

Reporte de la Primera Reunión Nacional de Consenso para la Inmunofenotipificación de Leucemias Agudas

Lourdes Arriaga-Pizano,¹ Dalia Ramírez-Ramírez,² Jessica Prieto-Chávez,¹ Rosana Pelayo² y Alejandro Ruiz-Argüelles³

¹Instituto Mexicano del Seguro Social, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Hospital de Especialidades, Ciudad de México; ²Instituto Mexicano del Seguro Social, Centro de Investigación Biomédica de Oriente, Laboratorio de Oncoinmunología, Puebla; ³Laboratorios Clínicos de Puebla, Departamento de Inmunología, Puebla Mexico

Resumen

En 2005 se publicaron recomendaciones para la tipificación de hemopatías malignas en Latinoamérica. Se consideró necesario realizar una reunión nacional para actualizarlas. Se convocaron y reunieron 95 profesionales expertos en el tema para analizar y contrastar alternativas y llegar a un consenso. Se alcanzaron opiniones de consenso en lo relativo a indicaciones, tipos y manejo de muestras, anticuerpos, nomenclatura e informe de resultados para el diagnóstico y seguimiento de las leucemias agudas. Las recomendaciones se describen en este artículo y se hace hincapié en la necesidad de que los laboratorios nacionales se apeguen a ellas.

PALABRAS CLAVE: Leucemia. Inmunofenotipo. Consenso.

Abstract

Recommendations for the typing of hematological malignancies in Latin America were published in 2005. Carrying out a national meeting to update them was deemed necessary. 95 professional experts on the subject were invited in order to analyze and contrast alternatives and reach a consensus. Consensus opinions were reached regarding indications, sample types and processing, antibodies, nomenclature and reporting of results for the diagnosis and monitoring of acute leukemias. This paper describes the recommendations and emphasizes on the need for national laboratories to adhere to them.

KEY WORDS: Leukemia. Immunophenotype. Consensus.

Correspondencia:
Alejandro Ruiz-Argüelles
E-mail: aruiz@clinicaruiz.com

Fecha de recepción 23 05 2018
Fecha de aceptación 04 10 2018
DOI 10.24875/GMM.18004418

Gac Med Mex 2019;155(20-29)
Disponible en PubMed
www.gacetamedicademexico.com

Introducción

Las enfermedades oncológicas han sido definidas como una prioridad global de salud, especialmente en países de bajo y mediano ingreso, en donde el factor demográfico puede limitar sustancialmente su control a largo plazo.

Las leucemias agudas son las neoplasias malignas infantiles más frecuentes en el mundo y siguen siendo de las principales causas de mortalidad de pacientes pediátricos y adultos con recaídas. La mayor incidencia de casos con evolución desfavorable es documentada en población hispana.^{1,2} Aunque las tasas de supervivencia han aumentado en los últimos años por el desarrollo de tratamientos eficientes, el diagnóstico tardío, la resistencia a la quimioterapia, la infiltración extramedular, la enfermedad residual y la recaída suelen empeorar significativamente el desenlace de la enfermedad, lo que subraya la necesidad de nuevas estrategias diagnósticas.³

La producción oligoclonal descontrolada de células precursoras hematopoyéticas de la serie linfoide o mieloide en la médula ósea a expensas de su diferenciación normal es la característica principal de las leucemias agudas.⁴ Entre ellas, la leucemia linfoblástica aguda (LLA) representa 23 % de los tumores malignos y 85 % de los casos de leucemia en población infantil, mientras que la leucemia mieloide aguda constituye 15 %.^{1,5,6}

De acuerdo con clasificaciones internacionales de etapas de linaje y maduración basadas en el número y grado de especificidad de los antígenos expresados por las células leucémicas,⁴ 80 a 85 % de los casos tiene inmunofenotipo de células B, mientras que casi 10 a 15 % muestra inmunofenotipo de células T.⁷ La leucemia congénita, una entidad distinta de la LLA típica, representa solo 3 % de las leucemias agudas, mientras que las leucemias de linaje mixto, con propiedades de células de dos estirpes, constituyen aproximadamente 2 %.

La mayor contribución a la supervivencia libre de enfermedad está dada por un tratamiento adecuado de la enfermedad, basado en la estratificación de los pacientes por grupos de riesgo y la identificación de factores de recaída.^{8,9} En la actualidad, los indicadores pronósticos más útiles son el inmunofenotipo, la detección de enfermedad residual y la respuesta a la terapia de inducción. El inmunofenotipo de las células leucémicas es uno de los factores que establecen el riesgo de recaída, que ocurre en 20 a 30 % de los

pacientes, particularmente en las leucemias de linaje T y de linaje mixto.¹⁰⁻¹²

Tanto el origen, como su progresión, resultan de múltiples factores que incluyen los genéticos, microambientales, macroambientales e inmunológicos. La teoría jerárquica del desarrollo del cáncer sostiene que las células troncales o iniciadoras de cáncer son responsables del inicio, el mantenimiento de tumores y posiblemente de la ulterior invasión y desarrollo de focos metastásicos.^{13,14} A pesar de la heterogeneidad biológica, molecular y clínica de las leucemias, es clara la manifestación de alteraciones desde los inicios del programa de diferenciación hematopoyética. Sin embargo, mientras que para las leucemias mieloideas agudas y crónicas una población de células troncales leucémicas es responsable de su desarrollo y recurrencia,^{15,16} para las leucemias linfoblásticas su tronalidad aparentemente no es fenotípica y puede estar relacionada con el microambiente tumoral,^{17,18} que contribuye a la patogénesis de la enfermedad.

