



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**



FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

HOSPITAL INFANTIL DEL ESTADO DE SONORA

**“ANTICUERPOS EN LEUCEMIA AGUDA LINFOBLÁSTICA OBTENIDOS CON
LA TÉCNICA EUROFLOW MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO EN EL
HOSPITAL INFANTIL DEL ESTADO DE SONORA DURANTE EL AÑO 2015-
2020”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA EN LA SUBESPECIALIDAD DE
ONCOLOGÍA PEDIÁTRICA**

PRESENTA:

DRA. LAVARA MIRANDA LUZ ADRIANA

Hermosillo, Sonora México

Marzo 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**



FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

HOSPITAL INFANTIL DEL ESTADO DE SONORA

**“ANTICUERPOS EN LEUCEMIA AGUDA LINFOBLÁSTICA OBTENIDOS CON
LA TÉCNICA EUROFLOW MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO EN EL
HOSPITAL INFANTIL DEL ESTADO DE SONORA DURANTE EL AÑO 2015-
2020”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA EN LA SUBESPECIALIDAD DE
ONCOLOGÍA PEDIÁTRICA**

PRESENTA:

DRA. LAVARA MIRANDA LUZ ADRIANA

**Dr. Héctor Manuel Esparza Ledezma
Director General HIES/HIMES**

**Dra. Alba Rocío Barraza León
Jefa de la Dirección de Enseñanza,
Investigación y Calidad**

**Dr. Gilberto Covarrubias Espinoza
Profesor titular de Oncología pediátrica**

**Dr. Homero Rendón García
Director de Tesis**

**Dra. Tania Clarisa Larios Farak
Asesor de Tesis**

Hermosillo, Sonora México

Marzo 2023

Dedicatorias

A mi familia por todo su amor y apoyo.

A mis maestros por su paciencia y guiar mis pasos.

A cada uno de los niños que he tenido el privilegio de conocer, principalmente a aquellos que se quedaron en el camino.

Índice

Abreviaturas	4
Resumen	5
Marco Teórico	7
Planteamiento del problema	18
Justificación del estudio	19
Pregunta de investigación	20
Objetivos	20
Material y métodos	21
Resultados	29
Discusión	34
Conclusiones	39
Limitaciones	40
Sugerencias y recomendaciones	41
Anexos	42
Bibliografía	43
Cuadro UNAM	47

Abreviaturas

AMO	Aspirado de médula ósea
CF	Citometría de flujo
DE	Desviación estándar
FAB	Federación Américo-Británica
EMR	Enfermedad Mínima Residual
Ig	Inmunoglobulina
LAL	Leucemia Aguda Linfoblástica
LCR	Líquido cefalorraquídeo
MPO	Mieloperoxidasa
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
SD	Desviación estándar

Resumen

Introducción: La Leucemia Aguda Linfoblástica (LAL) es la neoplasia hematológica maligna más frecuente en pediatría. La citometría de flujo (CF) es el método de elección para realizar la inmunofenotipificación al diagnóstico, definiendo patrones fenotípicos de normalidad y fenotipos aberrantes leucémicos, que son utilizadas para el seguimiento y evaluación de la respuesta al tratamiento a través de la detección de la enfermedad mínima residual (EMR). La CF con técnica EuroFlow consiste en la combinación de 8 anticuerpos que permite una orientación hacia el panel de caracterización celular con alta sensibilidad y especificidad. En el Hospital Infantil del Estado de Sonora la citometría de flujo se realiza con técnica EuroFlow, en nuestro país hasta el momento no existen reportes publicados acerca del empleo de esta técnica.

Objetivos: Determinar los anticuerpos en los pacientes con Leucemia Aguda Linfoblástica utilizando la técnica EuroFlow por citometría de flujo en el Hospital Infantil del Estado de Sonora durante los años 2015-2020.

Material y métodos: Se realizó un estudio transversal analítico y descriptivo, en pacientes con diagnóstico de LAL atendidos en el servicio de oncología del Hospital Infantil del Estado de Sonora durante el periodo de Enero de 2015 a Diciembre de 2020.

Resultados: Se revisaron 179 análisis de citometría de flujo de pacientes con edad media de 8 ± 5 años, con mayor frecuencia en hombres 58.1%. El grupo de riesgo más frecuente es el de Alto Riesgo en 67.6%. La presentación por inmunofenotipos correspondió a linaje B en 48%, preB en 38% y células T en 13%. La prueba de EMR fue positiva en 17% de los análisis al final de la inducción con un conteo celular $0.34 \pm 0.61\%$ y 21% pos inducción con un conteo celular de $0.14 \pm 0.22\%$. El mayor número de resultados de EMR positiva fueron en el grupo de alto riesgo en 22.89% y el inmunofenotipo T en 31.25%. Los resultados de EMR negativas fueron más frecuentes en el grupo de riesgo intermedio y en el Inmunofenotipo preB en 92.85% y en 84.37% respectivamente.

Conclusiones: La citometría de flujo es el método de elección para realizar la inmunofenotipificación y la detección de EMR. La técnica EuroFlow permite una orientación de linaje a través del tubo ALOT y posteriormente analizar la muestra con marcadores específicos de linaje, evitando el análisis innecesario de otros marcadores. Es necesario disponer de un equipo de citometría de flujo en las unidades médicas con atención a pacientes con neoplasias hematopoyéticas y contar con personal capacitado para realizar los estudios, obteniendo información útil para el pronóstico y seguimiento de la enfermedad.

Palabras Clave: Inmunofenotipo, EuroFlow, EMR, citometría de flujo.

Introducción

La Leucemia Aguda Linfoblástica (LAL) es la neoplasia hematológica maligna más frecuente en pediatría. Representa una cuarta parte de todos los cánceres infantiles y el 72% de todos los casos de leucemia infantil, con mayor incidencia entre los 2 y 5 años.¹ Afecta principalmente a la médula ósea (MO), con menos frecuencia también afecta a los tejidos extramedulares.

La Leucemia surge de eventos mutacionales de las células progenitoras hematopoyéticas tempranas, lo que lleva a la acumulación de células neoplásicas (blastos) que pierden la capacidad de diferenciación y maduración.

Analizando el perfil antigénico de los blastos, podemos representar su linaje celular de origen (mieloide, Linfoide de células B o T) y la etapa de diferenciación o madurez. El inmunofenotipo por citometría de flujo (CF) permite realizar esta caracterización de blastos.²

La enfermedad se puede clasificar en grupos de riesgo basado principalmente en las características clínicas y de las células leucémicas. Los avances terapéuticos y la posibilidad de dirigir el tratamiento de acuerdo al riesgo han permitido incrementar la sobrevida en las últimas 4 décadas del 10 al 80%.³

Una evaluación rigurosa del riesgo de recaída es fundamental para seleccionar una terapia que evite la toxicidad excesiva pero que mantenga una alta tasa de curación. El fracaso del tratamiento se debe principalmente a una dosificación inadecuada del fármaco más que a una resistencia intrínseca a los fármacos por parte de las células leucémicas.⁴

A través de la enfermedad mínima residual (EMR) es posible detectar a los pacientes con riesgo de recaída, así como la detección oportuna de una inminente recaída clínica.⁵ Uno de los métodos por lo que es posible realizar EMR es mediante la citometría de flujo.

Marco Teórico

La leucemia aguda linfoblástica es una neoplasia hematológica caracterizada por la proliferación desordenada de células linfoides que sufren mutaciones que serán transmitidas a todas sus descendientes, su característica es ser biológicamente inmadura.

Es la neoplasia maligna más comúnmente diagnosticada en los niños, representando casi un tercio de todos los cánceres pediátricos. La incidencia anual es cercana a 30 casos por millón de personas, con un incremento entre los 2 y 5 años de edad, con predominio en el sexo masculino⁶. En los Estados Unidos representa el 27% de la enfermedad maligna entre los niños menores de 15 años y se diagnostican entre 2000 y 2500 casos nuevos cada año.⁷

Aunque no hay consenso, se cree que la incidencia mundial es similar a la de los E.E.U.U. Tampoco es claro el comportamiento de su tendencia, en México se ha reportado un incremento de la morbilidad que se cree se debe a mejoría en el registro y clasificación de los datos.⁸

En el servicio de Oncología Pediátrica del Hospital Infantil del Estado de Sonora (HIES) la frecuencia detectada en neoplasias malignas es de 42% y es el cáncer diagnosticado con mayor frecuencia.

Los signos y síntomas generalmente no son específicos; se presentan como el resultado de la infiltración de las células leucémicas y la extensión de la enfermedad a nivel extramedular.

La presentación clínica puede incluir fiebre, dolor óseo, adenopatías, hepatomegalia, esplenomegalia, petequias o datos de sangrado, disnea secundaria a masa mediastinal, incluso con menor frecuencia, puede simular enfermedades autoinmunes como artritis reumatoide juvenil.^{1,9}

Las características encontradas por laboratorio son principalmente hematológicas como alteración de la cuenta de leucocitos, anemia y trombocitopenia. La lisis de las células leucémicas, la hematopoyesis inefectiva,

así como la infiltración hepática se asocian al incremento de Deshidrogenasa Láctica.

El diagnóstico se basa principalmente en la identificación morfológica de blastos mayor al 25% en el aspirado médula ósea.

