
42. Della Porta MG, Picone C, Pascutto C, et al. Multicenter validation of a reproducible flow cytometric score for the diagnosis of low-grade myelodysplastic syndromes: results of a European LeukemiaNET study. *Haematologica* 2012; 97:1209-17.
43. Pellagatti A, Cazzola M, Giagounidis AA, Malcovati L, Della Porta MG, Killick S, et al. Gene expression profiles of CD34+ cells in myelodysplastic syndromes: involvement of interferon-stimulated genes and correlation to FAB subtype and karyotype. *Blood*. 2006;108(1):337-45.

44. Ogata K, Kishikawa Y, Satoh C, Tamura H, Dan K, Hayashi A. Diagnostic application of flow cytometric characteristics of CD34+ cells in low-grade myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2006; 108(3):1037-44.
45. Westers TM, Alhan C, Chamuleau MED, et al. Aberrant immunophenotype of blasts in myelodysplastic syndromes is a clinically relevant biomarker in predicting response to growth factor treatment. *Blood* 2010; 115:1779-84.
46. Xu F, Wu L, He Q, et al. Immunophenotypic analysis of erythroid dysplasia and its diagnostic application in myelodysplastic syndromes. *Intern Med J* 2012; 42:401-11.
47. Wangen JR, Eidenschink Brodersen L, Stolk TT, et al. Assessment of normal erythropoiesis by flow cytometry: important considerations for specimen preparation. *Int J Lab Hematol* 2014; 36:184-96.
48. Fajtova M, Kovarikova A, Svec P, et al. Immunophenotypic profile of nucleated erythroid progenitors during maturation in regenerating bone marrow. *Leuk Lymphoma* 2013; 54:2523-30.
49. Mathis S, Chapuis N, Debord C, et al. Flow cytometric detection of dyserythropoiesis: a sensitive and powerful diagnostic tool for myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 2013;27:1981-7
50. Kern W, Haferlach C, Schnittger S, et al. Clinical utility of multiparameter flow cytometry in the diagnosis of 1013 patients with suspected myelodysplastic syndrome: correlation to cytomorphology, cytogenetics, and clinical data. *Cancer* 2010; 116:4549-63.
51. Matarraz S, López A, Barrena S, et al. Bone marrow cells from myelodysplastic syndromes show altered immunophenotypic profiles that may contribute to the diagnosis and prognostic stratification of the disease: a pilot study on a series of 56 patients. *Cytom Part B, Clin Cytom* 2010; 78:154-68.
52. Alhan C, Westers TM, van der Helm LH, et al. Absence of aberrant myeloid progenitors by flow cytometry is associated with favorable response to azacitidine in higher risk myelodysplastic syndromes. *Cytom Part B Clin Cytom* 2014; 86: 207-15.
53. Kern W, Haferlach C, Schnittger S, Alpermann T, Haferlach T. Serial assessment of suspected myelodysplastic syndromes: significance of flow cytometric findings validated by cytomorphology, cytogenetics, and molecular genetics. *Haematologica* 2013; 98: 201–207.

XIV. ANEXOS

Anexo 1

TIPO DE SÍNDROME MIELODISPLÁSICO: consideramos a un paciente con SMD si presentaba citopenias en un estudio de biometría hemática (Hemoglobina <10gr/dL; Neutrófilos <1,800/ μ L y/o Plaquetas <100,000/ μ L), sin tener causal aparente (Sin enfermedad hematológica previa; sin enfermedad autoinmunitaria; sin haber recibido quimioterapia o radioterapia; con panel viral para VIH, Hepatitis B y C negativos; perfil tiroideo normal; sin deficiencia de hierro, ácido fólico o complejo B), y de quien se dispuso de una muestra de médula ósea teñida con Wright, en la que se observaron <20% de blastos del total de células nucleadas, con \geq 10% de displasia en la serie eritroide, mieloide y/o megacariocítica.

De acuerdo a estos hallazgos se clasificó en uno de los 7 subtipos de síndrome mielodisplásico identificados por la OMS, 2008: Citopenia refractaria con displasia unilínea; Anemia refractaria con sideroblastos en anillo; Citopenia refractaria con displasia multilineal; Anemia refractaria con exceso de blastos, tipo 1 y tipo 2; Síndrome mielodisplásico con delección aislada del brazo largo del cromosoma 5; y Síndrome mielodisplásico no-clasificado.

