



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN**

**Correlación entre el análisis morfológico e  
inmunofenotípico en el diagnóstico y  
clasificación de leucemias agudas en  
pacientes pediátricos del Hospital Infantil de  
México Federico Gómez**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

**PRESENTA:  
ESMERALDA NUÑEZ HERNANDEZ**

**ASESOR:  
Q.C. ISRAEL PARRA ORTEGA**

**COASESORAS:  
M. en C. IDALIA C. AVILA MIYAZAWA  
QBP. NOEMÍ NÁJERA MARTÍNEZ**

**CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**  
**SECRETARÍA GENERAL**  
**DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

**ASUNTO: VOTO APROBATORIO**

DEPARTAMENTO DE  
EXÁMENES PROFESIONALES

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ**  
**DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN**  
**PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA**  
**Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales**  
**de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

**Correlación entre el análisis morfológico e inmunofenotípico en el diagnóstico y clasificación de leucemias agudas en pacientes pediátricos del Hospital Infantil de México Federico Gómez.**

Que presenta la pasante: **Esmeralda Nuñez Hernandez**

Con número de cuenta: **414011001** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

**ATENTAMENTE**

**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 15 de Marzo de 2019.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	M. en C. Idalia Carmen Avila Miyazawa	
<b>VOCAL</b>	M. en C. Gloria Leticia Arellano Martínez	
<b>SECRETARIO</b>	Dr. Salvador Fonseca Coronado	
<b>1er. SUPLENTE</b>	QFB. Laura Gricelda Martínez Méndez	
<b>2do. SUPLENTE</b>	M.C. Heidi Johanna Amezcua Hempel	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga\*

## AGRADECIMIENTOS

Durante el trayecto de mi vida y en el afán por cumplir mis sueños, me encontré con personas extraordinarias que de una u otra manera me apoyaron para salir adelante y llegar hasta este momento tan importante de mi vida, por tal motivo quiero agradecerles profundamente.

En primer lugar agradezco a Dios por ponerlos en mi camino, por darme la oportunidad de vivir y por todas sus bendiciones.

A mis padres, gracias por protegerme, por guiar mi camino, por educarme de la mejor manera que ustedes pudieron y por esforzarse siempre para que yo pudiera cumplir mis objetivos desde pequeña. Quiero decirles que sin ustedes este sueño no pudo haberse realizado. Los amo con todo mi corazón y serán mis héroes para toda la vida.

A mis hermanos, por el apoyo incondicional que me brindaron durante la carrera, por confiar en mi y estar ahí siempre que los necesité, por escucharme, por consentirme, por todas las veces que no pudimos estar juntos y ustedes me comprendieron. Son los mejores hermanos del mundo y quiero decirles que me considero muy afortunada de tenerlos en mi vida. Los amo. A mi cuñado por todo el apoyo brindado.

A mi tía Dominga, por protegerme desde el día en que llegué a esta ciudad, por escucharme, por sus sabios consejos, gracias porque en mis momentos de debilidad usted siempre me alentó, por ser tan optimista y enseñarme que todos los objetivos son posibles de realizarse, por ayudarme a nunca rendirme. Mil gracias por soportarme.

A mis sobrinos, por toda la felicidad que le han dado a mi vida, su llegada a la casa fue lo más maravilloso que me pasó. Quiero decirles que pueden contar conmigo siempre, yo los protegeré y nunca los dejaré solos. Gracias por ser mi motivación. Los amo.

A mi abuelita por consentirme y esperar siempre mi regreso.

A mi primo Luis, por tus consejos, por todo el apoyo que me brindaste, por ser para mí el ejemplo de superación y por alentarme siempre y enseñarme que no existen barreras en esta vida.

A mi primo Abraham, por el apoyo incondicional.

A Alejandra, gracias por escucharme y por todos tus consejos.

A mi tío Javier y a mi tía Dania, gracias por motivarme, por su optimismo y por ser para mí el ejemplo de perseverancia.

A mi tío Zeferino, gracias por los consejos, por inspirarme, por enseñarme el valor de la humildad. Es para mí una persona admirable.

Quiero agradecer enormemente a quienes sin su colaboración este trabajo no pudo haberse realizado.

A mi asesora la Maestra Idalia C. Avila, agradezco la paciencia, el tiempo y su invaluable asesoría y profesionalismo en la elaboración de este trabajo. Por contribuir en mi formación profesional y personal, por sembrar en mí tanto conocimiento, por inspirarme a seguir estudiando sobre esta interesante Ciencia. Por ser excelente persona, por todas las veces que me escuchó y por sus sabios consejos, por motivarme y confiar en mí, por toda la ayuda que me brindó, por los buenos momentos compartidos.

A mi asesor el Químico Israel Parra, por abrirme las puertas del Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG) y confiar en mí, por todas sus enseñanzas y por su valiosa contribución en la elaboración de este trabajo.

A mi asesora, la Química Noemí Nájera del Laboratorio de Citometría de Flujo del HIMFG, gracias por hacerme sentir bienvenida al laboratorio, por confiar en mí, por las enseñanzas que me brindó sobre citometría y por enseñarme a leer médula ósea, por sus libros, por todas sus contribuciones y ser también parte fundamental de este trabajo. Gracias por todos sus consejos, por los momentos tan agradables que compartimos, los llantos y las risas, por enseñarme a no rendirme nunca.

A mis sinodales, el Dr. Salvador Fonseca, la Maestra Leticia Arellano, la Maestra Heidi Amezcua y la Maestra Laura Martínez por su formidable contribución en este trabajo y por su tiempo dedicado en la revisión.

Al personal del laboratorio de citometría de flujo del HIMFG, Química Emma R. Mendoza, por enseñarme a leer extendidos de médula ósea, por los reactivos y atención hacia mí, por su profesionalismo y paciencia que tuvo conmigo para enseñarme, por la buena convivencia, por las risas y por sus buenos consejos; Dr. Ebzadrel Carbajal, por los reactivos para los extendidos, por compartirme su conocimiento y por resolver mis dudas, por los buenos momentos que compartimos y por alegrarnos el día. Gracias por su contribución.

A todos los niños del Hospital por hacer posible este trabajo.

A cada uno de mis profesores de la carrera, por todas sus enseñanzas y por moldear parte lo que ahora soy.

A la maestra Lourdes Galván por transmitirme su conocimiento, por todo el apoyo que me brindó, gracias por su gentileza.

A la maestra Heidi por las enseñanzas, por sus buenos consejos para superarme tanto profesional como personalmente, por toda la ayuda que me brindó.

Trabajar con ustedes ha sido una experiencia muy enriquecedora.

A la maestra Leticia Arellano por sus enseñanzas durante mi formación académica, gracias por la paciencia y por el apoyo brindado.

A mis amigos, por recorrer este camino juntos, por compartir nuestros conocimientos y ayudarnos mutuamente, por formar parte de mi equipo de trabajo en los laboratorios, por madrugar juntos (los últimos semestres ya no dormíamos), por todos los momentos que compartimos y que serán inolvidables.

Al SBEI del Programa Universitario de Estudios de la Diversidad Cultural y la Interculturalidad (PUIC), UNAM, por la beca otorgada durante mi carrera, ya que durante esta etapa fue mi mayor solvencia económica. Gracias por darle la importancia que merece la diversidad cultural de nuestro amado México.

A todos mis tutores de la beca, por la atención brindada, por el seguimiento de mis estudios, por su amabilidad y paciencia, en especial a Alejandra Jáuregui.

A mi alma mater, la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM, agradezco la formación profesional y personal que me brindó, ha sido la mejor experiencia que he tenido en mi vida.

## DEDICATORIAS

A mis padres, por ser mi mayor motor es esta vida. Son los mejores del mundo.

A mis hermanos por su confianza.

A mi tía Domi por su apoyo incondicional.

A mi hermanito César que desde el cielo me cuida. Te recuerdo con cariño.

A mi abuelito Miguel que guía mi camino desde el cielo. Por consentirme siempre y llevarme a la escuela cuando era pequeña.

A mis sobrinos por darle alegría a mi vida.

# ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE TABLAS	IV
GLOSARIO	V
ABREVIATURAS	VII
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
1. MARCO TEÓRICO	3
1.1. Hematopoyesis	3
1.1.1. Médula ósea	3
1.1.2. Estructura jerárquica del sistema hematopoyético	5
1.1.3. Leucopoyesis	7
1.1.3.1. Mielopoyesis	7
1.1.3.2. Linfopoyesis	8
1.2. Leucemias agudas	12
1.2.1. Definición	12
1.2.2. Etiología y patogenia	12
1.2.3. Epidemiología	14
1.2.4. Leucemia linfoblástica aguda (LLA)	15
1.2.4.1. Características clínicas	15
1.2.4.2. Datos de laboratorio	16
1.2.4.3. Factores pronósticos	17
1.2.4.4. Clasificación del grupo FAB	18
1.2.4.5. Clasificación de grupo EGIL	19
1.2.4.6. Clasificación de la OMS	20
1.2.5. Leucemia mieloblástica aguda (LMA)	21
1.2.5.1. Características clínicas	21
1.2.5.2. Datos de laboratorio	22
1.2.5.3. Factores pronósticos	23
1.2.5.4. Clasificación del grupo FAB	24
1.2.5.5. Clasificación de grupo EGIL	26
1.2.5.6. Clasificación de la OMS	27
1.2.6. Leucemia aguda bifenotípica (LAB)	28
1.2.6.1. Clasificación de grupo EGIL	28
1.2.7. Recaída	29
1.3. Marcadores <i>Cluster Differentiation</i> (CD)	30
1.4. Diagnóstico de las leucemias agudas	34
1.4.1. Evaluación morfológica	35
1.4.1.2. Evaluación morfológica y mielograma	39
1.4.2. Diagnóstico de leucemias agudas mediante inmunofenotipificación	44
2. JUSTIFICACIÓN	47
3. HIPÓTESIS	48

4. OBJETIVOS	49
4.1. General	49
4.2. Particulares	49
5. MATERIALES Y MÉTODOS	50
5.1. Criterios de inclusión de los pacientes	50
5.2. Criterios de exclusión de los pacientes	50
5.3. Metodología	50
5.3.1. Muestra de estudio	50
5.3.2. Recepción de la muestra	50
5.3.3. Preparación del extendido por la técnica de compresión	50
5.3.4. Tinción del extendido con colorante de Wright	51
5.3.5. Análisis morfológico	52
5.3.6. Recopilación de datos de inmunofenotipo y de parámetros hematológicos	54
5.3.7. Comparación de datos obtenidos por el método morfológico y por inmunofenotipo y cálculo de datos estadísticos	54
6. RESULTADOS	55
6.1. Resultados de la evaluación de la calidad de la muestra	55
6.2. Concordancia obtenida entre el análisis morfológico e inmunofenotípico	57
6.3. Correlación entre el porcentaje de blastos obtenidos por morfoloía y por citometría de flujo multiparamétrica	61
6.4. Subtipos de leucemia aguda obtenidos mediante inmunofenotipificación	61
6.5. Resultados epidemiológicos	63
6.6. Resultados de parámetros hematológicos	64
7. ANÁLISIS DE RESULTADOS	66
8. CONCLUSIONES	73
9. REFERENCIAS	74
10. ANEXOS	88

## ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> Sitios de la hematopoyesis.	4
<i>Figura 2.</i> Partes del hueso largo y ubicación de la médula ósea.	4
<i>Figura 3.</i> Ubicación de los componentes hematopoyéticos en la médula ósea.	4
<i>Figura 4.</i> Macrófago con precursores eritroides.	4
<i>Figura 5.</i> Jerarquía del sistema hematopoyético.	6
<i>Figura 6.</i> Mielopoyesis.	7
<i>Figura 7.</i> Etapas de maduración del eritroblasto.	7
<i>Figura 8.</i> Etapas de maduración del neutrófilo.	8
<i>Figura 9.</i> Morfología del eosinófilo, basófilo y mastocito.	8
<i>Figura 10.</i> Etapas de maduración del monocito.	8
<i>Figura 11.</i> Precursores megacariocíticos.	8
<i>Figura 12.</i> Diferencia morfológica entre el linfoblasto y linfocito.	10
<i>Figura 13.</i> Proceso de maduración del linfocito B.	10
<i>Figura 14.</i> Proceso de maduración del linfocito T.	11
<i>Figura 15.</i> Evolución clonal leucémica	13
<i>Figura 16.</i> Heterogeneidad clonal en la leucemia	13
<i>Figura 17.</i> Morfología de los linfoblastos.	18
<i>Figura 18.</i> Fenotipo de las etapas de diferenciación de las células B.	33
<i>Figura 19.</i> Fenotipo de las etapas de diferenciación de las células T.	34
<i>Figura 20.</i> Sitios de aspiración de médula ósea en niños.	36
<i>Figura 21.</i> Evaluación del aspirado de médula ósea.	38
<i>Figura 22.</i> Grumos óseos.	39
<i>Figura 23.</i> Intensidad en la expresión de antígenos.	45
<i>Figura 24.</i> Diagramas <i>dop plot</i> .	45
<i>Figura 25.</i> Extensiones de médula ósea.	51
<i>Figura 26.</i> Correlación entre el porcentaje de blastos obtenidos por morfología y por citometría de flujo multiparamétrica.	61
<i>Figura 27.</i> Distribución de subtipos de LA determinados por inmunofenotipo.	62
<i>Figura 28.</i> Porcentaje de subtipos de LLA-B.	62
<i>Figura 29.</i> Subtipos de LAB determinados por inmunofenotipo.	63
<i>Figura 30.</i> Proporción de pacientes masculinos y femeninos que presentan algún tipo de LA.	63
<i>Figura 31.</i> Rango de edades y número de pacientes masculinos y femeninos con LA.	64
<i>Figura 32.</i> Diagramas <i>dot plot</i> de una LLA Pre-B común.	98
<i>Figura 33.</i> Diagramas <i>dot plot</i> de una LMA-M3.	99

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Factores predisponentes de las leucemias agudas.	14
Tabla 2. Factores pronósticos de la LLA infantil.	17
Tabla 3. Clasificación morfológica de las LLA según el grupo FAB.	19
Tabla 4. Criterios de puntuación para diferenciar una L1 de una L2.	19
Tabla 5. Clasificación inmunológica de las LLA de acuerdo con el EGIL.	20
Tabla 6. Neoplasias de precursores linfoides, de acuerdo con la OMS, 2016.	21
Tabla 7. Grupos de riesgo de LMA.	23
Tabla 8. Clasificación de las LMA de acuerdo con el grupo FAB.	24
Tabla 9. Morfología y citoquímicas de las LMA.	26
Tabla 10. Clasificación inmunológica de las LMA de acuerdo con el EGIL.	27
Tabla 11. Clasificación de las LMA OMS, 2016.	27
Tabla 12. Sistema de puntuación EGIL para definir una LAB.	29
Tabla 13. Fenotipo de las diferentes etapas de maduración de granulocitos.	31
Tabla 14. Fenotipo de las diferentes etapas de maduración del monocito.	32
Tabla 15. Fenotipo de las diferentes etapas de la eritropoyesis.	32
Tabla 16. Fenotipo de las diferentes etapas de la megacariopoyesis.	33
Tabla 17. Características morfológicas que se evalúan en las células.	40
Tabla 18. Porcentaje de células hematopoyéticas en médula ósea de personas sanas.	41
Tabla 19. Composición celular de la médula ósea de acuerdo con la edad.	42
Tabla 20. Información que debe contener el reporte de la evaluación de MO.	43
Tabla 21. Terminologías utilizadas en la evaluación de células sanguíneas	44
Tabla 22. Anticuerpos para la inmunotipificación de las LA.	46
Tabla 23. Evaluación macroscópica, microscópica y mediante CFM del aspirado de médula ósea de pacientes pediátricos con sospecha de leucemia aguda.	55
Tabla 24. Pacientes pediátricos con sospecha de LA diagnosticados por morfología e inmunofenotipificación.	57
Tabla 25. Resultados positivos y negativos para LA obtenidos mediante morfología e inmunofenotipificación.	59
Tabla 26. Parámetros determinados para el análisis morfológico	60
Tabla 27. Resultados de parámetros hematológicos de 52 pacientes con LA.	65
Tabla 28. Resultados de parámetros hematológicos de 52 pacientes de acuerdo con el tipo de LA.	65
Tabla 29. Perfil inmunofenotípico de las leucemias agudas de los pacientes incluidos en este estudio.	91
Tabla 30. Antígenos CD que se emplean en el diagnóstico y clasificación de las leucemias agudas.	93

## GLOSARIO

**Aneuploidía.** Desviación del número de cromosomas normales que conduce a la pérdida o ganancia de uno o varios cromosomas individuales del conjunto diploide.

**Bastón de Auer.** Forma cristalizada de la enzima mieloperoxidasa con enzimas lisosómicas.

**Coagulación intravascular diseminada.** Activación sistémica de la coagulación y que conduce a la obstrucción trombótica de vasos pequeños y medianos y, en última instancia, disfunción orgánica. El consumo continuo de plaquetas y proteínas de la coagulación da como resultado trombocitopenia y bajas concentraciones de factores de coagulación que pueden causar hemorragias graves.

**Cromosoma Philadelphia.** Cromosoma 22 acortado como consecuencia de una translocación entre los cromosomas 9 y 22 (t [9; 22] [q34; q11]) que da lugar a un gen de fusión *BCR-ABL1*.

**Endostio.** Capa de tejido conjuntivo que tapizan los espacios internos del hueso cortical.

**Enfermedad mínima residual.** Presencia de pequeñas cantidades de células leucémicas en un paciente después de la quimioterapia y que no son detectadas con la metodología convencional.

**Epigenética.** Son los cambios en la función de los genes que son heredables por mitosis y/o meiosis, que no entrañan una modificación en la secuencia del DNA y que pueden ser reversibles.

**Hematogonia.** ("Fabricador de sangre" en latín). Son los precursores de linfocitos B que residen en la médula ósea y que se someten a una secuencia de maduración ordenada para dar lugar a las células B maduras.

**Hiperdiploidía.** Mas de 46 cromosomas

**Hiperleucocitosis.** Cuenta de leucocitos mayor o igual a  $100 \times 10^3/\mu\text{L}$  causada por la proliferación de células leucémicas.

**Hipodiploidía.** Menos de 46 cromosomas.

**Leucocitosis.** Cuenta de leucocitos entre  $50 \times 10^3/\mu\text{L}$  y  $99 \times 10^3/\mu\text{L}$ .

**Leucostasis.** Aumento de la viscosidad sanguínea y obstrucción vascular por formación de trombos de células leucémicas que favorecen isquemia y hemorragia tisular, como consecuencia de la hiperleucocitosis.

**Oncogen.** Gen que puede poner en marcha una proliferación celular descontrolada cuando se modifica su secuencia o la regulación de su expresión es incorrecta.

**Periostio.** Membrana de tejido conectivo fibroso que envuelve la superficie exterior del hueso, la capa más externa es densa y contiene gran cantidad de vasos sanguíneos, la capa más interna comprende en gran medida los osteoblastos y osteoclastos.

**Priapismo.** Erección peneana involuntaria, dolorosa y persistente de más de 4 h, la cual no tiene relación con estímulo sexual y no se resuelve con la eyaculación.

**Protooncogén.** Es un gen que, en condiciones normales, codifica una proteína implicada en el crecimiento, la diferenciación o la apoptosis de las células.

**Quiescencia.** Fase G0 y reversible del ciclo celular.

**Síndrome de lisis tumoral.** Desorden metabólico caracterizado por hiperuricemia, hiperfosfatemia e hiperpotasemia, con o sin hipocalcemia, consecuencia de la lisis de las células tumorales y de la abrupta liberación de iones intracelulares, ácidos nucleicos, proteínas y sus metabolitos en el espacio extracelular, que da como manifestaciones renales, musculoesqueléticas, arritmias cardíacas, neurológicas y muerte.

**Trabéculas óseas.** Proyecciones de hueso calcificado que irradian desde la cortical ósea al interior del espacio medular y proporciona sostén para la médula en desarrollo.

## ABREVIATURAS

AA	Anemia aplásica
AcMo	Anticuerpo monoclonal
ATRA	Ácido <i>all-</i> trans retinoico
BCR	Receptor de células B
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> (grupo de diferenciación)
CFM	Citometría de flujo multiparamétrica
CID	Coagulación intravascular diseminada
Col.	Colaboradores
CPH	Células progenitoras hematopoyéticas
CTH	Célula troncal hematopoyética
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ETP	<i>Early T-cell progenitor</i> (progenitor temprano de células T)
EGIL	Grupo Europeo para la Clasificación Inmunológica de las Leucemias
FAB	Grupo Cooperativo Franco-Americano-Británico
FISH	Hibridación fluorescente <i>in situ</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
HIMFG	Hospital Infantil de México Federico Gómez
HLA	Antígeno Leucocitario Humano
HTLV	Virus Linfotrópico de Células T Humanas
ICSH	Comité Internacional de Estandarización en Hematología
LA	Leucemias agudas
LAB	Leucemia aguda bifenotípica
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LLC	Leucemia linfoide crónica
LMA	Leucemia mieloblástica aguda
LMC	Leucemia mieloide crónica
LPA	Leucemia promielocítica aguda
M:E	Relación mieloide:eritroide
MO	Médula ósea
MPOx	Mieloperoxidasa
N:C	Relación núcleo:citoplasma
OMS	Organización Mundial de la Salud
Ph	Cromosoma <i>Philadelphia</i>
RC	Remisión completa
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
SLT	Síndrome de lisis tumoral
SNC	Sistema nervioso central
SP	Sangre periférica
SSC	<i>Side Scatter</i>
TCR	Receptores de células T
TdT	Desoxinucleotidil transferasa terminal
VEB	Virus de Epstein Barr
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana

## RESUMEN

Las leucemias agudas (LA) son el producto de cambios moleculares en una célula precursora hematopoyética. Estas leucemias se asocian con una gran morbilidad y mortalidad en todo el mundo y constituyen las neoplasias más frecuentes en la edad pediátrica. En el algoritmo de diagnóstico, la evaluación morfológica de la médula ósea representa el primer paso en la vía diagnóstica y es la primera herramienta para distinguir una leucemia linfoblástica aguda (LLA) de una leucemia mieloblástica aguda (LMA), la inmunofenotipificación permite confirmar el linaje y subclasificarlas de acuerdo con el grado de maduración. El diagnóstico preciso y oportuno de estas neoplasias permite otorgar el tratamiento adecuado al paciente y de esta manera lograr la remisión de la enfermedad. La información que proporciona el análisis morfológico complementa al estudio inmunofenotípico y de esta manera se puede llegar a un diagnóstico oportuno, lo cual indica que ambos métodos presentan correlación

En este trabajo se comparó la caracterización morfológica con la inmunofenotipificación de aspirados de médula ósea de pacientes pediátricos con sospecha de LA, mediante la evaluación morfológica y el análisis por citometría de flujo multiparamétrica para determinar el grado de correlación que existe entre ambos métodos para el diagnóstico y clasificación de estas neoplasias. En este estudio se incluyeron 59 pacientes pediátricos con sospecha de LA y se encontró una correlación de 79.6% entre ambos métodos, el índice *kappa* fue de 0.352. Estos resultados indican que es necesario realizar el análisis morfológico, ya que en la mayoría de los casos este método orientó hacia una LLA o una LMA, sin embargo, no es suficiente para realizar el diagnóstico definitivo, sobre todo cuando la muestra no es de calidad adecuada o cuando se trata de una leucemia aguda bifenotípica (LAB), el resultado de la morfología complementa en gran medida al estudio inmunofenotípico y siempre se debe realizar éste último en las muestras, ya que permite finalmente determinar el linaje específico afectado, así como la etapa de maduración o diferenciación en la que las células leucémicas están detenidas y por consiguiente permite estratificar el nivel de riesgo del paciente. En este estudio se pudo notar que cuando los casos cursaban con leucocitosis o presentaban un alto porcentaje de blastos, no hubo dificultad en el diagnóstico morfológico, además de que para este análisis se requiere que las muestras sean de buena calidad, ya que de lo contrario limita su evaluación.

## INTRODUCCIÓN

Las leucemias agudas (LA) son el producto de cambios moleculares en una célula precursora hematopoyética (Whitehead et al., 2016). Estas leucemias se asocian con una gran morbilidad y mortalidad en todo el mundo y constituyen las neoplasias más frecuentes en la edad pediátrica. Existe una mayor incidencia en la población de América Latina (Rivera et al., 2014). Se pueden clasificar mediante el análisis morfológico y citoquímico según lo propuesto por el grupo Franco-Americano-Británico (FAB), mediante inmunofenotipificación de acuerdo con el Grupo Europeo para la Clasificación Inmunológica de las leucemias (EGIL) y, basándose en la presentación clínica del paciente, morfología, inmunofenotipo y estudios citogenéticos y moleculares, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) (De Kouchkovsky y Abdul, 2016).

Actualmente, la clasificación FAB sigue siendo un sistema para describir las LA (Govindan y Morgensztern, 2016). En el algoritmo de diagnóstico, la evaluación morfológica de la médula ósea representa el primer paso en la vía diagnóstica (Chiaretti, Zini y Bassan, 2014) y es la primera herramienta para distinguir una LLA de una LMA (Rodak, Fritsma y Keohane, 2014), la inmunofenotipificación permite confirmar el linaje y subclasificarlos de acuerdo con el grado de maduración. Estos análisis se realizan de manera rápida, realizar el diagnóstico oportuno permite tratar inmediatamente al paciente ya que las LA son fatales si no se tratan a tiempo. El análisis morfológico revela los porcentajes de blastos, bastones de Auer y presencia de mielodisplasia en las células (Creutzig et al., 2012). La citometría de flujo multiparamétrica (CMF) permite medir diferentes parámetros de una célula (tamaño, complejidad, expresión de antígenos), así es posible caracterizar una célula por su fenotipo (Juárez y Pérez, 2010), lo que lleva a una mejor identificación de las poblaciones anormales (Peters y Ansari, 2011).

En México, desde 1953 a 1983, el diagnóstico y clasificación de las LA se basaba solamente en criterios morfológicos, en 1983 se implementó la clasificación inmunológica (Ruiz, 2016). Se han realizado estudios para conocer el grado de correlación entre el análisis morfológico y el inmunofenotípico, en 2002 el Dr. Alejandro Ruíz Arguelles reportó una correlación de 73% de 648 casos de LA (Ruiz, 2002) y Marsán y col., reportaron en 2016 un 81.3% de correspondencia (Marsán et al., 2016). En el presente trabajo se determinó el grado de correlación entre el análisis morfológico y la inmunotipificación por CFM en el diagnóstico y clasificación de LA en pacientes pediátricos con sospecha de LA del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

# MARCO TEÓRICO

## 1.1. Hematopoyesis

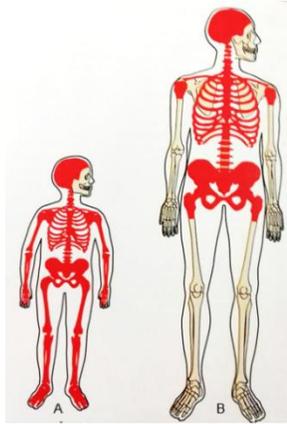
La hematopoyesis (*hema*, “sangre”; *poiesis*, “formación”) (Fortoul, 2013) es un proceso continuo y regulado (Rodak et al., 2014) que comienza a nivel de la célula troncal hematopoyética (CTH) con la auto-renovación, proliferación, diferenciación y maduración, culminando con la producción de elementos formes sanguíneos funcionales (Ruiz y Ruiz, 2014). Este procesos tiene lugar dentro del embrión e implica la generación de las CTH que aparecen en el día 27 de gestación (Jagannathan y Zon, 2013), son los arquitectos de la hematopoyesis definitiva, es decir, la producción de células sanguíneas que ocurre continuamente durante la vida del organismo (Ng y Alexander, 2017). Las CTH se originan en la arteria vitelina y en la región aorta-gónada-mesonefros (AGM). Después del día 40 de gestación, las CTH migran a la placenta, al hígado fetal y al bazo, principales sitios para su expansión (Rieger y Schroeder, 2012) (Lee, Decker, Lee y Ding, 2017) y finalmente se trasladan a la médula ósea (MO), ubicación de las CTH en los adultos (Jagannathan y Zon, 2013). Después del nacimiento, la MO es el principal sitio hematopoyético. En los primeros años de vida, la hematopoyesis ocurre tanto en el esqueleto axial como en el apendicular y luego, hay una disminución gradual de la hematopoyesis en los huesos largos hasta alrededor de los 15 años. A partir de esta edad, la hematopoyesis activa está confinada a los cuartos proximales de los ejes del fémur, el húmero y en la porción central del esqueleto (esqueleto axial) (Figura 1) (Proytcheva, 2013).

### 1.1.1. Médula ósea.

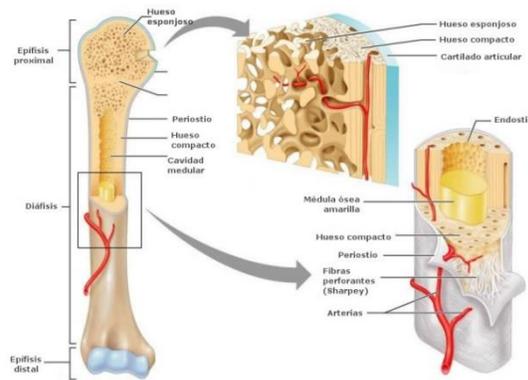
La médula ósea (MO) es un tejido de origen mesodérmico con dos componentes: hematopoyético y estromático (Granados, Arrieta y Cantú, 2013), localizado dentro de las cavidades de los huesos corticales (o compacto). Estas cavidades constan de hueso trabecular (o esponjoso) semejante a un panal de abejas. La MO puede ser de dos tipos: *médula roja* o hematopoyética y, *médula amarilla* compuesta principalmente por adipocitos (Rodak et al., 2014), Figura 2.

La médula roja presenta cordones extravasculares los cuales están separados de la luz de los sinusoides por células endoteliales y de la adventicia y se encuentran entre las trabéculas del hueso esponjoso (Rodak et al., 2014). Las células hematopoyéticas tienden a desarrollarse en nichos específicos dentro de los cordones (Figura 3). Las CTH se

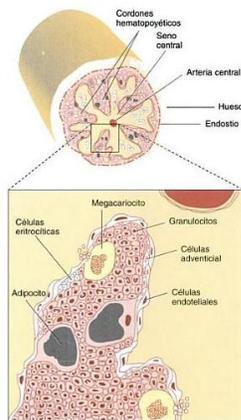
concentran en el *nicho vascular* (adyacentes a los sinusoides en toda la MO) (Morrison y Scadden, 2014) y en el *nicho osteoblástico* (adyacentes a los osteoblastos regulados por la proteína morfogenética) (Ruiz y Ruiz, 2014).



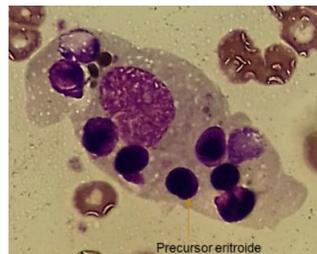
**Figura 1. Sitios de la hematopoyesis.** A) La médula ósea roja (áreas en rojo) se encuentra en todo el sistema esquelético en los niños. B) la médula amarilla reemplaza la médula roja en el adulto, la hematopoyesis se produce en la porción central del esqueleto. Imagen: Turgeon, 2012.



**Figura 2. Partes del hueso largo y ubicación de la médula ósea.** Recuperado de <http://www.nutriendotusalud.es/calcio-introduccion/>



**Figura 3. Ubicación de los componentes hematopoyéticos en la médula ósea.** Imagen tomada de Rodak, 2004.



**Figura 4. Macrófago con precusores eritroides.** Extendido de aspirado de médula ósea. Se observa un macrófago con núcleo excéntrico y abundante citoplasma donde se encuentran los precusores eritroides. Tinción de Wright, 1,000x. Imagen: Esmeralda Nuñez Hernandez, 2019.

Los eritroblastos se desarrollan en pequeños grupos adyacentes a las superficies externas de los senos vasculares y se agrupan en islotes alrededor de los macrófagos y éstos, a modo de células nodriza, les proporcionan ferritina (Figura 4). Los

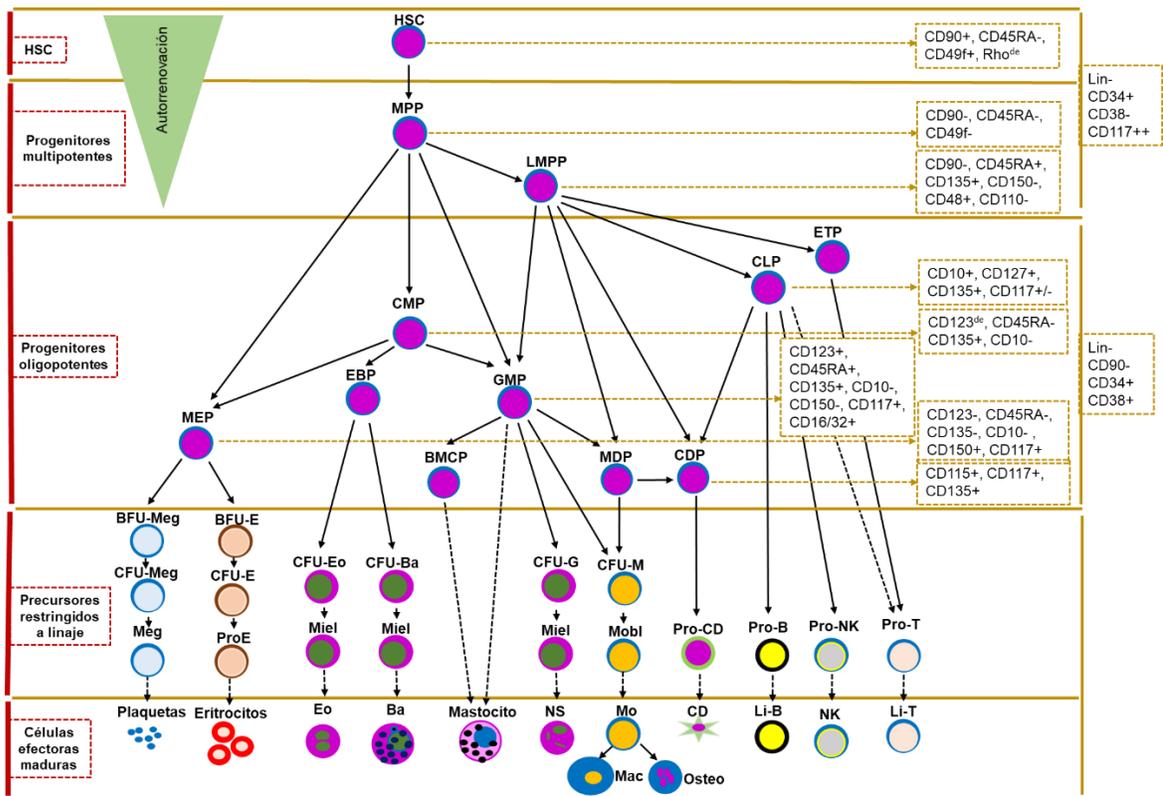
megacariocitos se sitúan en la proximidad de los sinusoides cuya pared es atravesada por fragmentos de citoplasma megacariocítico (plaquetas). Las células linfoides no presentan una ubicación precisa y generalmente se distribuyen de manera irregular por todo el tejido hematopoyético. La granulopoyesis se desarrolla en la parte más central de los espacios intesinusoides (Sans, Besse, Vives, 2006).

### **1.1.2. Estructura jerárquica del sistema hematopoyético.**

El sistema hematopoyético se constituye de células mieloides, linfoides, eritroides y megacariocitos. Todos estos linajes se generan en última instancia a partir de CTH multipotentes a través de una jerarquía de diferenciación que incluye múltiples niveles de progenitores (Lee et al., 2017) que restringen su compromiso de linaje (Figura 5): *células troncales hematopoyéticas*: o células madre hematopoyéticas, capaces de auto-renovarse y son multipotentes (originan a los distintos linajes sanguíneos) (Mayani, et al, 2007) (Fortoul, 2013); *células progenitoras multipotentes*: han reducido considerablemente su capacidad de auto-renovación y mantienen el potencial de diferenciación de casi todo el linaje (Kanji, Pompili y Das, 2011); *células progenitoras hematopoyéticas*: éstas han perdido su capacidad de auto-renovación, pero conservan su potencial proliferativo, pueden ser bipotenciales o monopotenciales (Mayani, et al, 2007) (Fortoul, 2013). Estas primeras células tienen una morfología parecida a los linfocitos y no es posible distinguirlas en el frotis de MO (Fortoul, 2013); *células precursoras*: éstas ya son reconocibles por su morfología (Mayani, et al, 2007) (Fortoul, 2013) y, *células sanguíneas circulantes*: los precursores hematopoyéticos al madurar generan a las células sanguíneas maduras (Mayani, et al, 2007) (Fortoul, 2013).

La diferenciación de una célula multipotente a un linaje específico implica un cambio global de su expresión génica, para que esta expresión sea estable, requiere la presencia y la actividad de un conjunto de distintos factores de transcripción que interactúan entre sí (Rieger y Schroeder, 2012). Cada día, se debe producir alrededor de un billón de células sanguíneas nuevas para reponer las pérdidas diarias (Ramalingam, Poulos y Butler, 2017), se debe generar la cantidad adecuada de células específicas en el momento y lugar correctos. Para lograrlo, las decisiones deben elegirse correcta y constantemente en las CTH: quiescencia vs. proliferación, auto-renovación vs. diferenciación, elección de linaje, supervivencia vs. muerte y, sessilidad vs. migración. El tiempo exacto y el orden secuencial de todas las elecciones en cada célula

sustentan la hematopoyesis normal. Estas decisiones están controladas por las propiedades intrínsecas de la CTH y de las señales extrínsecas del microambiente hematopoyético (Ramalingam et al., 2017) el cual consiste en una estructura tridimensional, altamente organizada, de células del estroma (Mayani, et al, 2007): células mesenquimales, osteoblastos, fibroblastos, adipocitos, macrófagos, células endoteliales y reticulares (Dorantes y Pelayo, 2012) y sus productos (Mayani, et al, 2007). Las interrupciones de las decisiones normales de destino celular dan origen a los trastornos hematológicos (Rieger y Schroeder, 2012).

