

Utilidad del Estudio de Citometría de Flujo en el Diagnóstico de Síndromes Mielodisplásicos

Recomendaciones Generales del Grupo Rioplatense de Citometría de Flujo (GRCF)

Agriello E.¹⁻¹², Barcala V.², Bergna M.³, Cismondi V.⁴, Ensinck A.⁵, Escalada A.⁶, Fiorenza G.⁵, Giordano H.⁷, Halperin N.⁸, Monreal M.⁹⁻¹¹, Novoa A.⁴⁻⁸, Novoa V.¹⁰, Pardo L.¹¹, Sánchez, A.⁶.

Subcomisión de Síndromes Mielodisplásicos del GRCF

¹Hospital Penna- Bahía Blanca-Buenos Aires-Argentina. ²Citomlab-CABA- Argentina

³CUCAIBA-HIGA San Martín-La Plata. Buenos Aires Argentina

⁴CDM S.A.-CABA- Argentina

⁵Laboratorios Dres..Turner-Rosario-Santa Fé-Argentina

⁶Cytomed- CABA- Argentina

⁷Laboratorio de Asociación española primera de Socorros Mutuos-Montevideo-Uruguay

⁸Hospital Escuela San Martín-CABA-Argentina. ⁹FUNDALEU-CABA-Argentina

¹⁰Hospital Grl. de Agudos Dr Carlos G.Durand-CABA-Argentina ¹¹INTERPFLOW-Co

¹²Laboratorios de Especialidades Bioquímicas-Bahía Blanca- Buenos Aires - Argentina

Correspondencia: norasilviahalperin@hotmail.com

Fecha de recepción: 05-12-2010

Fecha de aprobación: 15-12-2010



ACTUALIZACIÓN

HEMATOLOGIA, Vol. 14 N° 3: 114-121
Septiembre-Diciembre, 2010

RESUMEN

La Citometría de Flujo (CMF) identifica y cuantifica antígenos de la superficie celular e intracitoplasmáticos cuya expresión está rigurosamente regulada a lo largo de la diferenciación y maduración de las células stem hematopoyéticas a células maduras funcionales de la sangre periférica. Numerosos trabajos han confirmado su utilidad en el estudio de los Síndromes Mielodisplásicos (SMD) y desde el año 2006, es considerada como un co-criterio en casos donde los criterios clásicos no son suficientes para fundamentar el diagnóstico. La relación tan precisa en la expresión antigénica que caracteriza a una médula ósea (MO) normal, se pierde en los procesos neoplásicos y se traduce en patrones fenotípicos alterados o aberrantes. La CMF se aplica al estudio de los SMD, identificando dichos patrones anormales, causantes ó estrechamente vinculados con la producción inadecuada de células hematopoyéticas que deviene en citopenias. La constelación en la expresión antigénica normal y más aún en su desregulación, subraya la complejidad del estudio de los SMD por CMF y explica la gran variabilidad encontrada en las publicaciones sobre su utilidad en el estudio de una patología intrínsecamente tan heterogénea. La difusión reciente del primer Consenso para el estudio de los SMD elaborado por el Grupo Rioplatense de Citometría de Flujo (GRCF), constituye un primer paso en dirección a

la estandarización intra e interlaboratorio en los estudios de esta patología. El GRCF tiene como objetivo seguir trabajando en este sentido con el fin de lograr una mayor consistencia en los procedimientos técnicos y analíticos, optimizando asimismo las estrategias de estudio acorde con las actualizaciones prospectivas publicadas sobre el tema.

Palabras claves: síndromes mielodisplásicos, citometría de flujo, estandarización, consenso, GRCF.

INTRODUCCIÓN

Los SMD representan un grupo heterogéneo de neoplasias mieloides caracterizados por una diferenciación y maduración anormal de las diferentes líneas celulares (eritroide, mieloides granulocítica y/o monocítica, y megacariocítica), presencia de porcentaje variable de blastos, falla progresiva de la MO y aumento del riesgo de transformación en leucemia mieloides aguda (LMA)¹, siendo el pronóstico y el curso de la enfermedad diferente entre pacientes. Numerosos trabajos han confirmado ya la utilidad de la CMF en el diagnóstico inicial de los SMD, evaluación

pronóstica, monitoreo de la enfermedad y respuesta al tratamiento, agregando *objetividad* en el estudio de las alteraciones de precursores hematopoyéticos y de cada una de las líneas celulares afectadas en esta patología^{2,3}.

