

## Metodología y aplicaciones de la citometría de flujo para el inmunofenotipaje de las leucemias agudas

### Methodology and applications of flow cytometry for immunophenotyping of acute leukemias

Dra. Vianed Marsán Suárez, Lic. Lázaro O. del Valle Pérez, Lic. Gabriela Díaz Domínguez, DrC. Consuelo Macías Abraham

Instituto de Hematología e Inmunología. La Habana, Cuba.

---

#### RESUMEN

La citometría de flujo (CMF) es una técnica de avanzada, altamente sensible y automatizada, que se emplea para el inmunofenotipaje de las células normales y leucémicas. En este artículo se muestran los principales aspectos metodológicos a tener en cuenta para un mejor desarrollo e interpretación del inmunofenotipo por CMF, entre los que se encuentran: tipo, cantidad, conservación y transportación de la muestra, uso de anticoagulantes, empleo de anticuerpos monoclonales y fluorocromos, lisado de hematíes, fijación celular, así como la calibración y compensación de la auto-fluorescencia. Finalmente, se exponen las principales aplicaciones de esta metodología para definir el estado de maduración celular leucémico, clasificar las leucemias agudas en distintos subtipos inmunológicos, identificar subgrupos de mal pronóstico y detectar fenotipos aberrantes. Todo lo anterior resulta de gran utilidad para el diagnóstico de la enfermedad mínima residual que permite estratificar a los pacientes en diferentes grupos de riesgo e individualizar el tratamiento antileucémico.

**Palabras clave:** citometría de flujo, inmunofenotipo, leucemias agudas.

---

#### ABSTRACT

Flow cytometry (FCM) is an advanced, highly sensitive and automated technique used for immunophenotyping of normal and leukemic cells. The main

methodological aspects to consider for better development and interpretation of immunophenotyping by FCM are shown in this article. Among them are: type, quantity, storage and transportation of the sample, use of anticoagulants, use of monoclonal antibodies and fluorochromes, erythrocyte lysate, cell attachment, calibration and auto-fluorescence compensation. Finally, the main applications of this methodology are given for defining the state of leukemic cell maturation, acute leukemias rank in different immunological subtypes, poor prognosis subgroups and to identify and detect aberrant phenotypes, which are useful for the diagnosis of minimal residual disease, allowing to stratify patients into different risk groups and thus to identify the anti-leukemic treatment.

**Keywords:** flow cytometry, immunophenotyping, acute leukemias.

---

## INTRODUCCIÓN

La citometría de flujo (CMF) constituye una técnica de avanzada, automatizada, objetiva y altamente sensible, muy útil para el estudio del inmunofenotipo de las células normales y anormales.<sup>1</sup>

Este procedimiento permite realizar análisis multiparamétricos del componente celular en suspensión de una manera individual, célula a célula, a través de sus características físico-químicas e identificar la expresión de proteínas celulares, lo que hace que con los procedimientos de disgregación de tejidos, como son los órganos linfoides o la piel, se pierda información sobre la localización tisular de cada una de las células presentes en la muestra. En estos casos, se recomienda emplear técnicas de inmunohistoquímica.<sup>2,3</sup>

La CMF emplea anticuerpos monoclonales (AcMo) unidos a fluorocromos, que son detectados y visualizados mediante un sistema informático apropiado y de forma rápida, permite analizar un elevado número de partículas en suspensión en un corto periodo (5 000 partículas/s); ofrecer información simultánea de varios parámetros celulares, identificar paralelamente antígenos de superficie y citoplasmáticos, cuantificar la intensidad antigénica por medio de los canales medios de fluorescencia y emplear múltiples marcajes para, de esta manera, detectar la coexpresión de antígenos aberrantes sobre el mismo blasto.<sup>1-3</sup>

Esta técnica posee una sensibilidad superior a  $1 \times 10^{-4}$ , es decir, es capaz de detectar una célula tumoral entre 10 000 células normales. Entre sus desventajas se puede mencionar: la incapacidad para diferenciar las células normales de los blastos leucémicos en muestras que contienen un número reducido de células y que el análisis requiere necesariamente el uso de una suspensión celular, por lo que se limita el estudio fenotípico de tejidos debido al tratamiento de disgregación celular que no hace fiable la información sobre la arquitectura de los tejidos celulares, así como la interacción entre estas y el medio que las rodea.<sup>1-3</sup>

En este artículo se muestran los principales aspectos metodológicos a tener en cuenta para realizar el análisis inmunofenotípico por CMF; así como la aplicación de esta tecnología para el diagnóstico y la clasificación de las leucemias agudas (LA).