TIPO DE SMD	HALLAZGOS EN SANGRE PERIFÉRICA	HALLAZGOS EN MÉDULA ÓSEA
Citopenia refractaria con displasia unilínea: Anemia refractaria, Neutropenia refractaria, Trombocitopenia refractaria.	Unicitopenia o bicitopenia. Blastos <1%.	Displasia unilínea \geq 10% de las células en un linaje. <5% de blastos. <15% de precursores eritroides de tipo sideroblastos en anillo.
Anemia refractaria con sideroblastos en anillo (ARSA).	Anemia. Sin blastos.	\geq 15% de precursores eritroides de tipo sideroblastos en anillo. Displasia única eritroide. <5% de blastos.
Citopenia refractaria con displasia multilineal (CRDM).	Citopenia(s).	Displasia \geq 10% de las células en dos o tres linajes.

	<p>Blastos <1%.</p> <p>No cuerpos de Auer.</p> <p>Monocitos <1000/mL.</p>	<p><5% de blastos.</p> <p>No cuerpos de Auer.</p> <p>±15% de sideroblastos en anillo.</p>
Anemia refractaria con exceso de blastos tipo 1 (AREB-1).	<p>Citopenia(s).</p> <p>Blastos 2-4%.</p> <p>No cuerpos de Auer.</p> <p>Monocitos <1000/mL.</p>	<p>Displasia uni o multi-linaje.</p> <p>Blastos 5-9%.</p> <p>No cuerpos de Auer.</p>
Anemia refractaria con exceso de blastos tipo 2 (AREB-2).	<p>Citopenia(s).</p> <p>Blastos 5-19%.</p> <p>± Cuerpos de Auer.</p> <p>Monocitos <1000/mL.</p>	<p>Displasia uni o multi-linaje.</p> <p>Blastos 10-19%.</p> <p>± Cuerpos de Auer.</p>
SMD asociado a delección aislada del(5q).	<p>Anemia.</p> <p>Plaquetas normales o aumentadas.</p> <p>Blastos <1%.</p>	<p>Megacariocitos normales o aumentados con núcleo hipolobulado.</p> <p><5% de blastos.</p> <p>Anormalidad citogenética aislada del(5q).</p> <p>No cuerpos de Auer.</p>
SMD no-clasificado.	<p>Citopenias.</p> <p>Blastos ≤1%.</p>	<p>Displasia inequívoca en menos del 10% de las células en uno o más linajes y anomalía citogenética presuntiva de SMD.</p> <p><5% de blastos.</p>

Anexo 2.

IPSS-R: se refiere al Sistema de clasificación pronóstica internacional revisado en 2012, que identificó a cada caso con el diagnóstico de SMD en una de cinco categorías de acuerdo al número de blastos, estudio citogenético y número de citopenias.

- **NÚMERO DE BLASTOS:** correspondió a la cantidad de células de aspecto inmaduro observadas en el microscopio óptico en una muestra de médula ósea preparada con la tinción de Wright.

Escala: porcentaje respecto del total de células evaluadas.

- **ESTUDIO CITOGÉNÉTICO:** se refirió al estudio citogenético por bandeado GTG, realizado en una muestra de médula ósea y cuyo resultado fue categorizado según el Sistema de clasificación citogenética del SMD, publicado en el 2012.

Escala: 1. Muy bueno; 2. Bueno; 3. Intermedio; 4. Pobre; y 5. Muy pobre.

- **NÚMERO DE CITOPENIAS:** es cuando en el estudio inicial de un paciente el reporte de la biometría hemática indicó: Hemoglobina <10gr/dL, Neutrófilos <1,800/ μ L y/o Plaquetas <100,000/ μ L. Por lo que pueden ser desde 1 hasta 3 citopenias.

Escala: 1. Una citopenia; 2. Dos citopenias; 3. Tres citopenias.

a) Variables pronósticas:

PUNTOS POR VARIABLE	0	0.5	1	1.5	2	3	4
Citogenética	MB		B		I	P	MP
% blastos en médula ósea	≤ 2		>2 a <5		5 a 10	>10	
Hemoglobina (gr/dL)	≥ 10		8 a <10	<8			
Neutrófilos (1×10^3 /μL)	≥ 0.8	<0.8					
Plaquetas (1×10^3 /μL)	≥ 100	50 a <100	<50				
Citogenética. Muy buena (MB): -Y, del(11q); Buena (B): Normal, del(5q), del(12p), del(20q), doble incluyendo del(5q); Intermedia (I): del(7q), +8, +19, i(17q), cualquier otra única ó doble de clona independiente; Pobre (P): -7, inv(3)/t(3q)/del(3q), doble incluyendo -7/del(7q), compleja con 3 anormalidades; Muy pobre (MP): Compleja con más de 3 anormalidades.							

