

FORMULACIÓN DE INDICES CITOMÉTRICOS COMO HERRAMIENTA DIAGNÓSTICA EN MIELODISPLÁSIA Y SU CORRELACIÓN CON HALLAZGOS MORFOLÓGICOS Y CITOGENÉTICOS.

Tamayo H. Gabriel¹, Jaramillo A. Patricia², Rojas L. Mauricio³, Vargas Carlos⁴, Cardona Ricardo⁵

1. Centro especializado en patología oncohematológica, Synlab Colombia, grupo HEMO, Universidad de Antioquia.
2. Escuela de Microbiología, grupo HEMO, Universidad de Antioquia,
3. Grupo de Inmunología celular e Inmunogenética, Universidad de Antioquia
4. Escuela de microbiología, Grupo Microba, Universidad de Antioquia.
5. Hospital Pablo Tobón Uribe

RESUMEN

Introducción: Los síndromes mielodisplásicos (SMD) son una agrupación de enfermedades clonales adquiridas que afectan principalmente a la población adulta mayor y que tienen alto riesgo de evolucionar a leucemia aguda. El diagnóstico de esta entidad es difícil desde el punto de vista clínico y paraclínico, por esto es indispensable evaluar la utilidad de las técnicas diagnósticas presentes y estandarizar sus resultados para llegar a diagnósticos rápidos y precisos. La citometría de flujo ha sido reportada como una herramienta útil en la caracterización de SMD, sin embargo, hace falta la estandarización de la técnica y sus mecanismos de análisis para que sea más específica y menos subjetiva en la práctica clínica. Los índices citométricos han sido un acercamiento a este objetivo; allí se emplean fórmulas matemáticas simples que comparan la expresión de un marcador en una población problema con respecto a una población control. Estas medidas hacen de este resultado una medida objetiva, reproducible y no dependiente del observador.

Objetivo: formular índices citométricos como herramienta diagnóstica en mielodisplasia y correlacionar con hallazgos morfológicos y citogenéticos.

Materiales y métodos: Se realizó un estudio retrospectivo y exploratorio en donde se analizaron los datos de citometría de flujo de 59 pacientes y 10 controles y se evaluaron 67 índices citométricos, buscando diferencias entre los dos grupos evaluados.

Resultados y Discusión: Varios de los índices citométricos evaluados presentaron diferencias significativas entre los grupos de controles y pacientes haciendo de ellos potenciales candidatos para la aplicación en el análisis de rutina por citometría de flujo en el diagnóstico de SMD. Los índices citométricos más representativos son aquellos que involucran la medición de complejidad interna de neutrófilos, la cantidad de monocitos no clásicos, el coeficiente de variación (CV) del CD71, el CD36, el CD11b y de antígenos de precursores CD34+, el producto de la división entre la suma de neutrófilos en estadio temprano sobre las formas más maduras. Algunos de estos hallazgos ya han sido utilizados de rutina por otros autores y se han aplicado a la estrategia de análisis con resultados clínicamente significativos.

Conclusiones: El uso de índices citométricos es una forma de hacer numérica los análisis visuales propias de la citometría de flujo, de modo tal que sean más fáciles de

interpretar y que mitiguen la subjetividad propia de la interpretación de patrones visuales haciendo más rápido y preciso el análisis. El uso de esta herramienta es un acercamiento a la estandarización en el diagnóstico de SMD por citometría de flujo.

Palabras claves: Síndrome mielodisplásico, mielograma, histología, citogenética, citometría de flujo, mielodisplasia, índices citométricos

Key words: Myelodysplastic syndrome, bone marrow aspirate, histology, cytogenetics, flow cytometry, myelodysplasia, cytometry index.

INTRODUCCIÓN

Los Síndromes Mielodisplásicos (SMD) son un grupo heterogéneo de enfermedades clonales de las células progenitoras hematopoyéticas de compromiso mieloide que se manifiestan con alteraciones morfológicas, inmunofenotípicas, funcionales y genómicas en medula ósea. El resultado de dichas alteraciones es la hematopoyesis ineficaz, elevada expresión de apoptosis intramedular que se reflejan con citopenias periféricas, displasia morfológica y alto riesgo de evolucionar a leucemia mieloide aguda (LMA)².