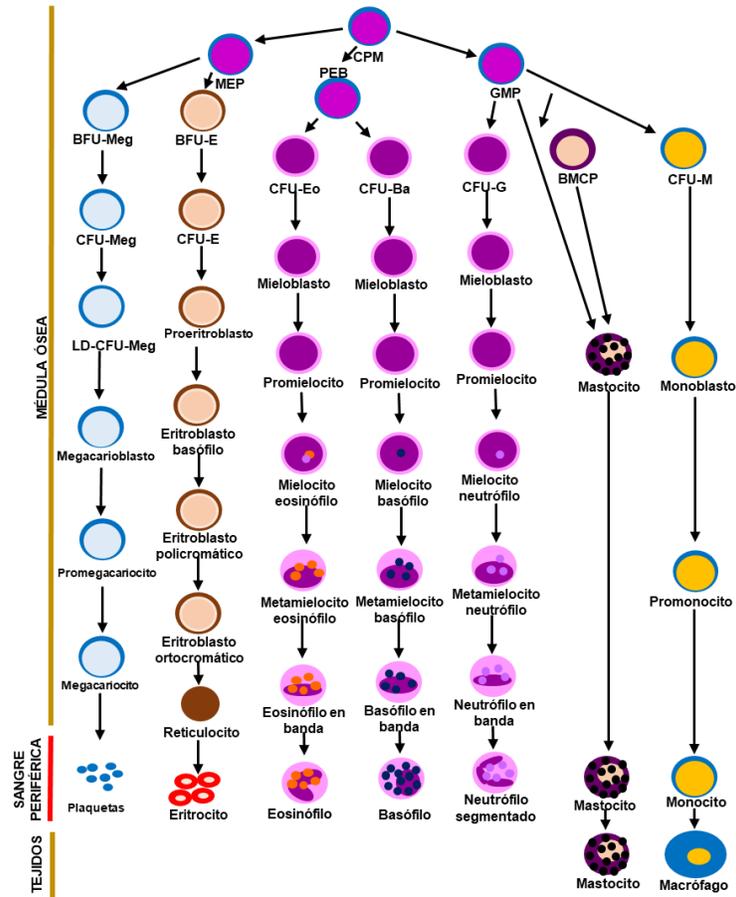


**Figura 5. Jerarquía del sistema hematopoyético.** La HSC reside en la parte superior de la jerarquía, esta célula primero pierde la capacidad de auto-renovación y se diferencia en una célula progenitora con un potencial de multilinaje decreciente para que finalmente ocurra el compromiso de unilinaje. Se muestran las características fenotípicas de las subpoblaciones en diferenciación en humanos. HSC: célula troncal hematopoyética; MPP: progenitor multipotente; LMPP: progenitor multipotente predispuesto al linaje linfocítico; CLP: progenitor linfocítico común; ETP: progenitor temprano de células T; CMP: progenitor mieloide común; MEP: progenitor de megacariocitos y eritrocitos; GMP: progenitor de granulocitos y monocitos; EBP: progenitor de eosinófilos y basófilos; MDP: progenitor de monocitos y células dendríticas; CDP: progenitor dendrítico común; BMCP: progenitor de basófilos y mastocitos; BFU-Meg: unidad formadora de brote megacariocítico; BFU-E: unidad formadora de brote eritroide; CFU-Meg: unidad formadora de colonias megacariocíticas; CFU-E: unidad formadora de colonias eritroides; CFU-G: unidad formadora de colonias de granulocitos; CFU-M: unidad formadora de colonias de monocitos; CFU-Eo: unidad formadora de colonias de eosinófilos; CFU-Ba: unidad formadora de colonias de basófilos; ProE: proeritroblasto; MiE: mieloblasto; MoB: monoblasto; Pro: progenitor; Li: linfocito; NK: célula *Natural Killer*; Lin: marcadores de linaje; de: débil.

Mayani et al, 2007; Rieger y Schroeder, 2012; Cano y Lopera, 2013; Dahlin y Hallgren 2014; Baladrán y Pelayo 2016; Keohane, Smith y Walenga, 2016; modificado.

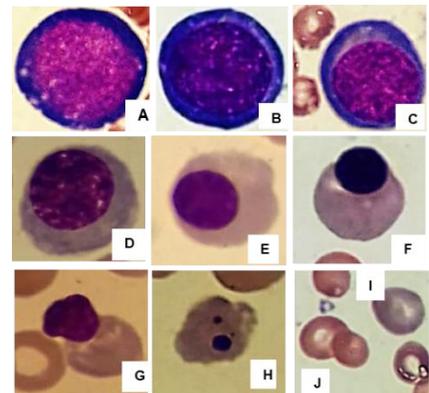
### 1.1.3. Leucopoyesis.

#### 1.1.3.1. Mielopoyesis.



**Figura 6. Mielopoyesis.** Se muestran las diferentes etapas de maduración de las células que se originan a partir del CMP. Mayani, et al, 2007; Dahlin y Hallgren 2014, Keohane et al., 2016; modificado.

**Figura 7. Etapas de maduración del eritroblasto.** A) Proeritroblasto, B y C) eritroblastos basófilos, D) eritroblasto policromático. E y F) eritroblastos ortocromáticos, nótese el núcleo completamente condensado de F con respecto al núcleo de E, además el núcleo es cada vez más excéntrico; en G el núcleo ya está siendo expulsado. En H, están presentes cuerpos de *Howell-Jolly*. I) reticulocito, el citoplasma es policromatófilo y es ligeramente más grande que los eritrocitos, J) eritrocitos. Médula ósea. Tinción de *Wright*, 1,000x. Imagen: Esmeralda Nuñez Hernandez, 2019.

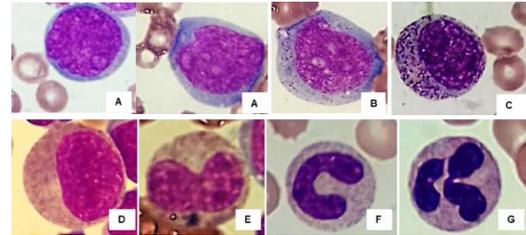


Las células mieloides se derivan del progenitor mielode común (CMP) y comprenden los granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos), monocitos, eritrocitos y megacariocitos; las células cebadas (mastocitos) se originan de mismo progenitor, sin embargo, no se consideran como leucocitos (Dahlin y Hallgren 2014). Las etapas de

maduración de estas células se muestran en la Figura 6. En las Figuras 7-11 se muestran mediante imágenes la morfología de las diferentes células sanguíneas.

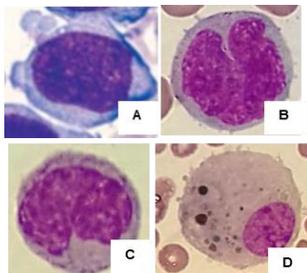
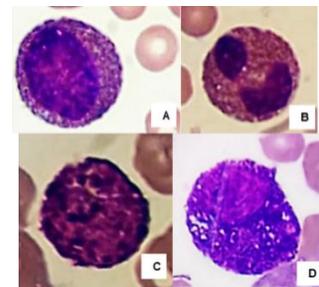
**Figura 8. Etapas de maduración del neutrófilo.**

A) mieloblasto tipo I, B) mieloblasto tipo III, C) promielocito, D) mielocito neutrófilo, E) metamielocito neutrófilo, F) neutrófilo en banda, G) neutrófilo segmentado. Conforme la célula va madurando la condensación de la cromatina es cada vez mayor, los gránulos secundarios que ya se notan en los mielocitos permiten que el citoplasma adquiera un color rosa-naranja. Médula ósea. Tinción de Wright, 1,000x. Imagen: Esmeralda Nuñez Hernandez, 2019.

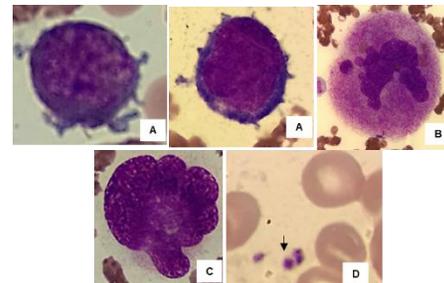


**Figura 9. Morfología del eosinófilo, basófilo y mastocito.**

A) mielocito eosinófilo, B) eosinófilo, éstas células presentan gránulos secundarios color rojo naranja y son de tamaños más pequeños que algunos de los gránulos del basófilo, C) basófilo, presenta gránulos color azul oscuro y son de tamaños variables, D) mastocito, se nota claramente el núcleo el cual es redondo y excéntrico, el citoplasma contiene abundantes gránulos de color azul oscuro a negro y son más pequeños que los gránulos del basófilo. Médula ósea. Tinción de Wright, 1,000x. Imagen: Esmeralda Nuñez Hernandez, 2019.



**Figura 10. Etapas de maduración del monocito.** A) Monoblasto, B) Promonocito, C) monocito, D) macrófago. El tamaño del núcleo se reduce conforme la célula va madurando: el en citoplasma del macrófago se observan depósitos de hierro (precipitados color marrón o café). A, tomado de Swerdlow et al, 2008 , B-D, médula ósea. Tinción de Wright, 1,000x. Imagen: Esmeralda Nuñez Hernandez, 2019.



**Figura 11. Precursores megacariocíticos.**

A) Megacarioblastos. Nótese las prolongaciones del citoplasma; B) megacariocito, el citoplasma tiene apariencia esponjosa y es intensamente granular, el núcleo es multilobulado, C) núcleo desnudo del megacariocito. D) plaquetas, presentan un color violeta, compárese el tamaño con el tamaño del eritrocito. Médula ósea. Tinción de Wright, 1,000x. Imagen: Esmeralda Nuñez Hernandez, 2019.

**1.1.3.2. Linfopoyesis.**

El sistema linfoide normal está formado por los órganos linfoides primarios (MO, timo) donde se originan los precursores de los linfocitos B y T y maduran sin presencia de

antígeno (antígeno independiente) y, por los órganos linfoides secundarios (ganglios linfáticos, bazo, tejido linfoide asociado a mucosas, piel y tubo digestivo) donde se inician las respuestas inmunes (antígeno dependiente) (Sans et al., 2006).

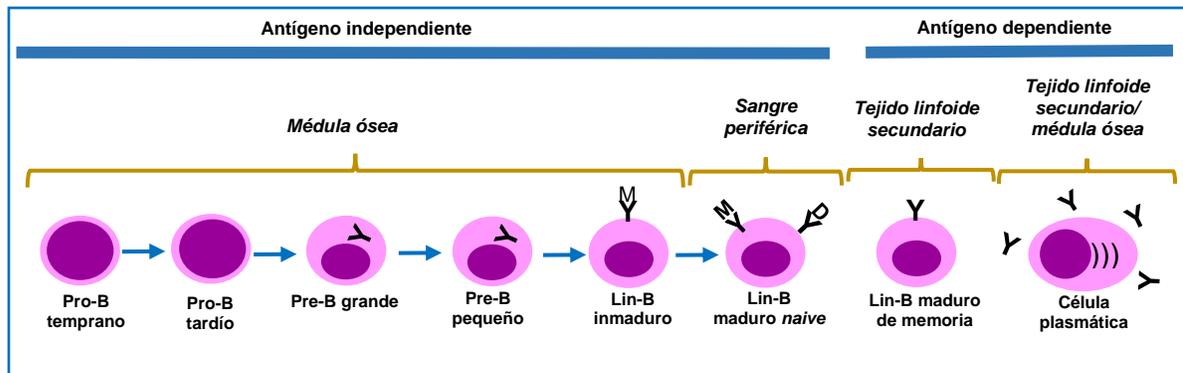
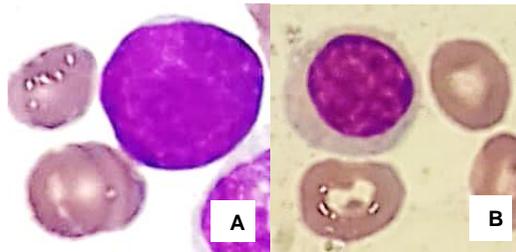
Las primeras etapas de desarrollo de las células B tienen lugar en la MO y alcanzan su madurez funcional con la expresión en la membrana de los receptores de reconocimiento antigénico, las inmunoglobulinas (Ig) de superficie. Las Ig tienen una unidad básica constituida por dos cadenas ligeras kappa ( $\kappa$ ) o lambda ( $\lambda$ ) y dos cadenas pesadas (difieren según el tipo de Ig) unidas por puentes disulfuro (Sans et al., 2006). El *progenitor de células B (pro-B)* es la etapa más inmadura de las células B (Sans et al., 2006); en esta etapa ocurre el reordenamiento de los genes de la cadena pesada de la Ig. La unión de los segmentos génicos  $D_H$  y  $J_H$  ocurre en el estadio de *pro-B temprano*, y en la etapa siguiente que es *pro-B tardío* se une el segmento  $V_H$  al  $DJ_H$  reordenado. En la etapa posterior *pre-B (precursor B) grande* se ha reordenado un gen de cadena pesada y formando una cadena pesada  $\mu$ . Cesan los reordenamientos de genes de cadena pesada. En el siguiente estadio (*pre-B pequeño*) ocurre el reordenamiento de los genes de la cadena ligera, reordenándose primero los genes de la cadena ligera  $\kappa$ . En caso de que estos reordenamientos fallen para producir una cadena viable, se reordenan los genes de la cadena ligera  $\lambda$ . Una vez que se une el segmento V con el J de la cadena ligera, se sintetiza y ensambla una proteína de cadena ligera en el retículo endoplásmico con las cadenas  $\mu$  para formar IgM de membrana. La IgM se asocia con  $Ig\alpha$  (CD79a) e  $Ig\beta$  para formar un complejo receptor del linfocito B funcional, que entonces se transporta a la superficie celular. El reordenamiento de cadena ligera cesa y el pre-B pequeño se transforma a un *linfocito B inmaduro* (Parham, 2016). Posteriormente pasa a *linfocito B maduro virgen*, que sintetiza además de IgM, IgD, esta célula pasa de la MO a sangre periférica (SP) (Sans et al., 2006). La fase final de maduración de los linfocitos B ocurre cuando los linfocitos B inmaduros entran a un tejido linfoide secundario para encontrar a su antígeno específico.

Los precursores de linfocitos B se denominan *hematogonias* (pre-B I, pre-B II y B inmaduro). En un adulto sano se encuentra hasta un 5% de hematogonias en MO (Dorfman, 2017), aparecen en mayor cantidad en bebés y niños sanos y disminuyen significativamente con la edad (Wohlfahrt, Hannel, Oliveira, Soares, y Silva, 2015), se observan normalmente en la SP y MO del recién nacido y también en la MO regenerativa

después de la quimioterapia (Keohane et al., 2016), pueden encontrarse en grandes cantidades en pacientes con citopenias autoinmunes y congénitas o en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (McKenna, Washington, Aquino, Picker y Kroft, 2001).

Las hematogonias miden de 10 a 20  $\mu\text{m}$  de diámetro, el núcleo puede ser redondo u ovalado y a veces muestran una o más hendiduras poco profundas, la cromatina nuclear es ligeramente condensada y homogénea, los nucléolos generalmente están ausentes o de tamaño pequeño e indistinto, escaso o sin citoplasma visible y cuando está presente es moderado a profundamente basófilo y carece de gránulos (McKenna et al., 2001) (Dorfman, 2017). Los blastos leucémicos (Figura 12) de la LLA-L1 se parecen a las hematogonias (Keohane et al., 2016). Si bien las hematogonias tienen características de células inmaduras, no deben llamarse linfoblastos (Wohlfahrt et al., 2015).

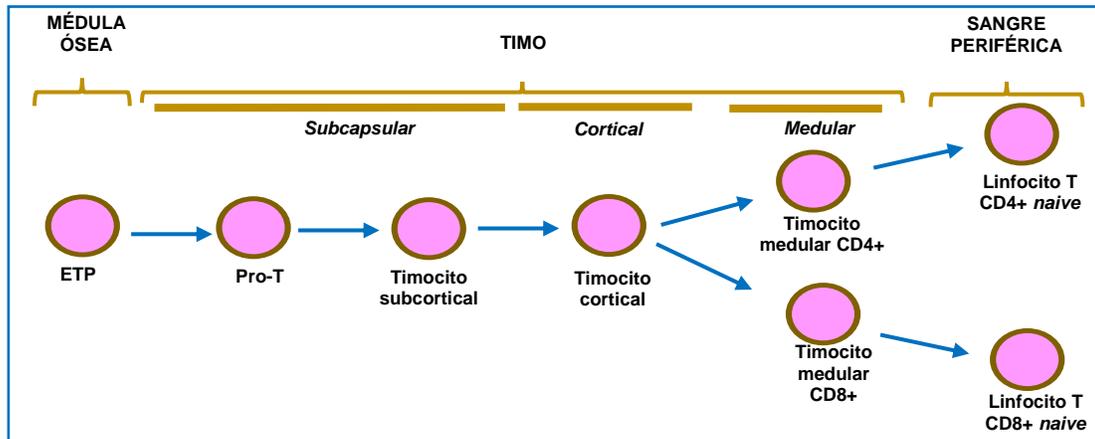
**Figura 12. Diferencia morfológica entre el linfoblasto y linfocito.** A) linfoblasto de LLA pre-B común (LLA-L1, FAB). La relación N:C es alta, la cromatina es ligeramente condensada y homogénea sin aglomeraciones, no presenta nucléolos, una parte del citoplasma es apenas visible; esta célula podría confundirse con una hematogonia. Médula ósea de paciente pediátrico con LLA. B) Linfocito. Baja relación núcleo citoplasma, la cromatina es condensada y aglomerada, no presenta nucléolos y el citoplasma es abundante. Tinción de Wright, 1,000x. Imagen: Esmeralda Nuñez Hernandez, 2019.



**Figura 13. Proceso de maduración del linfocito B en la médula ósea.** Las primeras etapas se encuentran en la médula ósea, la maduración de la célula se lleva a cabo en un tejido linfóide secundario. Parham, 2016; Universidad de Salamanca; 2011; Swerdlow, et al, 2008; modificado.

El timo se especializa en la maduración de los linfocitos T (timocitos). La madurez de los linfocitos T se alcanza con la expresión en la membrana citoplasmática de los

receptores de linfocitos T (TCR). Existen dos tipos de TCR: uno constituido por cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  (TCR $\alpha\beta$ ) y otro formado por las cadenas  $\gamma$  y  $\delta$  (TCR $\gamma\delta$ ) (Sans et al., 2006).



**Figura 14. Proceso de maduración de linfocitos T.** El progenitor temprano de células T (ETP) migra de la médula ósea al timo, sitio donde se lleva a cabo la diferenciación a linfocito T. Universidad de Salamanca, 2011; Swerdlow, et al, 2008; Cano y Lopera, 2013; modificado.

En el estroma tímico, el progenitor temprano de células T (ETP) encuentra un gran número de ligandos para los receptores Notch que posee, así como factores de crecimiento como el ligando kit e IL-7, que desencadenan la diferenciación y proliferación de estas células (Parham, 2016). El ETP se diferencia a pro-T, en esta etapa las células comienzan a expresar proteínas críticas (RAG1 y RAG2) para la posterior reorganización del gen del TCR. Los pro-T pasan a *pre-timocito*, los genes que codifican para las cadenas  $\gamma$  y  $\delta$  están reordenados, posteriormente se reordena la cadena  $\beta$  y se expresa el CD3 en el citoplasma (Cano y Lopera, 2013), posteriormente, en el *timocito intermedio* se reordenan los genes que codifican la cadena  $\alpha$  y se expresan muy débilmente las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  junto al complejo CD3 en la superficie de la célula (Sans et al., 2006). La expresión de la cadena  $\beta$  conecta en cascada la expresión simultánea de las moléculas CD4 y CD8 y de esta manera las células se convierten en dobles positivos (DP). Las células DP que reconocen al antígeno leucocitario humano de clase I (HLA-I) se diferencian en CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> y aquellas que reconocen al HLA-II se diferencian en CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> (células unipositivas) [UP]. En la médula tímica, los timocitos seleccionados positivamente se exponen a varios antígenos propios, las células UP con una alta afinidad para unirse a los autoantígenos se eliminan mediante apoptosis. Los timocitos maduros salen de la médula y son células vírgenes, migran continuamente a los órganos linfoides secundarios para diferenciarse en células efectoras después de un estímulo antigénico (Cano y Lopera, 2013).

Cada estadio de maduración de los linfocitos B y T se muestran en las Figuras 13 y 14 respectivamente.

## **1.2. Leucemias agudas**

### **1.2.1. Definición.**

La leucemia aguda (LA) es un grupo heterogéneo de padecimientos que suponen la proliferación desordenada de células hematopoyéticas inmaduras poco diferenciadas conocidas como blastos (Ruiz y Ruiz, 2014).

Debido a que el destino final de la célula precursora son las células sanguíneas, el precursor leucémico tienen una capacidad inherente para su movilización al torrente sanguíneo y la extravasación, además de una enorme capacidad para viajar por todo el cuerpo sin restricciones, estos atributos pueden explicar por qué las leucemias parecen necesitar menos aberraciones genéticas para su progresión (Whitehead et al., 2016).

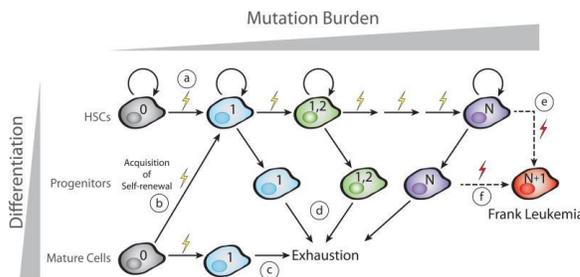
### **1.2.2. Etiología y patogenia.**

El inicio y avance de las leucemias agudas (LA) se asocian con cambios citogenéticos adquiridos, las mutaciones pueden implicar translocaciones de genes, inserciones o deleciones y cambios en las características epigenéticas, como las aberraciones de la metilación del DNA (Whitehead et al, 2016), estos cambios conducen a mutaciones de protooncogenes y a la formación de oncogenes, estos últimos codifican a factores de transcripción mutantes que resultan en trastornos de las vías de señalización celular que alteran las funciones celulares, incluidos el incrementos de la capacidad de auto-renovación, subversión del control de la proliferación normal, bloqueo en la diferenciación e incremento en la resistencia a las señales de muerte celular (apoptosis) (Lichtman, Kaushansky, Kipps, Prchal y Levi, 2014).

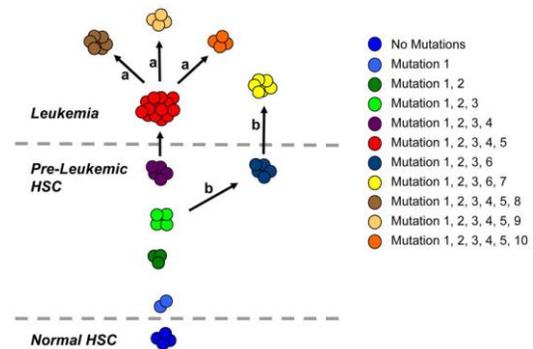
Se ha demostrado que son necesarias múltiples mutaciones para transformar las células normales en un clon leucémico (Jan y Majeti, 2012). Las mutaciones se acumulan en una CTH o en una célula progenitora que, en consecuencia, recupera las características de célula madre (Hackl, Astanina y Wieser, 2017). Estas células que albergan algunas, pero no todas las mutaciones encontradas en el clon leucémico se denominan células pre-leucémicas (Corces y Majeti, 2014).

Un modelo que explica la evolución clonal pre-leucémica, indica que se requiere que la primera mutación leucemogénica ocurra en una CTH (Figura 15a) o que confiera auto-

renovación a una célula más diferenciada (que previamente no tenía la capacidad de auto-renovación) (Figura 15b). Sin embargo, si la primera mutación ocurriera en una célula diferenciada pero no se confiriera una auto-renovación, esta mutación se perdería con el tiempo debido al agotamiento o la diferenciación terminal de este linaje (Figura 15c). En cada etapa de la evolución, estas células que se renuevan automáticamente conservan la capacidad de producir progenie diferenciada, pero se pierden en la diferenciación terminal (Figura 15d) (Lang, Wojcik y Rieger, 2015). Las mutaciones se adquieren en serie en un solo linaje de células (hasta N mutaciones) (Jan y Majeti, 2012). Finalmente, una de estas CTH pre-leucémicas (e) o una de su progenie más diferenciada pre-leucémica (Figura 15f) adquiere una o más (N + 1) mutaciones adicionales que conducen a la pérdida de las funciones normales de la célula y al desarrollo de leucemia franca (Corces y Majeti, 2014) produciendo los blastos leucémicos (Lang et al., 2015).



**Figura 15. Evolución clonal leucémica.** Corces y Majeti, 2014.



**Figura 16. Modelo de la heterogeneidad clonal en la leucemia aguda.** Jan y Majeti, 2012.

En algunos casos de LA, se ha demostrado que existen múltiples subclones de células pre-leucémicas, esta heterogeneidad clonal generalmente consiste en distintas subpoblaciones con un clon leucémico dominante (población en rojo, de Figura 16). Hay varias posibilidades para la generación de clones leucémicos adicionales: el clon dominante puede experimentar eventos mutacionales adicionales para generar distintos subclones hijos (café, marrón y naranja) (Figura 16a), un clon pre-leucémico común puede experimentar una evolución divergente para generar un clon leucémico distinto, pero relacionado (amarillo) (Figura 16b). En última instancia, la población total de células leucémicas consiste en estos múltiples subclones con una relación genética compleja, mutaciones comunes y divergentes (Jan y Majeti, 2012). Las primeras

mutaciones estarían presentes en todas las células leucémicas, mientras que las mutaciones presentes en los subclones leucémicos serían las últimas mutaciones (Corces y Majeti, 2014).

**Tabla 1. Factores predisponentes de las leucemias agudas.**

<b>FACTORES</b>	<b>COMENTARIOS</b>
<b>Genético</b>	Síndrome de Down, síndromes que afectan la estabilidad genómica o la reparación del DNA (ataxia telangiectasia, síndrome de rompimiento de Nijmegen). Policitemia vera, trombocitemia esencial, citopenias clonales, leucemia mieloide crónica, hemoglobinuria paroxística nocturna, síndrome de Kostmann, síndrome de Diamond-Blackfan, anemia de Fanconi, neurofibromatosis y trastornos poliendocrinos pueden evolucionar a una LMA.
<b>Infecciones virales</b>	El VEB, el VIH, y los HTLV I y II en algunos casos de leucemias del adulto, han sido los únicos con una clara asociación. En la LMA, no hay evidencia directa que sugiera alguna etiología viral.
<b>Productos químicos ambientales</b>	La translocación ETV6-RUNX1 y la leucemia mielomonocítica parecen estar relacionados con el tabaquismo y el uso de pintura en el hogar. Pesticidas, benceno y los hidrocarburos aromáticos policíclicos (dibenzo [a,h] antraceno) son carcinógenos humanos. La exposición al cloroformo, meta/para-xileno y tolueno en los primeros años de vida se ha relacionado con la LMA.
<b>Radiación</b>	La exposición <i>in útero</i> (pero no posnatal) a los rayos X incrementa el riesgo. La radiación terapéutica parece generar un riesgo bajo, pero puede incrementarse en personas también expuestas a sustancias alquilantes.
<b>Fármacos</b>	Los agentes quimioterapéuticos son la causa principal de LMA, el cloranfenicol, fenilbutazona y, con menor frecuencia, cloraquina y metoxipsoraleno pueden inducir insuficiencia de la MO que evoluciona a LMA.
<b>Dieta materna</b>	Un alto consumo de carne y azúcares durante el embarazo se ha asociado con un mayor riesgo de LLA, la exposición a inhibidores de la topoisomerasa II durante el embarazo es factor de riesgo para desarrollar LMA.
<b>Origen étnico</b>	Poblaciones nativo-americanas tienen mayor prevalencia de LLA. La LLA-T es hasta 1.7 veces mayor en población afroamericana que en el resto de las poblaciones, el gen ETV6-RUNX1 es más común en caucásicos.

VEB: virus de Epstein Barr; VIH: virus de la inmunodeficiencia humana; HTLV: virus linfotrópico de células T Humanas. Lassaletta, 2012; Longo et al., 2012; Lichtman et al, 2014; Zhang et al, 2014 y Whitehead et al, 2016.

La causa de las LA no se conoce con precisión, se sabe que existen diversos factores que predisponen a sufrir estas hemopatías (Tabla 1) (Longo, Kasper, Larry, 2012); la LMA puede aparecer en pacientes con un trastorno hematológico subyacente o como consecuencia de un tratamiento previo, sin embargo, en la mayoría de los casos, aparecen como una neoplasia de *novo* en individuos previamente sanos (Terwilliger y Abdul, 2017).

### 1.2.3. Epidemiología.

Las leucemias agudas (LA) constituyen las neoplasias más frecuentes en la edad pediátrica (Rendón, Reyes, Villasís, 2012). A nivel mundial, la LLA representa el 76% de los casos de leucemia infantil (Hossain, Xie & McCahan, 2014) y la LMA, el segundo subgrupo

más grande en niños (predomina en el periodo neonatal, pero representa una pequeña proporción de casos durante la infancia y la adolescencia) (Lagunas, 2016) y es el tipo de leucemia más común en adultos (Zhang, Samad, Pombo, Scelo, Smith, Feusner,... Metayer, 2014). Su incidencia se estima entre 20 a 35 casos por cada millón de habitantes al año (Rendón et al., 2012), sin embargo, en la población de América Latina la incidencia es mayor (Gómez, Marcos, Montaña, Ruiz, 2016).

En México, en pacientes de 0 a 18 años, la leucemia es el cáncer más común, en 2012, la incidencia fue 78.1/1,000,000/año. La prevalencia fue de 49.8%, con predominio de la LLA (83 %), seguida de la LMA (13.1 %) y los varones representaron el 54.4% de los pacientes con LA (Rivera et al., 2014).

#### **1.2.4. Leucemia linfoblástica aguda (LLA).**

La LLA es una enfermedad neoplásica de células precursoras linfoides, ya sea de linaje B o T. Se ve involucrada extensamente la MO y SP (Swerdlow, Campo, Lee, Jaffe, Pileri, Stein, Vardiman, 2008). La proliferación descontrolada y acumulación de los blastos leucémicos en la MO compromete la producción de otros tipos de células sanguíneas, lo que conduce a importantes deficiencias en el sistema inmunológico y fisiológico del paciente, que finalmente resulta en la muerte (Malouf y Ottersbach, 2017).

##### **1.2.4.1. Características clínicas.**

Los síntomas pueden ser inespecíficos y agudos y tener características generales que reflejan el grado de insuficiencia de la MO (anemia y/o trombocitopenia y/o leucopenia) y la amplitud de la diseminación extramedular (Terwilliger y Abdul, 2017).

- Síntomas B (fiebre, pérdida de peso, sudores nocturnos), infecciones, petequias, equimosis y hemorragias. (Terwilliger y Abdul, 2017).
- Signos y síntomas de anemia como palidez, fatiga y letargo (Lichtmann et al, 2014).
- Hay linfadenopatía, esplenomegalia y hepatomegalia en 20% de los pacientes (Terwilliger y Abdul, 2017).
- Dolor óseo o articular secundario a la infiltración de blastos o a necrosis de MO.
- En la LLA-T más del 8% de niños presentan una masa mediastinal anterior que puede comprimir los vasos y tráquea, causando el síndrome mediastinal superior.

- Puede presentarse agrandamiento indoloro del escroto debido a la infiltración testicular o a la obstrucción linfática por las células leucémicas.

Los signos y síntomas menos frecuentes son los derivados por la infiltración de los blastos al SNC (cefalea, trastornos del funcionamiento mental), sistema colector renal (oliguria), oculares (diplopía, pérdida de la visión), glándulas salivales (síndrome de Mikulicz), nervios periféricos (parálisis de los nervios craneales), piel (cutis leucémico) o las venas dorsales o los nervios sacros (priapismo) (Lichtmann et al. 2014).

#### **1.2.4.2. Datos de laboratorio.**

Es frecuente que se presente anemia, neutropenia y trombocitopenia.

- Puede presentarse leucopenia con leucocitos de  $100/\mu\text{L}$ , cifras normales y, en más del 10% de los casos hay hiperleucocitosis con blastos circulantes.
- Hasta el 16% de los pacientes carece de blastos en SP en el momento del diagnóstico (Lichtmann et al. 2014).
- Rara vez la anemia es el único hallazgo en niños con LLA (Doric, 2015).
- Pueden encontrarse células blásticas en el líquido cefalorraquídeo (LCR)
- Pocos pacientes, principalmente masculinos, presentan trombocitosis ( $>400 \times 10^3$  plaquetas/ $\mu\text{L}$ ).
- En 5% de los casos de LLA-T, hay coagulopatía leve.
- Niveles bajos de IgA e IgM, en la LLA-B.
- En la mayoría de los casos se eleva la deshidrogenasa láctica (LDH).
- Niveles elevados de ácido úrico en pacientes con gran carga tumoral.
- En afectación renal se incrementa el nivel de creatinina, ácido úrico y fósforo.
- Los hallazgos menos frecuentes incluyen hipercalcemia, hiperuricemia, elevación sérica de transaminasas (por infiltración hepática) o uremia (por insuficiencia renal secundaria a infiltración renal).
- En la mitad de pacientes pediátricos hay osteólisis, osteoesclerosis u osteopenia (Lichtmann et al, 2014).

Algunos pacientes pueden presentar inicialmente pancitopenia y una MO hipoplásica, lo que sugiere el diagnóstico de anemia aplásica (AA). Esta aplasia es transitoria y ocurre aproximadamente en el 2% de los casos de LLA infantil y, por lo tanto, se considera una condición pre-leucémica. La relación etiológica entre la AA y la LLA no

está bien establecida y no está claro si el proceso leucémico sigue a la aplasia o si ya está presente en el diagnóstico de AA (Villarreal, Jaime, Rodríguez, González y Gómez, 2012).

### 1.2.4.3. Factores pronósticos.

Tabla 2. Factores pronósticos de la LLA infantil.

PARÁMETRO	NIVEL DE RIESGO			
	BAJO	ESTÁNDAR	ALTO	MUY ALTO
<b>Edad</b>	1 a 9 años	1 a 9 años	<1año y >10 años	>15 años
<b>Leucocitos al momento del diagnóstico en SP</b>	<50,000/μL	<50,000/μL	>50,000/μL y <100,000/μL	>100,000/μL
<b>Citogenética</b>	Hiperdiploidía (>50 cromosomas)		Hipodiploidía (<45 cromosomas)	Hipodiploidía (<45 cromosomas)
<b>Biología molecular</b>	t(12;21)(p13;q22) ETV6-RUNX1 (TEL-AML1) TLX1 [LLA-T] Mutación en NOTCH1 [LLA-T]	t(1;19)(q23;p13.3)/E2A-PBX1	t(8;14), t(2;8), t(8;22) que involucran a c-MYC t(4; 11)/MLL-AF4 Pérdida del gen CDKN2A/B (ocurre en más del 40% de los casos de LLA pre-B)	t(9;22)(q34;q11)/BCR-ABL1 (Ph+)  t(v;11q23); MLL reordenado
<b>Inmunofenotipo</b>	LLA-B (principalmente B-II)	LLA-T  LLA-B	LLA-T LLA-Pro-B Co-expresión de antígenos mieloides en blastos linfoides LLA-ETP	
<b>Sexo</b>	Femenino		Masculino	
<b>SNC</b>	Sin afectación		Con afectación	Con afectación
<b>Enfermedad extramedular</b>			Hepatoesplenomegalia, linfadenopatía	

SP: sangre periférica; SNC: Sistema nervioso central; ETP-ALL: LLA Precursor Temprano de células T; Ph+: Cromosoma Philadelphia positivo. Pérez, 2011, Lichtmann et al, 2014; Rodak et al., 2014; Jiménez et al., 2016 y Lee y Cho, 2017.

Las características clínicas (masa inicial de células leucémicas reflejada por el conteo sanguíneo leucocitario, edad y presencia de enfermedad extramedular), morfológicas, inmunofenotípicas y moleculares son factores pronósticos que se consideran para valorar el riesgo de recaída.

Los pacientes con bajo riesgo son tratados con terapias menos agresivas, mientras que los tratamientos más agresivos y tóxicos o terapias innovadoras están reservados

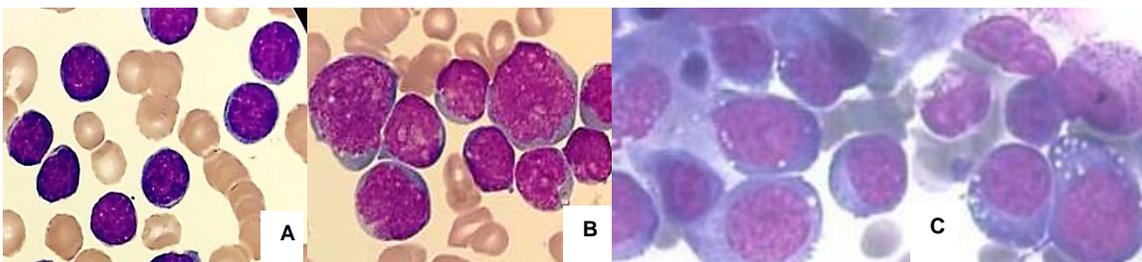
para los pacientes con alto riesgo de recaída (Jiménez, Hidalgo y Ramírez, 2016). En los casos pediátricos, los grupos de riesgo se dividen como se muestra en la Tabla 2.

Las aneuploidías son factores pronósticos (hiperdiploidía alta >50 cromosomas e hipodiploidía <44 cromosomas), la hiperdiploidía se asocia con mayor apoptosis y sensibilidad a una gran variedad de agentes quimioterapéuticos, y por ende mejor respuesta al tratamiento. La fusión de los genes BCR-ABL1 (cromosoma Philadelphia) está asociada a un mal pronóstico, estos pacientes son candidatos a terapias más innovadoras, incluyendo trasplante de MO durante la primera remisión (Jiménez et al., 2016).