---

Para realizar un mejor análisis inmunofenotípico por CMF, se deben tener en cuenta los siguientes aspectos metodológicos: tipo, cantidad, conservación y transportación de la muestra, uso de anticoagulantes, empleo de AcMo y fluorocromos, lisado de hematíes, fijación celular, así como la calibración y compensación de la autofluorescencia, previo a la interpretación de los datos.

## TIPO Y CANTIDAD DE MUESTRA

Los especímenes más utilizados en hematología, inmunología y hemoterapia para su inmunofenotipaje son variados y habitualmente incluyen: aspirados de médula ósea (MO), sangre periférica (SP) y sangre de cordón umbilical.<sup>4</sup> Pueden emplearse también los productos de leucoféresis y transfusión como los concentrados de hematíes, de plaquetas y el plasma. Se estudian, además, especímenes procedentes de tejidos linfoides como ganglio linfático, bazo y timo; y de tejidos no linfoides, como por ejemplo: piel, hígado, mucosa gástrica e intestino. En este caso, pueden haberse obtenido por procedimientos quirúrgicos, biopsia o punción-aspiración con aguja fina (PAAF).<sup>5</sup>

De igual forma, el inmunofenotipaje se aplica para el estudio de distintos fluidos corporales, entre ellos, líquidos: cefalorraquídeo (LCR), pleural y ascítico.<sup>5</sup>

Para el estudio de las LA, preferentemente se usa el aspirado de la MO por punción de la cresta ilíaca o el esternón, de modo firme y rápido, con el empleo de agujas de biopsia de 14 a 8 G, que permitan obtener un número suficiente de partículas de la MO en suspensión. Puede utilizarse también la SP cuando la cantidad de blastos exceda el 50 %.<sup>4</sup>

La cantidad de muestra necesaria dependerá del número de marcadores antigénicos a analizar, 1 mL de sangre total es suficiente para determinar hasta diez antígenos. Se recomienda realizar el conteo total de leucocitos contenidos en la muestra a estudiar, para determinar la cantidad de  $\mu\text{L}$  necesarios para cada determinación, a través de la siguiente fórmula:

$$\text{Cantidad en } \mu\text{L} = \frac{500\,000 \text{ células}}{\text{número total de leucocitos en la muestra}}$$

## USO DE ANTICOAGULANTE

Para el análisis del inmunofenotipo de las LA por CMF se recomienda usar EDTA en vez de heparina sódica, debido al uso previo del contador hematológico y para no alterar la conformación de los antígenos a estudiar. Para la determinación de antígenos de activación plaquetaria y de los productos de leucoféresis, se recomienda usar ácido citrato dextrosa (ACD) y fosfato citrato dextrosa (CPD), respectivamente.<sup>1</sup>

En aquellas muestras constituidas por dispersados unicelulares de tejidos sólidos; por ejemplo, de BAAF de ganglio, es conveniente que el anticoagulante esté diluido en un volumen de hasta 1 mL de un líquido isotónico estéril (suero salino fisiológico o tampón fosfato con pH 7,4) filtrado por filtros con poro  $< 0,40 \mu\text{m}$ . En el caso de los aspirados de la MO en los que se obtengan volúmenes inferiores a 1 mL, el volumen del líquido isotónico en el que se diluye el espécimen no debe superar el

volumen de la muestra obtenida para evitar una dilución excesiva. Una vez diluido, el aspirado debe hacerse pasar repetidamente (2 o 3 veces) por una aguja de 25 G para deshacer los copos medulares. Para el estudio de la activación de plaquetas debe diluirse la muestra volumen a volumen en tampón Hepes, pH 7,4.

