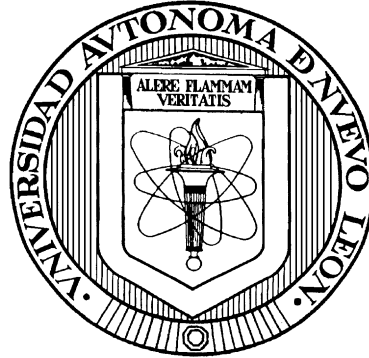


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



“COMPARACIÓN DEL ANÁLISIS CITOMORFOLÓGICO CON LA CITOMETRÍA DE FLUJO DEL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO PARA EL DIAGNÓSTICO DE INFILTRACIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL EN PACIENTES CON LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA”

Por

Q.B.C. MARÍA FERNANDA BORREGO LÓPEZ

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
Maestría en Laboratorio de Hematología**

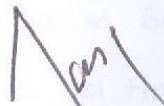
AGOSTO 2017

**“COMPARACIÓN DEL ANÁLISIS CITOMORFOLÓGICO CON LA
CITOMETRÍA DE FLUJO DEL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO PARA
EL DIAGNÓSTICO DE INFILTRACIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO
CENTRAL EN PACIENTES CON LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA
AGUDA”**

Aprobación de la Tesis:



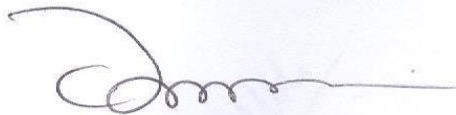
Dr. med. José Carlos Jaime Pérez
Director de Tesis



Dr. Luis Javier Marfil Rivera
Miembro de la comisión



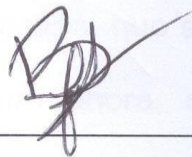
Dr. David Gómez Almaguer
Miembro de la comisión



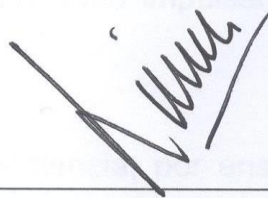
Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

**“COMPARACIÓN DEL ANÁLISIS CITOMORFOLÓGICO CON LA
CITOMETRÍA DE FLUJO DEL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO PARA
EL DIAGNÓSTICO DE INFILTRACIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO
CENTRAL EN PACIENTES CON LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA
AGUDA”**

Presentado por: Q.B.C. María Fernanda Borrego López



Este trabajo se realizó en el Servicio de Hematología del departamento de Medicina Interna del Hospital Universitario, Dr. José Eleuterio González de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. med. José Carlos Jaime Pérez.



Dr. med. José Carlos Jaime Pérez
Director de Tesis

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a Dios por haberme brindado la oportunidad de tener una familia extraordinaria y el permitirme realizar mis sueños y alcanzar mis metas con ellos, por cuidarme en el camino y darme fuerza para levantarme en cada tropiezo.

A mis padres Gerardo y Alma Josefina, que sin ellos no hubiera sido capaz de llegar hasta donde me encuentro ahora, sin su confianza, sin su apoyo incondicional, sin sus recomendaciones, gracias por llevarme siempre de la mano y por darme su cariño que es mi motor para seguir avanzando.

A mis hermanos Gerardo y Alma Arely, por siempre estar ahí para escuchar mis experiencias, quejas, vivencias y frustraciones, por comprenderme cuando no estaba de humor, por compartir alegría y buenos momentos durante este tiempo.

A mis tías María del Rosario y Blanca, por motivarme día a día a seguir adelante en mis estudios y sobre todo impulsarme en seguir creciendo como profesional.

A mi abuela Cristina, por su paciencia, por enseñarme el camino de la vida, gracias por sus consejos, por el amor que me ha dado y por su apoyo incondicional en mi vida.

Agradezco especialmente a mi asesor el Dr. med. José Carlos Jaime Pérez, por compartir sus conocimientos y apoyarme durante este camino profesional sin

titubear. Cada momento de risa, cada regaño, cada consejo tiene una dirección y un sentido que culmina en el cumplimiento de esta meta.

De igual manera, agradezco el apoyo del Dr. David Gómez Almaguer, a la Jefa del Laboratorio la QCB. María del Rosario Salazar Riojas, y a cada uno de los integrantes que conforman el equipo de trabajo del Servicio de Hematología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, de la UANL.

Agradezco a mis amigas Melisa, Dalila y Alejandra, a las cuales a pesar de tener poco tiempo de conocernos en ésta gran ciudad hicieron de estos dos años una experiencia inolvidable, gracias por escucharme y aconsejarme cuando lo necesitaba.

A mis amigas que considero como hermanas Reyna, Karla, Elyana y Karine, por escucharme y aconsejarme durante estos dos años a pesar de estar tan lejos de mí. Y por último, no queda más que agradecer a cada uno de mis amigos por apoyarme en lo que necesitaba durante esta etapa de mi vida: Mario, Sue, Raúl, Fernando, Francisco, Judith, Aaron, Tony. Y Raúl Antonio, esa persona que llegó en último momento y me apoyó cuando más lo necesitaba, por escucharme e impulsarme a seguir creciendo en mi vida profesional.

GRACIAS

DEDICATORIA

A mis padres Gerardo y Alma, mis hermanos Gerardo y Arely.

A mi abuela Cristina Verdín Sierra

A toda mi familia.

Amigos.

TABLA DE CONTENIDO

Contenido	Página
RESUMEN	
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Leucemia linfoblástica aguda.....	1
1.1.1 Epidemiología.....	1
1.1.2 Etiología.....	3
1.1.3 Patobiología.....	4
1.1.4 Manifestaciones clínicas.....	4
1.1.5 Factores de riesgo.....	5
1.1.6 Características genéticas y biológicas.....	5
1.2 Líquido cefalorraquídeo	5
1.2.1 Afectación al sistema nervioso central	6
1.2.2 Factores de riesgo de recaída al sistema nervioso central.....	7
1.2.3 Obtención del líquido cefalorraquídeo	7
1.2.4 Estudio del líquido cefalorraquídeo.....	8
1.2.4.1 Microscopía.....	9
1.2.4.2 Cito-morfología.....	11
1.2.4.3 Analizador hematológico.....	11
1.2.4.4 Citometría de flujo.....	13
2. JUSTIFICACIÓN	15
3. HIPÓTESIS	16
4. OBJETIVOS	17

4.1 Objetivo general	17
4.2 Objetivos particulares	17
5. MATERIALES Y MÉTODOS	18
5.1 Pacientes incluidos en el estudio.....	18
5.2 Criterios de inclusión.....	18
5.3 Criterios de exclusión.....	18
5.4 Materiales y reactivos.....	19
5.5 Equipos.....	19
5.6 Métodos.....	20
5.6.1 Análisis en fresco.....	20
5.6.2 Cito-centrifugado.....	20
5.6.3 Analizador hematológico.....	21
5.6.4 Citometría de flujo.....	24
5.7 Fórmulas utilizadas.....	25
5.8 Análisis estadístico.....	25
6. RESULTADOS	26
6.1 Utilidad del análisis por citometría de flujo del LCR de pacientes con LLA.....	27
6.2 Determinación de sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo del análisis citomorfológico del LCR	28
6.3 Comparación de cuatro métodos de laboratorio disponibles para evaluar la presencia de células en el LCR.....	29
6.4 Análisis ROC.....	30

7. DISCUSIÓN	35
8. CONCLUSIÓN	38
9. PERSPECTIVAS	39
10. BIBLIOGRAFÍA	40

LISTA DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
1	Características clínicas y de laboratorio de los pacientes con LLA.	27
2	Análisis del motivo de estudio contra la CC y CMF	28
3	Sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo del análisis cito-morfológico del LCR para la identificación de linfoblastos.	28
4	Comparación de los métodos de laboratorio disponibles para evaluar la presencia de células en el LCR	30
5	Sensibilidad, especificidad y valores predictivos para el recuento manual y automatizado en la detección de glóbulos blancos (CM y CA) o linfoblastos (CC, Cytospin) del LCR de todos los pacientes.	30

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Curva ROC del recuento manual de globulos blancos de las muestras de LCR	33
2	Curva ROC del recuento automatizado de globulos blancos con el modo fluido corporal de Sysmex XT-4000i de las muestras de LCR	34

LISTA DE ABREVIATURAS

LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
LMA	Leucemia Mieloblástica Aguda
LMC	Leucemia Mieloide Crónica
EE.UU.	Estados Unidos de América
SNC	Sistema Nervioso Central
LCR	Líquido Cefalorraquídeo
SLE	Supervivencia Libre de Eventos
SG	Supervivencia Global
PL	Punción Lumbar
CMF	Citometría de Flujo
GB	Glóbulos Blancos
GR	Glóbulos Rojos
CC	Citología Convencional
WBC-BF	Del inglés Withe Blood Cell-Body Fluid, Glóbulos Blancos-Líquido Corporal
PMN	Polimorfonuclear
RBC-BF	Del inglés Red Blood Cell-Body Fluid, Glóbulos Rojos-Líquido Corporal
NHL	Neoplasia Hematológica Leptomeningea
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
MN	Mononuclear

RX	Radioterapia
QX	Quimioterapia
TX	Tratamiento
CM	Conteo Manual
CA	Conteo Automatizado
ROC	Del inglés Receiver Operating Characteristic, Característica Operativa del Receptor

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentaje
>	Mayor
<	Menor
≥	Mayor o igual
mL	Mililitro
dL	Decilitro
μL	Microlitro
min	Minuto
mm	Milimetro
mg	Miligramo
m³	Metro cúbico
rpm	Revoluciones por minuto
g	Gravedades

RESUMEN

Q.B.C. María Fernanda Borrego López
Fecha de graduación: Agosto 2017

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del estudio:

“COMPARACIÓN DEL ANÁLISIS CITOMORFOLÓGICO CON LA CITOMETRÍA DE FLUJO DEL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO PARA EL DIAGNÓSTICO DE INFILTRACIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL EN PACIENTES CON LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA”.