La inmunofenotipificación de las hemopatías malignas ha demostrado ser de utilidad en el estudio de las leucemias agudas; sin embargo, ante la gran variedad de reactivos, instrumentos y plataformas de análisis se requiere normar diversos criterios concernientes a la indicación para realizar el estudio, selección de reactivos y métodos para el procesamiento y análisis de la muestra, e interpretación de los resultados. De allí que se hayan organizado grupos de trabajo o conferencias de consenso que permiten la comparabilidad y compatibilidad de la información generada por distintos laboratorios o instituciones donde se realizan estas investigaciones. Se han organizado dos Conferencias Latinoamericanas de Consenso para la Tipificación Inmunológica de Hemopatías Malignas^{19,20} y aunque las recomendaciones de la segunda aún pueden considerarse pertinentes, su actualización es altamente deseable, de acuerdo con la emergencia de entidades distintas y al progreso en las estrategias y tecnologías de precisión.

El 23 de marzo de 2018 se llevó a cabo la Primera Reunión Nacional de Consenso para la Inmunofenotipificación de Leucemias Agudas, convocada por la Sociedad Mexicana de Inmunología, con el aval de la Academia Nacional de Medicina de México. Se revisaron y discutieron diversos aspectos de la inmunofenotipificación de estas enfermedades y de ello emanan las recomendaciones contenidas en este escrito.

Tabla 1. Procesamiento de muestra para el inmunofenotipo por citometría de flujo

Muestra	Tiempo ^a	Lavado	Estabilización ^e	Enriquecimiento por gradiente de densidad ^g	Anticoagulante ^h	Transporte en SS/PBS ⁱ
Sangre periférica	Hasta 24 horas ^{b,c,d}	Sí	No	No	EDTA o heparina	No
Médula ósea	Hasta 24 horas	Sí	No	No ^k	EDTA o heparina	No
Sangre de cordón umbilical	Hasta 24 horas	No	No	No	ACD	No
Productos de leucoaféresis	Hasta 24 horas	No	No	No	ACD	No
Biopsias de tejidos sólidos	60 minutos	Sí	Sí ^f	No	No	Sí
Punción de tejidos sólidos	60 minutos	Sí	Sí	No	No	Sí
Fluido cerebroespinal	30 minutos	Sí	Sí	Sí	EDTA	No

^aTiempo máximo entre la colecta de la muestra y su procesamiento, incluido el transporte.^bProcesamiento lo más pronto posible, manteniendo la muestra a temperatura ambiente estable (16 a 25 °C) y con anticoagulante hasta 24 horas.^cDespués de la toma de muestra y al momento de iniciar el procesamiento, verificar la viabilidad celular para confirmar la estabilidad de la muestra; el fluorocromo de viabilidad se utilizará para el algoritmo de análisis y no como un aspecto restrictivo para aceptar la muestra. No se realizó recomendación en cuanto al porcentaje mínimo de viabilidad de la muestra por procesar, pero el dato deberá ser incluido en el informe final.^dTiempo de hasta 48 horas si la muestra se va a transportar al laboratorio de procesamiento y la temperatura se mantiene estable (16 a 25 °C); después de este tiempo se recomienda mantener la muestra refrigerada (4 °C).^eLa estabilización es requerida posterior a la colecta de la muestra y efectiva de 24 a 48 horas.^fDespués del tiempo recomendado, las muestras deben ser estabilizadas.^gEl enriquecimiento celular se recomienda para muestras con baja celularidad (menor a 1000 cel/μL) o en muestras de líquido cefalorraquídeo.^hLa recomendación es usar solo un anticoagulante y nunca mezclarlos.ⁱUsar EDTA solo si la muestra está contaminada con la sangre de la toma de muestra. Se recomienda usar un estabilizador para líquido cefalorraquídeo (sí la muestra no se va a procesar en menos de 30 minutos).^jSolución salina (SS) y amortiguador salino de fosfatos (PBS). El medio RPMI puede ser de utilidad.^kSalvo en casos en que se requiera concentrar la muestra para cuantificar eventos raros.

Participación

Participaron 95 profesionales de la salud, incluyendo laboratoristas, especialistas clínicos e investigadores, todos expertos en inmunofenotipificación de leucemias por citometría de flujo. Las entidades federativas participantes fueron Baja California, Ciudad de México, Colima, Estado de México, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Oaxaca, Puebla y Yucatán. La dirección del consenso estuvo a cargo de los doctores Arriaga Pizano, Pelayo y Ruiz-Argüelles.

Agenda

La discusión comprendió los aspectos de indicaciones médicas, preparación de muestras, así como pertinencia y selección de antígenos (identificados mediante los anticuerpos monoclonales correspondientes) para LLA de precursores B, LLA de precursores T, leucemia mieloide aguda y enfermedad medible residual. En el presente consenso se optó por cambiar el término “mínima” por “medible” para la enfermedad residual, con el objetivo de denotar que la sensibilidad del sistema analítico es la limitante para cuantificar blastos en las muestras. Aunque los desórdenes hematológicos comprenden, además de las leucemias agudas, los desórdenes linfoproliferativos crónicos, las gamopatías monoclonales y los

síndromes mielodisplásicos, dichas entidades no fueron discutidas durante esta reunión; serán abordadas secuencialmente en reuniones futuras.

