



Concordancia entre el análisis morfológico y el inmunofenotipo al momento del diagnóstico y clasificación de leucemias agudas en pacientes pediátricos

Concordance between morphological analysis and immunophenotype at the time of diagnosis and classification of acute leukemia in pediatric patients

Parra-Ortega Israel,* Núñez-Hernández Esmeralda,*[‡] Nájera-Martínez Noemí,*
 Mendoza-García Emma,* Cortés-Flores Dolores Catalina,[§] Gaytán-Morales Félix,[§]
 Castorena-Villa Iván,[§] López-Martínez Briceida^{||}

Palabras clave:

Morfología,
 inmunofenotipo,
 leucemia aguda.

Keywords:

Morphology,
 immunophenotype,
 acute leukemia.

* Departamento de Laboratorio Clínico, Hospital Infantil de México «Federico Gómez».

[‡] Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México.

[§] Unidad de Trasplante de Médula Ósea, Hospital Infantil de México «Federico Gómez».

^{||} Subdirección de Servicios Auxiliares de Diagnóstico, Hospital Infantil de México «Federico Gómez».

RESUMEN

Introducción: En el algoritmo de diagnóstico, la evaluación morfológica de la médula ósea representa el primer paso en la vía diagnóstica y es la primera herramienta para distinguir una leucemia. La inmunofenotipificación permite confirmar el linaje y subclasificar las leucemias agudas de acuerdo con el grado de maduración. **Material y métodos:** Con el objetivo de comparar la caracterización morfológica versus inmunofenotipificación de aspirados de médula ósea de pacientes pediátricos con sospecha de leucemia aguda mediante la evaluación morfológica y el análisis por citometría de flujo multiparamétrica (CFM) para determinar el grado de concordancia que existe entre ambos métodos para el diagnóstico y clasificación de las leucemias agudas, se incluyeron un total de 59 pacientes con sospecha de leucemia aguda, clínica y de laboratorio. **Resultados:** El porcentaje de concordancia entre ambos métodos fue de 79.6% y el índice kappa (κ) de 0.352. El coeficiente de correlación fue obtenido mediante morfología y por CFM (52 muestras) al identificar una R^2 de 0.9406. **Conclusiones:** Es necesario realizar el análisis morfológico antes de realizar el inmunofenotipo para clasificar el linaje específico y la etapa de diferenciación de las células leucémicas. Ambos estudios son complementarios y no excluyentes. En los casos de recaída, se debe realizar siempre un nuevo inmunofenotipo y considerarse el mayor número de marcadores celulares en los diferentes linajes hematopoyéticos.

ABSTRACT

Introduction: On the diagnostic algorithm, the morphological evaluation of the bone marrow represents the first step in the diagnostic pathway and is the first tool to distinguish a leukemia, immunophenotyping allows confirming the lineage and subclassifying acute leukemias according to the degree of maturation. **Material and methods:** With the objective of comparing the morphological characterization versus immunophenotyping of bone marrow aspirates of pediatric patients, with suspected acute leukemia, through morphological evaluation and analysis cytometric flow multiparameter (CFM) to determine the degree of concordance that exists between both methods for the diagnosis and classification of acute leukemia, a total of 59 patients with clinical and laboratory suspicion of acute leukemia were included. **Results:** The percentage of agreement between both methods was 79.6% and the kappa index (κ) of 0.352. The correlation coefficient obtained by morphology and by CFM (52 samples) is R^2 of 0.9406. **Conclusions:** It is necessary to perform the morphological analysis, before performing the immunophenotype to classify the specific lineage and the stage of differentiation of the leukemic cells, both studies are complementary and not exclusive. In cases of relapse, a new immunophenotype should always be performed considering the highest number of cell markers in the different hematopoietic lineages.

Recibido:

21/09/2019

Aceptado:

09/01/2020

Correspondencia:

**Briceida López
Martínez**

Subdirección de
Servicios Auxiliares de
Diagnóstico,
Hospital Infantil de
México «Federico
Gómez»

Dr. Márquez

Núm. 162,

Col. Doctores, 06720,
Alcaldía Cuauhtémoc,
CDMX.

Tel: 5552289917,

ext. 9022

E-mail: brisalopezmtz
@gmail.com

INTRODUCCIÓN

Las leucemias agudas (LA) son el producto de cambios moleculares en una célula precursora hematopoyética.¹ Estas leucemias se asocian con una gran morbilidad y una supervivencia estimada de 60 a 70% en países en vías de desarrollo además de que constituyen las neoplasias más frecuentes en la edad pediátrica en nuestro país y, en América Latina, tienen una mayor incidencia.² Se pueden clasificar mediante el análisis morfológico y citoquímico según lo propuesto por el grupo Franco-Americano-Británico (FAB), también mediante inmunofenotipificación de acuerdo con el Grupo Europeo para la Clasificación Inmunológica de las Leucemias (EGIL) y, basándose en la presentación clínica del paciente, morfología, inmunofenotipo y estudios citogenéticos y moleculares, según la Organización Mundial de la Salud (OMS).³

Actualmente, la clasificación FAB sigue siendo un sistema para describir las LA.⁴ En el algoritmo de diagnóstico, la evaluación morfológica de la médula ósea representa el primer paso en la vía diagnóstica⁵ y es la primera herramienta para distinguir una leucemia linfoblástica aguda (LLA) de una leucemia mieloide aguda (LMA).^{6,7} La inmunofenotipificación permite confirmar el linaje y subclasificar la LA de acuerdo con el grado de maduración. Estos análisis se realizan de manera rápida, pues realizar el diagnóstico oportuno permite tratar inmediatamente al paciente, ya que las LA son fatales si no se tratan a tiempo. El análisis morfológico revela los porcentajes de blastos, bastones de Auer y presencia de mielodisplasia en las células.⁸ La citometría de flujo multiparamétrica (CMF) permite medir diferentes parámetros de una célula (tamaño, complejidad y expresión de antígenos), y de esta manera es posible caracterizar una célula por su fenotipo,⁹ lo que lleva a una mejor identificación de las poblaciones anormales.¹⁰

El análisis morfológico y la inmunofenotipificación por citometría de flujo multiparamétrica son los métodos que se emplean de manera inicial en el diagnóstico de estas neoplasias. Estos métodos se realizan de manera rápida y, con la información que ambos proporcionan, se realiza el diagnóstico oportuno, lo que

permite otorgar el tratamiento al paciente y de esta manera lograr la remisión de la enfermedad. Por lo anterior, es importante describir la concordancia entre ambos procedimientos considerando los criterios analíticos que regulan cada procedimiento o proceso en el diagnóstico y clasificación de las leucemias en niños.

MATERIAL Y MÉTODOS

Con el objetivo de comparar la caracterización morfológica versus inmunofenotipificación de aspirados de médula ósea de pacientes pediátricos con sospecha de leucemia aguda mediante la evaluación morfológica y el análisis por citometría de flujo multiparamétrica para determinar el grado de concordancia que existe entre ambos métodos para el diagnóstico y clasificación de las leucemias agudas, se incluyeron un total de 59 pacientes con sospecha clínica y de laboratorio de leucemia aguda en el Hospital Infantil de México «Federico Gómez».

Como parte de su abordaje diagnóstico, a los pacientes se les realizó el aspirado de médula ósea (MO), el cual se colocó en un tubo con EDTAK2 para realizar el análisis morfológico e inmunofenotípico.

El análisis morfológico se realizó de la siguiente forma

Se mezcló la muestra por inversión de ocho a diez veces, se colocó una gota de aspirado en el centro de un portaobjetos, otro portaobjetos se colocó sobre la gota y se ejerció una presión muy suave; los portaobjetos se separaron uno del otro en direcciones opuestas, se dejó que el extendido se secara al aire libre y se visualizó macroscópicamente para valorar la calidad del extendido.

Una vez secos, los extendidos se tiñeron con el colorante de Wright; se colocaron en una charola de tinción y sobre la preparación se colocó el colorante de Wright de manera que cubriera todo el extendido. Se dejó actuar el colorante por cinco minutos, posteriormente se agregó buffer de fosfatos (pH 6.4) en una cantidad similar al del colorante agregado y se mezclaron ambos reactivos utilizando una pipeta Pasteur; se dejó actuar otros 10 minutos, se eliminó la mezcla del colorante con buffer

e inmediatamente se lavó el portaobjetos con agua corriente cuidando que los grumos medulares (cuando estaban presentes) no se despegaran del portaobjetos. Se limpió la parte posterior del portaobjetos y se dejó secar la preparación al aire libre inclinando el portaobjetos.

La evaluación de un aspirado de MO se realizó con el objetivo de mayor aumento (100x). A medida que se realizaba el mielograma, se examinaron las características morfológicas de las células como tamaño, relación núcleo/citoplasma (N:C), apariencia de la cromatina, presencia, tamaño y cantidad de nucléolos; forma y tamaño del núcleo y características de su borde (regular o con hendiduras), color del citoplasma, presencia de gránulos en el citoplasma y sus características (cantidad, tamaño, forma y color). También se examinó la presencia de vacuolas, presencia de cuerpos o bastones de Auer (cantidad y agrupación) u otras inclusiones citoplasmáticas; características del contorno de la membrana¹¹ y asincronía en la maduración.

Se realizó el conteo diferencial de todas las células nucleadas: blastos, promielocitos, mielocitos (neutrófilo y eosinófilo), metamielocitos (neutrófilo y eosinófilo), bandas (neutrófilo y eosinófilo), neutrófilos segmentados, eosinófilos, basófilos, promonocitos, monocitos, linfocitos, células plasmáticas, proeritroblastos, eritroblastos (basófilos, policromáticos y ortocromáticos) y mastocitos. En el conteo diferencial no se incluyeron las células rotas, los megacariocitos ni los macrófagos.¹² Esto se realizó en 500 células y se contaron en dos extendidos (dos casos se contaron en un solo extendido). Se determinó el promedio de cada célula encontrada en ambos frotis y se calculó el porcentaje de cada una.