Número de páginas: 43

Candidato para el grado de Maestría en Laboratorio de Hematología

Área de estudio: Laboratorio de Hematología

“Propósito y método del estudio”: La citomorfología convencional (CC) sigue siendo el método estándar para detectar linfoblastos en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con leucemia linfoblástica aguda (LLA), así como para guiar las decisiones terapéuticas. Sin embargo, en un número importante de pacientes no se detecta infiltración a sistema nervioso central (SNC) por esta metodología. Por lo anterior, el objetivo del estudio fue determinar la eficiencia del análisis cito-morfológico del LCR para el diagnóstico de infiltración del SNC en pacientes con LLA en comparación con la citometría de flujo (CMF). En este estudio prospectivo se incluyó el análisis de 60 muestras consecutivas de LCR en pacientes con LLA en diferentes estadios clínicos. Se estudiaron los métodos manual, automatizado, CC y CMF y se evaluó estadísticamente su desempeño.

“Contribuciones y Conclusiones”: Se estudiaron sesenta muestras de LCR, n= 43 de alto riesgo y n= 17 de pacientes de riesgo estándar. La mediana de glóbulos blancos mediante el recuento manual en pacientes con infiltración del SNC detectado por CMF fue mayor, 10.0 (rango: 0.0-1280.0) vs. 6.25 (rango: 0.0-30.0), ($p = 0.004$), el punto de corte óptimo de WBC mediante el método manual fue de 3.75 células/ μl (sensibilidad, 57.1%, especificidad, 84.8%). Mediante el recuento celular automatizado el recuento de glóbulos blancos en pacientes con infiltración del SNC detectado por CMF fue 7 (rango: 0.0-1578-0) frente a 5.5 (rango: 0.0-28.0), ($p= 0.214$) en aquellos sin infiltración. Para el recuento automatizado, el límite óptimo de WBC fue de 4.5 células/ μl (sensibilidad, 71.4%, especificidad, 73.9%). En comparación con la CMF, la sensibilidad y la especificidad de la citomorfología fueron de 28.6% y 100%, respectivamente. Aunque la CMF es costosa y su impacto clínico en las decisiones terapéuticas todavía no está estandarizado, el análisis por citomorfología presentó menor sensibilidad para la detección de linfoblastos en el LCR.

Dr. med. José Carlos Jaime Pérez
Director de Tesis

Capítulo I

1. INTRODUCCIÓN

La leucemia es una neoplasia clonal de células madre hematopoyéticas, caracterizada por proliferación excesiva, supervivencia y alteración de la diferenciación de las células. (1)

1.1 Leucemia Linfoblástica Aguda

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es un trastorno heterogéneo biológicamente caracterizado por una proliferación celular maligna linfoide que afecta tanto a niños como adultos con una incidencia de 1.5 casos por cada 100.000 personas, con 2 picos de la edad, el primero de 2 a 5 años, y el segundo a los 65 años de edad, con una relación hombre/mujer de 1.2:1.0.(2-4) Es la neoplasia maligna más común en la infancia, la cual representa casi el 30% de los cánceres pediátricos.(5) A pesar de la alta tasa de curación, la LLA es una de las principales causas de muerte en niños.(5) El diagnóstico se basa en características morfológicas, inmunofenotípicas y genéticas que permiten la diferenciación de progenitores normales y otras neoplasias hematopoyéticas y no hematopoyéticas.(6)

1.1.1 Epidemiología

La incidencia mundial es de alrededor de tres por 100,000 habitantes.(7) En los niños, la LLA representan el 75% de todas las leucemias agudas (que a su vez representan el 30% de todos los cánceres

en este grupo de edad), este porcentaje es mucho menor en los adultos, representando sólo el 20% de las leucemias agudas. (1, 6)

Tiene una incidencia de entre 3 y 4 niños por cada 100,000 habitantes por año, la cual varía significativamente de acuerdo a la raza y grupo étnico: 14.8 casos por millón de negros, 35.6 casos por millón de blancos y 40.9 casos por millón de hispanos.(8) Dentro de la población pediátrica hispana en los Estados Unidos se ha reportado una incidencia muy elevada.(9) Para los niños menores de 15 años, la incidencia de LLA en todo el mundo varía entre 20-35 casos por millón, mientras que la incidencia de LLA en Costa Rica y en la Ciudad de México y para las poblaciones hispanas que viven en Estados Unidos son superiores a 40 casos por millón.(9)

Existe un ligero predominio masculino en todos los grupos de edad y una incidencia significativa en los niños de origen sajón.(6)

Las tasas de incidencia de leucemias que han sido reportados para la Ciudad de México corresponden fundamentalmente a los empleados del sector privado y sus familias, que tienen derecho a los servicios proporcionados por el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), los cuales comprende aproximadamente el 40% de toda la población.(9) En esos estudios, se encontró que la incidencia global de la leucemia está entre 55.4 y 58.4 por millón. La incidencia de las diversas leucemias es la siguiente: LLA, entre el 43.2 y el 44.9 por millón; leucemias mieloides agudas (LMA), entre el 9.8 y el 10.6 por millón; leucemias mieloides crónicas (LMC), 2.5 por millón.(9) La proporción de linaje T se ha reportado en un 23.6%, una frecuencia relativamente alta a la reportada para la población blanca de los Estados Unidos de América (EE.UU.) o para las poblaciones asiáticas. Para

nuestra población, la proporción de niños con LLA de alto riesgo frente a los de riesgo estándar es de 1:1, una proporción mayor que el reportado por otras instituciones en los EE.UU. (9)

1.1.2 Etiología

Los eventos patogénicos precisos que conducen al desarrollo de la leucemia linfoblástica aguda son desconocidos.(10) Hay varios factores de riesgo para desarrollar LLA:

- Ambientales: como la exposición a rayos X en útero, o a reacciones nucleares.
- Ocupacionales: como en tareas agrícolas, de soldadura, en la industria maderera, así como por el uso de pesticidas, plaguicidas, tintes de cabello y solventes.
- Quimioterapia y radioterapia previas.
- Algunos fármacos como la fentoína.
- Tabaquismo antes y durante el embarazo como causa de leucemia linfoblástica aguda en niños, al igual que consumo materno de alcohol en el embarazo.
- Dieta rica en nitratos.
- Agentes infecciosos, sobre todo virales, como causas de enfermedades neoplásicas.(1)

En pocos casos (<5%) se asocian a herencia, síndromes genéticos, como el síndrome de Down, síndrome de Bloom, la ataxia-telangiectasia, y Síndrome de Nijmegen, o con radiaciones ionizantes o la exposición a fármacos quimioterapéuticos específicos.(10)

1.1.3 Patobiología

La LLA procede de diversas lesiones genéticas importantes en las células progenitoras comprometidas con la diferenciación en la vía de células T o células B, incluyendo mutaciones que afectan la capacidad de auto-renovación ilimitada y las que conducen a la detención de desarrollo de una etapa específica.(10)

Las células implicadas en la leucemia linfoblástica aguda tienen reordenamientos clonales en sus genes de inmunoglobulina o genes de receptores de células T y expresan moléculas antígeno-receptoras y otras glicoproteínas de superficie celular ligadas a diferenciación.(10)

1.1.4 Manifestaciones clínicas

Los síntomas que se presentan en la LLA incluyen sangrado por trombocitopenia, palidez y fatiga e infección causada por la neutropenia. La infiltración leucémica del hígado, el bazo, los ganglios linfáticos y el mediastino es común al diagnóstico.(8)

Menos del 10% de los pacientes tienen afectación sintomática del sistema nervioso central (SNC), aunque la frecuencia es mayor en pacientes con LLA de células B maduras.(11) La leucemia extramedular en el SNC o los testículos puede requerir modificaciones específicas en la terapia.(8)

La LLA de células T con una masa mediastinal puede causar estridor y sibilancias, derrames pericárdicos y síndrome de vena cava superior.(11) La frecuencia de LLA-T varía entre 5 y 15%.

