



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
UMAE: HOSPITAL GENERAL "DR GAUDENCIO  
GONZALEZ GARZA" CMN LA RAZA

IMPLEMENTACIÓN DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO MULTIPARAMÉTRICA CON LA  
PLATAFORMA EUROFLOW EN EL DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIAS AGUDAS EN  
PACIENTES PEDIÁTRICOS DEL HOSPITAL GENERAL CENTRO MÉDICO NACIONAL  
LA RAZA

TESIS  
PARA OBTENER EL GRADO EN  
MÉDICO ESPECIALISTA EN PATOLOGÍA CLÍNICA  
PRESENTA  
DRA. Itzel Quiroz Zepeda

ASESOR DE TESIS

M en C. Juana Wendy Aguilera Caldera



CDMX

MAYO 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

# INDICE

<b>INDICE</b>	<b>1</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>3</b>
<b>I. ANTECEDENTES</b>	<b>6</b>
Antecedentes históricos de la Citometría de Flujo	<b>8</b>
Citometría de Flujo en la Actualidad	<b>9</b>
Fundamento de la Citometría de Flujo	<b>11</b>
Plataforma Euroflow	<b>12</b>
Algoritmo Euroflow	<b>13</b>
Kit de Orientación en Leucemias Agudas ALOT	<b>15</b>
Kit de Identificación de Leucemias Agudas Linfoides B	<b>17</b>
Kit de Identificación de Leucemias Agudas Linfoides T	<b>18</b>
Kit de Identificación de Leucemias Agudas Mieloides	<b>19</b>
Especificaciones del equipo BD Facs Canto II	<b>22</b>
Software INFINICYT	<b>24</b>
<b>II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>25</b>
Objetivo general	<b>25</b>
Objetivos específicos	<b>25</b>
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>26</b>
<b>IV. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>28</b>
Tipo de estudio	<b>28</b>
Población	<b>28</b>
Selección de la muestra	<b>29</b>
Criterios de Inclusión	<b>29</b>
Criterios de exclusión	<b>29</b>
Definición de las variables	<b>30</b>
Leucemia Aguda Linfoide de estirpe B	<b>30</b>
Leucemia Aguda Linfoide de estirpe T	<b>31</b>
Leucemia Mieloide Aguda	<b>32</b>
Leucemia bifenotípica	<b>34</b>
Descripción del estudio	<b>35</b>
Flujograma de trabajo	<b>36</b>
Métodos de Citometría de Flujo	<b>37</b>
Flujograma KIT ALOT	<b>40</b>
Flujograma KIT LLAB	<b>42</b>
Flujograma KIT LLAT	<b>43</b>
Flujograma KIT LMA	<b>44</b>
Aspectos éticos	<b>47</b>
Recursos humanos y financieros	<b>51</b>

	Ubicación espacio temporal	51
	Consentimiento informado	52
	Análisis estadístico	53
	Cronograma de actividades	53
<b>V.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>54</b>
<b>VI.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>61</b>
<b>VII.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>68</b>
<b>VIII.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>70</b>
<b>IX.</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>76</b>

## RESUMEN

**Título del Protocolo: Implementación de la citometría de flujo multiparamétrica con la plataforma Euroflow en el diagnóstico de leucemias agudas en pacientes pediátricos del Hospital General Centro Médico Nacional La Raza**

La citometría de flujo multiparamétrica actualmente es una técnica utilizada para la obtención del inmunofenotipo, el cual, se ha constituido como un pilar en el diagnóstico y clasificación de las leucemias agudas y otras neoplasias. Los especímenes analizados pueden ser sangre periférica, médula ósea, ganglios linfáticos o líquido cefalorraquídeo entre otras muestras que puedan contener células neoplásicas. Debido a la implementación de nuevos instrumentos multicolores digitales y la existencia de un mayor número de fluorocromos disponibles, se han aumentado los marcadores o antígenos que pueden ser evaluados. A la vez permite una identificación más precisa y la caracterización fenotípica específica de las poblaciones de células tumorales, incluso en la evaluación de subgrupos de leucocitos aparentemente normales.<sup>1</sup>

Sin embargo, el incremento en la complejidad para la determinación del inmunofenotipo y los paneles de reactivos, ha requerido aumentar el nivel de conocimiento y habilidades para la correcta interpretación de la información obtenida. Como consecuencia, han surgido dificultades en el

análisis y obtención de resultados debido a la presencia de diferentes grados de subjetividad, ya que estos dependen de la experiencia y el conocimiento del operador experto y la variabilidad en los paneles utilizados entre los laboratorios dedicados al diagnóstico de inmunofenotipo por Citometría de Flujo.<sup>3</sup>

En los últimos años y con el fin de disminuir la variabilidad y subjetividad de la prueba, expertos en el tema han propuesto guías y recomendaciones en consensos internacionales y nacionales. Estos documentos han sido de gran impacto, pero han sido parcialmente exitosos por las siguientes razones: Primero se enfocan en listas de marcadores sin recomendaciones específicas acerca de los reactivos, fluorocromos o el diseño de los paneles, segundo, han fallado en proveer protocolos para la selección de las combinaciones de fluorocromos y conjugados de fluorocromos en un panel, las técnicas de preparación de la muestra, estandarización de los procesos operativos y estrategias más adecuadas para el análisis de la información en las diferentes poblaciones analizadas, etc.<sup>1</sup>

En 2006 se creó el CONSORCIO DE LA UNION EUROPEA EUROFLOW, para el diseño y evaluación de los paneles de anticuerpos utilizados en el diagnóstico y clasificación de las leucemias y linfomas más frecuentes, con los objetivos principales de proveer combinaciones en los fluorocromos, que apoyarán en la decisión al elegir la citometría de flujo multicolor adecuada y posteriormente su evaluación prospectiva en múltiples laboratorios.<sup>2</sup>

Además, han surgido nuevas necesidades con el propósito de estandarizar y armonizar el proceso, tales como la selección de la combinación más apropiada de fluorocromos, el diseño y evaluación de los procesos operativos, la preparación de la muestra, así como la elaboración del software adecuado para el análisis obtenido y principalmente la interpretación por parte del personal experto.

En particular la Plataforma propuesta por Euroflow ha sido implementada a partir de mayo de 2017 en el Laboratorio de Hematología Especial de la Unidad Médica de Alta Especialidad del Centro Médico La Raza, para la determinación del inmunofenotipo y Enfermedad Mínima Residual de los pacientes con diagnóstico de novo de Leucemias Agudas. Por lo cual surge la necesidad de analizar la experiencia de la implementación de la plataforma en el análisis del inmunofenotipo en nuestra población con el fin de identificar su utilidad en el diagnóstico de las leucemias agudas. Y con ello enfatizar la necesidad del uso de una plataforma estandarizada en las unidades donde se realice diagnóstico y clasificación de Leucemias Agudas.

# **Implementación de la citometría de flujo multiparamétrica con la plataforma Euroflow en el diagnóstico de leucemias agudas en pacientes pediátricos del Hospital General Centro Médico Nacional La Raza**

## **ANTECEDENTES**

La citometría de flujo multiparamétrica actualmente es una técnica utilizada para la obtención del inmunofenotipo, el cual, se ha constituido como un pilar en el diagnóstico y clasificación de las leucemias agudas y otras neoplasias. Los especímenes analizados pueden ser sangre periférica, médula ósea, ganglios linfáticos o líquido cefalorraquídeo entre otras muestras que puedan contener células neoplásicas. Debido a la implementación de nuevos instrumentos multicolores digitales y la existencia de un mayor número de fluorocromos disponibles, se han aumentado los marcadores o antígenos que pueden ser evaluados. A la vez permite una identificación más precisa y la caracterización fenotípica específica de las poblaciones de células tumorales, incluso en la evaluación de subgrupos de leucocitos aparentemente normales.<sup>1</sup>

Sin embargo, el incremento en la complejidad para la determinación del inmunofenotipo y los paneles de reactivos, ha requerido aumentar el nivel de conocimiento y habilidades para la correcta interpretación de la información obtenida. Como consecuencia, han surgido dificultades en el

análisis y obtención de resultados debido a la presencia de diferentes grados de subjetividad, ya que estos dependen de la experiencia y el conocimiento del operador experto y la variabilidad en los paneles utilizados entre los laboratorios dedicados al diagnóstico de inmunofenotipo por Citometría de Flujo.<sup>3</sup>

En los últimos años y con el fin de disminuir la variabilidad y subjetividad de la prueba, expertos en el tema han propuesto guías y recomendaciones en consensos internacionales y nacionales. Estos documentos han sido de gran impacto, pero han sido parcialmente exitosos por las siguientes razones: Primero se enfocan en listas de marcadores sin recomendaciones específicas acerca de los reactivos, fluorocromos o el diseño de los paneles, segundo, han fallado en proveer protocolos para la selección de las combinaciones de fluorocromos y conjugados de fluorocromos en un panel, las técnicas de preparación de la muestra, estandarización de los procesos operativos y estrategias más adecuadas para el análisis de la información en las diferentes poblaciones analizadas, etc.<sup>1</sup>

En 2006 se creó el CONSORCIO DE LA UNION EUROPEA EUROFLOW, para el diseño y evaluación de los paneles de anticuerpos utilizados en el diagnóstico y clasificación de las leucemias y linfomas más frecuentes, con los objetivos principales de proveer combinaciones en los fluorocromos, que apoyarán en la decisión al elegir la citometría de flujo multicolor adecuada y posteriormente su evaluación prospectiva en múltiples laboratorios.<sup>2</sup>

Además, han surgido nuevas necesidades con el propósito de estandarizar y armonizar el proceso, tales como la selección de la combinación más apropiada de fluorocromos, el diseño y evaluación de los procesos operativos, la preparación de la muestra, así como la elaboración del software adecuado para el análisis obtenido y principalmente la interpretación por parte del personal experto.

### **ANTECEDENTES HISTÓRICOS CITOMETRIA DE FLUJO**

La citometría de flujo basada en la impedancia y utilizando el principio Coulter se puso en primer lugar a disposición de Wallace H. Coulter en los Estados Unidos bajo el patente número 2656508 en 1953. Posteriormente, fue creado el primer dispositivo basado en citometría con enfoque hidrodinámico y asociado a fluorescencia, el cual fue el ICP 11 que fue desarrollado en 1968 por Wolfgang Göhde de la Universidad de Münster. Se dispuso comercialmente entre 1968 y 1969 cuando fue fabricado por el desarrollador alemán Partec a través de Phywe AG en Göttingen. En ese momento, los métodos de absorción tradicionales eran preferidos generalmente respecto a las técnicas de fluorescencia.<sup>3</sup>

Finalmente, en 1965 Mack Fulwyler desarrolló el citómetro de flujo que se convirtió en el precursor de los instrumentos de hoy. En particular, él era responsable de crear un separador electrónico basado en su volumen. Este instrumento podría separar las células basándose en el volumen de las

células y también utilizar la deflexión electrostática para la segregación y la clasificación; se llamó el microfluorómetro de flujo de Los Alamos.<sup>3</sup>

## **CITOMETRIA DE FLUJO EN LA ACTUALIDAD**

Actualmente el diagnóstico y la clasificación de las leucemias agudas se basa en la morfología, citoquímica, histopatología, inmunofenotipo y características citogenéticas o moleculares. El método más ampliamente utilizado para la determinación del inmunofenotipo es la citometría de flujo. La citometría de flujo multiparamétrica es hoy una herramienta fundamental en la clasificación de las Leucemias Agudas de origen linfoide y mieloide. Así como para la detección de Enfermedad mínima residual.

Sin embargo, existe gran variedad entre los criterios preanalíticos, analíticos y postanalíticos utilizados en los diversos laboratorios de citometría de flujo, tales como diferentes instrumentos de medición, reactivos, paneles de reactivos, fluorocromos, la técnica en cuanto a la preparación de los especímenes, las muestras utilizadas, los anticoagulantes, y los parámetros y estrategias que se requieren para analizar los datos obtenidos en la citometría tales como el software y los criterios utilizados en para la interpretación de los resultados. Por lo que existe la necesidad de armonizar los procesos, estandarizar los métodos de trabajo y homogeneizar los criterios de interpretación.

Los procesos utilizados en la Citometría de flujo y la interpretación de los resultados son las características con mayor variabilidad intralaboratorio e interlaboratorio en la actualidad en cuanto a las técnicas utilizadas en la investigación de células progenitoras hematopoyéticas. Incluso con el uso de métodos y reactivos idénticos, el análisis de datos manual tiene un coeficiente de variación que oscila entre 17- 44%. Por lo que la estandarización de la técnica se considera como una solución. Se han creado al menos tres consorcios en los últimos años para la estandarización de la citometría de flujo entre los cuales se encuentran: [Euroflow](#), [Human Immune Phenotyping Consortium](#)(HIPC) y [FlowCAP](#).<sup>1</sup>

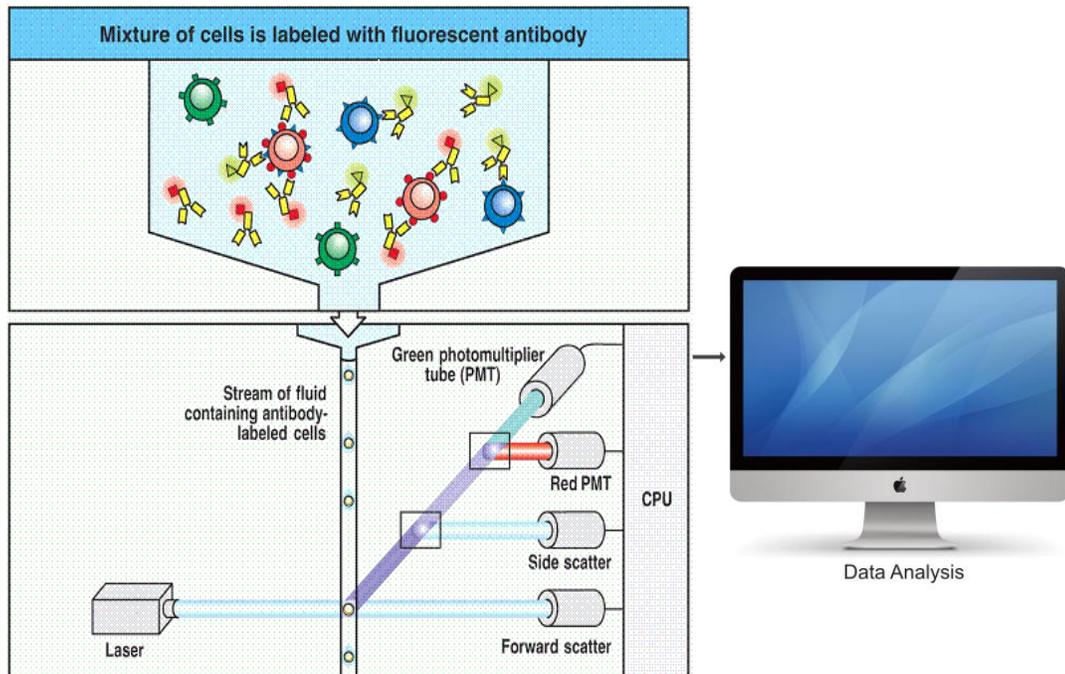
La plataforma para la estandarización en la Citometría de flujo propuesta por Euroflow fue implementada a partir de mayo de 2017 en el Laboratorio de Hematología Especial de la Unidad Médica de Alta Especialidad del Centro Médico La Raza, para la determinación del inmunofenotipo y Enfermedad Mínima Residual de los pacientes con diagnóstico *de novo* de Leucemias Agudas durante el período de mayo de 2017 a febrero 2018. Por lo que el presente trabajo describe la experiencia mediante los procesos utilizados y los resultados obtenidos con dicha plataforma, en nuestra población antes mencionada.