#### **1.2.4.4. Clasificación del grupo FAB.**

Las LLA se clasifican en L1, L2 y L3, las cuales se definen de acuerdo con sus características morfológicas (tamaño celular, cromatina nuclear, forma nuclear, nucléolos, grado de basofilia del citoplasma) y por el grado de heterogeneidad en la distribución de células leucémicas (Figura 17 y Tabla 3). Para cada una de las características consideradas, hasta el 10% de las células pueden variar (Bennet et al, 1976). Las LLA-L2 puede presentar problemas para su diferenciación con las L1, de ahí que existen criterios para clasificarlas (Tabla 4).

Los gránulos azurófilos finos en el citoplasma de los linfoblastos en extendidos teñidos con Romanowsky están presentes en casos raros de L2 (Bennett et al, 1976), sin embargo, nunca se observan bastones de Auer (Bain, Bates, Blackmore, Bradsha, Catovsky, De la Salle,... Worwood, 2008) y son negativos a MPOx y a cloroacetato esterasa (principal diferencia entre L2 y M1) (Bennett et al, 1976).



**Figura 17. Morfología de los linfoblastos.** A) subtipo L1, blastos pequeños sin nucléolos visibles. B) subtipo L2, blastos de diferentes tamaños y nucléolos prominentes. C) Subtipo L3, blastos grandes, citoplasma intensamente basófilo y presencia de vacuolas citoplasmáticas. *Médula ósea. Tinción de Wright, 1,000x. Imágenes A y B: Esmeralda Nuñez Hernandez, 2019; imagen C: Chiaretti et al., 2014.*

**Tabla 3. Clasificación morfológica de las LLA según el grupo FAB.**

CARACTERÍSTICA	L1	L2	L3 *
<b>Tamaño celular</b>	Predominan células pequeñas	Tamaño heterogéneo	Grandes, tamaño homogéneo.
<b>Cromatina</b>	Homogénea	Variable, heterogénea	Finamente punteada y homogénea
<b>Contorno nuclear</b>	Regular con hendidura ocasional	Irregular con indentaciones	Regular, oval o redondo
<b>Nucléolo</b>	Invisible o pequeños y discretos	Uno o más, frecuentemente prominentes	Prominentes, uno o más vesiculosos
<b>Citoplasma</b>	Escaso	Variable, a veces moderadamente abundante	Moderadamente abundante
<b>Basofilia citoplasmática</b>	Ligera o moderadamente intensa	Variable, en algunos intensamente	Muy intensa
<b>Vacuolas citoplasmáticas</b>	Variable	Variable	A menudo prominentes
<b>Ácido periódico de Schiff (PAS)</b>	+	+	-
<b>Mieloperoxidasa</b>	-	-	-
<b>Fosfatasa ácida</b>	+ (LLA-T)		

\*Tipo Burkitt. Bennet et al, 1976; Rodak, 2004; Freund, 2014.

**Tabla 4. Criterios de puntuación para diferenciar una L1 de una L2 según la FAB.**

CLASIFICACIÓN	PUNTO	CRITERIO
L1	+	Alta relación núcleo:citoplasma en $\geq 75\%$ de los blastos
L1	+	Nucléolos: 0 a 1 (pequeño) en $\geq 75\%$ de los blastos
L2	-	Baja relación núcleo:citoplasma en $\geq 25\%$ de los blastos
L2	-	Nucléolos: 1 ó más (prominentes) en $\geq 25\%$ de los blastos
L2	-	$\geq 25\%$ de células grandes
L2	-	Membrana nuclear irregular en $\geq 25\%$ de los blastos
No se valoran: Membrana nuclear regular en $\geq 75\%$ de los blastos <math>< 50\%</math> de blastos grandes		
Se consideran: L1: Si hay de 0 a 2 puntos positivos. L2: Si hay de 1 a 4 puntos negativos.		

Modificado de Arroyo, Sáenz, y Valenciano, 1982.

#### **1.2.4.5. Clasificación del grupo EGIL.**

La LLA-B y T se subdividen en cuatro subtipos (Tabla 5). Es importante mencionar que no todos los casos de LLA expresan antígenos para un solo linaje, éstas se denominan

LLA con expresión aberrante de antígenos (infidelidad de linaje) (Bene, Castoldi, Knapp, Ludwig, Matutes, Orfao y van't Veer, 1995).

**Tabla 5. Clasificación inmunológica de las LLA de acuerdo con el Grupo EGIL.**

LINAJE	SUBTIPO EGIL	MARCADOR
<b>B</b>	Pro-B	HLA-DR+, TdT+, CD34+, CD19+ y/o CD22+ y/o CD79a+, CD10-
	Pre-B común	HLA-DR+, TdT+, CD34+, CD19+ y/o CD22+ y/o CD79a+, CD10+
	Pre-B	HLA-DR+, TdT+, CD34-, CD19+ y/o CD22+ y/o CD79a+, cyI $\mu$ , CD20 <sup>het</sup>
	Madura	HLA-DR+, TdT-, CD34-, CD19+ y/o CD22+ y/o CD79a+, cyI $\mu$ , sI $\mu$
<b>T</b>	Pro-T	CD7 +
	Pre-T	CD7+, cyCD3 +, CD5+ CD2 +/-
	T-Cortical	CD7+, cyCD3 +, CD1a +, sCD3 +/- CD5+, CD2+, CD4+, CD8++
	T-madura	CD7+, cCD3 +, sCD3 +, CD2+, CD4 ó CD8+
<b>LLA+My</b>	LLA con infidelidad de linaje	LLA con uno o dos marcadores mieloides

cyI $\mu$ : cadena mu citoplásmica de la IgM; CD20 (antígeno de diferenciación restringido a los linfocitos B humanos). Modificado de Bene et al, 1995; Chiaretti, et al., 2014 y Antica, 2011.

De acuerdo con el EGIL, para definir una reacción positiva de las células frente a un anticuerpo monoclonal (AcMo) determinado, el umbral de positividad debe ser de 20%, a excepción de MPOx, CD3, CD79a y TdT, los cuales se consideran positivos con un mínimo de 10% de nivel de expresión (Chiaretti et al., 2014).

#### **1.2.4.6. Clasificación de la OMS.**

La OMS cambia la agrupación de LLA para una mayor comprensión de la biología y la patogénesis molecular de estas enfermedades y descarta los términos L1, L2 y L3. (Antica, 2011), a la LLA-B de células maduras la considera como linfoma de Burkitt (Terwilliger y Abdul, 2017) (Tabla 6).

#### *Inmunofenotipo de la LLA de Precursor Temprano de células T (ETP ALL)*

En 2009, el Hospital *St. Jude Children's Research* identificó un nuevo subgrupo de LLA-T pediátrica y fue designada como LLA de Precursor Temprano de células T, esta leucemia se caracteriza por un inmunofenotipo específico: CD1a-, CD8-, CD5<sup>débil</sup> (<5% de células positivas) (Neumann, Heesch, Gökbuget, Schwartz, Schlee, Benlasfer,... Baldus, 2012) y expresión (> 25% de células positivas) de al menos uno o más de los siguientes

marcadores de células madre o mieloides: CD117+, CD34+, HLA-DR+, CD13+, CD33+, CD11b+ o CD65+ (Haydu y Ferrando, 2013).

**Tabla 6. Neoplasias de precursores linfoides, de acuerdo con la OMS, 2016.**

TIPO	SUBTIPO
<b>Leucemia/ linfoma linfoblástico B</b>	Leucemia/linfoma linfoblástico B no especificado de otra manera ( <i>NOS</i> )
	Leucemia/linfoma linfoblástico B con anomalías genéticas recurrentes
	Leucemia/linfoma linfoblástico B con t(9;22)(q34.1;q11.2);BCR-ABL1
	Leucemia/linfoma linfoblástico B con t(v;11q23.3); con rearrreglo de KMT2A
	Leucemia/linfoma linfoblástico B con t(12;21)(p13.2;q22.1); ETV6-RUNX1
	Leucemia/linfoma linfoblástico B con t(5;14)(q31.1;q32.3); IL3-IGH
	Leucemia/linfoma linfoblástico B con t(1;19)(q23;13.3); TCF3-PBX1
	Leucemia/linfoma linfoblástico B con hiperdiploidía
	Leucemia/linfoma linfoblástico B con hipodiploidía
	* <i>Leucemia/linfoma linfoblástico B, BCR-ABL 1-like</i>
	* <i>Leucemia/linfoma linfoblástico B con iAMP21</i>
<b>Leucemia/ linfoma linfoblástico T</b>	* <i>Leucemia de Precursor Temprano de células T</i>

\* *Entidad provisional.* Modificado de Arber, Orazi, Hasserjian, Thiele, Borowitz, Le Beau,... Vardiman, 2016.

### 1.2.5. Leucemia mieloblástica aguda (LMA).

La LMA es una neoplasia maligna originada por la proliferación de células inmaduras de estirpe mieloides que se produce por una alteración en la regulación del crecimiento y diferenciación de las células hematopoyéticas, alteración que provoca la acumulación de precursores mieloides inmaduros con capacidad de replicación, pero que han perdido su capacidad de diferenciarse hacia células maduras (Perea, 2011).

#### 1.2.5.1. Características clínicas.

Los pacientes con LMA presentan manifestaciones clínicas inespecíficas (Rodak, 2004) que inician de forma gradual o abrupta (Longo et al, 2012).

- Los signos y síntomas más frecuentes son fatiga, debilidad, palidez, disnea, petequias, hemorragia conjuntival y retiniana (Lichtmann et al. 2014), hemorragias prolongadas, éstas son más frecuentes si la cifra de plaquetas es  $<20 \times 10^3/\mu\text{L}$ .
- La neutropenia da lugar a infecciones menores piógenas de la piel.

- La coagulación intravascular diseminada (CID) se observa con mayor frecuencia en la LMA-M3 (Leyto, 2018).
- Algunos pacientes presentan hepatomegalia o esplenomegalia leve.
- La linfadenopatía es rara, excepto en la variante monocítica.
- Los monoblastos suelen infiltrar los tejidos, pero éstos pueden ser asintomáticos (leucemia cutis, hiperplasia gingival) (Lichtmann et al. 2014).
- Los pacientes con LMA no tienden a presentar síntomas relacionados con el SNC cuando se produce infiltración por blastos (Longo et al, 2012). Además, la infiltración a este sitio es muy rara (Rodak et al., 2014).
- Pocas veces, los individuos presentan síntomas secundarios a un sarcoma mielóide (López y Guevara, 2016).
- Pueden presentarse masa retroocular en caso de infiltración extramedular.
- En caso de hiperleucocitosis, puede presentarse leucostasis y como consecuencia síntomas secundarios (López y Guevara, 2016).
- Los niños presentan irritabilidad, pérdida de apetito, vómito (López y Guevara, 2016).

#### **1.2.5.2. Datos de laboratorio.**

Al momento del diagnóstico, generalmente hay anemia y trombocitopenia.

- En 80% de los pacientes presenta anemia normocítica normocrómica (Sans et al., 2006).
- En más de la mitad de los pacientes el conteo de plaquetas es  $<50 \times 10^3/\mu\text{L}$ . La mediana de la cifra de leucocitos es de  $15\text{-}20 \times 10^3/\mu\text{L}$ . En 10% de los pacientes los leucocitos son  $>100 \times 10^3/\mu\text{L}$ , y suele suceder con más frecuencia en las variedades monocítica y mielomonocítica.
- En 85% de los casos se observan blastos en SP (Sans et al., 2006).
- En la mitad de los pacientes, los leucocitos son  $<5 \times 10^3/\mu\text{L}$ , y en más de la mitad de estos pacientes, el conteo absoluto de neutrófilos es  $<1 \times 10^3/\mu\text{L}$ . En otros casos la cifra es normal (Lichtmann et al. 2014). Hay niveles elevados de lisozima (subtipos monocíticos), hiperuricemia, hiperpotasemia, hiperfosfatemia e hipocalcemia. Cuando los leucocitos son elevados y estos hallazgos son pronunciados, esta situación indica síndrome de lisis tumoral (Lichtmann et al. 2014).

### 1.2.5.3. Factores pronósticos.

Una cifra de leucocitos  $<20 \times 10^3/\mu\text{L}$  se asocia a un mejor pronóstico, en contraste con los pacientes con recuentos leucocitarios altos, los cuales presentan un mayor riesgo de desarrollar complicaciones pulmonares y del SNC y tener un mayor riesgo de muerte (De Kouchkovsky y Abdul, 2016).

**Tabla 7. Grupos de riesgo de LMA.**

GRUPO DE RIESGO	GEN	TIPO DE PROTEÍNA	PERFIL CITOGÉNÉTICO	MUTACIÓN ADICIONAL	FENOTIPO ASOCIADO (FAB)
<b>Favorable</b>	RUNX1-RUNX	Factor de transcripción	t(8;21)(q22;q22)	KIT	M2
	CBFB-MYH11	Factor de transcripción	inv(16)(p13.1q22)	KIT	M4E
	PML-RARA	Factor de transcripción	t(15;17)(q22;q12)	FLT3	M3
	NPM1	Histona chaperona	Normal	FLT3	M4 y M5
	CEBPA	Factor de transcripción	Normal	FLT3	M0 y M2
<b>Intermedio</b>	MLLT3-MLL	Remodelador de la cromatina	t(9;11)(p22;q23)	-	M4 y M5
<b>Adverso</b>	DEK-NUP214	Factor de transcripción y nucleoporina	t(6;9)(p23;q34)	FLT3	M2 y M4
	RPN1-EVI1	Factor de transcripción	inv(3)(q21q26.2)	-	M1, M4 y M7
	RBM15-MKL1	Factor de transcripción	t(1;22)(p13;q13)	-	M7
	FLT3	Receptor tirosina cinasa	Normal, t(15;17)(q22;q12) y t(6;9)(p23;q34)	NPM1 y DNMT3a	M3, M4 y M5

Modificado de Lagunas, 2016.

En la LMA-M3 o leucemia promielocítica aguda (LPA), un conteo  $\geq 10 \times 10^3$  células/ $\mu\text{L}$  denota un riesgo alto, estos pacientes tienen un mayor riesgo de muerte temprana y recaída. La LMA relacionada con la terapia y la LMA asociadas con una neoplasia hematológica previa tienen pronóstico desfavorable (De Kouchkovsky y Abdul, 2016). Generalmente una o más anormalidades citogenéticas son encontradas en aproximadamente el 55% de los pacientes con LMA (Lagunas, 2016), estos cambios constituyen un fuerte factor pronóstico y permiten estratificar a la LMA en tres grupos de riesgo (Tabla 7) (De Kouchkovsky y Abdul, 2016).

#### 1.2.5.4. Clasificación del grupo FAB.

Esta clasificación se basa en el grado de maduración, aspecto morfológico y línea celular afectada (indiferenciada, mieloide, monoblástica, eritroblástica o megacarioblástica) (Tabla 8). Los estudios morfológicos revelan los porcentajes de blastos, estructuras intracelulares, como bastones de Auer, y presencia de mielodisplasia. La citoquímica ayuda a definir el linaje (Tabla 9) (Creutzig et al,2012).

El grupo FAB reconoce básicamente dos tipos de mieloblastos: tipo I que tiene un gran núcleo central con cromatina finamente dispersa y uno o dos nucléolos, el citoplasma es basófilo y no presenta gránulos, ni bastones de Auer; y tipo II que presenta en el citoplasma <20 gránulos azurófilos, la cromatina es más condensada, los nucléolos más prominentes y el citoplasma más abundante (Sans et al., 2006). La clasificación FAB determina una LMA cuando el porcentaje de blastos en SP o MO es  $\geq 30\%$ .

**Tabla 8. Clasificación de las LMA de acuerdo con el grupo FAB.**

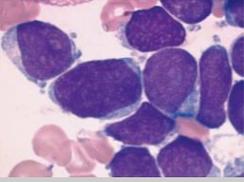
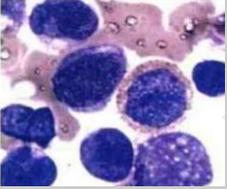
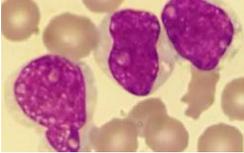
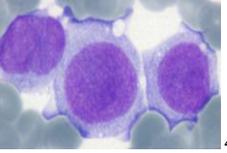
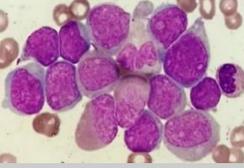
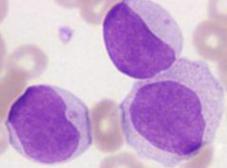
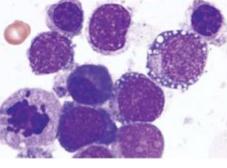
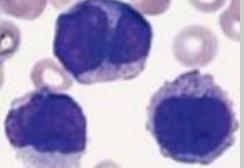
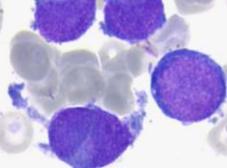
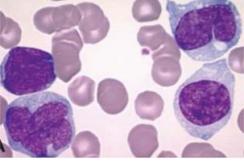
SUBTIPO FAB	DENOMINACIÓN	MORFOLOGÍA
<b>M0</b>	Mieloblástica aguda mínimamente diferenciada	<b>MO:</b> >90% de blastos, éstos no desarrollan las características morfológicas mieloides (son muy indiferenciados). Son redondos de tamaño pequeño a mediano con núcleo excéntrico. El núcleo a veces es lobulado o escindido, con cromatina fina y uno o varios nucléolos. El citoplasma es ligeramente basófilo sin gránulos. No se observan cuerpos de Auer.
<b>M1</b>	Mieloblástica aguda sin maduración	<b>MO:</b> >30% de TCN y >90% de las CNE son mieloblastos. <10% de maduración de las series granulocíticas más allá del estadio de promielocito. El mieloblasto es poco diferenciado, de tamaño mediano, con elevada relación N:C, contorno nuclear redondeado, cromatina laxa con presencia de uno o varios nucléolos prominentes. Pueden presentar una fina granulación azurófila, o algún bastón de Auer en el citoplasma (bastones de Auer se encuentran en 50% de los blastos). Si no hay evidencia de gránulos o bastones de Auer, los blastos pueden parecerse al linfoblasto L2.
<b>M2</b>	Mieloblástica aguda con maduración	<b>MO:</b> >30% de TCN y <90% de CNE son mieloblastos; hay maduración más allá del estadio de promielocito en >10% de las CNE; <20% de monocitos. Los blastos son pequeños o medianos, con cantidad variable de citoplasma y un perfil nuclear redondeado, veces adopta una posición cuadrangular respecto al citoplasma; la cromatina es laxa, con uno o varios nucléolos. El citoplasma es basófilo y puede contener granulación primaria azurófila, u ocasionalmente algún bastón de Auer. Pseudo Pelger-Huet y neutrófilos hipogranulares son las células más comunes. Los casos con hiperplasia eritroide (pero <50% de eritroblastos) sin las anomalías morfológicas de la eritroleucemia se incluyen en este grupo.
<b>M3</b>	Promielocítica hipergranular	<b>MO:</b> >30% de promielocitos anormales con abundantes gránulos citoplasmáticos que se tiñen de color rosa brillante, rojo o púrpura con la tinción de Romanowsky. Se hallan numerosos cuerpos de Auer, a menudo apilados (células en "haces", en inglés "faggot"). Los núcleos con frecuencia son reniformes o bilobulados con la presencia de una hendidura profunda o de perfil irregular. <b>SP:</b> Leucocitos disminuidos.

**Tabla 8 (continuación)**

<b>SUBTIPO FAB</b>	<b>DENOMINACIÓN</b>	<b>MORFOLOGÍA</b>
<b>M3v</b>	Promielocítica variante microgranular	<b>MO:</b> Promielocitos con gránulos tan pequeños que no se distinguen con el microscopio óptico, núcleo profundamente indentado con citoplasma claro abundante y gránulos similares a polvo observados en una localización excéntrica cerca del núcleo. A menudo se confunde con la M5. <b>SP:</b> Suele cursar con leucocitosis.
<b>M4</b>	Mielomonocítica aguda	<b>MO:</b> >30% de blastos de TCN y >20% de CNE son de componente monocítico (monoblastos, promonocitos y monocitos). Hay diferenciación granulocítica y monocítica. La proporción de células monocíticas no excede el 80% de las CNE. Los monoblastos son de gran tamaño, moderada relación N:C y basofilia variable con eventuales mamelones en el citoplasma. El núcleo puede ser redondeado, arriñonado o de forma irregular. Los nucléolos son prominentes. Mieloblastos, promielocitos y otros granulocitos posteriores comprenden entre el 30% y el 80% de las CNE. Bastón de Auer ±.
<b>M4E</b>	Mielomonocítica aguda con eosinofilia	<b>MO:</b> ≥5% eosinófilos con núcleos monocitoides y pueden ser híbridos con gránulos basófilos; componente monocítico >20%, pero <80%.
<b>M5A</b>	Monocítica aguda mal diferenciada	<b>MO:</b> >30% de blastos de TCN y >80% monoblastos. Estas células presentan una cromatina laxa, nucléolos prominentes y brotes o pseodopodos en la membrana citoplasmática que es de basófila oscura a gris, puede contener gránulos azurófilos finos. Los brotes pueden ser más translúcidos que el resto del citoplasma y esto da la apariencia de una doble membrana. Por el aspecto indiferenciado se puede confundir con la M1. <20% granulocitos.
<b>M5B</b>	Monocítica aguda diferenciada	<b>MO:</b> <80% de las células son monoblastos, promonocitos (predominan) y monocitos. Los promonocitos presentan núcleos redondos o cerebriformes y pueden tener nucléolos, el citoplasma color gris translúcido (menos basófilo que del monoblasto) con aspecto de vidrio esmerilado, con gránulos azurófilos y con presencia de alguna vacuola. <b>SP:</b> % elevado de monocitos.
<b>M6</b>	Eritroleucemia aguda	<b>MO:</b> >50% de células son precursores eritroides de TCN. >30% de CNE son mieloblastos tipo I o tipo II. Los precursores eritroides a menudo son morfológicamente anormales. Es común la presencia de precursores multinucleados. Pueden presentar cuerpos de Howell-Jolly, puede haber vacuolas perinucleares en los proeritroblastos y en los eritroblastos basófilos. Los cambios megaloblásticos y la diseritropoyesis son frecuentes. Única LMA con hiperplasia de precursores eritroides. Con frecuencia un SMD precede a una M6 (mielosis eritémica).
<b>M7</b>	Megacarioblástica	<b>MO:</b> >30% de megacarioblastos de TCN. El tamaño de éstos es heterogéneo; muestran un aspecto morfológico muy inmaduro, y son muy polimórficos. Algunos tienen el tamaño del linfoblasto L1 con citoplasma escaso, mientras que otros son tres veces más grandes. El núcleo es excéntrico, de cromatina laxa y reticulada con 1 a 3 nucléolos prominentes. El citoplasma es basófilo y agranular y muestra un aspecto muy similar a las plaquetas circulantes con presencia de mamelones o pseudópodos. Pueden observarse megacariocitos. La biopsia de MO muestra aumento de fibroblastos y/o aumento de reticulina.

TNC: todas las células nucleadas de la MO. CNE: células no eritroides; MO: Médula ósea; SP: sangre periférica; N:C: núcleo citoplasma. Bennett et al, 1976; Rodak, 2004; Merino, 2010 y Antica, 2011.

**Tabla 9. Morfología y citoquímicas de las LMA.**

SUBTIPO FAB	MORFOLOGÍA	CITOQUÍMICA	SUBTIPO FAB	MORFOLOGÍA	CITOQUÍMICA
LMA-M0	 1	MPO: +(< 3% mieloblastos) NSB: +(< 3% mieloblastos) NASDA: ++(< 3% mieloblastos) ANBE: - ANAE: - PAS: -	LMA-M4E	 3	MPO: + NSB: + NASDA: + ANBE: + (monocítico) ANAE: + (monocítico) PAS: + (difuso)
LMA-M1	 2	MPO: + (≥ 3% mieloblastos) NSB: + (≥ 3% mieloblastos) NASDA: +/- ANBE: - ANAE: - PAS: -	LMA-M5A	 4	MPO: - ó + (débil) NSB: - ó + (débil) NASDA: - ANBE: + (monocítico) ANAE: + (monocítico) PAS: -
LMA-M2	 2	MPO: ++ (mieloblastos) NSB: + mazacotes (mieloblastos) NASDA: + (mieloblastos) ANBE: - ANAE: - PAS: +	LMA-M5B	 4	MPO: - ó + (débil) NSB: - ó + (débil) NASDA: - ANBE: + ANAE: + PAS: -
LMA-M3	 2	MPO: + (intenso) (mieloblastos) NSB: + (intenso) (mieloblastos) NASDA: + ANBE: - ANAE: - PAS: + (difuso)	LMA-M6	 1	MPO: + (mieloblastos) NSB: + (mieloblastos) NASDA: + (mieloblastos) ANBE: - FA: + (intenso) (eritroblastos) PAS: + en mazacotes (eritroblastos)
LMA-M3v	 1	MPO: + (intenso) (mieloblastos) NSB: + (intenso) (mieloblastos) NASDA: + (mieloblastos) ANBE: - ANAE: - PAS: + (difuso)	LMA-M7	 3	MPO: - NSB: - NASDA: - (megacarioblasto) ANAE: + (megacarioblasto) PAS: +/- granular (megacarioblasto) FA: + (megacarioblasto)
LMA-M4	 1	MPO: + NSB: + NASDA: + ANBE: + (monocítico) ANAE: + (monocítico) PAS: + (difuso)			

MPO: Mieloperoxidasa; NSB: Negro Sudán B; NASDA: naftol ASD cloroacetato esterasa; ANAE: α-naftol acetato esterasa; ANBE: α-naftil butirato esterasa; PAS: ácido periódico de Schiff; FA: fosfatasa ácida. Bennett et al, 1976; Rodak, 2004; Merino, 2010; Antica, 2011. Imágenes: 1: Swerdlow et al, 2008; 2: Esmeralda Nuñez Hernandez, 2019; 3: Rodak, 2004; 4: Merino, 2010.

### 1.2.5.5. Clasificación del grupo EGIL.

El grupo EGIL definió inmunológicamente a las LMA por la expresión de dos o más de los siguientes marcadores mielomonocíticos: MPOx, CD13, CD33, CDw65 y/o CD117 (c-kit). Determinó que la MPOx es el marcador más específico para el linaje mielóide.

La LMA-M0, LMA-M6 y LMA-M7 de la FAB pudieron definirse inequívocamente por el inmunofenotipo. Se incluyeron otros dos subgrupos de LMA, uno con expresión de TdT y otro que expresa uno o más marcadores linfoides pero que no cumplen con los criterios para clasificarlos como LAB (Bene et al, 1995). Tabla 10.

**Tabla 10. Clasificación inmunológica de las LMA de acuerdo con el EGIL.**

SUBTIPO EGIL	MARCADOR
Linaje mielomonocítico*	MPOx+, CD13+, CD33+, CDw65+ y/o CD117+
Linaje eritroide (M6)	Temprano/inmaduro: no clasificable por marcadores
	Tardío/maduro: Glicoforina A+
Linaje megacariocítico (M7)	CD41+, y/o CD61+ (superficial o citoplasmático)
Mieloide temprano (M0)	MPO+, CD13+, CD33+, CDw65+ y/o CD117+ y CD3-, CD79a- y CD22-
LMA TdT+	Marcadores mieloides con la expresión de TdT+
LMA+Ly	LMA con expresión de uno o más marcadores linfoides

\* Positivo para al menos dos o más marcadores mieloides. Modificado de Bene et al, 1995.

### 1.2.5.6. Clasificación de la OMS.

**Tabla 11. Clasificación de las LMA, por la OMS, 2016.**

LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA Y NEOPLASIAS RELACIONADAS	
LMA con alteraciones genéticas recurrentes	LMA NOS
LMA con t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1	LMA con mínima diferenciación
LMA con inv(16)(p13.1;q22) o t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11	MA sin maduración
LPA con t(15;17)(q22;q12); PML-RARA	LMA con maduración
LMA con t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A	Leucemia mielomonocítica aguda
LMA con t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214	Leucemia monoblástica/monocítica aguda
LMA con inv(3)(q21.3q26) o t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM	Leucemia eritroide pura
LMA (megacarioblástica) con t(1;22)(p13.3;q13.3); RBM15-MKL1	Leucemia megacarioblástica aguda
* LMA con BCR-ABL1	Leucemia basofílica aguda
LMA con mutación de NPM1	Panmielosis aguda con Mielofibrosis
LMA con mutación bialélica de CEBPA	<b>Sarcoma mieloides</b>
* LMA con mutación de RUNX1	<b>Proliferaciones mieloides relacionadas con síndrome de Down</b>
<b>LMA con cambios relacionados a mielodisplasia</b>	Mielopoyesis anormal transitoria (desorden mieloides transitorio) (TAM)
<b>Neoplasias mieloides relacionadas o secundarias a tratamientos (LMA-t)</b>	Leucemia mieloides asociada con síndrome de Down

\* Entidad provisional; LMA: leucemia mieloides aguda; LPA: leucemia promielocítica aguda; NOS: no especificada de otra manera. Modificado de Arber et al, 2016

La base primaria para la subclasificación de las LMA no especificadas de otro modo (LMA NOS) son las características morfológicas, citoquímicas e inmunofenotípicas de las células leucémicas, sin embargo, se recomienda realizar el análisis molecular y citogenético ya que estos estudios proporcionan el pronóstico de la enfermedad (Swerdlow et al, 2008). Tabla 11.

Los promonocitos en la LMA con diferenciación monocítica son considerados equivalentes a blastos. La leucemia eritroide pura representa una neoplasia de células inmaduras comprometidas exclusivamente con el linaje eritroide (80% de las células de la MO) sin evidencia de un componente mieloblástico significativo. Las LMA con alteraciones citogenéticas recurrentes deben considerarse como LMA independientemente del porcentaje de blastos (Swerdlow et al, 2008).

La OMS determina una LMA NOS cuando hay  $\geq 20\%$  de mieloblastos en SP o MO.

### **1.2.6. Leucemia aguda bifenotípica (LAB).**

La mayoría de las LA se pueden asignar inequívocamente al linaje mielóide, linfóide B o T. Sin embargo, incluso después de una inmunofenotipificación extensa, un subconjunto pequeño y heterogéneo de leucemias no puede clasificarse fácilmente, las leucemias que caen dentro de esta categoría se han denominado leucemias agudas de linaje mixto, bifenotípicas, híbridas, indiferenciadas, bilineal o leucemia de linaje ambiguo (Weinberg y Arbe, 2010).

En la leucemia aguda bifenotípica (LAB) hay una sola población de blastos que coexpresan antígenos específicos de dos linajes diferentes, ya sea de células B o T y antígenos mieloides o monocíticos (Chiaretti et al., 2014).

#### **1.2.6.1. Clasificación del grupo EGIL.**

El EGIL propone un sistema de clasificación para distinguir los casos de LAB de aquellos con expresión aberrante de otro linaje y está basado en el número y grado de especificidad de marcadores (linfoides y mieloides) expresados en las células leucémicas (Dorantes, Medina, Dávila y López, 2013) (Tabla 12).

Se trata de una LAB cuando el valor del puntaje es  $>2$  para el linaje mielóide y  $>1$  para el linaje linfóide (Bene et al, 1995). Si no se cumplen estos criterios, se considera como

expresión aberrante del antígeno o infidelidad de linaje. El punto de corte para considerar un marcador como positivo, es de al menos 20%, excepto para los marcadores MPOx, CD3, CD79a y TdT, los cuales con un mínimo de 10% de positividad ya se consideran como positivos (Weinberg y Arber, 2010).

**Tabla 12. Sistema de puntuación EGIL para definir una leucemia bifenotípica.**

PUNTOS	LINAJE		
	LINFOIDE B	LINFOIDE T	MIELOIDE
<b>2</b>	CD79a cyIgM cyCD22	CD3 (cy/s) Anti-TCR $\alpha/\beta$ Anti-TCR $\gamma/\delta$	MPOx Anti-lizosima
<b>1</b>	CD19 CD10 CD20	CD2 CD5 CD8	CD13 CD33 CD65 CD117
<b>0.5</b>	TdT CD24	TdT CD7 CD1a	CD14 CD15 CD64 CD11b CD11c

Cy: citoplásmico; s: superficial; MPOx: mieloperoxidasa; TdT: *desoxinucleotidil transferasa terminal*. Bene et al, 1995 y Weinberg y Arber, 2010.

Basados en este sistema de puntuación, se han descrito cuatro subtipos principales de LAB: B/mieloide, T/mieloide, B/T linfoide, y la leucemia de trilineaje (presencia de marcadores mieloides, B y T) (Vizcaíno, Guzmán, De los Reyes, Quijano y Campos, 2010).

### 1.2.7. Recaída.

El tratamiento de las LA se divide en fases que tienen objetivos distintos: *inducción a la remisión*, terapia inicial en el tratamiento, su objetivo es reducir el número total de células leucémicas hasta en un 99% (Layton, 2015), eliminando en lo posible las células con resistencia primaria (HIMFG, s. f.); *post-remisión o consolidación*, su objetivo es intensificar el tratamiento a sitios santuarios (principalmente SNC y testículo) (HIMFG, s. f.), esta etapa es indispensable para prevenir recaídas en los primeros dos meses posteriores, y *mantenimiento o continuación*, fase final del tratamiento que dura de dos a dos años y medio (SS, 2009), su objetivo es eliminar la enfermedad residual que persiste al final de la inducción y erradicar la clona leucémica (HIMFG, s. f.).

La remisión completa (RC) se ve reflejada en la desaparición clínica de enfermedad detectable, el paciente se encuentra asintomático y asignológico, la MO presenta

celularidad normal con < 5% de blastos en evaluación morfológica (SS, 2009), en SP hay por lo menos  $1 \times 10^3$  neutrófilos/ $\mu\text{L}$ ,  $50 \times 10^3$  plaquetas/ $\mu\text{L}$  (no transfundidas) y Hb  $\geq 10$  g/dL (Dorantes y Medina, 2007), ausencia de blastos en LCR y un nivel de enfermedad mínima residual (EMR) detectable por PCR o CFM  $< 1 \times 10^{-5}$  (HIMFG, s. f.). Aproximadamente el 80% de los pacientes con LMA y LLA de recién diagnóstico pueden lograr una RC (Verma et al., 2010) empleando las terapias actualmente disponibles. Sin embargo, el 20-25% de los niños recaen (Nguyen et al., 2008).

La recaída se establece cuando una vez alcanzada la RC, existe evidencia de recurrencia leucémica, definida como cualquier cambio en la MO con blastos >5% o aparición de lesiones infiltrativas (SS, 2009).

Las recaídas se clasifican en *recaídas tempranas* (se presentan en los primeros 18 meses desde el diagnóstico), *recaídas intermedias* (ocurren entre los 18 y 36 meses desde el diagnóstico) y *recaídas tardías* (después de los 36 meses) (Nguyen, Devidas, Cheng, La, Raetz, Carroll, ..., Children's Oncology Group, 2008). La mayoría de las recaídas de LLA ocurren durante el tratamiento o dentro de los primeros dos años después de la finalización del tratamiento, aunque se ha informado que las recaídas se producen incluso después de 10 años desde el diagnóstico.

La mayoría de las recaídas ocurren en la MO, ya sea en forma aislada o combinada con la participación de otro sitio, principalmente el SNC o testículos, siendo menos frecuente en otros sitios extramedulares (Locatelli, Schrappe, Bernardo y Rutella, 2012). Se ha demostrado que en leucemias que recurren tempranamente, el clon recidivante ya se encontraba presente en la leucemia inicial con un menor número de copias, lo que indica la selección de un clon preexistente resistente a la terapia administrada. Por el contrario, en las recaídas tardías, puede conjeturarse que el origen es el desarrollo de una segunda leucemia a partir de una alteración premaligna (Makiya, 2013).

### **1.3. Marcadores *Cluster of Differentiation* (CD)**

*Cluster of differentiation* (CD) significa “grupo de diferenciación” y viene seguido de un número, el nombre deriva del hecho de que al madurar las células adquieren o eliminan proteínas en su superficie (Ruiz y Pérez, 2010). La designación de CD se refiere a un grupo de anticuerpos monoclonales (AcMo) que reconocen la molécula expresada en las células (Clark et al., 2016) y también se utiliza para nombrar a los antígenos (Ag) en

sí (Engel et al., 2015). Se agrega un símbolo "+" como superíndice a un número de CD para indicar la presencia de esa molécula en una célula o población celular, si la expresión de dicha molécula es intensa se pone "++"; un "-" indica su ausencia (Engel et al., 2015). Algunos CDs se expresan en todas las células de un linaje, pero la mayoría se expresan solo en una fracción de ellas o solamente en una etapa de su maduración (Ruiz y Pérez, 2010). Hasta la fecha han sido descritas 408 moléculas (Clark et al., 2016).

La maduración y diferenciación de las células sanguíneas durante la hematopoyesis se asocia con la expresión de conjuntos específicos de marcadores CD que definen el linaje (Wolach y Stone, 2015), estos marcadores también se utilizan para describir procesos neoplásicos relacionados con estas células (Pui, 2013). En las Tablas 13-16 se muestra cada estadio de maduración con los correspondientes fenotipos de las células hematopoyéticas normales.