Los SMD están estrechamente ligados a la edad de los pacientes con una edad promedio de 70 años. Esta entidad tiene una incidencia de 3-5 casos por cada 100.000 habitantes/año y 20 casos por cada 100.000/año en adultos mayores de 70 años. La aparición en la edad pediátrica y en el adulto joven es rara, <10% de los pacientes son menores de 50 años, el 80% de los casos son mayores de 60 años y menos del 5% representan edades pediátricas³. Este trastorno tiene un predominio en los hombres, excepto en la delección aislada de 5q que predomina en mujeres⁴. En América Latina se está presentando una transición demográfica, en donde la población infantil es proporcionalmente inferior en comparación a la población mayor y en donde es evidente el incremento de la esperanza de vida⁵, y por lo tanto, el aumento en la prevalencia de dicha entidad. A pesar de esto, en Colombia no se cuenta con datos publicados de incidencia ni prevalencia y tampoco se conocen las particularidades de los pacientes que permitan tener datos propios⁶.

El diagnóstico de mielodisplasia en el contexto de una situación clínica no definida es sumamente delicado y ha sido descrito como difícil ya que depende de una integración de muchos aspectos como antecedentes, clínica del paciente, morfología sanguínea, valores de hemograma, bioquímica general, bacteriología, virología, datos de la médula ósea, tanto morfológicos como estructurales, características fenotípicas, estudios citogenéticos y moleculares, todo esto con finalidad de descartar diagnósticos diferenciales y llegar a la patología buscada que en muchos casos es de descarte⁷.

Con estos datos, actualmente se clasifica esta entidad en varios subtipos diagnósticos según la organización mundial de la salud (OMS) en su versión revisada de 2016 y publicada en 2017²:

- SMD con displasia multilínea (MDS-MLD)

- SMD con displasia unilínea (MDS-SLD)
- SMD con sideroblastos en anillo (MDS-RS), con displasia multilínea (MLD) o unilínea (SLD)
- SMD con exceso de blastos (MDS-EB), de tipo 1 y 2 según la cantidad de blastos.
- SMD con del(5q) aislada
- SMD no clasificable entre los cuales se encuentra SMD con 1% de blastos en sangre, la citopenia refractaria de la infancia, la displasia unilínea con pancitopenia (MDS-U) y asociada con otras alteraciones citogenéticas recurrentes.

Para llevar a cabo el diagnóstico, la OMS y algunos grupos de diagnóstico en SMD han propuesto unos criterios (mayores y co-criterios) para el diagnóstico de esta entidad siempre y cuando se cumpla el prerrequisito de presentar alguna citopenia sostenida por más de 4 meses en eritrocitos, neutrófilos o plaquetas (a menos que haya presencia de alguna alteración citogenética recurrente en SMD en donde solo se necesitan dos meses); y de descartar una causa no hematológica como explicación a la citopenia ^{8,9}.

Los criterios mayores mencionados son:

- displasia de al menos el 10% de las células en uno o más linajes principales de médula ósea (en línea eritroide, de neutrófilo y megacariocítica)
- un aumento en los sideroblastos en anillo $\geq 15\%$ (o $\geq 5\%$ en presencia de la mutación SF3B1),
- un aumento en mieloblastos de 5-19% en aspirados medulares (pero en ausencia de reordenamientos de genes específicos de LMA) o mieloblastos de 2 a 19% en frotis de sangre periférica
- un cariotipo relacionado con SMD (5q-, -7, complejo, etc.)

Se debe cumplir al menos uno de estos criterios junto con los prerrequisitos anotados para llegar al diagnóstico de SMD. Cuando no se cumplen los criterios mayores pero el paciente presenta características clínicas típicas y no se puede detectar ninguna otra enfermedad subyacente, aún se puede considerar el diagnóstico de SMD cuando se cumplen los siguientes co-criterios (se deben cumplir dos como mínimo)⁸:

- Hallazgos histológicos e inmunohistoquímicos anormales y altamente sugestivos de SMD
- Múltiples patrones aberrantes en células mieloides y eritroides por medio de citometría de flujo multiparamétrica (CF)
- Evidencia de población clonal de células mieloides determinada a través de estudios moleculares (Secuenciación de próxima generación, NGS por sus siglas en inglés) en donde se detecten mutaciones somáticas típicas de SMD.