1.1.5 Factores de riesgo

Los factores pronósticos incluyen las características clínicas que están presentes al momento del diagnóstico, características biológicas y genéticas de las células de leucemia, y la respuesta temprana al tratamiento.(8)

En general la edad del paciente y el recuento inicial de glóbulos blancos se asocian al pronóstico de la enfermedad. Se considera que la LLA es de riesgo estándar cuando la edad es >1 o <10 años y el recuento de glóbulos blancos inicial de $<50,000$ por milímetro cúbico y de riesgo alto si la edad es ≥ 10 años, recuento de glóbulos blancos inicial $\geq 50,000$ por milímetro cúbico, o ambos. Los bebés menores de 1 año son un subgrupo especial de pacientes con peores resultados.(8)

1.1.6 Características genéticas y biológicas

Varias alteraciones genéticas se asocian con el pronóstico en niños con LLA. La hiperdiploidia alta con más de 50 cromosomas y la translocación $t(12;21)$ que codifica ETV6-RUNX1 se asocian con un resultado favorable. La hipodiploidia con menos de 44 cromosomas, los reordenamientos del MLL, BCR-ABL1, CRLF2, la amplificación intracromosómica del cromosoma 21 y los precursores de células T están asociados con las características clínicas de alto riesgo o un mal pronóstico.(8)

1.2 Líquido cefalorraquídeo

El LCR es un compuesto dinámico, metabólicamente activo que tiene muchas funciones importantes. (12)

La mayoría del LCR es producido por el plexo coroideo, circula a través de los ventrículos, las cisternas y el espacio subaracnoideo para ser absorbido en la sangre por las vellosidades aracnoideas.(12) La velocidad de formación de LCR en seres humanos es de aproximadamente 0.3-0.4 mL/min, lo que significa que la producción total por día es de aproximadamente 430-580mL. (13, 14)

1.2.1 Afectación al sistema nervioso central

El SNC puede ser un santuario para las células malignas durante la quimioterapia. A principios de la década de 1970, se desarrolló la terapia profiláctica dirigida al SNC, lo cual cambió el pronóstico de la LLA pediátrica. La quimioterapia sistémica eficaz adaptada al riesgo y el tratamiento dirigido al SNC han aumentado años de supervivencia libre de eventos (SLE) para la LLA infantil a >80% y hasta el 90% de la supervivencia global a 5 años en países desarrollados.(15, 16) Sin embargo, a pesar de la disminución del riesgo de recaída en general, la recaída en el SNC sigue siendo un obstáculo terapéutico importante.(15) Además, se sabe que la terapia dirigida al SNC puede causar daño neurológico y neuroendocrino permanente.(17)

Los niños con infiltración del SNC al momento del diagnóstico de LLA tienen un mayor riesgo de recaída y requieren terapia dirigida de intensificación. El impacto en el resultado de un pequeño número de blastos leucémicos en el LCR al momento del diagnóstico es discutible. Varios informes han indicado que la punción lumbar traumática con blastos en el momento del diagnóstico aumenta el riesgo de recaída al SNC, lo que sugiere que incluso pequeñas cantidades de blastos en el LCR pueden

empeorar el pronóstico.(5)

La presencia de blastos en el SNC al diagnóstico se identifica en menos de 5% de los niños y menos del 10% de los adultos.(18) Cuando está presente, tanto la SLE y la supervivencia global (SG) a 5 años disminuyen a 29% en comparación con los demás pacientes.(18) De hecho, los pacientes considerados de alto riesgo y los que reciben quimioterapia de intensificación dirigida al SNC (sistémica e intratecal), radiación craneoespinal y/o trasplante de células madre hematopoyéticas, todavía tienen un 4-15% de riesgo de desarrollar una recaída del SNC, una complicación con un mal pronóstico.(18)

1.2.2 Factores de riesgo de recaída al sistema nervioso central

La recaída al SNC es un obstáculo importante para curar la LLA que ocurre en el 3-8% de los pacientes y puede representar el 30-40% de todas las recaídas.(10, 17) Los factores asociados con un mayor riesgo de recaída del SNC incluyen un inmunofenotipo de células T, hiperleucocitosis, anomalías genéticas de alto riesgo, y la presencia de células leucémicas en el LCR (incluso de introducción iatrogénica debido a una punción lumbar traumática). Los polimorfismos en genes que codifican para proteínas implicadas en la farmacodinámica de los agentes antileucémicos también se han asociado con el riesgo de recaída al SNC.(10)

1.2.3 Obtención del líquido cefalorraquídeo

La punción lumbar (PL) diagnóstica es una de las pruebas invasivas más comúnmente realizadas, la cual se utiliza para obtener una muestra de

líquido cefalorraquídeo.(19, 20) Las indicaciones más comunes son la evaluación de un dolor de cabeza agudo y la investigación de enfermedades inflamatorias o infecciosas del sistema nervioso.(19)

El paciente debe asumir la posición recostada lateral o una posición sentada. Se prefiere la posición recostada lateral, para obtener una presión de apertura precisa y para reducir el riesgo de cefalea post-punción.(19) Después de ponerse guantes estériles, se debe limpiar la piel con un desinfectante apropiado, povidona-yodo o una solución a base de clorhexidina. Se anestesia tópicamente y se inserta un catéter en la zona lumbar en el espacio L3-4 o L4-5. Al realizar la punción, se mide manométricamente la presión de apertura. La cantidad de líquido recogido debe limitarse al volumen más pequeño necesario, normalmente de 3 a 4 mL.(20)

1.2.4 Estudio del líquido cefalorraquídeo

El diagnóstico de infiltración a SNC es un factor pronóstico bien establecido en LLA e implica el inicio de decisiones terapéuticas con efectos secundarios bien conocidos.(21-23) El examen de LCR es la prueba de laboratorio más útil en el diagnóstico de la infiltración del SNC. Las anomalías incluyen aumento de la presión de apertura (>200 mm de H₂O), proteína elevada (>50 mg/dL) y glucosa disminuida (<60 mg/dL) la concentración de LCR y el aumento en el recuento de leucocitos (>5 /mm³), que no es diagnóstico pero se asocia a infiltración del SNC.(24)

El estudio del LCR se utiliza a menudo para evaluar pacientes con signos neurológicos inexplicables o síntomas que tienen una predilección por

la afectación del SNC. La citología convencional (CC) tiene sensibilidad limitada en la evaluación de las muestras de LCR para las neoplasias hematológicas, y la pleocitosis se ha visto en asociación con algunos trastornos no neoplásicos, lo que puede dar lugar a resultados falsamente positivos.(25) Existe evidencia reciente de que el involucro del SNC puede no ser detectable por la citología convencional.(26) Ha sido previamente demostrado que la citometría de flujo (CMF) del LCR tiene una alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de enfermedades del SNC.(25, 26) Avances más recientes en CMF, incluyendo la capacidad de detectar más parámetros en un solo tubo, han mejorado aún más la detección de anormalidades. Por eso, se ha recomendado que la CMF se realice de forma rutinaria, en conjunto con la citología, en las muestras de LCR en las que se está evaluando la infiltración del SNC por neoplasias hematológicas.(25)

1.2.4.1 Microscopía

La evaluación citológica se debe realizar dentro de 2 horas después de la punción, preferiblemente dentro de 30 min para evitar lisis celular.(12) En condiciones normales el recuento celular debe ser menor o igual a 5 células/ml con predominio linfocitario (linfocitos: 93-97%; polimorfonucleares: 1-3%; monocitos: 0.5-1%).(25) La pleocitosis es el término con que se denomina al aumento del contenido en células (superior a lo normal).(27)

En general, el recuento de células y el diferencial se pueden obtener mediante la evaluación del número de células y la morfología en portaobjetos por microscopía, por recuento automático basado en propiedades de

dispersión celulares o por citometría de flujo en el que la expresión del antígeno de las células se evalúa en combinación con propiedades de dispersión de luz. Específicamente, el conteo microscópico de glóbulos blancos (GB) y glóbulos rojos (GR) se realiza usando una cámara de Neubauer o Fuchs-Rosenthal, las cuales contienen una rejilla de recuento microscópicamente visible y se utilizan con un volumen de muestra fijo. La tinción con reactivo de Samson o Türk se puede añadir al procedimiento para facilitar el recuento de GB y realizar el diferencial. Sin embargo, en las muestras de LCR con baja celularidad (<5 leucocitos/ μl), no se realiza diferencial mediante microscopía. Cuando el recuento de leucocitos es superior al valor de referencia, la mayoría de los laboratorios realizan centrifugación (cytospin) de la muestra, seguido de tinción Wright o de May-Grünwald-Giemsa para permitir diferenciar la morfología de las células en el LCR.(28) Esta técnica permite diferenciar entre los monocitos, linfocitos y granulocitos, que es de mayor importancia para los pacientes con enfermedad neurológica aguda. El recuento de eritrocitos es importante para excluir la hemorragia traumática como la causa de un elevado recuento de glóbulos blancos. Aunque el recuento microscópico y diferencial se ha utilizado durante mucho tiempo en el análisis del LCR de rutina, el laboratorio clínico se enfrenta a varios retos en la realización del mismo.(28)

1.2.4.2 Cito-morfología

El examen morfológico de las células del LCR se realiza en preparados por citocentrifugado teñidos con May-Grünwald-Giemsa.(28) Aunque es altamente específico ($>95\%$) en afectación del SNC, la CC del

LCR, el "patrón de oro" de diagnóstico; sin embargo, tiene una sensibilidad relativamente baja (<50%), con una tasa de falsos negativos de 20% a 60%.(22, 24, 28) La baja sensibilidad de la CC se debe a la escasez de células en el LCR y similitudes morfológicas que pueden hacer que sea difícil distinguir la morfología benigna de las células malignas.(24)