A continuación, se definen los aspectos técnicos relacionados al método y el instrumento con el que se realiza la citometría de flujo.

## **CITOMETRIA DE FLUJO FUNDAMENTO**

La citometría de flujo (FC) es una técnica mediante la cual se analizan de forma simultánea diferentes características celulares. Las células pasan alineadas una a una delante de un conjunto de detectores luminosos y al mismo tiempo son iluminadas por un haz de láser. La interacción de las células con el haz de láser genera señales de dos tipos diferentes: las generadas por la luz dispersada (FSC/SSC), que reflejan principalmente el tamaño celular y su complejidad, y las relacionadas con la emisión de luz por los fluorocromos presentes en las células. Estas señales se convierten en pulsos eléctricos que son amplificados y registrados como señales digitales para ser analizados por un ordenador. <sup>1</sup>

Cuando se añade el reactivo a la muestra, los anticuerpos marcados con fluorocromos presentes en el reactivo se unen específicamente a los antígenos hacia los que están dirigidos y permiten la detección por Citometría de Flujo de diferentes subpoblaciones linfocitarias, como se muestra en la Figura 1. <sup>1</sup>



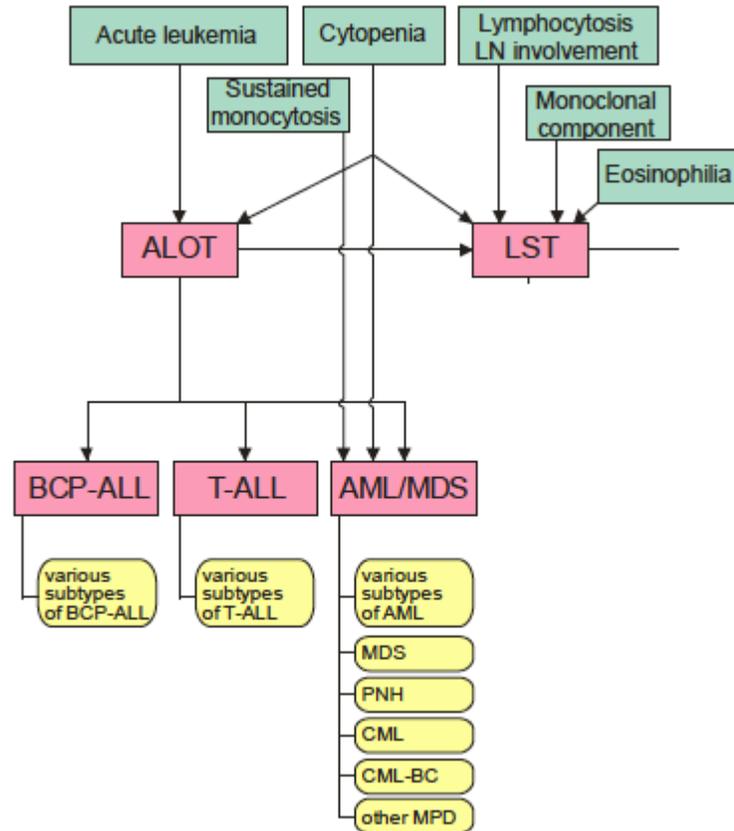
**Figura 1: Fundamento de la Citometría de Flujo.**

## **PLATAFORMA EUROFLOW**

Euroflow es un consorcio científico independiente originario de la unión europea, dirigido a la innovación y estandarización en el inmunofenotipo por citometría de flujo con el fin de mejorar el diagnóstico en los pacientes. Fue formado en 2005, inicialmente con 40 investigadores de 8 diferentes centros médicos universitarios de 8 diferentes países europeos, junto con 2 microempresas con experiencia y conocimientos en citometría de flujo aplicada a la determinación del inmunofenotipo de neoplasias hematológicas. En la actualidad, el consorcio Euroflow se ha convertido en un grupo de trabajo científico y forma parte de la Asociación Europea de Hematología y se ha expandido a 11 instituciones en Europa y America.<sup>2</sup>

En el 2012 el consenso Euroflow propuso un algoritmo basado en los paneles de 8 colores para el inmunofenotipo de neoplasias hematológicas, debido a la necesidad de validar y estandarizar los paneles de anticuerpos utilizados para el inmunofenotipo, con el fin de disminuir la variabilidad interlaboratorio e intralaboratorio. Los paneles están diseñados para diagnosticar y clasificar las Leucemias y linfomas de acuerdo a las categorías definidas por la OMS. <sup>2</sup>

El algoritmo utilizado y propuesto por Euroflow para el diagnóstico de las Leucemias Agudas es el siguiente:



**Figura 2: Algoritmo propuesto por Euroflow para el diagnóstico por**

**Citometría de Flujo Multiparamétrica:** ALOT: Kit de Orientación de Leucemias

Agudas. LST: kit para la evaluación de poblaciones linfocitarias. BCP-ALL: kit para la identificación de leucemia aguda linfocítica de precursores B. T-ALL kit para la identificación de leucemia aguda linfocítica de precursores T. AML/MDS: kit para la identificación de leucemia aguda mieloide y síndrome Mielodisplásico. AML: Leucemia Mieloide Aguda. MDS: Síndrome Mielodisplásico, PNH: Hemoglobinuria Paroxística Nocturna. CML: Leucemia mieloide Crónica. MPD: Enfermedades Mielo proliferativas.

## **Akute Leukemya Orientation Tube o Tubo de Orientación en leucemias Agudas**

El primer tubo que se utiliza cuando se sospecha de una Leucemia Aguda como lo muestra la Figura 2, es el tubo ALOT, denominado así por sus siglas: Akute Leukemya Orientation Tube o Tubo de Orientación en leucemias Agudas; el cual es un kit de 8 anticuerpos diseñado para el asesoramiento inicial en la determinación de la naturaleza de poblaciones inmaduras de células progenitoras hematopoyéticas en muestras de pacientes con Leucemia Aguda. Con la finalidad de determinar si se trata de un linaje linfoide de tipo T, B, mieloide o de fenotipo mixto.<sup>4</sup>

Cada kit contiene volumen suficiente para realizar 25 tests e incluye los siguientes anticuerpos contra marcadores intracitoplásmaticos y de membrana o superficie:

### **Superficie o membrana:**

Anticuerpo anti CD45-OC515 humano, clona: GA90, isotipo: IgG2a.

Anticuerpo anti CD19-PE-Cyanine7 humano, clona: 19-1, isotipo: IgG1.

Anticuerpo anti CD7-APC humano, clona: HULY-M2, isotipo: IgG2a.

Anticuerpo anti CD34-PerCP-Cyanine5.5 humano, clona: 581, isotipo: IgG1.

Anticuerpo anti SmCD3-APC-C750 humano, clona: UCHT-1, isotipo: IgG1.

### **Intracitoplasmáticos:**

Anticuerpo anti CyCD3-Pacific Blue™ humano, clona: UCHT-1, isotipo: IgG1.

Anticuerpo anti CyMPO-FITC humano, clona: 2C7, isotipo: IgG1.

Anticuerpo anti CyCD79a-PE humano, clona: HM57, isotipo: IgG1.

Fluorochrome	Pacific Blue™	OC515	FITC	PE	PerCP-Cyanine5.5	PE-Cyanine 7	APC	APC-C750
Marker	CyCD3	CD45	CyMPO	CyCD79a	CD34	CD19	CD7	SmCD3
Clone	UCHT-1	GA90	2C7	HM57	581	19-1	HULY-M2	UCHT-1
Isotype	IgG1	IgG2a	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	IgG2a	IgG1
Reactivity	T cells	Leukocytes	Myeloid	B-cells	Stem cells	B-cells	T-cells	T-cells

**Tabla 1: Fluorocromos Euroflow: Se muestran los fluorocromos, marcadores, clonas, isotipo y reactividad del kit ALOT.**

**Las descripciones de los marcadores del kit ALOT son las siguientes:**

CD45	Se encuentra en linfocitos, monocitos, granulocitos y eosinófilos por lo que se considera un marcador leucocitario, es un importante marcador en la identificación de células presentes en Leucemia aguda.
CD34	Marcador de inmadurez y se expresa en gran cantidad de leucemias agudas independientemente del linaje.
CyCD3	Marcador de linaje específico expresado en las etapas tempranas de maduración de los linfocitos T. (Marcador intracitoplasmático)
SmCD3	Marcador de madurez del linaje T.
CD7	Marcador de linaje T también presente en Leucemia Mieloide Aguda, como marcador aberrante
CD19	Marcador para linaje B, se expresa en etapas tempranas de las células B y en todos los casos de Leucemia Aguda de estirpe B.
CyMPO	Marcador intracelular específico de la estirpe Mieloide en fases tempranas de la maduración. (Marcador intracitoplasmático)
CyCD79a	Marcador de linaje B (Marcador intracitoplasmático)

## **B-cell precursor ALL (BCP-ALL) o KIT PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LEUCEMIA AGUDA LINFOIDE DE PRECURSORES B <sup>4</sup>**

El kit BCP-ALL se utiliza si se sospecha de una leucemia de linaje linfoide y estirpe B, en el kit ALOT (Figura 2) mediante la presencia de marcadores de estirpe B como CD79+ Y CD19+. El objetivo es el reconocimiento y clasificación entre la Leucemia Linfoide de estirpe B (pro-B, Leucemia Linfoide común y pre-B) o algunas clasificaciones alternativas que incluyen clasificaciones inmunofenotípicas asociadas a aberraciones moleculares bien definidas por la presencia de genes de fusión. La información obtenida mediante el uso de este tubo BCP-ALL necesita complementarse con el tubo ALOT previamente descrito, basado en los marcadores troncales CD45, CD34 y CD19 y el software INFINICYT. <sup>4</sup>

El Panel consiste de 4 tubos para la identificación y clasificación de Leucemias Agudas Linfoides de Estirpe B y consiste en la identificación de los marcadores que se muestran en la siguiente tabla:<sup>4</sup>

PANEL DE CLASIFICACIÓN MULTITUBO DE LLA ESTIRPE B POR EUROFLOW									
TUBO	PACIFIC BLUE	PACIFIC ORANGE	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7	OBJETIVO
1	CD20	CD45	CD58	CD66c	CD34	CD19	CD10	CD38	Diagnóstico y clasificación de BCP-LLA; Detección de marcadores asociados a aberraciones moleculares.
2	smlgk	CD45	cylgm	CD33	CD34	CD19	smlgm y CD117	smlgL	
3	CD9	CD45	nuTdT	CD13	CD34	CD19	CD22	CD24	
4	CD21	CD45	CD15 y CDw65	NG2	CD34	CD19	CD123	CD81	

**Tabla 4: Panel de Anticuerpos utilizados en el kit BCP-LLA**

#### **T-LLA o KIT PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LEUCEMIA AGUDA LINFOIDE DE ESTIRPE T <sup>4</sup>**

Cuando se sospecha de Leucemia Linfocítica Aguda de estirpe T se utiliza el panel T-ALL que consiste en 4 tubos y utiliza cyCD3, CD45, y smCD3 como marcadores comunes. El panel tiene como objetivo el reconocimiento y clasificación de las Leucemias Linfocíticas de estirpe T (Inmadura, timocítica común y madura) o la clasificación alternativa por ejemplo: la expresión de ciertas proteínas como cyTCR $\beta$ , TCR $\alpha\beta$  o TCR $\gamma\delta$ , así como la asociación con aberraciones moleculares.<sup>4</sup>

La información obtenida mediante el uso de este tubo T-LLA necesita complementarse con el tubo ALOT previamente descrito, basado en los marcadores comunes CD45, CD3 y cyCD3 y el software INFINICYT.

El Panel consiste de 4 tubos para la identificación y clasificación de Leucemias Agudas Linfoides de Estirpe T y consiste en la identificación de los marcadores que se muestran en la siguiente tabla: <sup>5</sup>

PANEL DE CLASIFICACIÓN MULTITUBO DE LLA ESTIRPE T POR EUROFLOW									
TUBO	PACIFIC BLUE	PACIFIC ORANGE	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7	OBJETIVO
1	cyCD3	CD45	nuTdT	CD99	CD5	CD10	CD1a	smCD3	Diagnóstico y clasificación estado de maduración y subclasificación de LLA-T
2	cyCD3	CD45	CD2	CD117	CD4	CD8	CD7	smCD3	
3	cyCD3	CD45	TCRgd	TCRab	CD33	CD56	cyTCRb	smCD3	
4	cyCD3	CD45	CD44	CD13	HLADR	CD45RA	CD123	smCD3	

**Tabla 4: Panel de Anticuerpos utilizados en el kit T-LLA**

#### **KIT PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LEUCEMIA AGUDA MIELOIDE Y SINDROME MIELODISPLÁSICO<sup>4</sup>**

El panel de Euroflow para el diagnóstico de Leucemia Mieloide Aguda y Síndrome Mielodisplásico consiste en 3 combinaciones complementarias de marcadores, y todos contienen HLA-DR, CD45, CD34 y CD117 como marcadores comunes.<sup>4</sup>

El primer set de tubos tiene como objetivo la detección y clasificación (asignación de linaje y maduración) de las neoplasias mieloides tales como Leucemia Aguda Mieloide y Síndrome Mielodisplásico, con mayor enfoque al linaje neutrofílico inmaduro (tubo 1), linaje monocítico (tubo 2), linaje eritroide (tubo 3) y expresión aberrante de marcadores linfoides (tubo 4). En caso de sospecha de Leucemia Mieloide Aguda se deben utilizar en combinación con el tubo ALOT. <sup>4</sup>

El segundo set de tubos (5 y 6) deben utilizarse en conjunto con los tubos 1 y 4 y el ALOT, brinda información acerca de linaje megacariocítico, basofílico y dendrítico así como información adicional acerca del desarrollo monocítico y mieloide o fenotipos aberrantes. <sup>4</sup>

El tubo 7 debe usarse en conjunto con el tubo 1-6 y ALOT si se sospecha de leucemia megacariocítica. También se puede utilizar para detectar mastocitosis en asociación con Leucemia Mieloide Aguda y Síndrome Mielodisplásico <sup>4</sup>

PANEL DE CLASIFICACIÓN MULTITUBO DE LMA/SMD POR EUROFLOW									
TUBO	PACIFIC BLUE	PACIFIC ORANGE	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7	OBJETIVO
<b>LMA/SMD</b>									
1	HLA DR	CD45	CD16	CD13	CD34	CD117	CD11b	CD10	Diagnóstico y subclasificación de LMA Y HPN especialmente de linaje neutrófilo
2	HLA DR	CD45	CD35	CD64	CD34	CD117	IREM2	CD14	Diagnóstico y subclasificación de LMA y HPN especialmente de linaje monocítico
3	HLA DR	CD45	CD36	CD105	CD34	CD117	CD33	CD71	Diagnóstico y subclasificación de LMA especialmente de linaje eritroide
4	HLA DR	CD45	nu Ydt	CD56	CD34	CD117	CD7	CD19	Expresión aberrante de marcadores linfoides.
<b>LMA</b>									
5	HLA DR	CD45	CD15	NG2	CD34	CD117	CD22	CD38	Expresión aberrante de marcadores, detección de células troncales.
6	HLA DR	CD45	CD42 y CD61	CD203c	CD34	CD117	CD123	CD4	Diagnóstico y subclasificación de LMA especialmente de linaje megacariocítico, basófilo, y dendrítico
<b>LMA-M7</b>									
7	HLA DR	CD45	CD41	CD25	CD34	CD117	CD42b	CD9	Caracterización de LMA-M7, o mastocitosis.