Si bien se documenta el análisis inmunofenotípico como una herramienta útil y es utilizado como co-criterio, durante largo tiempo se consideró que la caracterización inmunológica por CF no desempeñó un rol significativo en la práctica clínica para el diagnóstico de SMD. Sin embargo, avances recientes en este campo de investigación han estado en función de cambiar este concepto y han logrado que esta herramienta se incluya en los esquemas actuales como se anotó previamente. Estos estudios sugieren que la citometría de flujo puede asistir como método diagnóstico y pronóstico en SMD,

especialmente cuando las pruebas diagnósticas estándar como la citomorfología y el cariotipo presentan inconvenientes o son normales, suceso que puede pasar hasta en el 50% de los casos^{10,11}. Se ha reportado que algunos pacientes con SMD de riesgo bajo (sin requerimiento transfusional y cariotipo normal), se pueden distinguir de los pacientes con citopenia idiopática de significado incierto (ICUS por sus siglas en inglés, Idiopathic cytopenia of undetermined significance), basándose en anomalías fenotípicas detectadas por CF como la posibilidad de enumerar aberraciones fenotípicas en las células mieloides y población blástica (incluso cuando los blastos son menores al 5% en médula ósea (MO))¹²⁻¹⁵. Incluso Della Porta ha descrito en su revisión que la CF es más sensible en detectar displasia mieloides que la morfología¹⁶.

A pesar de las ventajas citadas, la CF tiene un inconveniente importante y ha sido la falta de estandarización tanto técnica como analítica en el diagnóstico de SMD¹⁷. El enfoque más utilizado para evaluar la displasia mieloides mediante CF es el análisis de reconocimiento de patrones en las gráficas citométricas, el cual se basa en una evaluación cualitativa de la desviación del patrón de expresión de antígenos en SMD con respecto a pacientes control. Aunque este enfoque es una buena herramienta para operadores expertos, existen varios puntos débiles en su análisis al ser dependientes de la observación subjetiva de cada operador y no hay datos de reproducibilidad robustos¹⁷⁻¹⁹. Otro punto para tener en cuenta es que algunos casos de SMD se presentan con anomalías en CF que no son específicas debido a que algunas alteraciones se han visto en citopenias no clonales limitando su especificidad y por lo tanto el diagnóstico²⁰.

Para resolver esto, diversos grupos han estudiado el uso de puntajes citométricos como herramienta diagnóstica^{17,18}. En estos sistemas de puntaje se ordena el análisis de aberraciones citométricas según su importancia y a las cuales se le asigna una puntuación, la suma de ellas puede discriminar SMD de citopenias no clonales con sensibilidades que van desde el 72 hasta el 86% y especificidades que van desde el 89% al 100%^{11,17}. Este tipo de puntuaciones pueden ser bastante útiles cuando los SMD son de bajo grado y no presentan alteraciones típicas como incremento de blastos, sideroblastos en anillo o alteraciones citogenéticas aberrantes y propias de SMD¹⁹.

El puntaje más mencionado y que incluso es recomendado por la OMS en su clasificación de 2017 y por el IMDSflow en su consenso de 2014 es el puntaje de Ogata^{2,18}. Este puntaje es una puntuación de 4 parámetros que consiste en:

- la medida de la dispersión de luz lateral (SSC de side scatter por sus siglas en inglés) en neutrófilos sobre la medida de SSC de los linfocitos. Si este cociente es inferior a 6 se le asigna un puntaje de 1.
- el porcentaje de células B progenitoras en el compartimento CD34+. Si este valor es igual o inferior a 5% se le asigna un puntaje de 1.
- el porcentaje de progenitores mieloides CD34+ con respecto al total de células nucleadas. Si este porcentaje es mayor a 2% se le asigna un puntaje de 1.
- la relación entre la intensidad media de fluorescencia (IMF) de CD45 en linfocitos sobre la IMF de CD45 en progenitores mieloides CD34+. Si este índice es superior a 7.5 o menor o igual a 4 se le asigna un puntaje de 1

Esta puntuación si es igual o superior a 2 presenta una sensibilidad del 70% y una especificidad del 93% en pacientes con SMD de bajo riesgo con respecto a controles citopénicos¹⁹.

A pesar de este acercamiento a la objetividad, estos puntajes siguen dependientes del análisis cualitativo de patrones antigénicos anormales, lo que es difícil de traducir a valores numéricos que permitan tener valores de referencia, es altamente subjetivo, es dependiente de personal experto y los análisis no son fáciles de interpretar por los clínicos al no tener valores numéricos^{21,22}. Son pocos los estudios que han intentado introducir evaluaciones cuantitativas de parámetros inmunofenotípicos y así hacer de esta evaluación objetiva. Los índices descritos en el puntaje de Ogata han sido un acercamiento a este objetivo; allí se emplean fórmulas matemáticas simples que comparan la expresión de un marcador en una población problema con respecto a una población control, un ejemplo es la mediana de SSC en neutrófilos con respecto a linfocitos, que si es menor a 6 se considera alterado. Estas medidas hacen de este resultado una medida objetiva, reproducible y no dependiente del observador¹.