La interpretación de los resultados citológicos puede ser difícil debido a la escasez de células en LCR y las posibles similitudes morfológicas entre células benignas y malignas. El examen citomorfológico se utiliza en pacientes con sospecha de infiltración leptomenígea de tumores sólidos o malignidades hematológicas.(28)

El diagnóstico de afectación del SNC por análisis del cito-centrifugado se clasifica como lo muestra el cuadro 1. Aun cuando haya menos de cinco blastos/ μ L existe mayor riesgo de una recaída del SNC. Esto obliga a la evaluación de la citología del líquido cefalorraquídeo como prueba diagnóstica en la LLA.(29)

Cuadro 1. Definición de infiltración del sistema nervioso central en la LLA(29)

Condición	Hallazgos
SCN-1	Sin linfoblastos
SCN-2	< 5 linfoblastos en el LCR
SCN-3	> 5 linfoblastos en el LCR o parálisis de pares craneales

1.2.4.3 Analizador Hematológico

Históricamente el conteo celular de fluidos corporales no podía ser realizado en contadores celulares automatizados debido a los altos conteos de fondo, partículas que interfieren (restos celulares) potencialmente y la fragilidad aumentada de las células en muestras de fluidos corporales. La

llegada de la nueva generación de analizadores hematológicos con bajos conteos de fondo, histogramas/dispersogramas para la identificación de sustancias que interfieren y sistemas lisantes selectivos, hacen posible realizar los conteos celulares automatizados (CA) en la mayoría de los fluidos corporales.(30, 31)

Los conteos celulares en fluidos corporales pueden añadir información diagnóstica importante concerniente a la etiología de la enfermedad o a la causa de formación excesiva del fluido. Los conteos de eritrocitos son de poca importancia diagnóstica excepto en el líquido cefalorraquídeo y no es realizado en otros tipos de fluidos.(30)

El analizador hematológico Sysmex XT-4000i es un analizador automático hematológico para uso de diagnóstico in vitro en laboratorios clínicos. El XT-4000i puede analizar y generar resultados de 39 parámetros. En el bloque del detector óptico, se analizan leucocitos y reticulocitos mediante el método de citometría de flujo por fluorescencia utilizando un láser semiconductor. El detector de eritrocitos analiza el recuento de eritrocitos y plaquetas utilizando el enfoque hidrodinámico. Los datos de análisis se muestran en la unidad de proceso de información.(31)

El modo de análisis de fluido corporal de XT-4000i utiliza el diagrama de dispersión 4DIFF y la distribución del recuento de eritrocitos obtenidos de una secuencia de análisis específico para calcular y mostrar los recuentos de leucocitos (WBC-BF), los recuentos y porcentajes de células mononucleares (MN)/polimorfonucleares (PMN) y los recuentos de eritrocitos (RBC-BF) encontrados en el fluido corporal.(31)

1.2.4.4 Citometría de flujo

El uso de análisis de CMF del LCR, además de examen morfológico aumenta en gran medida la tasa de detección de localización leptomenígea de neoplasias hematológicas (NHL).(32)

La CMF es una herramienta valiosa para el diagnóstico y la estadificación de los trastornos hematológicos relacionados con los ganglios linfáticos, la sangre y la médula ósea.(24) La CMF puede detectar de manera confiable pequeñas poblaciones de células con fenotipos aberrantes con alta sensibilidad.(22) Metodológicamente, la citometría de flujo puede detectar células B aberrantes que constituyen tan sólo un 0,01% de los linfocitos totales, una sensibilidad capaz de detectar la participación oculta del líquido cefalorraquídeo. Y, debido a su sensibilidad superior con respecto a la CC, representa el enfoque estándar para la detección de la afectación meníngea oculta en neoplasias linfoides agresivas.(22, 33)

Como el número de células en el LCR es bajo (normalmente <5 células/ μ l) y parecen disminuir rápidamente en el tubo en que se colectaron pocas horas después de la punción lumbar, las muestras de LCR para el análisis de citometría de flujo se deben analizar inmediatamente.(17, 32) Por lo tanto, para obtener resultados óptimos, se necesita la disponibilidad inmediata de esta técnica, ya que cualquier retraso en el transporte o procesamiento de la muestra dará lugar a una disminución del número de células en el LCR y es probable que se reduzca la sensibilidad del análisis.(32)

Para abordar este problema, varios métodos de estabilización de células se han utilizado para reducir la pérdida celular en las muestras de

LCR antes de análisis de citometría de flujo. Sin embargo, sólo dos de estos métodos se han utilizado en estudios clínicos grandes destinados a la detección de NHL: la obtención de LCR en tubos con 2 ml de medio que contiene suero y la obtención de LCR en tubos con 0.2 ml del agente fijador comercialmente disponible TransFix™. (32)

La adición de medio que contiene suero a LCR impide pérdida celular en hasta por lo menos 5 horas de almacenamiento. Sin embargo, los tubos de almacenamiento del LCR con medio que contiene suero no están disponibles comercialmente y tienen una vida útil limitada de alrededor de 3 meses. El uso de tubos de almacenamiento del LCR con Transfix puede ser una alternativa atractiva para la estabilización de las células en el LCR debido a su disponibilidad comercial y la vida útil más larga, es de, 1 año.(32)

TransFix es un reactivo de estabilización celular que contiene un buffer o tampón, un aldehído alifático, y sales de metales pesados. Transfix en combinación con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) también se ha utilizado para estabilizar muestras de LCR para permitir el envío durante la noche para el análisis por citometría de flujo.(32)

Capítulo II

2. JUSTIFICACIÓN

Es necesario optimizar la estrategia de laboratorio para el diagnóstico oportuno de la presencia de linfoblastos en el SNC en pacientes con LLA.

Capítulo III

3. HIPÓTESIS

H0:

El análisis citomorfológico negativo del LCR de pacientes con LLA descarta efectivamente la presencia de linfoblastos en el Sistema Nervioso Central.

H1:

El análisis citomorfológico negativo del LCR de pacientes con LLA no descarta efectivamente la presencia de linfoblastos en el Sistema Nervioso Central.

Capítulo IV

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General:

Determinar la eficiencia del análisis cito-morfológico del LCR para el diagnóstico de infiltración del SNC en pacientes con LLA.

4.2 Objetivos particulares:

1. Establecer la utilidad del análisis por citometría de flujo del LCR en pacientes con LLA.
2. Determinar la sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo del análisis citomorfológico del LCR.
3. Comparar los cuatro métodos de laboratorio disponibles para evaluar la presencia de células en el LCR.

Capítulo V

5. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se desarrolló en el Servicio de Hematología del Hospital Universitario “Dr. José E. González” de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

5.1 Pacientes incluidos en el estudio

En este estudio se incluyeron pacientes que acudieron al Servicio de Hematología del Hospital Universitario “Dr. José E. González” durante el periodo de julio del 2016 a junio del 2017 a consulta para diagnóstico o seguimiento de su enfermedad.

5.2 Criterios de inclusión de pacientes

- Diagnóstico reciente de LLA
- Sospecha clínica de recaída al SNC
- Finalización de Rx-Qx-Tx intratecal para recaída al SNC
- Que cuenten con su expediente clínico completo
- Que se cuente con sus estudios de LCR en los diarios correspondientes

5.3 Criterios de exclusión

- Volumen inadecuado de la muestra de LCR (< 2ml)

5.4 Materiales y Reactivos

- Colorante Wright
- Pipetas automáticas
- Puntillas nuevas
- Tubos Falcón de poliestireno de 5ml
- Reloj cronómetro
- BD Anticuerpos marcados con fluorocromos: CD1a, CD3, CD3c, CD4, CD8, CD10, CD14, CD19, CD20, CD34, CD38, CD45, CD56.
- PBS + 0.09% NaN₃ + 0.5% de BSA
- FACS Lysing dilución 1:10
- BD Intrasure™ Kit
- Portaobjetos
- Cámara para cytopsin sencilla
- Filtros para cámara de cytopsin sencilla
- Cubre objetos
- Cámara de Fuchs-Rosenthal
- Tubos capilares
- Cell pack
- Stromatolyser 4DL
- Stromatolyser 4DS
- Sulfolyser

5.5 Equipos:

- Analizador hematológico automático Sysmex XT-4000i®.
- Citocentrífuga Aerospray® Hematology Pro

- Citómetro BD FACS Canto™ II.
- Centrífuga IEC Centra CL2
- Microscopio Axiostar Plus, ZEISS ®

5.6 Métodos

5.6.1 Examen en fresco

1. Agitar suavemente la muestra.
2. Limpiar la cámara de Fuchs-Rosenthal con una torunda con alcohol y una gasa limpia y seca.
3. Colocar un cubreobjetos encima de la cámara de Fuchs-Rosenthal.
4. Tomar muestra con un capilar.
5. Colocar la punta del capilar sobre la cámara para que el líquido baje por capilaridad hasta llenar la cámara.
6. Observar al microscopio a 40x, contar las células en el cuadrante de leucocitos y en el de eritrocitos.
7. Realizar los cálculos correspondientes para cada tipo celular.