Determinación de la relación mieloide:eritroide (M:E). Se sumaron todas las células mieloides y por separado se sumaron todos los precursores eritroides. Finalmente se dividió el número de células mieloides entre el número de precursores eritroides.

Asignación del subtipo morfológico. Se asignó el subtipo de leucemia aguda de acuerdo con los criterios establecidos por el grupo FAB. El porcentaje de blastos para definirla como positiva fue $\geq 20\%$ sobre el total de células nucleadas (TCN), cuando se realizaba por primera vez el diagnóstico (de acuerdo con la clasificación de la OMS) y, $> 5\%$ sobre el TCN cuando se trataba de recaída (ver criterios clasificación en el caso de LMA en la *Tabla 1*).

Control de calidad de los extendidos. De acuerdo con D'Onofrio y col.,¹¹ una buena calidad de la preparación implica que la celularidad sea adecuada para que la mayoría de las células se encuentren intactas y que la tinción sea adecuada para que sea posible apreciar detalles celulares. Para asegurar esto, se realizó lo siguiente:

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

Obtención de información del inmunofenotipo y de parámetros hematológicos

De los 59 casos incluidos en este estudio, se revisaron los marcadores celulares que expresaron los blastos, además se determinó el porcentaje de estas células empleando la expresión de CD45 versus la gráfica de complejidad (SSC por sus siglas en inglés) y su viabilidad en el citómetro de flujo BD FACSCanto II.

Para la subclasificación inmunológica se emplearon los criterios y el sistema de puntuación del Grupo Europeo de Clasificación Inmunológica de Leucemias (EGIL). Se consideró como positivo cuando la expresión de un antígeno en las células fue $> 20\%$. Véase las *Tablas 2 y 3* para conocer la puntuación de los criterios EGIL y la forma de clasificar a las leucemias de linaje ambiguo (LALA).^{4,6,13,14}

El punto de corte para considerar un marcador como positivo es de al menos 20%, excepto para los marcadores MPOx, CD3, CD79a y TdT, los cuales con un mínimo de 10% de positividad ya se consideran como positivos.

Basados en este sistema de puntuación, se han descrito cuatro subtipos principales de LALA: B/mieloide, T/mieloide, B/T linfoide, y la leucemia de trilineaje (presencia de marcadores mieloides, B y T).

En el caso de una LALA, el valor del puntaje es de > 2 para el linaje mieloide y > 1 para el linaje linfoide. Si no se cumplen estos criterios, se considera como expresión aberrante del antígeno o infidelidad de linaje.

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

Tabla 1: Características morfológicas y morfométricas utilizadas en la clasificación de las LMA de acuerdo con el grupo cooperativo FAB.

Subtipo FAB	Denominación	Morfología
M0	Mieloblástica aguda mínimamente diferenciada	MO: > 90% de blastos. Éstos no desarrollan las características morfológicas mieloides (son muy indiferenciados). Son redondos de tamaño pequeño a mediano con núcleo excéntrico. El núcleo a veces es lobulado o escindido, con cromatina fina y uno o varios nucléolos. El citoplasma es ligeramente basófilo sin gránulos. No se observan cuerpos de Auer
M1	Mieloblástica aguda sin maduración	MO: > 30% de TCN y > 90% de las CNE son mieloblastos. < 10% de maduración de las series granulocíticas más allá del estadio de promielocito El mieloblasto es poco diferenciado, de tamaño mediano, con elevada relación N:C, contorno nuclear redondeado, cromatina laxa con presencia de uno o varios nucléolos prominentes. Pueden presentar una fina granulación azurófila, o algún bastón de Auer en el citoplasma (bastones de Auer se encuentran en 50% de los blastos). Si no hay evidencia de gránulos o bastones de Auer, los blastos pueden parecerse al linfoblasto L2
M2	Mieloblástica aguda con maduración	MO: > 30% de TCN y < 90% de CNE son mieloblastos; hay maduración más allá del estadio de promielocito en > 10% de las CNE; < 20% de monocitos. Los blastos son pequeños o medianos, con cantidad variable de citoplasma y un perfil nuclear redondeado, que a veces adopta una posición cuadrangular respecto al citoplasma; la cromatina es laxa, con uno o varios nucléolos. El citoplasma es basófilo y puede contener granulación primaria azurófila, u ocasionalmente algún bastón de Auer. Pseudo Pelger-Hüet y neutrófilos hipogranulares son las células más comunes Los casos con hiperplasia eritroide (pero < 50% de eritroblastos) sin las anomalías morfológicas de la eritroleucemia se incluyen en este grupo
M3	Promielocítica hipergranular	MO: > 30% de promielocitos anormales con abundantes gránulos citoplasmáticos que se tiñen de color rosa brillante, rojo o púrpura con la tinción de Romanowsky. Se hallan numerosos cuerpos de Auer, a menudo apilados (células en «haces», en inglés « <i>faggot</i> »). Los núcleos con frecuencia son reniformes o bilobulados con la presencia de una hendidura profunda o de perfil irregular. SP: leucocitos disminuidos
M3v	Promielocítica variante microgranular	MO: promielocitos con gránulos tan pequeños que no se distinguen con el microscopio óptico, núcleo profundamente indentado con citoplasma claro abundante y gránulos similares a polvo observados en una localización excéntrica cerca del núcleo A menudo se confunde con la M5 SP: suele cursar con leucocitosis
M4	Mielomonocítica aguda	MO: > 30% de blastos de TCN y > 20% de CNE son de componente monocítico (monoblastos, promonocitos y monocitos). Hay diferenciación granulocítica y monocítica. La proporción de células monocíticas no excede 80% de las CNE. Los monoblastos son de gran tamaño, moderada relación N:C y basofilia variable con eventuales mamelones en el citoplasma. El núcleo puede ser redondeado, arriñonado o de forma irregular. Los nucléolos son prominentes Mieloblastos, promielocitos y otros granulocitos posteriores comprenden entre 30 y 80% de las CNE. Bastón de Auer ±
M4E	Mielomonocítica aguda con eosinofilia	MO: ≥ 5% eosinófilos con núcleos monocitoides y pueden ser híbridos con gránulos basófilos; componente monocítico > 20%, pero < 80%
M5A	Monocítica aguda mal diferenciada	MO: > 30% de blastos de TCN y > 80% monoblastos. Estas células presentan una cromatina laxa, nucléolos prominentes y brotes o pseudópodos en la membrana citoplasmática, que es de basófila oscura a gris; puede contener gránulos azurófilos finos. Los brotes pueden ser más translúcidos que el resto del citoplasma y esto da la apariencia de una doble membrana. Por el aspecto indiferenciado se puede confundir con la M1. < 20% granulocitos

Continúa la Tabla 1: Características morfológicas y morfométricas utilizadas en la clasificación de las LMA de acuerdo con el grupo cooperativo FAB.

Subtipo FAB	Denominación	Morfología
M5B	Monocítica aguda diferenciada	MO: < 80% de las células son monoblastos, promonocitos (predominan) y monocitos. Los promonocitos presentan núcleos redondos o cerebriformes y pueden tener nucléolos, el citoplasma color gris traslúcido (menos basófilo que del monoblasto) con aspecto de vidrio esmerilado, con gránulos azurófilos y con presencia de alguna vacuola SP: % elevado de monocitos
M6	Eritroleucemia aguda	MO: > 50% de células son precursores eritroides de TCN. > 30% de CNE son mieloblastos tipo I o tipo II. Los precursores eritroides a menudo son morfológicamente anormales. Es común la presencia de precursores multinucleados. Pueden presentar cuerpos de Howell-Jolly, puede haber vacuolas perinucleares en los proeritroblastos y en los eritroblastos basófilos. Los cambios megaloblásticos y la diseritropoyesis son frecuentes Única LMA con hiperplasia de precursores eritroides. Con frecuencia un SMD precede a una M6 (mielosis eritrémica)
M7	Megacarioblástica	MO: > 30% de megacarioblastos de TCN. El tamaño de éstos es heterogéneo, muestran un aspecto morfológico muy inmaduro y son muy polimórficos, algunos tienen el tamaño del linfoblasto L1 con citoplasma escaso, mientras que otros son tres veces más grandes. El núcleo es excéntrico, de cromatina laxa y reticulada con 1 a 3 nucléolos prominentes. El citoplasma es basófilo y agranular y muestra un aspecto muy similar a las plaquetas circulantes con presencia de mamelones o pseudópodos Pueden observarse megacariocitos. La biopsia de MO muestra aumento de fibroblastos y/o aumento de reticulina

TCN = Todas las células nucleadas de la MO; CNE = Células no eritroides; MO = Médula ósea; SP = Sangre periférica; N:C = Núcleo citoplasma.^{4,6,13,14}

Plan de análisis estadístico

Se compararon los resultados obtenidos por ambos métodos y se calculó el grado de concordancia mediante la tabla de contingencia 2 x 2 y mediante el índice kappa (κ); también se calculó la sensibilidad, especificidad y valor de predicción positivo y negativo. Para el análisis estadístico de las diferentes determinaciones se empleó el programa GraphPad Prism® 6.01 para Mac OS X.

RESULTADOS

Evaluación de la calidad de la muestra

Se recibieron un total de 59 muestras del mismo número de pacientes. Para evaluar la calidad de las muestras se efectuó una inspección macroscópica antes de realizar los extendidos de todas las muestras. Siete fueron las muestras que macroscópicamente presentaban una apariencia viscosa y en las que se observaron coágulos, microscópicamente se observó una gran cantidad

de células destruidas. Adicionalmente, algunos casos presentaban finos precipitados color violeta que se encontraban en toda la extensión. Otras nueve muestras que macroscópicamente presentaba alguna alteración (presencia de pequeños coágulos o viscosa), microscópicamente, sin embargo, se observó una cantidad adecuada de células intactas.