En la reunión Internacional Working Conference en Viena (2006)⁴, la CMF se introduce como un co-criterio en casos donde los criterios clásicos de diagnóstico asociados a SMD no son suficientes. Sin embargo, el vertiginoso avance de la tecnología aplicada en CMF (equipos, reactivos, software de análisis), y la creciente experiencia de operadores y analistas promueve continuamente múltiples cambios, que atentan a menudo contra la credibilidad de los resultados aportados por este método. En este contexto importantes grupos cooperativos realizaron reuniones de consenso en los últimos tres años (US National Comprehensive Cancer Network, International Working Group, European Leukemia Net)^{2,4}, iniciando la estandarización del uso de la CMF en el estudio de SMD. Por tal motivo, la subcomisión de estudio de SMD del Grupo Rioplatense de Citometría de Flujo (GRCF) ha abordado el tema con la realidad local, y basándose en los conocimientos publicados hasta el momento, ha elaborado el primer Consenso para el estudio de los SMD que incluye en detalle cada uno de los aspectos metodológicos. (www.grucitometria.org.ar)

El principal objetivo del presente documento es destacar el aporte de la CMF en el diagnóstico de SMD, enfatizando especialmente en aspectos fundamentales como:

- requerimientos básicos del laboratorio (características de la muestra a remitir, datos clínicos necesarios).
- fundamentos generales del estudio e información proporcionada por el mismo.
- estandarización del informe de los resultados.

1- La CMF como co-criterio

El análisis de médula ósea por citometría es introducido como co-criterio en aquellos casos que cumplen ambos criterios esenciales y ninguno de los criterios decisivos de diagnóstico, pero con signos altamente vinculados a un SMD (Tabla I). Es el caso de pacientes sub-diagnosticados o con resultados cuestionables, pero con hallazgos clínicos típicamente relacionados a SMD como la anemia macrocítica con dependencia transfusional⁴.

Las citopenias periféricas persistentes en al menos una línea celular constituyen uno de los dos requisitos esenciales (pre-criterios) que deben cumplirse para establecer diagnóstico de SMD⁴. La CMF colabora en describir anomalías fenotípicas

TABLA I.- Criterios mínimos de diagnóstico de SMD⁴

- | |
|--|
| (A) Prerrequisitos o criterios esenciales |
| 1. Citopenia constante en al menos una de las líneas celulares: eritroide (Hb <110 g/L), de granulocito neutrófilo (< 1.5x10 ⁹ neutrófilos/L) o megacariocítica (< 100x10 ⁹ plaquetas/L) |
| 2. Exclusión de otras enfermedades, hematológicas o no, como causa primaria de la citopenia/d displasia. |
| (B) Criterios decisivos |
| 1. Displasia en al menos el 10% de la celularidad medular en al menos una de las líneas celulares eritroide, de granulocito neutrófilo y/o megacariocítica o >15% de sideroblastos en anillo |
| 2. Porcentaje de blastos en el aspirado medular entre 5-19% |
| 3. Anomalías cromosómicas recurrentes características de SMD (por citogenética ó por FISH). |
| (C) Co-criterios (para pacientes que cumplen "A" y no "B" pero presentan características clínicas típicas de SMD). |
| 1. Fenotipo aberrante identificados por citometría de flujo en células precursoras eritroides y/o mieloides en médula ósea. |
| 2. Evidencia molecular de monoclonalidad por ensayo HUMARA, técnicas de "microarrays" o análisis de mutaciones puntuales (p.ej.: mutaciones en RAS) |
| 3. Capacidad de formación de colonias por parte de los progenitores de MO y/o SP marcada y persistentemente reducida. |

(anormalidades en la expresión antigénica de células individuales), en diferentes líneas celulares que contribuyen al diagnóstico diferencial entre procesos mielodisplásicos y condiciones reactivas u otras neoplasias hematológicas o no hematológicas causantes de las citopenias.