En todos los casos anteriores no se recomienda el empleo de medios de cultivo. Los especímenes obtenidos mediante biopsia o procedimientos quirúrgicos, no deben ser sometidos a procesos de fijación o congelación. Si la pieza quirúrgica es considerable (> 1 cm), es aconsejable trocearla con bisturí en piezas más pequeñas de unos pocos mm<sup>3</sup>.<sup>1-4</sup>

## CONSERVACIÓN Y TRASPORTACIÓN DE LA MUESTRA

Los métodos y períodos de conservación de las muestras obtenidas para el inmunofenotipaje pueden variar de acuerdo con el tipo de especímenes u otros productos contenidos, tipo y número de células y el estado del paciente en el momento en el que se obtuvo.<sup>1-3</sup>

En general, la calidad de los resultados es inversamente proporcional al tiempo transcurrido y al grado de manipulación de la muestra desde su obtención, por lo que se recomienda el empleo de especímenes frescos, recién obtenidos. Así, las muestras deben procesarse, fundamentalmente, en las primeras 24 h posteriores a su extracción. Para el estudio del LCR y de las plaquetas, el tiempo de conservación es aún menor, 4 h desde su obtención, ya que sus células son más susceptibles de entrar en apoptosis.<sup>1-6</sup>

En todos los casos, la muestra debe conservarse a temperatura ambiente (22-25 °C). Solo en aquellas situaciones en que la muestra no pueda procesarse en el tiempo adecuado y se requiera de tiempos de almacenamiento o transportación más prolongados, sería recomendable su conservación a temperaturas entre 4 a 6 °C y añadir reactivo estabilizador, con el objetivo de obtener resultados aceptables hasta 5 días después de su obtención, en una proporción 1/10. De esta forma, las células conservan la viabilidad requerida (> 90 %). En caso de hemólisis, grumos, microcoágulos, congelamiento visible, incorrecto llenado del tubo y mal rotulado, la muestra debe rechazarse.<sup>5</sup>

## PANEL DE AcMo Y FLUOROCROMOS

El panel de AcMo a utilizar para el estudio de las LA debe incluir anticuerpos dirigidos contra los principales antígenos de diferenciación celular, expresados en la membrana, el citoplasma y el núcleo de los precursores hematopoyéticos, previamente titulados. Se utilizará la dilución óptima de fluorescencia del reconocimiento de la reacción antígeno-anticuerpo, no solo con fines económicos sino también para evitar la sobresaturación del antígeno.<sup>6</sup>

Se emplearán además, fluorocromos directa o indirectamente conjugados a los AcMo. Entre los principales fluorocromos se encuentran: FITC, RPE, ECD, PC5, PC5.5, PerCP, APC y AP7. Las muestras se incubarán durante 20 a 30 min a temperatura ambiente.<sup>2,6</sup>

La detección de antígenos intracitoplasmáticos e intranucleares requiere de una previa permeabilización de la membrana celular, a través de reactivos como: BD Cytotfix/ Cytoperm™ y Leucoperm™, respectivamente.<sup>4</sup>

## LISADO DE HEMATÍES Y FIJACIÓN DE LAS MUESTRAS

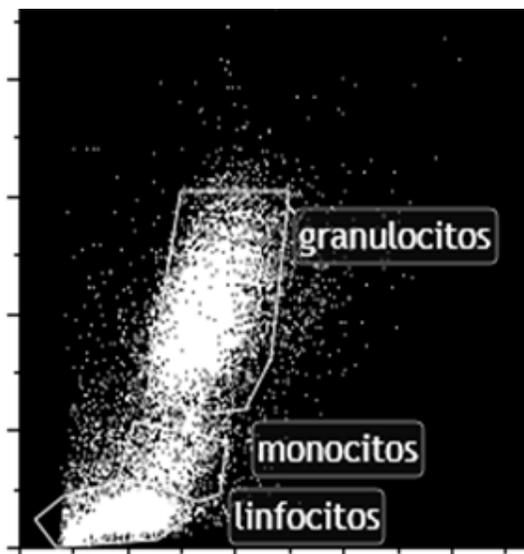
En el lisado de los hematíes se puede realizar con solución lisante o cloruro de amonio, durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las células deben ser lavadas en dos ocasiones con suero fisiológico y centrifugadas a 4 °C durante 10 min a 1500 rpm. Si la lectura en el citómetro se va a realizar dos o más horas después de haber culminado el procedimiento, las células deben ser fijadas para conservar su viabilidad con una solución fijadora (formaldehído al 1 %) y guardadas a 4 °C hasta el momento de la adquisición.<sup>2</sup>

## CALIBRACIÓN Y COMPENSACIÓN

La calibración se realiza para obtener una adecuada distribución de las células según su tamaño y complejidad interna. Estas características dependen del grado y de la magnitud de la dispersión de la luz del láser al interactuar con los componentes celulares, que se obtiene a través del análisis de la muestra que contiene solamente sangre total, la cual funciona como un control negativo.<sup>6</sup>

Cuando la luz difractada incide en el mismo eje de la luz incidente, se evalúa el tamaño celular a través del *forward scatter* (FSC). Por otro lado, cuando la luz difractada y reflejada es detectada a 90° de la dirección del láser, se evalúa la complejidad interna celular a través del *side scatter* (SC).<sup>6,7</sup>

En la [figura 1](#) se muestra un diagrama de puntos (*dot plot*) donde se ubican los linfocitos, monocitos y granulocitos, según su tamaño y granularidad.