Se clasifica de acuerdo a las características morfológicas de las células blásticas; se divide en L1, L2 y L3 como se muestra en la tabla I. (Federación Américo-Británica).

La leucemia aguda linfoblástica se puede clasificar por inmunofenotipo en células B y células T.¹ Cada grupo puede ser diferenciado por un marcaje de anticuerpos monoclonales, que pueden ser detectados por citometría de flujo (CF). Los anticuerpos monoclonales de los linfoblastos se pueden localizar en la superficie, núcleo y citoplasma de las células malignas y serán específicos de acuerdo a la etapa evolutiva en que sea detectada la leucemia con lo cual, se genera la clasificación inmunológica de la leucemia aguda linfoblástica (preB temprana, B, B transicional, B madura y de células T); la tabla II y la figura 1 muestran los anticuerpos monoclonales de la LAL y su frecuencia de expresión antigénica.

Tabla I. Características citológicas de la leucemia aguda linfoblástica.

Características Citológicas	L1	L2	L3
Tamaño de la célula	Pequeña	Grande y heterogénea	Grande y heterogénea
Cromatina Nuclear	Homogénea	Heterogénea y variable	Homogénea y fina
Núcleo	Regular indentado en forma ocasional	Irregular comúnmente indentado	Regular y ovalado
Nucléolos	No visibles o inconspicuo	Presentan más de uno y grandes	Prominentes y vesiculares
Cantidad de Citoplasma	Escaso	Variable y moderadamente abundante	Moderadamente abundante
Basofilia Citoplasmática	Leve a moderada rara vez intensa	Variable, algunos casos severa	Muy profunda
Vacuolas Citoplasmáticas	Negativas	Variable	Prominentes

Lanzkowski P. Manual of Pediatric Hematology and Oncology. Academic Press. Sixth Edition. 2016.

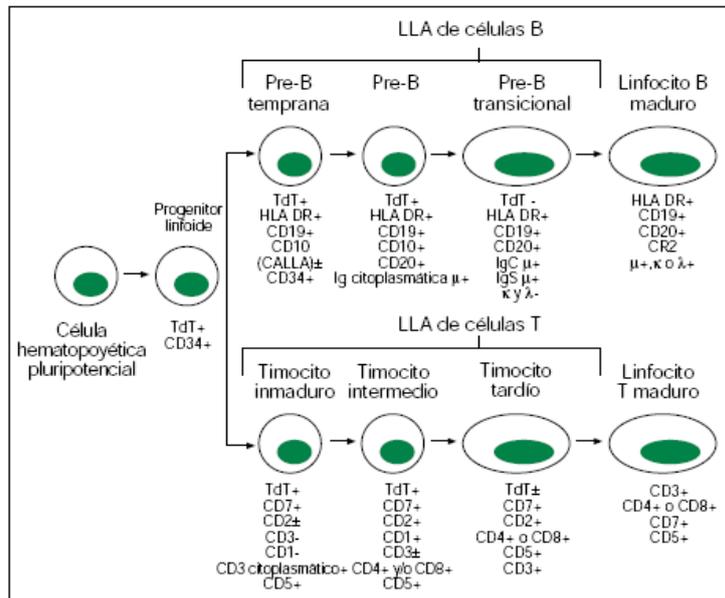


Figura 1. Anticuerpos monoclonales de las células linfoides en fase de maduración.
Fuente: Luis Madero López. Arturo Muñoz Villa. Hematología y Oncología Pediátrica 2 edición. 2005 editorial Ergon

Tabla II. Expresión antigénica en LAL (% de casos positivos)

INMUNOFENOTIPO SUBGRUPOS DE LAL											
SUBTIPO	CD19	CD22	CD7a	CD10	CD7	CD5	CD3	CIG	slg	slg κ OR λ	(%)
Pre-B Temprana	100	>95	>95	95	5	0	0	0	0	0	60–65
Pre-B	100	100	100	>95	0	<2	0	100	0	0	20–25
Pre-B Transicional	100	100	100	50	0	0	0	100	100	0	1–3
B	100	100	100	50	0	0	0	>95	>95	>95	2–3
T	<5	0	30	45	100	95	100	0	0	0	15–18

c, citoplásmica; clg μ, inmunoglobulina citoplásmica μ cadena; slg μ, inmunoglobulina superficie, μ cadena; slg κ o λ, inmunoglobulina superficie κ o λ cadena. Fuente: Pui Ching-Hou.2012 Leukemias.

La enfermedad se puede clasificar en grupos de riesgo basado principalmente en las características clínicas y las características de las células leucémicas. Se reconoce que ciertos factores del huésped ejercen una influencia crítica sobre la eficacia y la toxicidad del tratamiento. La mayoría de los grupos de colaborativos de estudio pediátricos clasifican a los pacientes en categorías de riesgo estándar, alto y muy alto.

Entre las características que se consideran para la clasificación de riesgo se encuentran principalmente la edad y la cuenta de leucocitos al diagnóstico.

La cuenta de leucocitos mayor a 50 000/mm³ está asociada a un pronóstico pobre, la cual se presenta en alrededor del 20% de los pacientes. Los niños con edad menor de 1 año o mayores de 10 años tienen un pronóstico más pobre comparado con niños entre 1 y 10 años.

Otras características como las alteraciones genéticas están asociadas con el resultado del tratamiento por ejemplo la hiperdiploidía y la translocación t(12;21) se asocian con un resultado favorable, mientras la hipodiploidía con menos de 44 cromosomas y el reordenamiento MLL se relacionan a un mal pronóstico.^{1,7,10,11}

Los avances terapéuticos y la posibilidad de dirigir el tratamiento de acuerdo con el riesgo han permitido incrementar la supervivencia en las últimas 4 décadas del 10 al 80%.³

El tratamiento se divide en diferentes fases, la primera es la inducción a la remisión con una duración entre 4 a 6 semanas y consiste en la combinación de drogas con distintos mecanismos de acción, los fármacos habitualmente utilizados son esteroides, vincristina, asparaginas y antraciclicos, alcanzando una remisión completa cerca de 95% los pacientes.⁹

Después de la inducción se administra la terapia de consolidación, el objetivo es erradicar las células leucémicas residuales. Se usan agentes citotóxicos y altas dosis de metotrexato, droga que juega un rol importante en la prevención de infiltración o recaídas a sitios santuarios (sistema nervioso central y testículos).

El mantenimiento es la fase más larga del tratamiento, con una duración aproximada de 1-2 años, los fármacos utilizados principalmente son la 6-mercaptopurina y el metotrexato, durante esta etapa se administra intensificaciones con drogas que usualmente se administran en la fase de inducción.

Durante las diferentes fases de tratamiento se hace uso de quimioterapia profiláctica para infiltración a sistema nervioso central, que consiste en agentes administrados vía intratecal o incluso el uso de radioterapia.

La respuesta a tratamiento es el indicador pronóstico más fuerte en la LAL, está se puede evaluar con la respuesta a la ventana esteroidea, la presencia de blastos mayor al 5% en la médula ósea en el día 14 de tratamiento y principalmente mediante la EMR al final de la inducción.^{9,12}

- **Enfermedad mínima residual**

La EMR tiene un potencial de aplicación en el manejo clínico de la LAL que incluye la identificación temprana de pacientes con alto riesgo de recaída y la detección oportuna de recaída clínica inminente. Puede demostrar la presencia de células leucémicas involucradas en el sistema nervioso central.⁵

Además, la EMR es un estudio de inmunofenotipificación que ha mostrado ser una herramienta confiable y útil para evaluar las muestras de médula ósea y sangre periférica cosechadas en trasplantes de células progenitoras hematopoyéticas, así como en la determinación de la eficacia de la purga.

Adicionalmente, un paciente que tiene niveles de ERM celular $>0.01\%$ en una muestra de médula ósea procesada por citometría de flujo tendrá un riesgo significativamente mayor de recaída que si los niveles son inferiores al 0.01% . Los datos también sugieren que cuanto mayor es el valor de EMR al final de la fase de inducción de la quimioterapia, mayor es el riesgo de recaída y menor la tasa de supervivencia.¹³ Por lo descrito anteriormente se considera a la enfermedad

mínima residual como el factor pronóstico independiente más importante en la leucemia linfoblástica aguda.^{14,7}

La evaluación de EMR no se usa solo para evaluar la respuesta al tratamiento y el riesgo de recaída durante la terapia estándar; tiene un valor pronóstico invaluable después de otras modalidades terapéuticas para la leucemia aguda, incluyendo trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas.

Existen tres tipos de técnicas que permiten la detección de la EMR: (a) inmunofenotipificación por citometría de flujo (CF); (b) identificación de aberraciones cromosómicas por prueba de reacción en cadena de polimerasa (PCR); y (c) detección de inmunoglobulina clon-específica y gen receptor de células T por amplificación de PCR. Las más utilizadas son por CF y PCR.¹⁵

- **Citometría de flujo**

La inmunofenotipificación por citometría se ha convertido en la técnica de elección, ya que es la única técnica que cumple los requisitos de alta velocidad, amplia aplicabilidad en el diagnóstico, además durante el seguimiento, da un enfoque preciso en la población de células malignas utilizando proteínas unidas a la membrana y proteínas intracelulares como dianas.¹⁶

Se prefiere una muestra de médula ósea (MO) a la sangre periférica para evaluar el inmunofenotipo en el momento del diagnóstico. La muestra de sangre periférica puede usarse en caso de que no se disponga de MO o en caso de la muestra sea deficiente en cantidad y/o calidad.¹⁷

La citometría de flujo es una técnica de análisis celular que mide las características de dispersión de luz y fluorescencia que poseen las células conforme pasan a través de un rayo de luz. Para su análisis por CF, las células deben encontrarse individualmente suspendidas en un fluido y se analizan prácticamente de manera directa. Las células pueden hacerse pasar a través del rayo de luz a muy altas velocidades (p.e. 100,000 células por segundo).