La CMF puede ayudar a distinguir una Anemia Refractaria (AR) de una Citopenia Refractaria con Displasia Multilineal (CRDM) identificando AR con alteraciones fenotípicas en múltiples compartimentos celulares de la MO de una AR con inmunofenotipo normal³, lo cual es de importancia crítica en el pronóstico y tratamiento de estas patologías. La CMF también puede contribuir significativamente al diagnóstico diferencial entre un SMD temprano y una Citopenia Idiopática de Significado Incierto (ICUS) mediante el recuento de blastos, estudio de aberraciones fenotípicas en los mismos y la posibilidad de distinguir anomalías fenotípicas en la serie mielóide madura². El estudio de las aberraciones (cualitativas o cuantitativas) de los blastos, tiene además un fuerte impacto en pacientes con procesos mielodisplásicos con exceso de blastos. Es importante puntualizar

que existen casos en los cuales los blastos presentan marcadas anomalías fenotípicas aun cuando se encuentren en valores inferiores al 5% siendo esto un factor altamente sugerente de un proceso mieloide clonal.

En los casos de monocitosis la CMF puede contribuir a distinguir situaciones reactivas de entidades clonales incluidas en los SMD/SMP como Leucemia Mielomonocítica Crónica⁵.

2- Consideraciones Sobre La Muestra

La muestra indicada para el estudio de SMD por CMF es la *Médula Ósea* ya que permite evaluar los distintos estadios madurativos de las poblaciones hematopoyéticas. El aspirado de MO debe realizarse usando como anticoagulantes heparina o EDTA³. La heparina es aconsejable si el procesamiento de la muestra se realiza pasadas las 24 hs de haber sido obtenida, debido a que el EDTA puede alterar el patrón de expresión de algunos antígenos como el CD10, CD11b, CD16 y CD64² con el envejecimiento de la muestra. El aspirado de MO debe ser transportado y conservado a **temperatura ambiente** y procesarse preferiblemente antes de las 24 horas para obtener una adecuada viabilidad celular y evitar la pérdida de poblaciones de interés.

Es importante un aspirado de MO de buena calidad ya que factores como la contaminación de la médula ósea con sangre periférica (hemodilución) o la formación de coágulos producen alteraciones en el análisis cuantitativo de las diferentes poblaciones genuinamente medulares y subestimación de los blastos o células precursoras²⁶. Para una mejor interpretación de los hallazgos obtenidos, es imprescindible que los datos de la muestra incluyan fecha, hora de extracción, los datos clínicos y de laboratorio relevantes que fundamenten el estudio⁷.

3- Fundamentos del estudio de CMF en médula ósea

La CMF identifica y cuantifica, utilizando anticuerpos monoclonales conjugados con distintos fluorocromos, proteínas de la superficie celular e intracitoplasmáticos cuya expresión está rigurosamente regulada a lo largo de la diferenciación y maduración de las células precursoras (stem cell) hematopoyéticas a células maduras funcionales de la sangre periférica^{3, 8}. Esta regulación no alcanza solamente a la **aparición/desaparición** secuencial de los antígenos celulares, sino también al control de la **cantidad de antígeno**, visualizado como cambios en la **intensidad** de expresión de los mismos.

Utilizando una apropiada y cuidadosa selección y combinación de reactivos (paneles amplios con

combinaciones específicas) y un **análisis multiparamétrico** exhaustivo, es posible identificar por citometría de flujo cada uno de los tipos celulares presentes en un aspirado de médula ósea y clasificarlos según su linaje e incluso según su estadio madurativo dentro de cada línea celular. Pueden establecerse de este modo **patrones de expresión normal** bien definidos de los distintos marcadores para cada línea celular en base a la presencia/ausencia del mismo así también como a su intensidad de expresión^{3,8}.

Esta relación tan precisa de expresión antigénica se pierde en los procesos neoplásicos y se traduce en **patrones fenotípicos alterados o aberrantes** identificables por citometría. La CMF se aplica al estudio de los SMD buscando anomalías en los patrones de expresión antigénica, causantes ó estrechamente vinculados con la producción inadecuada de células hematopoyéticas que deviene en citopenias⁸.

Cada paciente con un desorden mieloide clonal, tendrá un repertorio único de anomalías que pueden incluso evolucionar con el progreso de la enfermedad. Es por ello que el "recuento de anomalías" constituye un medio de evaluar el grado de "desregulación" y por lo tanto una forma de establecer cuán distante está un determinado paciente de una diferenciación y/o maduración hematopoyética normal. Se asume que, múltiples anomalías fenotípicas en un paciente son reflejo de una mayor inestabilidad genética, que se relaciona con un grado más severo de la enfermedad⁸⁻¹⁰.