**Fig. 1.** Disposición de linfocitos, monocitos y granulocitos, según tamaño y complejidad interna

Para obtener resultados óptimos en el citómetro de flujo se deben realizar las actividades de control recomendadas por el fabricante del instrumento, tales como: verificar la alineación óptica diaria, la estandarización y la compensación de la superposición espectral. Estos controles corrigen la superposición espectral de un fluorocromo en el espectro de fluorescencia de otro fluorocromo.<sup>6,7</sup>

La compensación de la fluorescencia debe realizarse con el marcaje pertinente, sobre las subpoblaciones linfocitarias de SP procedentes de individuos clínicamente normales, utilizando AcMo conjugados a diferentes fluorocromos de manera independiente y la inclusión de un tubo extra sin marcaje, que constituirá el control negativo. Se aconseja emplear los AcMo dirigidos contra los antígenos expresados en la mayoría de los linfocitos T y B como son anti-CD3 y anti-CD19, respectivamente.<sup>7</sup>

Las compensaciones se colocan en el valor cero, después se crean los histogramas para los FL1-FL4 y luego, se construyen los diagramas de punto, de acuerdo con las diferentes posibilidades de compensación. Inicialmente, debe adquirirse el tubo que contiene la muestra biológica sin AcMo conjugado, se ajustan los FSC y SSC en los valores lineales del *gate* óptimo, se excluye el *debris* y posteriormente, se ajustan los FSC y SC a los valores logarítmicos.<sup>6,7</sup>

A continuación, se van adquiriendo los tubos que contienen los AcMo conjugados de manera independiente y de esta forma, se van realizando las diferentes compensaciones de fluorescencia. Por ejemplo, al adquirir el tubo con AcMo+FITC se compensa FL2-FL1, al adquirir el tubo con AcMo+PE se ajustan FL1-FL2 y FL3-FL2, al adquirir el tubo con AcMo+APC se ajusta FL3-FL4 y así sucesivamente.<sup>2,6</sup>

## LA CMF EN EL DIAGNÓSTICO DE LAS LA

La CMF permite discriminar entre las células blásticas y el componente celular normal presentes de manera concomitante en la muestra y excluir este último del análisis fenotípico. De esta forma, se erradican los fenómenos de contaminación y clasificación celular errónea.<sup>6-9</sup>

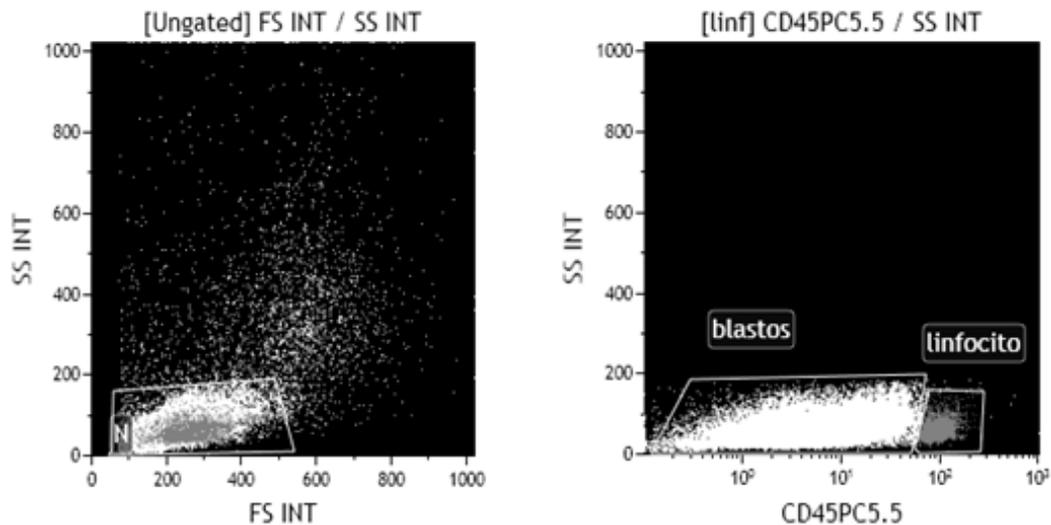
A través de CD45 marcado/SC se puede evidenciar una expresión heterogénea de este antígeno sobre las diferentes poblaciones celulares y diferenciar de manera eficiente a los diferentes linajes celulares existentes en una matriz compleja, como lo es la MO.<sup>10</sup>