**Tabla 5: Panel de Anticuerpos utilizados en el kit multitubo LMA/SMD**

## **ESPECIFICACIONES DEL EQUIPO UTILIZADO EN EL PROTOCOLO:**

### **EQUIPO BD FACS™ CANTO II**

Se trata de un citómetro de flujo de la marca Beckton Dickinson, pionera de la citometría de flujo desde hace 25 años, que ha demostrado precisión y exactitud en su análisis, así como en la emisión de resultados. Puede ser configurado con dos o tres láser para detectar hasta 8 colores. (Figura 3). Presenta algunas innovaciones con respecto a los equipos anteriores, como en el sistema de flúidos con una nueva alineación en el flujo celular para minimizar el tiempo de encendido y mejorar la reproducibilidad. Así como mejoras en el sistema óptico que maximiza la detección de las señales emitidas, disminuir el ruido en la prueba, y aumentar la sensibilidad y resolución por cada color en los ensayos multicolores. 5



**Figura 3: EQUIPO BD FACS™ CANTO II**

El Sistema óptico consiste en una fuente de luz con 3 láseres; uno azul (488-nm), uno rojo (633nm) y otro violeta (405 nm). Los cuales iluminan las células en la muestra, mientras que los recolectores dirigen el haz de luz así como las señales fluorescentes hacia los filtros y los receptores. En la figura 4 se describen las características del sistema óptico de equipo BD FACSCanto II. <sup>5</sup>

Instrument	Laser	Excitation Laser Line (nm)	Fluorescence Channel	Fluorochromes provided by BD Biosciences			
BD FACSCanto II flow cytometry system	Solid State (L1)	488	Green	FITC	Alexa Fluor® 488		
			Yellow	PE	PI		
			Orange	BD Horizon™ PE-CF594	PE-Texas Red®		
			Red	7-AAD	PE-Cy™5	PerCP	PerCP-Cy™5.5
			Infrared	PE-Cy™7			
	HeNe (L2)	633	Red	APC	Alexa Fluor® 647		
			Far Red	Alexa Fluor® 700			
			Infrared	BD APC-H7	APC-Cy7		
	Violet (L3)	405	Green	BD Horizon™ V500	AmCyan		
			Blue	Brilliant Violet™ 421	BD Horizon™ V450	VPD450	Pacific Blue™

Figura 4: Características del sistema óptico del Equipo BD Facs Canto: En la primera columna se muestra el nombre del instrumento BD FACSCanto II , En la segunda columna el láser, en la tercera columna la Longitud de onda del Laser en nanómetros, en la cuarta columna el canal de fluorescencia, y en las últimas 4 columnas los fluorocromos utilizados respectivamente. <sup>5</sup>

Algunas otras características incluyen el aumento en el nivel de automatización y de control de calidad para reducir los errores operador-dependientes y aumentar los niveles de confiabilidad. Así como el software acoplado al equipo , que permite el análisis de resultados y de control de calidad, mediante las especificaciones incluidas en este, como el uso de

Gráficos de Levey-Jennings para el monitoreo del desempeño del citómetro así como parte de la evaluación del control de calidad interno. Se pueden realizar ajustes automáticamente para asegurar la integridad en los datos y resultados reproducibles inter día e inter prueba. <sup>5</sup>

## **SOFTWARE INFINICYT.**

El software Infinicyt™ version 1.8 y el Database Connector son las herramientas utilizadas para el análisis de los datos obtenidos por la citometría de flujo, se encuentra avalado por el Consorcio Euroflow; y cuenta con conexión a la base de datos de EuroFlow™: las cuales se encuentran clasificadas en orientativas, paneles de clasificación y monitoreo.

Y cuenta con las siguientes especificaciones técnicas: Puede ser instalado en una computadora con sistema operativo Microsoft®: Windows 10®, Windows 8® or Windows 7®. <sup>5</sup>

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

### **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿La implementación de nuevos algoritmos con la plataforma de Euroflow son útiles y necesarios para el análisis adecuado en el estudio de los pacientes con leucemia aguda para el diagnóstico oportuno de las mismas?

### **OBJETIVO GENERAL**

Conocer la aplicación de los nuevos algoritmos diagnósticos en citometría de flujo con la plataforma de Euroflow en el estudio de los pacientes con Leucemia Aguda del HG CMNR en el período de Mayo 2017 a Febrero 2018.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

Conocer los inmunofenotipos presentes en los pacientes con Leucemias Agudas en el Hospital General CMN La Raza.

Evidenciar que el diagnóstico se realiza por medio de Citometría de Flujo.

## JUSTIFICACIÓN

Las leucemias agudas constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades hematológicas con diferencias en la etiología, patogenia, historia natural y pronóstico, que se caracterizan por la proliferación clonal de las células progenitoras hematopoyéticas y se consideran como uno de los tipos de cáncer que se presentan con más frecuencia en niños a nivel nacional e internacional; su incidencia se estima entre 20 a 35 casos por cada millón de habitantes al año.<sup>22</sup> Sin embargo, en México, la incidencia es mayor. Se estima que ocurren 49.5 casos nuevos por millón de habitantes al año y representa aproximadamente la tercera parte de todos los casos de cáncer en niños menores de 15 años y la cuarta parte de los casos de cáncer que ocurren antes de los 20 años en particular la Leucemia Linfoblástica aguda. La clasificación de tumores hematopoyéticos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) propone una aproximación multiparamétrica al diagnóstico de las enfermedades, integrando datos clínicos, morfológicos, fenotípicos y citogenéticos característicos de cada entidad, para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento oportuno, dentro de la cual se incluye el estudio inmunofenotípico por citometría de flujo.

El análisis inmunofenotípico con ayuda de esta herramienta tiene como objetivo asignar el linaje de las diferentes subpoblaciones linfocitarias y en poblaciones donde se detectan células inmaduras y/o blastos para apoyar

al diagnóstico en las diferentes enfermedades hematológicas como las leucemias agudas.<sup>23</sup>

La citometría de flujo constituye la metodología de elección para el inmunofenotipaje de leucemias y de linfomas y contribuye enormemente a la investigación del origen celular de estas hemopatías, a su diagnóstico y clasificación y a la detección de enfermedad mínima residual. Entre sus aportaciones merece destacar la repercusión clínica que tiene la clasificación inmunológica de las Leucemias Linfoblásticas.

Las nuevas Plataformas internacionales en cuanto a Citometría de flujo multiparamétrica, ofrecen la implementación de procedimientos específicos, paneles de identificación con marcadores predeterminados, algoritmos diagnósticos para la determinación de linaje y software adaptado al equipo, proporcionando así la estandarización del inmunofenotipo por citometría de flujo en las Leucemias Agudas.

En particular la Plataforma propuesta por Euroflow fue propuesta en 2006 a nivel internacional, y ha sido implementada a partir de mayo de 2017 en el Laboratorio de Hematología Especial de la Unidad Médica de Alta Especialidad del Centro Médico La Raza, para la determinación del inmunofenotipo y Enfermedad Mínima Residual de los pacientes con diagnóstico *de novo* de Leucemias Agudas. Por lo cual surge la necesidad de analizar la experiencia de la implementación de la plataforma en el

análisis del inmunofenotipo en nuestra población con el fin de identificar su utilidad en el diagnóstico de las leucemias agudas. Y con ello enfatizar la necesidad del uso de una plataforma estandarizada en las unidades donde se realice diagnóstico y clasificación de Leucemias Agudas.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **TIPO DE ESTUDIO**

Estudio Retrospectivo, transversal, descriptivo, observacional.

### **POBLACIÓN**

Resultados de inmunofenotipos de pacientes de recién diagnóstico con Leucemias Agudas del HG CMNR obtenidos durante el período de mayo de 2017 a febrero de 2018 en el Servicio de Hematología Especial del Laboratorio Central

## **SELECCIÓN DE LA MUESTRA**

Tamaño: Se incluyeron a todos los pacientes que fueron enviados para el análisis del inmunofenotipo con diagnóstico clínico y morfológico de Leucemia Aguda al laboratorio de Hematología Especial en el periodo de estudio.

Grupo de estudio: Pacientes de 0 a 17 años y de ambos sexos con diagnóstico clínico y morfológico de Leucemia Aguda en el periodo de estudio antes mencionado.

### **CRITERIOS DE SELECCIÓN DE MUESTRAS**

#### **CRITERIOS DE INCLUSIÓN.**

Se incluyeron al estudio si cumplen con los siguientes requisitos:

Edad: 0 a 17 años.

Pacientes del Hospital General CMN La Raza

Inmunofenotipo compatible con Diagnóstico de Leucemia Aguda de recién diagnóstico

#### **CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

Son mayores de 17 años.

Pertenecen a otro centro hospitalario.

Se trata de una Leucemia recurrente o previamente diagnosticada.

## DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES

### LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE ESTIRPE B.

Definición conceptual: proliferación neoplásica de células hematopoyéticas en estirpe linfoide de tipo B con posterior proliferación y expansión, cuya acumulación se acompaña de una disminución del tejido hematopoyético normal en médula ósea y posterior invasión de sangre periférica y otros tejidos. Cumple criterios morfológicos, clínicos, citogenéticos y de inmunofenotipo correspondientes a Leucemia Linfoblástica aguda de precursores de célula B según la clasificación de la OMS.

Indicador: SI, NO

Escala de medición: nominal

Definición operacional: Presencia de los marcadores de estirpe B en la muestra de aspirado de médula ósea analizada mediante Citometría de flujo multiparamétrica con la plataforma Euroflow KIT ALOT: CD34+, CD45+. CD19+ CD79a+, CD3cyt -, CD3 memb -, CD7 -, MPO -.

Con el kit de LLA B el siguiente inmunofenotipo:

LINAJE		ESTADIO	EXPRESIÓN FENOTÍPICA
LINEA B	Precursor B CD19+, CD22+, CD79a+, HLA DR +	ProB	CD 10 -, CD 34++, CD 20-, TdT ++
		Común	CD10+++ , CD34+, CD 20-/+, Cadena $\mu$ -, TdT++
		Pre B	CD10+, CD34-, CD 20+, Cadena $\mu$ +, TdT ++
	Madura B	CD 20+, TdT-, CD10+, CD 34- K+ o $\lambda$ +	

Indicador: Positivo (+), Negativo (-) Bright, Low.

Escala de medición: nominal

## **LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE PRECURSORES DE CÉLULA T.**

Definición conceptual: proliferación neoplásica de células hematopoyéticas en estirpe linfóide de tipo T con posterior proliferación y expansión, cuya acumulación se acompaña de una disminución del tejido hematopoyético normal en médula ósea y posterior invasión de sangre periférica y otros tejidos. Cumple criterios morfológicos, clínicos, citogenéticos y de inmunofenotipo correspondientes a Leucemia Linfoblástica aguda de célula T según la clasificación de la OMS.

Indicador: SI, NO

Escala de medición: nominal

Definición operacional: Presencia de los marcadores de estirpe T en la muestra de aspirado de médula ósea analizada mediante Citometría de flujo multiparamétrica con la plataforma Euroflow KIT ALOT: CD34+, CD45+. CD19- CD79a-, CD3cyt+, CD3 memb +, CD7 +, MPO -.

Con el kit de LLA T el siguiente inmunofenotipo:

LINEA T	Precursor T CD7++, CD3c+, CD3m -/+ débil	Pro T (T1)	CD2-, CD5-, CD8-, CD4-, TDT++, CD 34+/-
		Early T	CD5+, débil CD8-, CD1a-, CD2- , TDT +
		Pre T (TII)	CD2+ y/o CD5+, y/o CD8+, CD1a-, mCD3-
		Intermedia o cortical T (TIII)	
	Madura T (T IV) CD7++, CD3c+, CD3m+	Madura T	CD3m+, CD1a-, TCR αβ+ o TCR γδ+

Indicador: Positivo (+), Negativo (-) Bright, Low.

Escala de medición: nominal

## LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

Definición conceptual: proliferación neoplásica de células hematopoyéticas en estirpe Mieloide con posterior proliferación y expansión, cuya acumulación se acompaña de una disminución del tejido hematopoyético normal en médula ósea y posterior invasión de sangre periférica y otros tejidos. Cumple criterios morfológicos, clínicos, citogenéticos y de

inmunofenotipo correspondientes a Leucemias Mieloides Agudas según la clasificación de la OMS

Indicador: SI, NO

Escala de medición: nominal

Definición operacional: Presencia de los marcadores de estirpe mieloide en la muestra de aspirado de médula ósea analizada mediante Citometría de flujo multiparamétrica con la plataforma Euroflow. KIT ALOT: CD34+, CD45+. CD19- CD79a-, CD3cyt-, CD3 memb-, CD7 -, MPO +

Con el kit de LMA el siguiente inmunofenotipo:

LMA MPO +	Precursor	CD34+, CD38+, CD117+, CD133+, HLA DR+, C 45+
	Mielocítico Monocítico	CD13+, CD15+, CD16+, CD33+, CD65+, MPOc+, CD11c+, CD14+, CD64+, lisozima+, CD4+, CD11b, CD36, IREM2+
	Megacariocítico	CD41+, CD61+, CD42+
	Eritroide	CD235+, CD71+, CD105+, CD36+
	Basófilo, mastocito y dendrítica plasmocitoide	CD123+, CD203+, CD22+

Indicador: Positivo (+), Negativo (-) Bright, Low.

Escala de medición: nominal

## **LEUCEMIA BIFENOTÍPICA O DE LINAJE MIXTO**

Definición conceptual: proliferación neoplásica de células hematopoyéticas poco común y con escasa diferenciación que posee características de ambos linajes: linfoides y mieloides con posterior proliferación y expansión, cuya acumulación se acompaña de una disminución del tejido hematopoyético normal en médula ósea y posterior invasión de sangre periférica y otros tejidos.

Indicador: SI, NO

Escala de medición: nominal

Definición operacional: Presencia de los siguientes marcadores aberrantes específicos: marcador CD3 citoplásmico en el caso de células T, y la expresión de Mieloperoxidasa (MPO) y con antígenos de diferenciación monocitoide en la muestra de aspirado de médula ósea analizada mediante Citometría de flujo multiparamétrica con la plataforma Euroflow.

Indicador: Positivo (+), Negativo (-) Bright, Low.

Escala de medición: nominal

## **DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO**

El estudio se realizó en el Hospital General del CMNR por el IMSS, en la Ciudad de México D.F. por la tesista médico residente de patología clínica bajo la colaboración, supervisión y apoyo de los asesores comentados previamente, después de la autorización del proyecto de investigación por el Comité Local de Investigación, CLIEIS.