Son varios los autores que en los últimos años han documentado la relación entre la dishemopoyesis (identificada como anomalías fenotípicas en SMD), con el International Prognostic Scoring System (IPSS), el WHO Adjusted Prognostic Scoring System (WPSS), la dependencia transfusional, y el tiempo de progresión a mielodisplasias de alto grado/Leucemia Mieloide Aguda^{3,5,9-12}.

CAMBIOS FENOTÍPICOS EN LA MÉDULA ÓSEA

Los fenotipos en la MO de pacientes con MDS exhiben diferencias con respecto a los fenotipos de las MO de pacientes normales no solo a nivel de precursores CD34, sino en la población mielomonocítica, y eritroide^{4,9-17}. Las combinaciones de anticuerpos elegidas (paneles de marcación) para identificar estos cambios deben permitir estudiar la relación entre los antígenos (patrones madurativos) y no solamente su expresión aislada. Las tablas II y IV resumen las combinaciones mínimas recomendadas en el primer Consenso del Grupo

Rioplátense de Citometría de Flujo. Las tablas III y V presentan otras combinaciones sugeridas para ampliar el estudio de una MO con evidencias de proceso mielodisplásico. Es necesaria la combinación de tres fluorescencias como requisito mínimo siendo las combinaciones de cuatro colores o más lo recomendado internacionalmente³.

Las alteraciones fenotípicas observadas incluyen sobreexpresión o disminución en la expresión antigénica, expresión aberrante de antígenos linfoides en células mieloides, asincronismo madurativo en donde se observa expresión de marcadores de inmadurez en células maduras y ausencia total de expresión antigénica, alteraciones que solamente pueden ser identificadas por esta metodología. Otra alteración muy común es el cambio en el tamaño celular (detectado en el FSC-forward light scatter) y en la granularidad (identificado en el SSC-side light scatter), también evidenciables morfológicamente.

Análisis de células precursoras

La CMF tiene una gran ventaja sobre la morfología en el recuento de células CD34+ ya que puede contar

TABLA II.- Combinaciones triples (FITC- PE - PerCP/ PerCP/PC5)

TUBOS	FITC	PE	PerCP/PECy5/PC5
01	PBS	PBS	CD45
02	CD11b	CD13	CD45
03	CD16	CD13	CD45
04	CD15	CD33	CD34
05	CD64	CD14	CD45
06	HLA-DR	CD11b	CD45
07	CD71	CD36	CD45
08	CD71	CD13	CD34
09	CD34	CD38	CD117
10	HLA-DR	CD123	CD34
11	CD5	CD7	CD34 ³
12	CD3	CD56	CD45
13	CD4	CD8	CD3
14	CD10	CD20	CD19
15	CD45	CD34	CD117

TABLA III.- Otras combinaciones triples (FITC- PE - PerCP/PerCP/PC5)

TUBOS	FITC	PE	PerCP/PEC5.5/PC5
01	TDT	MPO	CD34
02	CD34	CD22	CD19
03	HLA-DR	CD117	CD34
04	CD36	CD64	CD34
05	CD34	CD79a	CD19
06	HLA-DR	CD33	CD45

TABLA IV.- Combinaciones cuádruples (FITC- PE - PerCP/ PerCP Cy5 - APC)

TUBOS	FITC	PE	PerCP/PEC5.5	APC
01	PBS	PBS	CD45	CD34
02	CD11b	CD13	CD45	CD34
03	CD16	CD13	CD45	CD34
04	CD15	CD33	CD45	CD34
05	CD36	CD64	CD45	CD14+CD34
06	HLA-DR	CD11b	CD45	CD34
07	CD71	CD36	CD45	CD34
08	CD71	CD13	CD45	CD34
09	HLA-DR	CD117	CD34	CD38
10	HLA-DR	CD123	CD45	CD34
11	CD5	CD7	CD34	CD56
12	CD4	CD8	CD45	CD3
13	CD10	CD20	CD19	CD34

TABLA V.- Otras combinaciones cuádruples (FITC- PE - PerCP/ PerCP Cy5 - APC)

TUBOS	FITC	PE	PerCP/PEC5.5	APC
01	TDT	MPO	CD45	CD34
02	HLA-DR	CD33	CD45	CD34
03	CD34	CD22	CD45	CD19
04	CD34	CD117	CD45	CD38
05	HLA-DR	CD117	CD45	CD34
06	CD34	CD79a	CD45	CD19
07	CD3	CD56	CD45	CD34

un mayor número de células (más de 50000 versus 500 por morfología). Otra ventaja es la objetividad que proporciona la marcación específica de estas células con respecto a la posible subjetividad en la clasificación morfológica de los blastos. En la tabla VI se presentan las alteraciones fenotípicas en el compartimento inmaduro de la MO^{3, 4, 8, 17}.