El antígeno pan leucocitario CD45 es una proteína expresada de manera constitutiva en todas las células hematopoyéticas, que incrementa su densidad de expresión en los estadios finales de la hematopoyesis, en los diferentes linajes celulares leucocitarios y permanece de manera estable en las células maduras. Sin embargo, las células eritroides y las plaquetas pierden la expresión de esta proteína a lo largo de su diferenciación. El CD45 pertenece a una familia compleja de glicoproteínas de alto peso molecular, está compuesto por cinco isoformas, posee actividad tirosin fosfatasa y realiza una función importante en la regulación de la diferenciación celular.<sup>10,11</sup>

La determinación del grado de expresión del antígeno CD45 es de particular importancia, ya que permite:

1. Discriminar entre las células blásticas inmaduras normales y maduras.
2. Definir el linaje celular.
3. Inferir el estadio de maduración.

En la [figura 2](#) se muestra cómo con el uso de CD45 marcado/SC se disponen de manera diferente las distintas poblaciones celulares: blastos y linfocitos maduros reactivos en la MO.



**Fig. 2.** Distribución de los blastos y linfocitos maduros con el uso de CD45/Side Scatter

## CLASIFICACIÓN INMUNOLÓGICA POR CMF DE LAS LA

Para el diagnóstico inmunológico de las LA por CMF, se deben emplear diferentes paneles de AcMo: obligatorios, recomendados y opcionales.<sup>11-13</sup>

Los paneles *obligatorios* contienen aquellos AcMo que permiten determinar los criterios para la identificación, cuantificación y clasificación de la enfermedad; los *recomendados* incluyen los marcadores que no son esenciales para el diagnóstico, pero que son importantes para la sub clasificación de las LA; y los *opcionales* contienen los anticuerpos utilizados para el diagnóstico de la enfermedad mínima residual (EMR), la detección de subtipos raros de leucemias y determinados marcadores antigénicos que puedan sugerir anomalías citogenéticas y moleculares, implicados en el pronóstico de la enfermedad.<sup>11</sup>

Para la caracterización inmunofenotípica de las LA, los grupos de expertos en CMF para el diagnóstico de enfermedades hematológicas sugieren el empleo de un panel de AcMo dirigidos contra los antígenos intracitoplasmáticos: mieloperoxidasa (MPO), CD3 y CD79a, el cual permitirá determinar el linaje celular leucémico: mielóide, T y B, respectivamente. Basados en la información que se obtenga a partir de este panel, se le adicionará el resto de los marcadores específicos de linaje y los relacionados con el estadio de maduración celular (CD34, CD45, CD117).<sup>10,14</sup>

Las LA se clasifican inmunofenotípicamente en:

1. Leucemias linfoides agudas (LLA)
2. Leucemias mieloides agudas (LMA)
3. Leucemias agudas de linaje ambiguo (LALA)

Las LALA incluyen a las LLA con expresión aberrante de antígenos mieloides (LLA-Mi+), las LMA asociadas a marcadores linfoides (LMA-Li+), las LA indiferenciadas (LAI) y aquellas de linaje mixto o híbridas (LAH).