Indicaciones médicas

Durante el consenso se acordó que la inmunofenotipificación de las leucemias agudas tiene utilidad para el diagnóstico, clasificación, pronóstico y seguimiento. Se resaltó la importancia de la comunicación entre patólogos, oncólogos, hematólogos y profesionales en citometría de flujo para determinar la asertiva interpretación de los datos que lleve a un diagnóstico confiable.

Preparación de la muestra

Idealmente las muestras deben procesarse en las 48 horas siguientes a su obtención, y preferentemente en las primeras 24. Sin embargo, tomando en cuenta que en ocasiones no es posible cumplir este requisito por razones diversas, se recomendó enfáticamente que todas las muestras recibidas sean procesadas para su análisis por citometría, aceptándose que la única razón válida para rechazarlas y solicitar una segunda muestra es la insuficiente información obtenida del estudio; es decir, cuando la pérdida de calidad de la muestra, por almacenamiento prolongado, interfiere con la certeza de la interpretación del estudio.

Tabla 2. Anticuerpos para inmunofenotipificación de leucemias agudas

Indicación	Linaje ^a	Diferenciación/Maduración	Subclasificación	Opcional
LLA de células precursoras B	CD19 ^b	CD34	CD10	TdT
	CD79 ^a (citoplásmico) ^b	CD45 ^c	Ig superficie	CD13
		CD20 ^d	Cadenas μ citoplásicas	CD33
		CD38 ^d		
LLA de células precursoras T	CD3 (citoplásmico y de superficie) ^e	CD34	—	CD2
	CD7 ^f	CD45 ^c	—	CD4
		TdT	—	CD5
		CD1a ^g	—	CD8
	CD99 ^h	—	—	CD13 ⁱ
				CD33 ^j
Leucemia mieloide aguda	MPO (citoplásica)	HLA-DR ^k	CD64 ^k	CD36 ^o
	CD13	CD34	CD15	CD14
	CD117 ^a	CD45	CD11b	CD123
			CD300 ^l	CD61
			CD105 ^l	
			CD56 ^m	
			CD71 ⁿ	

^aCuando sea posible, se recomienda usar la combinación de anticuerpos anti CD19, CD79a, CD3 (citoplásmico) y mieloperoxidasa (citoplásmica), para identificar células de linaje mieloide, T o B en la misma tinción.

^bPara definir el linaje de células B en LLA, tanto CD19 como CD79a deben estar presentes en las células precursoras B.

^cÚtil para propósito de selección de poblaciones (algoritmo de análisis) y como marcador cuando el grado de infiltración es bajo.

^dLa inclusión de CD20 y CD38 puede ayudar en el tamizaje de anomalías genéticas comunes en las células precursoras B de LLA.

^eSe agregó CD3 de superficie para distinguir leucemias de células T tempranas (CD3 citoplásmico^c CD3 superficie CD2⁺ CD7 CD5⁺) de leucemias agudas de células T (CD3 citoplásmico^c CD3 superficie^c CD2⁺ CD7⁺ CD5⁺). Para realizar la discriminación entre CD3 citoplásmico y de superficie es necesario hacer tinciones en tubos separados o con diferentes fluorocromos para cada uno, empezando en por la tinción de superficie con la subsecuente fijación para después proceder a la tinción intracelular.

^fÚtil para la evaluación de enfermedad medible residual.

^gSe agregó CD1a, ya que los pacientes que presentan ese fenotipo se remiten a trasplante.

^hSe agregó CD99 por que la mayoría de las leucemias con ausencia de CD34 trascurren con CD99⁺.

ⁱÚtil para evaluar la expresión de marcadores aberrantes en los blastos leucémicos de origen linfoides.

^jÚtil para el tamizaje de leucemia promielocítica.

^kMejor marcador para células con diferenciación monocítica.

^lCD105 y CD300 son nuevos marcadores reconocidos para diferenciación eritroide y monocítica, respectivamente.

^mMarcador asociado con leucemia de mal pronóstico.

ⁿMarcador útil para definir diferenciación eritroide.

^oÚtil para la identificación de linajes celulares eritroides, megacariocíticos o células dendríticas.

La lisis de eritrocitos y la fijación de muestras deben efectuarse después de la incubación con los anticuerpos fluorescentes. La separación o enriquecimiento celular por gradiente de densidad debe limitarse para casos en que las muestras sean resistentes a la lisis o cuya contaminación con células necróticas, estromales o de grasa pueda interferir con la interpretación de los resultados. La hemólisis osmótica y lavado antes de la incubación con anticuerpos (*bulk lysis*) o el enriquecimiento mediante gradientes de densidad también puede emplearse cuando se buscan eventos raros, como en la enfermedad medible residual.²¹

De especial interés fue definir el tiempo óptimo para el procesamiento de la muestra a fin de preservar la

viabilidad celular, el cual fue de hasta 48 horas después del momento de la recolección. Si la muestra tiene que ser transportada desde el lugar de la toma hasta el laboratorio de procesamiento, debe mantenerse a temperatura estable entre 16 y 25 °C. También se discutió acerca del lavado del lavado, estabilización celular, centrifugación, anticoagulación y transporte; las recomendaciones generales se muestran en la Tabla 1.