Al atravesar el rayo de luz, las células interaccionan con este causando dispersión de la luz; basándose en la difracción de la luz en sentido frontal, puede evaluarse el tamaño de las células que pasan y al medir la reflexión de la luz de manera lateral se determina la granularidad o complejidad de estas. Además de la dispersión de la luz, si previamente a su análisis se coloca a las células en presencia de anticuerpos monoclonales marcados con moléculas fluorescentes, se pueden evaluar que células poseen los antígenos complementarios a los anticuerpos monoclonales usados.¹⁸

A las células que serán examinadas se les acopla un fluorocromo, generalmente a través de un anticuerpo monoclonal que reconoce una estructura específica en la célula. Posteriormente, las células son suspendidas en el centro de un flujo de líquido isotónico que es impulsado a gran velocidad por un orificio estrecho y deben pasar a través de una fuente luminosa (láser) de forma secuencial. El láser, al incidir con cada célula, se desvía y este cambio de dirección es registrado por detectores especiales. Por otra parte, el reactivo fluorescente al ser excitado emite luz en una longitud de onda determinada (color) que es registrado por detectores colocados de forma perpendicular al rayo láser. Cada uno de los detectores del equipo ofrece una información que es convertida en impulsos eléctricos y posteriormente en códigos digitales que pueden ser visualizados a través de los programas de cómputo especializados. Fig. 2.¹⁸

En la actualidad existen equipos con diferentes detectores de fluorescencia, con los cuales pueden determinarse diferentes características que coexistan en determinadas poblaciones celulares.

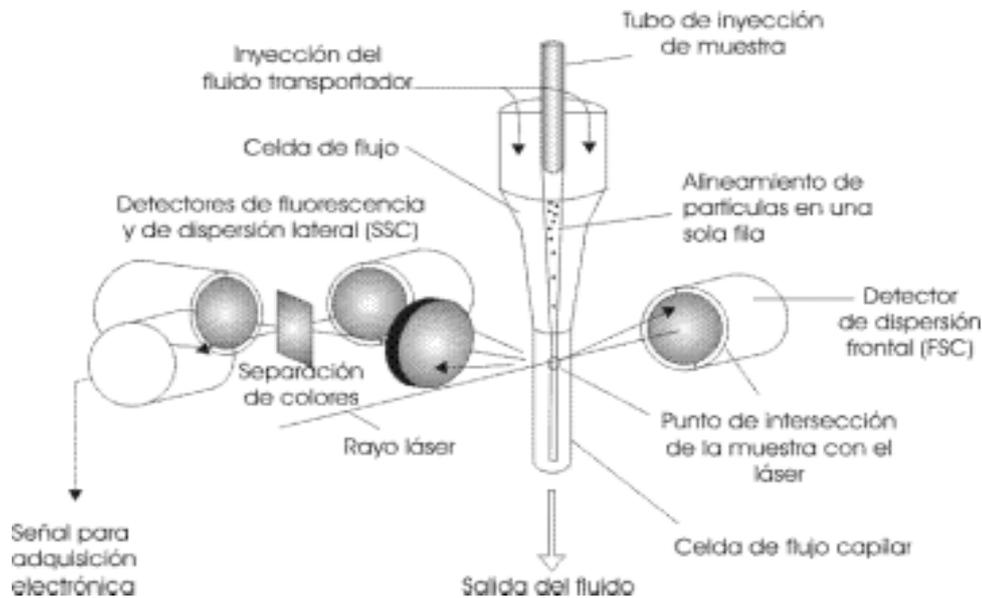


Figura 2. Principio general de la citometría de flujo

Fuente: Lourdes María Barrera Ramírez. Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratoria. México 2004.

Conociendo la información que aporta cada uno de los detectores de señal luminosa y teniendo en cuenta las necesidades del operador, se pueden elaborar histogramas con información de 1, 2 o más parámetros diferentes. La citometría de flujo es una técnica que permite un análisis celular multiparamétrico de forma rápida, sensible y específica. La disponibilidad de amplios paneles de reactivos de calidad facilita la aplicación de este método analítico en el diagnóstico, clasificación, evaluación pronóstica y valoración de enfermedad mínima residual. La citometría de flujo permite el análisis de un gran número de células (habitualmente entre 10,000 células por muestra, y más de un millón en los estudios de enfermedad mínima residual).¹⁹

La aplicación de la CF al análisis celular permite conocer aspectos físicos de la célula (tamaño y complejidad) y determinar la presencia o ausencia de determinados antígenos (habitualmente entre 3 y 4) en los diferentes compartimentos celulares (superficie celular, citoplasma, mitocondria, núcleo) lo

que contribuye a aumentar tanto la especificidad como la sensibilidad de la prueba. Esto ha determinado que en estos momentos la citometría de flujo sea una herramienta básica para el estudio de las hemopatías malignas por lo que se considera una práctica médica ampliamente aceptada.

La inmunofenotipificación permite una correcta clasificación de la gran mayoría de las leucemias, en más del 90% de los casos definiendo patrones fenotípicos de normalidad y fenotipos aberrantes leucémicos. Estos patrones fenotípicos aberrantes reflejan un patrón genético anormal presente en estas células leucémicas, características permitirán el seguimiento de la respuesta al tratamiento y el diseño de esquemas terapéuticos en función de este seguimiento (detección de EMR).²⁰

Para identificar tal patrón, se utilizan anticuerpos monoclonales dirigidos frente a antígenos específicos de línea: CD79a citoplásmico y CD19 en la definición de línea linfocitoide B; CD3 citoplásmico en la definición de línea linfocitoide T y Mieloperoxidasa (MPO) para la definición de línea mielocitoide. La utilización posterior de una batería más amplia de anticuerpos monoclonales permite establecer una subclasificación de las leucemias

El estudio de estos fenotipos aberrantes permite la detección de poblaciones leucémicas en un gran porcentaje de las neoplasias hematológicas y con un nivel de sensibilidad entre 0.01 y 0.001%, próximo al obtenido con otras técnicas más laboriosas, como la amplificación de PCR.

Se definen tres patrones fenotípicos aberrantes:

- A) *Infidelidad de línea*: presencia de un antígeno de una línea celular en una neoplasia de otra línea celular (por ejemplo, expresión de antígenos mielocitoses en una leucemia aguda linfoblástica de línea B o T).
- B) *Asincronismo madurativo*: coexistencia de dos o más antígenos no coincidentes en condiciones normales en una misma célula (por ejemplo, en los linfocitos B normales de sangre periférica los linfocitos B que expresan CD23 son aquellos que expresan más CD22; la diferenciación B normal de médula ósea se caracteriza por una pérdida progresiva del antígeno CD10 junto con un aumento en la expresión de CD20, existiendo ejemplos de LLA-línea B con blastos CD10 intensamente positivos con expresión de CD20).

C) *Sobreexpresión antigénica*: presencia de un antígeno existente en condiciones normales, pero con una intensidad mayor (los linfocitos B de sangre periférica expresan de forma heterogénea el antígeno CD5, mientras que en la LLC-B se observa una sobreexpresión de dicho antígeno).

La citometría de flujo presenta ciertas desventajas y ventajas.²¹ Algunas que deben ser cuidadosamente consideradas son las siguientes:

Desventajas:

1. Relativa baja sensibilidad al ser comparada con técnicas moleculares.
2. Problemas en la estandarización de los laboratorios ya que la realización de esta técnica es relativamente escasa y la poca experiencia en laboratorios limitan la validez y reproducibilidad de la prueba. Por ejemplo, en México no existen técnicas estandarizadas para definir el denominador del citómetro de flujo

Ventajas:

1. Aplicación universal,
2. Prueba de resultados rápidos
3. Costo diez veces menor que las técnicas de amplificación,
4. Alta sensibilidad con conteos celulares entre 5×10^6 a 1×10^7 .

La diferencia en la expresión antigénica en células blásticas y células progenitoras normales puede ser cualitativa o cuantitativa, o ambas.

Diferencias cualitativas son observadas en la combinación de inmunofenotipos expresados por la célula leucémica, algo que es extremadamente raro en médula ósea.

La identificación de diferencias cuantitativas en la expresión antigénica puede también ser útil para distinguir células leucémicas de las subclases de células normales, por ejemplo, la expresión en LAL de células B de CD10, CD19, y CD34 o sub-expresión de CD45 Y CD38 otros marcadores como CD45RA, CD11a y CD44 podrían sobre expresarse o sub expresión.

Para la LAL de células T, la combinación nuclear de TdT con marcadores citoplasmático CD3 y de superficie CD5 son altamente informativos.