**Tabla 13. Fenotipo de las diferentes etapas de maduración de los granulocitos.**

MBL	PROMIEL	MIEL N	METAM N	NB	NS	BAS
CD34+						
HLA-DR+						
CD117+	CD117+/-					
CD54+	CD54+	CD54 <sup>de</sup>				CD123+
CD45 <sup>de</sup>	CD45 <sup>de</sup>	CD45 <sup>de</sup>	CD45+	CD45+	CD45+	2D7+
MPO+/-	MPO <sup>de</sup>	MPO+	MPO <sup>in</sup>	MPO <sup>in</sup>	MPO <sup>in</sup>	FCεRI+
CD13+	CD13+	CD13 <sup>de</sup>	CD13+	CD13+	CD13+	CD203c+
CD33 <sup>de</sup>	CD33 <sup>de</sup>	CD33+	CD33 <sup>de</sup>	CD33 <sup>de</sup>	CD33 <sup>de</sup>	
	CD66b+	CD66b+	CD66b+	CD66b+	CD66b+	
	CD66c++	CD66c+	CD66c+	CD66c <sup>de</sup>	CD66c <sup>de</sup>	
	CD65+	CD65+	CD65+	CD65+	CD65+	
	CD15+/-	CD15+	CD15+	CD15 <sup>in</sup>	CD15 <sup>in</sup>	
		CD64 <sup>de</sup>	CD64+	CD64+	CD64+	
		CD11b+/-	CD11b+	CD11b+	CD11b <sup>in</sup>	
		CD11c+	CD11c+	CD11c+	CD11c+	
		CD66a+	CD66a+	CD66a+	CD66a <sup>de</sup>	
		CD24 <sup>de</sup>	CD24+	CD24+	CD24+	
			CD16+	CD16+	CD16 <sup>in</sup>	
			CD35 <sup>de</sup>	CD35+	CD35+	
			CD87+/-	CD87+	CD87+	
				CD14 <sup>de</sup>	CD14 <sup>de</sup>	
				CD10 <sup>de</sup>	CD10+	

MBL: mieloblasto; PROMIEL: promielocito; MIEL N: mielocito neutrófilo; METAM N: metamielocito neutrófilo; NB: neutrófilo en banda; NS: neutrófilo segmentado; BAS: basófilo; de: débil; in: intenso; FCεRI receptor de IgE de alta afinidad. Swerdlow, 2008; Wood, s. f; Manar et al, 2017.

Para la tipificación de las neoplasias hematológicas, existen cuatro reglas de los CDs:

1. No existe un solo Ag CD que sea específico de una enfermedad.

2. Todos los CDs que se emplean para definir linaje y estadio de las neoplasias hematológicas se expresan también en células normales.
3. Las células neoplásicas se distinguen de las células normales solamente por aberraciones en la expresión de Ag: a) *cuantitativas*: anomalías en la intensidad de expresión de un antígeno, b) *infidelidad o promiscuidad de linaje*: en una misma célula se expresan antígenos de linajes diferentes, c) *cronológicas*: expresión asincrónica y simultánea de antígenos tempranos y tardíos de un mismo linaje, d) *anatómicas*: las células expresan antígenos ajenos a un determinado compartimento anatómico, e) *numéricas*: no hay aberración, pero hay una población grande de células que expresan un antígeno específico.
4. En algunas ocasiones las células neoplásicas no presentan aberraciones antigénicas que permitan distinguirlas de las células normales (Ruiz y Pérez, 2010).

**Tabla 14. Fenotipo de las diferentes etapas de maduración del monocito.**

MONOBLASTO	PROMONOCITO	MONOCITO	MACRÓFAGO
CD34+			
CD117+			
HLA-DR+	HLA-DR+	HLA-DR+	HLA-DR+
CD45+	CD45+	CD45 <sup>in</sup>	CD45 <sup>in</sup>
CD13+/-	CD13+	CD13+	CD13+
CD33+	CD33+	CD33 <sup>in</sup>	CD33 <sup>in</sup>
CD4+	CD4+	CD4+	CD4+
	MPO+	MPO+	MPO+
	CD64+	CD64+	CD64+
	CD15+	CD15+	CD15+
	CD11b+	CD11b <sup>in</sup>	CD11b <sup>in</sup>
	CD36+	CD36+	CD36+
	CD14+	CD14 <sup>in</sup>	CD14 <sup>in</sup>
		IREM-2+	IREM-2+
			CD16+
			CD163+

in: intenso. Swerdlow, 2008; Wood, s. f; Manar et al, 2017.

**Tabla 15. Fenotipo de las diferentes etapas de la eritropoyesis.**

PROEB	EBB	EBP	EBO	RET	ERIT
CD34+					
CD45 <sup>de</sup>					
HLA-DR+					
CD13+					
CD33+					
CD177+	CD177+				
CD105+	CD105+	CD105+			
CD71+	CD71+	CD71+	CD71+	CD71+	
CD36 <sup>in</sup>	CD36 <sup>in</sup>	CD36 <sup>in</sup>	CD36 <sup>in</sup>	CD36+	CD36+
<b>CD235a ±</b>	CD235a+	CD235a+	CD235a+	CD235a+	CD235a+

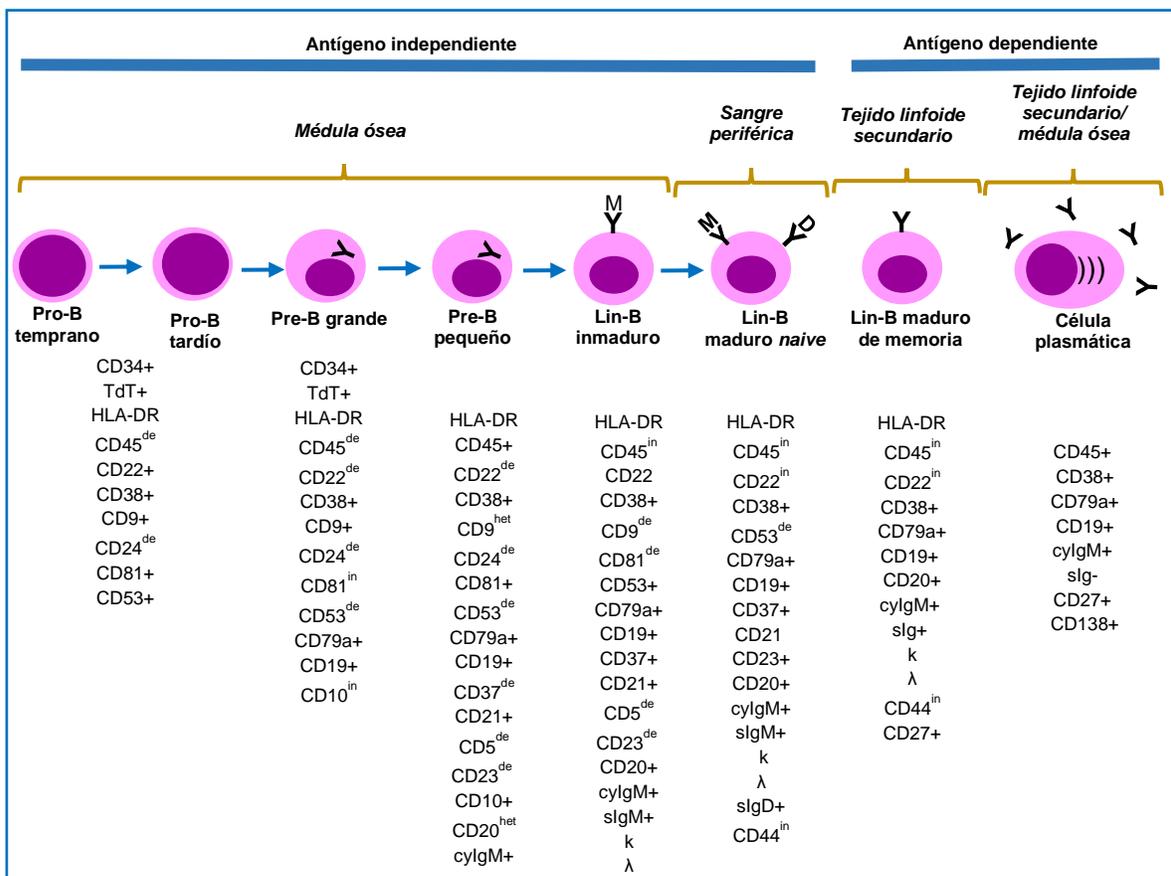
PROEB: proeritroblasto; EBB: eritroblasto basófilo; EBP: eritroblasto policromático; EBO: eritroblasto ortocromático; RET: reticulocito; ERIT: eritrocito; CD235a: Glicoforina A; de: débil; in: intenso. Swerdlow, 2008; Manar et al, 2017; Spandl, 2013; Ching, 2013.

**Tabla 16. Fenotipo de las diferentes etapas de la megacariopoyesis.**

MEGACARIOBLASTO	PROMEGACARIOCITO	MEGACARIOCITO	PLAQUETA
CD34 ±			
HLA-DR+			
CD13+			
CD33+			
CD45+			
CD117+			
CD38+/-	CD38+	CD38+	CD38+
CD41+	CD41+	CD41 <sup>in</sup>	CD41 <sup>in</sup>
CD61+	CD61+	CD61 <sup>in</sup>	CD61 <sup>in</sup>
	CD42b+/-	CD42b	CD42b
	CD36+	CD36+	CD36+
		F-VIII	F-VIII

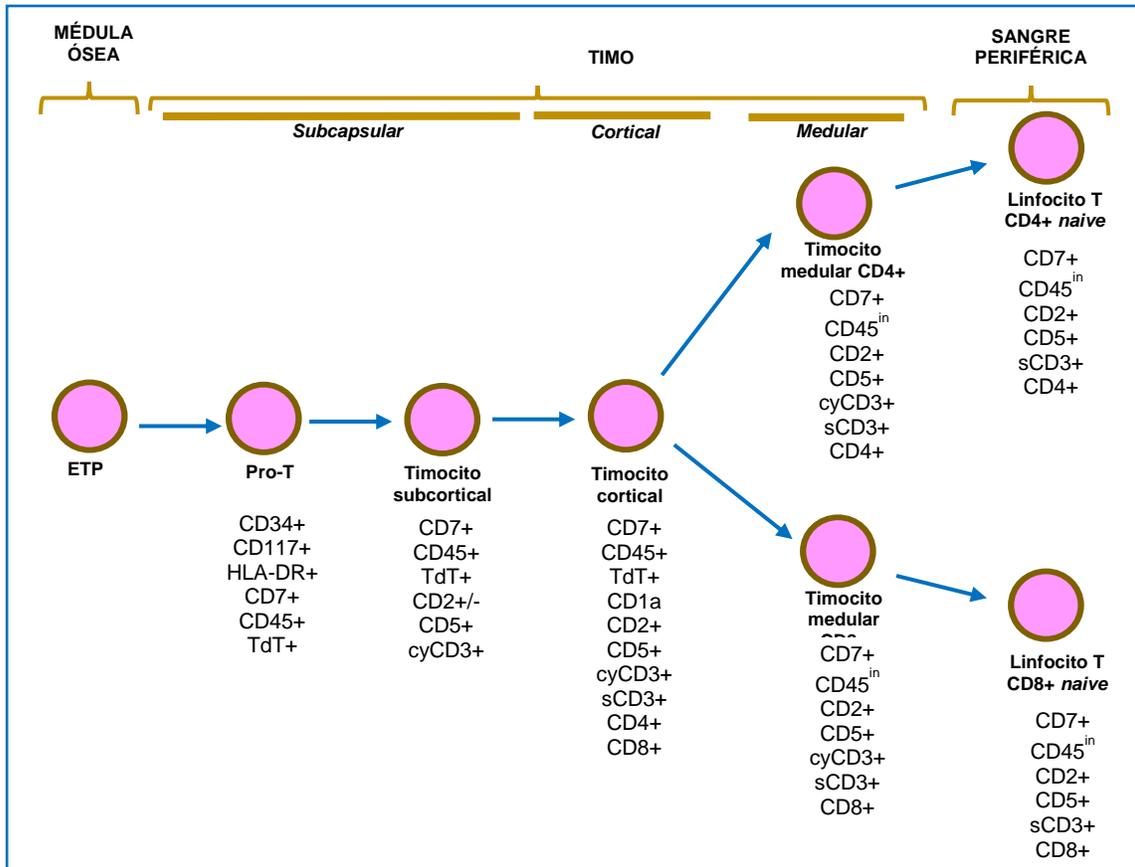
CD41: Complejo GP IIb/IIIa; CD42b: GP Ib; CD61: GP IIIa; F-VIII: Factor VIII de la coagulación; in: intenso. Swerdlow, 2008; Ching, 2013.

En las siguientes Figuras (18 y 19) se encuentran las etapas de diferenciación de las células de linaje linfoide.



**Figura 18. Fenotipo de las etapas de diferenciación de las células B.**

de: débil; in: intenso; het: heterogéneo. Parham, 2016; Universidad de Salamanca; 2011; Swerdlow, et al, 2008. Esmeralda Nuñez Hernandez, 2019.



**Figura 19. Fenotipo de las etapas de diferenciación de las células T.**

in: intenso. Universidad de Salamanca, 2011; Swerdlow, et al, 2008; Cano y Lopera, 2013. Esmeralda Nuñez Hernandez, 2019.

#### 1.4. Diagnóstico de las leucemias agudas

Se sospecha de algún tipo de LA cuando el paciente presenta características clínicas relacionadas con esta enfermedad, a todos estos pacientes se les deberá realizar:

**Historial clínico completo.** Enfocado a identificar los factores de riesgo para desarrollar LA. Se debe investigar el tiempo de evolución de los signos y síntomas sugestivos de LA, ya que, generalmente es corto (de cuatro a seis semanas) (SS, s. f.).

**Exámenes de laboratorio.** Biometría hemática con revisión del frotis de SP, química sanguínea, pruebas de función hepática, pruebas de coagulación, descartar infecciones bacterianas y virales (HIMFG, s. f.) (Vizcaíno et al., 2016).

**Radiografía** de tórax y de huesos largos, tomografía computarizada de cráneo, ultrasonografía para valorar la hepatoesplenomegalia no detectable en clínica (Ortega, Osnaya y Rosas, 2007) y en niños con agrandamiento de testículos (SS, s. f.).

**Evaluación de MO.** Se realiza el aspirado de MO para estudios morfológicos, inmunofenotípicos, citogenéticos y moleculares. Ante la incapacidad de aspirar médula ósea (“grifo seco”) se debe realizar una biopsia de MO por trepanación (Creutzig et al., 2012).

**Diagnóstico morfológico.** La morfología de las LA se define según la FAB.

**Inmunofenotipificación.** Se realiza el inmunofenotipo por CFM y las LA se clasifican de acuerdo con la clasificación del EGIL (HIMFG, s. f.).

**Estudios citogenéticos y moleculares.** *Citogenético:* se buscan alteraciones cromosómicas numéricas o estructurales, visibles en el examen microscópico (HIMFG, s. f.). *Molecular:* busca alteraciones cromosómicas submicroscópicas estructurales específicas y puede realizarse por medio de FISH o RT-PCR (HIMFG, s. f.).

Recientemente la secuenciación masiva o de siguiente generación (NGS, *Next Generation Sequencing*) se ha introducido en los laboratorios hematológicos (Bacher, Shumilov, Flach, Porret, Joncourt, Wiedemann,... Pabst, 2018) y permite realizar un mejor pronóstico de las LA. La NGS consiste en secuenciar miles de nucleótidos simultáneamente en una sola reacción, cubriendo ya sea todo el genoma, solo el exoma o un panel de genes seleccionados (Jiménez, Hidalgo y Ramírez, 2017). Los resultados de la NGS deben interpretarse teniendo en cuenta otros hallazgos de laboratorio, la morfología, histopatología, inmunofenotipificación, genética molecular tradicional, citogenética y resultados de diagnóstico y datos clínicos (Bacher et al., 2018).

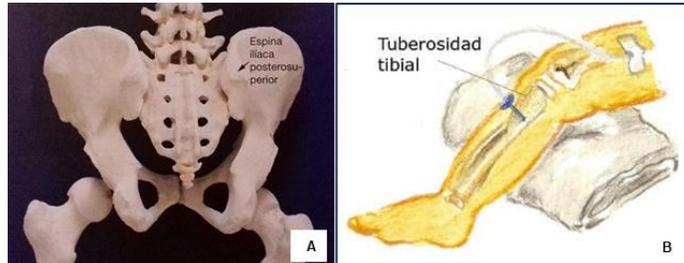
**Punción lumbar.** La investigación de la implicación del SNC en el momento del diagnóstico es necesaria en pacientes pediátricos, porque se requiere un tratamiento específico en el caso de afectación (Creutzig et al, 2012). La leucemia del SNC se define cuando hay >5 leucocitos/ $\mu$ L en el LCR, con blastos presentes en una muestra atraumática o cuando hay parálisis de nervios craneales (Lichtmann et al. 2014).

#### **1.4.1. Evaluación morfológica.**

La evaluación morfológica de un aspirado de MO es el medio más importante para evaluar la función de la MO y los trastornos hematológicos (d’Onofrio, Zini y Bain, 2015). Es el primer paso para el diagnóstico, estadificación y evaluación de la respuesta al tratamiento en las LA. El diagnóstico se puede establecer con el aspirado de MO y con la SP, la biopsia de MO puede no ser necesaria (Proytcheva, 2013).

Los sitios de aspiración de MO en niños, es la cresta ilíaca posterosuperior de la pelvis (Figura 20A) (Rodak et al., 2014), en niños más pequeños, se extrae la médula de la cara medial del extremo proximal de la tibia, justo por debajo de la tuberosidad tibial (Figura 20B) (Bain et al., 2008).

**Figura 20. Sitios de aspiración de médula ósea en niños.** A) Cresta ilíaca posterosuperior de la pelvis. Imagen: Rodak et al, 2014. B) Extremo proximal de la tibia debajo de la tuberosidad tibial. Imagen: ACEUE, 2009.



Después de la quimioterapia, los aspirados pueden ser hipocelulares y pueden no contener elementos hematopoyéticos. En tales casos, la biopsia de MO es adecuada para la CFM y evaluar la EMR (Proytcheva, 2013).

*Obtención del aspirado y preparación de la extensión.* Un aspirado de MO de alta calidad requiere que la dilución de la muestra por SP sea mínima; esta dilución aumenta en proporción al volumen de aspirado. Por esta razón, el volumen a aspirar debe ser de 0.2 a 0.5 mL máximo (d'Onofrio et al., 2015). Se emplea como anticoagulante el EDTA ya que distorsiona menos la morfología celular (Rodak et al., 2014), sin embargo, los frotis deben realizarse tan pronto como sea posible para reducir el artefacto de almacenamiento (Sotavento, Erber, Porwit, Tomonaga y Peterson, 2008).

*Extensión de aspirado sin anticoagulante.* Dado que la MO se coagula más rápidamente que la SP, hay que realizar las extensiones del material aspirado sin demora a la cabecera del paciente.

El extensor se coloca frente a la gota de aspirado en un ángulo de aproximadamente 30° y se desplaza hacia atrás para hacer contacto con la gota y permitir que la muestra se extienda a lo ancho del extensor, éste se desplaza hacia adelante en una acción suave y continua (Sotavento et al, 2008). Los fragmentos, grumos o partículas óseas (agregaciones de hueso y médula hematopoyética), los megacariocitos y los glóbulos de grasa se depositan en la cola del frotis (Bain et al, 2008) (Rodak et al., 2014).

Si no hay grumos suficientes, se pueden concentrar. Esto no suele ser necesario en las médulas hipercelulares, como en las LA (Bain et al, 2008).

*Preparación por compresión o aplastamiento.* Se extiende una parte del aspirado en una caja de Petri o vidrio de reloj y con una pipeta Pasteur se extraen los grumos y se colocan en un portaobjetos de vidrio, con otro portaobjetos, se presiona muy suavemente y finalmente los portaobjetos se separan en dirección longitudinal. Otra técnica de compresión es cuando una gota de MO que contiene grumos se coloca en el centro de un portaobjetos, un segundo portaobjetos se coloca encima del primero, el peso de este sobre el primero es suficiente para aplastar las partículas, no se debe aplicar ninguna fuerza adicional, los portaobjetos se separan en dirección longitudinal (Sotavento et al, 2008). Los frotis se dejan secar al aire libre y posteriormente se tiñen con los colorantes de Romanowsky como la tinción de Wright-Giemsa (Sotavento et al, 2008).

Se pueden usar extensiones adicionales para tinciones citoquímicas las cuales ayudan a orientar el linaje de los blastos cuando por morfología se dificulta. La citoquímica es el estudio de los componentes químicos de la célula, estos elementos pueden ser enzimáticos o no enzimáticos (Rodak et al., 2014).

*Examen pre-microscópico y microscópico.* La evaluación de un aspirado de MO debe seguir un enfoque sistemático (d'Onofrio et al., 2015):

*Fase pre-microscópica.* Implica la adquisición de información clínica: si el paciente se encuentra bajo tratamiento; conteo diferencial y evaluación de frotis de SP; información obtenida en el momento de obtener la muestra (grifo seco) y los resultados del examen físico (d'Onofrio et al., 2015).

*Fase microscópica.* La evaluación de la extensión debe realizarse primero a bajo aumento (objetivo 10x). Un mielograma se realiza cuando las partículas están presentes, cuando la calidad es aceptable y cuando el número de células es suficiente. En otros casos, si la presencia de megacariocitos y precursores hematopoyéticos indica que el material es MO, es posible hacer una evaluación cualitativa (Figura 21) (d'Onofrio et al., 2015). Los pasos que se siguen son:

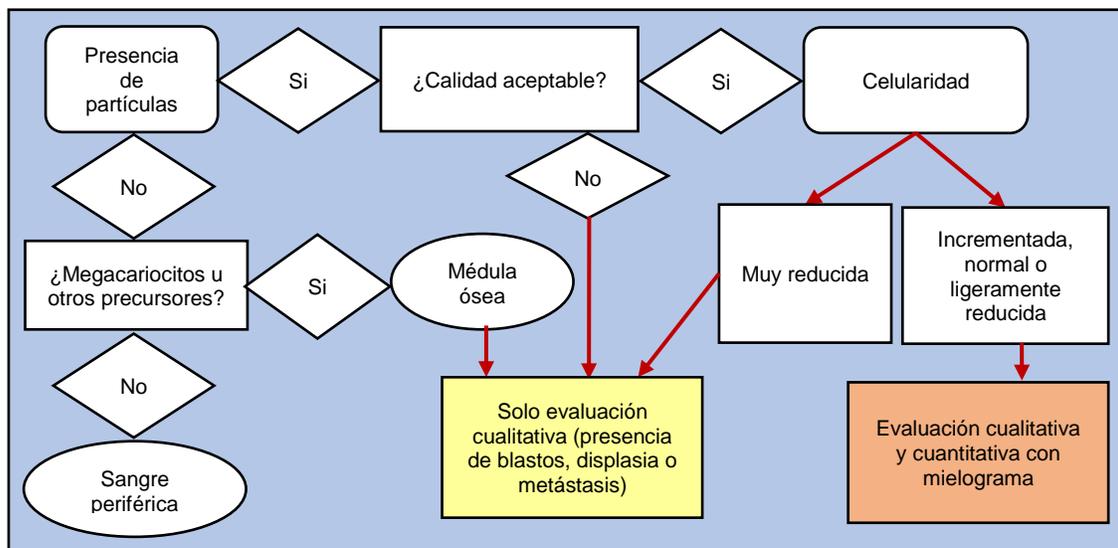
1. *Evaluación de si la muestra es representativa.* Una extensión puede considerarse representativa si hay fragmentos, si la extensión ha sido realizada de manera correcta y si la mayoría de las células aparecen intactas (d'Onofrio et al., 2015).

2. *Evaluación de la celularidad.* Se evalúan varios grumos; se determina mediante la observación de la proporción de células hematopoyéticas con las células grasas (Rodak et al., 2014) presentes en los grumos. La celularidad depende de la edad del paciente

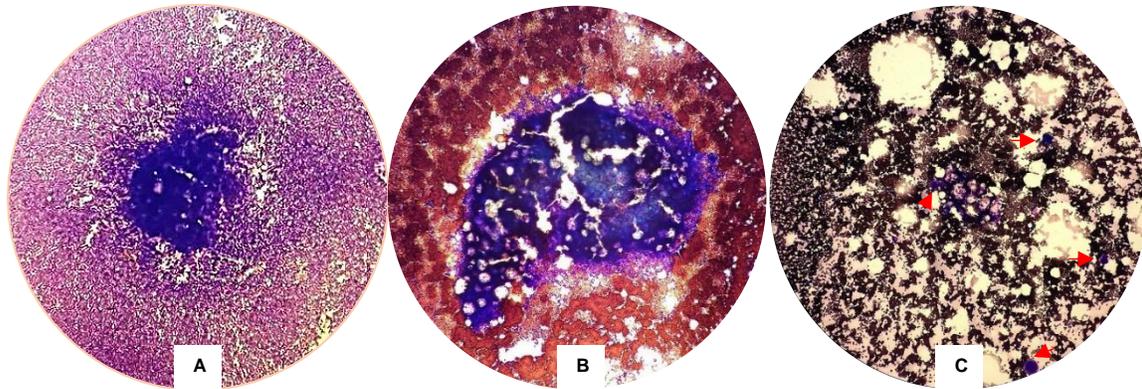
(d'Onofrio et al., 2015), esta evaluación es subjetiva y difícil en el aspirado, pero puede expresarse en términos descriptivos semicuantitativos (d'Onofrio et al., 2015). La celularidad normal en niños menores de 10 años es de 59-95% (media 79%), a los 30 años, la media es de 50%, y a los 70 años, del 30% (rango 11-47%). Considerando estos rangos se puede determinar si los grupos presentan celularidad aumentada (hipercelular), normal (normocelular) o reducida (hipocelular) (Figura 22) (Bain et al, 2008).

3. *Evaluación citológica de células grandes.* Se evalúa la presencia, número y características morfológicas de los megacariocitos, se realiza la identificación de otras células grandes fácilmente reconocibles y que pueden ser constituyentes normales de la MO (osteoblastos, osteoclastos) o grupos de células neoplásicas (d'Onofrio et al., 2015).

En condiciones normales, se pueden encontrar de 2 a 10 megacariocitos/campo a un aumento de 10x (Rodak et al., 2014) tanto en niños como en adultos (Proytcheva, 2013), sin embargo, el tamaño es diferente. Los megacariocitos en neonatos e infantes en comparación con los del adulto, son pequeños, de tamaño uniforme y monolobulados, los megacariocitos de mayor tamaño empiezan a presentarse a partir de los 4 años aproximadamente. Los megacariocitos pequeños, hipolobulados (displásicos) se ven en adultos con LMC y trastornos mielodisplásicos. De acuerdo con lo anterior, los megacariocitos pequeños son un hallazgo normal en infantes y no necesariamente evidencian un estado patológico (Fuchs, McGinn, Cantu, Klein, Sola y Rimsza, 2012).



**Figura 21. Evaluación del aspirado de médula ósea.** En el esquema se muestra el proceso de evaluación de los extendidos de aspirado de médula ósea. Modificado de d'Onofrio, Zini, & Bain, 2015.



**Figura 22. Grumos óseos.** A) En el centro del campo se observa un fragmento de médula ósea hipercelular. B) Médula ósea normocelular, aspirado de médula ósea de paciente pediátrico. C) Médula ósea hipocelular, en la parte superior izquierda del grumo se encuentra un megacariocito; en el campo, en parte superior derecha, parte media e inferior se encuentran otros tres megacariocitos. A y C: aspirado de médula ósea de pacientes pediátricos con LLA. Tinción de Wright, 10x. Imagen: Esmeralda Nuñez Hernandez, 2019.

4. Selección de la mejor área y más representativa para el examen en 100x. Las células por evaluar son las que se encuentran detrás de los grumos, el área seleccionada debe estar donde las células están distribuidas regularmente, separadas, sin superponerse, con una preservación y visibilidad óptimas de las estructuras celulares y sin un exceso de células dañadas (d'Onofrio et al., 2015).

#### 1.4.1.2. Evaluación morfológica y mielograma.

**Evaluación celular.** La citohematología diagnóstica se basa esencialmente en la observación a mayor aumento (objetivo 100x).

Un análisis morfológico cualitativo de las características celulares se acompaña de la evaluación minuciosa con el fin de determinar si muestran o no anomalías morfológicas (Tabla 17). Es de gran importancia la detección de displasia en cualquier linaje (D'Onofrio et al., 2015). Se deben buscar áreas de necrosis, en estas áreas las células se tiñen irregularmente con contornos borrosos, encogimiento citoplasmático y picnosis nuclear. La necrosis de la MO puede producirse en la enfermedad de las células falciformes y en ocasiones en los linfomas, LLA, LLC (Bain et al, 2008).

**Mielograma.** Un recuento diferencial debe comprender células blásticas, promielocitos, mielocitos, metamielocitos, formas en bandas, neutrófilos segmentados, eosinófilos, basófilos, mastocitos, promonocitos, monocitos, linfocitos, células plasmáticas y eritroblastos. El conteo no debe incluir megacariocitos, macrófagos, osteoblastos,

osteoclastos, células estromales, células rotas o células no hematopoyéticas como células tumorales metastásicas (Sotavento et al, 2008). Resulta adecuado un diferencial sobre 200-500 y deben contarse en al menos dos frotis, es adecuado un diferencial utilizando las categorías eritroide, mieloide, linfoide y plasmática (Bain et al, 2008). Se suele optar por no diferenciar los cuatro estadios de maduración de los precursores eritroides o se pueden combinar los tres últimos estadios en un total único y contar por separado solo a los proeritroblastos (Rodak et al., 2014). En el caso de las LA, es importante el recuento específico de los blastos leucémicos y si se trata de valorar la respuesta a la quimioterapia, se deben comparar las extensiones de seguimiento con las extensiones anteriores para valorar el curso de la enfermedad o el efecto del tratamiento (Bain et al, 2008).

**Tabla 17. Características morfológicas que se evalúan en las células.**

<b>CARACTERÍSTICAS</b>	<b>EXPLICACIÓN</b>
<b>Características generales de la célula</b>	Tamaño Forma Relación N:C
<b>Características del núcleo</b>	Forma Posición Contorno <ul style="list-style-type: none"> <li>• Regular</li> <li>• Presencia o no de hendiduras</li> </ul> Cromatina <ul style="list-style-type: none"> <li>• Grado de condensación (laxa, condensada o granular)</li> </ul> Nucléolo <ul style="list-style-type: none"> <li>• Prominencia</li> <li>• Cantidad</li> </ul>
<b>Características del citoplasma</b>	Color Presencia del complejo de Golgi Color de los gránulos (si los tiene) cantidad, tamaño, distribución Membrana celular <ul style="list-style-type: none"> <li>• Contorno regular o irregular de la membrana</li> <li>• Presencia de prolongaciones</li> </ul> Presencia de inclusiones (como bastones de Auer) y vacuolas.

D'Onofrio et al., 2015.

**Determinación de cocientes celulares.** El Comité Internacional de Estandarización en Hematología (ICSH), dentro de sus “Directrices para la Estandarización de Muestras e Informes de Médula Ósea”, indica que la relación mieloide:eritroide (M:E) debe calcularse expresando la proporción de todos los granulocitos y monocitos y sus precursores entre la proporción de los eritroblastos (en todas sus etapas de diferenciación) (Sotavento et al, 2008). En condiciones normales, el cociente M:E es de 2:1 a 4:1, el mieloide:linfoide de 1 a 17:1 y el linfoide:eritroide de 0.2 a 4.0:1 (Bain et al, 2008).

**Tabla 18. Porcentaje de células hematopoyéticas en médula ósea de personas sanas.**

CÉLULA	RECIÉN NACIDO	EDAD						
		0-24 HORAS	3 MESES	12 MESES	18 MESES	2-6 AÑOS	9 AÑOS	17-45 AÑOS
Mieloblasto	0.3	0.5-2	0-4	0.5	0.4	1	0-7-1.8	0-3
Promielocito	0.8	0.5-5	1.5-5	0.7	0.6	0.5	0.8-4.8	1-5
Mielocito	4	1-9	0.5-16	2	2.5	17	18-35	3-15
Metamielocito	19	4.5-35	3-33	11	12	20	15.7-29	4-15
Neutrófilo en banda	29	10-40	2-24	14	14	11	0.9-8	12.5-33.5
Neutrófilo segmentado	7			6	6	10	2.6-14	9-31.5
Eosinófilo y precursores	2.7	1-8	0-6	2	3	6	0-2.5	0-5.5
Basófilo y precursores	0.12	0-1.5	0-0.5	0.1	0.1	-	0	0-1
Monocitos	0.9	0-2.5	0-1	1.5	2	0.4	0	0-6
Precursores eritroides	14.5	39.5	16	8	8	13	9.5-22.3	2.5-17.5
Linfocitos	15	4-22	47	49	46	21	8.5-28	7.5-26.5
Célula plasmática	0	0	0	0.003	0.06	0.13	0.05-0.41	0-1.5

Bain, Clark y Wilkins, 2010.

La variación del patrón natural de la MO debido a la tendencia de la médula a ser aspirada en forma de partículas de diferentes tamaños, la distribución irregular de las células al extenderlas en los portaobjetos y al incontrolable factor de la dilución con SP que puede llegar a ser del 40 al 100% en las muestras de MO de 0.25-0.5 mL (D'Onofrio et al., 2015), permiten que los recuentos diferenciales en los aspirados de sujetos normales varíen enormemente. Cuando hay un incremento de la reticulina medular, algunos de los tipos celulares pueden resistirse a la aspiración quedando por tanto infrarrepresentados en el recuento (Bain et al, 2008).

De forma ideal, los diferenciales deberían realizarse en biopsia, pero las dificultades para la identificación lo hacen impracticable. De acuerdo con lo anterior, los valores normales de los diferenciales celulares y la celularidad en la MO (Tablas 18 y 19) pueden tomarse únicamente como una indicación aproximada (Bain et al, 2008).

**Informe de resultados.** El informe (Tabla 20) debe contener información sobre la calidad del extendido y el tipo de evaluación realizada. Las conclusiones pueden limitarse a una descripción precisa de lo que se ha observado o, si la morfología lo permite, incluir un diagnóstico (D'Onofrio et al., 2015).

**Tabla 19. Composición celular de la médula ósea de acuerdo con la edad.**

EDAD	CELULARIDAD	COMPOSICIÓN CELULAR
Recién nacido	90-100%	<ul style="list-style-type: none"> <li>Hiperplasia mieloide con desviación hacia la inmadurez. &lt; 5% de blastos</li> </ul>
Neonato (desde el nacimiento hasta los 28 días)	90%	<ul style="list-style-type: none"> <li>Disminución en el número de células mieloides en las primeras dos semanas de vida.</li> <li>Disminución en el número de progenitores eritroides.</li> <li>Megacariopoyesis Megacariocitos pequeños monolobulados</li> <li>Aumento gradual en el número de células linfoides, principalmente células B</li> </ul>
Infante (1 mes a 1 año)	80-90%	<ul style="list-style-type: none"> <li>Relación M:E = 5-12:1</li> <li>Mielopoyesis: Alcanza un nivel estable ~ 30-35%</li> <li>Eritropoyesis: Segunda disminución a los 3-4 meses con estabilización subsiguiente del recuento total de eritroblastos del 7-9%. La disminución eritroide es más pronunciada durante el nadir fisiológico.</li> <li>Megacariopoyesis: Megacariocitos pequeños monolobulados</li> <li>Las células linfoides constituyen la mayor población después del primer mes (47.2±9.2%) con predominio de hematogonias. La población más pequeña está compuesta de células T y NK. No hay agregados linfoides.</li> <li>Relación L:M:E= ~ 6: 5:1</li> <li>Depósitos de hierro ausente en niños pequeños</li> </ul>
2-5 años	60–80%	<ul style="list-style-type: none"> <li>Relación M:E= 3-4:1</li> <li>Aumento en el componente mieloide y eritroide y disminución en el número de células B y hematogonias y un ligero aumento en el número de células T.</li> <li>Depósitos de hierro detectable después de los 4-5 años.</li> </ul>
6-12 años	50-70%	<ul style="list-style-type: none"> <li>Relación M:E= 3-4:1</li> <li>Menos del 20% de linfocitos</li> <li>Las células T son más abundantes que las células B</li> <li>Los depósitos de hierro alcanzan el nivel adulto</li> </ul>
> 12 años y adultos	40-60%	<ul style="list-style-type: none"> <li>Relación M: E 3-4: 1</li> <li>Menos del 20% de linfocitos</li> <li>Las células T superan las células B</li> </ul>

M:E, relación mieloide:eritroide; L:M:E, relación:linfoide:mieloide:eritroide. Modificado de Proytcheva, 2013.

**Tabla 20. Información que debe contener el reporte de la evaluación de MO.**

<b>INFORMACIÓN</b>	<b>EXPLICACIÓN</b>
Nombre de la institución	Hospital donde se realiza el estudio
Identificador único de la muestra	Número de acceso al laboratorio
Datos del paciente	Nombre, edad, sexo, fecha de nacimiento
Historial clínico del paciente y sospecha clínica	Presentaciones clínicas actual del paciente, antecedentes clínicos del pacientes y familiares
<b>Descripción del aspirado</b>	
Calidad	Si la extensión y la calidad de la muestra es buena
Fragmentos	Presentes o ausentes
Celularidad	Hiper celular, normocelular o hipocelular
Tinción de hierro	Incluir los resultados si es que este estudio se realizó
Mielograma	Se debe incluir el conteo diferencial realizado
Relación M:E	Se incluye si se evaluó o no este parámetro
Megacariocitos	Si están presentes o no y si sus características morfológicas son normales
Comentarios	Mencionar la presencia de células blásticas y las características morfológicas que presentan. Si hay displasia y que serie es la afectada. Cuando aumenta el número de macrófagos, debe documentarse y registrar si presentan anomalías, p. ej., hemo o eritrofagocitosis, presencia de inclusiones como microorganismos o vacuolas. Un aumento de mastocitos y cualquier morfología atípica deben tenerse en cuenta. Debe describirse cualquier célula anormal o agregado de células tumorales metastásicas y también documentar la presencia de un número significativo de células rotas.
Diagnóstico morfológico	Se indica el diagnóstico al que se llegó
Firma del analista	El informe debe ser firmado por la(s) persona(s) que evaluó la extensión

Modificado de Sotavento et al, 2008 y, D'Onofrio, Zini, & Bain, 2015.

**Terminología utilizada durante el diagnóstico morfológico.** De acuerdo con un consenso del grupo europeo LeukemiaNet (Zini, Bain, Bettelheim, Cortez, D'Onofrio, Faber, ...Bene, 2010) se determinaron algunas terminologías que se mencionan en la Tabla 21 y que se emplean durante la evaluación morfológica de las células sanguíneas en SP y MO, esto con el fin de armonizar los informes oncohematológicos.