Anticuerpos monoclonales para leucemias agudas

En el consenso se concluyó que la inmunofenotipificación de leucemias agudas a través de paneles de

anticuerpos esenciales debería ser capaz de identificar adecuadamente las células precursoras B de la LLA, las células precursoras T de la LLA, la leucemia mieloide aguda y la enfermedad medible residual.

Se recomendó enfáticamente el uso de paneles multiparamétricos que combinen al menos tres anticuerpos monoclonales conjugados a diferentes fluorocromos. Esta estrategia debería permitir la identificación del linaje, etapas de maduración o diferenciación y la subclasiﬁcación de las leucemias agudas.

Se acentuó que la adquisición de muestras y el análisis de datos deben realizarse inmediatamente después del proceso de incubación con los anticuerpos fluorescentes, evitando así la pérdida de viabilidad celular, la internalización del anticuerpo y la disminución de la intensidad luminosa de los fluorocromos.

En los casos de LLA de células precursoras B, el uso de anticuerpos anti-CD19 y anti-CD79a citoplasmáticos se refrendó como el enfoque más potente para identificar el linaje de las células neoplásicas. Para determinar su grado de diferenciación se incluyeron los anticuerpos anti-CD34, CD45, CD20 y CD38, mientras que para subclasiﬁcar la variante se recomendó la investigación de CD10, inmunoglobulina de superficie y cadenas μ citoplásmicas. Como opcionales se mencionaron los anticuerpos anti-CD13 y anti-CD33 para evaluar la expresión de marcadores aberrantes en los blastos leucémicos de origen linfoidé, así como el anticuerpo anti-TdT, que brinda información adicional sobre el grado de madurez de las células leucémicas (Tabla 2).

Respecto a las leucemias linfoblásticas de células T se aceptó que la demostración del antígeno CD3 (citoplásmico y de superficie) y del CD7 era necesaria para definir el linaje, mientras que CD34, CD45, CD1d, TdT y CD99 son necesarios para establecer el grado de diferenciación (Tabla 2). Como opcionales se indicaron los anticuerpos anti-CD2, CD4, CD5 y CD8, así como aquellos contra CD13 y CD33 para demostrar aberraciones.

En la leucemia mieloide aguda se acordó que los antígenos que definen el linaje son la mieloperoxidasa citoplásmica, el antígeno CD13 y el CD117. La maduración de este linaje se basa en la investigación de los antígenos HLA-DR, CD34 y CD45, mientras que la subclasiﬁcación requiere la investigación de los anticuerpos CD11b, CD15, CD56, CD64, CD71 y CD300. Como anticuerpos opcionales para complementar la subclasiﬁcación de estos casos se indicaron aquellos contra CD14, CD36, CD61 y CD123 (Tabla 2).

Tabla 3. Nuevas entidades de interés clínico en leucemias agudas

LLA ETP	Presente	Ausente	Opcional
	CD2 ^a	CD1	CD5
	CD3 superficie ^a	CD8	CD11 ^b
	CD4 ^a		CD44
	CD10 ^a		CD65
	CD13		CD117
	CD33		
	CD34		
	CD56 ^b		
	HLA-DR		
LLA Ph-like	Presente	Ausente	Opcional
	CD19	CD4	CRLF2 ^c
	CD34		CD43
	CD10		CD20
	CD45		

LLA = leucemia linfoblástica aguda, LLAT = leucemia linfoblástica aguda de precursores T, LLA Ph-like = leucemia linfoblástica aguda con cromosoma Philadelphia

^aMarcadores signiﬁcativamente menos expresados en LLA-ETP que en una típica LLA-T.

^bMarcadores signiﬁcativamente más expresados en LLA-ETP que en una típica LLA-T.

^cMarcador expreso en al menos 50 % de los pacientes.

Se refrendó que los casos que cumplen los criterios de tinción en dos o más linajes celulares se deben deﬁnir como leucemias mixtas. La combinación de anticuerpos anti-CD79 α , CD3 y MPO fue muy recomendada como panel básico para identiﬁcar a este grupo de leucemias.

Nuevas entidades de interés clínico

Recientemente se ha reconocido la existencia de una variante de leucemia aguda de precursores tempranos de células T (ETP, *early T-cell precursor*). Esta variante, de características fenotípicas distintas a las leucemias linfoblásticas de células T, es aparentemente de pronóstico más desfavorable y se especula que puede resultar del arresto muy temprano en la diferenciación de las células del linaje T en el estadio de precursores hematopoyéticos poco comprometidos o que aún exhiben potencial mieloide.²²

Otra variante de LLA de células B de alto riesgo y mal pronóstico es la denominada “Philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia”, que se presenta en una quinta parte de los adultos, principalmente de origen hispánico y cuya identiﬁcación oportuna puede motivar decisiones terapéuticas.²³ Con el ﬁn de iniciar el reconocimiento fenotípico y la

prevalencia de estas dos variantes en nuestra región, se sugiere el empleo de los anticuerpos enlistados en la Tabla 3.

Interpretación

Para las leucemias agudas se acordó interpretar como tales los casos que cumplen los criterios de linaje cuando los blastos en médula ósea representen más de 20 % de las células nucleadas de la muestra. Se reiteró la recomendación de utilizar siempre la frase "...fenotipo compatible con...".