Evgenia y Col. reportaron un índice matemático entre la expresión de diversos antígenos comúnmente alterados en línea mieloide de SMD, concluyendo que el valor matemático reportado puede tener buena sensibilidad en discriminar pacientes con SMD de pacientes sin alteración clonal²³. En este estudio se desarrolló una fórmula matemática que combina la expresión antigénica de marcadores seleccionados del compartimiento granulocítico de la médula ósea con el cociente de la población madura sobre la inmadura de los neutrófilos, esto da como resultado el índice de dismielopoyesis (DMI).

Esta fórmula se basa en la medición de la intensidad de expresión de antígenos como el CD16, CD11b en los granulocitos maduros y su porcentaje debido a la hipótesis de que los perfiles fenotípicos anormales en esta población son un fuerte indicador de displasia. Por otro lado, se mide la intensidad media de fluorescencia (IMF) de CD45 de la población mieloide con respecto a la IMF de CD45 de la población linfoide, y la IMF de CD45 en los progenitores mieloides, hallazgos descritos por Ogata como anormales¹. Por último, se incluye la relación entre el porcentaje de granulocitos terminales CD16+ y el porcentaje de progenitores mieloides como una cuantificación aproximada de la desviación a la izquierda descrita en los neutrófilos de SMD. A este resultado se le aplica transformación logarítmica para armonizar los resultados^{23,24}. El resultado de esta fórmula es el DMI expuesto anteriormente.

Valores de DMI superiores a 4.521 fueron considerados normales, y valores inferiores fueron asociados a SMD con sensibilidad de 84.5% y especificidad de 93.6% identificando SMD en 77.2% de los pacientes de bajo grado; además reveló displasia multilínea para varios casos que habían sido clasificados como anemia refractaria y anemia refractaria con sideroblastos en anillo. En conclusión, el autor expreso que el DMI es un indicador sensible de dismielopoyesis que vuelve objetiva la interpretación de los resultados y es más rentable en tiempo y costo que los enfoques actuales si la formula se introduce de forma automática en software de análisis citométrico, haciendo de los índices citométricos una herramienta valiosa para el diagnóstico de SMD²⁴.

El propósito de este estudio es explorar la posibilidad de establecer nuevos parámetros inmunofenotípicos útiles en el diagnóstico por CF en SMD a modo de índices citométricos, que dependerían menos de la experiencia del operador y sería más efectiva en cuanto a costos calidad y tiempo que los enfoques actuales. Para ello se emplearán fórmulas matemáticas simples a modo de índices que combinen la expresión antigénica de marcadores seleccionados del compartimiento granulocítico, monocítico y eritroide de la médula ósea, contra la proporción de poblaciones celulares maduras linfoides a modo de referencia y que den como resultados índices citométricos que representen la dismielopoiesis.

OBJETIVOS:

General:

- Formular índices citométricos mieloides como herramienta diagnóstica en pacientes con síndrome mielodisplásico y correlacionar con hallazgos morfológicos y citogenéticos.

Específicos

- Describir las características clínico-epidemiológicas de la población de estudio
- Identificar las alteraciones citométricas, citogenética y morfológicas de la población en estudio
- Construir índices citométricos mieloides en poblaciones patológicas y control
- Calcular la significancia estadística de los índices citométricos entre las poblaciones evaluadas
- Calcular la correlación entre índices citométricos con significancia estadística con los hallazgos patológicos paraclínicos, morfológicos y citogenéticos.

Hipótesis

- El uso de índices citométricos permite detectar de forma numérica alteraciones fenotípicas en pacientes con síndrome mielodisplásico.