b) Estratificación pronóstica del SMD según IPSS-R, 2012:

CATEGORÍA DE RIESGO	PUNTAJE TOTAL	SUPERVIVENCIA GLOBAL (mediana en años)
Muy bajo	≤1.5	8.8
Bajo	>1.5 a 3	5.3
Intermedio	>3 a 4.5	3
Alto	>4.5 a 6.	1.6
Muy Alto	>6	0.8

Anexo 3

FCM SCORE

Parámetro de citometría	Valores de referencia	Coefficiente de regresión	Puntos
Tamaño del clúster relacionado a mieloblastos (%)	≥2	2.59	1
Tamaño del clúster relacionado a progenitores B (%)	≤5	1.87	1
Relación CD45 linfocitos/Mieloblastos	≤4 o ≥7.5	1.76	1
Relación SCC Granulocitos/linfocito	≤6	2.31	1

Anexo 4

RED SCORE

Parámetro RED Score	
CD71CV (%)	<80: 0 puntos ≥80: 3 puntos
CD36CV (%)	<65: 0 puntos ≥65: 2 puntos
Nivel de Hemoglobina (g/dl)	>10.5 (M) o >11.5 (H): 0 puntos ≤10.5 (M) o ≤11.5 (H): 2 puntos

Anexo 5

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACION MEDICA

Título del protocolo: **“Relación entre las alteraciones por citometría de flujo según las escalas CFM y RED con el índice pronóstico internacional (IPSS-R) en pacientes con síndrome mielodisplásico”**

Investigador principal: Dr. Carlos Roberto Hernández Pérez.

Sede donde realizare el estudio: Hospital de Especialidades CMN SXXI.

Nombre del paciente _____

A través de este documento queremos hacerle una invitación a participar voluntariamente en un estudio de investigación clínica. Antes de que usted acepte participar en este estudio, se le presenta este documento de nombre “Consentimiento Informado”, que tiene como objetivo comunicarle de los posibles riesgos y beneficios de su participación para que usted pueda tomar una decisión informada. Su decisión es voluntaria, lo que significa que usted es totalmente libre de ingresar o no en el estudio. Podrá retirar su consentimiento en cualquier momento y sin tener que explicar las razones, sin que esto signifique una disminución en la calidad de la atención médica que se le provea, ni deteriorará la relación con su médico.

El síndrome mielodisplásico (SMD) es una enfermedad hematológica que se presenta porque la médula ósea donde se produce la sangre, deja de funcionar, los pacientes presentan cansancio y palidez de la piel por la baja de glóbulos rojos conocida como anemia, también pueden tener infecciones frecuentes porque bajan los glóbulos blancos que sirven de defensas contra infecciones, en algunos casos pueden presentar sangrado por baja de las plaquetas que son unas pequeñas células que sirven para la coagulación. En la médula ósea que se ve al microscopio las células tienen alteraciones en su forma, pero existen aparatos especiales pueden ver mejor estas alteraciones, uno de esos aparatos es el citometro de flujo.

El objetivo de este estudio es evaluar si las alteraciones en la forma de las células medidas por citometría de flujo, de la muestra de médula ósea que le tomaron al momento de su diagnóstico, nos ayudan a clasificar mejor la enfermedad.

Su participación consiste en permitirnos analizar sus estudios de laboratorio registrados en su expediente clínico, así como los estudios especiales que le realizaron llamados citometría de flujo y cariotipo, en caso de que se los hayan realizado.

Es posible que los resultados de este estudio ayuden a otros pacientes a clasificar mejor la enfermedad. Esto no quiere decir que no se haya hecho antes o que su enfermedad está mal clasificada, lo que se busca es utilizar una herramienta relativamente nueva como la citometría de flujo en mejorar la identificación de cada enfermedad.

El estudio no implica riesgo para usted ya que los datos serán obtenidos del expediente clínico mientras usted participa en este estudio, así como los registros de salud relacionados, información que permanecerá estrictamente confidencial en todo momento.

Al firmar la forma de consentimiento, usted otorga su autorización para a esta información para el estudio actual y cualquier investigación posterior que pueda llevarse a cabo utilizando estos mismos datos. Sin embargo, el Investigador del estudio tomará las medidas necesarias para proteger su información personal y no incluirá su nombre en ningún formato, publicaciones o divulgación futura, evitando que usted sea identificado. Si se retira del estudio, no obtendremos más información personal acerca de usted, pero podremos necesitar continuar utilizando la información ya recopilada.