La detección de alteraciones fenotípicas en los precursores CD34+, aun en valores menores al 1%, parece ser un claro signo de transformación o de desregulación genética y facilita la identificación de pacientes con MDS^{11, 13, 15}. La expresión de antígenos linfoides (CD7, CD56 y/o Tdt) en precursores inmaduros mieloides ha sido asociada con dependencia transfusional y progresión de la enfermedad^{11,13,17}.

Además, la CMF permite cuantificar no solamente los precursores CD34+ sino también los precursores mieloides CD34-CD117+. El aumento de los precursores CD34+, la presencia de precursores CD34-CD117+ aberrantes y la disminución de precursores maduros (CD34-CD117+) eritroides y granulocíticos serían factores informativos ya que hablarían de un acumulo de precursores hematopoyéticos asociados a una falla en la maduración granulocítica y eritroide¹⁰.

Las células CD34+ conforman un compartimento heterogéneo que contiene poblaciones mayoritarias como los mieloblastos y linfoblastos (precursores B o hematogonias), y poblaciones minoritarias como los monoblastos, precursores de célula dendrítica, precursores a basófilo/mastocito y precursores inmaduros, los cuales pueden identificarse y cuantificarse utilizando las combinaciones de anticuerpos adecuadas. Se observa que aun con un porcentaje de células CD34+ dentro de los valores normales, la composición celular de dicho compartimento puede estar alterada, con el aumento de una subpoblación a expensas de otra^{15,17}.

Los pacientes con MDS muestran un descenso significativo de los precursores linfoides B CD19+ CD34+ CD10+. Esto también se observa en otras patologías como los desórdenes mieloproliferativos e inmunodeficiencias. En las MO displásicas esta disminución va generalmente acompañada de características fenotípicas aberrantes, más acentuadas en pacientes de alto riesgo^{14,16,18}.

Análisis de células maduras

Los cambios dishemopoyéticos en las series mielomonocítica al igual que en los precursores son claramente evidenciables por la CMF, mientras que en la serie eritroide al igual que en la megacariocítica a menudo suelen ser más evidentes en el estudio morfológico. Es por esto que ambas metodologías deben ser complementarias. En la tabla VII se resumen las alteraciones fenotípicas en el compartimento maduro de MO^{3,4,10,18}.

La *serie granulocítica* anormal puede presentar hipogranularidad reflejada en los cambios en el SSC, alteraciones en los patrones de maduración de CD13/CD11b y CD13/CD16 (Figura 1), alteración en la expresión de antígenos mieloides (Figura 2) y expresión de marcadores de otros linajes. Es importante tener en cuenta las variables que se mencionaron en el punto 2, que pueden afectar el estudio por CMF como el uso del anticoagulante incorrecto, el tiempo entre la punción y el estudio por CMF, y la contaminación de la muestra con sangre periférica¹⁹ que puede dar lugar a la subestimación de las distintas poblaciones celulares de la MO. La presencia de otras patologías como la hemoglobinuria paroxística nocturna que presenta ausencia de CD16 en granulocitos y de CD14 en monocitos, o las MO reactivas (HIV, infecciones, quimioterapia) pueden dar lugar a patrones fenotípicos diferentes de los normales pero no específicos de MDS².

El estudio en la *serie monocítica* es importante tanto en su valor cuantitativo (disminución o aumento relativo) como en las alteraciones cualitativas que se resumen en la tabla VII. La expresión de CD56

TABLA VI.- Alteraciones fenotípicas en células precursoras de la MO con MDS

Progenitores CD34+ mieloides

- aumento relativo y absoluto de células CD34+.
- aumento relativo y absoluto de células CD34-CD117+.
- SSC anormal (granularidad).
- expresión de CD11b y/o CD15.
- ausencia/disminución CD13,CD33,CD34, CD38, CD45, CD117 o HLADR.
- sobreexpresión de CD13, CD33, CD34, CD117.
- expresión de antígenos "linfoides" TdT, CD5, CD7, CD19 o CD56.