Las características evaluadas de las muestras se resumen en las Tablas 4 a 6, y la valoración de la calidad de las muestras se agrupó de la siguiente forma, basados en el área de lectura:

- A: ausente; N/A: no aplica.
- B: buena distribución de las células, no se encuentran tan separadas ni se superponen. La mayoría de las células se encuentran íntegras (se logran observar sus características).
- B*: buena distribución celular, la mayoría de las células se encuentran íntegras. Se observan los bastones de Auer en los blastos.
- C: la mayoría de las células se encuentran íntegras, se observan los abundantes bastones de Auer y grá-

nulos azurófilos y naranjas que se encuentran en los promielocitos.

- D: la mayoría de las células se encuentran íntegras y se observan escasos gránulos primarios en una cantidad muy baja de blastos.
- E: abundantes células destruidas y presencia de finos precipitados color violeta.
- F: abundantes células rotas, presencia de mallas de fibrina y eritrocitos crenados.

Tabla 2: Sistema de puntuación EGIL para definir una LA.

Puntos	Linaje		
	Linfoide B	Linfoide T	Mieloide
2	CD79a cyIgM cyCD22	CD3 (cy/s) Anti-TCR α/β Anti-TCR γ/δ	MPOx Anti-lizosima
1	CD19 CD10 CD20	CD2 CD5 CD8	CD13 CD33 CD65 CD117
0.5	TdT CD24	TdT CD7 CD1a	CD14 CD15 CD64 CD11b CD11c

Cy = Citoplásmico; s = superficial; MPOx = Mieloperoxidasa; TdT = Desoxinucleotidil transferasa terminal.^{4,6,13,14}

- G: presencia de finos precipitados color violeta.
- H: abundantes células rotas y presencia de coágulos y fibrina.
- I: abundantes células rotas y presencia de mallas de fibrina en toda la extensión.

Concordancia obtenida entre el análisis morfológico e inmunofenotípico

De las 59 muestras analizadas, 47 coincidieron al emplear ambos métodos y 12 fueron discordantes, tal como se detalla en la *Tabla 6*. El análisis en la tabla de cuatro entradas se describe en la *Tabla 7* y los resultados del desempeño en la *Tabla 8*.

El porcentaje de concordancia entre ambos métodos fue de 79.6% y el índice kappa (κ) de 0.352 (aceptable de acuerdo con la valoración del índice kappa).

Se determinó la sensibilidad, la especificidad y los valores predictivos de la morfología. Estos resultados se muestran en la *Tabla 8*.

Los casos de LLA que concordaron en ambos métodos fueron 38 (73.07%), de los cuales por morfología 14 (36.8%) correspondieron al subtipo LLA-L1 y 24 (63.2%) al subtipo LLA-L2. Dos casos que por inmunofenotipo fueron pro-B, presentaron una LLA-L2; los pre-B común presentaron una morfología tanto de tipo L1 (13 casos) como de L2 (19 casos) y dos casos pre-B morfológicamente fueron L2. En cuanto a las LLA-T, un caso presentó una morfología de tipo L1 y el otro una L2.

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

Tabla 3: Clasificación inmunológica de las LLA de acuerdo con el grupo EGIL.

Linaje	Subtipo EGIL	Marcador
B	Pro-B	HLA-DR+, TdT+, CD34+, CD19+ y/o CD22+ y/o CD79a+, CD10-
	Pre-B común	HLA-DR+, TdT+, CD34+, CD19+ y/o CD22+ y/o CD79a+, CD10+
	Pre-B	HLA-DR+, TdT+, CD34-, CD19+ y/o CD22+ y/o CD79a+, cyIg μ , CD20 ^{het}
	Madura	HLA-DR+, TdT-, CD34-, CD19+ y/o CD22+ y/o CD79a+, cyIg μ , sIg μ
T	Pro-T	CD7 +
	Pre-T	CD7+, cyCD3+, CD5+, CD2 +/-
	T-Cortical	CD7+, cyCD3+, CD1a+, sCD3+/-, CD5+, CD2+, CD4+, CD8+
	T-madura	CD7+, cCD3+, sCD3+, CD2+, CD4 o CD8+
LLA + My	LLA con infidelidad de linaje	LLA con uno o dos marcadores mieloides

cyIg μ = cadena μ citoplásmica de la IgM; CD20 (antígeno de diferenciación restringido a los linfocitos B humanos); het: heterogéneo.^{5,6}

Tabla 4: Evaluación macroscópica, microscópica y evaluación mediante CFM del aspirado de médula ósea de pacientes pediátricos con sospecha de leucemia aguda.

Núm.	% Viabilidad (CFM)	Observación macroscópica	Observación microscópica		
		Característica	Grumo medular (10x)	Megacariocitos (10x)	Área de lectura (100x)
1	80	Normal	1/extendido	0.1/campo	B
2	-	Normal	A	A	B
3	69.8	Ligeramente viscosa		A	E
4	84	Normal	A	A	B
5	93.2	Normal	A	2/extendido	B
6	74.2	Normal	A	A	B
7	88.9	Normal	A	A	B
8	64.3	Normal	A	A	B
9	87.4	Normal	A	A	B
10	90.8	Normal	A	A	B
11	83.1	Normal	A	A	B
12	92.3	Frotis remitido por el hospital	21/extendido	0.1/campo	B
13	81.3	Normal	A	3 núcleos desnudos/extendido	B
14	86.6	Normal	A	3 núcleos desnudos/extendido	B
15	87.9	Normal	A	0.1/campo	B
16	91	Normal	A	A	B
17	98.7	Viscosa	A	0.1/campo	B
18	93	Normal	A	A	B
19	89	Normal	A	A	B
20	46.1	Normal	A	A	B
21	92	Normal	A	A	B
22	87	Viscosa, presencia de coágulos pequeños	A	A	B
23	90	Viscosa	A	2/extendido	B
24	88.2	Normal	A	1/extendido	B
25	93.4	Normal	1/extendido	5/extendido	B
26	89	Normal	7/extendido	0.1/extendido	B
27	75	Normal	A	4/extendido	B
28	83.6	Normal	A	A	B
29	93.6	Normal	A	A	B
30	87.2	Normal	A	1/extendido	B
31	-	Presencia de coágulo pequeño	A	1/extendido	B
32	-	Normal	A	A	B
33	-	Normal	A	A	B
34	-	Normal	A	A	B
35	84	Viscosa	A	A	B
36	73.5	Viscosa, presencia de fibrina	A	A	I

Continúa la Tabla 4: Evaluación macroscópica, microscópica y evaluación mediante CFM del aspirado de médula ósea de pacientes pediátricos con sospecha de leucemia aguda.

Núm.	% Viabilidad (CFM)	Observación macroscópica	Observación microscópica		
		Característica	Grumo medular (10x)	Megacariocitos (10x)	Área de lectura (100x)
38	90.4	Normal	A	2/extendido	B
39	-	Viscosa	A	A	B
40	-	Viscosa, presencia de fibrina	-	-	I
41	87	Ligeramente viscosa	A	A	B
42	94	Presencia de coágulo pequeño	3/extendido	4.8/campo	B
43	90	Normal	N/A (s.p.)	N/A (s.p.)	B
44	64	Viscosa, presencia de coágulos de diferentes tamaños	A	A	F
45	95	Normal	A	A	B*
46	92	Normal	A	A	C
47	89	Normal	A	A	D
48	-	Normal	2/extendido	2/extendido	B*
49	79	Normal	A	A	B
50	-	Normal	A	A	G
51	-	Viscosa, presencia de coágulos	-	-	H
52	-	Viscosa, presencia de coágulos	-	-	H
53	76.5	Normal	1/extendido	3/extendido	B
54	88	Normal	1/extendido	0.1/campo	B
55	93.8	Normal	A	1/extendido	B
56	80	Normal	A	A	B
57	72.4	Normal	A	1/extendido	B
58	93	Viscosa, presencia de coágulos pequeños	A	A	B
59	50	Normal	A	A	B

En las LALA identificadas en este estudio (cuatro casos) se observaron las siguientes características morfológicas: 1) la LALA que expresaba marcadores de células B/mieloide morfológicamente se presentó como LLA-L2; 2) la LALA expresaba marcadores de células T/mieloide y morfológicamente se caracterizó como una LMA-M2; 3) los dos casos de LALA expresaba marcadores de células B/T. Morfológicamente no se logró identificar o caracterizar un linaje celular (mala calidad de la muestra).

Dos de los casos estudiados, que fueron referenciados con el diagnóstico de recaída por morfología, fueron positivos debido a que se encontró un porcentaje

de blastos > 5% (12 y 10.4%) en ambas muestras, sin embargo, no se logró distinguir el linaje específico al que pertenecían; por CFM se determinó un porcentaje de blastos mucho menor, el cual fue de 0.4% y 2% respectivamente; además, las muestras presentaron una expresión de sus antígenos de manera normal al identificar estadios normales de diferenciación. Con estos resultados, los casos se consideraron como normales y se descartó la posible recaída que se sospechó mediante el análisis morfológico (falsos positivos). Estos dos casos más otros cinco fueron determinados como normales mediante CFM, lo que dio un total de siete muestras

normales, mientras que por morfología en seis casos se determinó que no se trataba de una LA; uno de estos seis fue descartado como normal debido a que por CFM se diagnosticó una LLA de linaje B (Pre-B común). De manera que solamente cinco casos fueron concordantes en ambos métodos para descartar una LA.

En siete casos por morfología no se logró identificar la presencia de células leucémicas (muestras con mala calidad para el análisis morfológico), sin embargo, en el inmunofenotipo por CFM fueron positivas para LA.

Correlación entre el valor de blastos obtenidos por morfología y por citometría de flujo multiparamétrica

Se calculó el coeficiente de correlación con el valor de blastos obtenidos mediante morfología y por CFM

(52 muestras) y se identificó una R^2 de 0.9406, lo cual muestra una buena correlación entre ambos métodos. Como se puede apreciar en la *Figura 1*, en la mayoría de los casos los puntos no se encuentran tan alejados de la línea de regresión.

Subtipos de leucemia aguda obtenidos mediante inmunofenotipificación

De la población estudiada y de acuerdo con los resultados del análisis inmunofenotípico (*Figura 2*).