5.6.2 Cito-centrifugado

1. Limpiar los portaobjetos para ayudar a una mayor adherencia celular.
2. Armar la cámara de muestra única.
3. Etiquetar el portaobjetos con el registro del paciente, el nombre completo y la fecha de realización del estudio.
4. Colocar el portaobjetos en el soporte deslizante con la parte de etiquetado frente a la cámara de muestra única.
5. Presionar la palanca de liberación e insertar la cámara de muestra única.

6. Mezclar la muestra suavemente.
7. Agregar 200 μL de la muestra en la cámara de muestra única.
8. Cerrar la centrifuga.
9. Centrifugar 4 minutos a 1000 rpm.
10. Sacar el portaobjetos y después la cámara de muestra única de la centrifuga.
11. Señalar con un marcador el área en donde se localizan las células.
12. Dejar secar el portaobjetos por 5 minutos y teñir con la tinción de Wright: Primero cubrir completamente el portaobjetos con solución de Wright y dejar reposar por 5 minutos. Después agregar agua destilada y dejar reposar 5 minutos. Lavar con agua de la llave y dejar secar.
13. Observar al microscopio a 40x y 100x para realizar el conteo de las células.
14. Reportar de hallazgos.

5.6.3 Analizador Hematológico

1. Asegúrese de que el instrumento está en el estado "PREPARADO". Compruebe que está encendido el diodo READY (preparado).
2. Haga doble clic en el icono "Controller" (Controlador) en la pantalla de menú. Aparecerá el menú Controller (controlador).
3. Haga doble clic en el icono "Manual Sample No." (ID muestra manual) en el menú Controller (Controlador) o haga clic en el botón "Manual" de la barra de herramientas. Aparecerá el cuadro de diálogo Manual Sample No. (ID de muestra manual).
4. Introduzca el ID de la muestra.
5. Haga clic en "Body Fluid" en "Modo" para ajustar el modo análisis.

6. Una vez completada la configuración, haga clic en “Aceptar” o “Cancelar”.

Aceptar: Se confirma el ID de la muestra, el perfil y el modo de análisis, y se cierra el cuadro de diálogo.

Cancelar: Se cancela la ID de la muestra, el perfil y el modo de análisis, y se cierra el cuadro de diálogo.

7. Al hacer clic en “Aceptar”, se ejecuta una comprobación de fondo al mismo tiempo. Si el valor de fondo es igual o menor que los valores mostrados en la tabla, la comprobación de fondo se da por finalizada (Si el valor de fondo es mayor al mostrado en la tabla, el valor se muestra sobre fondo rojo).

WBC-BF	0.001 [$\times 10^3/\mu\text{L}$]
RBC-BF	0.003 [$\times 10^6/\mu\text{L}$]

Si los valores de fondo están por encima de las cifras aceptables, se produce un “BACKGROUND ERROR” (error de fondo) y aparece un cuadro de diálogo de ayuda.

Si los valores de fondo superan los niveles aceptables, al hacer clic en “OK” (Aceptar) en el cuadro de diálogo Help (Ayuda) se cerrará éste cuadro y comenzará un lavado automático.

8. Si el resultado de la comprobación de fondo da un valor de fondo inferior o igual al límite admisible, el diodo de “PREPARADO” se enciende y la unidad principal se ajusta en el estado preparado para el análisis de fluido corporal.
9. Mezcle completamente pero con cuidado el contenido del tubo de ensayo. (Un mezclado excesivo puede disgregar las células

sanguíneas en el fluido corporal e imposibilitar la obtención de resultados precisos).

10. Quite el tapón con cuidado para no derramar la muestra.
11. Mantenga el tubo de muestras debajo de la pipeta de aspiración de tal forma que la punta de la pipeta esté en la parte inferior del tubo de muestras. Pulse el interruptor INICIO.

No retire el tubo de muestra mientras parpadee el diodo de PREPARADO: ya que la muestra se está aspirando. (El análisis requiere un volumen adecuado. El volumen de muestra necesario es de 1.0 mL o más y el volumen de muestra aspirada es de 85 µL)
12. Cuando se apague el diodo de PREPARADO (y se oigan dos pitidos cortos), retire el tubo de la muestra.
13. Cuando el diodo de PREPARADO se vuelva a encender, prepare la siguiente muestra y repita los pasos 9 al 12.
14. Observar los resultados obtenidos del análisis, lo cual se muestra en el explorador de muestras y el explorador de datos en la unidad de procesamiento de información (IPU).

Parámetros en modo fluidos corporales.

N	Parámetros	Descripción
1	WBC-BF	WBC en fluidos corporales
2	RBC-BF	RBC en fluidos corporales
3	MN%	Porcentaje de células mononucleares
4	MN#	Número absoluto de células mononucleares
5	PMN%	Porcentaje de células polimorfonucleares
6	PMN#	Número absoluto de células polimorfonucleares
7	TC-BF#	Conto total de partículas (excepto fantasmas) que aparecen en el dispersograma Diff; todas las partículas WBC y no-WBC.

NOTA: las muestras deben medirse inmediatamente después de su extracción.

5.6.4 Citometría de flujo

1. Prepare los tubos necesarios dependiendo de los anticuerpos que se van a utilizar. Estos tubos deberán ser de polipropileno de 5 mL nuevos.
2. Etiquete cada tubo con el o los anticuerpos correspondientes y el nombre completo del paciente.
3. Centrifugue la muestra 5 minutos a 300g, retire el sobrenadante y deje la cantidad mínima necesaria para el proceso alrededor de 400 μ L (el volumen final se ajusta dependiendo de la cantidad de tubos a procesar), esto con el fin de concentrar la celularidad debido a la escasa cantidad de células que tienen los LCR.
4. Coloque 100 μ L de la muestra centrifugada y resuspendida.
5. Agregue la cantidad necesaria de anticuerpos monoclonales a utilizar.
6. Agite en vortex suavemente.
7. Incube por 15 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad.
8. Agregue 2 mL de solución lizante filtrada.
9. Incube por 10 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad.
10. Centrifugue por 5 minutos a 300g.
11. Retire el sobrenadante por aspiración.
12. Resuspender en 300 μ L de solución de lavado filtrada y agitar en vortex.
13. Leer inmediatamente.
14. Analizar los datos.

5.7 Fórmulas utilizadas

El número de leucocitos contados mediante la cámara de Fuchs-Rosenthal se obtuvo mediante las siguientes fórmulas:

$$\text{Concentración Celular} = \frac{\text{Total Células Contadas} \times 10.000}{\text{Número de Cuadros Contados}}$$

5.8 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de cada método se integraron en una base elaborada en el software SPSS versión 22.0. Se realizó un análisis descriptivo para documentar la frecuencia, mediana y rango de las variables numéricas. Se determinó la sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivo y negativo para cada uno de los métodos utilizados, mediante chi cuadrada para comparar variables categóricas dicotómicas. Se utilizó el análisis con T de Student para comparación de medias en muestras numéricas paramétricas. Para variables no paramétricas se utilizó la prueba U de Mann Whitney. Se realizó análisis ROC en el software SPSS versión 22.0 con la finalidad de determinar la eficiencia de cada método de laboratorio para evaluar la presencia de células en el LCR tomando como referencia la Citometría de flujo para la detección de linfoblastos.

Capítulo VI

6. RESULTADOS

En el periodo de estudio se analizaron 60 muestras de LCR que cumplieron con los criterios de inclusión. Dos muestras fueron excluidas debido a que el volumen era inadecuado para el análisis (< 2 ml).

Se incluyeron 34 (56.7%) muestras de hombres y 26 (43.3%) de mujeres, con un promedio de edad de 17 años (rango: 2-60). Hubo 23 (43.3%) pacientes de edad pediátrica y 34 (56.7%) fueron adultos. El Inmunofenotipo de la LLA fue de células B en 56 (93.3%) y células T en 4 (6.7%) muestras. Hubo 43 (71.7%) muestras de LCR de pacientes con alto riesgo y 17 (28.9%) de riesgo estándar. Las características clínicas y de laboratorio de los 60 pacientes se muestran en la Tabla 1.

De toda la población en estudio, el análisis por CMF detectó mediante perfil antigénico linfoblastos en 14 (23.3%) de 60 muestras estudiadas. En cuanto al análisis por el CM se encontraron 15 (25%) muestras positivas. El análisis por CC encontró 4 (6.7%) muestras positivas y el CA fue positivo en 22 (36.7%) muestras de LCR.