La detección de EMR en LAL de células B usualmente es identificada con la expresión de CD19, CD10, CD34 y/o TdT, en tanto que entre 30 y 50% de los casos, otros marcadores útiles para detectar EMR son CD38, CD45 y CD22.^{2,21}

- **Citometría de flujo con técnica EuroFlow**

El Consorcio EuroFlow se formó en 2005 y los objetivos generales del proyecto fueron el desarrollo y estandarización de enfoques de citometría de flujo rápidos, precisos y altamente sensibles para el diagnóstico y subclasificación de neoplasias hematológicas, así como para la evaluación de la eficacia del tratamiento durante el seguimiento (EMR).^{16,22}

La técnica consiste en la combinación de 8 anticuerpos llamados marcadores de columna vertebral (Kit o tubo ALOT), diseñados por el consorcio EuroFlow, para la evaluación inicial de poblaciones de células inmaduras en muestras con sospecha de leucemia aguda. Esta combinación de anticuerpos permite una orientación adecuada hacia el panel de caracterización celular apropiado (células B, T o de linaje mieloide) con alta sensibilidad y especificidad.

Otros tubos contienen marcadores dirigidos a la caracterización de poblaciones celulares particulares (marcadores de caracterización) a los que se somete la muestra de acuerdo con linaje sospechado para valorar el grado de maduración.^{16,17,23}

Los paneles están diseñados de manera flexible para adaptarse a las necesidades de distintos laboratorios de diagnóstico y se pueden aplicar en uno o varios pasos secuenciales.²²

Planteamiento del problema

La sobrevivencia de los niños con leucemia aguda linfoblástica (LAL) se ha incrementado en las últimas décadas gracias a avances en el conocimiento de la historia natural de la enfermedad, a la generación de nuevos antineoplásicos, a la identificación de grupos de riesgo, así como a la aplicación de técnicas de la inmunología y biología molecular para el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad.¹ Se estima una sobrevivencia a 5 años de 90% en los países desarrollados, en México sobrevivencia es menor al 70% y representa el 50% de las defunciones totales por neoplasias malignas.

En el Hospital Infantil del Estado de Sonora (HIES) durante el periodo de 2008 a 2014 las Leucemias ocuparon el 46.8% de Neoplasias atendidas en el servicio de Oncología Pediátrica y representaron el 50% de las muertes.^{24.25}

En el HIES durante 5 años se realizaron con citómetro de flujo BD y técnica europea (EuroFlow) estudios de inmunofenotipificación, índice de DNA y Enfermedad Mínima Residual. Dicha técnica facilita al citometrista la realización e interpretación de los resultados con el objetivo de tener certeza en el diagnóstico inmunológico de la Leucemia Aguda.

En nuestro país no existen reportes publicados acerca del empleo de esta técnica. Una potencial explicación para ello es que su ejecución implicaba inicialmente costos económicos muy altos, debido a problemas de equipamiento y reactivos.

Por lo cual es necesario evaluar los resultados realizados durante este tiempo para identificar la inmunofenotipificación por citometría de flujo, en pacientes pediátricos que recibieron atención oncológica en el Hospital Infantil del Estado de Sonora durante el año 2015-2020.

Justificación del estudio

La inmunofenotipificación de Leucemia aguda Linfoblástica por citometría de flujo es un estudio de rutina realizado en el abordaje diagnóstico de procesos hematológicos malignos, en la actualidad diferentes métodos estandarizados se utilizan para llevar a cabo este proceso de inmunofenotipificación, lo cual permite dar seguimiento al estudio de enfermedad mínima residual que tiene implicaciones en el tratamiento y pronóstico de los pacientes con LAL.

Es importante reconocer la inmunofenotipificación realizada en la unidad de citometría de flujo del HIES, para evaluar los estándares de calidad de sus resultados y considerar si estos se encuentran dentro de los criterios internacionales de diagnóstico inmunológico de las LAL, de esta manera también se puede evaluar la variabilidad inmunológica de la leucemia residual lo cual tiene implicaciones en la supervivencia.

Los hallazgos del proyecto pueden generar información basal para sustentar futuras líneas de investigación sobre el tópico (p. e. terapéuticas, ensayos clínicos), tanto nivel local como nacional.

Pregunta de investigación

¿Cuáles son los anticuerpos en los pacientes con Leucemia Aguda Linfoblástica utilizando la técnica EuroFlow por citometría de flujo en el Hospital Infantil del Estado de Sonora durante los años 2015-2020?

Objetivos

- General

Determinar cuales son los anticuerpos presentes en los pacientes con Leucemia Aguda Linfoblástica utilizando la técnica EuroFlow por citometría de flujo en el hospital Infantil del Estado de Sonora durante los años 2015-2020.

- Específicos

1. Determinar los Inmunofenotipos de los pacientes con LAL de acuerdo a criterios Pre B temprana, Pre B, Pre B transicional, B y T.
2. Describir los anticuerpos de la Enfermedad Mínima Residual y la proporción de casos sin remisión inmuno-hematológica.
3. Identificar los inmunofenotipos aberrantes en las LAL con Enfermedad Mínima Residual positiva en el día 35 de haber iniciado la quimioterapia de inducción y subsecuentes por técnica de EuroFlow.
4. Analizar los factores clínicos pronósticos de los pacientes.

Material y métodos

1. Tipo de estudio

- Estudio transversal analítico y descriptivo.
- Universo de estudio: Pacientes menores de 18 años con diagnóstico histopatológico de LAL atendidos en el servicio de oncología del hospital Infantil del Estado de Sonora durante el periodo de Enero de 2015 a Diciembre de 2020.

2. Fuente de datos

La fuente de datos secundarios: Consta de hoja de recolección diseñado específicamente para el estudio, basado en consulta con expertos y literatura publicada en el que se registró la información socio demográfica y clínica, reportes de laboratorio clínico, oncológico y de replicación celular citometría de flujo y biología molecular.

3. Muestreo y tamaño de la muestra

Se obtuvo una muestra por conveniencia no probabilística de 179 estudios realizados por citometría de flujo en pacientes con diagnóstico de Leucemia Aguda Linfoblástica y seguimiento en el Hospital Infantil del Estado de Sonora durante el periodo de Enero de 2015 a Diciembre de 2020.

4. Sujetos de estudio

Criterios de inclusión

- Menores de 18 años independientemente de su lugar de procedencia o residencia.

- Diagnóstico de LAL establecido por el servicio de oncología del HIES. Criterio diagnóstico histopatológico: más de 25% de células blásticas catalogadas de acuerdo con la clasificación de la FAB como L1, L2 y L3
- Estudio por citometría de flujo evaluado por Técnica de EuroFlow.

b) Criterios de exclusión

- Pacientes con el diagnóstico de LAL que no cuenten con reporte de estudio realizado por Técnica EuroFlow en el Hospital Infantil del Estado de Sonora.

5. Plan de análisis estadístico

Se utilizaron expedientes clínicos de la muestra de pacientes con LAL menores de 17 años atendidos en el HIES, los cuales se vaciaron en una base de datos en el sistema EXCEL, de donde se obtuvo la información y se procedió a la realización de cuadros concentrados de información, con la finalidad de realizar gráficas y tablas. El análisis estadístico se llevó a cabo con medidas descriptivas, en búsqueda de relación estadística entre variables.

6. Procedimientos y diseño general

Se llevó a cabo un estudio transversal durante 5 años en pacientes menores de 18 años de edad con LAL diagnosticada mediante aspirado de médula ósea (AMO), el criterio diagnóstico morfológico de LAL fue la presencia de más de 25% de células blásticas, las cuales se catalogan como L1, L2 y L3 de acuerdo a los criterios de la FAB.

Los sujetos de estudio se agruparon de acuerdo a los factores pronósticos de la LAL (ver tabla II) y se les solicitó inmunofenotipo por citometría de flujo y citogenética al inicio de tratamiento.

En este estudio se evalúa el apartado de citometría de Flujo realizada por Técnica de EuroFlow para determinar inmunofenotipo. Adicionalmente se

determinó EMR en el día 35 de haber iniciado tratamiento (final de la inducción) con muestra de médula ósea o en algunos casos, como los pacientes que tiene una primera EMR positiva se realizó un nuevo estudio posterior a la inducción.

La muestra de médula ósea fue tomada bajo técnica estéril, por médico oncólogo, se aspiró una muestra de 4 ml de médula ósea usando Trocar tipo Osgood de calibre 16 o 18 en una jeringa de 10 ml, colocada en tubo Vacutainer bañado con EDTA 7.5 m. La muestra fue procesada con Técnica EuroFlow en un laboratorio destinado a estudios por citometría de flujo dentro de las instalaciones del Hospital Infantil del Estado de Sonora. En el caso de EMR se consideró el primer reporte de inmunofenotipo realizado a ingreso del paciente que permite definir el linaje de la leucemia aguda linfoblástica (Tabla II), con un conteo mínimo de 100 000 células mononucleares en la búsqueda intencionada de inmunofenotipos aberrantes persistentes en combinación de tres o cuatro marcadores como lo muestra la tabla III.

Tabla III. Inmunofenotipos aberrantes en leucemia aguda linfoblástica.