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

En cuanto a las LALA, un caso (25%) las células expresaban marcadores de células B/mieloide, un caso (25%)

Tabla 5: Características del perfil inmunofenotípico de las leucemias agudas de los pacientes incluidos en este estudio.

Núm.	Perfil inmunofenotípico	Clasificación	
		EGIL	FAB
1	CD34+, CD123+, TdT+, CD22+, CD79a+, CD19+, CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, CD58+, CD15+, CD66c+	Pro-B	LLA-L2
2	CD34+, CD123+, CD22+, CD19+, CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, CD58+, CD15+, CD66c+	Pro-B	S/Dx
3	CD34+, CD79a+, CD19+, CD38+, CD9+, CD81+, CD58+, CD13+	Pro-B	LLA-L2
4	CD34+, CD123+, HLA-DR+, TdT+, CD22+, CD19+, CD10+, CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, CD21+, CD66c+, CD11b+, CD16+, CD71+	Pre-B común	LLA-L2
5	CD34+, CD123+, TdT+, CD22+, CD19+, CD10+, CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, CD58+, CD66c+	Pre-B común	LLA-L2
6	CD34+, CD123+, TdT+, CD22+, CD19+, CD10+, CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, CD20+, CD58+, CD13+, CD66c+, CD15+	Pre-B común	LLA-L1
7	CD34+, CD123+, TdT+, CD22+, CD79a+, CD19+, CD10+, CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, λ +, CD58+, CD66c+	Pre-B común	LLA-L2
8	CD34+, CD123+, TdT+, CD22+, CD79a+, CD19+, CD10+, CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, CD66c+	Pre-B común	LLA-L2
9	CD34+, CD123+, TdT+, CD22+, CD79a+, CD19+, CD10+, CD38+, CD9+, CD81+, CD20+	Pre-B común	LLA-L2
10	CD34+, CD123+, CD22+, CD79a+, CD19+, CD10+, CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, CD20+, CD58+, CD66c+	Pre-B común	LLA-L1
11	CD34+, CD123+, CD22+, CD79a+, CD19+, CD10+, CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, λ +, CD58+, CD66c+	Pre-B común	LLA-L2
12	CD34+, CD123+, CD22+, CD79a+, CD19+, CD10+, CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, CD20+, CD58+, CD66c+	Pre-B común	LLA-L1
13	CD34+, CD123+, CD22+, CD79a+, CD19+, CD10+, CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, CD20+, CD58+, CD66c+	Pre-B común	LLA-L2
14	CD34+, CD123+, CD22+, CD79a+, CD19+, CD10+, CD38+, CD24+, CD81+, CD58+	Pre-B común	LLA-L1
15	CD34+, CD123+, CD22+, CD79a+, CD19+, CD10+, CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, CD58+	Pre-B común	LLA-L1
16	CD34+, CD123+, CD22+, CD19+, CD10+, CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, CD58+	Pre-B común	LLA-L2
17	CD34+, CD123+, CD22+, CD19+, CD10+, CD38+, CD9+, CD24+, CD20+, CD58+	Pre-B común	LLA-L1
18	CD34+, CD123+, CD22+, CD19+, CD10+, CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, CD58+, CD66c+	Pre-B común	LLA-L2

Continúa la Tabla 5: Características del perfil inmunofenotípico de las leucemias agudas de los pacientes incluidos en este estudio.

Núm.	Perfil inmunofenotípico	Clasificación	
		EGIL	FAB
19	CD34+, CD123+, CD22+, CD19+, CD10+, CD38+, CD9+, CD24+, CD20+, CD66c+	Pre-B común	LLA-L2
20	CD34+, CD123+, CD22+, CD19+, CD10+, CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, CD20+, CD58+, CD66c+	Pre-B común	LLA-L1
21	CD34+, TdT+, CD22+, CD79a+, CD19+, CD10+, CD38+, CD9+, CD24+, CD20+	Pre-B común	LLA-L1
22	CD34+, TdT+, CD22+, CD79a+, CD19+, CD10+, CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, CD20+	Pre-B común	LLA-L2
23	CD34+, TdT+, CD22+, CD19+, CD10+, CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, CD58+	Pre-B común	LLA-L2
24	CD34+, TdT+, CD19+, CD10+, CD22+, CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, CD66c+	Pre-B común	LLA-L1
25	CD34+, CD22+, CD79a+, CD19+, CD10+, CD38+, CD9+, CD24+, CD20+, CD58+	Pre-B común	LLA-L2
26	CD34+, CD22+, CD79a+, CD19+, CD10+, CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, CD58+	Pre-B común	S/Dx
27	CD34+, CD22+, CD19+, CD10+, CD38+, CD9+, CD24+, CD81+	Pre-B común	LLA-L2
28	CD34+, CD22+, CD19+, CD10+, CD38+, CD9+, CD24+, CD81+	Pre-B común	LLA-L1
29	CD34+, CD38+, CD10+ (8%) /CD34-, CD38+, CD10+ (2%)	Pre-B común	NO LA
30	CD123+, TdT+, CD22+, CD79a+, CD19+, CD10+, CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, CD58+, CD66c+	Pre-B común	LLA-L2
31	CD123+, CD22+, CD79a+, CD19+, CD10+, CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, CD20+, λ+, CD58+	Pre-B común	LLA-L2
32	CD123+, CD22+, CD19+, CD10+, CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, CD58+	Pre-B común	LLA-L2
33	CD123+, CD22+, CD19+, CD10+, CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, CD58+, CD66c+	Pre-B común	S/Dx
34	TdT+, CD10+, CD38+	Pre-B común	LLA-L1
35	CD22+, CD79a+, CD19+, CD10+, CD38+, CD9+, CD81+, CD20+, CD58+	Pre-B común	LLA-L1
36	CD22+, CD79a+, CD19+, CD10+, CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, CD20+, CD58+	Pre-B común	LLA-L2
37	CD22+, CD79a+, CD19+, CD10+, CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, CD20+, CD58+	Pre-B común	LLA-L2
38	CD22+, CD19+, CD10+, CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, CD20+, CD58+, CD66c+	Pre-B común	LLA-L1
39	CD34+, CD22+, CD79a+, CD19+, cyIgM+, CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, CD10+, CD58+, CD15+	Pre-B	S/Dx
40	CD123+, CD22+, CD79a+, CD19+, cyIgM+, CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, CD10+, CD20+, λ+, CD66c+	Pre-B	LLA-L2
41	CD22+, CD79a+, CD19+, cyIgM+, CD38+, CD9+, CD24+, CD81+, λ+, CD58+, CD15+	Pre-B	LLA-L2
42	cyCD3+, CD2+, CD5+, CD7+	LLA-T	LLA-L1
43	cyCD3+, sCD3+, CD7+	LLA-T	LLA-L2
44	cyCD3+, sCD3+, CD8+, CD7+, CD10+	LLA-T	S/Dx
45	CD34+, CD123+, CD117+, HLA-DR+, MPox-, CD33+, CD38+, CD7+, CD19+, CD105+	Mieloide	LMA-M1
46	CD34+, CD117+, HLA-DR+, MPox+, CD13+, CD33+, CD15+, CD64+, CD16+, CD38+, CD71+	Mieloide	LMA-M2
47	CD34+, CD117+, HLA-DR+, MPox+, CD13+, CD33+, CD38+, CD7+, CD71+	Mieloide	LMA-M2
48	CD34+, CD117+, MPox+, CD13+, CD33+, CD64+	Mieloide	LMA-M3
49	CD34+, CD58+, CD38+, CD9+, CD81+, [CD22+, CD19+, CD10+, CD24+ (4.5 puntos)] CD13+, CD33+ (2 puntos)	LA B/mieloide	LLA-L2
50	CD34+, CD123+, HLA-DR+, CD38+, cyCD3+, CD7+ (2.7 puntos) CD11b+, CD16+, CD35+, [MPox+, CD13+, CD33+, CD117+, CD14+, CD15+, CD64+ (6.5 puntos)] CD71+, CD36+	LA T/Mie-loide	LMA-M2
51	CD34+, CD123+, CD38+, CD58+, CD9+, CD81+, [CD22+, CD79a+, CD19+, CD10+, CD24+ (6.5 puntos)] suCD3+, CD7+ (2.5 puntos) CD66c+	B/T	S/Dx
52	CD34+, CD38+, CD9+, [CD22+, CD79a+, cyIgM+, CD19+, CD10+ (8 puntos)] cyCD3+ (2 puntos)	B/T	S/Dx

S/Dx = Sin diagnóstico, muestra de mala calidad; LA = Leucemia aguda; MPox = Mieloperoxidasa.

la expresión de sus marcadores fue de células T/mieloide y dos (50%) correspondieron marcadores de células B/T.

Resultados epidemiológicos

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

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

se presentó un paciente con el dato de edad sin referir (S/D) (Figura 3).

Resultados de parámetros hematológicos

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

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

Tabla 6: Característica de las muestras de médula ósea de los pacientes pediátricos con sospecha de LA diagnosticados por morfología e inmunofenotipificación.