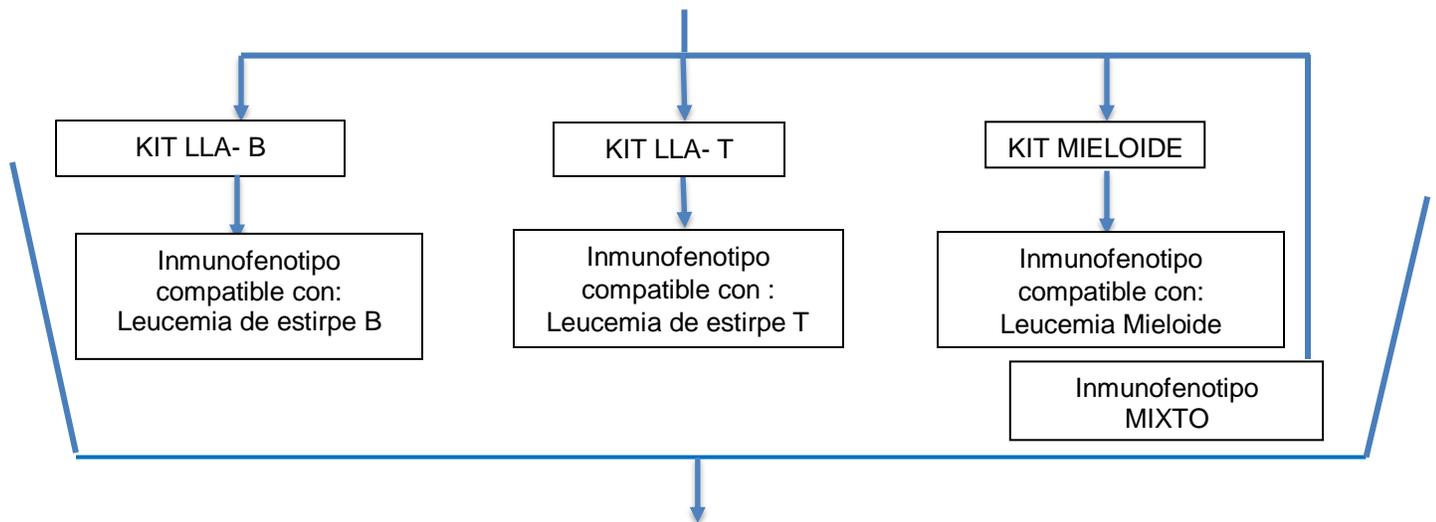
A continuación, se redacta la manera en que se trabajó con los métodos en el laboratorio clínico del HGCMN La Raza.

## FLUJOGRAMA DE TRABAJO

RECEPCIÓN DE ASPIRADO DE MÉDULA ÓSEA CON SOSPECHA DE LEUCEMIA AGUDA

↓  
OBTENCIÓN DE INMUNOFENOTIPO CON LA PLATAFORMA DE EUROFLOW Y ANÁLISIS EN SOFTWARE INFINICYT CON EL KIT ALOT

↓  
OBTENCIÓN DE INMUNOFENOTIPO CON LA PLATAFORMA DE EUROFLOW Y ANÁLISIS EN SOFTWARE INFINICYT PARA DETERMINAR ESTIRPE DE ACUERDO AL RESULTADO OBTENIDO.

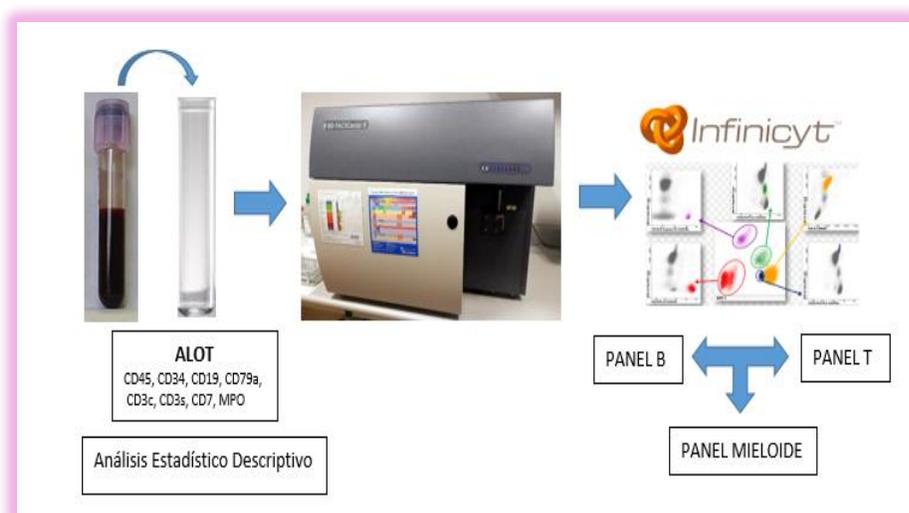


EMISIÓN DE RESULTADO INDICANDO LOS MARCADORES PRESENTES Y SU INTENSIDAD, LOS MARCADORES NEGATIVOS, LOS KITS MONTADOS A LA MUESTRA, Y LA ESTIRPE CORRESPONDIENTE DE ACUERDO AL INMUNOFENOTIPO OBTENIDO DE LA POBLACIÓN CELULAR ANALIZADA.

↓  
CLASIFICACIÓN DE LA LEUCEMIA DE ACUERDO AL INMUNOFENOTIPO  
(Clasificación inmunológica de las Leucemias Agudas)

## MÉTODOS DE CITOMETRÍA DE FLUJO

1. Recepción de Aspirado de médula ósea con Diagnóstico de Leucemia Aguda.
2. Determinación del inmunofenotipo en la muestra de médula ósea mediante el Citómetro de Flujo Facs Canto II BD con la plataforma de Euroflow kit ALOT.
3. Análisis de los escatogramas en el software Infinicyt.
- 4.- Determinación de la estirpe de acuerdo al resultado del kit ALOT.
- 5.- Determinación del inmunofenotipo en la muestra de médula ósea mediante el Citómetro de Flujo Facs Canto II BD con la plataforma de Euroflow kit LLA B, kit LLA T o KIT mieloide.
- 6.- Análisis de los escatogramas en el software Infinicyt.
- 7.- Confirmación de la estirpe celular.
- 8.- Clasificación de la Leucemia Aguda según el inmunofenotipo (Clasificación inmunológica de las Leucemias Agudas)



## **1.- RECEPCIÓN DE ASPIRADO DE MÉDULA ÓSEA CON DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIA AGUDA.**

En el laboratorio de Hematología Especial recibir la solicitud y muestra de Aspirado de Médula Ósea con diagnóstico clínico y morfológico de Leucemia Aguda

## **2.- DETERMINACIÓN DEL INMUNOFENOTIPO EN LA MUESTRA DE MÉDULA ÓSEA MEDIANTE EL CITÓMETRO DE FLUJO FACS CANTO II BD CON LA PLATAFORMA DE EUROFLOW KIT ALOT**

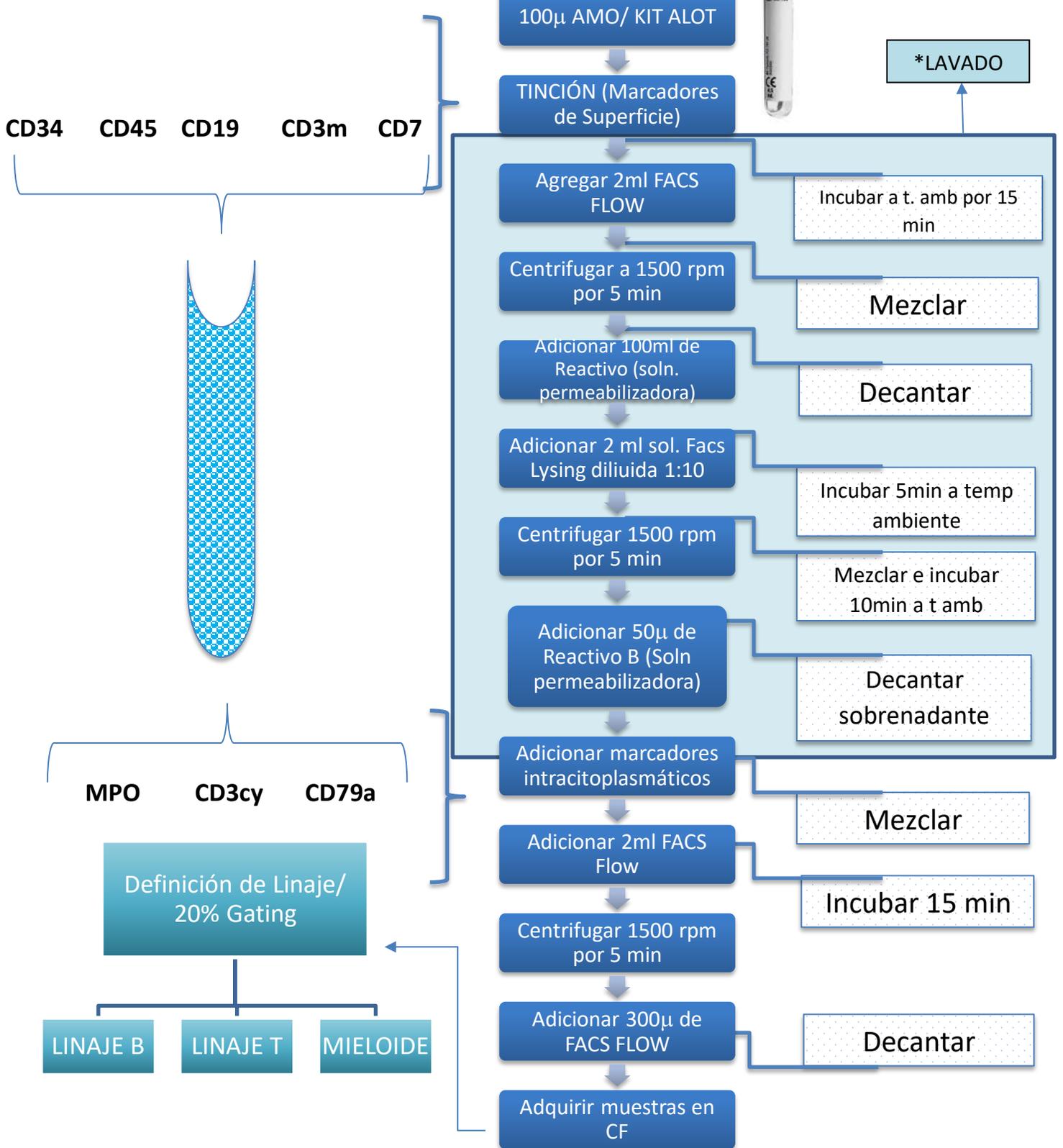
La obtención de muestra se debe hacer de forma aséptica por punción en un tubo estéril de recolección que contenga un anticoagulante apropiado (se recomienda el uso de EDTA). Almacenar las muestras sanguíneas entre 18-22°C hasta su procesamiento. El procedimiento incluye adicionar el volumen correspondiente del tubo ALOT de cada marcador de superficie: 5  $\mu$  de CD3 citoplasmático, 5 $\mu$  de CD45, 10 $\mu$  de MPO citoplasmática, 10 $\mu$  de CD79a citoplasmático, 7 $\mu$  de CD 34, 5 $\mu$  de CD19, 5 $\mu$  de CD7. 3 $\mu$  de CD3 de superficie. En caso de ser necesario adicionar la cantidad necesaria de PBS para completar el volumen final a 100 $\mu$  por tubo. Mezclar bien. Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente y protegidos de la luz. Adicionar 2 ml de PBS al pellet de células. Mezclar bien. Centrifugar 5 minutos a 540 g. Descartar el sobrenadante utilizando una pipeta Pasteur o sistema de vacío, sin levantar el Pellet. Resuspender el pellet mezclando gentilmente. Adicionar 100 $\mu$  del reactivo A (solución de permeabilización; BD intrasure

kit). Incubar por 5 minutos a temperatura ambiente protegidos de la luz. Adicionar 2 ml de la solución FACSLysing 1X (FACSLysing 10X se diluye; Dilución 1/10 en agua destilada). Mezclar bien. Incubar 10 min a temperatura ambiente y protegidos de la luz. Centrifugar 5 min a 540 g. Descartar el sobrenadante utilizando una pipeta Pasteur o sistema de vacío, sin levantar el Pellet. Mezclar gentilmente. Agregar 50 $\mu$  del Reactivo B (Solución de permeabilización; BD Intrasure kit). Mezclar bien. Incubar por 15 min a temperatura ambiente y protegidos de la luz. Adicionar 2 ml de PBS al pellet celular. Mezclar bien. Centrifugar 5 min a 540 g. Descartar el sobrenadante utilizando una pipeta Pasteur o sistema de vacío sin levantar el Pellet. Mezclar bien. Resuspender el pellet en 200 $\mu$  de PBS. Adquirir las células preferentemente de manera inmediata después de la tinción, o conservarlas a 4C máximo por 1 hora hasta ser adquiridas en el citómetro de flujo.

### **3.- ANÁLISIS DE LOS ESCATOGRAMAS EN EL SOFTWARE INFINICYT.**

Se emplea el Software INFINICYT para el análisis de las muestras. Primero se deben seleccionar los blastos mediante el patrón de expresión característico de CD34 y CD45; a continuación se seleccionarán el resto de las poblaciones celulares con ayuda de los marcadores específicos de línea (CyMPO para línea mieloide; CyCD3, SmCD3 y CD7 para línea linfoide T; CD19 y CyCD79a para línea linfoide B)

# FLUJOGRAMA ALOT



#### **4. SE DETERMINARÁ LA ESTIRPE DE ACUERDO AL RESULTADO DEL KIT ALOT.**

Se indicará si se sospecha de una leucemia de Linaje Linfoide B, Linfoide T, Mieloide o Bifenotípica.

#### **5.-DETERMINACIÓN DEL INMUNOFENOTIPO EN LA MUESTRA DE MÉDULA ÓSEA MEDIANTE EL CITÓMETRO DE FLUJO FACS CANTO II BD CON LA PLATAFORMA DE EUROFLOW KIT LLA B, KIT LLA T O KIT MIELOIDE.**

##### **KIT LLA B**

Para la confirmación de una Leucemia Linfoblástica de estirpe B es necesario realizar el Protocolo de Procedimientos propuesto por la Plataforma.