Progenitores CD34+ linfoides

- disminución absoluta y relativa (a CD34+ totales) de CD34+ CD19+ CD10+.
- ausencia de expresión de CD79a.

TABLA VII.- Alteraciones fenotípicas en células precursoras de la MO con MDS

Serie granulocítica neutrófila

- SSC disminuido (hipogranularidad)
- anomalía en los patrones de maduración (CD16/CD13, CD13/CD11b)
- ausencia/disminución CD13 y CD33
- expresión de CD34, CD117, HLADR
- expresión de antígenos linfoides
- disminución en la expresión de CD45
- expresión anormal de CD15, CD36, CD64
- asincronismo CD10/CD16
- desvío asincrónico hacia la izquierda

Serie monocítica

- SSC anormal (granularidad)
- anomalía en los patrones de maduración en HLADR/CD11b, CD13, CD33, CD64/CD36/CD14
- ausencia de expresión de CD13, CD14 y CD33
- expresión de CD34
- expresión de antígenos linfoides (con excepción de CD4)
- disminución en la expresión de CD45

Serie eritroide

- expresión anormal de CD45
- expresión de CD34
- expresión anormal de CD71, CD117, CD36
- aumento cuantitativo post lisis

debe evaluarse en el contexto clínico del paciente ya que es frecuentemente vista en MO en regeneración post quimioterapia o post trasplante, durante la administración de factores de crecimiento y en procesos infecciosos¹⁴.

Las alteraciones fenotípicas de la *serie eritroide* se describieron por primera vez en 2001²⁰. Si bien se cuenta con pocos marcadores para el estudio de la displasia eritroide, ha sido relacionado el aumento de

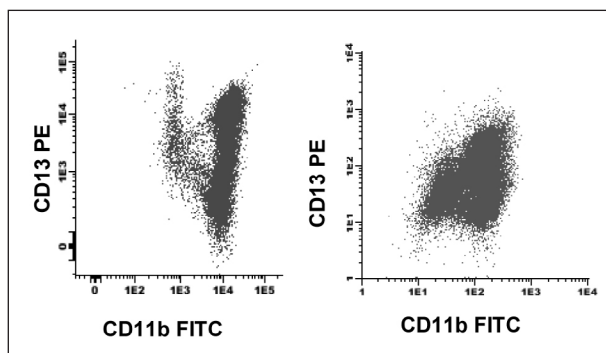


Fig. 1.- Serie granulocítica. Patrón CD13/CD11b normal (a) y alterado (b).

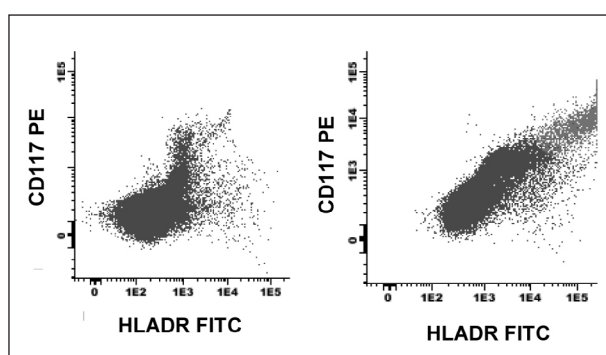


Fig. 2.- Serie granulocítica. Expresión aberrante (d) de HLADR y CD117 con respecto a lo normal (c)

precusores eritroides nucleados CD36negativo/+débil como factor pronóstico en las MDS¹⁰ y en muchos casos la CMF permite evidenciar cambios fenotípicos cuando aún no se observan morfológicamente.

INFORME

En el informe de los resultados se incluirá no solo el análisis cuantitativo de las células que comprenden las distintas poblaciones de la MO, sino también las características fenotípicas más relevantes de las mismas.

Durante las reuniones de Consenso, se estandarizó el modo de informar los resultados emitidos por el laboratorio de CMF al hematólogo clínico para un mejor aprovechamiento y entendimiento de los mismos.

El formato que se presenta (Tabla VIII) es el que se usará en el registro de SMD de la SAH. El mismo es una manera simplificada de presentar los resultados, al que se llegará luego de un complejo y minucioso análisis, el cual se detallará en una sección anterior del informe.