Núm.	Género	Edad (años)	Análisis morfológico		Análisis inmunofenotípico		Concordancia
			% Blastos	Clasificación FAB	% Blastos	Clasificación EGIL	
1**	F	13	23.5	LLA-L2	12.7	Pro-B	Concordante
2**	F	17	89.8	LLA-L2	91.6	Pro-B	Concordante
3	F	7	-	S/Dx	63.9	Pro-B	Discordante (A)
4	M	4	87.6	LLA-L1	63.0	Pre-B común	Concordante
5	M	2	94.8	LLA-L1	78.0	Pre-B común	Concordante
6	M	3	90.4	LLA-L1	74.2	Pre-B común	Concordante
7	M	4	84.4	LLA-L2	67.5	Pre-B común	Concordante
8	F	4	70.2	LLA-L1	58.3	Pre-B común	Concordante
9	F	5	93.0	LLA-L2	77.6	Pre-B común	Concordante
10	F	6	70.4	LLA-L1	70.7	Pre-B común	Concordante
11	F	5	80.3	LLA-L2	64.0	Pre-B común	Concordante
12	F	7	86.2	LLA-L2	80.0	Pre-B común	Concordante
13	F	14	94.1	LLA-L2	74.5	Pre-B común	Concordante
14	F	5	86.9	LLA-L2	76.2	Pre-B común	Concordante
15	M	16	87.5	LLA-L2	82.6	Pre-B común	Concordante
16	M	4	80.0	LLA-L2	80.5	Pre-B común	Concordante
17	F	11	58.6	LLA-L2	61.8	Pre-B común	Concordante
18	M	12	29.0	LLA-L2	25.5	Pre-B común	Concordante
19	M	5	88.7	LLA-L1	72.6	Pre-B común	Concordante
20	M	14	35.2	LLA-L1	12.1	Pre-B común	Concordante
21	F	1	81.0	LLA-L1	74.4	Pre-B común	Concordante
22	F	5	84.7	LLA-L2	62.5	Pre-B común	Concordante
23**	F	15	87.4	LLA-L1	82.3	Pre-B común	Concordante
24	M	3	77.4	LLA-L2	65.2	Pre-B común	Concordante
25	F	5	86.0	LLA-L1	77.6	Pre-B común	Concordante
26**	M	9	97.9	LLA-L2	88.1	Pre-B común	Concordante
27	F	9	85.6	LLA-L2	66.7	Pre-B común	Concordante

Continúa la Tabla 6: Característica de las muestras de médula ósea de los pacientes pediátricos con sospecha de LA diagnosticados por morfología e inmunofenotipificación.

Núm.	Género	Edad (años)	Análisis morfológico		Análisis inmunofenotípico		Concordancia
			% Blastos	Clasificación FAB	% Blastos	Clasificación EGIL	
28	F	2	96.0	LLA-L2	80.7	Pre-B común	Concordante
29	F	5	86.0	LLA-L2	82.3	Pre-B común	Concordante
30	F	14	93.4	LLA-L2	78.5	Pre-B común	Concordante
31	M	7	66.6	LLA-L2	52.0	Pre-B común	Concordante
32	M	5	95.1	LLA-L1	92.0	Pre-B común	Concordante
33	M	3	78.5	LLA-L1	79.4	Pre-B común	Concordante
34	M	6	96.8	LLA-L2	90.0	Pre-B común	Concordante
35**	M	7	84.6	LLA-L1	88.4	Pre-B común	Concordante
36	M	14	-	S/Dx	48.5	Pre-B común	Discordante (A)
37*	M	9	-	S/Dx	73.1	Pre-B común	Discordante (A)
38**	M	10	4.5	No LA	10.0	Pre-B común	Discordante, mediante el análisis morfológico se encontró un porcentaje menor de blastos que los obtenidos mediante CFM
39*	M	7	73.1	LLA-L2	73.0	Pre-B	Concordante
40	M	2	-	S/Dx	64.4	Pre-B	Discordante (A)
41	M	15	92.3	LLA-L2	72.0	Pre-B	Concordante
42	F	1	81.3	LLA-L2	74.0	LLA-T	Concordante
43	M	13	88.4	LLA-L1	85.1	LLA-T	Concordante
44	M	3	-	S/Dx	52.0	LLA-T	Discordante (A)
45	M	11	48.9	LMA-M2	50.5	Mieloide	Concordante
46	M	—	85.2	LMA-M3	72.0	Mieloide	Concordante
47**	M	13	94.8	LMA-M1	83.4	Mieloide	Concordante
48**			39.4	LMA-M2	37.8	Mieloide	Concordante
49			48.6	LLA-L2	48.9	B/Mieloide	Discordante, Mediante el análisis morfológico se determinó una LLA-L2 y por CFM una LAB
50**			53.4	LMA-M2	47.0	T/Mieloide	Discordante, Por morfología se determinó una LMA-M2 y mediante CFM se determinó una LAB
51			-	S/Dx	92.5	LALA B/T	Discordante (A)
52			-	S/Dx	73.0	LALA B/T	Discordante (A)
53**			12.0	LA	0.4	MO normal	Discordante, Número de blastos identificados
54**			10.4	LA	2.0	MO normal	Discordante, Número de blastos identificados
55			0.4	No LA	2.0	MO normal	Concordante
56			0.8	No LA	0.8	MO normal	Concordante
57**			2.3	No LA	0.7	MO normal	Concordante
58*			2.4	No LA	2.0	MO normal	Concordante
59**			1.0	No LA	2.0	MO normal	Concordante

MO = médula ósea; S/Dx = sin diagnóstico debido a que la muestra era de mala calidad desde el punto de vista morfológico; LA = leucemia aguda; LALA = leucemia aguda de linaje ambiguo; CFM = citometría de flujo multiparamétrica; no LA = por morfología no se identificó una leucemia aguda; * = pacientes de recién diagnóstico; ** = pacientes con sospecha recaída; discordante (A): el diagnóstico morfológico no se logró realizar sin embargo, por CFM si se realizó el diagnóstico.

En cuanto al conteo plaquetario, se encontró una media de 84.2×10^3 plaquetas/ μL ($12-341 \times 10^3/\mu\text{L}$) y 90.4% presentó trombocitopenia (Tablas 9 y 10).

DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Las leucemias agudas (LA) comprenden un grupo heterogéneo de enfermedades malignas caracterizadas por la expansión clonal de células precursoras hematopoyéticas^{15,16} en la MO y sangre periférica. Este tipo de leucemias son el tipo de cáncer más común en los niños, pues representan 25-35% de los casos de cáncer infantil en la mayoría de las poblaciones en vías de desarrollo.¹⁷

Se reconocen dos categorías principales: LLA y LMA, pero un pequeño número de casos no corresponden con estos dos grupos, porque no muestran evidencia clara de diferenciación de un solo linaje o expresan antígenos de diferenciación altamente específicos de más de un linaje¹⁵ y se denominan leucemias agudas de linaje ambiguo (LALA).

El diagnóstico de las LA se realiza con base en las manifestaciones clínicas y el estudio de las células leucémicas de SP y MO.¹⁸ Estos estudios incluyen: evaluación morfológica, inmunofenotipo y genética molecular y citogenética.

Tabla 7: Resultados positivos y negativos para LA obtenidos mediante morfología e inmunofenotipificación.

	Inmunofenotipo positivo	Inmunofenotipo negativo
Morfología positiva	42	2
Morfología negativa	10	5

Tabla 8: Parámetros determinados para el análisis morfológico.

Parámetro	%
Sensibilidad	80
Especificidad	71
Valor predictivo positivo	95
Valor predictivo negativo	33

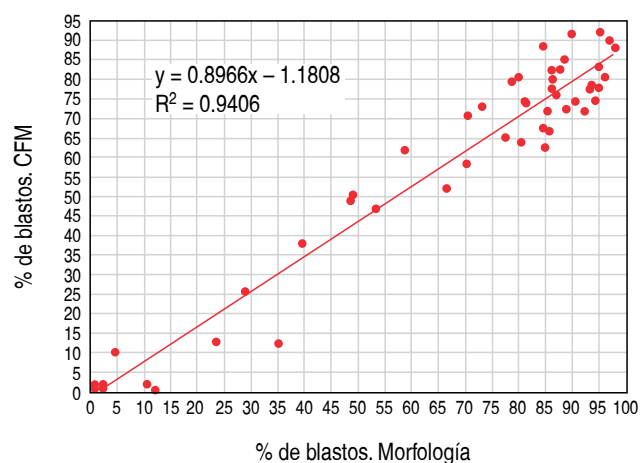


Figura 1: Correlación entre el porcentaje de blastos obtenidos por morfología y por citometría de flujo multiparamétrica.

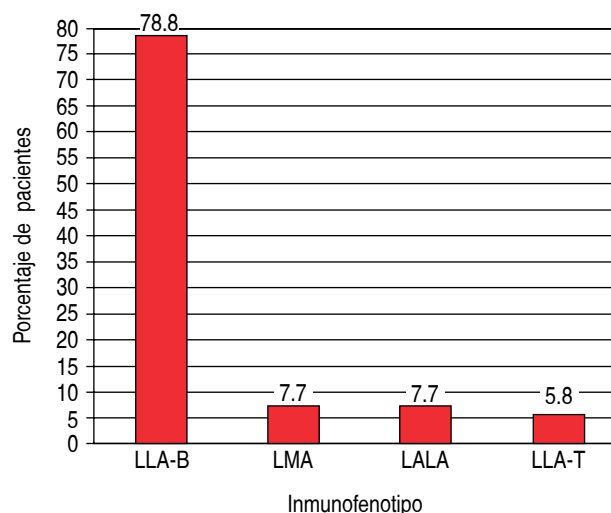


Figura 2: Distribución de subtipos de LA determinados por inmunofenotipo.

La evaluación morfológica de la MO, como primer paso en el algoritmo de diagnóstico de las LA,⁵ permite distinguir una LLA de una LMA.⁴ Junto con la morfología, la inmunofenotipificación mediante CFM es crucial para la detección y asignación del linaje, así como el estadio de maduración de las células blásticas en muestras sospechosas de leucemia, pues es la que permite realizar el diagnóstico y la clasificación definitiva de las LA.⁵

Es este trabajo, inicialmente, se evaluó la calidad de la muestra. Siete casos (11.8%) no pudieron analizarse por morfología, ya que las muestras eran de mala calidad, estaban coaguladas y presentaban una gran cantidad de células destruidas; otras muestras contenían mallas de fibrina o

coágulo. La presencia de coágulos pudo deberse a que no se colocó inmediatamente el aspirado en el tubo con EDTAK2 o que no se mezcló con el anticoagulante después de haberla colocado en él, ya que la MO se coagula más rápidamente que la SP⁶ o incluso que la muestra se haya coagulado debido a una mala punción medular o una extracción difícil.¹⁸ La gran cantidad de células destruidas, las hendiduras en los linfocitos y las células en apoptosis que se observaron en estas muestras pudieron provocarse por almacenamiento prolongado si se considera que no fueron remitidas al laboratorio de manera inmediata, posteriormente de la toma de muestra. La calidad de estas muestras concordó con lo obtenido por CFM, ya que mostraron un bajo porcentaje de viabilidad.