**Tabla 21. Terminologías que se utilizan en la evaluación de células sanguíneas.**

- Los precursores eritroides pueden ser designados como:
  - Proeritroblasto
  - Eritroblasto basófilo o eritroblasto temprano
  - Eritroblasto policromático o eritroblasto intermedio
  - Eritroblasto ortocromático o eritroblastos tardíoLos megaloblastos se pueden designar de manera equivalente: promegaloblasto, megaloblastos temprano, intermedio y tardío.
- El término "displasia" indica una maduración morfológicamente anormal y no es sinónimo de "síndrome mielodisplásico". El término "displásico" es aplicable solo a las células de los tres linajes mieloides. Para las células de otros linajes que muestran un desarrollo morfológicamente anormal similar, p. ej. linfocitos, células plasmáticas y mastocitos (a pesar del origen mieloides de este último), es preferible usar el término "atípico".
- La hematopoyesis displásica puede conducir a la producción de eritrocitos morfológicamente anormales (por ejemplo, poiquilocitos) o plaquetas (por ejemplo, gigantes, hipogranulares o con gránulos anormales); sin embargo, el término "displásico" debe reservarse para las células nucleadas.
- La displasia no puede evaluarse en pacientes que reciben factores de crecimiento. La presencia de neutrófilos hipergranulares, a menudo observados en pacientes con sepsis, no debe incluirse entre los criterios para cuantificar la displasia en pacientes con sospecha de SMD o LMA.
- Al determinar el porcentaje de células displásicas para fines de diagnóstico y clasificación, las anomalías morfológicas sutiles no deben considerarse suficientes para clasificar a las células como displásicas.
- Las células anormales de la LPA deben designarse como promielocitos atípicos o anormales, hipergranulares o microgranulares (hipogranulares), según sea el caso. Aunque ambos tipos de células son, de hecho, displásicas, el término "displásico" no es útil en este contexto. Los promielocitos hipogranulares distintos de la LPA hipogranular, se pueden incluir en la categoría general de "promielocitos displásicos".
- Las células blásticas que no pueden ser reconocidas como pertenecientes a un linaje específico deben designarse como "blastos, no clasificados de otra manera". La asignación de los blastos a un linaje específico se facilita cuando se evalúan varias células entre sí en lugar de aisladamente.

SMD: síndrome mielodisplásico; LPA: leucemia promielocítica aguda. Modificado de Zini et al, 2010.

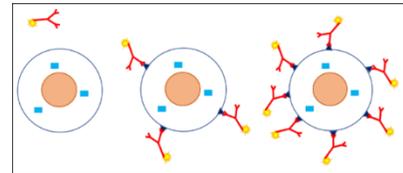
#### **1.4.2. Diagnóstico de leucemias agudas mediante inmunofenotipificación.**

La citometría de flujo multiparamétrica (CFM) es una técnica que permite un análisis celular multiparamétrico de forma rápida, sensible y específica (Barrera et al., 2004) de células o partículas de manera individual (O'Donnell, Ernst y Hingorani, 2013). Un parámetro es una característica física o química de una célula dentro de estos se encuentran: tamaño (Cortés, Cervantes, Ortiz, 2014), granularidad y fluorescencia, esta última se detecta al emplear anticuerpos monoclonales (AcMo) unidos a fluorocromos, estos AcMo reconocen estructuras o proteínas específicas de la célula (Barrera et al, 2004).

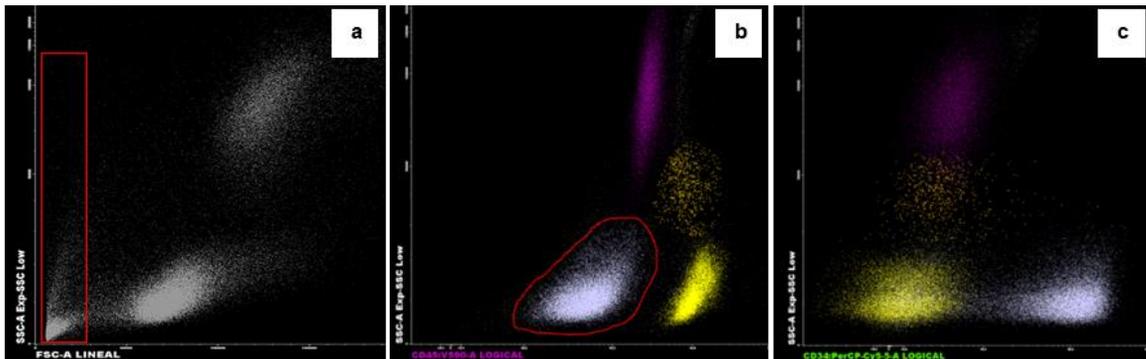
La CFM se basa en hacer pasar células u otras partículas en suspensión, alineadas y de una en una por delante de un haz luminoso. Produce información generada por la

dispersión de la luz y la relacionada con la emisión de luz por los fluorocromos presentes en la célula (Barrera et al, 2004). La dispersión frontal o *FSC (forward scatter)* constituye el tamaño de la célula y la dispersión lateral o *SSC (side scatter)* (Cortés et al., 2014) es proporcional a la granularidad o la complejidad interna de la célula y a la fluorescencia (Adan et al., 2016). La intensidad de la fluorescencia es proporcional a la cantidad de determinado antígeno presente en la célula (Figura 23).

**Figura 23. Intensidad en la expresión de antígenos.** La primera célula no posee en antígeno para el anticuerpo al que ha sido expuesto; la segunda cuenta con pocos antígenos y la tercera presenta una gran cantidad y por lo tanto más anticuerpos se han unido a ésta. *Esmeralda Nuñez Hernandez, 2019.*



El análisis morfológico e inmunofenotípico siguen siendo los principales métodos por los cuales las LA se diagnostican por primera vez (Peters y Ansari, 2011) (Gajendra, 2016). La inmunofenotipificación mediante CFM es un método rápido y confiable, permite diagnosticar, evaluar el pronóstico, dirigir la terapia y permite el seguimiento (en la evaluación de EMR) en las LA (Gajendra, 2016).



**Figura 24. Diagramas dop plot.** a) Diagrama donde se muestra la separación de las células con base en la dispersión frontal (FSC) vs. dispersión lateral (SSC). El rectángulo rojo engloba a una población, se trata de *debris* o trozos de células que deben eliminarse antes de analizar las poblaciones. b) se muestra el grado de expresión de CD45 vs. complejidad. Los linfocitos (amarillo claro) representan la población que muestran una fuerte expresión al igual que los monocitos (amarillo oscuro), los granulocitos (morado) muestran una expresión intermedia de CD45 y alta complejidad, los blastos (blancos) muestran una expresión y complejidad baja. c) los blastos expresan CD34 y además su expresión es intensa. Muestra de un paciente pediátrico con leucemia aguda bifenotípica. *Imagen: Laboratorio de Citometría de Flujo, HIMFG.*

La evaluación de los datos obtenidos por CFM se basa en la inspección de patrones visibles que se muestran en la computadora. El análisis comienza con la inspección de los diagramas de puntos (*dot plot*) que representan el tamaño y la complejidad (Figura 24a), la identificación de poblaciones específicas puede ser confirmada y resuelta aún

más en el gráfico de la dispersión de la densidad del antígeno panhematopoyético CD45 y SSC (útil para la detección de blastos) (Figura 24b). Posteriormente se selecciona la población celular de interés para su análisis el cual se centra en los patrones de expresión de los antígenos, que incluyen datos cualitativos (presencia o ausencia de Ag) y la intensidad de los Ag expresados (Figura 24c). (Rodak et al., 2014).

*Anticuerpos empleados para inmunofenotipificación de las leucemias agudas.* Los objetivos principales para el inmunofenotipo son establecer el linaje y la madurez de las células leucémicas (Ruiz, Rivadeneyra, Duque y Orfao, 2005).

Para definir los diferentes subtipos de LA, en la Tabla 22 se muestran los AcMo a emplearse. No es necesario definir variantes de esta estirpe T. La expresión de cyMPOx más uno de los otros Ag (CD13, CD33 o CD117) es suficiente para definir a la estirpe mieloide, en ausencia de cyMPOx es necesaria la co-expresión de estos tres Ag. Para la LPA, la expresión de CD34<sup>- o tenue</sup>, HLA-DR<sup>- o tenue</sup>, CD13<sup>+heterogéneo</sup>, CD33<sup>++</sup>, CD15<sup>- o tenue</sup>, constituyen un fenotipo sugerente de esta variante. Sin embargo, su confirmación, debe demostrarse el gen quimérico PML/RARa (Ruiz y Pérez, 2010).

Cuando hay una alta cantidad de hematogonias en la MO, la CFM es esencial para descartar una LLA. En la MO normal, todos los tipos de hematogonias (Şedek, Bulsa, Sonsala, Twardoch, Wiczorek, Malinowska,...Szczepeński, 2014) se caracterizan por la adquisición y pérdida regular y ordenada de antígenos de linaje B. Las hematogonias pueden distinguirse de los linfocitos por su débil expresión de CD45 (Chiaretti et al., 2014)

**Tabla 22. Anticuerpos para la inmunofenotipificación de las LA.**

ESTIRPE	LINAJE	MADURACIÓN	SUBCLASIFICACIÓN	OPCIONAL
<b>Linfoblástica T</b>	cyCD3 CD7 CD2	TdT CD34	<i>Ninguna</i>	<i>Ninguna</i>
<b>Linfoblástica B</b>	CD19 cyCD79α	HLA-DR TdT CD34 CD45	CD10 cylgμ slgM	CD20 CD38
<b>Mieloblástica</b>	cyMPOx CD13 CD33 CD177	HLA-DR CD34 CD45	CD15	CD36 CD64

Cy: citoplasmático; s: superficial; MPOx: mieloperoxidasa. Ruiz, Duque y Orfao, 1998; Ruiz et al., 2005; Ruiz y Pérez, 2010.

## 2. JUSTIFICACIÓN

La incidencia de las leucemias agudas en infantes ha ido incrementando, estas neoplasias son de progresión rápida. El análisis morfológico y la inmunofenotipificación por citometría de flujo multiparamétrica son los métodos que se emplean de manera inicial en el diagnóstico de estas neoplasias, estos métodos se realizan de manera rápida y con la información que ambos proporcionan se realiza el diagnóstico oportuno lo cual permite otorgar el tratamiento al paciente y de esta manera lograr la remisión de la enfermedad. Por ello, llevar a cabo el estudio de la correlación entre ambos procedimientos, reiterará la importancia de realizar cada uno, apreciando la importancia del primero como guía inicial, para asegurar el tipo de leucemia con el segundo procedimiento.

### **3. HIPÓTESIS**

Si el análisis morfológico de las células de un aspirado de médula ósea se complementa con el análisis inmunofenotípico (citometría de flujo) en el diagnóstico oportuno de las leucemias agudas, entonces ambos métodos presentan correlación en el diagnóstico de estas neoplasias.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. General**

Comparar la caracterización morfológica con la inmunofenotipificación de aspirados de médula ósea de pacientes pediátricos del Hospital Infantil de México Federico Gómez con sospecha de leucemia aguda, mediante la evaluación morfológica y el análisis por citometría de flujo multiparamétrica para determinar el grado de correlación que existe entre ambos métodos para el diagnóstico y clasificación de las leucemias agudas.

### **4.2. Particulares**

- Generar evidencia de la utilidad del análisis morfológico y por citometría de flujo multiparamétrica en el diagnóstico de las leucemias agudas para demostrar que ambos métodos son útiles en el diagnóstico de las leucemias agudas.
- Categorizar el tipo de leucemia aguda integrando todos los resultados de los hallazgos morfológicos y del inmunofenotipo para establecer un diagnóstico final.
- Comparar los resultados del diagnóstico morfológico con el inmunofenotípico, analizando muestras de leucemias agudas bifenotípicas para demostrar el alcance que tiene el inmunofenotipo en el diagnóstico de este tipo de leucemias.
- Identificar aspirados de médula ósea de buena calidad (fase preanalítica) mediante su evaluación macroscópica y microscópica para realizar un adecuado diagnóstico morfológico.

## **5. MATERIAL Y MÉTODOS**

Un total de 59 pacientes con sospecha de leucemia aguda fueron incluidos en este estudio, el cual se realizó en el laboratorio de citometría de flujo del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

### **5.1. Criterios de inclusión de los pacientes**

- Menores de 18 años
- Con sospecha de leucemia aguda con base en criterios clínicos
- Con sospecha de recaída con base en criterios clínicos

### **5.2. Criterios de exclusión de los pacientes**

- Pacientes con muestra no valorable para realizar el diagnóstico morfológico e inmunofenotípico

### **5.3 Metodología**

#### **5.3.1. Muestra de estudio.**

A los pacientes con sospecha de leucemia aguda se les realizó el aspirado de médula ósea en la cara medial del extremo proximal de la tibia, el aspirado se colocó en un tubo con EDTA, la misma muestra fue utilizada para el análisis morfológico e inmunofenotípico.

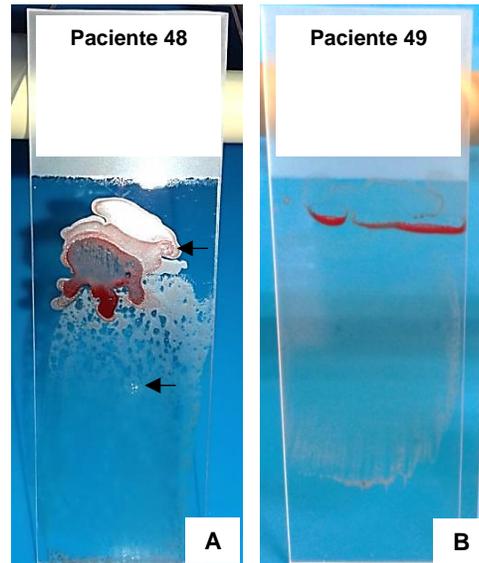
#### **5.3.2. Recepción de la muestra.**

Al recibir la muestra se tomaron los datos del paciente (nombre, edad, género, tratamiento previo, diagnóstico presuntivo), se realizó una evaluación macroscópica del aspirado.

#### **5.3.3. Preparación del extendido por la técnica de compresión.**

Se mezcló la muestra por inversión de 8 a 10 veces, se colocó una gota de aspirado en el centro de un portaobjetos, otro portaobjetos se colocó sobre la gota y se ejerció una presión muy suave, los portaobjetos se separaron uno del otro en direcciones opuestas, se dejó que el extendido se secase al aire libre, se visualizó

macroscópicamente si quedaron grumos medulares atrapados en la extensión (Figura 25A), si no presentaba grumos (Figura 25B) se realizaba otra preparación: en un extremo del portaobjetos se colocó una gota de la muestra, se inclinó el portaobjetos y en algunos casos se succionó el exceso de sangre por el borde de la gota con una pipeta Pasteur y se dejó secar al aire libre.



**Figura 25. Extensiones de médula ósea.** Todas las extensiones se realizaron por la técnica de compresión. A) En este extendido se observan dos grumos medulares (flechas negras). B) En esta extensión no se encontraron grumos. *Imagen: Esmeralda Nuñez Hernandez, 2019.*

#### 5.3.4. Tinción del extendido con colorante de Wright.

*Fundamento de la tinción de Wright.* Esta tinción contiene los colorantes: azul de metileno y eosina. El metanol contenido en la solución de la tinción fija las células en el portaobjetos, la tinción de los componentes celulares se produce cuando se ionizan los colorantes al agregar buffer de fosfatos; el azul de metileno es básico y tiñe los componentes ácidos de las células de color azul a violeta, la eosina es ácida y tiñe de naranja-rosado los componentes básicos, las estructuras con pH neutro se tiñen con ambos colorantes y presentan un color lavanda a lila (Carr y Rodak, 2010).

Una vez secos, los extendidos se tiñeron con la solución de Wright: se colocaron en una charola de tinción, sobre la preparación se colocó el colorante de Wright de manera que cubriera todo el extendido, se dejó actuar 5 minutos, posteriormente se agregó buffer de fosfatos (pH 6.4) en una cantidad similar al del colorante agregado y se mezclaron ambos reactivos soplando con una pipeta Pasteur, se dejó actuar otros 10 minutos, se eliminó la mezcla del colorante con buffer e inmediatamente se lavó el portaobjetos con agua corriente cuidando que los grumos medulares (cuando estaban

presentes) no se despegaran del portaobjetos, se limpió la parte posterior del portaobjetos y se dejó secar la preparación al aire libre inclinando el portaobjetos.

### **5.3.5. Análisis morfológico.**

La evaluación de un aspirado de MO debe seguir un enfoque que permita una evaluación de la calidad de la preparación, la evaluación debe realizarse primero con bajo aumento (objetivo 10x) (D'Onofrio et al., 2015).

La citohematología diagnóstica se basa esencialmente en la observación con el objetivo de mayor aumento (100x). Un análisis morfológico se acompaña de la evaluación minuciosa de las células con el fin de determinar si muestran o no anomalías en su morfología (D'Onofrio et al., 2015). Un recuento diferencial (mielograma), permite obtener una estimación cuantitativa del porcentaje de células pertenecientes a los diversos linajes hematopoyéticos (Sotavento et al, 2008).

**Evaluación con el objetivo de 10x.** Se realizó una revisión cuidadosa de toda la extensión para verificar si la calidad de la muestra era buena (la calidad de la muestra es aceptable cuando la mayoría de las células aparecen intactas, no hay presencia de filamentos de fibrina y/o presencia de coágulos), si las células se tiñeron, si había presencia de células tumorales, presencia de macrófagos y megacariocitos y cuando estas células estaban presentes se utilizaba el objetivo 100x para identificar los detalles morfológicos (D'Onofrio et al., 2015).

*Determinación semicuantitativa de la celularidad:* cuando los grumos estaban presentes, se observaban detenidamente y se estimaba la proporción de células hematopoyéticas en relación con las células grasa presentes en los grumos (D'Onofrio et al., 2015).

Cuando los megacariocitos estaban presentes se realizaba su estimación numérica por campo, revisando todo el extendido.

A este aumento se seleccionaba el área de lectura, es decir, cerca de los grumos medulares cuando éstos estaban presentes.

**Evaluación con el objetivo de 40x.** La mejor área de lectura se confirmaba a este aumento, debía ser un área donde la distribución celular fuera adecuada, es decir, las células no debían estar superpuestas ni muy separadas y la mayoría de las células no debían estar destruidas (D'Onofrio et al., 2015).

## **Evaluación con el objetivo de 100x**

***Evaluación morfológica de las células:*** se examinaron las características morfológicas de las células (a medida que se realizaba el mielograma) como tamaño, relación N:C, apariencia de la cromatina, presencia, tamaño y cantidad de nucléolos, forma y tamaño del núcleo y características de su borde (regular o con hendiduras), color del citoplasma, presencia de gránulos en el citoplasma y sus características (cantidad, tamaño, forma y color), presencia de vacuolas, presencia bastones de Auer (cantidad y agrupación) u otras inclusiones citoplasmáticas, características del contorno de la membrana (D'Onofrio et al., 2015), asincronía en la maduración.

***Mielograma:*** se realizó el conteo diferencial de todas las células nucleadas: blastos, promielocitos, mielocitos (neutrófilo y eosinófilo), metamielocitos (neutrófilo y eosinófilo), bandas (neutrófilo y eosinófilo), neutrófilos segmentados, eosinófilos, basófilos, promonocitos, monocitos, linfocitos, células plasmáticas, proeritroblastos, eritroblastos: basófilos, policromáticos y ortocromáticos; y mastocitos. En el conteo diferencial no se incluyeron las células rotas, los megacariocitos ni los macrófagos (Sotavento et al, 2008); se realizó en 500 células y se contaron en dos extendidos (dos casos se contaron en un solo extendido). Se determinó el promedio de cada célula encontrada en ambos frotis y se calculó el porcentaje de cada una.

***Determinación de la relación Mieloide:Eritroide (M:E).*** Se sumaron todas las células mieloides y por separado se sumaron todos los precursores eritroides, finalmente se dividió el número de células mieloides entre el número de precursores eritroides.

***Asignación del subtipo morfológico:*** se asignó el subtipo de leucemia aguda de acuerdo con los criterios establecidos por el grupo FAB, el porcentaje de blastos para definirla como positiva fue  $\geq 20\%$  sobre el total de células nucleadas (TCN) cuando se realizaba por primera vez el diagnóstico (de acuerdo con la OMS) y,  $>5\%$  sobre el TCN cuando se trataba de recaída.

***Control de calidad de los extendidos.*** De acuerdo con D'Onofrio y col. (2015), una buena calidad de la preparación implica que la celularidad sea adecuada, que la mayoría de la células se encuentren intactas y que la tinción sea adecuada para que sea posible apreciar detalles celulares. Para asegurar esto, se realizó lo siguiente: si había gran cantidad de precipitado del colorante en la muestra, se realizaban otros extendidos y se teñían de manera que el colorante no se evaporara. Cuando había

gran cantidad de células rotas y/o gran cantidad de células no teñidas, se descartaban dichos extendidos para su lectura y se evaluaban los demás, en caso de que también se encontraran las mismas características en los últimos, se realizaban otro extendidos de manera cuidadosa para descartar que los frotis anteriores se hayan realizado de manera incorrecta, en caso de que estos hallazgos siguieran presentándose, se empleaban colorantes y buffer de diferente lote al utilizado anteriormente (en caso de células no teñidas) u otro personal del laboratorio realizaba el extendido (cuando había abundantes células destruidas), si las células en estos últimos frotis no se encontraban destruidas se realizaba la lectura en éstos, pero si las células seguían destruidas y no se teñían, la muestra se descartaba para su evaluación morfológica.

### **5.3.6. Recopilación de datos de inmunofenotipo y de parámetros hematológicos.**

De los 59 casos incluidos en este estudio, se revisaron los marcadores que expresaron los blastos, además se determinó el porcentaje de estas células (empleando CD45/SSC) y su viabilidad en el citómetro de flujo BD FACSCanto II.

*Asignación del subtipo inmunológico de la leucemia aguda:* para la subclasificación inmunológica se emplearon los criterios y el sistema de puntuación del EGIL, se consideró como positivo cuando la expresión de un antígeno en las células era >20%.

De la bitácora del laboratorio se recolectaron los datos del conteo leucocitario, plaquetario y concentración de hemoglobina de todos los pacientes en este estudio.

### **5.3.7. Comparación de datos obtenidos por el método morfológico y por inmunofenotipo y cálculo de datos estadísticos**

Se compararon los resultados obtenidos por ambos métodos, se calculó el grado de concordancia mediante la tabla de contingencia 2x2 y mediante el índice *kappa* ( $\kappa$ ), también se calculó la sensibilidad, especificidad, valor de predicción positivo y negativo. La correlación ( $R^2$ ) entre el porcentaje de blastos obtenidos por ambos métodos se calculó en Excel y se determinaron medias y porcentajes.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Resultados de la evaluación de la calidad de la muestra

Un total de 59 muestras fueron incluidas durante este estudio. Para evaluar la calidad de las muestras se realizó una inspección macroscópica antes de realizar los extendidos, de todas las muestras, siete fueron las que macroscópicamente presentaban una apariencia viscosa y se observaron coágulos, microscópicamente se observó una gran cantidad de células destruidas, adicionalmente, algunos casos presentaban finos precipitados color violeta que se encontraban en toda la extensión. Otras nueve muestras que macroscópicamente presentaba alguna alteración (presencia de pequeños coágulos y/o viscosa), microscópicamente se observó una cantidad adecuada de células intactas. También se determinó el porcentaje de células viables mediante CFM.

Para determinar si la muestra era representativa, microscópicamente se evaluó la presencia o ausencia de grumos medulares y megacariocitos para saber si la muestra se encontraba o no hemodiluida y si la mayoría de las células se encontraban intactas. Solamente ocho de las 58 muestras de MO contenían grumos medulares y 21 presentaban megacariocitos. Estas observaciones no aplicaron para una muestra debido a que era SP (Tabla 23).

**Tabla 23. Evaluación macroscópica, microscópica y mediante CFM del aspirado de médula ósea de pacientes pediátricos con sospecha de leucemia aguda.**

No.	% VIABILIDAD (CFM)	OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA	OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA		ÁREA DE LECTURA (100x)
		CARACTERÍSTICA	GRUMO MEDULAR (10x)	MEGACARIOCITOS (10x)	
1	80	Normal	1/extendido	0.1/campo	B
2	-	Normal	A	A	B
3	69.8	Ligeramente viscosa		A	E
4	84	Normal	A	A	B
5	93.2	Normal	A	2/extendido	B
6	74.2	Normal	A	A	B
7	88.9	Normal	A	A	B
8	64.3	Normal	A	A	B
9	87.4	Normal	A	A	B
10	90.8	Normal	A	A	B
11	83.1	Normal	A	A	B
12	92.3	<i>Frotis realizado por hospital</i>	21/extendido	0.1/campo	B
13	81.3	Normal	A	3 núcleos desnudos/extendido	B
14	86.6	Normal	A	3 núcleos desnudos/extendido	B
15	87.9	Normal	A	0.1/campo	B
16	91	Normal	A	A	B
17	98.7	Viscosa	A	0.1/campo	B
18	93	Normal	A	A	B

Tabla 28. (continuación)

No.	% VIABILIDAD (CFM)	OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA		OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA	
		CARACTERÍSTICA	GRUPO MEDULAR (10x)	MEGACARIOCITOS (10x)	ÁREA DE LECTURA (100x)
19	89	Normal	A	A	B
20	46.1	Normal	A	A	B
21	92	Normal	A	A	B
22	87	Viscosa, presencia de coágulos pequeños	A	A	B
23	90	Viscosa	A	2/extendido	B
24	88.2	Normal	A	1/extendido	B
25	93.4	Normal	1/extendido	5/extendido	B
26	89	Normal	7/extendido	0.1/extendido	B
27	75	Normal	A	4/extendido	B
28	83.6	Normal	A	A	B
29	93.6	Normal	A	A	B
30	87.2	Normal	A	1/extendido	B
31	-	Presencia de coágulo pequeño	A	1/extendido	B
32	-	Normal	A	A	B
33	-	Normal	A	A	B
34	-	Normal	A	A	B
35	84	Viscosa	A	A	B
36	73.5	Viscosa, presencia de fibrina	A	A	I
37	82.3	Viscosa, presencia de fibrina y coágulo grande	A	A	I
38	90.4	Normal	A	2/extendido	B
39	-	Viscosa	A	A	B
40	-	Viscosa, presencia de fibrina	-	-	I
41	87	Ligeramente viscosa	A	A	B
42	94	Presencia de coágulo pequeño	3/extendido	4.8/campo	B
43	90	Normal	N/A (s. p.)	N/A (s. p.)	B
44	64	Viscosa, presencia de coágulos de diferentes tamaños	A	A	F
45	95	Normal	A	A	B*
46	92	Normal	A	A	C
47	89	Normal	A	A	D
48	-	Normal	2/extendido	2/extendido	B*
49	79	Normal	A	A	B
50	-	Normal	A	A	G
51	-	Viscosa, presencia de coágulos	-	-	H
52	-	Viscosa, presencia de coágulos	-	-	H
53	76.5	Normal	1/extendido	3/extendido	B
54	88	Normal	1/extendido	0.1/campo	B
55	93.8	Normal	A	1/extendido	B
56	80	Normal	A	A	B
57	72.4	Normal	A	1/extendido	B
58	93	Viscosa, presencia de coágulos pequeños	A	A	B
59	50	Normal	A	A	B

A: ausente; N/A: no aplica; s. p.: sangre periférica; B: Buena distribución de las células, no se encuentran tan separadas ni se superponen. La mayoría de las células se encuentran íntegras (se logran observar sus características). B\*: Buena distribución celular, la mayoría de las células se encuentran íntegras, se observan los bastones de Auer en los blastos; I: abundantes células rotas y presencia de mallas de fibrina en toda la extensión; C: la mayoría de las células se encuentran íntegras, se observan los abundantes bastones de Auer y los gránulos azurófilos y naranjas que se encuentran en los promielocitos; D: La mayoría de las células se encuentran íntegras, se observan escasos gránulos primarios en una cantidad muy baja de blastos; E: abundantes células destruidas, presencia de finos precipitados color violeta; F: Abundantes células rotas, presencia de mallas de fibrina, eritrocitos crenados; G: Presencia de finos precipitados color violeta; H: Abundantes células rotas y presencia de coágulos y fibrina.

## 6.2. Concordancia obtenida entre el análisis morfológico e inmunofenotípico

De las 59 muestras analizadas, 47 coincidieron empleando ambos métodos y 12 fueron discordantes, tal como se detalla en la Tabla 24; el porcentaje de concordancia entre ambos métodos fue de 79.6% (Tabla 25) y el índice *kappa* ( $\kappa$ ) de 0.352.

**Tabla 24. Pacientes pediátricos con sospecha de LA diagnosticados por morfología e inmunofenotipificación.**

No.	GÉNERO	EDAD (AÑOS)	ANÁLISIS MORFOLÓGICO		ANÁLISIS INMUNOFENOTÍPICO		CONCORDANCIA
			% BLASTOS	CLASIFICACIÓN FAB	% BLASTOS	CLASIFICACIÓN EGIL	
1 **	F	13	23.5	LLA-L2	12.7	Pro-B	Concordante
2 **	F	17	89.8	LLA-L2	91.6	Pro-B	Concordante
3	F	7	-	S/Dx	63.9	Pro-B	Discordante (A)
4	M	4	87.6	LLA-L1	63	Pre-B común	Concordante
5	M	2	94.8	LLA-L1	78	Pre-B común	Concordante
6	M	3	90.4	LLA-L1	74.2	Pre-B común	Concordante
7	M	4	84.4	LLA-L2	67.5	Pre-B común	Concordante
8	F	4	70.2	LLA-L1	58.3	Pre-B común	Concordante
9	F	5	93	LLA-L2	77.6	Pre-B común	Concordante
10	F	6	70.4	LLA-L1	70.7	Pre-B común	Concordante
11	F	5	80.3	LLA-L2	64	Pre-B común	Concordante
12	F	7	86.2	LLA-L2	80	Pre-B común	Concordante
13	F	14	94.1	LLA-L2	74.5	Pre-B común	Concordante
14	F	5	86.9	LLA-L2	76.2	Pre-B común	Concordante
15	M	16	87.5	LLA-L2	82.6	Pre-B común	Concordante
16	M	4	80	LLA-L2	80.5	Pre-B común	Concordante
17	F	11	58.6	LLA-L2	61.8	Pre-B común	Concordante
18	M	12	29	LLA-L2	25.5	Pre-B común	Concordante
19	M	5	88.7	LLA-L1	72.6	Pre-B común	Concordante
20	M	14	35.2	LLA-L1	12.1	Pre-B común	Concordante
21	F	1	81	LLA-L1	74.4	Pre-B común	Concordante
22	F	5	84.7	LLA-L2	62.5	Pre-B común	Concordante
23 **	F	15	87.4	LLA-L1	82.3	Pre-B común	Concordante
24	M	3	77.4	LLA-L2	65.2	Pre-B común	Concordante
25	F	5	86	LLA-L1	77.6	Pre-B común	Concordante
26 **	M	9	97.9	LLA-L2	88.1	Pre-B común	Concordante
27	F	9	85.6	LLA-L2	66.7	Pre-B común	Concordante
28	F	2	96	LLA-L2	80.7	Pre-B común	Concordante
29	F	5	86	LLA-L2	82.3	Pre-B común	Concordante
30	F	14	93.4	LLA-L2	78.5	Pre-B común	Concordante
31	M	7	66.6	LLA-L2	52	Pre-B común	Concordante
32	M	5	95.1	LLA-L1	92	Pre-B común	Concordante

Tabla 24 (continuación)							
No.	GÉNERO	EDAD (AÑOS)	ANÁLISIS MORFOLÓGICO		ANÁLISIS INMUNOFENOTÍPICO		CONCORDANCIA
			% BLASTOS	CLASIFICACIÓN FAB	% BLASTOS	CLASIFICACIÓN EGIL	
33	M	3	78.5	LLA-L1	79.4	Pre-B común	Concordante
34	M	6	96.8	LLA-L2	90	Pre-B común	Concordante
35 **	M	7	84.6	LLA-L1	88.4	Pre-B común	Concordante
36	M	14	-	S/Dx	48.5	Pre-B común	Discordante (A)
37 *	M	9	-	S/Dx	73.1	Pre-B común	Discordante (A)
38 **	M	10	4.5	No LA	10	Pre-B común	Discordante. Mediante el análisis morfológico se encontró un porcentaje menor de blastos que los obtenidos mediante CFM.
39 *	M	7	73.1	LLA-L2	73	Pre-B	Concordante
40	M	2	-	S/Dx	64.4	Pre-B	Discordante (A)
41	M	15	92.3	LLA-L2	72	Pre-B	Concordante
42	F	1	81.3	LLA-L2	74	LLA-T	Concordante
43	M	13	88.4	LLA-L1	85.1	LLA-T	Concordante
44	M	3	-	S/Dx	52	LLA-T	Discordante (A)
45	M	11	48.9	LMA-M2	50.5	Mieloide	Concordante
46	M	—	85.2	LMA-M3	72	Mieloide	Concordante
47 **	M	13	94.8	LMA-M1	83.4	Mieloide	Concordante
48 **			39.4	LMA-M2	37.8	Mieloide	Concordante
49			48.6	LLA-L2	48.9	B/Mieloide	Discordante. Mediante el análisis morfológico se determinó una LLA-L2 y por CFM una LAB
50 **			53.4	LMA-M2	47	T/Mieloide	Discordante. Por morfología se determinó una LMA-M2 y mediante CFM se determinó una LAB
51			-	S/Dx	92.5	B/T	Discordante (A)
52			-	S/Dx	73	B/T	Discordante (A)

Tabla 24 (continuación)							
No.	GÉNERO	EDAD (AÑOS)	ANÁLISIS MORFOLÓGICO		ANÁLISIS INMUNOFENOTÍPICO		CONCORDANCIA
			% BLASTOS	CLASIFICACIÓN FAB	% BLASTOS	CLASIFICACIÓN EGIL	
53 **			12	LA	0.4	M.O. Normal	Discordante. Debido a que se solicitó el estudio para diagnóstico de recaída, por el % de blastos obtenidos mediante el análisis morfológico sí se consideró como recaída; sin embargo, por CFM se encontró un % menor de blastos.
54 **			10.4	LA	2	M.O. Normal	Discordante. Debido a que se solicitó el estudio para diagnóstico de recaída, por el % de blastos encontrado en el análisis morfológico sí se consideró como recaída; sin embargo, por CFM se encontró un % menor de blastos
55			0.4	No LA	2	M.O. Normal	Concordante
56			0.8	No LA	0.8	M.O. Normal	Concordante
57 **			2.3	No LA	0.7	M.O. Normal	Concordante
58 *			2.4	No LA	2	M.O. Normal	Concordante
59 **			1	No LA	2	M.O. Normal	Concordante

M.O.: médula ósea. S/Dx: sin diagnóstico debido a que la muestra era de mala calidad; LA: leucemia aguda; LAB: leucemia aguda bifenotípica; CFM: citometría de flujo multiparamétrica; No LA: por morfología no se diagnosticó una leucemia aguda; \*: pacientes de recién diagnóstico; \*\*: pacientes con sospecha recaída, el resto de los casos sin datos de recaída o de recién diagnóstico; Discordante (A): El diagnóstico morfológico no se logró realizar, en el extendido se observó presencia de coágulos y/o fibrina y/o gran cantidad de células destruidas, sin embargo, por CFM si se realizó el diagnóstico.

**Tabla 25. Resultados positivos y negativos para LA obtenidos mediante morfología e inmunofenotipificación.**

	INMUNOFENOTIPO POSITIVO	INMUNOFENOTIPO NEGATIVO
MORFOLOGÍA POSITIVA	42	2
MORFOLOGÍA NEGATIVA	10	5

Se determinó la sensibilidad, la especificidad y los valores predictivos de la morfología, estos resultados se muestran en la Tabla 26.

**Tabla 26. Parámetros determinados para el análisis morfológico.**

<b>PARÁMETRO</b>	<b>%</b>
<b>Sensibilidad</b>	80
<b>Especificidad</b>	71
<b>VPP</b>	95
<b>VPN</b>	33

VPP: Valor predictivo positivo; VPN; valor predictivo negativo.

Los casos de LLA que concordaron en ambos métodos fueron 38, de los cuales por morfología 14 (36.8 %) correspondieron al subtipo LLA-L1 y 24 (63.2%) al subtipo LLA-L2. Dos casos que por inmunofenotipo fueron Pro-B, presentaron una LLA-L2; los pre-B común presentaron una morfología tanto de tipo L1 (13 casos) como de L2 (19 casos) y dos casos pre-B morfológicamente fueron L2. En cuanto a las LLA-T, un caso presentó una morfología de tipo L1 y el otro una L2.

Cuatro casos de LMA fueron concordantes en ambos métodos, por morfología se encontraron cinco casos: LMA-M1 (un caso), LMA-M2 (tres casos) y LMA-M3 (un caso). Por inmunofenotipo se descartó una LMA-M2 el cual resultó ser una bifenotipia T/Mieloide.

En las LAB, la B/Mieloide morfológicamente se presentó como LLA-L2, la T/Mieloide como LMA-M2, mientras que los dos casos de B/T no se pudieron determinar morfológicamente debido a que la muestra no era de una calidad adecuada.

Dos de los casos que ingresaron para el diagnóstico de recaída, por morfología fueron positivos debido a que se encontró un porcentaje de blastos >5% (12 y 10.4%) en ambas muestras, sin embargo, no se logró distinguir el linaje específico al que pertenecían, por CFM se determinó un porcentaje de blastos mucho menor, que fueron de 0.4% y 2% respectivamente, además, la muestra inmunológicamente mostró estadios normales de diferenciación, con estos resultados, los casos se consideraron como normales y se descartó la posible recaída que se sospechó mediante el análisis morfológico. Estos dos casos más otros cinco fueron determinados como normales mediante CFM, dando un total de siete muestras normales, mientras que por morfología en seis casos se determinó que no se trataba de una LA, uno de estos seis fue descartado como normal debido a que por CFM se diagnosticó una LLA de linaje B (Pre-B común). De manera que solamente cinco casos fueron concordantes en ambos métodos para descartar una leucemia aguda.

En siete casos no se logró el diagnóstico por morfología debido a que las muestras no eran de una calidad adecuada, mientras que al evaluarlas por CFM fueron positivas para leucemia aguda.