Linaje de células	Combinación de Marcadores	Aplicabilidad, %
LAL linaje T	Tdt/CD5/CD3/(CD19/CD33/HLA-DR	92
	CD34/CD5/CD3/(CD19/CD33/HLA-DR	21
LAL linaje B	CD19/CD34/CD10/CD38	52
	CD19/CD34/CD10/CD58	49
	CD19/CD34/CD10/CD45	47
	CD19/CD34/CD10/TdT	43
	CD19/CD34/CD10/CD66C	31
	CD19/CD34/TdT/IgM	17
	CD19/CD34/CD10/CD22	11
	CD19/CD34/CD10/CD13	10
	CD19/CD34/CD10/CD15	10
	CD19/CD34/CD10/CD21	6
	CD19/CD34/CD10/CD33	6
	CD19/CD34/CD10/CDNG2	5
	CD19/CD34/CD10/CD65	4

Fuente: (Campana D y cols. 2004)

Una vez detectados los inmunofenotipos aberrantes se determinó la cantidad de células leucémicas residuales detectadas por citometría de flujo en la muestra de médula ósea, agrupándose de acuerdo con el porcentaje de células detectadas como persistentes, para lo cual se considera EMR negativa menor a 0.01% células mononucleares con expresión de antígenos aberrantes y positiva mayor a 0.01% de células mononucleares con antígenos aberrantes.

7. Procesamiento de muestra con Técnica EuroFlow

- Protocolo ALOT

Marcación de superficie e intracitoplasmática combinadas

1. Agregar el volumen correspondiente de cada marcador de superficie, según los paneles recomendados por EuroFlow y de ser necesario, utilizar Facs Flow (BD) para completar el volumen final a 100µl para cada tubo. Mezclar bien.
2. Posterior a incubar por 30 minutos a temperatura ambiente sin exponer a la luz, agregar 2 ml de Facs Flow al precipitado. Mezclar bien.
3. Centrifugar por 5 minutos a 1500 revoluciones por minuto (rpm)
4. Descartar el sobrenadante utilizando pipeta pasteur sin levantar el precipitado o botón, dejando aproximadamente 50 µl residuales en cada tubo
5. Resuspender el precipitado mezclando suavemente y agregar 100µl del reactivo A (solución de permeabilización BD intrasure kit).
6. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente y sin exponer a la luz y agregar 2 ml de solución 1X de Facs lysing (dilución 1:10)
7. Mezclar bien, incubar 10 minutos a temperatura ambiente y sin exponer a la luz y centrifugar a 1500 rpm por 5 min
8. Descartar el sobrenadante utilizando pipeta Pasteur, sin levantar el precipitado o botón, dejando aproximadamente 50 µl residuales en cada tubo

9. Resuspender el precipitado mezclando suavemente
10. Agregar 50µl del reactivo B (solución de permeabilización BD intrasure kit). Mezclar bien.
11. Agregar el volumen adecuado de marcadores intracitoplasmático. Mezclar bien.
12. Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente y sin exponer a la luz.
13. Agregar 2 ml de Facs Flow al precipitado. Mezclar bien.
14. Centrifugar a 1500 rpm por 5 min. Descartar el sobrenadante utilizando pipeta Pasteur, sin levantar el precipitado o botón, dejando aproximadamente 50 µl residuales en cada tubo.
15. Resuspender las células en 200µl de Facs Flow.
16. Adquirir las células de forma inmediata o conservarlas a 4 °C por un máximo de una hora.

- **Procesamiento de la muestra para determinación de la Enfermedad Mínima Residual por Citometría de Flujo**

1. Se realizó el conteo celular para conocer tanto la cantidad y proporción de las poblaciones celulares que componen la muestra.
2. Se ajustó al equipo para efectuar un conteo mínimo de 1 millón de células mononucleares.
3. Al conteo de células mononucleares, se agregó 50 ul de muestra por tubo y 20µl de cada marcador y se incubo 20 min en la oscuridad a temperatura ambiente.
A la anterior mezcla se le agregan 2mL de lisante (diluido 1:10 con agua tridestilada filtrada) a cada tubo y se deja reposar a temperatura ambiente por 10 minutos en oscuridad.
4. Se centrifuga por 5 minutos.
5. Posteriormente se decanta, eliminando el sobrenadante y se agregan 2 ml de Facs Flow a cada tubo. Esta mezcla se centrifuga y decanta.
6. Finalmente se agregan 250µl de formaldehido diluido al 2%.

7. Esta mezcla se guardó en refrigeración hasta su adquisición en citómetro.

- **Procesamiento de las muestras para marcadores citoplásmicos**

A las muestras de pacientes para detectar los anticuerpos intracitoplasmáticos de las células leucémicas, se les realizó el siguiente procedimiento:

1. Colocar 50µl de la muestra en tubo de poliestireno.
2. Adicionar 100µl de fijador (reactivo intraprep BD) agitar vigorosamente.
3. Incubar a Temperatura ambiente.
4. Adicionar 4µl de Facs Flow (BD) y centrifugar 5 minutos.
5. Aspirar sobrenadante.
6. Adicionar 100µl de permeabilizante (reactivo 2 intraprep) se incubar 5 minutos.
7. Agitar vortez a baja velocidad 2 segundos.
8. Adicionar los anticuerpos seleccionados.
9. Incubar a T ambiente 15 minutos.
10. Adicional 4ml de Facs Flow y centrifugar 5 minutos a 500g.
11. Aspirar el sobrenadante.
12. Resuspender en 500µl de formaldehido al 0.5% para analizar en el citómetro.

Nota: Facs Flow (Beckton Dickinson): solución utilizada para mantener estable la estructura celular, se prepara con 0.5 % de albúmina bovina.

8. Definición de variables

Variable	Concepto	Medición	Escala	Fuente
Edad	Medición de tiempo de vida de un sujeto desde su nacimiento hasta el momento del estudio	Años cumplidos de vida	Cuantitativa continua	Cuestionario
Sexo	Condición de un organismo que distingue entre masculino y femenino	Genero	Cualitativa nominal 1= Femenino 2= masculino	Cuestionario Archivo
Enfermedad mínima residual	Medición por citometría de flujo del conteo mínimo de 100000 células monoclonales	Porcentaje de blastos en la médula ósea.	Dicotómica: Positiva (>0.01%) Negativa (>0.01%)	Reporte de laboratorio Archivo
Inmunofenotipo	Tipo de Linaje B o T en proliferación y estado de maduración.	Detección de anticuerpos monoclonales de superficie T o B por citometría de flujo.	Cualitativa nominal 0= Pre B 1= B transicional 2= B 3= T	Reporte de laboratorio Archivo
Grupo de Riesgo	Clasificación de acuerdo con factores biológicos y paraclínicos establecidos para determinar el riesgo de recaída o mala respuesta a tratamiento.	Clasificación por Riesgo	Cualitativa nominal 1= Bajo riesgo 2= Riesgo Habitual 3= Riesgo intermedio 4= Alto Riesgo 5= Muy alto Riesgo	Archivo
Viabilidad Celular	Discriminar entre células viables (vivas) y no viables (muertas)	Porcentaje de células vivas en muestra de médula ósea para realizar estudio en citómetro de flujo.	Cuantitativa discreta 1= >80% 2= <=79.9%	Reporte de laboratorio Archivo
Cluster de Diferenciación	Anticuerpos monoclonales de diferenciación detectados en la superficie de las células monoclonales que definen tipo de linaje.	Anticuerpo detectado por citometría de flujo.	Cualitativa nominal Positivo Negativo Débil positivo Débil negativo	Reporte de laboratorio Archivo
Leucocitos	Células que se producen en médula ósea y se encuentran en sangre y tejidos linfoides	Número de leucocitos en una muestra de médula ósea.	Cuantitativa continua	Reporte de laboratorio

9. Cronograma de actividades

Cronograma de actividades								
Actividades	Año 2021			Año 2022			Año 2023	
	Junio-Julio	Agosto-Septiembre	Octubre-Diciembre	Enero-Marzo	Abril-Julio	Agosto-Noviembre	Enero-Febrero	Marzo
Protocolo de estudio	X	X						
Recolección de datos			X					
Análisis estadístico				X	X	X		
Conclusiones							X	
Entrega de tesis								X

Resultados

Se revisaron 179 análisis de citometría de flujo que incluyeron pacientes con edad entre 1 a 17 años, la edad media fue de 8 ± 5 años con mayor frecuencia de pacientes de sexo masculino en 58.1%.

La caracterización por grupo de riesgo incluyó con mayor frecuencia a los casos de Alto Riesgo en 67.6%. Respecto a la cuenta de leucocitos al diagnóstico el 63% de los casos presentaron menos de $49\ 000\text{mm}^3$ leucocitos en sangre periférica. Los inmunofenotipos más frecuentes fueron los de células B en 48% y preB en 38%, mientras el 13% de las leucemias correspondieron a linaje de células T.

La prueba de enfermedad mínima residual (EMR) positivas al final de la inducción y pos inducción se registraron con 17% y 21% respectivamente con un conteo celular de linfoblastos de $0.34 \pm 0.61\%$ de células en los casos positivos al final de la inducción y en los casos pos inducción $0.14 \pm 0.22\%$ de células. La viabilidad celular de las muestras presento una media $89.93\% \pm 5.04$ (Tabla IV).

Las tablas V y VI muestran los anticuerpos con marcaje débil positivo, positivo y negativo del tubo ALOT basado en la técnica EuroFlow, reporte de LAL B y LAL T.