Ocho de las 58 muestras de MO contenían grumos medulares y 21 presentaban megacariocitos, lo cual indica que el resto de las muestras se encontraban hemodiluidas, de acuerdo con D'Onofrio y col.¹⁷ la dilución con SP puede llegar a ser de 40 al 100% en las muestras de MO de 0.25-0.5 mL.¹⁷

En este estudio, se encontró una correlación de 79.6% entre el análisis morfológico y el inmunofenotípico; así este resultado es muy cercano al obtenido y publicado por el Dr. Alejandro Ruiz-Argüelles en 2002, quien reportó una correlación de 73% entre ambos métodos de un total de 648 casos de LA. Adicionalmente, en nuestro país, los doctores Guillermo y Alejandro Ruiz-Argüelles han generado información de importancia en el diagnóstico y clasificación inmunológica de las leucemias agudas. Dicha información está sustentada en la optimización de recursos y sobre todo en la correcta combinación de anticuerpos monoclonales a utilizar.¹⁹⁻²³ Marsán y

colaboradores²⁴ reportaron en 2016 una correlación de 81.3%, sin embargo, en este estudio solamente se analizaron casos de LLA.²⁴ El índice kappa (κ) de 0.352 obtenido en este estudio indica que la concordancia es aceptable dado que se encuentra dentro del intervalo de 0.21-0.40.²⁵

Los resultados discordantes se encontraron en los siguientes casos:

- A) Un caso en el que la morfología fue LLA-L2 y por CFM fue una LALA (células B/mieloide).
- B) Un caso que por CFM fue una LALA con marcadores de células T/mieloide y morfológicamente se clasificó como una LMA-M2, debido a que los blastos presentaban una morfología mieloide con presencia de gránulos azurófilos en el citoplasma; sin embargo, estos gránulos presentaban un tamaño más grande que los observados en los otros casos de LMA-M2, además se encontraron pseudo-Pelger-Huët y neutrófilos hipogranulares y los precursores eritroides presentaron características megaloblastoides. Estos hallazgos permitieron clasificar este caso como LMA-M2; los gránulos observados en los blastos se correlacionan con el resultado del inmunofenotipo ya que presentó positividad a la MPOx. Un caso similar como éste fue reportado por Sharma y su equipo,²⁶ en el que uno de los pacientes con bifenotipia T/mieloide reveló la presencia de bastones de Auer en los blastos.²⁶ Como se ha encontrado en este estudio, las LALA se pueden presentar morfológicamente como LLA o LMA, similar al estudio realizado por Matutes y col., en el cual, de 90 casos de LALA, 39 mostraron una morfología de LLA, 38 se clasificaron como LMA de subtipos M1 y M5 y, rara vez, M2 o M4 y ningún caso fue M3, M6 o M7.²⁷ Asimismo, Sharma y su grupo²⁴ reportaron que de 15 casos con LAB, 11 presentaron una morfología LMA-M1, M2 o M4/5 y ninguno presentó una LMA-M3, M6 o M7.²⁶ De acuerdo con los hallazgos anteriores, al estudiar un caso con LALA mediante un análisis morfológico inicial, no se podría sospechar de este tipo de leucemia, y por lo tanto, el diagnóstico de LALA se basa en la inmunofenotipificación y la exclusión por citogenética de los casos de LMA con anomalías genéticas recurrentes.²⁷
- C) Dos casos con presunta recaída fueron diagnosticados como positivos mediante morfología. En cada caso se encontró un porcentaje de blastos de 12 y 10.4%, sin embargo, la morfología no permitió determinar el linaje, mientras que por CFM encontraron 0.4 y 2% de células inmaduras y con un patrón de la expresión

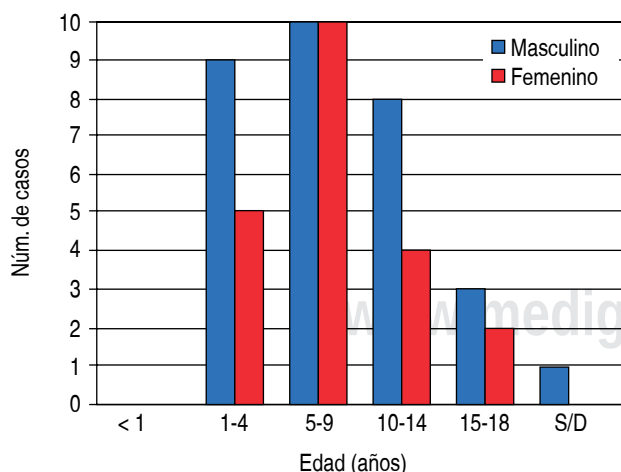


Figura 3: Intervalo de edades y número de pacientes masculinos y femeninos con LA.

de sus antígenos de manera normal. De esta manera se descartó la posible recaída.

- D) Un caso que por morfología se clasificó como normal, por CFM se diagnosticó LLA pre-B común y el porcentaje de blastos fue mayor al encontrado por morfología. En estas dos situaciones se destaca la importancia de la CFM para hacer el diagnóstico definitivo, además, se puede notar una de las limitantes que tiene la morfología en la determinación del número de blastos cuando éstos se encuentran en cantidades bajas y la sensibilidad analítica que presenta la CFM es mucho mayor (una célula neoplásica en 1,000,000 células analizadas) a la que tiene la morfología (una célula neoplásica en 1,000 células observadas), además de ser 100% operador dependiente. Así, la habilidad en la identificación de células y sus características morfológicas, morfométricas y tintoriales es la que condiciona los resultados.
- E) Siete casos (11.8%) no pudieron diagnosticarse por morfología debido a que mostraban una celularidad dañada o presencia de células destruidas, no así por citometría de flujo.

Los resultados con concordancia se encuentran de la siguiente forma:

- A) De los 44 casos por CFM se diagnosticó una LLA, y en 38 de éstos por morfología también se diagnosticó una LLA. B). Todos los casos (cuatro casos) en los que la CFM mostró un fenotipo mieloide por morfología

Tabla 9: Resultados de los parámetros hematológicos de 52 pacientes con LA.

Parámetro	n (%)
Leucocitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	
Media (intervalo)	88.7 (2-433.4)
< 50	28 (53.8)
> 50	24 (46.2)
Hemoglobina (g/dL)	
Media (intervalo)	8.9 (3.2-14.2)
< 11	43 (82.7)
11-18	9 (17.3)
Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	
Media (intervalo)	84.2 (12-341)
< 150	47 (90.4)
150-450	5 (9.6)

Tabla 10: Resultados de los parámetros hematológicos de 52 pacientes de acuerdo con el tipo de LA.

Parámetro	LLA-B n (%)	LLA-T n (%)	LALA n (%)	LMA n (%)
Leucocitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)				
< 50	23 (56)	0	3 (75)	
> 50	18 (44)	3 (100)	1 (25)	
< 20				
> 20				
Hemoglobina (g/dL)				
< 11	35 (85.4)	1 (33.3)	4 (100)	4 (100)
11-18	6 (14.6)	2 (66.6)		2 (50)
Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)				
< 150	36 (87.8)	3 (100)	4 (100)	2 (50)
150-450	5 (12.2)			4 (100)

fueron LMA, y C) y de los siete casos que por CFM mostraron un fenotipo normal, cinco de éstos por morfología también fueron normales.

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

Los resultados obtenidos indican que el análisis morfológico se oriente hacia una LLA o LMA, sin embargo, no es suficiente para realizar el diagnóstico definitivo en las LA, sobre todo cuando la muestra no es de calidad adecuada o cuando se trata de una LALA. El resultado de la morfología debe confirmarse siempre con el estudio inmunofenotípico y siempre se debe realizar este último, ya que es el que finalmente determina el linaje específico afectado, así como la etapa de maduración o diferenciación en la que las células leucémicas están detenidas y por consiguiente permite, en algunos casos, estratificar el nivel de riesgo, pronóstico y tratamiento del paciente.

Se calculó el coeficiente de correlación entre el porcentaje de blastos obtenidos mediante morfología y por CFM y se encontró una R^2 de 0.9406. Este resultado indica que hubo una buena correlación entre ambos métodos,

ya que en la mayoría de los casos el porcentaje de blastos fue muy similar. Sin embargo, se presentaron dos casos en los que por morfología se detectó un porcentaje muy elevado de blastos (comparándolo con el obtenido por CFM), de manera que se consideraron como LA, mientras que por CFM esta enfermedad fue descartada por el bajo porcentaje de células inmaduras encontradas y que además mostraron una diferenciación normal, aunque en algunos casos ocurrió lo contrario. Esta incongruencia fue más notoria en los casos en los que por CFM se detectaron bajos porcentajes de células inmaduras, es decir, de 0.4 a 12.7%. Estos resultados pueden atribuirse a diversos factores, como la diferencia en la cantidad de células que se cuentan en ambos métodos, ya que por morfología se contaron aproximadamente 1,000 células mientras que por CFM se adquieren más de 100,000 eventos. Otro factor a considerar es que, cuando se realiza el extendido del aspirado medular, muchos blastos son destruidos por la manipulación al momento de la toma de muestras,^{14,28,29} y si el porcentaje de blastos es pequeño, la disminución es más evidente. En los dos casos donde se encontró mayor porcentaje de blastos por morfología (diagnosticados como LA por morfología y por CFM descartados) se pudieron haber confundido algunas células normales por células leucémicas, debido a que morfológicamente presentaban una apariencia de blastos, sin embargo, estos pacientes ingresaron por diagnóstico de recaída (estuvieron bajo tratamiento quimioterapéutico), lo cual explicaría la dificultad de distinguir claramente una célula madura de una inmadura, ya que éstas presentaban cambios en su morfología.