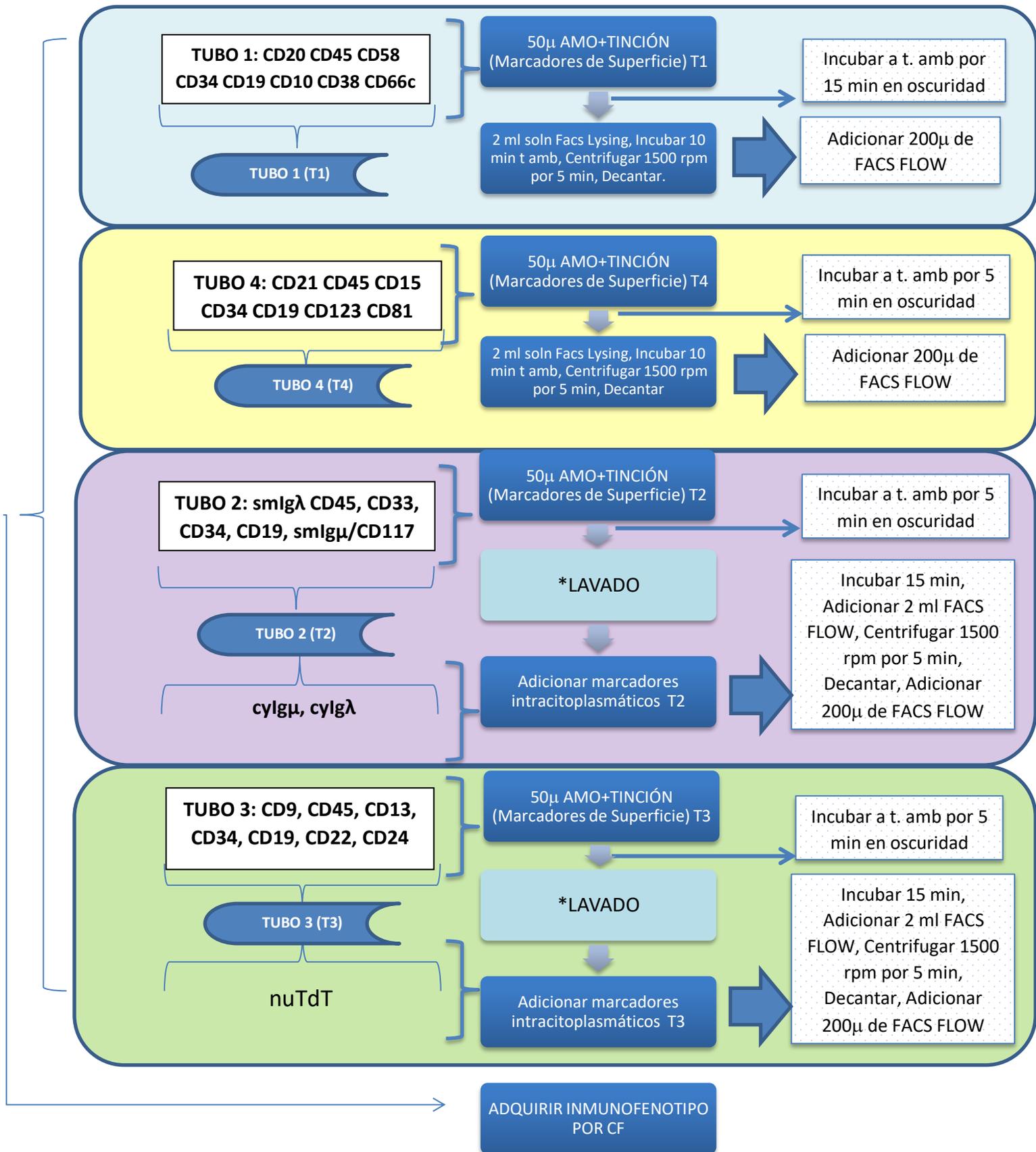
##### **KIT LLA T**

Para la confirmación de una Leucemia Linfoblástica de estirpe T es necesario realizar el Protocolo de Procedimientos propuesto por la Plataforma.

##### **KIT LMA**

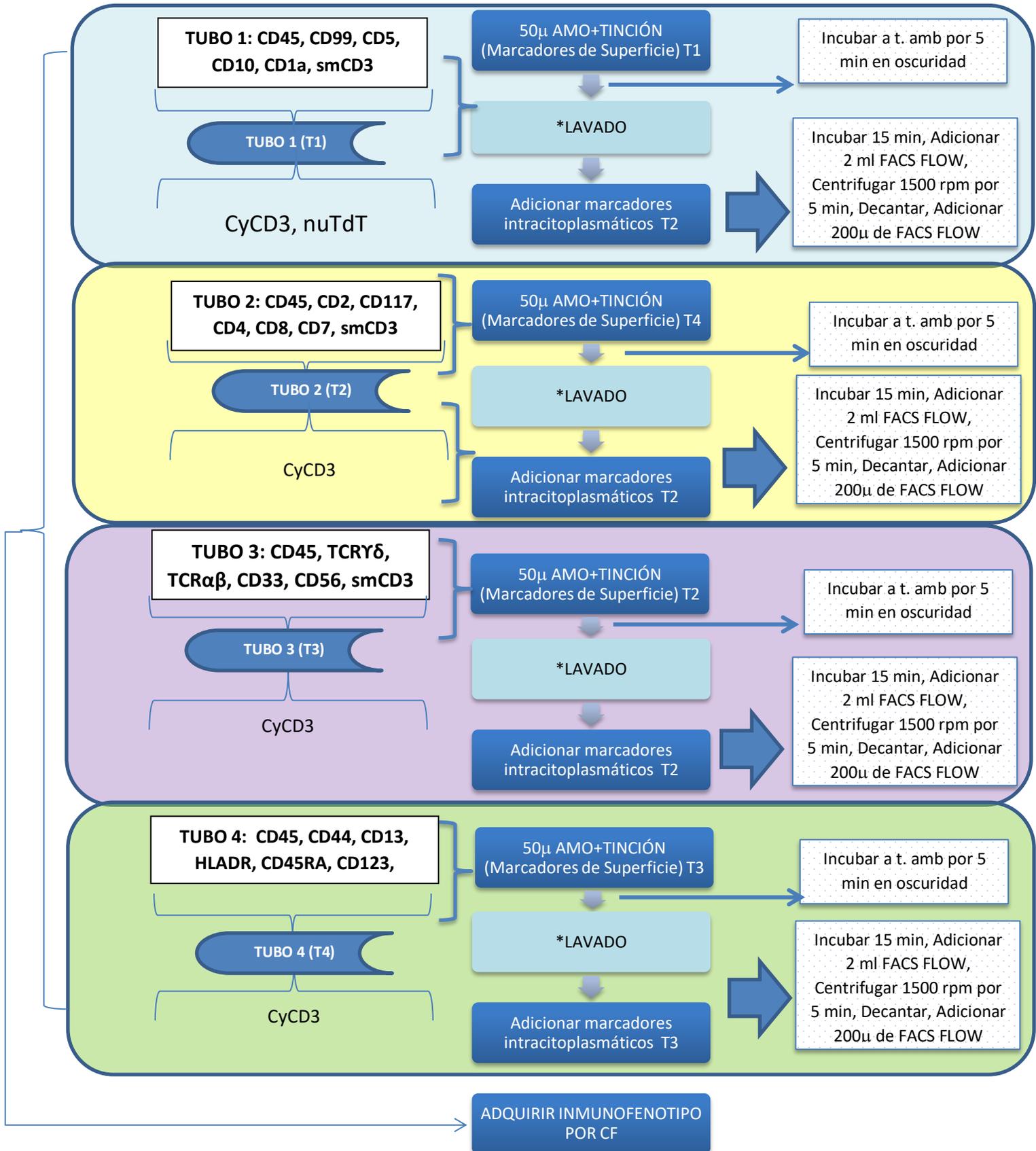
Para la confirmación de una Leucemia Mieloblástica es necesario realizar el Protocolo de Procedimientos propuesto por la Plataforma.

# FLUJOGRAMA PANEL LLA B



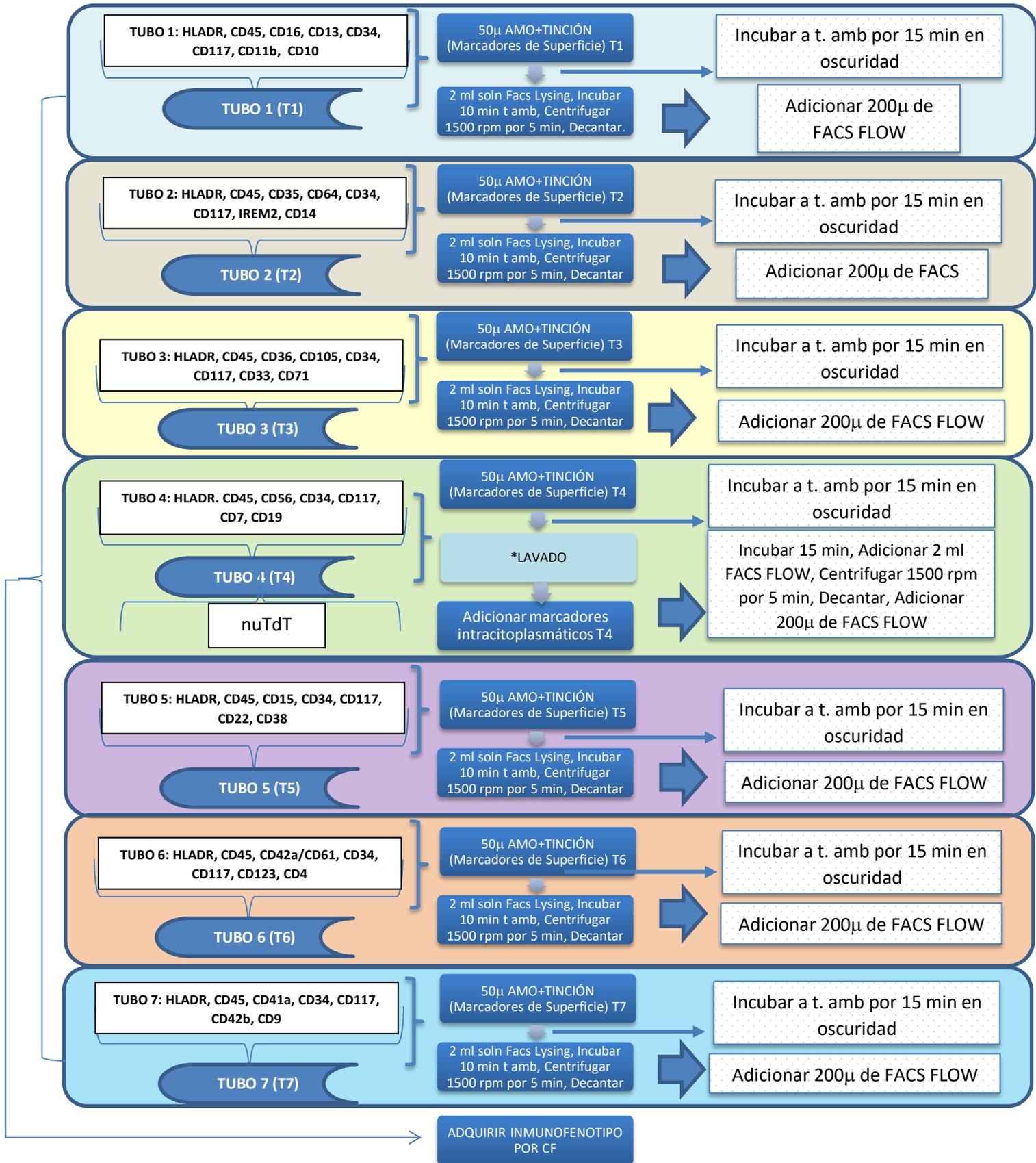


## FLUJOGRAMA PANEL LLA T





# FLUJOGRAMA PANEL MIELOIDE



## **6.- ANÁLISIS DE LOS ESCATOGRAMAS EN EL SOFTWARE INFINICYT**

Se emplea el Software INFINICYT para el análisis de las muestras. Primero se deben seleccionar los blastos mediante el patrón de expresión característico de CD34 y CD45; a continuación se seleccionarán el resto de las poblaciones celulares con ayuda de los marcadores específicos de línea, dependiendo de la estirpe y el kit seleccionado.

## **7.- CONFIRMACIÓN DE LA ESTIRPE CELULAR**

El citometrista experimentado realiza el análisis de los datos obtenidos por citometría de flujo con la plataforma Euroflow y determina la estirpe celular de las clonas neoplásicas y emite un resultado indicando los marcadores presentes y su intensidad, los marcadores negativos, los kits montados a la muestra, y la estirpe correspondiente de acuerdo al inmunofenotipo obtenido.

## **8.- CLASIFICACIÓN DE LA LEUCEMIA AGUDA SEGÚN EL INMUNOFENOTIPO (CLASIFICACIÓN INMUNOLÓGICA DE LAS LEUCEMIAS AGUDAS)**

El resultado del análisis se emite indicando el inmunofenotipo de las clonas neoplásicas analizadas lo cual corresponde a la clasificación inmunológica de acuerdo a la siguiente tabla:

LINAJE		ESTADIO	EXPRESIÓN FENOTÍPICA	Considerar
LINEA B	Precursor B CD19+, CD22+, CD79a+, HLA DR +	ProB	CD 10 -, CD 34++, CD 20-, TdT ++	CD15, CD65, CD38, CD81
		Común	CD10+++ , CD34+, CD 20-/+ , Cadena $\mu$ -, TdT++	CD58, CD123, CD66c, CD38. CD81, CD11b, CD9, CD13, CD33, CD52, CD24, CD21
		Pre B	CD10+, CD34-, CD 20+, Cadena $\mu$ +, TdT ++	CD58, CD123, CD66c, CD38. CD81, CD11b, CD9, CD13, CD33, CD24, CD21
	Madura B	CD 20+, TdT-, CD10+, CD 34- K+ o $\lambda$ +	CD38 CD81 bcl2	
LINEA T	Precursor T CD7++, CD3c+, CD3m -/+ débil	Pro T (T1)	CD2-, CD5-, CD8-, CD4-, TdT++, CD 34+/-	CD44, CD127, CD10, CD45 RA, CD38, CD13, CD33, CD56, CD117
		Early T	CD5+, débil CD8-, CD1a-, CD2-, TdT +	
		Pre T (TII)	CD2+ y/o CD5+, y/o CD8+, CD1a-, mCD3-	
		Intermedia o cortical T (TIII)		
	Madura T (TIV) CD7++, CD3c+, CD3m+	Madura T	CD3m+, CD1a-, TCR $\alpha\beta$ + o TCR $\gamma\delta$ +	
MIELOIDE	LMA MPO +	Precursor	CD34+, CD38+, CD117+, CD133+, HLA DR+, C 45+	
		Mielocítico Monocítico	CD13+, CD15+, CD16+, CD33+, CD65+, MPOc+, CD11c+, CD14+, CD64+, lisozima+, CD4+, CD11b, CD36, IREM2+	
		Megacariocítico	CD41+, CD61+, CD42+	
		Eritroide	CD235+, CD71+, CD105+, CD36+	
		Basófilo, mastocito y dendrítica plasmocitoide	CD123+, CD203+, CD22+	

**Tabla 6: Clasificación inmunológica de las leucemias agudas. Se muestra el linaje, el Estadio de maduración, el inmunofenotipo correspondiente de acuerdo a los marcadores presentes y los marcadores a considerar.**

## ASPECTOS ÉTICOS

Conforme a la ley general de salud en el capítulo de investigación en el artículo 17, el grado de riesgo para el paciente en el estudio es Sin Riesgo, por lo que no se requiere consentimiento informado por escrito, debido a que se trabajará con resultados de Aspirado de Médula Ósea con diagnóstico clínico y morfológico de Leucemia Aguda. Por lo cual no existen implicaciones éticas para este estudio, ya que no se requiere interacción directa con el paciente.

La importancia de la realización de este estudio radicará en que se demostrarán los resultados obtenidos mediante la implementación de los protocolos de Estandarización de la Plataforma Euroflow, los cuales incluirán la estandarización en las especificaciones del instrumento, los procedimientos técnicos, los protocolos de tinción y el análisis de los datos como lo menciona T. Kalina y cols, en Leukemia 2012.<sup>1</sup> Debido a que el empleo de la estandarización ha permitido establecer paneles fijos de inmunotipificación en leucemias y algunas neoplasias de células hematopoyéticas incluidas las Leucemias agudas en pacientes pediátricos, mediante el uso de algoritmos que establecen y/o definen el linaje de las diferentes subpoblaciones celulares, apoyando al diagnóstico de las patologías hematológicas, de manera más certera, rápida y reproducible como lo establecen las evidencias a nivel internacional.<sup>1</sup> La estandarización

también permite la comparación de los resultados en otras instituciones donde se empleen los protocolos de Euroflow.