En el caso de las leucemias de precursores linfoides B, la recomendación es subclasificar en pro-B (B-I), común (B-II), pre-B (B-III) y B madura (B-IV), por sus posibles implicaciones en el pronóstico y abordajes terapéuticos. Las células B-I solo expresan CD19 y CD79a, las células B-II expresan además el antígeno CD10; las B-III expresan cadenas m citoplásmicas (usualmente junto con CD20 y después de perder el CD10) y la B maduras exhiben inmunoglobulinas en la superficie y el antígeno CD20.

Las leucemias agudas de células T, salvo por la variante ETP-LLA, no ameritan ser subclasificadas.

En las leucemias mieloideas se acordó que si el caso cumple con más de 20 % de blastos con dos marcadores de linaje mieloide entonces es compatible con leucemia mieloide aguda; si además tiene expresión de HLA-DR, CD64, CD11b, CD14 o CD300 es compatible con diferenciación monocítica; si expresa CD71 o CD36 y CD105 o CD36 y CD123 es compatible con diferenciación eritroide; si expresa CD36 y CD61 es compatible con diferenciación megacariocítica y, finalmente ante la ausencia o expresión tenue de CD14, HLA-DR, CD15, CD34, CD117 el fenotipo puede interpretarse como sugerente de leucemia promielocítica.

Se interpretarán como de linaje mixto, los casos que sin duda alguna denoten coexpresión de dos marcadores de cada uno de los linajes involucrados.

Informe de resultados del fenotipo inmunológico de leucemia aguda

El resultado de este estudio debe contener como mínimo necesario y suficiente las siguientes secciones:

1. Información demográfica del paciente: nombre completo, edad, sexo y procedencia.
2. Fecha y hora de la toma de muestra.
3. Tipo de muestra y calidad analítica de la misma.
4. Anticuerpos y número de parámetros fluorescentes empleados en el estudio.

5. Descripción de los hallazgos. A manera de un relato, describir las características y fenotipo de las células neoplásicas, así como la proporción de células nucleadas ($CD45^+$).
6. Interpretación. Siguiendo las indicaciones antes anotadas y empleando los siguientes términos:
 - a. Leucemia aguda de precursores B (I a IV).
 - b. Leucemia aguda de precursores T.
 - c. Leucemia mieloide aguda....
 - i. ...con diferenciación monocítica
 - ii. ...con diferenciación eritroide
 - iii. ...con diferenciación megacariocítica
 - d. Leucemia promielocítica.
7. Sugerencias. Relativas a estudios diagnósticos adicionales, nunca a procedimientos terapéuticos.
8. Histogramas representativos de los hallazgos. Estos serán de gran utilidad si la investigación de la enfermedad medible residual se realiza en otro laboratorio.
9. Comentarios u observaciones.

Enfermedad medible residual

Es la población neoplásica remanente posterior al tratamiento de inducción a la remisión en las neoplasias hematológicas negativas a nivel citomorfológico. La respuesta precoz al tratamiento de inducción es uno de los factores pronósticos más importantes en pacientes afectados de leucemia aguda. Actualmente se consigue la remisión citológica en una gran proporción de estos pacientes, sin embargo, un porcentaje importante recaerá posteriormente. Es preciso utilizar técnicas más sensibles para medir la leucemia residual y establecer un nuevo concepto de remisión completa.

Recomendaciones de consenso

- a) Dada la importancia de detectar números bajos de células neoplásicas imbuidas en abundancia de células normales, la viabilidad de la muestra es crucial. Debe procesarse el estudio lo más pronto posible después de la obtención de la muestra y cuidar la estabilidad de la temperatura (16 a 25 °C) de la muestra durante su transporte.
- b) Realizar el estudio en aspirados de médula ósea o sangre periférica.
- c) Concentrar o enriquecer el componente de células nucleadas de la muestra.

- d) De ser posible, cuando se trate de médula ósea, utilizar para la inmunofenotipificación el primer tubo de la toma de muestra.
- e) Es altamente recomendable contar con el fenotipo de diagnóstico inicial del paciente y posiblemente imágenes de citogramas representativos.
- f) En la medida de lo posible, practicar el mismo abordaje (combinaciones de anticuerpos y fluorocromos, estrategias de selección o *gating*, ganancias, etcétera) con el que mejor se discriminó a las células neoplásicas en el momento del diagnóstico.
- g) Contar con un número mínimo de 500 000 células nucleadas ($CD45^+$) para establecer la frecuencia de células neoplásicas en la muestra.
- h) Reportar el inmunofenotipo de la enfermedad medible residual, tomando en cuenta que el fenotipo de la clona leucémica que reemergió como una EMR⁺ puede tener un fenotipo diferente con el que inició el paciente. Lo anterior se puede deber a la modulación antigénica por el tratamiento, pero también puede ser indicativo de la presencia de otra clona o neoplasia.
- i) Informe de resultados. El informe debe contener los mismos apartados que el informe del inmunofenotipo al diagnóstico, pero la interpretación del estudio debe ser:
 - I. Positiva para enfermedad medible residual, seguida de la cantidad en proporción (%) de las células nucleadas $CD45^+$, así como en su número absoluto por microlitro. Esta estimación se puede realizar por medio de una o dos plataformas.
 - II. No detectable o por debajo del límite de detección, con lo que se evita emplear el concepto de ausencia que solo depende del estado del arte.
- j) En cualquier caso, además, debe reportarse el límite inferior de detección para cada instrumento, en cada laboratorio y en cada una de las tres variantes mayores de leucemia aguda (de precursores B, T o mieloide).