### 6.3. Correlación entre el porcentaje de blastos obtenidos por morfología y por citometría de flujo multiparamétrica

Se calculó el coeficiente de correlación entre el porcentaje de blastos obtenidos mediante morfología y por CFM (52 muestras) encontrándose una  $R^2$  de 0.9406, lo cual indica una buena correlación entre ambos métodos y como se puede apreciar en la Figura 26, en la mayoría de los casos los puntos no se encuentran tan alejados de la línea de regresión.

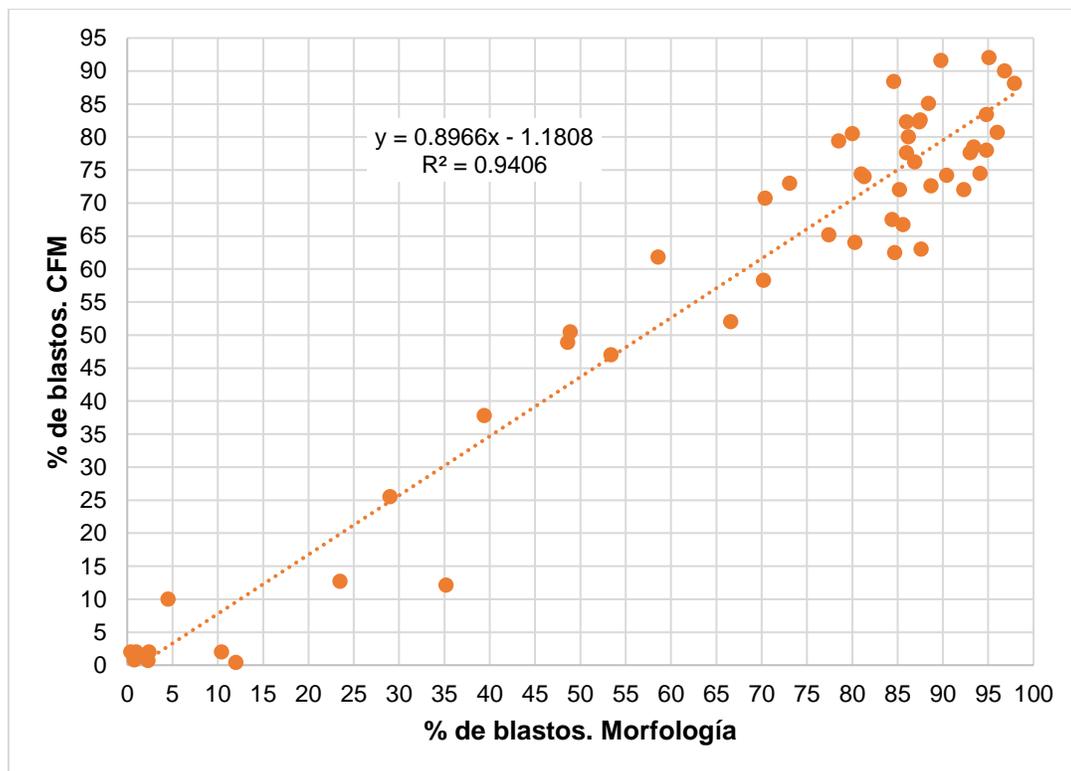


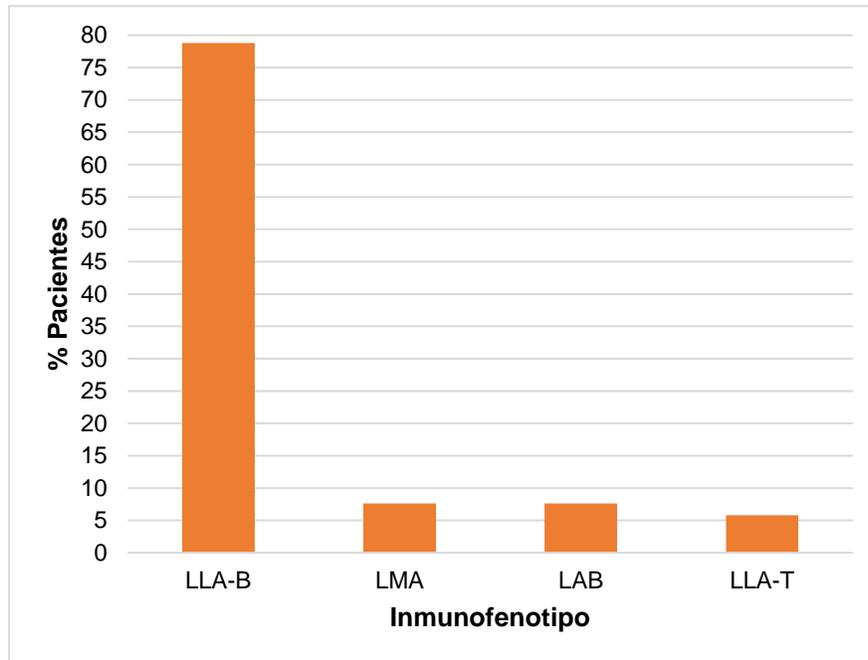
Figura 26. Correlación entre el porcentaje de blastos obtenidos por morfología y por citometría de flujo multiparamétrica.

### 6.4. Subtipos de leucemia aguda obtenidos mediante inmunofenotipificación

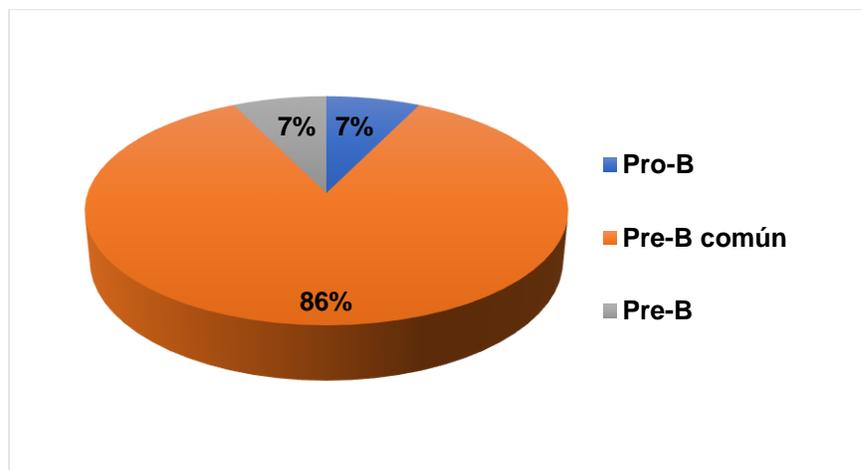
De la población estudiada y de acuerdo con los resultados del análisis inmunofenotípico, 41 (78.8%) casos correspondieron a LLA-B, tres casos (5.8%) a LLA-T, cuatro casos (7.7%) a LMA y cuatro (7.6%) a LAB (Figura 27).

De acuerdo con el perfil inmunofenotípico, de los 41 casos de LLA-B, tres (7.3%) correspondieron al subtipo Pro-B, 35 (85.4%) al Pre-B común y tres (7.3%) al subtipo Pre-B (Figura 28).

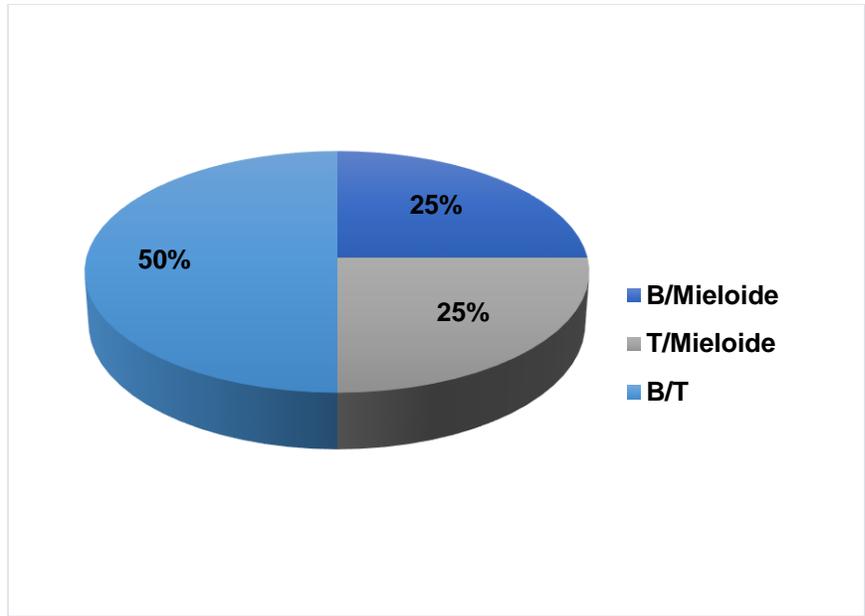
En cuanto a las LAB, un caso (25%) resultó ser una B/Mieloide, un caso (25%) T/Mieloide y dos (50%) correspondieron a una B/T (Figura 29).



**Figura 27.** Distribución de subtipos de LA, determinados por inmunofenotipo.



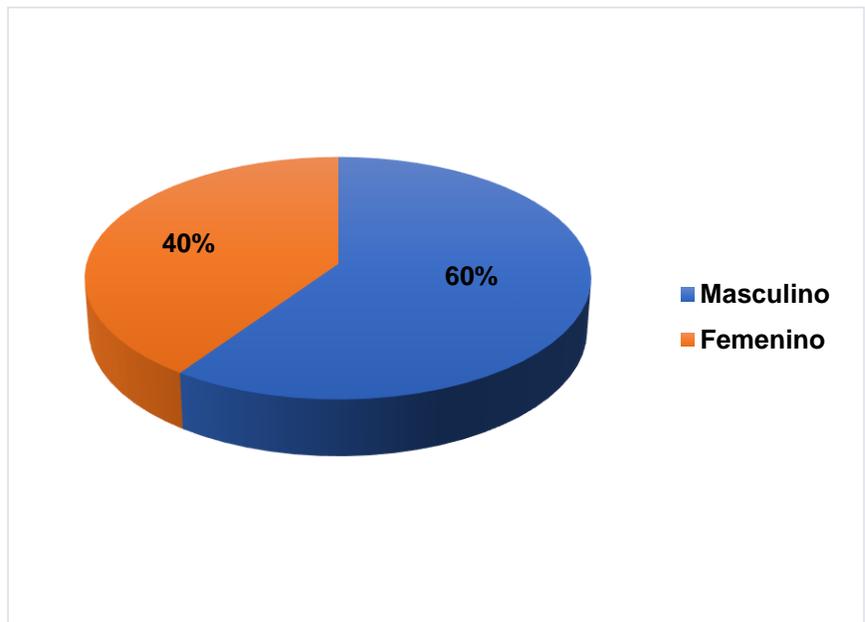
**Figura 28.** Porcentaje de subtipos de LLA-B.



**Figura 29.** Subtipos de LAB determinados por inmunofenotipo.

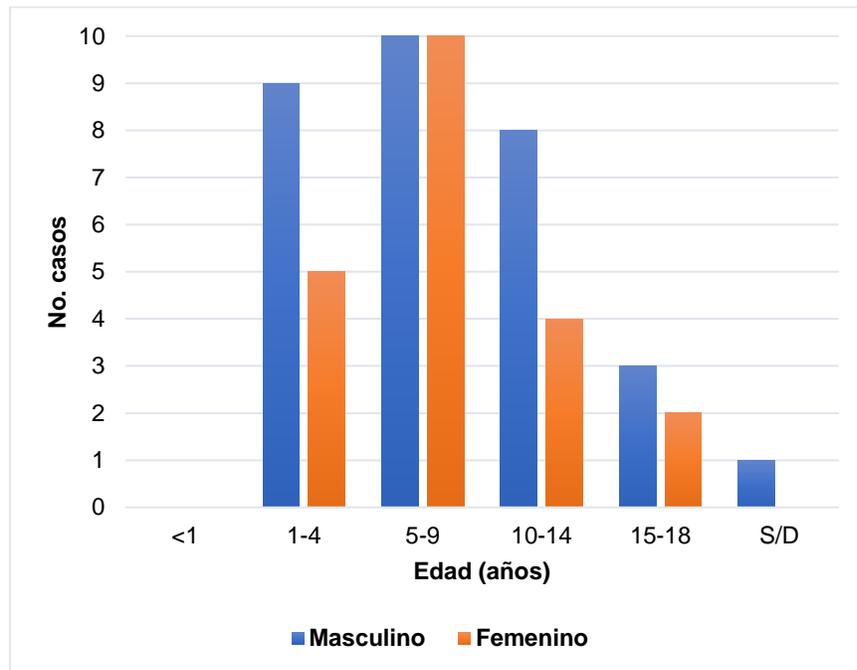
### 6.5. Resultados epidemiológicos

De acuerdo con el género, se encontró una mayor prevalencia en pacientes masculinos (31 casos, 59.6%) que en pacientes femeninos (21 casos, 40.4%), tal como se muestra en la Figura 30.



**Figura 30.** Proporción de pacientes masculinos y femeninos que presentan algún tipo de LA.

De acuerdo con la edad, se encontraron pacientes desde uno hasta 17 años, con una edad promedio de 7.7; el rango donde se encontraron más casos de leucemia fue de cinco a nueve años (38.5%) seguido de pacientes de uno a cuatro años (26.9%), no se encontraron pacientes menores de un año que cursaran con leucemia (Figura 31).



**Figura 31.** Rango de edades y número de pacientes masculinos y femeninos con LA.

## 6.6. Resultados de parámetros hematológicos

De acuerdo con el conteo leucocitario, la media fue de  $88.7 \times 10^3$  leucocitos/ $\mu\text{L}$  ( $2-433.4 \times 10^3$  leucocitos/ $\mu\text{L}$ ); solamente se encontró un caso que cursaba con leucopenia ( $2 \times 10^3$  leucocitos/ $\mu\text{L}$ ), 9 (17.3%) se encontraron dentro del rango normal y el resto presentó leucocitosis (el 19% cursó con hiperleucocitosis) (Tabla 27).

La media de la concentración de hemoglobina fue de 8.9 g/dL (3.2-14.2 g/dL), el 82.7% de los pacientes presentó anemia (Tabla 27).

En cuanto al conteo plaquetario, se encontró una media de  $84.2 \times 10^3$  plaquetas/ $\mu\text{L}$  ( $12-341 \times 10^3/\mu\text{L}$ ) y el 90.4% presentó trombocitopenia (Tabla 27). En la Tabla 28 se encuentran los resultados de acuerdo al tipo de LA.

Tabla 27. Resultados de parámetros hematológicos de 52 pacientes con LA.

PARÁMETRO		N(%)
<b>Leucocitos (x10<sup>3</sup>/μL)</b>		
Media(rango)	88.7(2-433.4)	
<50	28(53.8)	
>50	24(46.2)	
<b>Hemoglobina [g/dL]</b>		
Media(rango)	8.9(3.2-14.2)	
<11	43(82.7)	
11-18	9(17.3)	
<b>Plaquetas (x10<sup>3</sup>/μL)</b>		
Media(rango)	84.2(12-341)	
<150	47(90.4)	
150-450	5(9.6)	

Tabla 28. Resultados de parámetros hematológicos de 52 pacientes de acuerdo con el tipo de LA.

PARÁMETRO	LLA-B	LLA-T	LAB	LMA
	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)
<b>Leucocitos (x10<sup>3</sup>/μL)</b>				
Media (rango)	80.6 (2-312.4)	258.1 (91-433.4)	50.3 (6.1-137)	83.2 (25.1-163)
<50	23(56)	0	3(75)	
>50	18(44)	3(100)	1(25)	
<20				
>20				4(100)
<b>Hemoglobina [g/dL]</b>				
Media (rango)	8.4 (3.2-14.2)	10.2 (8.2-11.6)	8.5 (5.8-9.7)	10.3 (7.6-12.4)
<11	35(85.4)	1(33.3)	4(100)	2(50)
11-18	6(14.6)	2(66.6)		2(50)
<b>Plaquetas (x10<sup>3</sup>/μL)</b>				
Media (rango)	85.7 (12-341)	63 (40-75)	82.5 (40-114)	63 (19-112)
<150	36(87.8)	3(100)	4(100)	4(100)
150-450	5(12.2)			

## 7. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Las leucemias agudas (LA) comprenden un grupo heterogéneo de enfermedades malignas caracterizadas por la expansión clonal de células precursoras hematopoyéticas (van Dongen, Lhermitte, Böttcher, Almeida, van der Velden, Flores,... Orfao, 2012) en la médula ósea (MO) y sangre periférica (SP). Son el tipo de cáncer más común en los niños, representan el 25-35% de los casos de cáncer infantil en la mayoría de las poblaciones (Zhang et al., 2014).

Se reconocen dos categorías principales: LLA y LMA, un pequeño número de casos no encajan en estos dos grupos porque no muestran evidencia clara de diferenciación de un solo linaje o expresan antígenos de diferenciación altamente específicos de más de un linaje (van Dongen et al., 2012) y se denominan leucemias agudas bifenotípicas (LAB).

El diagnóstico de las LA se realiza con base en las manifestaciones clínicas y el estudio de las células leucémicas de SP y MO (Lepe et al., 2017), estos estudios incluyen: evaluación morfológica, inmunofenotipo, genética molecular y citogenética.

La evaluación morfológica de la MO, como primer paso en el algoritmo de diagnóstico de las LA (Chiaretti et al., 2014) permite distinguir una LLA de una LMA (Rodak et al., 2014). Junto con la morfología, la inmunofenotipificación mediante CFM es crucial para la detección, la asignación del linaje y el estadio de maduración de las células blásticas en muestras sospechosas de leucemia (van Dongen et al., 2012) y es la que permite realizar el diagnóstico y la clasificación definitiva de las LA (Chiaretti et al., 2014).

Es este trabajo, inicialmente se evaluó la calidad de la muestra, siete casos (11.8%) no pudieron analizarse por morfología ya que las muestra eran de mala calidad, estaban coaguladas y presentaban una gran cantidad de células destruidas, otras muestras contenían mallas de fibrina o coágulo. La presencia de coágulos pudo deberse a que no se colocó inmediatamente el aspirado en el tubo con EDTA o que no se haya mezclado con el anticoagulante después de haberla colocado en él, ya que la MO se coagula más rápidamente que la SP (Rodak et al., 2014) o que la muestra se haya coagulado debido a una mala punción medular o una extracción difícil (Aznar et al., 2009). La gran cantidad de células destruidas, las hendiduras en los linfocitos y las células en apoptosis que se observaron en estas muestras, fueron causados por su almacenamiento prolongado o inadecuado (Raskin, E. y Messick, J., 2012). La calidad de

estas muestras concordó con lo obtenido por CFM ya que mostraron un bajo porcentaje de viabilidad.

Ocho de las 58 muestras de MO contenían grumos medulares y 21 presentaban megacariocitos lo cual indica que el resto de las muestras se encontraban hemodiluidas, de acuerdo con D'Onofrio y col. (2015) la dilución con SP puede llegar a ser del 40 al 100% en las muestras de MO de 0.25-0.5 mL (D'Onofrio et al., 2015), sin embargo, las muestras que se analizaron en este estudio también estaban destinadas para el análisis inmunofenotípico para el cual se solicita una cantidad de 1.0 mL a 3.0 mL (Becton Dickinson [DB], s. f.b) que como se puede notar, sobrepasa por mucho la cantidad recomendada que se debe extraer para realizar un análisis morfológico, esto explica porque la mayoría de las muestras estaban hemodiluidas.

En este estudio, de 59 muestras con sospecha de LA se encontró una correlación de 79.6% entre el análisis morfológico y el inmunofenotípico, este resultado es muy cercano al obtenido por el Dr. Alejandro Ruiz Arguelles que en 2002 reportó una correlación de 73% entre ambos métodos de un total de 648 casos de LA (Ruiz, 2002). Marsán y col. reportaron en 2016 una correlación de 81.3%, sin embargo, en este estudio solamente se analizaron casos de LLA (Marsán et al., 2016). El índice *kappa* ( $\kappa$ ) de 0.352 obtenido en este estudio indica que la concordancia es aceptable dado que se encuentra dentro del rango de 0.21-0.40 (Cerdeja y Villarreal, 2008).

Los resultados discordantes se encontraron en los siguientes casos: A) un caso en el que la morfología fue LLA-L2 y por CFM fue una LAB (B/Mieloide), B) un caso que por CFM fue una T/Mieloide y morfológicamente se clasificó como una LMA-M2 debido a que los blastos presentaban una morfología mieloide con presencia de gránulos azurófilos en el citoplasma, sin embargo, estos gránulos presentaban un tamaño más grande que los observados en los otros casos de LMA-M2, además se encontraron pseudo Pelger-Hüet y neutrófilos hipogranulares, los precursores eritroides presentaron características megaloblastoides, estos hallazgos permitieron clasificar este caso como LMA-M2; los gránulos observados en los blastos se correlacionan con el resultado del inmunofenotipo ya que presentó positividad a la MPOx; un caso similar como éste fue reportado por Sharma y col., donde uno de los pacientes con bifenotipia T/mieloide, reveló la presencia de bastones de Auer en los blastos (Sharma et al., 2017). Como se ha encontrado en este estudio, las LAB se pueden presentar morfológicamente como LLA o LMA, similar al estudio realizado por Matutes y col. en el cual, de 90 casos de LAB,

39 mostraron una morfología de LLA, 38 se clasificaron como LMA de subtipos M1 y M5 y rara vez M2 o M4; ningún caso fue M3, M6 o M7 (Matutes et al., 2011), así mismo, Sharma y col. reportaron que de 15 casos con LAB, 11 presentaron una morfología LMA-M1, M2 o M4/5 y ninguno presentó una LMA-M3, M6 o M7 (Sharma et al., 2017). De acuerdo con los hallazgos anteriores, al estudiar un caso con LAB mediante un análisis morfológico inicial, no se podría sospechar de este tipo de leucemia, por lo tanto, el diagnóstico de LAB se basa en la inmunofenotipificación y la exclusión por citogenética de los casos de LMA con anomalías genéticas recurrentes (Matutes et al., 2011).

C) Dos casos con presunta recaída fueron diagnosticados como positivos mediante morfología, en cada caso se encontró un % de blastos de 12 y 10.4%, sin embargo, la morfología no permitió determinar el linaje, mientras que por CFM encontraron 0.4% y 2% de blastos respectivamente y, de esta manera se descartó la posible recaída. D) Un caso que por morfología se clasificó como normal, por CFM se diagnosticó LLA Pre-B común y el % de blastos fue mayor al encontrado por morfología. En estas dos situaciones se destaca la importancia de la CFM para hacer el diagnóstico definitivo, además, se puede notar una de las limitantes que tiene la morfología en la determinación del número de blastos cuando éstos se encuentran bajos.

E) Siete casos (11.8%) no pudieron diagnosticarse por morfología debido a que la muestra no era de calidad adecuada.

El resto de los resultados coincidió en los siguientes casos: A) de los 44 casos que por CFM se diagnosticó una LLA, en 38 de éstos por morfología también se diagnosticó una LLA; B) todos los casos (4 casos) en los que la CFM mostró un fenotipo mieloide, por morfología fueron LMA, y C), de los siete casos que por CFM mostraron un fenotipo normal, cinco de éstos por morfología también fueron normales.

Los valores de sensibilidad y especificidad indican que el 80% de pacientes presentan algún tipo de LA cuando el diagnóstico morfológico resulta positivo y, 71% de pacientes no presentan LA cuando morfológicamente no se diagnostica esta enfermedad. De acuerdo con los valores predictivos, hay un 95% de probabilidad de que los individuos con sospecha de LA padezcan la enfermedad cuando la morfología es positiva y, existe un 33% de probabilidad de que, si por morfología no se detecta algún tipo de leucemia, los pacientes realmente no la padezcan.

Los resultados obtenidos indican que es necesario realizar el análisis morfológico, ya que en la mayoría de los casos este método orientó hacia una LLA o LMA, sin

embargo, no es suficiente para realizar el diagnóstico definitivo de las LA, sobre todo cuando la muestra no es de calidad adecuada o cuando se trata de una LAB, el resultado de la morfología complementa al estudio inmunofenotípico y siempre se debe realizar este último ya que es el que finalmente determina el linaje específico afectado así como la etapa de maduración o diferenciación en la que las células leucémicas están detenidas y por consiguiente permite estratificar el nivel de riesgo del paciente.

Se calculó el coeficiente de correlación entre el porcentaje de blastos obtenidos mediante morfología y por CFM encontrándose una  $R^2$  de 0.9406, este resultado indica que hubo una buena correlación entre ambos métodos ya que en la mayoría de los casos el % de blastos fue muy similar, sin embargo, se presentaron dos casos en los que por morfología se detectó un porcentaje muy elevado de blastos (comparándolo con el obtenido por CFM), de manera que se consideraron como LA, mientras que por CFM esta enfermedad fue descartada por el bajo porcentaje de células inmaduras encontradas y que además mostraron una diferenciación normal, en algunos casos ocurrió lo contrario. Esta incongruencia fue más notoria en los casos en los que por CFM se detectaron bajos porcentajes de células inmaduras, es decir, de 0.4 a 12.7%. Estos resultados pueden atribuirse a diversos factores, como la diferencia en la cantidad de células que se cuentan en ambos métodos, ya que por morfología se contaron aproximadamente 1,000 células mientras que por CFM se adquieren más de 100,000 eventos, otro factor a considerar es que cuando se realiza el extendido del aspirado medular, muchos blastos son destruidos (Bain, 2015) y si el porcentaje de blastos es pequeño, la disminución es más evidente. En los dos casos donde se encontró mayor porcentaje de blastos por morfología (diagnosticados como LA por morfología y por CFM se descartó), se pudieron haber confundido algunas células normales por células leucémicas debido a que morfológicamente presentaban una apariencia de blastos, sin embargo, estos pacientes ingresaron para diagnóstico de recaída (estuvieron bajo tratamiento quimioterapéutico) lo cual explicaría la dificultad de distinguir claramente una célula madura de una inmadura ya que éstas presentaban cambios en su morfología, Kerrigan y col. realizaron un estudio sobre los cambios morfológicos de las células sanguíneas después de la quimioterapia y encontraron, entre otros cambios, que células monocíticas presentaban núcleos inmaduros (Kerrigan, Castillo, Foucar, Townsend y Neidhart, 1989), esta situación pudo presentarse en estos dos casos debido a que agentes quimioterapéuticos pueden dar origen a cambios displásicos en las células (Rodak et al., 2014).

En cuanto al subtipo de LLA de la clasificación FAB, se encontró un mayor porcentaje de LLA-L2 (63.2%), mientras que del subtipo L1 fueron 36.8% y no se encontró ningún tipo con morfología L3, los resultados concuerdan con los obtenidos por Morales y col. donde encontraron un 62% en L2 y 38% en L1, sin presencia de L3 (Morales et al., 2014). Cabe mencionar que la clasificación FAB no es clínicamente importante ya que no ayuda a planificar el tratamiento (Layton, 2015).

Los subtipos de LMA más comunes en los niños son: M1, M2, M3 y M6, sin embargo, en los niños con síndrome de Down los subtipos M5 y M7 se ven con frecuencia (Asif, Hassan y Yasmeen, 2011). De los cuatro casos de LMA encontrados en este estudio, presentaron una morfología de LMA-M1, M2 y M3, estos resultados concuerdan con los reportados por la literatura.

La LMA-M3 ahora es altamente curable cuando se administra ácido *all-* trans retinoico (ATRA) y quimioterapia (antraciclina) (Swerdlow et al, 2008). Sin embargo, un conteo  $\geq 10 \times 10^3$  células/ $\mu$ L denota un riesgo alto ya que tienen un mayor riesgo de muerte temprana y recaída (De Kouchkovsky y Abdul, 2016); el conteo leucocitario del caso con LMA-M3 en este estudio fue de  $40 \times 10^3$ / $\mu$ L, además de un conteo plaquetario de  $19 \times 10^3$ / $\mu$ L lo que sugiere que se trataba de un paciente de alto riesgo. La importancia de la morfología en la LMA-M3 destaca aún más ya que la morfología de los promielocitos más las características clínicas, indicarán un diagnóstico presuntivo de esta entidad y en ésta, a diferencia de casi todas las otras LA, el tratamiento debe comenzar después de examinar la morfología y antes de que se confirme el diagnóstico por estudios citogenéticos o moleculares (Tallman y Altman, 2009).

La LLA de linaje B es el cáncer más frecuente en la infancia (Sanjuan, Bueno, Prieto, Acha, Stam,...Menéndez, 2015), esta información se puede constatar con los resultados obtenidos en este estudio ya que se encontró un 78.8% de LLA-B, 5.8% de LLA-T, 7.7% de LMA. En el estudio realizado por Bekker y col., encontraron 85.1% de pacientes con LLA-B, 10.8% con LLA-T, y 4.1% pacientes con LAB. Pérez y col. reportaron un 85.1% de casos con LLA y 12.3% con LMA (Pérez, Fajardo, Bernáldez, Martínez, Medina, Espinosa,... Mejia, 2011).

En cuanto a la subclasificación de la LLA-B, se encontró un mayor porcentaje en la LLA pre-B común (85.4%), mientras que del subtipo LLA-B madura no se encontró ningún caso. Las frecuencias de distribución reportadas por varios grupos de trabajo

internacionales son: pro-B 3%, Pre-B común 60-65%, pre-B 9%, B maduras 3% y células T 10% (Quero, Estrada, Pacheco, Reyes, Álvarez y Vargas, 2012). Los resultados concuerdan también con el obtenido por Morales y col. (85% de LLA pre- B común) (Morales, Covarrubias, Rendón y Larios, 2014).

En este estudio se encontró un 7.6% de LAB, en la literatura frecuentemente se informa que la prevalencia es menos de 5% de las leucemias infantiles (Bleahu et al., 2011). Los resultados en este tipo de LA llegan a ser muy variados, en este mismo hospital (en 2008) se reportó un 28.3% de LAB (Dorantes, Medina, Dávila y López, 2008). En cuanto a la proporción de subtipos de LAB, el resultado concordó con el reportado por Dorantes y col. ya que en ambos se encontró un mayor porcentaje de B/T linfoide. La LAB es un grupo biológicamente diferente de LA y la importancia de identificarla es porque es de mal pronóstico, recaída temprana e infiltración extramedular (Sharma et al., 2017) y por tanto requiere de un tratamiento más intensivo (Bleahu et al., 2011).

Estudios epidemiológicos informan que existe una mayor prevalencia de LA en pacientes masculinos lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este estudio ya que se encontró un 59.6% de pacientes masculinos y un 40.4% de pacientes femeninos, resultados cercanos se obtuvieron en un estudio realizado en nuestro país por Rivera y col., en un periodo de 2007 a 2012, en el cual los varones representaron el 54.4% de los pacientes con LA (Rivera, Shalkow, Velasco, Cárdenas, Zapata, Olaya,...., Pantoja, 2014), otro estudio realizado en 2016 por Mayer y col. en este hospital, de 549 pacientes con LA, el 55% fueron masculinos (Mayer, 2016).

De acuerdo con la edad, se encontraron pacientes desde uno hasta 17 años, con una edad promedio de 7.7; el rango donde se encontraron más casos fue de cinco a nueve años (38.5%) seguido de pacientes de uno a cuatro años (26.9%), en el estudio realizado por Rivera y col. encontraron una mayor prevalencia en los niños con cero a cuatro años (35%) y un 29% en pacientes de cinco a nueve años (Rivera et al., 2014); el estudio realizado por Morales y col. en un periodo de 2008 a 2010 en 54 pacientes con LLA, el mayor número de pacientes se ubicó entre uno y 10 años, la media fue de 8.3 años (rango de uno a 17 años) (Morales et al., 2014); Bekker y col. reportan que de 638 pacientes pediátricos con diagnóstico reciente de LLA (de la Ciudad de México), la edad media de toda la población fue de 6.2 años (Bekker et al., 2014). Como se puede observar, la edad promedio obtenida es similar en estos estudios.

El rango normal del conteo leucocitario durante la infancia se considera que es de  $4.0-14.5 \times 10^3/\mu\text{L}$  (Jaime et al., 2018), en este estudio se encontraron nueve (17.3%) pacientes con conteos normales de leucocitos. Un conteo  $>50 \times 10^3/\mu\text{L}$  se considera de alto riesgo (Willian et al., 2015). En este estudio se encontraron 23 (56%) con un conteo  $<50$  leucocitos  $\times 10^3/\mu\text{L}$  y el resto (44%) presentó  $>50$  leucocitos  $\times 10^3/\mu\text{L}$  (leucocitosis), estos pacientes presentan un alto riesgo de muerte temprana ya que en la LLA con leucocitosis es más común que se desarrolle el síndrome de lisis tumoral (SLT) (Röllig y Ehninger, 2015) (Tasmeen et al., 2017). El alto conteo leucocitario de los pacientes en este estudio pudo deberse a que el diagnóstico se realizó de manera tardía y la rápida proliferación condujo a una alta carga tumoral leucémica (Röllig y Ehninger, 2015), la cantidad de pacientes es casi la mitad de la población en estudio, aquí se puede notar la importancia de realizar el diagnóstico oportuno.

La LLA-T es una enfermedad agresiva, estos pacientes a menudo tienen características clínicas de alto riesgo, como la edad (You, Medeiros y Hsi, 2015), hiperleucocitosis con infiltración extramedular (Vadilloa, Dorantes, Pelayo y Schnoor, 2017). Los resultados encontrados en este estudio concuerdan con lo descrito anteriormente ya que los tres casos de LLA-T presentaron leucocitosis ( $>50 \times 10^3/\mu\text{L}$ ), dos de ellos con hiperleucocitosis, un paciente que además de presentar hiperleucocitosis contaba con una edad de 13 años; estas características desfavorables indican que estos pacientes presentan un mayor riesgo de recaída o muerte temprana (Vadilloa et al., 2017).

En las LMA, una cifra de leucocitos  $<20 \times 10^3/\mu\text{L}$  se asocia a un mejor pronóstico (De Kouchkovsky y Abdul, 2016), en el estudio los cuatro pacientes con LMA presentaron un conteo leucocitario  $>20 \times 10^3/\mu\text{L}$ , dos de ellos con hiperleucocitosis, estos conteos altos sugieren una baja tasa de remisión completa en estos pacientes (de Jonge et al., 2011) y una muerte temprana. El diagnóstico temprano de la LMA es de gran importancia ya que la hiperviscosidad celular causada por la elevación extrema de leucocitos puede conducir rápidamente a una falla orgánica múltiple y la muerte (Stucki et al., 2001).

En cuanto a los otros parámetros hematológicos, en 43 (82.7%) pacientes se encontró una hemoglobina  $<11\text{g/dL}$ ; y 47 (90.4%) presentaron trombocitopenia ( $<150 \times 10^3/\mu\text{L}$ ), estos hallazgos son causados por el fracaso de la hemopoyesis normal y el reemplazo de las células normales por las células leucémicas lo que resulta en anemia, sangrado y mayor riesgo de infecciones (Asif, Hassan y Yasmeen, 2011).

## 8. CONCLUSIONES

- Se encontró una correlación de 79.6% entre el método morfológico y el inmunofenotípico en el diagnóstico de leucemias agudas. En la mayoría de los casos la morfología orientó hacia una LLA o una LMA
- Es necesario realizar el análisis morfológico ya que complementa al inmunofenotípico, sin embargo, siempre se debe realizar este último para determinar el linaje específico y la etapa de diferenciación de los blastos leucémicos.
- Las leucemias agudas bifenotípicas pueden mostrarse como LLA o LMA, razón por la cual la morfología es limitada en estos casos y la inmunofenotipificación es el método que permite determinar el perfil fenotípico, la importancia de su identificación radica en que estas leucemias son de mal pronóstico.
- Para el análisis morfológico es importante que las muestras sean de buena calidad ya que, si la muestra está coagulada y/o o con abundantes células destruidas, limita su evaluación. El detectar muestras de mala calidad indica que en la fase preanalítica deben aplicarse los cuidados necesarios para realizar una correcta punción medular y/o un adecuado transporte y almacenamiento de las muestras.
- En este estudio se pudo notar que cuando los casos cursaban con leucocitosis o presentaban un alto porcentaje de blastos, no hubo dificultad en el diagnóstico morfológico.

## 9. REFERENCIAS

- Adan, A., Alizada, G., Kiraz, T., Baran, Y. & Nalbant, A. (2016). Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol*, 1–14. doi: 10.3109/07388551.2015.1128876
- Antica, M. (2011). Acute Leukemia – The Scientist's Perspective and Challenge. *InTechOpen*.
- Arber, D., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M., Le Beau, M., ... Vardiman, J. (2016). The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *BLOOD* 127(20), 2391-2405. doi: 10.1182/blood-2016-03-643544.
- Arroyo, G., Sáenz, G. y Valenciano, E. (1982). Interpretación Morfológica y Citológica de la Leucemia Aguda. Cátedra de Hematología, Departamento de Análisis Clínicos, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. Recuperado el 11-02-2017, de <http://www.binasss.sa.cr/revistas/rccm/v4s1/art6.pdf>
- Asif, N., Hassan, K. & Yasmeen, N. (2011). Acute Myeloblastic Leukemia in Children. *International Journal of Pathology*, 9(2), 67-70.
- Asociación Canaria de Enfermería de Urgencias y Emergencias (ACUE). (2009). Recuperado de <http://aceue.blogspot.com/2009/08/via-intraosea.html>
- Aznar, J., Núñez, A., Haro, T., León, A., Aldana, J. y González, E. R. (2009). Manual de Obtención y Manejo de Muestras para el Laboratorio Clínico. Servicio Andaluz de Salud. Consejería de Salud. Junta de Andalucía.
- Bacher, U., Shumilov, E., Flach, J., Porret, N., Joncourt, R., Wiedemann, G., ... Pabst, T. (2018). Challenges in the introduction of next-generation sequencing (NGS) for diagnostics of myeloid malignancies into clinical routine use. *Blood cancer journal*, 8(11), 113. doi:10.1038/s41408-018-0148-6
- Bain, B. (1998). Classification of acute leukaemia: the need to incorporate cytogenetic and molecular genetic information. *J Clin Pathol* 51, 420–423.
- Bain, B. (2015). *Blood Cells A Practical Guide*. (5a. Ed.). Londres: Wiley Blackwell.
- Bain, B., Bates, I., Blackmore, S., Bradsha, A., Catovsky, D., De la Salle, B.,... Worwood, M. (2008). *Dacie and Lewis. Practical Haematology*. (10a. Ed.). España: Elsevier.
- Bain, B., Clark, D. M. y Wilkins, B. (2010). Bone Marrow Pathology. (4a. Ed.). EUA: Wiley-Blackwell.