MATERIALES Y METODOS

Tipo de estudio

Estudio de tipo exploratorio, transversal y retrospectivo

Pacientes

Se analizaron los ficheros para citometría de flujo a modo de fuente de información primaria y los reportes de pruebas e historias clínicas de los pacientes estudiados en el

laboratorio Synlab en 2018 de Medellín que ingresaron por citopenia en estudio como fuente secundaria. Como criterio de inclusión se incluyeron aquellos pacientes que cumpliera el criterio de citopenia el cual se definió según la revisión de 2016 de la clasificación de la OMS de las neoplasias mieloides y la LMA las cuales son: anemia (Hb <10g/dL), neutropenia ($<1.8 \times 10^3/\mu\text{L}$) o trombocitopenia ($<100 \times 10^3/\mu\text{L}$)²⁵. De estos pacientes se tomaron todos aquellos que se les hubiera realizado el paquete completo de pruebas de médula ósea (cariotipo, biopsia, mielograma y citometría con paneles diagnósticos sugeridos por Euroflow) y que fueran diagnosticados como síndrome mielodisplásico de Novo después de descartar causas secundarias de la citopenia a modo de criterio de exclusión (desordenes carenciales, inmunológicos, infecciosos) a excepción de 5 pacientes que se les diagnóstico LMA secundaria a SMD previamente diagnosticado. El total de pacientes que cumplieron estos requisitos fueron 59. Adicional a lo anterior se registraron datos de interés y relacionados al curso de la enfermedad como niveles de lactato deshidrogenasa (LDH) y volumen corpuscular medio (MCV).

El grupo de pacientes control para comparar los datos citométricos con respecto al grupo con SMD se compone de 10 pacientes que ingresaron para diagnóstico de citopenia secundaria a cáncer sólido (sospecha de mieloptisis) debido a la imposibilidad de conseguir donantes sanos de médula ósea por lo traumático de la toma de la muestra, que no estuvieran en tratamiento con esquemas citotóxicos, que tuvieran la totalidad de pruebas en médula ósea incluyendo CF con paneles diagnósticos sugeridos por Euroflow y que no se les diagnosticara SMD posterior al estudio medular o infiltración por el cáncer en estudio. No se encontraron publicaciones que relacionen la presencia de mieloptisis con el incremento en la probabilidad de presentar displasia citométrica, más aún en pacientes no infiltrados con el tumor no hematológico. La excepción a la premisa anterior la constituye los pacientes con el síndrome de Li-fraumeni en donde hay predisposición a presentar un alto margen de tumores, incluyendo hematológicos. Sin embargo, en este estudio no se incluyeron pacientes con esta entidad con alta prevalencia en niños.

Consideraciones éticas

La Investigación está clasificada sin riesgo según la norma 8430 de 1993 y cumple con las Pautas Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica en Seres Humanos. Igualmente se cumple con los principios de confidencialidad, beneficencia no directo al participante, pero se genera un nuevo conocimiento científico que redundará en el futuro a favor de los pacientes con SMD. Así mismo el principio de justicia con los criterios de inclusión y exclusión, toda la información será custodiada por el investigador principal como se indicó a la institución, que dio el aval para dicha investigación.

Evaluación morfológica

En cada evaluación citomorfológica de mielograma se evaluó 500 células con recuento diferencial y caracterización cualitativa siguiendo los criterios sugeridos por la International Council for standardization in Hematology para evaluación de médula ósea²⁶. La displasia

se definió si se presentaban 10% o más de células displásicas en una o más líneas mieloides como:

- Granulocitos: Neutrófilos hipo o agranulares, hipolobulación de tipo Pelger-Hüet, promielocitos: con cambios en la maduración núcleo/citoplasma, hipogranulares o con granulaciones anormales.
- Megacariocitos: Micromegacariocitos, formas hipolobuladas, bi o multinucleadas
- Serie eritroide: Núcleo asimétrico o múltiple, puentes internucleares, sideroblastos anillados, cambios megaloblásticos, cariorrexis
- Se hizo recuento de blastos en el total de células nucleadas para compararlas con el recuento realizado por CF.

La evaluación histomorfopatológica se hizo a través de coloración básica de hematoxilina y eosina y evaluando la histotopografía de cada muestra reportando hallazgos displásicos en cada una de las líneas mieloides si se presentaran.

La coloración de hierro medular en búsqueda de sideroblastos en anillo se realizó a través de coloración de Perls en extendidos medulares.

Citogenética

El análisis citogenético se realizó en el diagnóstico inicial y los casos fueron clasificados usando el Sistema Internacional de criterios de nomenclatura citogenética (ISCN 2016)²⁷.

Citometría de flujo

Procesamiento de muestras

Las muestras de médula ósea fueron colectadas en EDTA como anticoagulante y fueron procesadas y adquiridas en un periodo máximo de 24 horas desde su toma en un citómetro de flujo BD Facs Canto II de Becton Dickinson. Diariamente se hizo estandarización y control de instrumento con perlas comerciales para tal fin y adicionalmente se verificó compensación según protocolos publicados por este consorcio en 2012 para asegurar la estandarización del instrumento²⁸.