En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a: Comisión de Ética de Investigación de la CNIC del IMSS: Avenida Cuauhtémoc 330 4° piso Bloque "B" de la Unidad de Congresos, Colonia Doctores. México, D.F., CP 06720. Teléfono (55) 56 27 69 00 extensión 21230, Correo electrónico: comision.etica@imss.gob.mx.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, _____ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación. Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento

Firma del participante o del padre o tutor

Fecha: _____

Testigo 1 _____

Fecha: _____

Testigo 2 _____

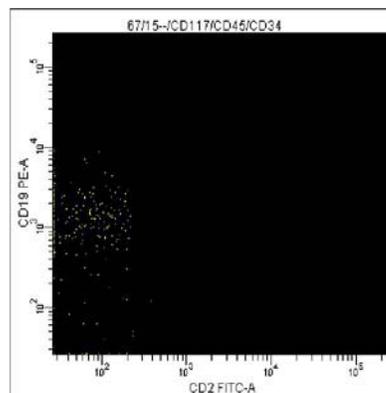
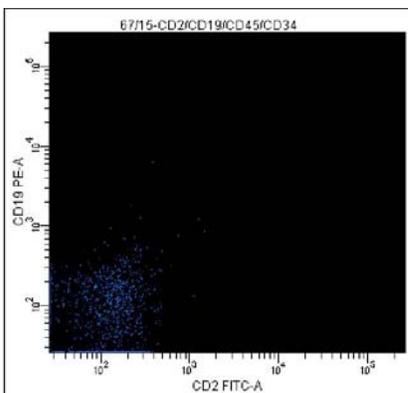
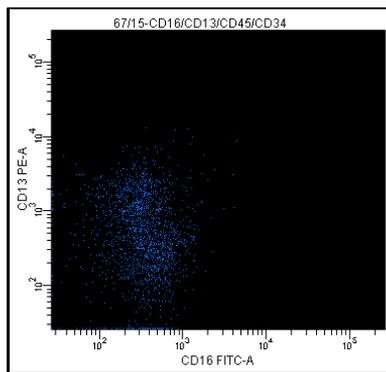
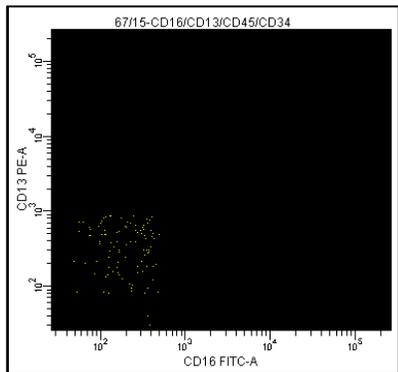
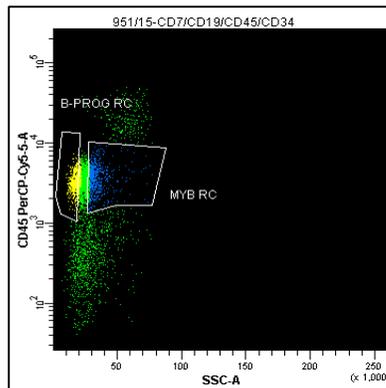
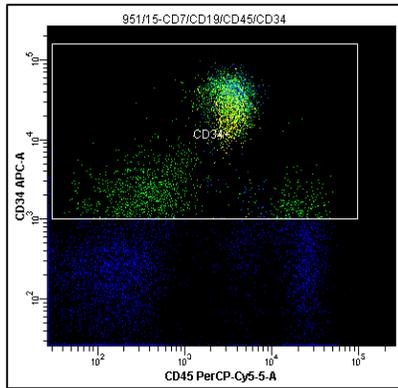
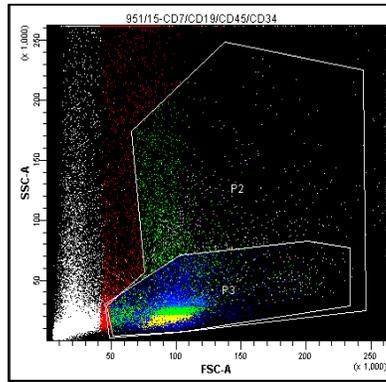
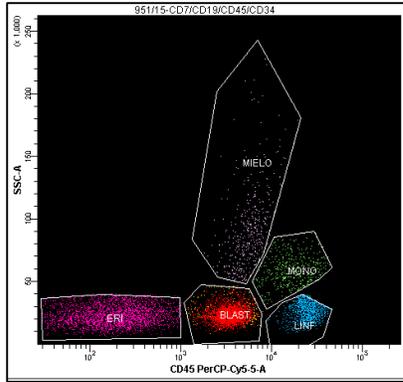
Fecha: _____

He explicado al Sr (a). _____ la naturaleza y los propósitos de la investigación; he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación, He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar la investigación con seres humanos y me apegó a ella.