- Balandrán, J.C. y Pelayo, R. (2016). Ontogenia de linfocitos B. *Rev Alerg Méx.* 63(1), 71-79.
- Barrera, L. M., Drago. M. E., Pérez, J., Zamora, A. C., Gómez, F., Sainz, T. Y Mendoza, F. (2004). Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Rev Inst Nal Enf Resp*, (17)1, 42-55
- Becton Dickinson [DB] (s. f.a). *Human and Mouse CD Marker Handbook*. Recuperado de [https://www.bdbiosciences.com/documents/cd\\_marker\\_handbook.pdf](https://www.bdbiosciences.com/documents/cd_marker_handbook.pdf)
- Becton Dickinson [DB] (s. f.b). *Protocolo de manejo de Citómetro BD FACSCanto™II para inmunofenotipos de 8 colores*.
- Bekker, V. C., Miranda, E., Núñez, J. C., Olarte, I., Guerra, F., Pompa, E., ... Mejía, J. M., (2014). Prevalence of Gene Rearrangements in Mexican Children with Acute Lymphoblastic Leukemia: A Population Study Report from the Mexican Interinstitutional Group for the Identification of the Causes of Childhood Leukemia. *BioMed Research International*. *BioMed Research International*. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/210560>
- Bene, M. C., Castoldi, G., Knapp W., Ludwig, W., Matutes, E., Orfao, A. y van't Veer, M. (1995). Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*, 9(10):1783-6.
- Bennett, J. M., et al. (1976). Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias FRENCH-AMERICAN-BRITISH (FAB) CO-OPERATIVE GROUP. *British Journal of Haematology*, 33(451), 451-458.
- Bleahu, I. D., Vladasel, R., & Gheorghe, A. (2011). A special case of acute leukemia in childhood. *Journal of medicine and life*, 4(3), 297-301.
- Cano, L. y Lopera, D. (2013). *Autoimmunity: From Bench to Bedside*. Colombia: El Rosario University Press. [Versión electrónica]. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459471/>
- Carr, J. y Rodak, B. (2010). *Atlas de Hematología Clínica*. (3a. Ed.). Argentina: Médica Panamericana.
- Cerda, J. y Villarroel, J. (2008). Evaluación de la concordancia inter-observador en investigación pediátrica: Coeficiente de Kappa. *Rev Chil Pediatr*, 79 (1), 54-58.
- Chiaretti, S., Zini, G. y Bassan, R. (2014). Diagnosis and Subclassification of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis*, 6(1). doi: 10.4084/MJHID.2014.073

- Ching, P. (2013). *Childhood Leukemias*. (3ª. Ed.). USA: Cambridge University Press. [Versión electrónica]. Recuperado de <https://books.google.com.mx/books?id=pEogAAQBAJ&pg=PA72&dq=LYMPHOCYTE+MATURATION+B+DIFFERENTIATION+ANTIGENS.&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiYoda3-6raAhV4oMKHYVeDY8Q6AEIbTAJ#v=onepage&q=LYMPHOCYTE%20MATURATION%20B%20DIFFERENTIATION%20ANTIGENS.&f=false>
- Clark, G., Stockinger, H., Balderas, R., van Zelm, M. C., Zola, H., Hart, D. & Engel, P. (2016). Nomenclature of CD molecules from the Tenth Human Leucocyte Differentiation Antigen Workshop. *Clinical & Translational Immunology*, 5(1), e57. doi: 10.1038/cti.2015.38
- Corces, M. R. y Majeti, R. (2014). Pre-leukemic evolution of hematopoietic stem cells: the importance of early mutations in leukemogenesis. *Leukemia*, 28(12), 2276-82.
- Cortés, E., Cervantes, A., Ortiz, A. (2014). Manual de Prácticas de Laboratorio de Citometría de flujo. México. UAM Unidad Iztapalapa.
- Creutzig, U., van den Heuvel, M., Gibson, B., Dworzak, M., Adachi, S., Bont, E.,... Reinhardt, D. (2012). Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in children and adolescents: recommendations from an international expert panel. *Blood*, 120(16), 3187-3205.
- D'Onofrio, G., Zini, G. y Bain, B. (2015). *Morphology of Blood Disorders*. (2ª ed.). Italia: Wiley Blackwell. [Versión electrónica]. Recuperado de [https://books.google.com.mx/books?id=DCIVBQAAQBAJ&pg=PA16&lpg=PA16&dq=HOW+THE+ERYTHROID+MYELOID+RELATIONSHIP+IS+CALCULATED+IN+THE+MYELOGRAM&source=bl&ots=Da2Y8\\_A3E5&sig=KwLI0bcxozf-o-HxVDzZMQpvPRk&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiwgr-2zqTaAhVE21MKHXmdDy4Q6AEIUzAF#v=onepage&q=HOW%20THE%20ERYTHROID%20MYELOID%20RELATIONSHIP%20IS%20CALCULATED%20IN%20THE%20MYELOGRAM&f=false](https://books.google.com.mx/books?id=DCIVBQAAQBAJ&pg=PA16&lpg=PA16&dq=HOW+THE+ERYTHROID+MYELOID+RELATIONSHIP+IS+CALCULATED+IN+THE+MYELOGRAM&source=bl&ots=Da2Y8_A3E5&sig=KwLI0bcxozf-o-HxVDzZMQpvPRk&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiwgr-2zqTaAhVE21MKHXmdDy4Q6AEIUzAF#v=onepage&q=HOW%20THE%20ERYTHROID%20MYELOID%20RELATIONSHIP%20IS%20CALCULATED%20IN%20THE%20MYELOGRAM&f=false)
- Dahlin, J. y Hallgren, J. (2014). Mast cell progenitors: Origin, development and migration to tissues. *Molecular Immunology* 63, 9–17. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2014.01.018>
- De Jonge, H. J., Valk, P. J., de Bont, E. S., Schuringa, J. J., Ossenkoppele, G., Vellenga, E., & Huls, G. (2011). Prognostic impact of white blood cell count in intermediate risk acute myeloid leukemia: relevance of mutated NPM1 and FLT3-ITD. *Haematologica*, 96(9), 1310-7.

- De Kouchkovsky, I. y Abdul, M. (2016). 'Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update'. *Blood Cancer Journal*, 6(e441): 1-10. doi: 10.4110/in.2013.13.2.43
- Dorantes, E. y Pelayo, R. (2012). Lineage switching in acute leukemias: a consequence of stem cell plasticity? *Bone marrow research*. 406796.
- Dorantes, E., M. y Medina, A. (2007). Protocolo de tratamiento con el esquema NOPHO-AML93 modificado en pacientes pediátricos del HIMFG con leucemia mieloide aguda. México. [Versión electrónica]. Recuperado de <http://himfg.com.mx/descargas/documentos/planeacion/guiasclinicasHIM/LeuAg uMieloblastica.pdf>
- Dorantes, E., Medina, A., Dávila, C. y López, B., (2008). Clasificación inmunológica de las leucemias agudas linfoblásticas del Hospital Infantil de México Federico Gómez, de acuerdo al EGIL (European Group for the Immunological Classification of Leukemia). *Gaceta Mexicana de Oncología*, 12(3),136-142.
- Dorantes, E., Medina, A., Dávila, K. y López, B. (2013). Clasificación inmunológica de las leucemias agudas linfoblásticas del Hospital Infantil de México Federico Gómez, de acuerdo al EGIL (European Group for the Immunological Classification of Leukemia). *Gaceta Mexicana de Oncología*, 12(3), 136-142
- Dorfman, D. (2017). *Flow Cytometry, An Issue of Clinics in Laboratory Medicine*. EUA: Elsevier. [Versión electrónica]. Recuperado de [https://books.google.com.mx/books?id=Y4M\\_DwAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=Flow+Cytometry,+An+Issue+of+Clinics+in+Laboratory+Medicine.&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjwxKml7qXeAhUSKKwKHZ-iDb4Q6AEIKTAA#v=onepage&q=HEMATOGONE&f=false](https://books.google.com.mx/books?id=Y4M_DwAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=Flow+Cytometry,+An+Issue+of+Clinics+in+Laboratory+Medicine.&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjwxKml7qXeAhUSKKwKHZ-iDb4Q6AEIKTAA#v=onepage&q=HEMATOGONE&f=false)
- Doric, M. (2015). Correlation Between Initial Blood Count And Clinical Parameters In Children With Acute Lymphoblastic Leukemia. *Medical Youth*, 66(1).
- Engel, P., Boumsell, L., Balderas, R., Bensussan, A., Gattei, V., Horejsi, V.,... Clark, G. (2015). CD Nomenclature 2015: Human Leukocyte Differentiation Antigen Workshops as a Driving Force in Immunology. *The Journal of Immunology November*, 195(10) ,4555-4563. doi:10.4049/jimmunol.1502033
- Fortoul, V. (2013). *Histología y biología celular*. (2ª. Ed.). México: McGraw-Hill.
- Freund, M. (2014). *Hematología. Guía práctica para el diagnóstico microscópico*. (11ª. Ed.). Argentina: Médica Panamericana.
- Fuchs, D. A., McGinn, S. G., Cantu, C., Klein, R., Sola, M. & Rimsza, L. M (2012). Developmental Differences in Megakaryocyte Size in Infants and Children. *American Journal of Clinical Pathology*, 138 (1), 140–145.

- Gajendra, S. (2016). Flowcytometry in Acute Leukemia. *Clin Oncol.*, 1(1166).
- García, B., Rubio, F. y Romero, R. (2016). *Técnicas de Inmunodiagnóstico*. España: Paraninfo. [Versión electrónica]. Recuperado de [https://books.google.com.mx/books?id=Wy-IDAAQBAJ&pg=PA259&dq=sistema+optico+del+citometro+de+flujo&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwicxc7E45\\_eAhUI7oMKHX-dApAQ6AEINzAD#v=onepage&q=sistema%20optico%20del%20citometro%20de%20flujo&f=false](https://books.google.com.mx/books?id=Wy-IDAAQBAJ&pg=PA259&dq=sistema+optico+del+citometro+de+flujo&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwicxc7E45_eAhUI7oMKHX-dApAQ6AEINzAD#v=onepage&q=sistema%20optico%20del%20citometro%20de%20flujo&f=false)
- Gene. (2018). HLA-DRA major histocompatibility complex, class II, DR alpha [*Homo sapiens* (human)]. [Base de datos]. Recuperado de [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3122?report=full\\_report#reference-sequences](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3122?report=full_report#reference-sequences)
- Gómez, D., Marcos, E., Montaña, E., Ruiz, G. (2016). Acute Leukemia Characteristics are Different Around the World: the Mexican Perspective. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia*, 17,(1): 46-51.
- Govindan, R. y Morgensztern, D. (2016). Manual Washington de Oncología. (3a. Ed.). España: Wolters Kluwer.
- Granados, M., Arrieta, O. y Cantú, D. (2013). *Oncología y cirugía. Bases y principios*. México: Manual Moderno. [Versión electrónica]. Recuperado de <https://books.google.com.mx/books?id=xWTLCQAAQBAJ&pg=PA148&dq=la++medula+osea+es+un+tejido&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwih5IDoqOncAhVQhq0KHSkAAqQQ6AEIQTAF#v=onepage&q=la%20%20medula%20osea%20es%20un%20tejido&f=false>
- Hackl, H., Astanina, K. y Wieser, R. (2017). Molecular and genetic alterations associated with therapy resistance and relapse of acute myeloid leukemia. *Journal of hematology & oncology*, 10(1), 51. doi:10.1186/s13045-017-0416-0
- Haydu, E. y Ferrando, A. (2013). Early T-cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia (ETP T-ALL). *Current Opinion in Hematology*, 20(4), 10.1097/MOH.0b013e3283623c61. doi: 10.1097 / MOH.0b013e3283623c61
- HIMFG. (s. f.). Protocolo de manejo para pacientes pediátricos con leucemia aguda linfoblástica no tratados previamente. Recuperado de <http://himfg.com.mx/descargas/documentos/planeacion/guiasclinicasHIM/LeuAg uLinfoblastica.pdf>
- Hossain, M. J., Xie, L., & McCahan, S. M. (2014). Characterization of pediatric acute lymphoblastic leukemia survival patterns by age at diagnosis. *Journal of cancer epidemiology*, 2014, 865979. doi:10.1155/2014/865979

- Ismail, M., Zaghloul, A., Nahla, A. & Heba, M. (2017). Membranous Expression of pan CD66, CD66a, CD66b, and CD66c and their Clinical Impact in Acute Leukemia: Cross Sectional Longitudinal Cohort Study in Saudi Arabia. *Journal of Leukemia*, 5(2). doi: 10.4172/2329-6917.1000230
- Ivanovs, A. et al. (2017). Human haematopoietic stem cell development: from the embryo to the dish. *Development* 144, 2323-2337. doi:10.1242/dev.13486
- Jagannathan, M., y Zon, I. (2013). Hematopoiesis. *Development*, 140(12), 2463–2467. doi: 10.1242/dev.083147
- Jaime, J.C., García, G., Herrera, J. L, Marfil, L. & Gómez, D. (2018). Revisiting the complete blood count and clinical findings at diagnosis of childhood acute lymphoblastic leukemia: 10-year experience at a single center. *Hematol Transfus Cell Ther.* doi: <https://doi.org/10.1016/j.htct.2018.05.010>
- Jan, M., y Majeti, R. (2012). Clonal evolution of acute leukemia genomes. *Oncogene*, 32(2), 135-40.
- Jiménez, S., Hidalgo, A. y Ramírez, J. (2016). Leucemia linfoblástica aguda infantil: una aproximación genómica. *Bol Med Hosp Infant Mex.*,74(1),13-26. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmhmx.2016.07.007>
- Juárez, R. y Pérez, P. (2010). Citometría de flujo en la evaluación de enfermedad mínima residual en leucemia linfoblástica aguda. *Acta Pediatr Mex*;33(4):198-206.
- Kanji, S., Pompili, V. y Das, H. (2011). Plasticity and Maintenance of Hematopoietic Stem Cells During Development. *Recent Pat Biotechnol.* 5(1), 40-53.
- Keohane, E. Smith, L. y Walenga, J. (2016). *Rodak's Hematology: Clinical Principles and Applications.* (5a. Ed.). Elsevier: Canadá.
- Kerrigan, D. P., Castillo, A., Foucar, K., Townsend, K. & Neidhart, J. (1989). Peripheral Blood Morphologic Changes after High-Dose Antineoplastic Chemotherapy and Recombinant Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor Administration. *American Journal of Clinical Pathology*, 92(3), 280–285.
- Kumar, V., Abbas, A. y Aster, J. C. (2015). *Robbins y Cotran. Patología estructuras y funcional.* (9ª. Ed.). España: Elsevier.
- Labardini, J., Cervera, E., Corrales, C., Balbuena, M., Barbosa, A., Espinoza, ... Cortés, J. (2011). Leucemia Aguda Promielocítica. *Cancerología* 6, 103 – 106.
- Lagunas, F. A. (2016). Leucemia mieloide aguda. Una perspectiva de los mecanismos moleculares del cáncer. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 15(3), 150-157.

- Lang, F., Wojcik, B. y Rieger, M. A. (2015). Stem Cell Hierarchy and Clonal Evolution in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Stem cells international*, 2015, 137164.
- Lassaletta, A. (2012). Leucemias. Leucemia linfoblástica aguda. *Pediatr Integral*, XVI(6), 453-462.
- Layton, C. (2015). Factores de pronóstico en leucemia linfoblástica aguda pediátrica: posibles marcadores moleculares. *Medicina e Investigación*, 3(1), 85-91. doi: 10.1016/j.mei.2015.02.008
- Lee, JW, y Cho, B. (2017). Prognostic factors and treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Revista coreana de Pediatría*, 60 (5), 129-137. doi: <http://doi.org/10.3345/kjp.2017.60.5.129>
- Lee, Y., Decker, M., Lee, H., y Ding, L. (2017). Extrinsic regulation of hematopoietic stem cells in development, homeostasis and diseases. *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology*, 6(5). doi: 10.1002/wdev.279.
- Lepe, J. L., Jerónimo, F. J., y Hernández, J., G. (2017). Características citopatológicas de la leucemia aguda en el Hospital de Especialidades Pediátricas de Chiapas, México. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.*, 74(2), 122-133.
- Leyto, C. (2018). Leucemia Mieloide Aguda. *Rev Hematol Mex*, 19(1),24-40.
- Lichtman, M., Kaushansky, K., Kipps, T., Prchal, J. y Levi, M. (2014). Williams. Manual de Hematología. (8ª. Ed.). México: McGraw-Hill.
- Locatelli, F., Schrappe, M., Bernardo, M. E. y Rutella, S. (2012). How I treat relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 120, 2807-2816; doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2012-02-265884>
- Longo, L., Kasper, L., Larry, J. (2012). Harrison: principios de medicina interna (18a. ed.). México: Mc Graw-Hill.
- López, G. y Guevara, N. (2016). Enfoques diagnósticos de las leucemias agudas pediátricas. *Medicina y laboratorio*, 22(3-4), 111-146.
- Makiya, M. (2013). Tratamiento de la Leucemia Linfoblástica Aguda Pediátrica Recaída. *Hematología*, 17, 82-88.
- Malouf, C., & Ottersbach, K. (2017). Molecular processes involved in B cell acute lymphoblastic leukaemia. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 75(3), 417-446.
- Manar, I. et al. (2017). Membranous Expression of pan CD66, CD66a, CD66b, and CD66c and their Clinical Impact in Acute Leukemia: Cross Sectional Longitudinal Cohort Study in Saudi Arabia. *J Leuk* 5(230). doi: 10.4172/2329-6917.1000230

- Marsán, V., del Valle, L., Díaz, G., Macías C., Machín, S., Lam, R., ...Plá, M. (2016). Correlación entre morfología y citometría de flujo en la Leucemia Linfocítica Aguda Infantil. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 32(4), 483-493.
- Marsán, V., Macías, C., Díaz, G., Morales, Y., Lam, R. M., Machín, S., ...Valdés, C. (2017). Expresión del antígeno CD45 en la Leucemia Linfocítica Aguda Pediátrica. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 33(2).
- Matutes, E., Pickl, R., van't Veer, M., Morilla, R., Swansbury, J., Strobl, H.,... Wolf-Dieter Ludwig. (2011). Mixed-phenotype acute leukemia: clinical and laboratory features and outcome in 100 patients defined according to the WHO 2008 classification. *Blood* 117, 3163-3171. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2010-10-314682>
- Mayani, H., et al. (2007). Hematopoiesis. *Cancerología* 2, 95-107.
- Mayer, R. (2016). *Clasificación Inmunológica de las Leucemias Linfoblásticas Agudas del Hospital Infantil de México Federico Gómez, de Acuerdo al EGIL (European Group for the Immunological Classification of Leukemia) Durante El Período 2010-2015*. [Tesis de Licenciatura]. HIMFG. México.
- McKenna, R., Washington, L., Aquino, D. B., Picker, L. J. y Kroft, S. H. (2001). Immunophenotypic analysis of hematogones (B-lymphocyte precursors) in 662 consecutive bone marrow specimens by 4-color flow cytometry. *Blood*, 98(8), 2498-2507; doi: <https://doi.org/10.1182/blood.V98.8.2498>
- Merino, A. (2010). Clasificación de las leucemias agudas mieloides. *Rev Lab Clin*. 3(3):139–147.
- Morales, A., Covarrubias, G., Rendón, H. y Larios, T. (2014). Supervivencia en Niños con Leucemia Aguda Linfoblástica Tratados en Base a Factores de Riesgo Inmunomoleculares. *Bol Clin Hosp Infant Edo Son*, 31(2), 90-95.
- Morrison, S. y Scadden, D. (2014). The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* 505(7483), 327–334. doi: 10.1038/nature12984
- Neumann, M., Heesch, S., Gökbüget, N., Schwartz, S., Schlee, C., Benlasfer, , ... Baldus, C. D. (2012). Clinical and molecular characterization of early T-cell precursor leukemia: a high-risk subgroup in adult T-ALL with a high frequency of FLT3 mutations. *Blood cancer journal*, 2(1), e55.
- Ng, A. P., & Alexander, W. S. (2017). Haematopoietic stem cells: past, present and future. *Cell death discovery*, 3, 17002. doi:10.1038/cddiscovery.2017.2

- Nguyen, K., Devidas, M., Cheng, S. C., La, M., Raetz, E. A., Carroll, W. L.,...Loh, M. L., Children's Oncology Group (2008). Factors influencing survival after relapse from acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *Leukemia*, 22(12), 2142-50.
- O'Donnell, E. A., Ernst, D. N., & Hingorani, R. (2013). Multiparameter flow cytometry: advances in high resolution analysis. *Immune network*, 13(2), 43-54.
- Ortega, M., Osnaya, M. y Rosas, J. (2007). Leucemia linfoblástica aguda. *Med Int Mex.*, 23, 26-33.
- Otero, M. J. y Gonzáles, E. A. (2013). Aplicaciones Clínicas De La Citometría De Flujo. *Ed Cont Lab Clín*, 17, 62-70
- Owen, J., Pun, J. y Strandfor, S. (2014). Kuby: inmunología (7a. ed.). México: McGraw-Hill. [Versión electrónica]. Recuperado de <https://books.google.com.mx/books?id=zBslCgAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>
- Parham, P. (2016). *Inmunología*. (4a. Ed). EUA: Manual Moderno.
- Perea, G. (2011). Factores pronósticos en la leucemia mieloide aguda: utilidad de los estudios inmunofenotípicos y moleculares. [Tesis Doctoral]. Universidad Autónoma de Barcelona. Departamento de Medicina, España.
- Pérez, H. (2011). Guías de Tratamiento para Leucemia. Hospital Infantil de México Federico Gómez Servicio de Radioterapia. Recuperado de <http://himfg.com.mx/descargas/documentos/planeacion/guiasclinicasHIM/GRadioterapiaLeucemias.pdf>
- Pérez, M. L., Fajardo, A., Bernáldez, R., Martínez, A., Medina, A., Espinosa, L.,... Mejia, J. M. (2011). Childhood acute leukemias are frequent in Mexico City: descriptive epidemiology. *BMC cancer*, 11, 355. doi:10.1186/1471-2407-11-355.
- Peters, J., y Ansari, Q. (2011). Multiparameter Flow Cytometry in the Diagnosis and Management of Acute Leukemia. *Arch Pathol Lab Med*; 135, 44-54.
- Proytcheva, M. (2013). Bone marrow evaluation for pediatric patients. *Int. Jnl. Lab. Hem.* 35, 283-289. doi:10.1111/ijlh.12073
- Pui, C. (2013). *Childhood Leukemias*. (3ª ed.) USA: Cambridge University Press. [Versión electrónica]. Recuperado de <https://books.google.com.mx/books?id=pEogAwAAQBAJ&pg=PA72&dq=LYMPHOCYTE+MATURATION+B+DIFFERENTIATION+ANTIGENS.&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiYoda3->

6raAhV4oMKHYVeDY8Q6AEIbTAJ#v=onepage&q=Lymphocyte%20maturation%20b%20differentiation%20antigens.&f=false

- Quero, A., Estrada, R., Pacheco, I., Reyes, U., Álvarez, R. y Vargas, M. (2012). Características clínicas e inmunofenotípicas en un grupo de niños con leucemia aguda linfoblástica. *Pediatría de México*, 14(4), 116-171.
- Ramalingam, P., Poulos, M. G y Butler, J. M. (2017). Regulation of the Hematopoietic Stem Cell Lifecycle by the Endothelial Niche. *Curr Opin Hematol.* 24(4), 289–299. doi: 10.1097/MOH.0000000000000350
- Raskin, E. y Messick, J. (2012). Bone Marrow Cytologic and Histologic Biopsies: Indications, Technique, and Evaluation. *Vet Clin Small Anim* 42, 23– 42. doi:10.1016/j.cvsm.2011.10.001
- Rendón, M. E., Reyes, N. C., Villasís, M. A. (2012).Tendencia mundial de la supervivencia en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda. Revisión de las últimas cuatro décadas. *Bol Med Hosp Infant Mex*; 69(3),153-163.
- Rey, I. (2016). Manejo del sangrado en leucemia promielocítica aguda. *Hematología*, 20, 203-206.
- Rieger, A., y Schroeder, T. (2012). Hematopoiesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 4(12). doi: 10.1101/cshperspect.a008250
- Rivera, R., Shalkow, J., Velasco, L., Cárdenas, R., Zapata, M., Olaya, A.,..., Pantoja, F. (2014). Descriptive Epidemiology in Mexican children with cancer under an open national public health insurance program. *BMC Cancer*; 14:790.
- Rodak, B. (2004). *Hematología: fundamentos y aplicaciones clínicas* (2a. ed.). Argentina: Médica Panamericana.
- Rodak, B., Fritsma, G. y Keohane, E. (2014). *Hematología. Fundamentos y aplicaciones clínicas*. (4ª. Ed.). México: Médica Panamericana.
- Rodríguez, D. y Úcar, P. (2014), *Traducción e interpretación. Lectura y comprensión de textos especializados en Ciencias de la Salud*. España: Universidad Pontificia Comillas. [Versión electrónica]. Recuperado de <https://books.google.com.mx/books?id=mYrbAwAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>
- Röllig, C. & Ehninger, G. (2015). How I treat hyperleukocytosis in acute myeloid leukemia. *Blood*, 125, 3246-3252.
- Ruiz, A. (2002). La citología analítica moderna en el laboratorio de hematología. *Gac. Méd. Mex.* 138(1), 155-159.

- Ruiz, A. (2016). Advances in the diagnosis and treatment of acute and chronic leukemia in Mexico. *Salud pública de México*; 58(2): 291-295.
- Ruiz, A. y Pérez, B. (2010). La necesidad de las recomendaciones de consenso para la inmunotipificación de las hemopatías malignas. *Rev Hematol Mex.*, 11(2), 82-90.
- Ruiz, A., Duque, R. E. y Orfao, A. (1998). Report on the First Latin American Consensus Conference for Flow Cytometric Immunophenotyping of Leukemia. *Cytometry (Communications in Clinical Cytometry)*, 34, 39–42.
- Ruiz, A., Rivadeneyra, L., Duque, R. E. y Orfao, A. (2005). Report on the Second Latin American Consensus Conference for Flow Cytometric Immunophenotyping of Hematological Malignancies. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)*, 70, 39–44.
- Ruiz, G. y Ruiz, G. (2014). *Fundamentos de hematología*. (5ª. Ed.). México: Médica Panamericana.
- Sanjuan, A., Bueno, C., Prieto, C., Acha, P., Stam, R.,...Menéndez, P. (2015). Revisiting the biology of infant t(4;11)/MLL-AF4+ B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 126, 2676-2685; doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2015-09-667378>.
- Sans, J., Besse, C. y Vives, J. L. (2006). *Hematología Clínica*. (5a. Ed.). Elsevier: España.
- Scott, F. (2005). *Biología del desarrollo*. (7ª. Ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Secretaría de Salud. (2009). GPC de Diagnóstico y Tratamiento de Leucemia Linfoblástica Aguda, México. Recuperado de [http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/142\\_GPC\\_LEUCEMIA\\_LINFOBLASTICA/Imss\\_ER.pdf](http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/142_GPC_LEUCEMIA_LINFOBLASTICA/Imss_ER.pdf)
- Sędek, L., Balsa, J., Sonsala, A., Twardoch, M., Wieczorek, M., Malinowska, I., Szczepański, T. (2014). The immunophenotypes of blast cells in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: ¿How different are they from their normal counterparts? *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)*, 86, 329–339.
- Shahni, A., Saud, M., Siddiqui, S., & Mukry, S. N. (2018). Expression of aberrant antigens in hematological malignancies: A single center experience. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, 34(2), 457–462. <http://doi.org/10.12669/pjms.342.13996>
- Sharma, M., Sachdeva, M., Bose, P., Varma, N., Varma, S., Marwaha, R. K., & Malhotra, P. (2017). Haematological profile of patients with mixed-phenotype acute leukaemia from a tertiary care centre of north India. *The Indian journal of medical research*, 145(2), 215-221.

- Sotavento, S., Erber, W. N, Porwit, A., Tomonaga, M. & Peterson, L. C. (2008). ICSH guidelines for the standardization of bone marrow specimens and reports. *Int. Jnl. Lab. Hem*, 20, 349–364. doi:10.1111/j.1751-553X.2008. 01100.x
- Spandl, S. et al. (2013). Molecular pathways of early CD105-positive erythroid cells as compared with CD34-positive common precursor cells by flow cytometric cell-sorting and gene expression profiling. *Blood Cancer Journal* 3(1). doi: 10.1038/bcj.2012.45
- SS, SEDENA, SEMAR (s. f). Algoritmos de Atención Clínica. México. Recuperado de <http://educads.salud.gob.mx/sitio/recursos/Leucemia/LEUCEMIA.pdf>
- Stucki, A., Rivier, A. S., Gikic, M., Monai, N., Schapira, M. & Spertini, O. (2001). Endothelial cell activation by myeloblasts: molecular mechanisms of leukostasis and leukemic cell dissemination *Blood*, 97, 2121-2129.
- Swerdlow, S., Campo, E., Lee, N., Jaffe, E., Pileri, S., Stein, H.,...Vardiman, J. (2008). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. (4ª. Ed.).
- Tallman, M. & Altman, J. (2009). How I treat acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 114, 5126-5135.
- Tasmeen, R., Islam, A., Begum, M. (2017). Tumor Lysis Syndrome and Hyperleukocytosis in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia in a Tertiary Care Hospital. *Mymensingh Med J.* 26(4), 906-912.
- Terwilliger, T. y Abdul, M. (2017). Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer Journal*, 7(577), 1-11 doi:10.1038/bcj.2017.53
- Testa, U., Pelosi, E. y Frankel, A. (2014). CD123 is a membrane biomarker and a therapeutic target in hematologic malignancies. *Biomarker Research*, 2(4). doi: 10.1186/2050-7771-2-4
- Turgeon, M. L., (2012). Clinical Hematology. Teory and Procedures. (5ª. Ed.). Philadelphia: Wolters Kluwer Health / Lippincott Williams & Wilkins.
- UniProt. [Base de datos]. Recuperado de <https://www.uniprot.org/>
- Universidad de Salamanca. (2011). Maduración linfoide B. España.
- Vadilloa, E., Dorantes, E., Pelayo, R. y Schnoor, M. (2017). T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL): New insights into the cellular origins and infiltration mechanisms common and unique among hematologic malignancies. *Blood Reviews* 32, 36–51
- Valencia, P. y Ancer, J. (2014). *Patología*. México: McGraw-Hill. Pp. 337.

- van Dongen, J. J., Lhermitte, L., Böttcher, S., Almeida, J., van der Velden, V. H., Flores J., ... Orfao, A., EuroFlow Consortium (EU-FP6, LSHB-CT-2006-018708) (2012). EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*, 26(9), 1908-75.
- Verma, D., Kantarjian, H., Faderl, S., O'Brien, S., Pierce, S., Vu, K.,... Ravandi, F. (2010). Late relapses in acute myeloid leukemia: analysis of characteristics and outcome. *Leukemia & lymphoma*, 51(5), 778-82.
- Villarreal, L., Jaime, J., Rodríguez, M., González, O. y Gómez, D. (2012). Acute lymphoblastic leukemia of childhood presenting as aplastic anemia: report of two cases. *Rev Bras Hematol Hemoter*, 34(2), 165-7.
- Vizcaíno, M., Guzmán, C., De los Reyes, I., Quijano, S. y Campos, A. (2010). Diagnóstico de leucemias bifenotípicas por citometría de flujo. *Biomédica*, 30, 22-26.
- Weinberg, O. y Arber, D. (2010). Mixed-phenotype acute leukemia: historical overview and a new definition. *Leukemia* 24, 1844–1851
- Whitehead, T. P., Metayer, C., Wiemels, J. L., Singer, A. W., & Miller, M. D. (2016). Childhood Leukemia and Primary Prevention. *Current problems in pediatric and adolescent health care*, 46(10), 317-352.
- Willian, D., Valdeci F., Helder, F., Félix, C. & Vinicios, M. (2015). Acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents: prognostic factors and analysis of survival. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 37(4), 223-229.
- Wohlfahrt, A., Hannel, L., Oliveira, L., Soares, B. y Silva, J. (2015). The importance of immunophenotyping by flow cytometry in distinction between hematogones and B lymphoblasts. *J Bras Patol Med Lab*, 51(1), 7-12.
- Wolach, O. y Stone, R. M. (2015). How I treat mixed-phenotype acute leukemia. *Blood*, 125, 2477-2485. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2014-10-551465>.
- Wood, B. (s. f.). *The Diagnosis of Myeloid Neoplasia by Flow Cytometry*. University of Washington, Seattle. USA.
- You, J., Medeiros, L. J. & Hsi, E. (2015). T-Lymphoblastic Leukemia/Lymphoma. *American Journal of Clinical Pathology*, 144(3), 411–422
- Zhang, L., Samad, A., Pombo, M. S., Scelo, G., Smith, M. T., Feusner,...Metayer, C. (2014). Global characteristics of childhood acute promyelocytic leukemia. *Blood reviews*, 29(2), 101-25.

Zini, G., Bain, B., Bettelheim, P., Cortez, J., D'Onofrio, G., Faber, E.,...Bene, M. (2010). A European consensus report on blood cell identification: terminology utilized and morphological diagnosis concordance among 28 experts from 17 countries within the European LeukemiaNet network WP10, on behalf of the ELN Morphology Faculty. *British Journal of Haematology*, 151, 359–364 doi:10.1111/j.1365-2141.2010.08366.x

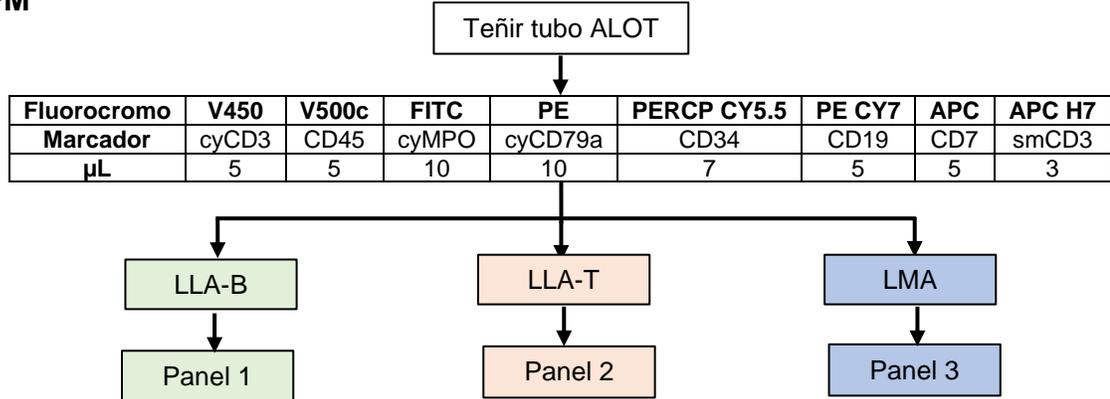
## 10. ANEXOS

### 10.1. Requisitos de la muestra para la determinación de inmunofenotipificación de leucemias

- **Preparación del paciente:** no aplica.
- **Tipo de muestra:** médula ósea anticoagulada con heparina o sangre completa anticoagulada con EDTA.
- **Condiciones de la muestra:** debe estar bien mezclada, no debe estar coagulada.
- **Identificación de la muestra primaria:** debe estar rotulada con letra clara y con el nombre completo del paciente, así como el número de registro, edad, sexo, servicio, nombre del médico que lo solicita, porcentaje de blastos y diagnóstico por morfología FAB.
- **Volumen de la muestra:** mínimo 1.0 mL, óptimo 3.0 mL.
- **Estabilidad y conservación:** a temperatura ambiente hasta 24 horas.

**Criterios de rechazo:** muestras coaguladas, obtenidas con otro tipo de anticoagulantes, sin datos de porcentajes de blastos y sin diagnóstico por morfología FAB (BD, s. f.b).

## 10.2. Metodología de inmunofenotipificación de leucemias agudas por CFM



Panel 1. Panel de tinción para LLA-B

Tubo	Fluorocromo	V450	V500c	FITC	PE	PERCP CY5.5	PE CY7	APC	APC H7
1	Marcador	CD20	CD45	CD58	CD66c	CD34	CD19	CD10	CD38
	µL	5	5	7	10	7	5	5	3
2	Marcador	smlgk	CD45	cylgµ	CD33	CD34	CD19	smlgµ/CD117	cylgλ
	µL	5	5	15	5	7	5	10/5	4
3	Marcador	CD9	CD45	nuTdT	CD13	CD34	CD19	CD22	CD24
	µL	5	5	10	7	7	5	5	5
4	Marcador	CD21	CD45	CD15		CD34	CD19	CD123	CD81
	µL	5	5	10		7	5	5	5

Panel 2. Panel de tinción para LLA-T

Tubo	Fluorocromo	V450	V500c	FITC	PE	PERCP CY5.5	PE CY7	APC	APC H7
1	Marcador	cyCD3	CD45	nuTdT	CD99	CD5	CD10	CD1a	smCD3
	µL	5	5	10	5	15	5	5	3
2	Marcador	cyCD3	CD45	CD2	CD117	CD4	CD8	CD7	smCD3
	µL	5	5	5	5	7	5	5	3
3	Marcador	cyCD3	CD45	TCRγδ	TCRαβ	CD33	CD56		smCD3
	µL	5	5	10	10	10	5		3
4	Marcador	cyCD3	CD45	CD44	CD13	HLADR	CD45RA	CD123	smCD3
	µL	5	5	7	7	10	5	5	3

Panel 3. Panel de tinción para LMA

Tubo	Fluorocromo	V450	V500c	FITC	PE	PERCP CY5.5	PE CY7	APC	APC H7
1	Marcador	HLADR	CD45	CD16	CD13	CD34	CD117	CD11b	CD10
	µL	5	5	10	7	7	5	5	5
2	Marcador	HLADR	CD45	CD35	CD64	CD34	CD117	IREM2	CD14
	µL	5	5	5	10	7	5	5	5
3	Marcador	HLADR	CD45	CD36	CD105	CD34	CD117	CD33	CD71
	µL	5	5	10	5	7	5	10	5
4	Marcador	HLADR	CD45	nuTdT	CD56	CD34	CD117	CD7	CD19
	µL	5	5	10	10	7	5	5	5
5	Marcador	HLADR	CD45	CD15		CD34	CD117	CD22	CD38
	µL	5	5	10		7	5	5	3
6	Marcador	HLADR	CD45	CD42a/CD61	CD203c	CD34	CD117	CD123	CD4
	µL	5	5	10/4	5	7	5	5	5
7	Marcador	HLADR	CD45	CD41a	CD25	CD34	CD117	CD42b	CD9
	µL	5	5	10	10	7	5	1	5

ALOT: tubo orientador de leucemia aguda; PerCP: peridina clorofila proteína, PE: ficoeritrina, APC: alofocianina, FITC: isotiocianato de fluoresceína; cy: marcador citoplasmático. (DB, s. f.b).