En el presente trabajo se empleó una combinación de anticuerpos monoclonales de diferentes linajes mediante el protocolo estandarizado de la plataforma Euroflow que incluye la utilización de diferentes paneles: 1. kit ALOT para la determinación de la estirpe celular, 2. El kit LLA B para determinar la clasificación inmunológica de las Leucemias Agudas de estirpe B, 3. El kit LLA T para determinar la clasificación inmunológica de las Leucemias Agudas de estirpe T, 4. El kit LMA que nos permite el estudio de la ontogenia de las poblaciones de neutrófilos, monocitos, eritrocitos, fenotipo aberrante, células progenitoras, células dendríticas, megacariocitos y basófilos como lo indica JJM van Dongen y cols, en Leukemia 2012<sup>4</sup>.

Lo anterior proporcionó una herramienta fundamental en el diagnóstico de Leucemias e incluso podrá sugerir la presencia de una alteración genética, por la existencia de marcadores aberrantes de diferentes linajes o estirpes; lo cual conferirá la oportunidad de clasificarlos de acuerdo al riesgo.

JJM van Dongen y cols. Leukemia 2012. Menciona que en la Leucemias Mieloides Agudas (LMA) con expresión de CD19, CD7 y CD56 sugiere la presencia de la t (8; 21).<sup>4</sup>

Deok-Hwan Yang. American Journal of Hematology 2007. Comentan que la expresión de CD56 en LMA ha sido asociada con manifestaciones extramedulares y resistencia al tratamiento.<sup>24</sup>

Djokic Miroslav y cols. En Haematologica 2009 menciona que la sobreexpresión de CD123 en las clonas blásticas de estirpe B indica la presencia de fenotipo aberrante y genotipo hiperdiploide, y adicionalmente representa un marcador de buen pronóstico; y además es de utilidad en el seguimiento y monitoreo de Enfermedad Mínima Residual.<sup>25</sup>

Nobutaka Kiyokawa y cols en. Leukemia Research en 2014. Analizaron a 696 pacientes pediátricos con diagnóstico de LLA de estirpe B con presencia del gen de fusión BCR-ABL y confirmaron la fuerte correlación de la presencia de este gen y el marcador CD66c así como la correlación entre este marcador y la presencia de hiperdiploidia y la mutación en CRLF2., lo cual en conjunto se considera como un factor pronóstico importante. <sup>26</sup>

Lo anterior demuestra la importancia y relevancia científica de la correcta implementación de una plataforma estandarizada con los diferentes paneles de Leucemias Agudas para el análisis en el inmunofenotipo de los pacientes pediátricos y adultos, y con ello se podrá otorgar un resultado más preciso, exacto, reproducible, y que permitirá realizar la complementación con los parámetros, clínicos, citoquímicos, citogenéticos y moleculares, tal como lo indica la Organización Mundial de la Salud.

Considerando que el equipo para la obtención del inmunofenotipo así como los insumos necesarios para su funcionamiento es una herramienta del Laboratorio Clínico del HG CMN LA RAZA obtenido a través de una licitación.

El presente estudio pretende beneficiar al estudio del paciente, complementando su diagnóstico, y obteniéndolo de manera más rápida, eficaz y reproducible, identificar la utilidad de la implementación de una plataforma estandarizada aplicada en la población pediátrica de la UMAE HG CMN LA RAZA con diagnóstico de Leucemia aguda. Además la no maleficencia ya que no se realizará alguna modificación intencionada en las variables de los pacientes que puedan influir en el diagnóstico o tratamiento, por lo que no conlleva daño directo ni indirecto. Y se realizará de manera justa ya que se tratarán los datos de cada paciente sin más ni menos atributos que los que su condición amerita, ya que los resultados de inmunofenotipo obtenidos para el estudio serán recolectados de los pacientes previamente estudiados y los cuales forman parte del protocolo del servicio de Hematología Pediátrica de la UMAE en el diagnóstico de Leucemias Agudas de novo.

## **RECURSOS HUMANOS Y FINANCIEROS**

El tesista, médico residente del 3er año de Patología Clínica del Hospital General del Centro Médico Nacional La Raza, realizó todos los procedimientos analíticos y de obtención de resultados en el laboratorio.

Se utilizaron las instalaciones del Hospital General del Centro Médico Nacional La Raza para su estudio.

## **UBICACIÓN ESPACIO-TEMPORAL**

El estudio se llevó a cabo en el servicio de laboratorio clínico del Hospital General del Centro Médico Nacional La Raza, en la sección de Hematología Especial con los resultados de inmunofenotipos de pacientes de recién diagnóstico con Leucemias Agudas del HG CMNR obtenidos durante el período de mayo de 2017 a febrero de 2018.

## CONSENTIMIENTO INFORMADO

El presente trabajo corresponde a una investigación sin riesgo para el paciente con base en el artículo 17 de la Ley Federal de Salud, Título Segundo, capítulo 1 “De los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos”. En materia de investigación para la salud en nuestro país, debido a que solo se revisarán resultados de inmunofenotipo de los pacientes pediátricos con Leucemia Aguda, no implica riesgo para ellos, por lo que es categoría I, es una investigación sin riesgo, y se mantendrá la confidencialidad de los pacientes pediátricos.

Entendiéndose por Investigación sin riesgo: “estudios que emplean técnicas y métodos de investigación documental retrospectivos y aquéllos en los que no se realiza ninguna intervención o modificación intencionada en las variables fisiológicas, psicológicas y sociales de los individuos que participan en el estudio, entre los que se consideran: cuestionarios, entrevistas, revisión de expedientes clínicos y otros, en los que no se le identifique ni se traten aspectos sensitivos de su conducta”.<sup>21</sup>

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

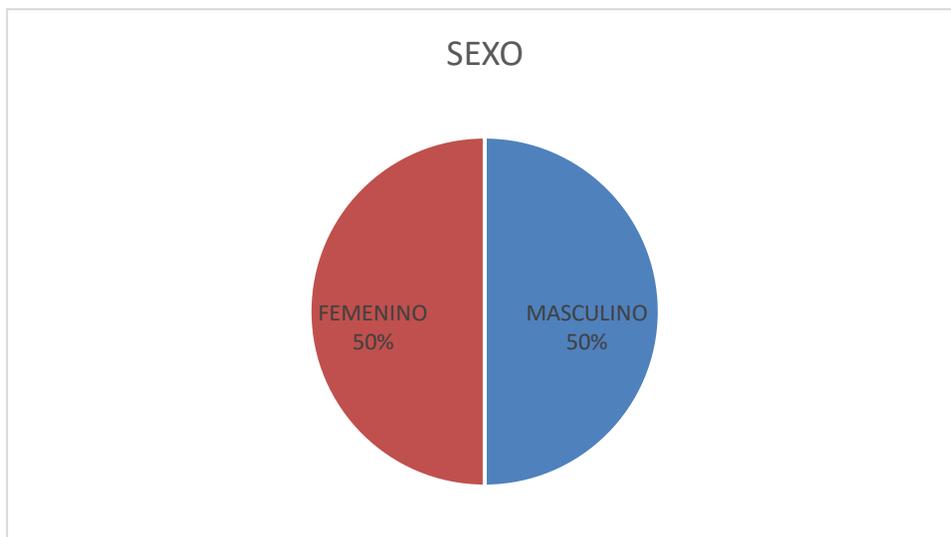
Para describir las características generales de los grupos se empleó estadística descriptiva.

### CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

CRONOGRAMA DE TRABAJO MENSUAL 2018-2019													
ACTIVIDAD	2018												2019
	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC	ENE
Recopilación y creación de base de datos	X	X											
Elaboración del marco teórico	X	X	X	X									
Elaboración de escrito de Protocolo				X	X	X	X	X					
Presentación al comité de Ética								X					
Envío de protocolo al SIRELCIS								X	X	X	X	X	X
Presentación al comité de Investigación CLIEIS								X	X	X	X	X	X
Análisis estadísticos								X	X	X	X		
Análisis de resultados									X	X	X		
Elaboración de Tesis									X	X	X	X	X

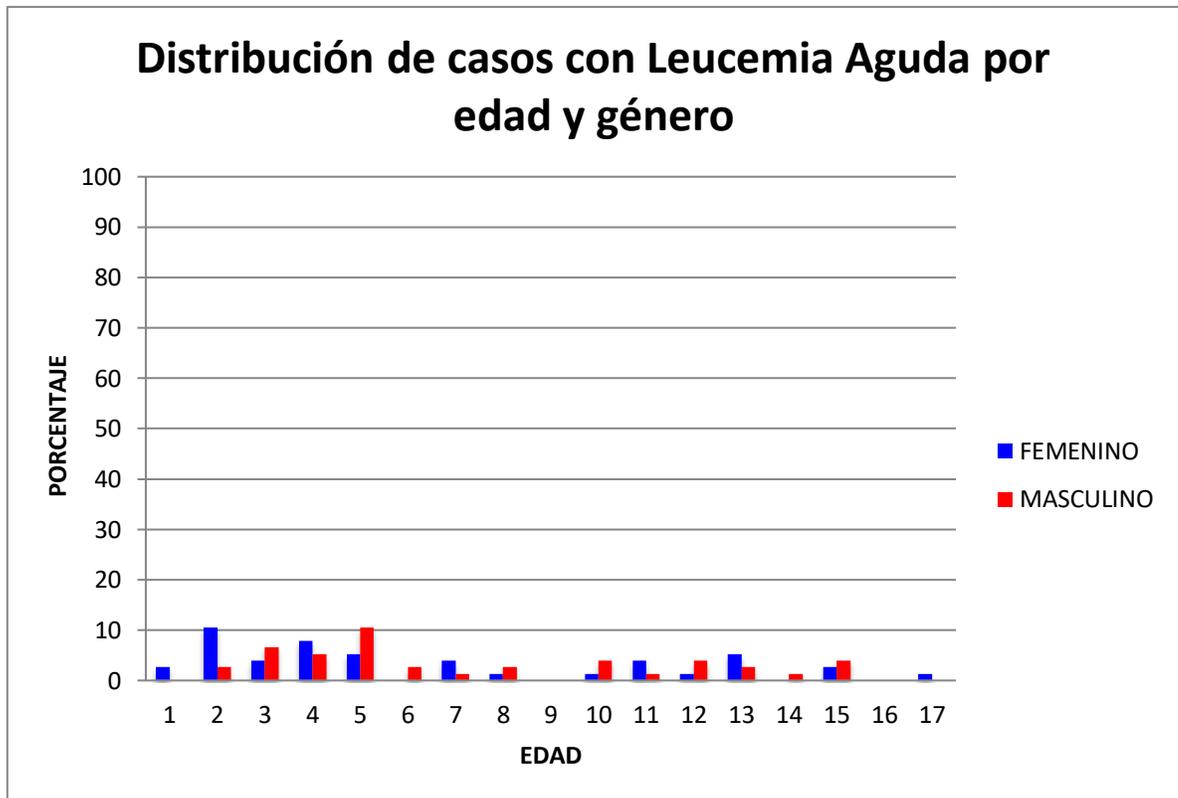
## RESULTADOS

Durante el período de mayo de 2017 a febrero de 2018 en el Servicio de Hematología Especial del Laboratorio Central se analizaron 76 muestras de médula ósea obtenidas mediante aspirado a pacientes con diagnóstico de Leucemia Aguda por el servicio de Hematología pediátrica, para obtener el Inmunofenotipo inicial al diagnóstico. De los cuales 38 pertenecen al género masculino (50%) y 38 al femenino (50%) como lo demuestra el gráfico 1.



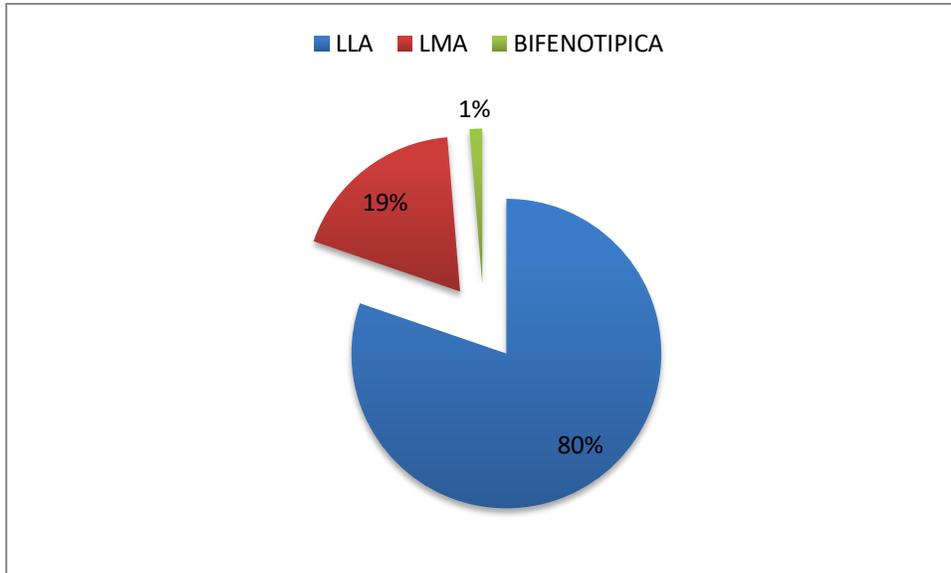
**Gráfico 1:** Porcentaje de género en pacientes con Leucemia Aguda.

De los cuales se realizó su distribución de acuerdo a la edad y al género como se muestra en el Gráfico 2.



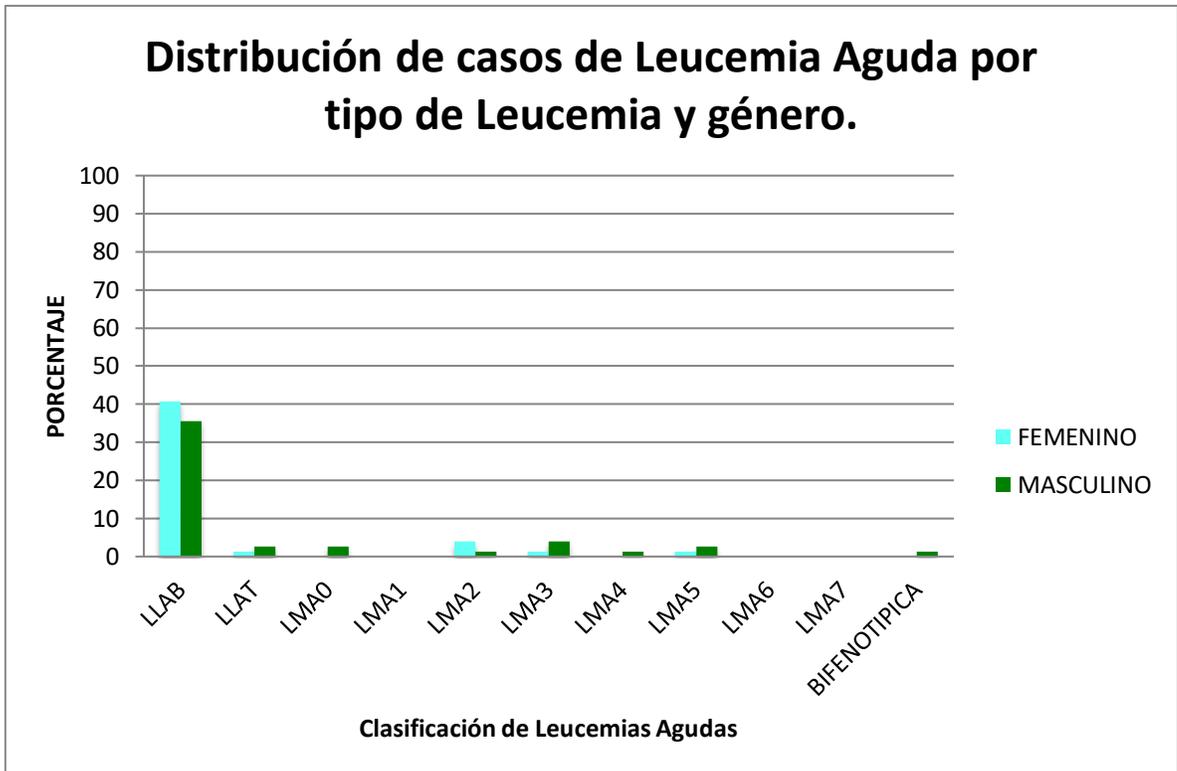
**Gráfico 2:** Se expone la distribución de Leucemias Agudas de acuerdo al porcentaje según la edad y el género. Donde se observa un pico de los 2 a los 5 años en el género femenino y de los 3 a los 5 años en el género masculino. Y una distribución similar en cuanto al género de los 10 a los 15 años. Mientras que se expone que en los extremos de edad en los pacientes analizados el porcentaje es mayor en el género femenino.