Para la tinción de muestras se utilizaron los anticuerpos y técnicas de marcación sugeridos por los consorcios IMDS-Flow y Euroflow para estudio de neoplasias mieloides. HLA-DR, CD34, CD117 y CD45 se utilizan como marcadores centrales en los paneles y se agrega CD11b, CD13, CD10 y CD16 para maduración de neutrófilos, mientras que la segunda combinación de anticuerpos CD14, CD64, CD300e y CD35 pueden aplicarse para el análisis de diferenciación monocítico. CD33 en la tercera combinación con CD36, CD71 y CD105 como método para diferenciar entre eritroblastos, monocitos y neutrófilos y evaluar las características en eritroblastos, según lo recomendado por el grupo de trabajo de flujo de IMDS^{29,30}. Estos anticuerpos se validaron para una cantidad de $500 \times 10^3 \text{ Cel/uL}$ con el objetivo de estandarizar la cantidad de antígeno- anticuerpo. En la siguiente tabla se relaciona los fluorocromos utilizados según cada línea celular

FLUOROCROMO	FITC	PE	PER CP Cy 5.5	PE Cy7	APC	APC H7	V450	V500
LÍNEA								
NEUTROFILO Clona	CD16 <i>CLB-Fc- gran/1</i>	CD13 <i>L138</i>	CD34 <i>8G12</i>	CD117 <i>104D2D1</i>	CD11b <i>D12</i>	CD10 <i>HI10A</i>	HLADR <i>L243</i>	CD45 <i>2D1</i>
MONOCITICA Clona	CD36 <i>CLB-IVC7</i>	CD56 <i>My31</i>	CD34 <i>8G12</i>	CD117 <i>104D2D1</i>	IREM2 <i>UP-H2</i>	CD14 <i>MφP9</i>	HLADR <i>L243</i>	CD45 <i>2D1</i>
ERITROIDE Clona	CD35 <i>E11</i>	CD105 <i>266</i>	CD34 <i>8G12</i>	CD117 <i>104D2D1</i>	CD33 <i>P67.6</i>	CD71 <i>M-A712</i>	HLADR <i>L243</i>	CD45 <i>2D1</i>

Para controlar los sesgos propios de la técnica citométrica se verifica que los protocolos fueron procesados bajo las directrices de calidad relacionadas a compensación y configuración dadas por Euroflow³¹, esto asegura que los niveles de fluorescencia serán reproducibles con el tiempo y controlados con perlas de calibración conocidas y estandarizadas que se evalúan constantemente asegurando que los valores de fluorescencia para cada fluorocromo no son superiores o inferiores al 15%. El Consorcio EuroFlow desarrolló y optimizó un procedimiento operativo estándar paso a paso para configurar el citómetro de flujo BD FACSCanto II de 8 colores el cual fue el instrumento utilizado. La configuración estandarizada del instrumento desarrollada por EuroFlow permite la estandarización multiplataforma entre laboratorios y dentro del laboratorio de mediciones de citometría de flujo.

Si bien un factor de sesgo puede ser la variación lote a lote de los fluorocromos utilizados en los paneles de diagnóstico, un estudio publicado por Lecrevisse en 2017 en un periodo de 7 años demostró que la variación en estas moléculas no era significativo en el 90% de las moléculas y definían un valor inferior al 20% de CV como estable³². El CV entre moléculas fue de FITC (2.1%), PE (3.5%), PECy7 (3.9%), PerCPCy5.5 (5.8%), APC (5.8%), APCH7 (7.4%), y APCC750 (14.5%). PB (1.4%), PO (2.4%), HV450 (0.7%) y HV500 (1.7%) BV421 (4.1%) y BV510 (16.2%). Estos datos llevan a concluir que no hay variación significativa entre los lotes de fluorocromos de los tubos evaluados y que las evaluaciones serían consistentes entre lotes.