En la [tabla](#) se muestra la clasificación de las LLA, según el Grupo Europeo, para la caracterización de las leucemias agudas (EGIL).<sup>15</sup>

**Tabla.** Clasificación inmunológica de las leucemias linfoides agudas (LLA), según el Grupo Europeo para la caracterización de las leucemias agudas

LLA de fenotipo B	CD19+ y/o CD79a+ y/o CD22+
pro-B (B-I)	no expresión de otro antígeno linfóide B
común (B-II)	CD10+
pre-B (B-III)	IgM+ citoplasma
B madura (B-IV)	$\kappa$ ó $\lambda$ + citoplasma o superficie
LLA de fenotipo T	CD3+ citoplasma o superficie
pro-T (T-I)	CD7+
pre-T (T-II)	CD2+ y/o CD5+
cortical (T-III)	CD1a+ y/o CD4/CD8+
T madura (T-IV)	Receptor de célula T+

Para definir el linaje B, los blastos deben expresar fuertemente el antígeno CD19, el cual tiene que estar asociado con al menos uno de los siguientes antígenos: CD79a citoplasmático, CD22 citoplasmático o de membrana y el CD10. Por lo tanto, la expresión solo del CD19 no es suficiente para confirmar el fenotipo B. Los antígenos CD19 y CD22 son sensibles y específicos de la línea linfóide B. Sin embargo, el CD79a, a pesar de tener una alta sensibilidad, no es absolutamente específico de este linaje, ya que puede estar expresado en células mieloides y sobre los linfocitos T, al igual que en blastos de pacientes con LLA-T y LMA, respectivamente.<sup>16-19</sup>

Para definir el linaje T, los blastos leucémicos deben expresar fuertemente el antígeno CD3 citoplasmático o en la membrana celular, el cual debe estar asociado con al menos uno de los siguientes marcadores: CD2, CD7 y CD5. Estos tres antígenos, si bien son sensibles, no son específicos de linaje T; así CD2 y CD7 pueden estar expresados también sobre precursores mieloides, al igual que en blastos de pacientes con LMA y el CD5 se expresa en la ontogenia T y sobre una sub población de células B maduras.<sup>19-21</sup>

Las LMA constituyen un grupo de neoplasias hematológicas morfológicamente muy heterogéneas, donde pueden estar afectadas múltiples líneas celulares. Esta heterogeneidad morfológica también se observa en la obtención de diferentes patrones inmunofenotípicos.<sup>22,23</sup>

Se considera a la MPO el marcador específico de linaje mielóide, excepto para las variedades M0 (pobremente diferenciada), M6 (eritroleucemia) y M7 (megacariocítica), donde es negativa. Los antígenos CD11c, CD64, CD13, CD33 y lisozima son expresados en la mayoría de los precursores mieloides; CD14 identifica a la línea monocítica; CD15 a la granulocitaria; CD71, glicoforina A y CD36 a la eritroide; y los antígenos CD41 y CD42 a la plaquetaria. En la variedad M3 de la LMA los

blastos generalmente no expresan HLA-DR y son positivos para el antígeno CD15. Los promielocitos anormales pueden mostrar, igualmente, niveles elevados de CD13 y CD117, respectivamente.<sup>22,23</sup>

Los antígenos CD34, deoxinucleotidiltransferasa terminal (TdT) y CD117 (c-kit) no son específicos de linaje, pero sí de inmadurez celular; CD38 y HLA-DR pueden estar expresados sobre los precursores linfoides y mieloides pero también, en células maduras; y CD117 puede estar expresado, además, en células de origen no hematopoyético, como son los melanocitos. Este patrón antigénico de inmadurez celular se observa con frecuencia en las LAI.<sup>14</sup>

Las LAH expresan antígenos de más de un linaje celular. Se clasifican en T/mieloide, B/mieloide, B/T y trilineaje (B/T/mieloide).<sup>24-26</sup>

## IDENTIFICACIÓN POR CMF DE FENOTIPOS ABERRANTES

El análisis inmunofenotípico de las células leucémicas mediante la CMF multiparamétrica es una herramienta de gran utilidad para la identificación de los fenotipos aberrantes, con una gran implicación directa en el pronóstico, el tratamiento y seguimiento de la enfermedad.<sup>27</sup>

Los fenotipos aberrantes o "leucémicos" incluyen, fundamentalmente: la infidelidad o promiscuidad de linaje, la sobre e infra expresión antigénica, el asincronismo madurativo, así como la expresión ectópica de antígenos.<sup>23-26</sup>

Las variedades de LLA-Mi+, LMA-Li+ y LAH son prototipos de infidelidad de linaje. La alta expresión del antígeno CD33 asociado con la ausencia o débil expresión del CD15, sobre los promielocitos anormales en la M3, generalmente están asociados con la presencia de anomalías citogenéticas, como por ejemplo, la t (15;17).<sup>24</sup>