Tabla IV. Características clínicas de pacientes con Leucemia Aguda Linfoblástica estudiados por citometría de Flujo con técnica EuroFlow HIES 2022.			
		N	%
SEXO	FEMENINO	75	41.9
	MASCULINO	104	58.1
	TOTAL	179	100%
GRUPO DE RIESGO	BAJO RIESGO	7	3.91
	RIESGO HABITUAL	12	6.7
	RIESGO INTERMEDIO	18	10.06
	ALTO RIESGO	121	67.6
	MUY ALTO RIESGO	21	11.73
	TOTAL	179	100
LEUCOCITOS	< 49 999MIL	112	62.57
	50 000 - 99 999	40	22.35
	> 100 MIL	27	15.08
	TOTAL	179	100
CITOMETRIA			
INMUNOFENOTIPO	PRE B	68	38
	B TRANSICIONAL	1	0.6
	B	87	48.6
	T	23	12.8
	TOTAL	179	100
*EMR DIA 35			
POSITIVA	> 0.01%	8	17
NEGATIVA	<0.01%	39	83
	TOTAL	47	100
*EMR > 35 DÍAS			
POSITIVA	> 0.01%	18	21
NEGATIVA	<0.01%	64	79
	TOTAL	81	100

* Enfermedad mínima Residual

Tabla V. Anticuerpos reportados en pacientes con LAL B por citometría de flujo Técnica EuroFlow tubo ALOT . HIES 2022.						
ANTICUERPO	*POSITIVO		NEGATIVO		POSITIVO	
	n	%	n	%	n	%
CyCD3	13	20.9	43	69.35	6	9.67
CD45	153	95.6	0	0	7	4.37
MPO	0	0	47	100	0	0
CD79a	8	12.6	8	12.6	47	74.6
CD34	34	23.12	10	6.99	103	72.02
CD19	67	45.27	7	4.72	74	50
CD7	14	21.87	43	67.1	7	10.9
smCD3	12	19.6	45	73.7	4	6.5

* DEBIL

Tabla VI. Anticuerpos reportados en pacientes con LAL T por citometria de flujo con Técnica EuroFlow tubo ALOT. HIES 2022.						
ANTICUERPO	*POSITIVO		NEGATIVO		POSITIVO	
	n	%	n	%	n	%
cyCD3	13	22.4	3	13.6	6	27.2
CD45	23	100	0	0	0	0
CyMPO	0	0	7	100	0	0
cyCD79	1	14.2	6	85.71	0	0
CD34	2	28.5	5	71.42	0	0
CD19	1	14.2	6	85.71	0	0
CD7	13	56.52	3	13.04	7	30.43
smCD3	11	52.38	6	28.57	4	19.04

* DEBIL

El registro de anticuerpos con técnica EuroFlow reportados como débil positivo, positivos y negativos para inmunofenotipo B (PreB, B transicional y B) y T se muestra en las tablas VII y VIII, donde podemos observar cuales son los anticuerpos más frecuentes. De los 68 pacientes con inmunofenotipo PreB se encuentran principalmente positivos CD38 (49 casos) y CD81 (45 casos), entre los anticuerpos débiles positivos los más frecuentes fueron CD20 (37 casos) y CD 9 (34 casos), así mismo se observa que la mayoría son negativos para CD15 (54 casos). El único caso registrado como B transicional fue positivo a CD10, CD66c, CD38, CD22, CD 123 y CD 81 negativo a CD117, débil positivo a nuTdT y smIgλ. En pacientes con inmunofenotipo B (87 pacientes), predominando CD9 débil positivo (63 casos), CD38 positivo (61 casos) y CD15 negativo (71 casos).

Tabla VII. Anticuerpos presentes en Inmunofenotipo por Técnica EuroFlow de citometría de flujo panel B. HIES 2022											
ANTICUERPO	PREB				ANTICUERPO	B TRANSICIONAL		ANTICUERPO	INMUNOFENOTIPO B		
	* POSITIVO	* NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO		* POSITIVO	NEGATIVO		* POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
CD20	37	0	18	4	CD20	0	1	CD20	36	37	4
CD58	19	0	33	7	CD58	0	1	CD58	10	62	5
CD10	16	0	29	12	CD10	0	0	CD10	15	56	6
CD66c	17	0	1	40	CD66c	0	0	CD66c	39	6	35
CD38	10	0	1	49	CD38	0	0	CD38	21	0	61
SmlgK	1	0	34	0	SmlgK	0	1	SmlgK	1	4	0
CylgM	11	0	27	2	CylgM	1	0	CylgM	2	8	5
CD33	21	0	30	4	CD33	1	0	CD33	31	27	1
smlgM/CD117	13	0	17	5	smlgM/CD117	0	1	smlgM/CD117	2	3	2
smlgλ	19	0	5	10	smlgλ	1	0	smlgλ	4	1	2
CD9	34	2	3	21	CD9	1	0	CD9	63	6	12
nuTdT	18	0	11	7	nuTdT	1	0	nuTdT	4	5	1
CD13	9	0	27	1	CD13	1	0	CD13	4	7	1
CD22	17	0	1	26	CD22	0	0	CD22	8	2	15
CD24	11	0	1	30	CD24	1	0	CD24	4	2	8
CD21	11	0	24	0	CD21	0	1	CD21	4	3	0
CD15	0	0	54	0	CD15	0	1	CD15	2	71	0
CD123	20	1	6	26	CD123	0	0	CD123	44	6	10
CD81	10	0	0	45	CD81	0	0	CD81	25	3	42
Total	294	3	322	289	Total	7	6	Total	319	309	210

* Débil

Tabla VIII. Anticuerpos por Técnica EuroFlow de citometría de flujo panel T. HIES 2022.			
ANTICUERPO	* POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
NuTDT	10	6	4
CD99	5	10	8
CD5	15	4	4
CD10	5	13	5
CD1a	13	9	1
CD2	14	8	1
CD117	11	8	1
CD4	17	6	0
CD8	13	7	3
Total	103	71	27

* Débil

La Tabla IX muestra los resultados de las pruebas de EMR realizadas por citometría de flujo con técnica EuroFlow de acuerdo con el grupo de riesgo y linaje. Los grupos de riesgo y linaje que tienen el mayor número de resultados de EMR positivos son el grupo de alto riesgo (22.89%) y el inmunofenotipo T (31.25%). Los resultados de EMR negativa predominan en el grupo de riesgo intermedio (92.85%) y en Inmunofenotipo Pre B (84.37%).

Tabla IX. Resultados de EMR en pacientes con Leucemia aguda linfoblástica de acuerdo con los grupos de riesgo e inmunofenotipo. HIES 2022				
GRUPO DE RIESGO	EMR POSITIVA		EMR NEGATIVA	
	n	%	n	%
BAJO RIESGO	1	14.2	6	85.71
HABITUAL	2	20	8	80
INTERMEDIO	1	7.14	13	92.85
ALTO RIESGO	19	22.89	64	76.8
MUY ALTO RIESGO	3	20	12	79.92
INMUNOFENOTIPO				
	n	%	n	%
PRE B	5	15.62	27	84.37
B	16	19.75	65	80.24
T	5	31.25	11	68.75

Discusión

Los inmunofenotipos de pacientes con Leucemia Aguda Linfoblástica obtenidos con la técnica EuroFlow reportaron inmunofenotipo de células B en 87.2% (incluyendo células B, Pre-B y B transicional), el resto corresponde a inmunofenotipo T. Estos resultados son similares a los porcentajes que se encontraron en la bibliografía, donde se describe que el 85% pertenece a precursores de células B y el 15% a precursores linfoides de células T.^{1,9}

Los paneles de citometría de flujo EuroFlow contienen prácticamente todos los marcadores clásicos recomendados por la OMS y por el consenso AIEOP-BFM para la asignación de linaje. Se sugiere el uso de CD19, CD10, CD22 y CyCD79a para identificar las neoplasias derivadas de células B; CD3 y CD7 para las neoplasias de linaje T; mientras que los marcadores como MPO, CD33, CD13, CD64, CD65 y CD117 son utilizados para asignar el extirpe celular de tipo mieloide. El tubo ALOT utilizado en este estudio para orientar el linaje celular estuvo conformado por CyCD3, CD45, MPO, CD79a, CD34, CD19, CD7 y SmCD3.^{17, 26, 27, 28}

Las guías de AIEOP- BFM 2016 también recomienda algunos marcadores que están asociados a lesiones genéticas o subtipos clínicos que impactan en el pronóstico de la enfermedad, entre ellos se encuentra CD123 (hiperdiploidía), CD66c (hiperdiploidía, BCR/ABL), NG2 (reordenamiento MLL), CRLF-2 (reordenamiento CRLF-2), falta de positividad para CD44 (TEL/AML1; LLA-B madura con translocación de MYC), sin embargo aún no se establece el uso de estos marcadores para la evaluación inicial de las lesiones genéticas por lo que su uso se sugiere de manera opcional.¹⁷

La selección de los anticuerpos del tubo ALOT utilizados para orientar la asignación de inmunofenotipo, depende de la especificidad asociada a linaje y la sensibilidad de los antígenos reconocidos. Se considera que un marcador de orientación ideal es expresado constantemente por todas las células de un solo

linaje, pero no muestra reactividad de linaje cruzado. A excepción de CyCD3 que es exclusivo de inmunofenotipo T, existen muy pocos antígenos específicos.