Si bien hay cierta congruencia en la interpretación de la importancia de la detección de enfermedad medible residual en niños con LLA en la que se ha descrito > 1 blasto/ μ L en los días 33 y 83 del tratamiento, que pronostica 100 % de recaídas, el laboratorio de citometría de flujo deberá limitarse a describir la cantidad numérica (si es medible) de células neoplásicas, sin incursionar en lo concerniente a las decisiones del médico tratante.

Como material suplementario se generaron sugerencias de paneles de anticuerpos para plataformas de 6, 8 y 10 colores, que solo pretenden servir como guías generales (Anexo 1).

Consideraciones finales

Por definición, un consenso es un “acuerdo entre dos o más partes”, es decir, una opinión aprobada por mayoría, que no implica un consentimiento activo de cada una, sino una aceptación en el sentido de no-negación. Así, las recomendaciones de consenso para la tipificación inmunológica de las neoplasias hematológicas solo reflejan las ideas en las que hay acuerdo de los especialistas involucrados, pero no necesariamente son del todo satisfactorias para todos sus signatarios. A pesar de esta limitación, las guías y recomendaciones de consenso desempeñan un papel decisivo en facilitar la comunicación y fortalecer la compatibilidad y comparabilidad de la información derivada de los estudios cuyas conclusiones se apoyan en el inmunofenotipo por citometría de flujo. Dada la velocidad con que aparecen nuevas especificidades CD y el vertiginoso desarrollo de nuevas y más poderosas capacidades analíticas en la citometría de flujo, es esperable y deseable que se sigan organizando reuniones de consenso para actualizar estas guías. La comunidad de usuarios siempre apreciará dichos esfuerzos.

Lista de participantes

Adrián Eduardo Acosta Sansén, Luz María Aguilar Anguiano, Juana Wendy Aguilera Caldera, Monserrat Aguirre, Carlos Alonso Muñoz, Lourdes Arriaga Pizano, Karen Amalínalli Ayala Contreras, Juan Carlos Balandrán, Rocío Baños Lara, Olga Verónica Barrales Benítez, Georgina Barrera Lumbreras, Andrea Bedoya, Omar Cano Jiménez, Antonieta Chávez González, Juan Carlos Chong Melchor, Sergio De Alba Camacho, Oxana Dobrovinskaya, Carlos Leonardo Duarte Martínez, Erick Espíndola, Karla A. Espinosa Bautista, Eduardo Ferat Osorio, María del Carmen Garza González, Miguel Alejandro Guerra Raphael, María Lourdes Gutiérrez, Sergio Gutiérrez Castillejos, Arely Eunice Hernández Alcántara, Ana Karen Hernández Colín, Hilda Elizabeth Hernández Juárez, Elva Jiménez Hernández, Gerardo Juárez Avendaño, Angélica Juárez Gómez, Lizeth Linares Sotelo, Briseida López Martínez, Felipe Alfonso Lule B, Ismael Mancilla Herrera, Juan Carlos Marín Corte, Orlando Martínez

Loya, Alejandro Martínez Sánchez, Juan Manuel Mejía Aranguré, Nereida Méndez Ramírez, Libertad Meza Arias, Carlos Mojica Cardoso, Adrián Morales Maravilla, Dafne Moreno Lorenzana, Lorena Nava Villegas, Juan Carlos Núñez Enríquez, Adriana Núñez Valencia, Roxana Olgún, Erick Olvera Juárez, Israel Parra Ortega, Rosana Pelayo, Elías Pérez Becerra, Beatriz Pérez Romano, Heriberto Prado García, Jessica Lakshmi Prieto Chávez, Dalia Ramírez, Heidi Ramírez Rodríguez, Alma B. Rodríguez Gallegos, Víctor Hugo Rosales, Héctor Alejandro Rosete Hernández, Alejandro Ruiz Argüelles, Mónica Saavedra, Stephanie Saint Remy Hernández, Jessica Sánchez Vargas, Antonio Sandoval Cabrera, Eliana Silva Casoluengo, Gloria Soldevila Melgarejo, Raúl Solís, Elena Soto Vega, Karina Suárez Álvarez, Patricia Rangel, Wilfrido David Tapia Sánchez, Gabriela Vargas Zaragoza, Esperanza Velasco Pérez, Armando Vilchis Ordoñez, Jairo Ricardo Villanueva Toledo, Pedro Arturo Zárate Rodríguez.

Agradecimientos

A la Academia Nacional de Medicina, por otorgar su aval y facilitar el uso de sus instalaciones para la celebración de la reunión. A Sysmex Diagnósticos México, por el apoyo en la organización y difusión de la reunión de consenso.