Con los resultados obtenidos de inmunofenotipo por Citometría de Flujo, se identificaron 61 casos de Leucemia Aguda de tipo Linfocítica (80%), 14 casos de Leucemia Aguda Mieloide (19%) y un caso de Leucemia bifenotípica (1%) como lo muestra el gráfico 3.



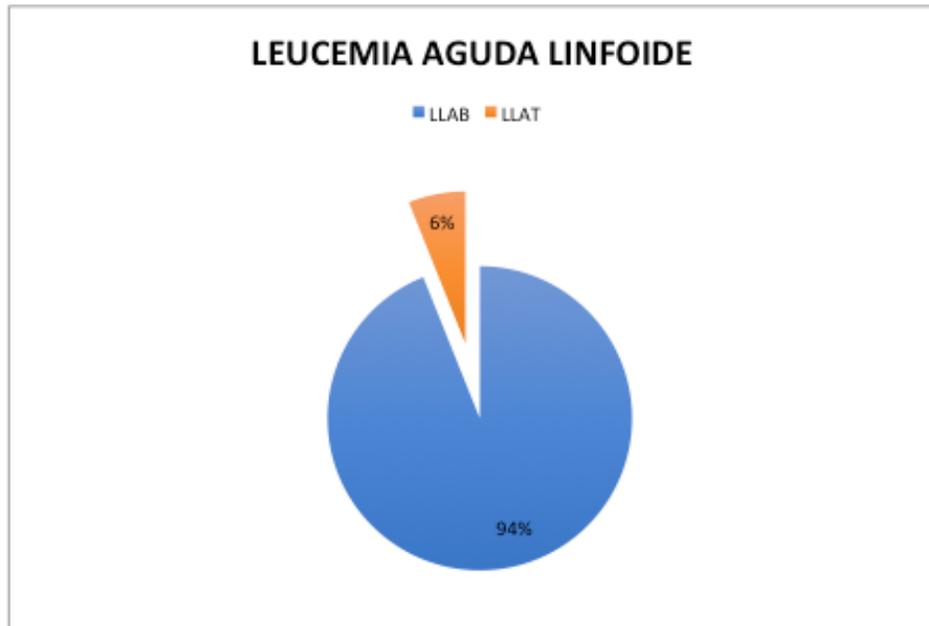
**Gráfico 3:** Porcentaje de Leucemias Agudas diagnosticadas en el período de mayo 2017 a febrero 2018.

A su vez se expone la distribución de acuerdo a la clasificación de las Leucemias agudas y al género como se muestra en el Gráfico 4.



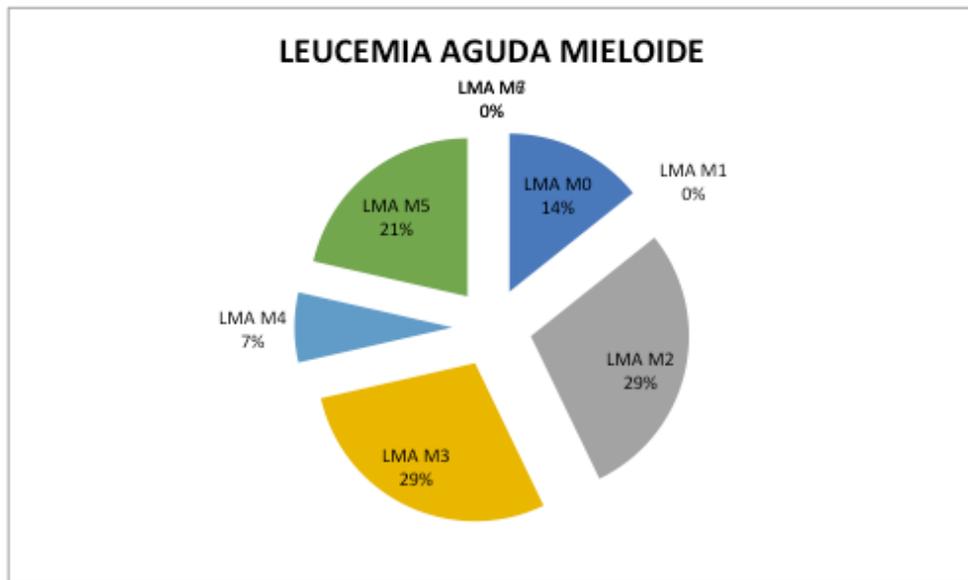
**Gráfico 4:** Se muestra la distribución de Leucemias Agudas de acuerdo al porcentaje según la clasificación y el género. Donde se hace evidente el predominio de las Leucemias Linfoblásticas de estirpe B en ambos sexos .

Posteriormente, las Leucemias de linaje linfoide se identificaron como 61 (94%) casos de Leucemia Linfoide Aguda de estirpe B y 3 (6%) casos de Leucemia Linfoide Aguda de estirpe T. (Gráfico 5.)



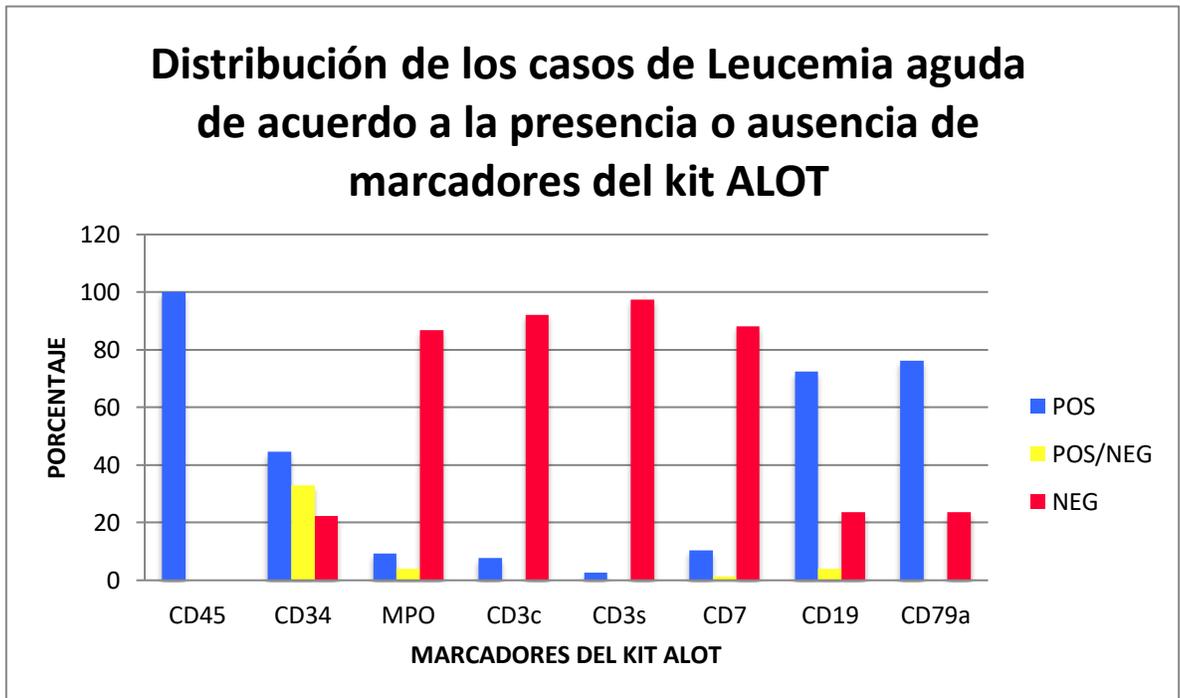
**Gráfico 5:** Porcentaje de Leucemia Agudas linfoblásticas en el período de mayo 2017 a febrero 2018.

De igual forma, se clasificaron las Leucemias Agudas Mieloides de acuerdo a la clasificación de la FAB, 2 casos de M0 (14%), 4 casos de M2 (29%), 4 casos de M3 (29%), 1 caso de M4 (7%), 3 casos de M5 (21%) y ningún caso correspondiente con M1, M6 y M7. Gráfico 6.



**Gráfico 6:** Porcentaje de Leucemia Agudas Mieloide en el período de mayo 2017 a febrero 2018.

En la siguiente gráfica se muestra la distribución de los casos de Leucemia Aguda de acuerdo a la presencia o ausencia de los marcadores del kit ALOT obtenidos mediante el análisis de los resultados de la citometría de flujo multiparamétrica con la plataforma Euroflow



**Gráfico 7 :** Se muestra la distribución de los casos de Leucemias agudas de acuerdo al porcentaje de presencia o ausencia de cada uno de los marcadores del kit ALOT.

## DISCUSIÓN

Mediante la obtención de resultados podemos observar que la implementación de los nuevos algoritmos de la plataforma Euroflow en la UMAE HG Dr Gaudencio González Garza del CMN La Raza ha sido de utilidad para el análisis adecuado en el estudio de los pacientes con leucemia aguda para el diagnóstico oportuno de las mismas. Debido a que han permitido obtener un resultado de inmunofenotipo en todos aquellos pacientes con diagnóstico inicial de Leucemia Aguda y con ello identificar la presencia de los marcadores presentes o ausentes en las clonas neoplásicas para su clasificación y definición de linaje.

El presente estudio permitió identificar la proporción de acuerdo al sexo de Leucemias Agudas durante el período de mayo 2017 a febrero de 2018, del 50% de los casos de Leucemias agudas de novo corresponden a mujeres y 50% de hombres. (**Gráfico 1**) Lo que indica una proporción 1:1 y difiere de la estadística internacional que indica que existe una relación de 3:2 en relación a hombres y mujeres de acuerdo a la Sociedad Americana contra el Cancer.<sup>27</sup> La diferencia obliga a realizar más estudios para conocer la proporción en una mayor cantidad de pacientes en nuestra población. En el **gráfico 2** Se expone la distribución de Leucemias Agudas de acuerdo al porcentaje según la edad y el género. Donde se observa un pico de los 2 a los 5 años en el género femenino y de los 3 a los 5 años en el género masculino. Y una distribución similar en cuanto al género de los 10 a los 15

años. Incluso se expone que en los extremos de edad en los pacientes analizados el porcentaje es mayor en el género femenino. Es importante conocer la distribución, para identificar los grupos etareos con mayor porcentaje de diagnóstico de Leucemia Aguda así como el sexo en nuestra población.

En el **gráfico 3** observamos los porcentajes de acuerdo a la estirpe de las células neoplásicas e identificamos 61 casos de Leucemia Aguda de tipo Linfoide lo cual corresponde al 80%, 14 casos de Leucemia Aguda Mieloide (19%) y un caso de Leucemia bifenotípica (1%), lo anterior coincide con las estadísticas internacionales y nacionales.<sup>27,28</sup> A su vez se expone la distribución de acuerdo a la clasificación de las Leucemias agudas y al género como se muestra en el **Gráfico 4**. En el cual se identifica que en ambos sexos predominan las Leucemias Linfoblásticas de estirpe B y en cuanto al género femenino, en nuestra población existe un ligero predominio en la Leucemia Linfoblástica de estirpe B y las LMA M2.

De igual manera ocurre en el caso de la estadística obtenida en la clasificación de las leucemias linfoblásticas de acuerdo a su linaje: las Leucemias de linaje linfoide se identificaron como 61 (94%) casos de Leucemia Linfoide Aguda de estirpe B y 4 (6%) casos de Leucemia Linfoide Aguda de estirpe T. (**Gráfico 5.**)<sup>27,28</sup> Por otra parte el análisis de los fenotipos concordantes con Leucemia mieloide determinó que 2 casos correspondieron a M0, lo cual equivale a un 14%, 4 casos de M2 (29%), 4 casos de M3 (29%), 1 caso de M4 (7%), 3 casos de M5 (21%) y ningún caso correspondiente con M1, M6 y M7; de acuerdo a la clasificación de la

FAB. (**Gráfico 6**). Por lo anterior se recomienda realizar más estudios para conocer la proporción en una mayor cantidad de pacientes en nuestra población.

Mediante el **gráfico 7** se muestra la distribución de los casos de Leucemia Aguda de acuerdo a la presencia o ausencia de los marcadores del kit ALOT obtenidos mediante el análisis de los resultados de la citometría de flujo multiparamétrica con la plataforma Euroflow. Lo cual evidencia la utilidad de el kit ALOT, el cual se considera de escrutinio u orientación ya que el complemento de todos los marcadores del kit se ha identificado como una importante herramienta diagnóstica cuando se desconoce la estirpe celular. En la gráfica se demuestra que el 100% de las muestras analizadas muestran POSITIVIDAD para el marcador de superficie CD45, el cual se considera un marcador leucocitario que indica que en todos los casos se analizaron este tipo de células. El porcentaje de las células CD34+ oscila en un 45% de las muestras analizadas con diagnóstico de Leucemias Agudas, la cual es una sialoglicoproteína presente en la superficie de las células progenitoras hematopoyéticas, y por lo tanto se expresan en las leucemias con estados de elevada inmadurez. Resulta bastante evidente que el 95% de las Leucemias analizadas no expresan la enzima MPO, la cual está presente en los fagosomas de las células de linaje Mieloide, lo cual indica que en su mayoría resultaron de linaje linfoide al carecer de este marcador. Lo anterior confirma la importancia del kit ALOT para la orientación y diferenciación entre leucemias. EL marcador o cluster de diferenciación CD3 presenta dos cadenas (superficial o de

membrana y citoplasmática) y forma parte del Receptor de Linfocitos T, así como CD7 el cual también se encuentra en estos y por lo tanto ambos resultan de gran utilidad para identificar la estirpe celular de la Leucemia, lo anterior se demuestra en el gráfico, ya que se encuentra positivo en un 3 a 4%, lo cual corresponde con la cantidad de Leucemias de T identificadas durante el estudio (3). Finalmente CD19 y CD79a forman parte de los marcadores específicos de células B, y en el gráfico coincide con la cantidad de LLA de estirpe B identificadas. (60 A 70%)

El análisis adecuado para el diagnóstico de los pacientes con Leucemia Aguda según la Organización mundial de la Salud debe de ser mediante la integración de las diferentes herramientas diagnósticas que incluyen el cuadro clínico, la citoquímica, la citometría de flujo y los estudios citogenéticos, siendo de vital importancia la realización de cada una de estas. Sin embargo en el presente estudio podemos evidenciar que el diagnóstico donde se determinó el linaje en el 100% de los pacientes se realizó de acuerdo al resultado de la citometría de flujo. Cabe mencionar que los estudios de citogenética que se realizan en el hospital incluyen solo cariotipo, el cual, por su naturaleza solo permite identificar alteraciones cromosómicas y que además conlleva una cantidad mayor de tiempo; debido a esto, las alteraciones a nivel molecular y/o genético no son detectadas. Lo cual confirma la necesidad e importancia de la utilización de la Plataforma estandarizada que brinde resultados exactos y precisos para el correcto diagnóstico y tratamiento.