El tubo ALOT incluye la evaluación de CD45 y CD34, que son los marcadores que se encontraron con mayor frecuencia en las muestras, ambos marcadores son útiles para establecer el grado de diferenciación celular. El marcador CD45 se expresa en la superficie celular de todas las células hematopoyéticas, incrementando su densidad en los estadios finales de la hematopoyesis, mientras que CD34 se encuentra en los estadios tempranos de maduración celular, lo que corrobora que las células estudiadas son células inmaduras y de origen hematopoyético.

Existen otros marcadores de inmadurez celular entre ellos deoxinucleotidiltransferasa terminal (TdT) y CD117 (c-kit). Algunos marcadores como CD38 y HLA-DR pueden estar expresados sobre los precursores linfoides y mieloides, pero también en células maduras; mientras CD117 puede estar expresado también en células de origen no hematopoyético, como son los melanocitos.^{26, 27} En este caso CD117 y TdT no están incluidos en el tubo ALOT, sin embargo, están incluidos tanto en el Panel B como en el T.

En relación con las leucemias de linaje T, el tubo ALOT coincide en el predominio de expresión de CD3 citoplasmático y/o de superficie acompañado de una alta expresión de antígeno CD7. La presencia del antígeno CD3 (citoplásmico y de superficie) asociado a otros marcadores como CD2, CD7 y CD5 define el linaje, sin embargo, se debe considerar que estos últimos tres marcadores son sensibles, pero no específicos, por ejemplo, CD2 y CD7 se pueden expresar en

precursores mieloides, mientras CD5 se expresa en una subpoblación de células B maduras y se expresa de manera parcial en menos del 75% de los blastos.

Los anticuerpos CD2, CD3 y CD5 son marcadores de linaje T, CD4 y CD8 están asociados a células con mayor grado de diferenciación y por lo tanto tienen mayor relevancia clínica en la clasificación de neoplasias linfoides de células T

maduras; CD1a es un marcador de inmadurez en células T. CD117 es un marcador asociado a linaje mieloide y rara vez se observa en LLA.^{26, 27, 28}

En el tubo ALOT para orientar a la identificación de células B es fundamental evaluar CD19, el cual se expresa fuertemente y debe estar asociado a otros antígenos como CD79a, CD22 o CD10 para determinar el linaje. En los resultados obtenidos de las muestras analizadas con linaje de células B los marcadores que predominantes fueron CD19 y CyC79. El marcador cyCD79 se expresa en precursores de células B, células plasmáticas y, de manera variable, en las células B maduras, en casos raros se puede expresar en leucemias de inmunofenotipo T, su uso clínico está dirigido a identificar LLA de células B y diferenciar los subtipos de linfomas de células B maduras.^{26, 28}

De acuerdo al análisis del panel B en las leucemias de células Pre B los marcadores dominantes fueron CD19 y CD79 (Las células Pre B solo expresan CD19 y CD79a); en las leucemias con inmunofenotipo B transicional se expresaron principalmente los marcadores CD10, cyCD79 y CD19 que concuerda con la bibliografía; en el Inmunofenotipo B se observó un incremento en la expresión de CD20, disminuyendo CD10 y se expresaron algunas inmunoglobulinas, de acuerdo a los datos encontrados en la literatura los inmunofenotipos B expresan cadenas m citoplásmicas (usualmente junto con CD20 y después de perder el CD10), mientras las células B maduras exhiben inmunoglobulinas en la superficie y antígeno CD20.²⁷

Es necesario evaluar más de un antígeno asociado a células B como CD19, CD22 o CD79 ya que algunas poblaciones de células B son negativas para CD20 (por ejemplo después de la terapia con Rituximab anti-CD20) o carecen de inmunoglobulina de superficie demostrable.²⁹

Entre los hallazgos más relevantes en el análisis del panel B se encuentra la expresión de CD66c, el cual se presenta en niveles más altos en los pacientes con LLA de estirpe B que coexpresan el gen de fusión positivo para *BCR-ABL1*, asociándose con baja respuesta al tratamiento y disminución de la supervivencia de los pacientes.¹⁷ Otros marcadores frecuentes son CD38 CD81,

CD24 y CD22, todos ellos están asociados a linaje B en diferentes estadios de maduración celular, CD38 y CD45 se pueden utilizar en conjunto para identificar células plasmáticas y dar seguimiento a otras neoplasias hematopoyéticas.²⁶

En la leucemia mieloide los antígenos que definen el linaje son la MPO citoplásmica, el antígeno CD13 y el CD117, sin embargo, CD13 y CD33 se pueden utilizar para demostrar aberraciones. En este estudio, de los 47 casos (26.26%) en los que se realizó MPO ninguno resultó positivo, por lo que se descarta la presencia de inmunofenotipo mixto (dos formas de leucemia aguda combinada: leucemia mieloide y linfoide).²⁷

La valoración de la respuesta al tratamiento al final de la inducción se lleva a cabo mediante la EMR. Se refiere una remisión completa en el 95% de los pacientes que completan la fase de inducción a la remisión con un esquema multidroga basado en vincristina, asparagina, esteroide y antraciclicos.⁹ El porcentaje de casos que tuvieron una remisión completa se reportó en 82.92% al final de la inducción, este resultado se encuentra por debajo de lo estimado de acuerdo con la bibliografía consultada, es importante destacar que los grupos de alto riesgo y muy alto riesgo son los grupos con menor porcentaje de EMR negativa (76.8 y 79.92% respectivamente) y el inmunofenotipo T fue negativo solo en 68.78%, mientras el resto de inmunofenotipos tuvieron remisión por arriba del 80%.

El riesgo de fracaso del tratamiento y muerte es de 3 a 5 veces mayor en los niños con niveles de enfermedad mínima residual de 0.01% o más, al final de la terapia de inducción, la intensificación de la quimioterapia en pacientes con EMR positiva mejora la respuesta al tratamiento.¹⁰

En el seguimiento de la EMR es de considerar rastreo de anticuerpo CD66c en relación a BCR ABL1 o a EMR + persistente, lo cual, puede ser monitorizado en inmunofenotipo positivo y expresión genética de genes de fusión positivos.

En general los casos que presentaron una remisión completa posterior a la fase de inducción fueron de 79.01%, sin embargo, no se consideraron algunas

características de relevancia clínica para el pronóstico como EMR positiva persistente a lo largo del tratamiento o pacientes con recaída a medula ósea.

La importancia de la correcta asignación de grupo de riesgo se basa en que los grupos de alto y muy alto riesgo tiene mayor probabilidad de que la enfermedad no responda al tratamiento o que esta reaparezca luego de contar con una EMR negativa (recaída). La estadificación por riesgos nos permite administrar quimioterapia más intensiva a aquellos pacientes que tienen más probabilidad de no responder a tratamiento, mientras que se utiliza quimioterapia menos intensiva, y por lo tanto menos toxica en aquellos que tienen mejor respuesta a tratamiento.

De acuerdo con las estadísticas encontradas el porcentaje de pacientes estadificados en riesgo bajo e intermedio corresponde al 50% aproximadamente, sin embargo, en este estudio encontramos que el 79.33% de los pacientes están estadificados en alto y muy alto riesgo, es decir, la población estudiada presenta por lo menos alguna característica de mal pronóstico.^{10, 30}

Todos los pacientes de este estudio con inmunofenotipo T están clasificados en los grupos de alto y muy alto riesgo, históricamente se describe a los pacientes con leucemias de linaje T con un pronóstico más sombrío el cual ha mejorado al usar quimioterapia más intensiva logrando una tasa de supervivencia libre de recaídas (SLR) de 60 % al 70 %, este inmunofenotipo se caracteriza por una resistencia relativa a diferentes clases de fármacos incluyendo el esteroide, en comparación con los pacientes de linaje B; además se asocia a infiltración a SNC, masa mediastinal e hiperleucocitosis. El grupo BFM hace referencia a mayor lentitud en la eliminación de la EMR en los pacientes con inmunofenotipo T.^{4, 31, 32}

Conclusiones

Se ha descrito una mejoría en la supervivencia en los niños con LAL, esto se relaciona a las innovaciones en el tratamiento, así como a la clasificación por grupos de riesgo de enfermedad que nos permite dirigir la quimioterapia de acuerdo con las características clínicas, citogenéticas y por laboratorio que presentan los pacientes al diagnóstico.

La inmunofenotipificación y la EMR son indispensables para realizar esta clasificación y dirigir la terapia, así como la EMR es el principal factor pronóstico independiente en la LAL.

El uso de la citometría de flujo nos permite realizar ambos estudios. La técnica EuroFlow utiliza un tubo inicial (ALOT) el cual se basa en 8 marcadores diferentes que nos orientan a la diferenciación de linaje, una vez que la muestra está orientada hacia un linaje determinado, se somete a un análisis bajo marcadores específicos para ese linaje y de acuerdo con los marcadores que presenta es posible determinar el estadio de maduración. Como resultado es posible evitar el análisis innecesario de antígenos dirigidos a inmunofenotipos diferentes al sospechado.

Lo ideal es realizar la EMR utilizando los marcadores que se identificaron durante el inmunofenotipo, por lo que es importante contar con un registro para realizar una búsqueda intencionada de blastos de acuerdo con las características reportadas.

Es necesario disponer de un equipo de citometría de flujo en las unidades médicas que tratan Leucemias Agudas y llevar un registro completo de los marcadores reportados en inmunofenotipo para realizar EMR de manera subsecuente, así como se requiere de personal capacitado para realizar los estudios; esto nos permite obtener información útil para el pronóstico y seguimiento de la enfermedad.