### **Tinción de marcadores de superficie**

1. Colocar 50  $\mu$ L de muestra en el tubo.
2. Adicionar el volumen correspondiente de cada anticuerpo de superficie.
3. Mezclar bien.
4. Incubar 30 min. a temperatura ambiente y protegidos de la luz.
5. Agregar 2 mL de solución lisante (FASCLysing 1X)
6. Mezclar bien.
7. Incubar 10 min. a temperatura ambiente y protegido de la luz.
8. Centrifugar 5 min. a 540g
9. Decantar sobrenadante.
10. Agregar 2 mL de solución buffer fosfatos (PBS).
11. Mezclar bien.
12. Centrifugar 5 min. a 540g.
13. Decantar sobrenadante.
14. Agregar 200  $\mu$ L de PBS.
15. Adquirir las células. (DB, s. f.b).

### **Tinción de marcadores de superficie e intracelulares**

1. Colocar 50  $\mu$ L de muestra en el tubo.
2. Adicionar el volumen correspondiente de cada anticuerpo de superficie.
3. Mezclar bien.
4. Incubar 30 min. a temperatura ambiente y protegidos de la luz.
5. Agregar 2 mL PBS.
6. Mezclar bien.
7. Centrifugar 5 min. a 540g.
8. Decantar sobrenadante.
9. Agregar 100  $\mu$ L de reactivo A (fijador).
10. Incubar 5 min. a temperatura ambiente y protegido de la luz.
11. Agregar 2 mL de solución FASCLysing 1X.
12. Mezclar bien.
13. Incubar 10 min. a temperatura ambiente y protegido de la luz.
14. Centrifugar 5 min. a 540g.
15. Decantar sobrenadante.
16. Agregar 50  $\mu$ L de reactivo B (solución de permeabilización)
17. Mezclar bien.
18. Agregar el volumen correspondiente de cada anticuerpo intracitoplasmático.
19. Mezclar bien.
20. Incubar por 30 min. a temperatura ambiente y protegido de la luz.
21. Agregar 2 mL de PBS.
22. Mezclar bien.
23. Centrifugar 5 min. a 540g.
24. Decantar sobrenadante.
25. Agregar 200  $\mu$ L de PBS.
26. Mezclar bien.
27. Adquirir células en citómetro de flujo BD FACSCanto II para inmunofenotipos de 8 colores (DB, s. f.b). Considerar como positivo cuando la expresión de un antígeno en las células sea  $>20\%$ .

### 10.3. Perfil inmunofenotípico de los casos con leucemia aguda

En la Tabla 29 se muestra el perfil inmunofenotípico de cada uno de los casos de leucemia aguda.

Los tres casos de LLA pro-B expresaron el marcador CD34 y todos presentaron antígenos aberrantes de linaje mielóide, el CD15 y CD66c se presentaron en dos casos y en un caso solo se expresó el CD13. En las LLA pre-B común, 26 casos expresaron CD34 mientras que en el resto (9 casos) este marcador fue negativo; en 16 casos hubo infidelidad de linaje, en un caso se expresó el CD11b, CD16, CD71 y CD66c, en otro caso CD13, CD15 y CD66c; en los 14 casos restantes hubo expresión solamente del marcador CD66c. De los 3 casos de LLA pre-B, 2 fueron negativos para CD34, también hubo coexpresión de antígenos mieloides: en 2 casos se expresó solamente el CD15 mientras que en el otro se presentó únicamente el CD66c.

Todos los casos de LLA-T fueron negativos para el marcador CD34; en un solo caso hubo expresión aberrante de un antígeno de linaje B (CD10).

Todos los casos de LMA expresaron el CD34 y 3 de los cuatro casos fueron positivos para MPox; dos casos fueron positivos para CD7, de estos, en un caso se presentó el CD19 y CD105 mientras que en el otro se expresó el CD71, en los dos casos restantes se expresó únicamente el CD71 (de origen eritroide).

En todas las LAB se expresó el marcador CD34.

**Tabla 29. Perfil inmunofenotípico de las leucemias agudas de los pacientes incluidos en este estudio.**

No.	PERFIL INMUNOFENOTÍPICO	CLASIFICACIÓN	
		EGIL	FAB
1	CD34+, CD123+, TdT+, CD22+, CD79a+, CD19+, CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, CD58+, CD15+, CD66c+	Pro-B	LLA-L2
2	CD34+, CD123+, CD22+, CD19+, CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, CD58+, CD15+, CD66c+	Pro-B	S/Dx
3	CD34+, CD79a+, CD19+, CD38+, CD9+, CD81+, CD58+, CD13+	Pro-B	LLA-L2
4	CD34+, CD123+, HLA-DR+, TdT+, CD22+, CD19+, <b>CD10+</b> , CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, CD21+, CD66c+, CD11b+, CD16+, CD71+	Pre-B común	LLA-L2
5	CD34+, CD123+, TdT+, CD22+, CD19+, <b>CD10+</b> , CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, CD58+, CD66c+	Pre-B común	LLA-L2
6	CD34+, CD123+, TdT+, CD22+, CD19+, <b>CD10+</b> , CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, CD20+, CD58+, CD13+, CD66c+, CD15+	Pre-B común	LLA-L1
7	CD34+, CD123+, TdT+, CD22+, CD79a+, CD19+, <b>CD10+</b> , CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, λ+, CD58+, CD66c+	Pre-B común	LLA-L2
8	CD34+, CD123+, TdT+, CD22+, CD79a+, CD19+, <b>CD10+</b> , CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, CD66c+	Pre-B común	LLA-L2
9	CD34+, CD123+, TdT+, CD22+, CD79a+, CD19+, <b>CD10+</b> , CD38+, CD9+, CD81+, CD20+	Pre-B común	LLA-L2

<b>Tabla 29 (continuación)</b>			
<b>No.</b>	<b>PERFIL INMUNOFENOTÍPICO</b>	<b>CLASIFICACIÓN</b>	
		<b>EGIL</b>	<b>FAB</b>
10	CD34+, CD123+, CD22+, CD79a+, CD19+, <b>CD10+</b> , CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, CD20+, CD58+, CD66c+	Pre-B común	LLA-L1
11	CD34+, CD123+, CD22+, CD79a+, CD19+, <b>CD10+</b> , CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, λ+, CD58+, CD66c+	Pre-B común	LLA-L2
12	CD34+, CD123+, CD22+, CD79a+, CD19+, <b>CD10+</b> , CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, CD20+, CD58, CD66c+	Pre-B común	LLA-L1
13	CD34+, CD123+, CD22+, CD79a+, CD19+, <b>CD10+</b> , CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, CD20+, CD58, CD66c+	Pre-B común	LLA-L2
14	CD34+, CD123+, CD22+, CD79a+, CD19+, <b>CD10+</b> , CD38+, CD24+, CD81+, CD58+	Pre-B común	LLA-L1
15	CD34+, CD123+, CD22+, CD79a+, CD19+, <b>CD10+</b> , CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, CD58+	Pre-B común	LLA-L1
16	CD34+, CD123+, CD22+, CD19+, <b>CD10+</b> , CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, CD58+,	Pre-B común	LLA-L2
17	CD34+, CD123+, CD22+, CD19+, <b>CD10+</b> , CD38+, CD9, CD24+, CD20+, CD58+	Pre-B común	LLA-L1
18	CD34+, CD123+, CD22+, CD19+, <b>CD10+</b> , CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, CD58+, CD66c+	Pre-B común	LLA-L2
19	CD34+, CD123+, CD22+, CD19+, <b>CD10+</b> , CD38+, CD9+, CD24+, CD20+, CD66c+	Pre-B común	LLA-L2
20	CD34+, CD123+, CD22+, CD19+, <b>CD10+</b> , CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, CD20+, CD58+, CD66c+	Pre-B común	LLA-L1
21	CD34+, TdT+, CD22+, CD79a+, CD19+, <b>CD10+</b> , CD38+, CD9+, CD24+, CD20+	Pre-B común	LLA-L1
22	CD34+, TdT+, CD22+, CD79a+, CD19+, <b>CD10+</b> , CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, CD20+	Pre-B común	LLA-L2
23	CD34+, TdT+, CD22+, CD19+, <b>CD10+</b> , CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, CD58+	Pre-B común	LLA-L2
24	CD34+, TdT+, CD19+, <b>CD10+</b> , CD22+, CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, CD66c+	Pre-B común	LLA-L1
25	CD34+, CD22+, CD79a+, CD19+, <b>CD10+</b> , CD38+, CD9+, CD24+, CD20+, CD58+	Pre-B común	LLA-L2
26	CD34+, CD22+, CD79a+, CD19+, <b>CD10+</b> , CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, CD58+	Pre-B común	S/Dx
27	CD34+, CD22+, CD19+, <b>CD10+</b> , CD38+, CD9+, CD24+, CD81+	Pre-B común	LLA-L2
28	CD34+, CD22+, CD19+, <b>CD10+</b> , CD38+, CD9+, CD24+, CD81+	Pre-B común	LLA-L1
29	CD34+, CD38+, <b>CD10+</b> (8%) /CD34-, CD38+, <b>CD10+</b> (2%)	Pre-B común	NO LA
30	CD123+, TdT+, CD22+, CD79a+, CD19+, <b>CD10+</b> , CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, CD58+, CD66c+	Pre-B común	LLA-L2
31	CD123+, CD22+, CD79a+, CD19+, <b>CD10+</b> , CD38+, CD9, CD24+, CD81+, CD20+, λ+, CD58+,	Pre-B común	LLA-L2
32	CD123+, CD22+, CD19+, <b>CD10+</b> , CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, CD58+	Pre-B común	LLA-L2
33	CD123+, CD22+, CD19+, <b>CD10+</b> , CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, CD58+, CD66c+	Pre-B común	S/Dx
34	TdT+, <b>CD10+</b> , CD38+,	Pre-B común	LLA-L1
35	CD22+, CD79a+, CD19+, <b>CD10+</b> , CD38+, CD9+, CD81+, CD20+, CD58+	Pre-B común	LLA-L1
36	CD22+, CD79a+, CD19+, <b>CD10+</b> , CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, CD20+, CD58+,	Pre-B común	LLA-L2
37	CD22+, CD79a+, CD19+, <b>CD10+</b> , CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, CD20+, CD58+,	Pre-B común	LLA-L2

Tabla 29 (continuación)			
No.	PERFIL INMUNOFENOTÍPICO	CLASIFICACIÓN	
		EGIL	FAB
38	CD22+, CD19+, <b>CD10+</b> , CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, CD20+, CD58+, CD66c+	Pre-B común	LLA-L1
39	CD34+, CD22+, CD79a+, CD19+, <b>cylgM+</b> , CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, CD10+, CD58+, CD15+	Pre-B	S/Dx
40	CD123+, CD22+, CD79a+, CD19+, <b>cylgM+</b> , CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, CD10+, CD20+, $\lambda$ +, CD66c+	Pre-B	LLA-L2
41	CD22+, CD79a+, CD19+, <b>cylgM+</b> , CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, $\lambda$ +, CD58+, CD15+	Pre-B	LLA-L2
42	cyCD3+, CD2+, CD5+, CD7+	LLA-T	LLA-L1
43	cyCD3+, sCD3+, CD7+	LLA-T	LLA-L2
44	cyCD3+, sCD3+, CD8+, CD7+, CD10+	LLA-T	S/Dx
45	CD34+, CD123+, CD117+, HLA-DR+, <b>MPox-</b> , CD33+, CD38+, CD7+, CD19+, CD105+	Mieloide	LMA-M1
46	CD34+, CD117+, HLA-DR+, <b>MPox+</b> , CD13+, CD33+, CD15+, CD64+, CD16+, CD38+, CD71+	Mieloide	LMA-M2
47	CD34+, CD117+, HLA-DR+, <b>MPox+</b> , CD13+, CD33+, CD38+, CD7+, CD71+	Mieloide	LMA-M2
48	CD34+, CD117+, <b>MPox+</b> , CD13+, CD33+, CD64+	Mieloide	LMA-M3
49	CD34+, CD58+, CD38+, CD9+, CD81+, [CD22+, CD19+, CD10+, CD24+ (4.5 puntos)] CD13+, CD33+ (2 puntos)	LA B/Mieloide	LLA-L2
50	CD34+, CD123+, HLA-DR+, CD38+, cyCD3+, CD7+ (2.7 puntos) CD11b+, CD16+, CD35+, [MPox+, CD13+, CD33+, CD117+, CD14+, CD15+, CD64+ (6.5 puntos)] CD71+, CD36+	LA T/Mieloide	LMA-M2
51	CD34+, CD123+, CD38+, CD58+, CD9+, CD81+, [CD22+, CD79a+, CD19+, CD10+, CD24+ (6.5 puntos)] suCD3+, CD7+ (2.5 puntos) CD66c+	B/T	S/Dx
52	CD34+, CD38+, CD9+, [CD22+, CD79a+, cylgM+, CD19+, CD10+ (8 puntos)] cyCD3+ (2 puntos)	B/T	S/Dx

S/Dx: sin diagnóstico debido a que la muestra era de mala calidad; LA: leucemia aguda.

#### 10.4. Antígenos CD que se emplean en el diagnóstico y clasificación de las leucemias agudas.

Tabla 30. Antígenos *Cluster of differentiation* que se emplean en el diagnóstico y clasificación de las leucemias agudas.

MARCADOR	NOMBRE ALTERNATIVO	DESCRIPCIÓN/FUNCIÓN	EXPRESIÓN CELULAR NORMAL
CD1a	R4, HTA1	Heterodímeros constituidos por una cadena $\alpha$ que se une no covalentemente con la $\beta$ 2 microglobulina ( $\beta$ 2m). Proteína presentadora de antígenos lipídicos y glucolípidos	Precursor de linfocitos T, células dendríticas
CD2	T11, LFA-2	GP transmembranal. Implicado en la activación de las células T, media la adhesión entre células T y otros tipos de células	Precursor y linfocitos T maduras, células NK

<b>Tabla 30 (continuación)</b>				
<b>MARCADOR</b>	<b>NOMBRE ALTERNATIVO</b>	<b>DESCRIPCIÓN/FUNCIÓN</b>	<b>EXPRESIÓN NORMAL</b>	<b>CELULAR</b>
CD3	T3	Parte del complejo TCR-CD3 presente en la superficie celular de linfocitos T. Media la transducción de señales en la activación de las células T, participa también en la internalización y la regulación de la superficie celular de los complejos TCR-CD3	Precursor y maduras	linfocitos T
CD4	L3T4, W3/25, T4	GP transmembranal. En las células T, funciona principalmente como un coreceptor para MHC-II. Interactúa simultáneamente con el TCR. En células NK participa en su diferenciación/activación. Desencadena la diferenciación de monocitos a macrófagos	Precursor de células NK	linfocitos T, monocitos y en algunas células NK
CD5	T1, Tp67, Leu-1, Ly-1	GP transmembranal. Actúa como un regulador negativo de la señalización del TCR	Precursor y maduras	linfocitos T, células B1a
CD7	gp40, TP41	GP transmembranal. Activación de células T	Precursor y maduras	linfocitos T, células NK
CD8	Leu2	En las células T, interactúa simultáneamente con el TCR para estabilizarlo cuando se une con la MHC-I.	Precursor de células T supresoras/citotóxicas, subpoblación de células NK	linfocitos T
CD9	p24, DRAP-1, MRP-1	Proteína transmembranal. Se asocia con CD41/CD61 para la activación y agregación plaquetaria. Participa en la adhesión celular y motilidad celular y en la metástasis tumoral	Plaquetas, precursores de linfocitos B, linfocitos T y B activados, eosinófilos y granulocitos	
CD10	Antígeno de la leucemia linfoblástica aguda común (CALLA), gp100, NEP	Endopeptidasa neutra. Regula el crecimiento y proliferación de células B	Precursor y maduras	linfocitos B, linfocitos B del centro germinal, neutrófilos
CD11b	Mac-1	GP. Participa en la fagocitosis, quimiotaxis y apoptosis	Granulocitos, células NK, y en algunos subtipos de linfocitos B y T	monocitos,
CD11c	p150	GP. <i>Funciones similares a CD11b</i>	Granulocitos, células NK, y en algunos subtipos de linfocitos B y T	
CD13	APN, gp150	Aminopeptidasa. Participa en el procesamiento de diversos péptidos. Actúa como un receptor para el coronavirus humano y del citomegalovirus	Linaje mieloide expresado en una etapa muy temprana de diferenciación, incluso antes de la expresión de cualquier signo morfológico de diferenciación mieloide. Durante la maduración de granulocitos y monocitos	
CD14	LPS-Receptor	GP. Receptor de membrana o se secreta de forma soluble. Correceptor del lipopolisacárido bacteriano	Monocitos	
CD15	Lewis X	Carbohidrato. Ligando para selectinas	Granulocitos, mastocitos	monocitos,
CD16	CD16a, FcγRIIIA	Receptor Fc de IgG (FcγRIII). Modula la respuesta inmune, media la fagocitosis y la citotoxicidad dependiente de anticuerpos	Granulocitos, células NK, mastocitos	monocitos,
CD19	B4	GP. Transducción de señales para el desarrollo, activación y diferenciación de linfocitos B.	Precursores y maduras	linfocitos B, pero no en células plasmáticas
CD20	B1, Bp35	Fosfoproteína. Activación y proliferación celular B	Precursores y maduras	linfocitos B, se expresa después de 19, no se expresa en células plasmáticas
CD21	CR2, EBV-R, C3dR	GP. CR2 (receptor de complemento tipo 2), su ligando es C3d. regula la activación del complemento	Linfocitos B y dendríticas	células
CD22	BL-CAM	GP. Adhesión y activación	Precursores y maduras	linfocitos B
CD23	FcεRII, BLAST-2	FcεRII (porque se comporta como un receptor de baja afinidad para el fragmento Fc de la IgE)	Linfocitos B activados, monocitos, plaquetas	neutrófilos,
CD24	BA-1, HAS	GP. modula las señales de crecimiento y diferenciación de los linfocitos B	Linfocitos B, pero no en las células plasmáticas	

<b>Tabla 30 (continuación)</b>				
<b>MARCADOR</b>	<b>NOMBRE ALTERNATIVO</b>	<b>DESCRIPCIÓN/FUNCIÓN</b>	<b>EXPRESIÓN NORMAL</b>	<b>CELULAR</b>
<b>CD33</b>	gp67, Siglec-3	GP transmembranal. Proliferación y supervivencia celular	UFC-GMME, UFC-GM, UFB-E, mieloblastos, todos los estadios de maduración de neutrófilos y de monocitos, megacarioblastos, proeritroblastos	
<b>CD34</b>	gp10-120, mucosialin, MY10	GP transmembranal. Media la unión de las CTH a las células estromales de la MO	CTH, progenitores hematopoyéticos	
<b>CD35</b>	CR1, C3b/C4b-R	Receptor para C3b o C4b. Facilitar la fagocitosis de inmunocomplejos o de partículas recubiertas por dichas fracciones de complemento	Neutrófilos y monocitos	
<b>CD36</b>	GPIV, gpIIIb	Adhesión y agregación plaquetaria. Fagocitosis y apoptosis	Megacariocitos, plaquetas, precursors eritroides, eritrocitos, monocitos	
<b>CD37</b>	gp52-40	Tetraspanina. Regulación de las interacciones entre las células T y células B	Linfocitos B	
<b>CD38</b>	T10, ADP ribosa cíclica hidrolasa	Adhesión celular y transducción de señales	Durante la maduración de los precursors de células B y T, megacariocitos	
<b>CD41</b>	Complejo GP IIb/IIIa	Agregación plaquetaria	Megacariocitos, plaquetas	
<b>CD42b</b>	Gplb	GP que se encuentra en la superficie de las plaquetas, participa en la formación de agregados plaquetarios al unirse al dominio A1 del vWF	Megacariocitos, plaquetas	
<b>CD44</b>	HCAM, glicoproteína fagocítica I (Pgp-1)	Receptor de ácido hialurónico (HA). Participa en la activación de los linfocitos	Linfocitos B y T, células NK, monocitos, granulocitos, eritrocitos	
<b>CD45</b>	LCA (antígeno leucocitario común), T200	GP transmembranal. Con actividad tirosinfosfatasa que permite la regulación de la fosforilación	Se expresa en la superficie de todos los leucocitos, incrementa su expresión a medida que la célula va madurando. Precursors eritroides y megacariocíticos pierden la expresión a lo largo de su diferenciación. Linfocitos expresan los más altos niveles, monocitos niveles ligeramente más bajos que los linfocitos y granulocitos niveles más bajos que monocitos	
<b>CD53</b>	Tetraspanina 25(TSPAN25)	Involucrado en la regulación del crecimiento de las células hematopoyéticas	Linfocitos B y T, monocitos, macrófagos, neutrófilos. Precursors hematopoyéticos	
<b>CD54</b>	ICAM-1	Las proteínas ICAM son ligandos para la proteína de adhesión de leucocitos LFA-1	Linfocitos B y T, monocitos y macrófagos	
<b>CD56</b>	Molécula de adhesión de células neurales (NCAM)	GP transmembranal. Adhesión celular	Células NK, linfocitos CD4+	
<b>CD58</b>	LFA-3	Ligando de CD2 de linfocitos T. Esta interacción es importante para mediar en las interacciones de los timocitos con las células epiteliales del timo	Linfocitos B y T, células NK, monocitos y macrófagos, granulocitos	
<b>CD61</b>	GPIIIa	Adhesión celular	Megacariocitos, plaquetas	
<b>CD64</b>	FcγRI, FcRI	GP transmembranal. Receptor tipo I de alta afinidad que se une a la fracción Fc de la IgG	Durante la maduración de granulocitos y monocitos	
<b>CD65</b>	VIM2	Adhesión celular	Granulocitos y monocitos	
<b>CD66a</b>	Molécula de adhesión celular antígeno carcinoembrionario 1 (CEACAM1)	Adhesión celular, migración, unión de patógenos, transducción de señales y regulación de la expresión génica	Granulocitos y sus precursors. Débilmente en promielocitos	

<b>Tabla 30 (continuación)</b>				
<b>MARCADOR</b>	<b>NOMBRE ALTERNATIVO</b>	<b>DESCRIPCIÓN/FUNCIÓN</b>	<b>EXPRESIÓN NORMAL</b>	<b>CELULAR</b>
<b>CD66b</b>	Molécula de adhesión celular antígeno carcinoembrionario 8 (CEACAM8)	Adhesión celular, migración, unión de patógenos, transducción de señales y regulación de la expresión génica	Alta expresión en eosinófilos. Se expresa en neutrófilos y sus precursores, alcanza su máxima expresión en los mielocitos y metamielocitos y luego disminuye en los estadios de banda y segmentados	
<b>CD66c</b>	Molécula de adhesión celular antígeno carcinoembrionario 6 (CEACAM6)	Adhesión celular, migración, unión de patógenos, transducción de señales y regulación de la expresión génica	Granulocitos y sus precursores. La expresión es más alta en la etapa de promielocitos y disminuye progresivamente durante la maduración	
<b>CD71</b>	Receptor de transferrina (Trf), T9	Media la captación de complejos de transferrina-hierro	Precursos eritroides	
<b>cyCD79a</b>	Igα	Proteína transmembranal que forma un complejo con el BCR. Junto con CD79β inicia la transducción de señales tras la unión del antígeno al BCR. También se requiere para la diferenciación eficiente de células pro y pre-B	Precursos y linfocitos B	
<b>CD81</b>	TAPA1, Tetraspanina-28	Proteína de superficie. forma un complejo CD19-CD21-CD81 que participa en la transducción de señales en las células B	Precursos y linfocitos B	
<b>CD87</b>	Receptor del activador del plasminógeno tipo urocinasa (uPAR)	Actúa como un receptor para el activador de plasminógeno tipo urocinasa	Linfocitos T, células NK, granulocitos y monocitos	
<b>CD99</b>	MIC2, E2	Extravasación de monocitos y neutrófilos a través de las células endoteliales.	Precursos hematopoyéticos, linfocitos T, linfocitos B, células NK, monocitos y plaquetas.	
<b>CD105</b>	Endoglina	Regulación de la angiogénesis	Macrófago y precursos eritroides	
<b>CD117</b>	c-kit, receptor del SCF (SCFR)	Receptor tirosina cinasa transmembranal perteneciente a la familia de receptores tirosina cinasa tipo III. Regulación de la apoptosis, diferenciación celular, proliferación, quimiotaxis y adhesión celular	CTH, progenitores hematopoyéticos, mastocitos	
<b>CD123</b>	Cadena α del receptor para IL-3 (IL-3Rα)	GP transmembranal. Diferenciación y proliferación de progenitores hematopoyéticos.	En la mayoría de los progenitores hematopoyéticos. Fuerte expresión en progenitores granulocíticos y monocíticos, disminuye moderadamente durante la diferenciación monocítica y se mantiene hasta en las últimas etapas de maduración en granulocitos. Expresión transitoria en linaje eritroide y megacariocítico en las primeras etapas de diferenciación y luego desaparece	
<b>CD203c</b>	B10. Ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 3 (ENPP3)	Activa los basófilos y los mastocitos e induce la liberación de citocinas inflamatorias	Basófilos y mastocitos	
<b>CD235</b>	Glicoforina A	Sialoglicoproteína principal de la membrana del eritrocito. Forma parte de los antígenos del grupo sanguíneo MN. Previene la agregación y la lisis de los eritrocitos	Precursos eritroides y eritrocitos.	
<b>cyIgμ</b>		Cadena pesada de inmunoglobulina	A partir de la etapa Pre-B de los precursos de linfocitos B	
<b>slgM</b>		Cadena ligera κ de inmunoglobulina	Linfocito B inmaduro y maduro	

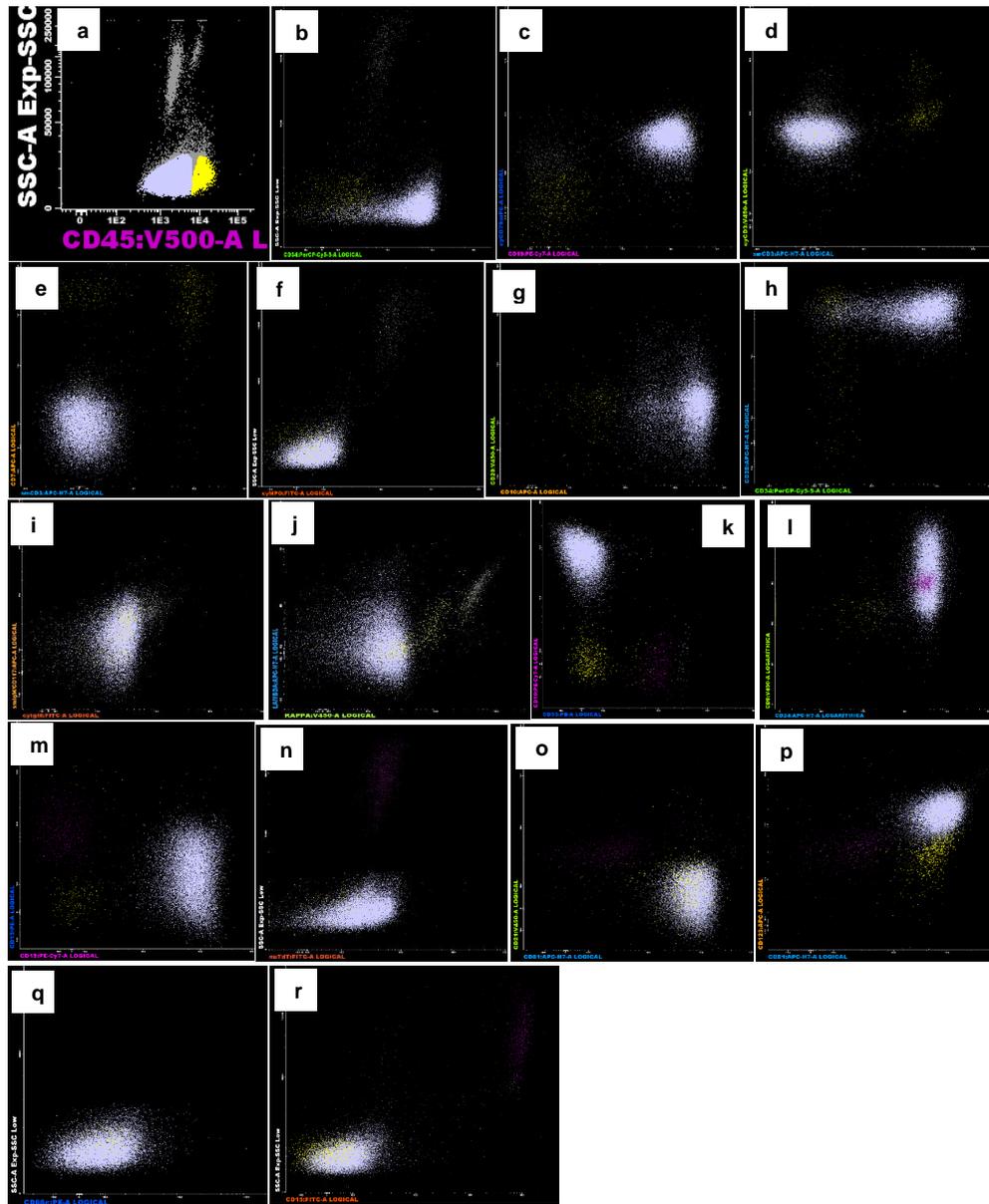
**Tabla 30 (continuación)**

MARCADOR	NOMBRE ALTERNATIVO	DESCRIPCIÓN/FUNCIÓN	EXPRESIÓN NORMAL	CELULAR
<b>sIgMA</b>		Cadena ligera λ de inmunoglobulina	Linfocito B inmaduro y maduro	y
<b>sIgM</b>		IgM en la superficie de linfocitos B	Linfocito B inmaduro y maduro	y
<b>cyMPO</b>	Mieloperoxidasa	Enzima lisosomal, se empaqueta en los gránulos primarios y se libera en el fagosoma o en el espacio extracelular donde cataliza la conversión de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en ácido hipocloroso. Destruye microorganismos patógenos	Todas sus etapas de la maduración de neutrófilos y eosinófilos, en basófilos se detecta en las formas inmaduras. Los basófilos maduros suelen ser negativos. La intensidad es menor en monocitos que en granulocitos	
<b>nuTdT</b>	Desoxinucleotidil transferasa terminal	DNA polimerasa	Precusores de linfocitos B y T	
<b>HLA-DR</b>	MHC II	Antígeno leucocitario humano. Presenta péptidos derivados de proteínas extracelulares.	APC: células dendríticas, linfocitos B, macrófagos, y sus precursores; células progenitoras hematopoyéticas	
<b>IREM-2</b>	CD300e. Receptor inmune expresado por células mieloides (IREM)	GP transmembranal. Activación de células mieloides	Monocitos, macrófagos	
<b>TCRγδ</b>		Complejo multiproteico. Reconocimiento antigénico, inmunovigilancia.	Linfocitos T	
<b>TCRαβ</b>		Complejo multiproteico. Reconocimiento antigénico, protección inmunológica	Linfocitos T	
<b>cyTCRβ</b>		Reconocimiento antigénico	Precursor T	

APC: Células presentadoras de antígeno; BCR: receptor de células B; CTH: célula troncal hematopoyética; GP: glicoproteína; LPS: lipopolisacárido; MHC-I y II: molécula principal de histocompatibilidad clase I y II; MO: médula ósea; SCF: receptor del factor de células madre; TCR: receptor de células T; vWF: factor de von Willebrand. UniProt; Gene, 2018; Becton Dickinson, s. f.a; Pui, 2013; Rodak et al., 2014; Testa, Pelosi, & Frankel, 2014; Engel et al., 2015; Kumar, Abbas y Aster, 2015; Ismail, Zaghloul, Nahla & Heba, 2017; Marsán, Macías, Díaz, Morales, Lam, Machín, S.,...Valdés, C., 2017; Shahni, Saud, Siddiqui, & Mukry, 2018.

## 10.5. Diagramas *dot plot* de diferentes casos de leucemias aguda

### Reporte de una LLA-B (Pre-B común)

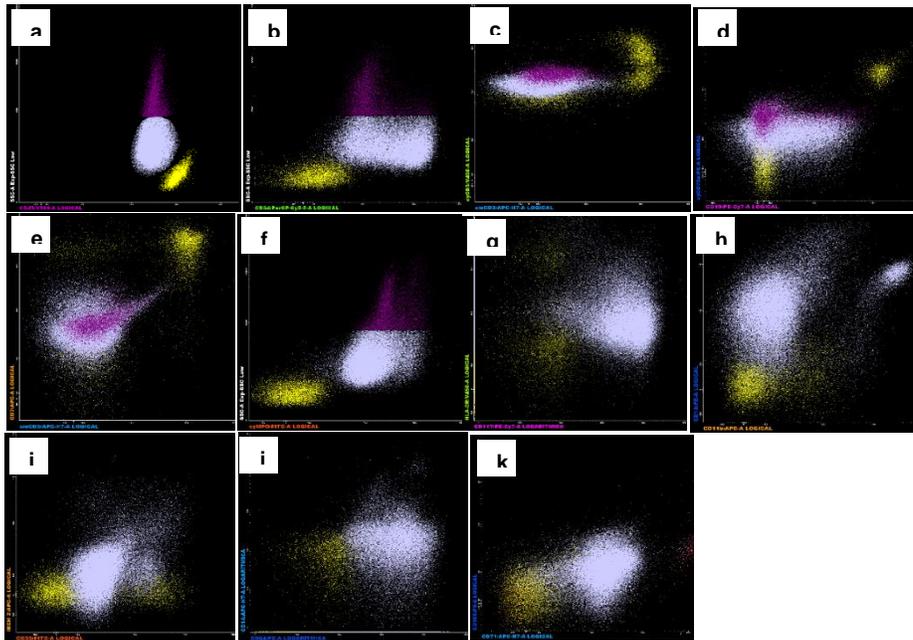


**Figura 32. Diagramas *dot plot* de una LLA Pre-B común.**

a) La población en color gris tenue es la población de blastos (baja expresión de CD45) y la población de linfocitos (alta expresión de CD45) se encuentra en amarillo, ambas poblaciones muestran baja complejidad. Las poblaciones que se encuentran arriba de la población de blastos y linfocitos son los granulocitos ya que presentan mayor complejidad. En el diagrama b) se muestra la positividad de los blastos para CD34; en c) se observa la positividad para CD19; d) los blastos no expresan el cyCD3 ni el suCD3, se puede comparar con la población de linfocitos los cuales si expresan dichos marcadores; e) la población de blastos no expresan el CD7; f) se puede notar que los blastos no presentan cyMPOx; g) se muestra la positividad para CD10; h) los blastos son positivos para CD38 y CD34; i) muestra que la población de blastos no expresan cyIgM, sulgM; j) se observa que son negativos para las cadenas  $\kappa$  y  $\lambda$ ; k) se muestra la positividad para CD10 y no expresan CD33 que se puede comparar con los neutrófilos los

cuales si expresan este Ag y se encuentran de color morado; l) la población es positiva para CD24; m) negativa para CD13; n) no expresan nuTdT; o) expresan CD81 pero no el CD21, en p) se observa la positividad para CD123 mientras que los linfocitos y los neutrófilos no expresan este marcador; q) no se muestra expresión para CD66c, y r) los blastos son negativos para CD15, al igual que los linfocitos que normalmente no expresan ese antígeno. *Imagen: Laboratorio de Citometría de Flujo, HIMFG.*

### Reporte de una LMA-M3



**Figura 33. Diagramas dot plot de una LMA-M3.**

a) Se muestra la población de linfocitos con una fuerte expresión de CD45 y baja complejidad (población en amarillo), la población en morado representa los granulocitos los cuales presentan mayor complejidad y una expresión de CD45 más baja que los linfocitos, debajo de los granulocitos se observa la población de células leucémicas (gris tenue), a comparación del caso de la figura 33, la población leucémica muestra mayor complejidad por los gránulos de los promielocitos: b) se puede notar que una parte de la población expresa el CD34 y la otra parte ya ha perdido este Ag, se puede comparar con los granulocitos los cuales ya no expresan este antígeno al igual que los linfocitos; c) se observa que la población leucémica no expresa en suCD3 ni el cyCD3, se puede comparar con la población de los granulocitos que se encuentran en la misma zona que la población de interés, ya que normalmente los granulocitos no expresan dichos Ag, además una población de linfocitos se encuentra también en el área negativa para dichos antígenos, estos linfocitos corresponden a los linfocitos B; d) se observa que la población no expresa en CD19 ni el cyCD79a, en la misma zona se encuentran los granulocitos y una población de linfocitos que corresponden a los de linaje T, otra población de linfocitos si expresa estos Ags normalmente y corresponden a los linfocitos B; e) se muestra que la población no presenta CD7 ni cyCD3 y se puede comparar con la población de granulocitos que se encuentra en la misma zona, una población de linfocitos si presentan dichos antígenos y corresponden a los linfocitos T; f) se observa que la población de interés presenta cyMPOx; g) la población expresa CD117; h) expresión de CD13; h) no expresa CD35 ni IREM-2; j) positividad para CD64; k) la población no expresa CD71 ni CD105, estos marcadores normalmente se expresan en los precursores eritroides tal como se muestra en este diagrama donde la población en rojo (precursores eritroides) expresan el CD71 y otra población, además de expresar este marcador expresa el CD105. *Imagen: Laboratorio de Citometría de Flujo, HIMFG.*