Es importante remarcar que para poder interpretar los hallazgos fenotípicos y llegar a un diagnóstico

TABLA VIII.- Modelo de informe para el registro de la SAH*

Resultados

- 01- células CD34+: (---%)
 - células CD34 (-) CD117+ (---%)
 - fenotipo conservado / alterado: n°alteraciones: (cuanti o cuali)
- 02- serie granulocítica (--%):
 - patrón madurativo conservado o patrón madurativo aberrante:
 - N° de alteraciones:
- 03- serie eritroide (--%):
 - patrón madurativo conservado o patrón madurativo aberrante:
 - N° de alteraciones:
- 04- serie monocítica (--%)
 - patrón madurativo conservado o patrón madurativo aberrante:
 - N° de alteraciones:

Conclusiones

- a) sin evidencia fenotípica que sugiera proceso mielodisplásico
- b) con clara evidencia fenotípica de DMC* sugerente de SMD'
- c) no concluyente

*DMC: desorden mielóide clonal, SMD: síndrome mielodisplásico

definitivo es imprescindible correlacionarlos con el contexto clínico del paciente y los restantes estudios hematológicos.

CONCLUSIONES

La Citometría de Flujo en los últimos años ha experimentado un vertiginoso avance reflejado en una presencia cada vez más relevante en el diagnóstico, tratamiento, seguimiento y pronóstico de las neoplasias hematológicas. Los SMD representan un grupo heterogéneo de neoplasias mieloides en los que la CMF identifica anomalías fenotípicas en los patrones de diferenciación y/o maduración de las distintas líneas celulares de la médula ósea, que guardan estrecha relación con la displasia que caracteriza a estos desordenes mieloides clonales.

La constelación en la expresión antigénica normal y más aún en su desregulación, subraya la complejidad del estudio de los SMD por CMF y explica la gran variabilidad encontrada en las publicaciones sobre la utilidad de la CMF en el estudio de una patología intrínsecamente tan heterogénea. No pasa inadvertido ni sorprende que en nuestro medio, la falta de estandarización en los procedimientos técnicos y analíticos lleve a una inmensa variabilidad en los informes de inmunomarcación y análisis por CMF.

El GRCF ha elaborado y difundido recientemente el primer Consenso para el estudio de los SMD por CMF que constituye un primer paso en pos de una mayor consistencia intra e interlaboratorio en los estudios de esta patología. En este documento se dan los lineamientos básicos y mínimos respecto a los requerimientos del laboratorio de CMF, las combinaciones mínimas de anticuerpos que deberán utilizarse para el estudio fenotípico, y se presenta un modelo de informe, bastante simplificado, con los resultados obtenidos.

Es nuestro objetivo continuar trabajando en esta dirección y al mismo tiempo actualizar nuestras estrategias de estudio, conforme a los conocimientos publicados en la bibliografía.

ABSTRACT

Flow cytometry (FC) identifies and quantifies cell surface and cytoplasmic antigens that are highly regulated during maturation from hematopoietic stem cells to fully functional mature cells in peripheral blood. Various studies have confirmed the useful role of FC in the evaluation of myelodysplastic syndromes (MDS), and as from 2006, FC has become a useful adjunct (co-criteria) in patients with questionable clinical and morphological criteria. The regulation of antigen expression characteristic of normal hematopoietic stem cell maturation is lost in neoplastic processes, giving rise to abnormal phenotypic patterns. FC assists in the study of MDS patients by identifying immunophenotypic abnormalities causing or closely related to the inadequate production of hematopoietic cells that ultimately cause of cytopenias. The constellation of antigens expressed or miss expressed in this group of patients highlights the complexity of studying MDS by FC, and explains the great variability found in publications addressing the role of FC in the study of such an intrinsically heterogeneous disease. The "Consensus for the study of patients with MDS by Flow Cytometry" recently elaborated by the Grupo Rioplatense de Citometría de Flujo (GRCF), is our first step towards standardization of the process. The GRCF is committed to continue its quest towards achieving more consistent technical and analytical procedures, and thereby optimize actual strategies for evaluating this group of patients.

Key words: Myelodysplastic syndromes, flow cytometry, standarization, consensus, GRCF.