En algunas LMA de linaje monocítico se han reportado sobreexpresión e infra expresión de los antígenos CD13 y CD33, así como patrones anormales en la densidad e intensidad de expresión de CD11b, HLA-DR, CD14, CD64 y CD36. En la línea eritroide se han encontrado anomalías en la expresión de CD45, CD71, CD235a y CD117, respectivamente.<sup>14</sup>

La coexpresión del antígeno CD34 asociado con CD20 en la LLA-B, y con CD14 y CD15 en la LMA, indican asincronismo maduracional.<sup>14</sup> La identificación de blastos que expresan el fenotipo CD1/CD4/CD8, característico del timocito cortical, en la MO o SP y ambas, así como la detección de células TdT positivas en el LCR, son ejemplos representativos de antígenos ectópicos.<sup>27-29</sup> La identificación de estos fenotipos aberrantes en el momento del diagnóstico, constituye una herramienta de gran utilidad para el monitoreo postratamiento de EMR.<sup>30-32</sup>

El diagnóstico inmunológico por CMF de las LA, es primordial para confirmar el diagnóstico morfológico, definir el estado de maduración celular leucémico, clasificar a la enfermedad en distintos subtipos inmunológicos, identificar subgrupos de mal pronóstico, diagnosticar LA de linaje ambiguo y detectar fenotipos aberrantes útiles para el diagnóstico de la EMR, lo cual permite estratificar a los pacientes en diferentes grupos de riesgo y de esta forma, individualizar el tratamiento antileucémico.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hedley B, Keeney M. Technical issues: flow cytometry and rare event analysis. *Int J Lab Hem.* 2013;35:344-50.
2. Van Dongen JJ, Lhermitte L, Bottcher S, Ameida J, van der Velden VH, Flores-Montero J, et al. Euro Flow antibodies panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leucocytes. *Leukemia.* 2012;26:1908-75.
3. Donnenberg AD, Donnenberg VS. Rare event analysis in flow cytometry. *Clin Lab Med.* 2007;27:627-52.
4. Drenon B, Fardel O, Fauchet R, Amiot J. Flow cytometry: application for the diagnosis and the follow-up of hematological malignancies. *Ann Biol Clin.* 2002 Nov-Dec;60(6):663-72.
5. Yu G, Vergara N, Moore E, King R. Use of Flow Cytometry in the Diagnosis of Lymphoproliferative Disorders in Fluid Specimens. *Diagn Cytopathol.* 2014;42(8):664-70.
6. Vogt RF Jr, Whitfield WE, Henderson LO, Hannon WH. Fluorescence intensity calibration for immunophenotyping by flow cytometry. *Methods.* 2000 Jul;21(3):289-96.
7. Dongen JJ. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry B Clin Cytom.* 2004;60:1-13.
8. vanLochem EG, van dV V, Wind HK, Marvelde JG, Westerdaal NA, van Craigh FE. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood.* 2008;111:3941-67.
9. Orfao A, Ortuno F, De Santiago M, Lopez A, San Miguel J. Immunophenotyping of acute leukemias and myelodysplastic syndromes. *Cytometry.* 2004;58:62-71.
10. Gerardo CJ, Rodríguez C, Sastre D, Heller V, Fernández E. Utilización estratégica de CD45 en la identificación de células blásticas por citometría de flujo. *Acta Bioquím Clín Latinoam.* 2006;40(2):173-80.
11. Orfao A, Ramudo L, López A, Rivas R, González M, Flores J, et al. Inmunofenotipaje de hemopatías malignas: de la investigación básica a la práctica asistencial. *Haematologica.* 2008;93(Extra 1):79-93.
12. Marsán V, del Valle BB, Sánchez M, Macías C, Mazorra Z, Lam RM. Validación del ultramicrométodo inmunocitoquímico (UMICIQ) para el inmunofenotipaje de la leucemia linfocítica aguda pediátrica. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter.* 2012;28(3):282-8.
13. Ruiz-Arguelles A, Rivadeneyra-Espinoza L, Duque RE, Orfao A. Report on the second Latin American consensus conference for flow cytometric immunophenotyping of hematological malignancies. *Cytometry B Clin Cytom.* 2006;70:39-44.