Tabla 1. Características clínicas y de laboratorio de 60 pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) diagnosticados y tratados en un centro de referencia en el noreste de México

Variable	N= (%).
Edad, mediana (años), rango	17 (2-60)
Género	
Masculino	34 (56.7)
Femenino	26 (43.3)
Inmunofenotipo	
Células B	56 (93.3)
Células T	4 (6.7)
Riesgo al diagnóstico	
Alto riesgo	43 (71.7)
Riesgo estándar	17 (28.3)
Estado Clínico de la Muestra de LCR	
Diagnóstico	26 (43.3)
Sospecha de recaída a SNC	23 (38.3)
Después del tratamiento por recaída a SNC*	11 (18.4)

* Muestra de LCR negativa por CC

6.1 Utilidad del análisis por citometría de flujo del LCR en pacientes con LLA.

Al comparar la CC considerado el método estándar contra la CMF, observamos que hubo 4 (6.6%) muestras positivas por ambas metodologías para la presencia de linfoblastos y 10 (16.6%) muestras solo presentaron

CMF positiva, teniendo una diferencia significativa ($p= 0.002$). En cuanto al motivo del estudio, de los pacientes con nuevo diagnóstico hubo 2 (7.7%) muestras positivas por CMF con CC negativo, y 24 (92.30%) fueron negativas por ambas metodologías. De los 23 pacientes con sospecha clínica de recaída, hubo 4 (17.4%) muestras positivas por ambas metodologías, 6 (26.1%) muestras tuvieron CC negativa y CMF positiva, y 13 (56.5%) muestras fueron negativas por ambas metodologías. De los 11 pacientes que fueron tratados por recaída al SNC, hubo 2 (18.2%) muestras positivas por CMF y negativas por CC, y 9 (81.8%) muestras fueron negativas por ambas metodologías. Los resultados se observan en la Tabla 2.

Tabla 2. Análisis del motivo de estudio contra la CC y CMF

	CC +	CC-	CMF+	CMF-
Nuevo Diagnóstico (n=26)				
Niños	0	10	0	10
Adultos	0	16	2	14
Sospecha clínica de recaída al SNC (n=23)				
Niños	1	10	4	7
Adultos	3	9	6	6
Después de Tx por recaída a SNC (n=11)				
Niños	0	5	0	5
Adultos	0	6	2	4

*CC: Citomorfología convencional, cytospin, CMF: Citometría de flujo, SNC: Sistema Nervioso Central

6.2 Determinación de sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo del análisis citomorfológico del LCR.

Se realizó un análisis para evaluar la sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo (VPP y VPN) del análisis por CC del LCR para la identificación de linfoblastos, utilizando la CMF como método de referencia. Se determinó que la CC presentó una especificidad de 100%, y sensibilidad de 28.6% para la detección de linfoblastos. Por otro lado, tiene un VPP del 100% y VPN del 82.1%. Los resultados se observan en la tabla 3.

Tabla 3. Sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo del análisis cito-morfológico del LCR para la identificación de linfoblastos.

	CC
Sensibilidad	28.6%
Especificidad	100%
VPP	100%
VPN	82.1%

* CC: Citomorfología convencional, cytopsin, VPP: Valor predictivo positivo, VPN: Valor predictivo negativo

6.3 Comparación de cuatro métodos de laboratorio disponibles para evaluar la presencia de células en el LCR.

Se realizó una comparación entre los cuatro métodos para evaluar la presencia de células en el LCR, lo cual se observa en la tabla 4. El análisis por CC se comparó con la CMF evaluando la presencia de blastos, encontrando 4 (6.7%) muestras positivas por ambos métodos, 10 (16.7%) muestras positivas

por CMF pero negativas por CC y 46 (76.6%) muestras negativas por ambos métodos, con un valor de $p=0.000$. En cuanto al CM y CA se compararon los leucocitos totales contra la presencia de linfoblastos por CMF. Al comparar la CMF contra CM observamos 8 (13.3%) muestras positivas por ambos métodos, 6 (10%) positivas por CMF y negativas por CM, 7 (11.7%) positivas por CM pero negativas por CMF y 39 (65%) negativas por ambos métodos. En cuanto a la comparación de CMF contra el CA se encontraron 10 (16.7%) muestras positivas por ambos métodos, 12 (20%) positivas por CA y negativas por CMF, 4 (6.7%) positivas por CMF pero negativas por CA y 34 (56.6%) negativas por ambos métodos. Dichos resultados se observan en la Tabla 4.

Tabla 4. Comparación de los métodos de laboratorio disponibles para evaluar la presencia de células en el LCR

	Comparado con Leucocitos Totales					
	CC +	CC -	CM +	CM -	CA +	CA -
CMF Positiva	4	10	8	6	10	4
CMF Negativa*	0	46	7	39	12	34
^C Valor de p	p=0.000		p=0.002		p=0.002	

CC: Citomorfología convencional, cytospin, CMF: Citometría de flujo, CM: Conteo manual, CA: Conteo automatizado.

6.4 Análisis ROC

Al realizar la comparación de la eficiencia de los métodos, se compararon contra la CMF para detectar la afectación del SNC, la prueba con

mayor sensibilidad en nuestro grupo fue el recuento celular automatizado (CA), con una sensibilidad de 71.4%, mientras que la prueba con mayor especificidad fue CC, con una especificidad del 100%. La sensibilidad, la especificidad y los valores predictivos de los ensayos se determinaron y se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Sensibilidad, especificidad y valores predictivos para el recuento manual y automatizado en la detección de glóbulos blancos (CM y CA) o linfoblastos (CC, Cytospin) del LCR de todos los pacientes. La citometría de flujo se adoptó como la prueba de referencia.

	CM	CA	CC
Sensibilidad	57.1%	71.4%	28.6%
Especificidad	84.8%	73.9%	100%
VPP	53.3%	45.4%	100%
VNP	86.7%	89.5%	82.1%

*CC: Citomorfología convencional, cytopsin, CM: Conteo manual, CA: Conteo automatizado.

Se realizó análisis ROC para el CM y el CA de GB con el fin de evaluar el mejor punto de corte para considerar infiltración del SNC por linfoblastos, utilizando como estándar de oro la CMF.

La mediana del recuento manual de GB del LCR en pacientes con afectación del SNC detectada por CMF fue significativamente mayor que aquellos que no presentaban afectación, 10.0 (rango 0–1280.0) contra 6.25 (rango 0-30.0), respectivamente ($p=0.004$), el recuento óptimo de GB que mejor correlacionó con la afectación a SNC según la CMF fue de 3.75

células/ μ l, con una sensibilidad de 57,1%, especificidad de 84,8%, con un área bajo la curva (AUC) de 0.682 y una índice de Youden de 0.419, (figura 1).

Para el CA por Sysmex XT-4000i la mediana de GB en los pacientes con infiltración del SNC detectados por CMF fue 7 (rango 0.0-1578.0) frente a 5.5 (rango 0.0-28.0) respectivamente, sin diferencia significativa ($p= 0.214$). El punto de corte óptimo para GB fue de 4.5 células/ μ l, con una sensibilidad de 71.4% y una especificidad de 73.9%, un AUC de 0.715 y un índice de Youden de 0.41, (figura 2) para la detección de blastos.

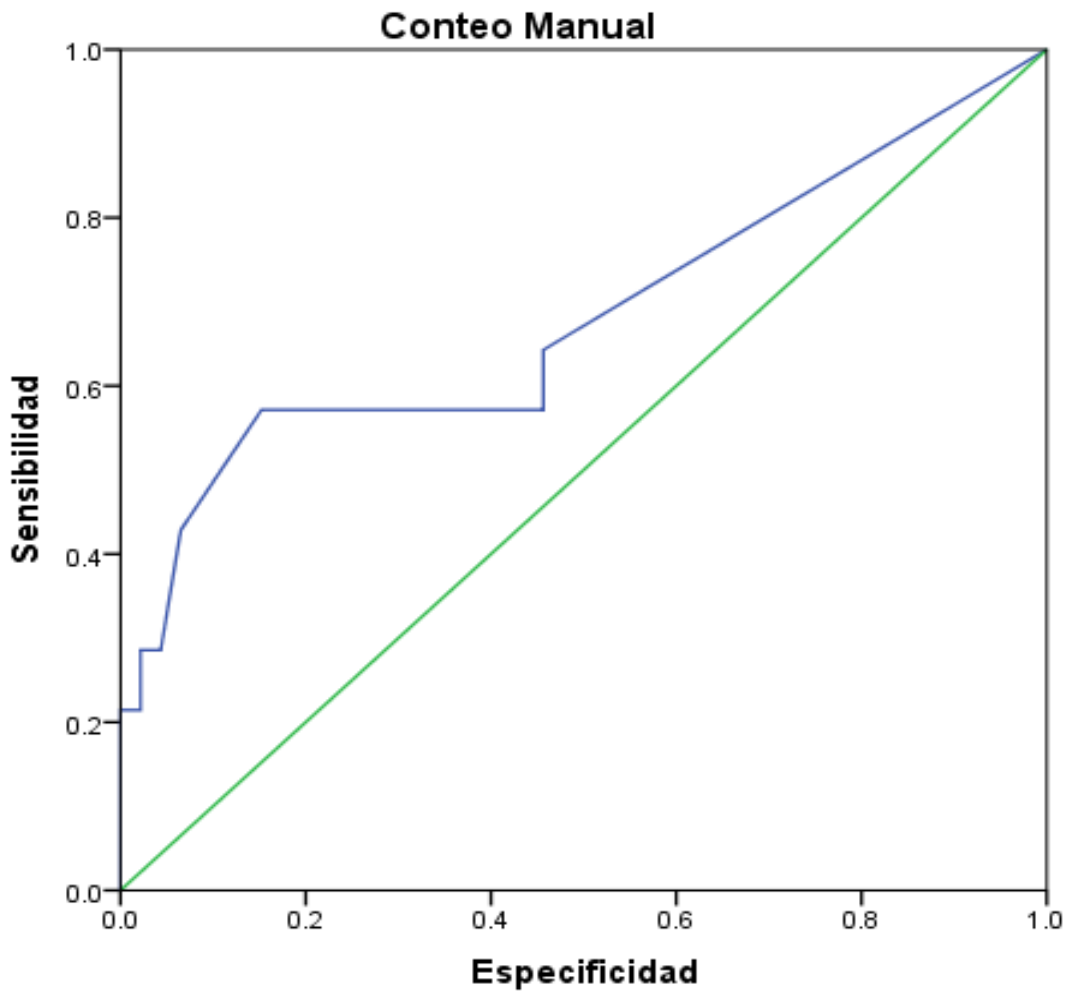


Figura 1. Curva ROC del recuento manual de globulos blancos de las muestras de LCR de todos los pacientes [área bajo la curva (AUC) = 0.682]. El punto de corte óptimo seleccionado de 3.75/ μ l de células predijo la afectación del SNC, definida por CFM positivo con una sensibilidad de 57.1% y especificidad de 84.8%.para GB.