Kerrigan y su grupo³⁰ realizaron un estudio sobre los cambios morfológicos de las células sanguíneas después de la quimioterapia y encontraron, entre otros cambios, que células monocíticas presentaban núcleos inmaduros.³⁰ Esta situación pudo presentarse en estos dos casos debido a que agentes quimioterapéuticos pueden dar origen a cambios displásicos en las células.⁶ Es por ello que en los casos de recaída, el inmunofenotipo debe volver a realizarse y considerarse todos los marcadores celulares.

En cuanto al subtipo de LLA de la clasificación FAB, se encontró un mayor porcentaje de LLA-L2 (63.2%), mientras que del subtipo L1 fue de 36.8% y no se encontró ningún tipo con morfología L3. Los resultados concuerdan con los obtenidos por Morales y cols.³¹ donde encontraron 62% en L2 y 38% en L1, sin presencia de L3.³¹ Cabe mencionar que la clasificación FAB no es la única forma en la cual debe clasificarse una LA ya que no ayuda a planificar el tratamiento.³²

Los subtipos de LMA más comunes en los niños son: M1, M2, M3 y M4, sin embargo, en los niños con sín-

drome de Down el subtipo M7 se ven con frecuencia.³³ Los cuatro casos de LMA encontrados en este estudio presentaron una morfología de M1, M2 y M3. Estos resultados concuerdan con los reportados por la literatura.

La LMA-M3 ahora es altamente curable cuando se administra ácido transretinoico (ATRA) y quimioterapia (antraciclina),³⁴ sin embargo, un conteo $\geq 10 \times 10^3$ células/ μL denota un riesgo alto, ya que tienen un mayor riesgo de muerte temprana y recaída.³ El conteo leucocitario del caso con LMA-M3 en este estudio fue de $40 \times 10^3/\mu\text{L}$, además de un conteo plaquetario de $19 \times 10^3/\mu\text{L}$, lo que sugiere que se trataba de un paciente de alto riesgo.

La importancia de la morfología en la LMA-M3 destaca aún más, ya que la morfología de los promielocitos y las características clínicas del paciente indicarán un diagnóstico presuntivo de esta entidad y en ésta, a diferencia de casi todas las otras LA, el tratamiento de este tipo de leucemias debe realizarse de manera inmediata por considerarse una urgencia hematológica. El tratamiento final se establece cuando se confirme la presencia de la translocación t (15:17) mediante métodos citogenéticos o moleculares.³⁵

La LLA de linaje B es el cáncer más frecuente en la infancia;³⁶ esta información se puede constatar con los resultados obtenidos en este estudio, ya que se encontró 78.8% de LLA-B, 5.8% de LLA-T y 7.7% de LMA. En el estudio realizado por Bekker y colaboradores³⁷ encontraron 85.1% de pacientes con LLA-B, 10.8% con LLA-T, y 4.1% pacientes con LALA. Pérez y col. reportaron 85.1% de casos con LLA y 12.3% con LMA.³⁸

En cuanto a la subclasificación de la LLA-B, se encontró un mayor porcentaje en la LLA pre-B común (85.4%), mientras que del subtipo LLA-B madura no se encontró ningún caso. Las frecuencias de distribución reportadas por varios grupos de trabajo internacionales son: pro-B 3%, pre-B común 60-65%, pre-B 9%, B maduras 3% y células T 10%.³⁹ Los resultados concuerdan también con el obtenido por Morales y col. (85% de LLA pre-B común).³¹

En este estudio se encontró 7.6% de LAB, sin embargo en la literatura frecuentemente se informa que la prevalencia es menos de 5% de las leucemias infantiles.⁴⁰ Los resultados en este tipo de LA llegan a ser muy variados, pues en este mismo hospital pero en otro estudio se reportó 28.3% de LALA.⁴¹ En cuanto a la proporción de subtipos de LALA, el resultado concordó con el reportado por Dorantes y cols.⁴¹ ya que en ambos se encontró un mayor porcentaje de B/T linfóide. La LALA es un grupo biológicamente diferente de LA y es importante identificarla porque es de mal pronóstico, recaída temprana e infiltración extramedular²⁶ y, por tanto, requiere de un tratamiento más intensivo.⁴⁰

Estudios epidemiológicos informan que existe una mayor prevalencia de LA en pacientes masculinos, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este estudio, ya que se encontró 59.6% de pacientes masculinos y 40.4% de pacientes femeninos. Resultados cercanos se obtuvieron en un estudio realizado en nuestro país por Rivera y cols.,² en un periodo de 2007 a 2012, en el cual los varones representaron 54.4% de los pacientes con LA.² Otro estudio realizado en 2016 por Mayer y col. en este hospital, de 549 pacientes con LA, 55% fue de pacientes masculinos.⁴²

Con respecto a la edad, se encontraron pacientes desde uno hasta 17 años, con una edad promedio de 7.7. El intervalo en el que se encontraron más casos fue de cinco a nueve años (38.5%) seguido de pacientes de uno a cuatro años (26.9%). En el estudio realizado por Rivera y cols.² encontraron una mayor prevalencia en los niños con cero a cuatro años (35%) y 29% en pacientes de cinco a nueve años. El estudio realizado por Morales y colegas³¹ en un periodo de 2008 a 2010, en 54 pacientes con LLA, el mayor número de pacientes se ubicó entre uno y 10 años y la media fue de 8.3 años (intervalo de uno a 17 años). Bekker y su equipo³⁷ reportaron que en 638 pacientes pediátricos con diagnóstico reciente de LLA de la Ciudad de México, la edad media de toda la población fue de 6.2 años.³⁷ Como se puede observar, la edad promedio obtenida es similar en estos estudios.

El valor normal del número de leucocitos durante la infancia es variable, por la influencia de la edad, sexo y raza, de acuerdo con Jaime y su grupo,^{43,44} quienes consideran de manera general que el valor de referencia para leucocitos se encuentra en el intervalo de $4.0\text{--}14.5 \times 10^3/\mu\text{L}$. En este estudio se encontraron nueve (17.3%) pacientes con conteos normales de leucocitos. Un conteo $> 50 \times 10^3/\mu\text{L}$ se considera de alto riesgo.⁴³ En este estudio se encontraron 23 (56%) con un conteo < 50 leucocitos $\times 10^3/\mu\text{L}$ y el resto (44%) presentó > 50 leucocitos $\times 10^3/\mu\text{L}$ (leucocitosis); estos pacientes presentan un alto riesgo de muerte temprana, ya que en la LLA con leucocitosis es más común que se desarrolle el síndrome de lisis tumoral (SLT).⁴⁴⁻⁴⁶

La LLA-T es una enfermedad agresiva, y estos pacientes a menudo tienen características clínicas de alto riesgo, como la edad⁴⁷ e hiperleucocitosis con infiltración extramedular.⁴⁸ Los resultados encontrados en este estudio concuerdan con lo descrito anteriormente ya que los tres casos de LLA-T presentaron leucocitosis ($> 50 \times 10^3/\mu\text{L}$), dos de ellos con hiperleucocitosis y un paciente que además de presentar hiperleucocitosis contaba con una edad de 13 años. Estas características desfavorables muestran que estos pacientes presentan un mayor riesgo de recaída o muerte temprana.⁴⁸

En las LMA, una cifra de leucocitos $< 20 \times 10^3/\mu\text{L}$ se asocia con un mejor pronóstico.³ En el estudio los cuatro pacientes con LMA presentaron un conteo leucocitario $> 20 \times 10^3/\mu\text{L}$, dos de ellos con hiperleucocitosis. Estos conteos altos sugieren una baja tasa de remisión completa en estos pacientes⁴⁹ y una muerte temprana. El diagnóstico temprano de la LMA es de gran importancia, ya que la hiperviscosidad celular causada por la elevación extrema de leucocitos puede conducir rápidamente a una falla orgánica múltiple y la muerte.⁵⁰

En cuanto a los otros parámetros hematológicos, en 43 (82.7%) pacientes se encontró una hemoglobina < 11 g/dL y 47 pacientes (90.4%) presentaron trombocitopenia ($< 150 \times 10^3/\mu\text{L}$). Estos hallazgos son causados por el fracaso de la hemopoyesis normal y el reemplazo de las células normales por las células leucémicas, lo que resulta en anemia, sangrado y mayor riesgo de infecciones.³³

CONCLUSIONES

Se encontró una correlación de 0.9406 y una concordancia de 79.6%, con un índice kappa de 0.325 entre el método morfológico y el inmunofenotípico en el diagnóstico de leucemias agudas. En la mayoría de los casos la morfología orientó hacia una LLA o una LMA.

Es necesario realizar el análisis morfológico antes de realizar el inmunofenotipo para clasificar el linaje específico y la etapa de diferenciación de las células leucémicas, pues ambos estudios son complementarios y no excluyentes.

Las LALA morfológicamente pueden mostrarse como LLA o LMA, razón por la cual la morfología es limitada en estos casos y la inmunofenotipificación ideal para la caracterización de las células leucémicas; éste es el método de elección en la identificación de este tipo de leucemias.

En los casos de recaída, se debe realizar siempre un nuevo inmunofenotipo considerando el mayor número de marcadores celulares en los diferentes linajes hematopoyéticos.

Para el análisis morfológico es importante que las muestras sean de buena calidad ya que, si la muestra está coagulada o con abundantes células destruidas, se limita su evaluación.