14. Ahmadi A, Poorphatollad A, Aghaiipour M, Rezaei M, Nikoo-ghoftar M, Gharib A. Diagnostic value of CD117 in differential diagnosis of acute leukemia. *Tumor Biol.* 2014;35:6763-8.
15. Bene MC, Nebe T, Bettelheim P, Buldini B, Bumbea H, Kern W. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: A consensus proposal of the European Leukemia Net Work Package 10. *Leukemia.* 2011;25:567-74.
16. Carey JL, McCoy JP, Keren DF. *Flow cytometry in clinical diagnosis.* 4<sup>th</sup>ed. Chicago:ASCP Press; 2007.
17. Stetler-Stevenson M, Davis B, Wood B, Braylan R. 2006 Bethesda International Consensus Conference on Flow Cytometry Immunophenotyping of Hematolymphoid Neoplasia. *Cytometry B Clin Cytom.* 2007;72B:S3.
18. Nguyen D, Diamond LW, Braylan RC. *Flow cytometry in hematopathology: a visual approach to data analysis and interpretation.* 2<sup>nd</sup> ed. Totowa:Human Press; 2007.
19. Sedek L, Balsa A, Sonsola A, Twardoch M, Wiccorck M, Malinowska L. The immunophenotypes of blast cells in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: How different are they from their normal counterpart? *Cytometry.* 2014;868:329-39.
20. Craig F, Foon K. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood.* 2008;111(8):3941-67.
21. Finn W, Carter K, Raich R, StoolmanL, Hero A. Analysis of Clinical Flow Cytometric Immunophenotyping Data by Clustering on Statistical Manifolds: Treating Flow Cytometry Data as High-Dimensional Objects. *Cytometry.* 2009:1-7.
22. Dong HY, Kung J, Bhardwaj V, Mc Gilln J. Flow cytometry rapidly identifies all acute promyelocytic leukemias with high specificity independent of underlying cytogenetic abnormalities. *Am J Pathol.* 2011;13574-84.
23. Biomed A, Path Z, Comm S, Path S. Antigen expression pattern of acute promyelocytic leukaemia cases in Malasya. *Med J Malasya.* 2014;69(2):64-9.
24. Borowitz MJ. Mixed phenotype acute leukemia. *Cytometry B Clin Cytom.* 2014;86:152-3.
25. Gajendra S, Sachdev R, Dorwal P, Goel S, Jha B, Sahni T. Mixed-phenotypic acute leukemia: cytochemically myeloid and phenotypically early T-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood Res.* 2014 Sep;49(3):196-8. doi: 10.5045/br.2014.49.3.196.
26. Deffis M, Alvarado M, Ruiz G, Rosas A, Barrera G, Aguayo A. Diagnosing and treating mixed phenotype acute leukemia: a multicenter 10-year experience in Mexico. *Ann Hematol.* 2014;93:595-601.
27. Ahmadzadeh A, Saedi S, Jaseb K, Asnafi A, Alghasi A, Saki N. T-cell acute lymphoblastic leukemia with del (7) (q11.2q22) and aberrant expression of myeloid markers. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res.* 2013;7(4):40-4.

28. Gaipa G, Basso G, Alliprandi S, Migliacacca M, Vallinoto G, Maglia O, et al. Prednisone induces immunophenotypic modulation of CD10 and CD34 in nonapoptotic B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia cells. *Cytometry B Clin Cytom.* 2008;74:50-5.
29. Yu G, Vergara N, Moore E, King R. Use of flow cytometry in the diagnosis of lymphoproliferative disorders in fluid specimens. *Diagn Cytopathol.* 2014;42(8):664-70.
30. Schrappe M. Minimal residual disease: optical methods, timing, and clinical relevance for an individual patient. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2012;2012:137-42. doi: 10.1182/asheducation-2012.1.137.
31. Gaipa G, Basso G, Biondi A, Campana D. Detection of minimal residual disease in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cytometry.* 2013;84B:359-69.
32. Salari F, Shahjehani M, Shahrabi S, Saki N. Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia: optimal methods and clinical relevance, pitfalls and recent approaches. *Med Oncol.* 2014;31:2-9.

Recibido: 29 de diciembre de 2014.

Aceptado: 31 de marzo de 2015.

Dra. *Vianed Marsán Suárez*. Instituto de Hematología e Inmunología. Apartado 8070, La Habana, CP 10800, Cuba. Tel (537) 643 8695, 8268.  
Correo electrónico: [rhematologia@infomed.sld.cu](mailto:rhematologia@infomed.sld.cu)