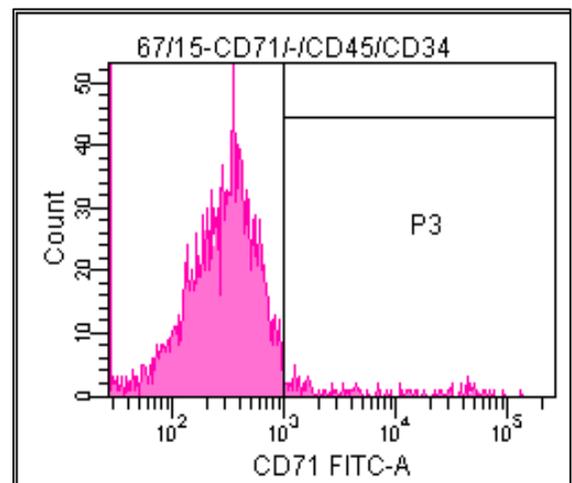
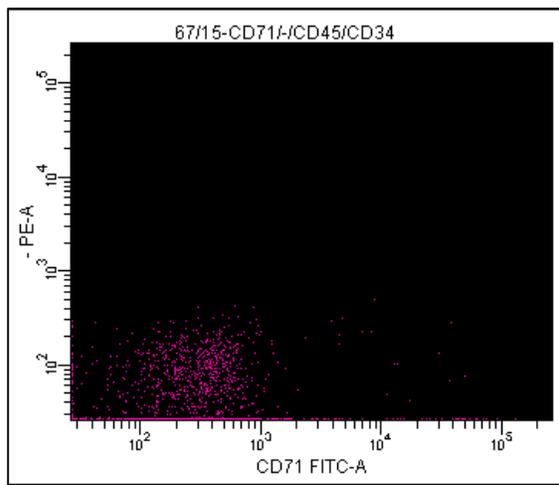
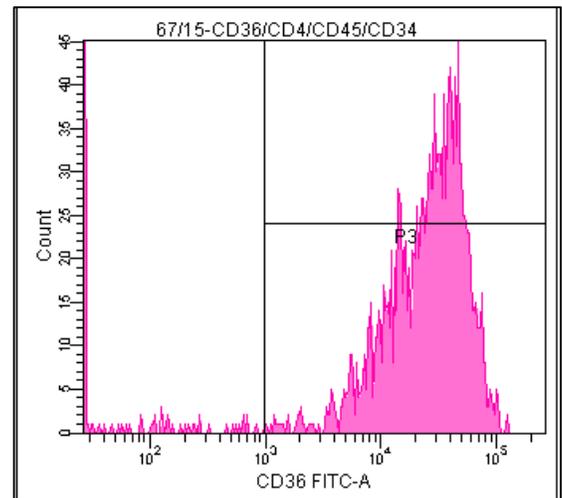
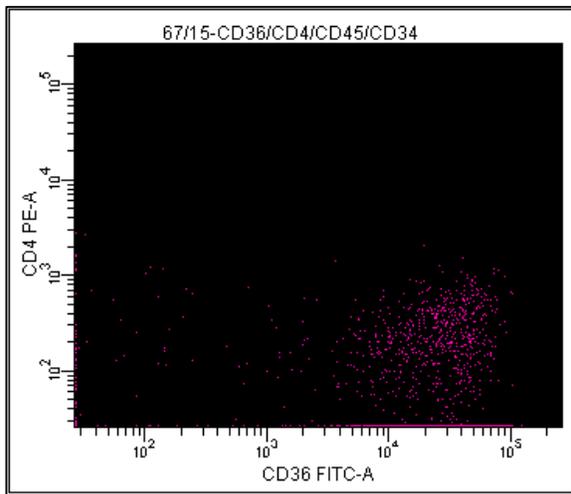
Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

Firma de investigador.

Fecha: _____



Análisis por citometría de flujo de los cuatro parámetros de la Escala CFM de una muestra de células de médula ósea, marcadas anticuerpos CD34 y CD45, en una paciente con Síndrome mielodisplásico tipo AREB 2.



Análisis por citometría de flujo de los dos parámetros de la Escala RED en una paciente con Síndrome mielodisplásico tipo AREB 2.