Limitaciones

Durante el desarrollo de este estudio se identificó que no fue posible realizar todos los inmunofenotipos y estudios de EMR en la unidad a los pacientes con diagnóstico y seguimiento en la unidad secundario a la falta de insumos, por lo que en estos casos fue necesario enviar muestras a laboratorios externos.

Como resultado la base de datos no cuenta con todos los estudios de diagnóstico y seguimiento durante el periodo estudiado, por lo que no fue factible dar seguimiento a los pacientes haciendo uso de la misma técnica de citometría de flujo. No fue posible dar seguimiento e identificar la cantidad pacientes que lograron una remisión completa posterior a la inducción con el antecedente de inmunofenotipo y EMR positiva al final de la inducción realizados en la unidad.

Sugerencias y recomendaciones

Es indispensable que los servicios de oncología pediátrica tengan al alcance un equipo de citometría de flujo que cuente con los marcadores mínimos necesarios para identificar el extirpe celular y grado de maduración. Se requiere asegurar un adecuado procesamiento y obtención de la muestra, así como disponer de personal altamente capacitado para realizar los estudios.

Es necesario contar con una técnica adecuada que permita optimizar los recursos y obtener información útil para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con Leucemia aguda linfoblástica, así como se necesita una base de datos completa de los resultados obtenidos en el análisis de las muestras ya que estos datos tienen valor pronóstico y están ligados a las decisiones terapéuticas para obtener resultados favorables.

Anexos

HOJA 1 DE RECOLECCIÓN DE DATOS								
EDAD	SEXO	RIESGO	TIPO DE ESTUDIO	LEUCOCITOS	INMUNOFENOTIPO	RESULTADO EMR	TIEMPO EN QUE SE REALIZO EMR	VIABILIDAD CELULAR

HOJA 2 DE RECOLECCIÓN																
TUBO ALOT								PANEL T								
cyCD3	CD45	cyMPO	cyCD79a	CD34	CD19	CD7	smCD3	nuTdT	CD99	CD5	CD10	CD1a	CD2	CD117	CD4	CD8

HOJA 3 DE RECOLECCIÓN DE DATOS																		
PANEL B																		
CD20	CD58	CD66c	CD10	CD38	smIgK	cyIgM	CD33	smIgM/CD117	smIgA	CD9	nuTdT	CD13	CD22	CD24	CD21	CD15	CD123	CD81

Bibliografía

1. Pizzo PA. Principles and Practice of Pediatric Oncology. Séptima edición ed.: Wolters Kluwer; 2015.
2. Del Principe MI, De Bellis E, Gurnari C, Buzzati E, Savi A, Irno Consalvo MA. Applications and efficiency of flow cytometry for leukemia diagnostics. Expert Review of Molecular Diagnostics. 2019; 19 (12), 1089-1097.
3. Campana D, Coustan-Smith E. Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. Cytometry. 1999; 38 (4):139-52.
4. Pui CH, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med. 2006; 354 (2):166-78.
5. Campana D. Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. Semin Hematol. 2009; 46 (1): 100-6.
6. Satake N, Sakamoto K. Acute lymphoblastic leukemia. [Online]; 2006. <http://www.emedicine.com/ped/TOPIC2587.HTM>.
7. Pui CH, Relling MV, Campana D, Evans WE. Childhood acute lymphoblastic leukemia. Rev Clin Exp Hematol. 2002; 6 (2):161-80.
8. Mejía JM, Fajardo A, Bernáldez R, Paredes R, Flores H, Martínez M del C. Incidencia de las leucemias agudas en niños de la ciudad de México, de 1982 a 1991. Salud Publica Mex. 2000; 42 (5): 431-7.
9. Kato M, Manabe A. Treatment and biology of pediatric acute lymphoblastic leukemia. Pediatr Int. 2018; 60 (1): 4-12.
10. Hunger SP, Mullighan CG. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. N Engl J Med. 2015; 373 (16): 1541-52.
11. Pieters R, Carroll WL. Biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia. Hematol Oncol Clin North Am. 2010; 24 (1): 1-18.
12. Inaba H, Mullighan CG. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. Haematologica. 2020;105 (11): 2524-2539.

13. Kruse A, Abdel-Azim N, Kim HN, Ruan Y, Phan V, Ogana H. Minimal Residual Disease Detection in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Int J Mol Sci.* 2020; 21 (3):1054.
14. Kotrova M, Trka J, Kneba M, Brüggemann M. Is Next-Generation Sequencing the way to go for Residual Disease Monitoring in Acute Lymphoblastic Leukemia? *Mol Diagn Ther.* 2017; 21 (5): 481-492.
15. Qin X, Zhang MY, Liu WJ. Application of minimal residual disease monitoring in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2018; 22 (20): 6885-6895.
16. Van Dongen JJ, Orfao A, EuroFlow Consortium. EuroFlow: Resetting leukemia and lymphoma immunophenotyping. Basis for companion diagnostics and personalized medicine. *Leukemia.* 2012 Sep;26(9):1899-907.
17. Dworzak MN, Buldini B, Gaipa G, Ratei R, Hrusak O, Luria D. International-BFM-FLOW-network. AIEOP-BFM consensus guidelines 2016 for flow cytometric immunophenotyping of Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom.* 2018; 94 (1): 82-93.
18. Barrera LM, Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.* 2004; 17 (1) 42-45.
19. Campana D, Pui CH. Minimal residual disease-guided therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2017; 129 (14): 1913-1918.
20. Lhermitte L, Barreau S, Morf D, Fernandez P, Grigore G, Barrena S. Automated identification of leukocyte subsets improves standardization of database-guided expert-supervised diagnostic orientation in acute leukemia: a EuroFlow study. *Mod Pathol.* 2021; 34 (1): 59-69.
21. Campana D, Pui CH. Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance. *Blood.* 1995; 85 (6): 1416-34.
22. Van Dongen JJ, Lhermitte L, Böttcher S, Almeida J, van der Velden VH; EuroFlow Consortium (EU-FP6, LSHB-CT-2006-018708). EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric

- immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*. 2012; 26 (9): 1908-75.
23. Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VH, Martin-Ayuso M, Böttcher S; EuroFlow Consortium (EU-FP6, LSHB-CT-2006-018708). EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia*. 2012; 26 (9): 1986-2010.
24. Jaime-Pérez JC, El problema de la recaída en la leucemia linfoblástica aguda de la Infancia, *RevHematolMex*. 2017 ene;18 (1):1-3.
25. Comportamiento epidemiológico del cáncer en menores de 18 años, México 2008-2014, *Centró Nacional para la salud de la infancia y la adolescencia*.
26. Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood*. 2008 Apr 15;111(8):3941-67.
27. Gaynon PS, Angiolillo AL, Carroll WL, Nachman JB, Trigg ME; Children's Oncology Group. Long-term results of the children's cancer group studies for childhood acute lymphoblastic leukemia 1983-2002: a Children's Oncology Group Report. *Leukemia*. 2010; 24 (2): 285-97.
28. Pieters R, Carroll WL. Biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2010; 24(1): 1-18.
29. Willemse MJ, Seriu T, Hettinger K, d'Aniello E, Hop WC, Panzer ER. Detection of minimal residual disease identifies differences in treatment response between. T-ALL and precursor B-ALL. *Blood*. 2002; 99 (12): 4386-93.
30. Arriaga L, Ramírez D, Prieto J, Pelayo R, Ruiz A, Ruiz GJ. Reporte de la Primera Reunión Nacional de Consenso para la Inmunofenotipificación de Leucemias Agudas. *Gac Med Mex*. 2019; 155 (1): 20-29.
31. Marsán V, Macías C, Díaz G, Triana Y, Lam R, Machín S. CD45 y leucemia linfocítica aguda pediátrica. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia [Internet]*. 2019; 35 (3) Disponible en: <http://www.revhematologia.sld.cu/index.php/hih/article/view/973>.
32. DiGiuseppe JA, Wood BL. Applications of Flow Cytometric Immunophenotyping in the Diagnosis and Posttreatment Monitoring of B

- and T Lymphoblastic Leukemia/Lymphoma. *Cytometry B Clin Cytom.* 2019; 96 (4): 256-265.
33. Lanzkowski P. *Manual of Pediatric Hematology and Oncology.* Academic Press. Sixth Edition. 2016.
34. Madero-López L, Muñoz- Villa A. *Hematología y Oncología Pediátrica.* Ed.: Ergon. Segunda Edición, 2005.
35. Pui CH. *Leukemias.* Ed.: Cambridge University Press. Tercera Edición. 2012.

Cuadro UNAM

Datos del alumno	
Autor:	Dra. Luz Adriana Lavara Miranda
Teléfono:	5529664433
Universidad:	Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad:	Medicina
Número de cuenta	306113204
Datos del Director y/o asesores de Tesis	Dr. Homero Rendón García Dra. Tania Clarisa Larios Farak
Datos de la tesis	
Título	Anticuerpos en Leucemia Aguda Linfoblástica obtenidos con la técnica EuroFlow mediante citometría de flujo en el Hospital Infantil del Estado de Sonora durante el año 2015-2020
Palabras clave	Inmunofenotipo, EuroFlow, EMR, citometría de flujo
Número de páginas	46