Bibliografía

1. Pérez-Saldivar ML, Fajardo-Gutiérrez A, Bernáldez-Ríos R, Martínez-Ávalos A, Medina-Sanson A, Espinosa-Hernández L, et al. Childhood acute leukemias are frequent in Mexico City: descriptive epidemiology. *BMC Cancer*. 2011;11:355.
2. Xu H, Cheng C, Devidas M, Pei D, Fan Y, Yang W, et al. ARID5B genetic polymorphisms contribute to racial disparities in the incidence and treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 2012;30:751-757.
3. Vilchis-Ordoñez A, Dorantes-Acosta E, Vadillo E, López-Martínez B, Pelayo R. Early hematopoietic differentiation in acute lymphoblastic leukemia: the interplay between leukemia-initiating cells and abnormal bone marrow microenvironment. En: Mejía-Aranguré JA, editor. *Etiología de las leucemias agudas en los niños*. México: Springer; 2016.
4. Dorantes-Acosta E, Pelayo R. Lineage switching in acute leukemias: a consequence of stem cell plasticity? *Bone Marrow Res*. 2012;2012:406796.
5. Xie Y, Davies SM, Xiang Y, Robison LL, Ross JA. Trends in leukemia incidence and survival in the United States (1973-1998). *Cancer*. 2003;97:2229-2235.
6. Mejía-Aranguré JM, Núñez-Enríquez JC, Fajardo-Gutiérrez A, Rodríguez-Zepeda MD, Martín-Trejo JA, Duarte-Rodríguez DA, et al. Descriptive epidemiology of children with acute myeloid leukemia residing in Mexico City: a report from the Mexican Inter-Institutional Group for Identifying Childhood Leukemia Causes. *Gac Med Mex*. 2016;152:66-77.
7. Balandrán JC, Vadillo E, Dozal D, Reyes-López A, Sandoval-Cabrera A, Laffont-Ortiz MD, et al. Analysis of normal hematopoietic stem and progenitor cell contents in childhood acute leukemia bone marrow. *Arch Med Res*. 2016;47:629-643.
8. Izraeli S. Similar yet different. *Blood*. 2010;116:1019-20.
9. Juárez-Velázquez R, Reyes-León A, Salas-Labadiá C, Rivera-Luna R, Velasco-Hidalgo L, López-Hernández G, et al. Significance of CASP8AP2 and H2AFZ expression in survival and risk of relapse in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2014;55:2305-2311.
10. Pui CH, Rubnitz JE, Hancock ML, Downing JR, Raimondi SC, Rivera GK, et al. Reappraisal of the clinical and biologic significance of myeloid-associated antigen expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 1998;16(12):3768-3773.
11. Rubnitz JE, Onciu M, Pounds S, Shurtliff S, Cao X, Raimondi SC, et al. Acute mixed lineage leukemia in children: the experience of St Jude Children's Research Hospital. *Blood*. 2009;113:5083-5089.
12. Meijerink JP, Den-Boer ML, Pieters R. New genetic abnormalities and treatment response in acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol*. 2009;46:16-23.
13. Kakarala M, Wicha MS. Implications of the cancer stem-cell hypothesis for breast cancer prevention and therapy. *J Clin Oncol*. 2008;26:2813-2820.
14. Rajendran P, Dalerba, P. Theoretical and experimental foundations of the "cancer stem cell" model. En: Rajasekhar V, editor. *Cancer stem cells*. EE. UU.: Wiley-Blackwell; 2014.
15. Chávez-González A, Avilés-Vázquez S, Moreno-Lorenzana D, Mayani H. Hematopoietic stem cells in chronic myeloid leukemia. En: Alimoghadam K, editor. *Stem cell biology in normal life and diseases*. Croacia: IntechOpen; 2013.
16. Chung SS, Park, CY. Acute myeloid leukemia cells-updates and controversies. En: Rajasekhar V (editor). *Cancer stem cells*. EE. UU.: Wiley-Blackwell; 2014.
17. Raff T, Brugemann, M. Leukemia-initiating cells in acute lymphoblastic leukemia. En: Rajasekhar V (editor). *Cancer stem cells*. EE. UU.: Wiley-Blackwell; 2014.
18. Balandrán JC, Purizaca J, Enciso J, Dozal D, Sandoval A, Jiménez-Hernández E, et al. Pro-inflammatory-related loss of CXCL12 niche promotes acute lymphoblastic leukemic progression at the expense of normal lymphopoiesis. *Front Immunol*. 2016;7:666.
19. Ruiz-Argüelles A, Duque RE, Orfao A. Report on the first Latin American Consensus Conference for Flow Cytometric Immunophenotyping of Leukemia. *Cytometry*. 1998;34:39-42.
20. Ruiz-Argüelles A, Rivadeneyra-Espinoza L, Duque RE, Orfao A, Latin American Consensus Conference. Report on the second Latin American Consensus Conference for flow cytometric immunophenotyping of hematological malignancies. *Cytometry B Clin Cytom*. 2006;70:39-44.
21. EuroFlow. Standard Operating Protocol (SOP) for Bulk Lysis for MRD panels (versión 1.1) 2014. Disponible en <http://medtechtrading.ch/documents/BulkLysisProtocol.pdf>
22. Haydu JE, Ferrando AA. Early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Curr Opin Hematol*. 2013;20:369-373.
23. Jain N, Roberts KG, Jabbour E, Patel K, Eterovic AK, Chen K, et al. Ph-like acute lymphoblastic leukemia: a high-risk subtype in adults. *Blood*. 2017;129:572-581.

Anexo 1**Sugerencias de construcción de paneles**

A continuación, sugerencias de paneles de anticuerpos para plataformas de 6, 8 y 10 colores, que pretenden servir como guías generales. Mayor información acerca de los marcadores (clonas, disponibilidad) se describe en la tabla “Relación de marcadores propuestos”.