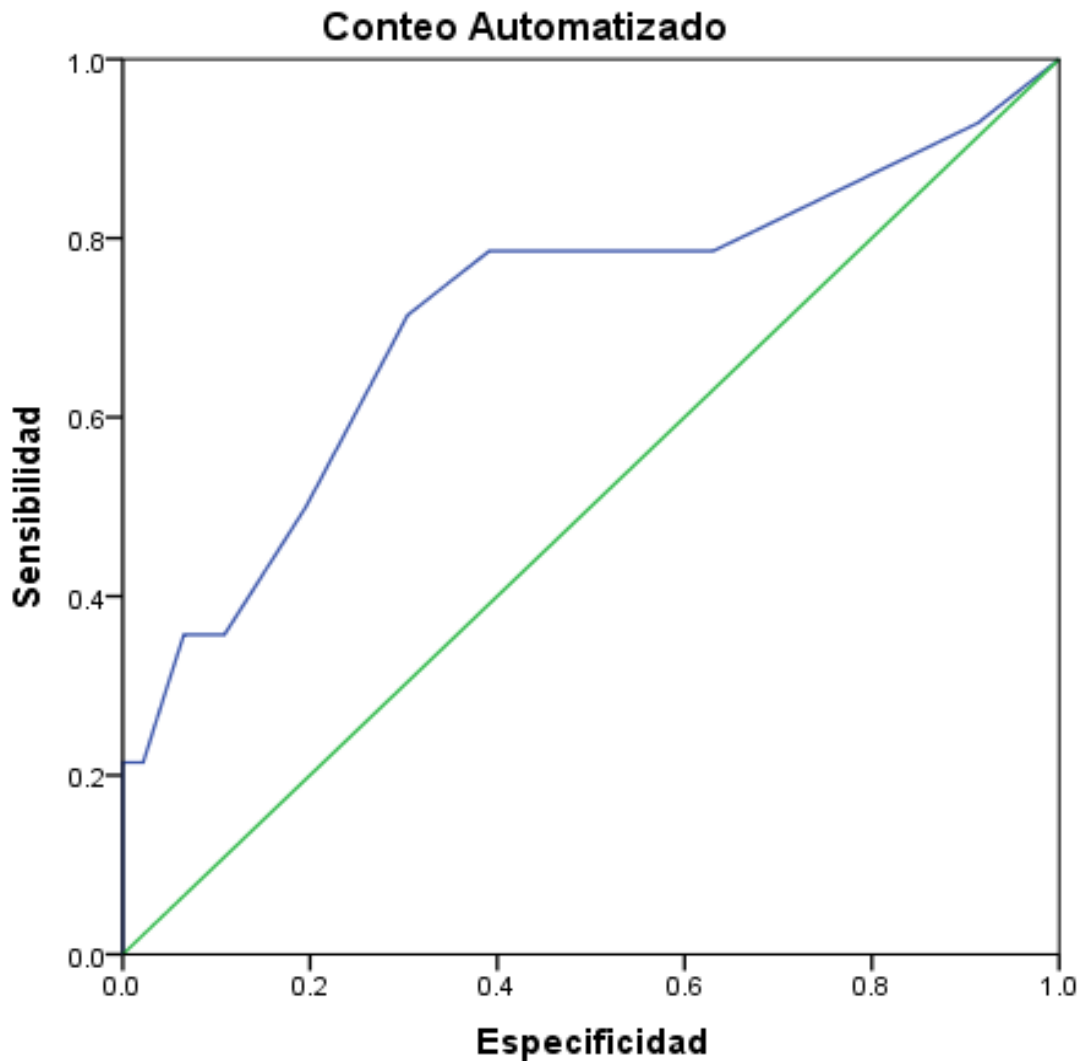


Figura 2. Curva ROC del recuento automatizado de globulos blancos con el modo fluido corporal de Sysmex XT-4000i de las muestras de LCR de todos los pacientes [área bajo la curva (AUC) = 0.715]. El punto de corte óptimo seleccionado de 4.5/ μ l de células predijo la afectación del SNC, definida por CFM positivo con una sensibilidad de 71.4% y especificidad de 73.9%.para GB.

Capítulo VII

7. DISCUSIÓN

La recaída a SNC representa entre 30-40% de las recaídas según algunos estudios (10, 17), lo cual es un obstáculo terapéutico importante para curar la LLA. La infiltración a SNC sigue siendo un reto diagnóstico, además de saber que es un sitio en el cual las células presentes se encuentran expuestas a bajas concentraciones del fármaco utilizado en la terapia intratecal.

El problema en el diagnóstico de infiltración del SNC es que no se cuenta con un método preciso que permita detectar linfoblastos cuando se realiza el análisis del LCR, por lo cual, es necesario optimizar la estrategia de laboratorio para el diagnóstico oportuno de la presencia de linfoblastos en SNC de pacientes con LLA y evitar recaídas futuras o bien, prevenirla mediante terapia profiláctica.

El método estándar para detectar la afectación del SNC es el examen por CC de un preparado por citocentrifugación del LCR. El cual aunque es altamente específico (>95%) se asocia con una sensibilidad limitada (30%), además de dar entre 20 a 60% de resultados falsos negativos.(24) Nuestros hallazgos apoyan los estudios que concluyen que este método tiene una pobre sensibilidad de 28.6% (15), y alta especificidad del 100% comparado contra la presencia de linfoblastos por CMF.(15, 24) Además, en la literatura se ha afirmado que el uso de la CC no es suficiente para detectar infiltración del SNC.(26)

La CC puede presentar problemas como escasas células, presencia

de artefactos y la consideración de la morfología atípica como evidencia no concluyente de actividad neoplásica, lo cual algunos observadores pueden interpretar como muestra positiva. Aunque la sensibilidad de la CMF es considerablemente mayor que CC, este método no ha sido estandarizado para el diagnóstico de infiltración del SNC, su uso varía entre las instituciones y su significado clínico después de detectar la afectación del SNC como factor de riesgo para la recaída sigue siendo algo desconocido.

En el presente estudio se comparó el uso de la CC considerado el método estándar contra la CMF para la detección de linfoblastos en SNC, y observamos que hubo 4 (6.6%) muestras positivas por ambas metodologías para la presencia de linfoblastos y 10 (16.6%) muestras solo presentaron CMF positiva, teniendo una $p= 0.002$. Esto es similar a lo reportado en otros estudios (15, 32, 33), en los cuales se observó que la CMF aumenta la detección de infiltración del SNC.

Existen estudios que apoyan que la afectación del SNC detectada sólo por CMF se asocia a una mayor incidencia de recaída y menor supervivencia global (15, 16), lo que sugiere que los pacientes con CMF positiva podrían beneficiarse de una terapia intensificada adicional sistémica y/o dirigida a SNC. Sin embargo, ninguna guía clínica actual apoya firmemente este último enfoque.

Los pacientes con infiltración del SNC al momento del diagnóstico de LLA tienen un mayor riesgo de recaída y requieren terapia dirigida de intensificación. El impacto en el resultado de un pequeño número de linfoblastos al diagnóstico es discutible. Debido a esto, es importante contar con un método que tenga la capacidad de identificar con precisión una cantidad pequeña de células en el LCR para detectar de manera temprana la

presencia de linfoblastos en pacientes asintomáticos, o bien, diagnosticar recaída a SNC en aquellos pacientes con sospecha clínica que presentan un análisis por CC negativo.

En el presente estudio observamos un 5.8% de adultos con nuevo diagnóstico de LLA en los que se identificaron linfoblastos sólo con el uso de la CMF. Lo cual es similar a lo reportado en la literatura, en donde se describe la presencia de linfoblastos en SNC al diagnóstico en menos del 10% de los adultos.(18) De los pacientes que presentaban sospecha clínica de recaída a SNC encontramos que 6 (26.1%) presentaron un análisis por CC negativo y CMF positiva, lo cual indica que en 1 de cada 4 pacientes que presentan sospecha clínica de infiltración no se detectan linfoblastos por el método de referencia. Por lo anterior, debemos evaluar la utilización de la CMF en aquellos casos en que la clínica indique una alta posibilidad de infiltración del SNC.