Análisis de datos

El análisis citométrico fue realizado con el software Infinicyt versión 2.0 de la compañía Cytognos (Salamanca España). Para la identificación de poblaciones se utilizaron Los antígenos propuestos por el European Leukemia Net Working Group Guidelines (ELN)¹⁸. Así para seleccionar cada población mieloide de interés se utilizó una estrategia de selección múltiple con marcadores según línea así: para línea eritroide CD71 y CD36, para progenitores: CD45, CD34, CD117, HLA-DR, CD34; para neutrófilos: CD11b, CD13, CD16, CD10, CD64, CD35, CD33; para monocitos: HLA-DR, CD11b, CD13, CD16, CD33, CD14, CD300e, CD64. Los linfocitos fueron utilizados como control y se seleccionaron

según características de expresión de CD45 en conjunto con características de tamaño y complejidad (SSC, FSC) y expresión negativa de antígenos mieloides.

Creación de Índices citométricos

Con base en los criterios definidos por el ELN y revisión de literatura se crearon índices citométricos que involucraran la expresión de los antígenos mieloides contenidos en los paneles trabajados a partir de los tubos mieloides Euroflow dirigidos a neutrófilo, monocito y eritrocito. Estos índices citométricos fueron configuradas en el software de análisis y fueron calculados para cada análisis citométrico según panel correspondiente.

Con estos datos se realizó los análisis estadísticos con la finalidad de calcular diferencias e identificar expresión cuantitativa de antígenos con poder diagnóstico. Para esto se compararon los índices citométricos de cada uno de los grupos diagnósticos en SMD y los controles. Debido a que se tuvieron grupos con pocos datos y con el objetivo de incrementar su tamaño muestral se creó un grupo de comparación adicional sumando pacientes de grupos ya establecidos, teniendo en cuenta las características de su grupo diagnóstico y sus características en común. Así se tiene, grupo exceso de blastos que incluye EB1, EB2 y LMA, el grupo displásico que incluye displasia unilínea, multilínea y con sideroblastos en anillo y el grupo citogenético que incluye anomalías en 5q e inclasificables diagnosticados a partir de las otras alteraciones citogenéticas como la ausencia del cromosoma 7.

Análisis estadístico

Para las variables categóricas, se utilizaron frecuencias absolutas, frecuencias relativas y la prueba ji-cuadrado de Pearson para identificar las diferencias estadísticas. Para las variables cuantitativas, se determinó el cumplimiento del supuesto de normalidad con la prueba de Shapiro-Wilk, se calcularon las medianas con su respectivo rango Inter cuartil y las diferencias estadísticas se calcularon utilizando Kruskal-Wallis y posteriormente, se utilizó la prueba de Bonferroni para conocer entre cuáles categorías se presentaban las diferencias significativas. Para comparación de variables cuantitativas se utilizó la Rho de Spearman. En los análisis se consideraron significativos valores P menores a 0,05 y todos los datos se procesaron en el software SPSS versión 21 (IBM, Armonk, Nueva York, EE.UU.).

RESULTADOS

Características de la población

El rango de edad fue de 33 a 90 años, con una mediana de 72 años en donde el 91.5% eran mayores de 50 años. De los 59 pacientes estudiados, 32 fueron mujeres que representan el (54.2%) y 27 hombres con el (45.8%). El SMD con del(5q) aislado se encontró que en el 100% (n=3) de los pacientes fueron mujeres. El subtipo de SMD más frecuente fue el SMD con displasia unilínea que se presentó en el 27.1% (n=16) de los pacientes. La distribución de estos datos se presenta en la **tabla 1**

Tabla 1: Frecuencia de pacientes según grupo diagnóstico

Grupo diagnóstico	n	%
Unilínea	16	27.1
Inclasificable	15	25.4
Multilínea	10	16.9
Leucemia mieloide Aguda con cambios relacionados a mielodisplasia	5	8.5
Exceso de blastos 2	4	6.8
Exceso de blastos 1	4	6.8
del(5q) aislado	3	5.1
Sideroblastos en Anillo	2	3.4

La citopenia más frecuentemente fue la anemia en un 47.5% (n=28) de los pacientes con un nivel de hemoglobina promedio en 7.8 g/dL, de estos el 33.9% (n=20) tenían displasia en la línea eritroide. Además, la trombocitopenia se presentó en el 42.4% (n=25) y un promedio de recuento plaquetario de $52 \times 10^3/\mu\text{L}$. El resumen de datos paraclínicos se presenta en la **tabla 2**

Tabla 2. Parámetros paraclínicos por subtipo de SMD.