REFERENCIAS

1. Whitehead TP, Metayer C, Wiemels JL, Singer AW, Miller MD. Childhood leukemia and primary prevention. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*. 2016; 46 (10): 317-352.
2. Rivera-Luna R, Shalkow-Klincovstein J, Velasco-Hidalgo L, Cárdenas-Cardós R, Zapata-Tarrés M, Olaya-Vargas A et al. Descriptive epidemiology in Mexican children with cancer under

- an open national public health insurance program. *BMC Cancer*. 2014; 14: 790.
3. De Kouchkovsky I, Abdul-Hay M. Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update. *Blood Cancer J*. 2016; 6 (e441): 1-10.
 4. Govindan R, Morgensztern D. Manual Washington de oncología. 3a ed. España: Wolters Kluwer; 2016.
 5. Chiaretti S, Zini G, Bassan R. Diagnosis and subclassification of acute lymphoblastic leukemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2014; 6 (1): e2014073.
 6. Rodak BF, Fritsma GA, Keohane EM. Hematología. Fundamentos y aplicaciones clínicas. 4a ed. México: Médica Panamericana; 2014.
 7. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*. 1995; 9 (10): 1783-1786.
 8. Creutzig U, van den Heuvel-Eibrink MM, Gibson B, Dworzak MN, Adachi S, de Bont E et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in children and adolescents: recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2012; 120 (16): 3187-3205.
 9. Juárez-Velázquez R, Pérez-Vera P. Citometría de flujo en la evaluación de enfermedad mínima residual en leucemia linfoblástica aguda. *Acta Pediatr Mex*. 2012; 33 (4): 198-206.
 10. Peters JM, Ansari MQ. Multiparameter flow cytometry in the diagnosis and management of acute leukemia. *Arch Pathol Lab Med*. 2011; 135 (1): 44-54.
 11. D'Onofrio G, Zini G. Morphology of blood disorders. 2nd ed. Italia: Wiley Blackwell; 2015.
 12. Lee SH, Erber WN, Porwit A, Tomonaga M, Peterson LC. ICSH guidelines for the standardization of bone marrow specimens and reports. *Int J Lab Hem*. 2008; 30 (5): 349-364.
 13. Bain BJ. Classification of acute leukemia: the need to incorporate cytogenetic and molecular genetic information. *J Clin Pathol*. 1998; 51 (6): 420-423.
 14. Bain BJ, Bates I, Blackmore S, Bradsha A, Catovsky D, De la Salle B et al. Dacie and Lewis. Practical haematology. 10th ed. España: Elsevier; 2008.
 15. van Dongen JJ, Lhermitte L, Böttcher S, Almeida J, van der Velden VH, Flores J et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*. 2012; 26 (9): 1908-1975.
 16. Zhang L, Samad A, Pombo-de-Oliveira MS, Scelo G, Smith MT, Feusner J et al. Global characteristics of childhood acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 2015; 29 (2): 101-125.
 17. Lepe-Zúñiga JL, Jerónimo-López FJ, Hernández-Orantes JG. Características citopatológicas de la leucemia aguda en el Hospital de Especialidades Pediátricas de Chiapas, México. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 2017; 74 (2): 122-133.
 18. Aznar J, Núñez A, Haro T, León A, Aldana J, González ER. Manual de obtención y manejo de muestras para el laboratorio clínico. Servicio Andaluz de Salud. España: Consejería de Salud. Junta de Andalucía; 2009.
 19. Ruiz-Argüelles A. La citología analítica moderna en el laboratorio de hematología. *Gac Méd Mex*. 2002; 138 (1): 155-159.
 20. Ruiz-Argüelles GJ. Advances in the diagnosis and treatment of acute and chronic leukemia in Mexico. *Sal Pub Méx*. 2016; 58 (2): 291-295.
 21. Ruiz-Argüelles A, Pérez-Romano B. La necesidad de las recomendaciones de consenso para la inmunotipificación de las hemopatías malignas. *Rev Hematol Mex*. 2010; 11 (2): 82-90.
 22. Ruiz-Argüelles A, Duque RE, Orfao A. Report on the first latin american consensus conference for flow cytometric immunophenotyping of leukemia. *Cytometry*. 1998; 34 (1): 39-42.
 23. Ruiz-Argüelles A, Rivadeneyra-Espinoza L, Duque RE, Orfao A. Report on the second latin american consensus conference for flow cytometric immunophenotyping of hematological malignancies. *Cytometry Part B*. 2005; 70 (1): 39-44.
 24. Marsán SV, del Valle PLO, Díaz DG, Macías AC, Machín GS, Lam DRM et al. Correlación entre morfología y citometría de flujo en la leucemia linfocítica aguda infantil. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter*. 2016; 32 (4): 483-493.
 25. Cerda J, Villarreal L. Evaluación de la concordancia inter-observador en investigación pediátrica: Coeficiente de Kappa. *Rev Chil Pediatr*. 2008; 79 (1): 54-58.
 26. Sharma M, Sachdeva MUS, Bose P, Varma N, Varma S, Marwaha RK et al. Haematological profile of patients with mixed-phenotype acute leukaemia from a tertiary care center of north India. *Indian J Med Res*. 2017; 145 (2): 215-221.
 27. Matutes E, Pickl W, van't Veer M, Morilla R, Swansbury J, Strobl H et al. Mixed-phenotype acute leukemia: clinical and laboratory features and outcome in 100 patients defined according to the WHO 2008 classification. *Blood*. 2011; 117 (11): 3163-3171.
 28. Bain BJ. Blood cells a practical guide. 5th ed. London: Wiley Blackwell; 2015.
 29. Bain BJ, Clark DM, Wilkins B. Bone marrow pathology. 4th ed. EUA: Wiley-Blackwell; 2010.
 30. Kerrigan DP, Castillo A, Foucar K, Townsend K, Neidhart J. Peripheral blood morphologic changes after high-dose antineoplastic chemotherapy and recombinant human granulocyte colony-stimulating factor administration. *Am J Clin Pathol*. 1989; 92 (3): 280-285.
 31. Morales-Peralta A, Covarrubias-Espinoza C, Rendón-García H, Larios-Farak TC. Supervivencia en niños con leucemia aguda linfoblástica tratados en base a factores de riesgo inmunomoleculares. *Bol Clin Hosp Infant Edo Son*. 2014; 31 (2): 90-95.
 32. Layton-Tovar C. Factores de pronóstico en leucemia linfoblástica aguda pediátrica: posibles marcadores moleculares. *Medicina e Investigación*. 2015; 3 (1): 85-91.
 33. Asif N, Hassan K, Yasmeen N. Acute myeloblastic leukemia in children. *Int J Pathol*. 2011; 9 (2): 67-70.
 34. Swerdlow SH, Campo E, Lee N, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th ed. Lyon: IARC; 2008.
 35. Tallman MS, Altman JK. How I treat acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 2009; 114 (25): 5126-5135.
 36. Sanjuan-Pla A, Bueno C, Prieto C, Acha P, Stam RW, Marschalek R et al. Revisiting the biology of infant t (4; 11)/MLL-AF4+ B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2015; 126 (25): 2676-2685.
 37. Bekker-Méndez VC, Miranda-Peralta E, Núñez-Enríquez JC, Olarte-Carrillo I, Guerra-Castillo FX, Pompa-Mera EN et al. Prevalence of gene rearrangements in Mexican children with acute lymphoblastic leukemia: a population study report from the Mexican interinstitutional group for the identification of the causes of childhood leukemia. *BioMed Res Inter*. 2014; 2014: 210560.
 38. Pérez-Saldivar ML, Fajardo-Gutiérrez A, Bernáldez-Ríos R, Martínez-Avalos A, Medina-Sanson A, Espinosa-Hernández L et al. Childhood acute leukemias are frequent in Mexico City: descriptive epidemiology. *BMC cancer*. 2011; 11: 355.
 39. Quero-Hernández A, Estrada CR, Pacheco PI, Reyes GU, Álvarez SRM, Vargas VM. Características clínicas e inmunofenotípicas en un grupo de niños con leucemia aguda linfoblástica. *Pediatría de México*. 2012; 14 (4): 166-171.

40. Bleahu ID, Vladasel R, Gheorghe A. A special case of acute leukemia in childhood. *J Med Life*. 2011; 4 (3): 297-301.
41. Dorantes-Acosta E, Medina-Sanson A, Dávila-Ornelas K, Briceida López-Martínez B. Clasificación inmunológica de las leucemias agudas linfoblásticas del Hospital Infantil de México «Federico Gómez», de acuerdo al EGIL (European Group for the Immunological Classification of Leukemia). *Gac Mex Oncol*. 2013; 12 (3): 136-142.
42. Mayer VR. Clasificación Inmunológica de las Leucemias Linfoblásticas Agudas del Hospital Infantil de México «Federico Gómez», de acuerdo al EGIL (European Group for the Immunological Classification of Leukemia) durante el periodo 2010-2015 [Tesis de Licenciatura]. México: HIMFG; 2016.
43. Jaime-Pérez JC, García-Arellano G, Herrera-Garza JL, Marfil-Rivera LJ, Gómez-Almaguer D. Revisiting the complete blood count and clinical findings at diagnosis of childhood acute lymphoblastic leukemia: 10-year experience at a single center. *Hematol Transfus Cell Ther*. 2018; 41 (1): 57-61.
44. Lustosa de Sousa DW, de Almeida FFV, Cavalcante FFH, de Oliveira LMV. Acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents: prognostic factors and analysis of survival. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2015; 37 (4): 223-229.
45. Röllig C, Ehninger G. How I treat hyperleukocytosis in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2015; 125 (21): 3246-3252.
46. Tasmeen R, Islam A, Alam ST, Begum M. Tumor lysis syndrome and hyperleukocytosis in childhood acute lymphoblastic leukemia in a tertiary care hospital. *Mymensingh Med J*. 2017; 26 (4): 906-912.
47. You MJ, Medeiros LJ, Hsi ED. T-lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Am J Clin Pathol*. 2015; 144 (3): 411-422.
48. Vadillo E, Dorantes-Acosta E, Pelayo R, Schnoor M. T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL): new insights into the cellular origins and infiltration mechanisms common and unique among hematologic malignancies. *Blood*. 2017; 32 (1): 36-51.
49. De Jonge HJ, Valk PJ, de Bont ES, Schuringa JJ, Ossenkoppele G, Vellenga E et al. Prognostic impact of white blood cell count in intermediate risk acute myeloid leukemia: relevance of mutated NPM1 and FLT3-ITD. *Haematologica*. 2011; 96 (9): 1310-1317.
50. Stucki A, Rivier AS, Gikic M, Monai N, Schapira M, Spertini O. Endothelial cell activation by myeloblasts: molecular mechanisms of leukostasis and leukemic cell dissemination. *Blood*. 2001; 97 (7): 2121-2129.

www.medigraphic.org.mx