En este reporte se observó que la cantidad de linfoblastos detectados por CMF fue significativamente mayor en aquellas 4 muestras con un CC positivo que en aquellas con CMF positiva solamente, lo cual sugiere que la evaluación morfológica es dependiente del observador de la CC, incluso si es realizada por observadores experimentados, ya que realiza una detección subóptima en todos los pacientes.

Las limitantes principales del estudio son un tamaño relativamente reducido de la muestra y la heterogeneidad en grupos de edad y estadios clínicos. Lo anterior sugiere que es necesario realizar estudios multicéntricos para evaluar la importancia de la CMF en el uso rutinario del análisis de LCR para detección de infiltración por linfoblastos.

Capítulo VIII

8. CONCLUSIÓN

Se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna, ya que el análisis citomorfológico negativo del LCR de pacientes con LLA no descarta efectivamente la presencia de linfoblastos en SNC.

Los resultados de este estudio confirman que la CMF del LCR tiene mayor sensibilidad que la CC para la detección de infiltración del SNC en los pacientes con LLA.

Capítulo IX

9. PERSPECTIVAS

1. Valorar establecer la CMF del LCR de rutina en las tres etapas que se incluyeron en este estudio: nuevo Dx, sospecha de recaída y final del Tx de recaída al SNC.
2. Dar seguimiento clínico a aquellos pacientes que presentaron un análisis por citología convencional negativo y citometría de flujo positiva ya que actualmente éste último método no es el estándar para definir la necesidad de dar tratamiento.
3. Dar seguimiento a los pacientes de este estudio con nuevo diagnóstico con respecto a recaída al SNC a 18, <36 y >36 meses.
4. Determinar la sobrevida general a 5 años.
5. Establecer la eficacia del tratamiento de la recaída al SNC en nuestro centro.

Capítulo X

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Cornell R Fea. Adult Acute Leukemia. *Disease-a-Month*. 2012;58(4):219-38.
2. Jaime-Pérez JC, Jiménez-Castillo RA, Herrera-Garza JL, Gutiérrez-Aguirre H, Marfil-Rivera LJ, Gómez-Almaguer D. Survival Rates of Adults With Acute Lymphoblastic Leukemia in a Low-Income Population: A Decade of Experience at a Single Institution in Mexico. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2017;17(1):60-8.
3. Pui CH, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2008;371(9617):1030-43.
4. Mullighan CG, Willman CL. Advances in the Biology of Acute Lymphoblastic Leukemia-From Genomics to the Clinic. *J Adolesc Young Adult Oncol*. 2011;1(2):77-86.
5. Lo Nigro L. Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2013;35(4):245-52.
6. Onciu M. Acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2009;23(4):655-74.
7. Grigoropoulos NF, Petter R, Van 't Veer MB, Scott MA, Follows GA. Leukaemia update. Part 1: diagnosis and management. *BMJ*. 2013;346:f1660.
8. Hunger SP, Mullighan CG. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *New England Journal of Medicine*. 2015;373(16):1541-52.
9. 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.
10. Inaba H GM, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2013;381(9881).
11. Faderl S, O'Brien S, Pui CH, Stock W, Wetzler M, Hoelzer D, et al. Adult acute lymphoblastic leukemia: concepts and strategies. *Cancer*. 2010;116(5):1165-76.
12. Deisenhammer F. BA, Egg R., Gilhus N. E., Giovannoni G. , Rauer S. , Sellebjerg F. and Tumani H. Routine Cerebrospinal Fluid (CSF) Analysis. 2010. In: *European Handbook of Neurological Management [Internet]*. Second Edition.
13. Brinker T, Stopa E, Morrison J, Klinge P. A new look at cerebrospinal fluid circulation. *Fluids Barriers CNS*. 2014;11:10.
14. Oresković D, Klarica M. The formation of cerebrospinal fluid: nearly a hundred years of interpretations and misinterpretations. *Brain Res Rev*. 2010;64(2):241-62.
15. Ranta S, Nilsson F, Harila-Saari A, Saft L, Tani E, Söderhäll S, et al. Detection of central nervous system involvement in childhood acute lymphoblastic leukemia by cytomorphology and flow cytometry of the cerebrospinal fluid. *Pediatr Blood Cancer*. 2015;62(6):951-6.
16. Martínez-Laperche C, Gómez-García AM, Lassaletta Á, Moscardó C, Vivanco JL, Molina J, et al. Detection of occult cerebrospinal fluid involvement during maintenance therapy identifies a group of children with acute lymphoblastic leukemia at high risk for relapse. *Am J Hematol*. 2013;88(5):359-64.
17. Levinsen M, Marquart HV, Groth-Pedersen L, Abrahamsson J, Albertsen BK,

Andersen MK, et al. Leukemic blasts are present at low levels in spinal fluid in one-third of childhood acute lymphoblastic leukemia cases. *Pediatr Blood Cancer*. 2016;63(11):1935-42.

18. Westerman IRDaDA. Cerebrospinal fluid analysis by flow cytometry in acute lymphoblastic leukemia: is it all that it is cracked up to be? *Leukemia & Lymphoma*. 2014;55(7):1441-3.

19. Doherty CM FRDLPTUMJ, 83(2):93-102. Diagnostic Lumbar Puncture. *The Ulster Medical Journal*. 2014;83(2):93-102.

20. Ellenby MS, Tegtmeyer K, Lai S, Braner DAV. Lumbar Puncture. *New England Journal of Medicine*. 2006;355(13):e12.

21. Subirá D, Castañón S, Román A, Aceituno E, Jiménez-Garófano C, Jiménez A, et al. Flow cytometry and the study of central nervous disease in patients with acute leukaemia. *Br J Haematol*. 2001;112(2):381-4.

22. Hegde U, Filie A, Little RF, Janik JE, Grant N, Steinberg SM, et al. High incidence of occult leptomeningeal disease detected by flow cytometry in newly diagnosed aggressive B-cell lymphomas at risk for central nervous system involvement: the role of flow cytometry versus cytology. *Blood*. 2005;105(2):496-502.

23. Biojone E, Queiróz ReP, Valera ET, Odashima NS, Takayanagui OM, Viana MB, et al. Minimal residual disease in cerebrospinal fluid at diagnosis: a more intensive treatment protocol was able to eliminate the adverse prognosis in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2012;53(1):89-95.

24. Del Principe MI, Maurillo L, Buccisano F, Sconocchia G, Cefalo M, De Santis G, et al. Central nervous system involvement in adult acute lymphoblastic leukemia: diagnostic tools, prophylaxis, and therapy. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2014;6(1):e2014075.

25. Craig FE, Otori NP, Gorrill TS, Swerdlow SH. Flow cytometric immunophenotyping of cerebrospinal fluid specimens. *Am J Clin Pathol*. 2011;135(1):22-34.

26. Manley S, Keenan R, Campbell H, Caswell M, Pizer B. No evidence for routine cerebrospinal fluid cytology in detecting asymptomatic central nervous system relapse in children with acute lymphoblastic leukaemia: 20 years' experience of a UK primary treatment centre. *Br J Haematol*. 2014;164(3):462-4.

27. Sevillano García M.D. CPP, Cacho Gutiérrez J. Alteraciones del líquido cefalorraquídeo y de su circulación: hidrocefalia, pseudotumor cerebral y síndrome de presión baja. *Medicine*; 2011. p. 4814-24.

28. de Graaf MT, de Jongste AH, Kraan J, Boonstra JG, Sillevius Smitt PA, Gratama JW. Flow cytometric characterization of cerebrospinal fluid cells. *Cytometry B Clin Cytom*. 2011;80(5):271-81.

29. Carmen CMRd. Importancia del laboratorio en el diagnóstico y pronóstico de leucemia aguda linfoblástica de la infancia 2005; 26:[129-36 pp.].

30. Ejemplo de procedimiento para el análisis de fluidos corporales en los analizadores XE, XT y XS de Sysmex. Departamento de aplicaciones y soporte científico. p. 1-22.

31. Sysmex Corporation. Kobe J. Analizador hematológico automático XT-4000i. Instrucciones de uso. 2009.

32. de Jongste AH, Kraan J, van den Broek PD, Brooimans RA, Bromberg JE, van Montfort KA, et al. Use of TransFix™ cerebrospinal fluid storage tubes prevents cellular loss and enhances flow cytometric detection of malignant hematological cells after 18 hours of storage. *Cytometry B Clin Cytom*. 2014;86(4):272-9.

33. Del Principe MI, Buccisano F, Cefalo M, Maurillo L, Di Caprio L, Di Piazza F,

et al. High sensitivity of flow cytometry improves detection of occult leptomeningeal disease in acute lymphoblastic leukemia and lymphoblastic lymphoma. *Ann Hematol.* 2014;93(9):1509-13.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

María Fernanda Borrego López

Candidata para el Grado de Maestra en Laboratorio de Hematología

Tesis: “COMPARACIÓN DEL ANÁLISIS CITOMORFOLÓGICO CON LA CITOMETRÍA DE FLUJO DEL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO PARA EL DIAGNÓSTICO DE INFILTRACIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL EN PACIENTES CON LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA”

Campo de estudio: Laboratorio de Hematología

Biografía:

Datos personales: nacida en Hermosillo, Sonora el 15 de Abril de 1992.

Educación: Egresada de la Universidad de Sonora, grado obtenido Químico Biólogo Clínico en 2015.