Inmunofenotipificación de LLA de precursores B

Fluorocromo	10 colores	8 colores	6 colores
FITC	Ig	Ig	CD45
PE	CD79a	CD79a	CD79a
PE-Dazzle 594	CD10	—	—
PerCP-Cy5.5	CD34	CD34	CD34
PE-Cy7	CD19	CD19	CD19
APC	CD38	CD38	CD38
APC-R700	CD13	—	—
APC-Cy7	CD20	CD20	CD20
Brilliant violet 421	TdT	CD10	—
Pacific orange	CD45	CD45	—

Inmunofenotipificación de LLA de precursores T

Fluorocromo	10 colores	8 colores	6 colores
FITC	CD7	CD7	CD7
PE	CD99	CD99	CD3
PE-Dazzle 594	CD4	—	CD34
PerCP-Cy5.5	CD34	CD34	—
PE-Cy7	CD1a	CD1a	CD45
APC	TdT	TdT	TdT
Alexa fluor 700	CD2	—	—
APC-Cy7	CD3	CD3	CD3
Brilliant violet 421	CD3	CD3	—
Pacific orange	CD45	CD45	—

Inmunofenotipificación de LMA, 10 colores

Fluorocromo	T1	T2
FITC	CD64	CD15
PE	CD71	CD16
PE-Dazzle 594	CD19	CD123
PE-Cy5	CD117	CD10
PE-Cy7	CD13	CD13
APC	CD34	CD34
Alexa fluor 700	MPO	CD38
APC-Cy7	CD11b	CD33
Brilliant violet 421	HLA DR	HLA DR
Pacific orange	CD45	CD45

Inmunofenotipificación de LMA, ocho colores

Fluorocromo	T1	T2
FITC	CD64	CD15
PE	CD71	CD16
PE-Cy5	CD117	CD10
PE-Cy7	CD13	CD13
APC	CD34	MPO
APC-Cy7	CD11b	CD33
Brilliant violet 421	HLA DR	HLA DR
Pacific orange	CD45	CD45

Inmunofenotipificación de LMA, seis colores

Fluorocromo	T1	T2	T2
FITC	CD64	CD15	CD71
PE	HLA DR	HLA DR	HLA DR
PE-Cy5	CD117	CD10	CD11b
PE-Cy7	CD13	CD13	CD13
APC	CD34	CD33	MPO
APC-Cy7	CD45	CD45	CD45

Relación de marcadores propuestos

Marcador	Fluorocromo	Clona	Compañía	Catálogo
CD1a	PE-Cy7	HI149	BioLegend	300122
CD2	Alexa fluor 700	TS1/8	BioLegend	309228
CD3	APC-Cy7	SK7	BioLegend	344818
CD3	Pacific blue	UCHT1	BioLegend	300431
CD3	PE	UCHT1	BioLegend	300441
CD4	PE-Dazzle 594	SK3	BioLegend	344640
CD7	FITC	4H9	eBioscience	11-0078-42
CD10	PE-Dazzle 594	HI10a	BioLegend	312228
CD10	Brilliant violet 421	HI10a	BioLegend	312218
CD10	PE-Cy5	HI10a	BioLegend	312206
CD11b	APC-Cy7	ICRF44	BioLegend	301342
CD11b	PE-Cy5	ICRF44	BioLegend	301308
CD13	APC-R700	WM15	BD Biosciences	565124
CD13	PE-Cy7	L138 (Leu-M7)	BD Biosciences	338425
CD15	FITC	MMA	BD Biosciences	340703
CD16	PE	3G8	BioLegend	980102
CD19	PE-Cy7	HIB19	BioLegend	302216
CD19	PE-Dazzle 594	SJ25-C1	BioLegend	363032
CD20	APC-Cy7	2H7	BioLegend	302314
CD33	APC	P67.6	BioLegend	366606
CD33	APC-Cy7	P67.6	BioLegend	366614
CD34	PerCP-Cy5.5	8G12	BD Biosciences	347203
CD34	APC	8G12 (HPCA2)	BD Biosciences	340441
CD38	Alexa fluor 700	HB-7	BioLegend	356624
CD38	APC	HB-7	BioLegend	356606
CD45	APC-Cy7	HI30	BioLegend	304014
CD45	FITC	HI30	BioLegend	304038
CD45	Pacific orange	HI30	Thermo Fisher Scientific	MHCD4530
CD45	PE-Cy7	HI30	BioLegend	304016
CD64	FITC	10.1	BioLegend	305006
CD71	FITC	M-A712	BD Biosciences	555536
CD71	PE	M-A712	BD Biosciences	555537
CD79a	PE	HM57	BD Biosciences	563777
CD99	PE	3B2/TA8	BioLegend	371306
CD117	PE-Cy5	104D2	BioLegend	313210
CD123	PE-Dazzle 594	6H6	BioLegend	306034
HLA DR	Pacific blue	L243	BioLegend	980404
HLA DR	PE	L243	BioLegend	307606
Ig	FITC	Policlonal	Thermo Fisher Scientific	H17001
MPO	Alexa fluor 700	2C7	Novus	NB100-64803AF700
MPO	APC	2C7	Novus	NB100-64803APC
TdT	Brilliant violet 421	41A	BioLegend	368806
TdT	APC	41A	BioLegend	368808