La aplicación de los algoritmos propuestos por la plataforma Euroflow para el diagnóstico ha permitido ofrecer a la población pediátrica de nuestro hospital con diagnóstico de Leucemia Aguda un procedimiento de citometría de flujo estandarizado, rápido y basado en mediciones cuantitativas de gran objetividad, y con ello la mejora en la calidad de su atención. Anteriormente a la estandarización por la plataforma existía una imperiosa necesidad de estandarización debido a que había una gran variabilidad en las técnicas utilizadas, los equipos y sobretodo los paneles de anticuerpos y reactivos, los cuales, de manera sistemática eran elegidos a base de recomendaciones propuestas en consensos entre expertos, y que carecían de validación prospectiva a modo de poder demostrar su impacto sobre todo el proceso, lo cual limitaba seriamente la reproducibilidad y estandarización diagnóstica del inmunofenotipado por citometría de flujo, condicionando en parte también su utilidad clínica. Actualmente con la implementación de la plataforma, es posible obtener el inmunofenotipo de una manera estandarizada, mediante la utilización de la técnica, equipo y paneles de anticuerpos propuestos por el consorcio Euroflow, en cualquier centro hospitalario del país y a nivel mundial. Y el presente estudio permite observar y describir los resultados obtenidos en los pacientes pertenecientes a nuestra población, posterior a la utilización de la plataforma.<sup>29</sup> Dichos anticuerpos y su identificación, confieren a la citometría de flujo una capacidad diagnóstica fundamental así como la facultad de sugerir la presencia de alguna alteración genética o bien la

asociación entre la presencia de algunos marcadores con aspectos clínicos y asociados al tratamiento. Tal como lo manifiestan JJM van Dongen y cols. en Leukemia 2012 donde se menciona que en los casos de Leucemias Mieloides Agudas (LMA) (**tabla 11**) con expresión de CD19, CD7 y CD56 se sugiere la presencia de una traslocación en (8; 21).<sup>4</sup> O bien Deok-Hwan Yang en el American Journal of Hematology del 2007 evidencian que la expresión de CD56 en LMA ha sido asociada con manifestaciones extramedulares y resistencia al tratamiento.<sup>24</sup> O bien Djokic Miroslav y cols. en Haematologica 2009 quienes expresan que la sobreexpresión de CD123 en las clonas blásticas de estirpe B indica la presencia de fenotipo aberrante y genotipo hiperdiploide, el cual adicionalmente representa un marcador de buen pronóstico; y además es de utilidad en el seguimiento y monitoreo de Enfermedad Mínima Residual.<sup>25</sup> Además Nobutaka Kiyokawa y cols en. Leukemia Research en 2014 analizaron a 696 pacientes pediátricos con diagnóstico de LLA de estirpe B con presencia del gen de fusión BCR-ABL y confirmaron la fuerte correlación entre la presencia de dicho gen y el marcador CD66c así como la correlación entre este marcador y la concurrencia de hiperdiploidia y la mutación en CRLF2., lo cual en conjunto se considera como un factor pronóstico importante. <sup>26</sup>

Finalmente es importante señalar que el nivel de estandarización que se ha obtenido con la utilización conjunta de los protocolos descritos y las herramientas informáticas desarrolladas, resulta imprescindible para la comparación de los resultados entre diferentes centros y para garantizar la

construcción de una base de datos de referencia con información fenotípica sobre un gran número de muestras normales y de pacientes con los subtipos de Leucemias Agudas y otras hematopatías malignas. Y solo de esa forma podremos utilizar en el futuro esta información de forma prospectiva en cualquier centro del mundo y de nuestro país donde se apliquen los protocolos estandarizados, como marco de referencia para la comparación de nuevos casos, estrategia que resulta clave para la estandarización del rastreo diagnóstico de hemopatías como para su clasificación y diagnóstico diferencial (perfiles inmunofenotípicos de casos nuevos que muestran solapamiento con las poblaciones de referencias para diferentes enfermedades). Por lo que es de suma importancia comenzar con una base de datos y su análisis que contenga todos los resultados obtenidos en cada uno de los centros donde se implemente la plataforma.

## CONCLUSIONES

La plataforma Euroflow y su implementación en el laboratorio clínico en la sección de Hematología Especial del Hospital General CMN La Raza, ha permitido realizar el diagnóstico en los pacientes con Leucemia Aguda y su clasificación de acuerdo a la Organización Mundial de Salud, identificando la estirpe de las células neoplásicas mediante la obtención del Inmunofenotipo presente en dichas clonas celulares con el uso de las nuevas tecnologías aplicadas en la Citometría de flujo; lo cual clínicamente se traduce en la complementación diagnóstica, clasificación y pronóstico, así como da pauta a elegir el tratamiento adecuado.

Los resultados obtenidos de acuerdo a la presencia o ausencia de los marcadores en las clonas neoplásicas permiten conocer la biología celular de dichas clonas así como su identificación y clasificación de acuerdo a las Organización Mundial de la Salud.

El uso de estos paneles permite la identificación de algunos marcadores que se han relacionado con alteraciones genéticas, factores pronósticos y respuesta al tratamiento por lo que el reconocimiento de estos da pauta a incidir en dichos aspectos cuando se identifique su presencia.

La implementación de una plataforma estandarizada permitirá la creación de una base de datos para la comparación con otros centros y así reducir la variabilidad y aumentar la reproducibilidad.

## BIBLIOGRAFÍA:

1. Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VH, Martin-Ayuso M, van Dongen JJ, Orfao A; EuroFlow Consortium (EU-FP6, LSHB-CT-2006-018708) EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia*. 2012 Sep;26(9):1986-2010.
2. Van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, Almeida J. Standardization of flow cytometry for human blood immunophenotyping on behalf of the EuroFlow Consortium (EU-FP6, LSHB-CT-2006-018708) EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*, 2012, Sep;26(9):1908-75.
3. Stetler-Stevenson M, Davis B, Wood B, Braylan R. Bethesda International Consensus Conference on Flow Cytometric Immunophenotyping of Hematolymphoid Neoplasia. *Cytometry B Clin Cytom* 2007; 72 Suppl 1: S3
4. JJM van Dongen, L Lhermitte, S Bottcher. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes on behalf of the EuroFlow Consortium (EU-FP6, LSHB-CT-2006- 018708

5. **BD BIOSCIENCES. Protocolos de Manejo del Citómetro BD FACSCanto™ II Para inmunofenotipos de 8 colores. 2016 BD**
6. **Lepe-Zuñiga J, Jerónimo-López F, Hernández J, Características citopatológicas de la leukemia aguda en el Hospital de Especialidades Pediátricas de Chiapas México Bol Med Hosp Infant Mex. 2017; 74(2):122-133**
7. **Gorczyca W. Flow Cytometry in Neoplastic Hematology-Morphologic-Immunophenotypic Correlation. Informa Healthcare 2007.**
8. **Clinical Flow Cytometric Analysis of Hematolymphoid Cells; Approved Guideline - Second Edition H43-A2 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2007**
9. **Hurford MT, Altman AJ, DiGiuseppe JA. Unique Pattern of Nuclear TdT Immunofluorescence Distinguishes Normal Precursor B Cells (Hematogones) from Lymphoblasts of Precursor B-Lymphoblastic Leukemia. American Journal of Clinical Pathology (2008) 129, 700-705**
10. **Peters J., Qasim Ansari M. Multiparameter Flow Cytometry in the Diagnosis and Management of Acute Leukemia. Archives of Pathology & Laboratory Medicine: January 2011, Vol. 135, No. 1, pp. 44-54.**
11. **Chiaretti S., Zini G., Bassan R., Diagnosis and Subclassification of Acute Lymphoblastic Leukemia. Mediterr J Hematol Infect Dis. 2014; 6(1): e2014073.**

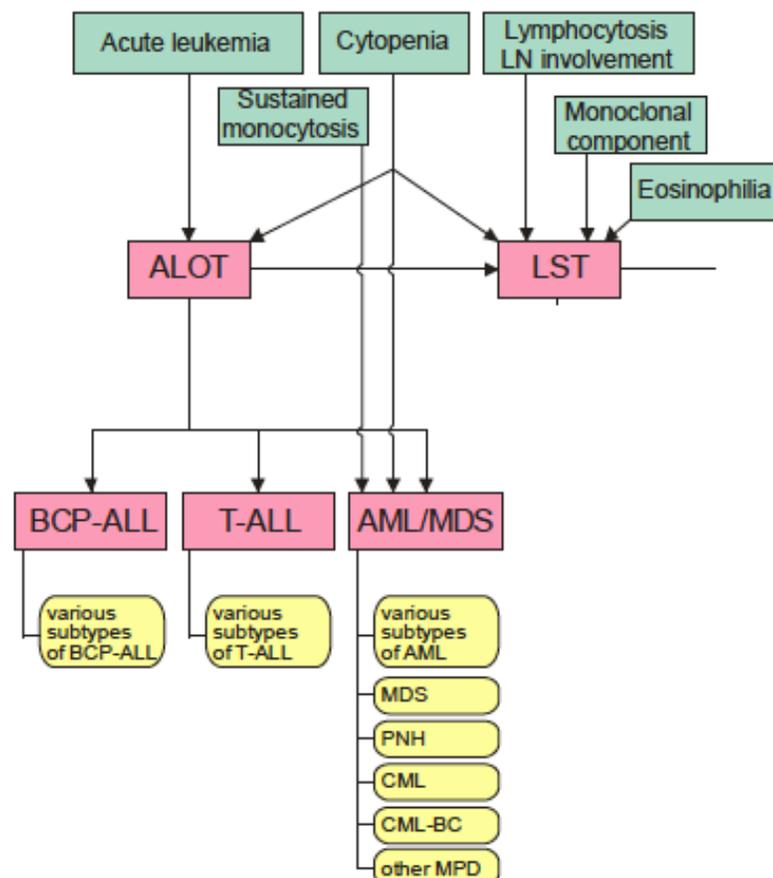
12. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009;114:937–951.
13. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT. French-American-British (FAB Cooperative Group) Proposals for the classification of the acute leukaemias. *Br J Haematol*. 1976;33:451-458.
14. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT. The morphological classification of acute lymphoblastic leukaemia: concordance among observers and clinical correlations. *Br J Haematol*. 1981;47:553–561.
15. Jaffe ES, Harris NL, Stein H. Introduction and overview of the classification of the lymphoid neoplasms. *WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissue*. IARC; Lyon: 2008. pp. 158–166.
16. Lai R, Hirsch-Ginsberg CF, Bueso-Ramos C. Pathologic diagnosis of acute lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2000;14:1209–1235.
17. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-2405.
18. Sugar IP, Gonzalez-Lergier J, Sealfon SC. Improved compensation in flow cytometry by multivariable optimization. *Cytometry A*. 2011;79(5):356-60.

19. van Dongen JJ, Adriaansen HJ, Hooijkaas H. Immunophenotyping of leukaemias and non-Hodgkin's lymphomas. Immunological markers and their CD codes. Neth J Med. 1988;33(5-6):298-314.
20. Ruiz-Arguelles A, Rivadeneyra-Espinoza L, Duque RE, Orfao A. Report on the second Latin American consensus conference for flow cytometric immunophenotyping of hematological malignancies. Cytometry B Clin Cytom. 2006.
21. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud. TITULO SEGUNDO, Capítulo 1: de los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos.
22. INEGI Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer 2018.
23. Ciudadana J., Orfao A. Utilidad del inmunofenotipo en el diagnóstico y el seguimiento de la leucemia linfoblástica aguda del adulto. Medicina Clínica 2007
24. Deok-Hwan Y., Yeung-Chul M. Predictable prognostic factor of CD56 expression in patients with acute myeloid leukemia with t(8 : 21) after high dose cytarabine or allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. AM J Hematol 2007
25. Djokic M., Bjorklun E. Overexpression of CD123 correlates with the hyperdiploid genotype in acute lymphoblastic leukemia. Haematologica 2009.

- 26. Nobutaka K., Kazutoshi I. Significance of CD66c expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. Leukemia Research 2014**
- 27. Cancer Statistics Center. American Cancer Society.**
- 28. Global Cancer Control, Organización Panamericana de la Salud.**
- 29. Flores M., Nuevas estrategias metodológicas y de Análisis de datos de Citometría de Flujo aplicadas al diagnóstico y clasificación de Hemopatías malignas. Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca 2016.**

## ANEXOS

**ANEXO 1: Algoritmo propuesto por Euroflow para el diagnóstico por Citometría de Flujo Multiparamétrica: ALOT: Kit de Orientación de Leucemias Agudas. LST: kit para la evaluación de poblaciones linfocitarias. BCP-ALL: kit para la identificación de leucemia aguda linfoide de precursores B. T-ALL kit para la identificación de leucemia aguda linfoide de precursores T. AML/MDS: kit para la identificación de leucemia aguda mieloide y síndrome mielodisplásico. AML: Leucemia Mieloide Aguda. MDS: Síndrome mielodisplásico, PNH: Hemoglobinuria Paroxística Nocturna. CML: Leucemia mieloide Crónica. MPD: Enfermedades Mieloproliferativas.**



## ANEXO 2: Fluorocromos y marcadores de diferenciación del kit LST.

Pacific Blue™	OC515™	FITC	PE	PerCP-Cyanine5.5	PE-Cyanine7	APC	APC-C750
CD20+CD4	CD45	CD8 + SmIgLambda	CD56 + SmIgKappa	CD5	CD19 + TCRγδ	SmCD3	CD38

**ANEXO 3: Características del sistema óptico del Equipo BD Facs Canto:** En la primera columna se muestra el nombre del instrumento BD FACSCanto II , En la segunda columna el láser, en la tercera columna la Longitud de onda del Laser en nanómetros, en la cuarta columna el canal de fluorescencia, y en las últimas 4 columnas los fluorocromos utilizados respectivamente. <sup>5</sup>

Instrument	Laser	Excitation Laser Line (nm)	Fluorescence Channel	Fluorochromes provided by BD Biosciences			
BD FACSCanto II flow cytometry system	Solid State (L1)	488	Green	FITC	Alexa Fluor® 488		
			Yellow	PE	PI		
			Orange	BD Horizon™ PE-CF594	PE-Texas Red®		
			Red	7-AAD	PE-Cy™5	PerCP	PerCP-Cy™5.5
	HeNe (L2)	633	Infrared	PE-Cy™7			
			Red	APC	Alexa Fluor® 647		
			Far Red	Alexa Fluor® 700			
	Violet (L3)	405	Infrared	BD APC-H7	APC-Cy7		
			Green	BD Horizon™ V500	AmCyan		
			Blue	Brilliant Violet™ 421	BD Horizon™ V450	VPD450	Pacific Blue™