BIBLIOGRAFÍA

- Brunning R, Orazi A, Germing U, y col. Myelodysplastic syndromes/neoplasms. Swerdlow S, Campos E, Harris N, Jaffe E. Who classification of Tumours and Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 2008 Chapter 5, 87-107.
- Loken MR, van de Loosdrech AA, Ogata K, y col. Flow cytometry in myelodysplastic syndromes: report from a working conference. *Leukemia Research* 2008; 32: 5-17.
- van de Loosdrech A, Alhan C., Bené MC y col. Standarization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: report of the first European Net working conference of flow cytometric in myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2009; 94, issue 8, 1124-1134.
- Valent P, Horny HP, Bennett JM y col. Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference. *Leukemia Research* 2007; 31: 727-36.
- Vardiman J, Thiele J, Arber D y col. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009; 114, 937-950.
- Saavedra C, Quijano S, Romero M y col. Reporte del Primer Consenso Colombiano de Citometría de Flujo para el estudio de Transtornos Hematológicos. *Biomédica* 2010, 30 (Supl): 11-21.
- Wood B y col. 2006 Bethesda International Consensus Recommendations on the Immunophenotypic Analysis of Hematolymphoid Neoplasia by Flow Cytometry: optimal reagents and reporting for the flow cytometric diagnosis of hematopoietic neoplasia. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 2007; 2B: S14- S22.
- Loken M, Wells. D. The role of Flow Cytometry in mielodysplastic syndromes *Journal of the National Comprehensive Cancer Network* 2008; Volume 2 N° 9.
- van de Loosdrech A, Westers TM, Westra AH y col. Identification of distinct prognostic subgroups in low- and intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes by flow cytometry. *Blood* 2008; 111: 1067-1077.
- Matarraz s, Lopez A, Barrena S, y col. Bone Marrow cells from Myelodysplastic Syndromes show altered immunophenotypic profiles that may contribute to the diagnosis and prognosis stratification of the disease: A pilot study on a series of 56 patients. *Cytometry Part B. (Clinical Cytometry)* 2010; 78B: 154-168.
- Wells DA, Benesch M, Loken MR, y col. Myeloid and monocytic dyspoiesis as determined by flow cytometric scoring in myelodysplastic syndrome correlates with the IPSS and with outcome after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2003; 102: 394-403.
- Scott BL, Wells DA, Loken MR, y col. Validation of a flow cytometric scoring system as a prognostic indicator for post-transplantation outcome inpatients with myelodysplastic syndrome. *Blood* 2008; 112: 2681-6.
- Ogata K, Nakamura K, Yokose N, y col. Clinical significance of phenotypic features of blasts in patients with myelodysplastic syndrome. *Blood*, 2002; 100: 3887-3896.
- Ogata K, Kishikawa Y, Satoh CH, YCL. Diagnostic application of flow cytometric characteristics of CD34 cells in low-grade myelodysplastic syndromes. *Blood*, 2006; 108: 1037-1044.
- Matarraz S, Lopez A, Barrena, y col. The immunophenotype of different immature, myeloid and B-cell lineage-committed CD34+ hematopoietic cells allows discrimination between normal/reactive and myelodysplastic syndrome precursors. *Leukemia* 2008 22, 1175-1183.
- Ribeiro, Matarraz S, Santiago, M, y col. Maturation-associated immunophenotypic abnormalities in bone marrow B-lymphocytes in myelodysplastic syndrome. *Leukemia Research* 2006; 30: 9-16.
- Monreal M., Pardo M., Pavlovsky M. y col. Increased Immature

- Hematopoietic Progenitor Cells CD34+/CD38dim in Myelodysplasia. **Cytometry Part B** (Clinical Cytometry) 70B: 63-70 (2006).
18. Sternberg, Killick, Littlewood, y col. Evidence for reduced B-cell progenitors in early (low-risk) myelodysplastic syndrome. **Blood** 2005; 106: 2982-2991.
 19. Loken M, Sung-Chao Chu, Fritschle, y col. Normalization of Bone Marrow Aspirates for Hemodilution in Flow Cytometric Analyses. **Cytometry Part B**. (Clinical Cytometry) 2009; 76B: 27-36.
 20. Stetler Stevenson, Arthur, Jabbour, y col. Diagnostic utility of flow cytometric immunophenotyping in myelodysplastic syndrome. **Blood** 2001; 98, 979-987.