PARAMETROS PARACLÍNICOS EVALUADOS POR SUBGRUPOS DE SMD			Mediana	Percentil 25	Percentil 75
DX	Del(5q) aislada	Hb (g/dL)	12.6	11.5	15.3
		NEUTROFILOS $\times 10^3/\mu\text{L}$	2.85	2.28	5.97
		PLAQUETAS $\times 10^3/\mu\text{L}$	234	132	310
		VCM (fL)	98.2	83.9	105.7
		LDH (UI)*	221	221	221
	Exceso de blastos 1	Hb (g/dL)	7.2	6.4	9.3
		NEUTROFILOS $\times 10^3/\mu\text{L}$	4.08	2.119	151.6
		PLAQUETAS $\times 10^3/\mu\text{L}$	51.5	49	72
		VCM (fL)	92.2	75.5	104
		LDH (UI)*	551	551	551
	Exceso de blastos 2	Hb (g/dL)	8.25	7.30	9.20
		NEUTROFILOS $\times 10^3/\mu\text{L}$	1.53	1.53	1.53
		PLAQUETAS $\times 10^3/\mu\text{L}$	299	299	299
		VCM (fL)	95.8	95.8	95.8
		LDH (UI)*	285	285	285
Inclasificable	Hb (g/dL)	10.70	8.80	11.40	
	NEUTROFILOS $\times 10^3/\mu\text{L}$	2.16	0.80	2.92	
	PLAQUETAS $\times 10^3/\mu\text{L}$	190	114	212	

		VCM (fL)	91.2	86.5	92.8
		LDH (UI)	194	166	239
Leucemia mieloide aguda con cambios relacionados con la mielodisplasia		Hb (g/dL)	9.7	7.5	10.0
		NEUTROFILOS x10 ³ /μL	1.27	0.42	1.76
		PLAQUETAS x10 ³ /μL	80	65	156
		VCM (fL)	104.0	96.0	109.5
		LDH (UI)*	485	307	665
	Multilínea		Hb (g/dL)	9.7	8.5
		NEUTROFILOS x10 ³ /μL	1.22	1.10	2.06
		PLAQUETAS x10 ³ /μL	110	54	225
		VCM (fL)	100.8	99.0	107.4
		LDH (UI)	217	133	410
Sideroblastos en Anillo (>15%)		Hb (g/dL)	11.3	11.3	11.3
		NEUTROFILOS x10 ³ /μL	1.12	1.12	112
		PLAQUETAS x10 ³ /μL	52	52	52
		VCM (fL)	92.7	92.7	92.7
		LDH (UI)*	142	142	142
Unilínea (eritroide, megacariocítica o granulocítica)		Hb (g/dL)	9.5	7.8	11.2
		NEUTROFILOS x10 ³ /μL	2.32	1.25	5.01
		PLAQUETAS x10 ³ /μL	66	58	163
		VCM (fL)	96.1	92.5	113.3
		LDH (UI)	177	168	271

* datos disponibles para solo un paciente por subgrupo. Hb: hemoglobina, VCM: volumen corpuscular medio, LDH: lactato deshidrogenasa.

En el mielograma las alteraciones displásicas se encontraron en el 69.5% (n=41). En la línea eritroide la alteración se evidenció en el 42.4%(n=25) donde los parámetros más frecuentes fueron los cambios nucleares, como la cariorrexis ambos en un 25.4% (n=15) de los pacientes, seguido de la binucleación y el asincronismo madurativo ambos en un 16.9% (n=10) y finalizando con los cambios macrocíticos en un 37.3% (n=22). En el linaje granulocítico los cambios morfológicos se observaron en el 23.7% (n=14), donde los hallazgos más relevantes fueron la hipolobulación con 15.3% (n=9) de los pacientes, seguido del asincronismo madurativo con 11.9% (n=7). Por último, en la línea megacariocítica, se obtuvo una alteración de la morfología en el 55.9% (n=33) de estos, los más alterados fueron los megacariocitos pequeños en el 30.5% (n=18), seguido de la hipolobulación en el 28.8% (n=17) y finalmente los monolobulados en el 15.3% (n=9). Estos datos se encuentran resumidos en la **tabla 3**.

Tabla 3 de alteraciones morfológicas en el mielograma según la línea celular

Alteraciones morfológicas según línea celular	n	%
Displasia eritroide	25	42.4
Cariorexis	15	25.4
Asincronismo madurativo	10	16.9
Hemoglobinización anormal	2	3.4

<i>Fragmentación nuclear</i>	3	5.1
<i>Puentes intercitoplásmicos</i>	3	5.1
<i>Binucleación</i>	10	16.9
<i>Alteración del contorno nuclear</i>	11	18.6
<i>Cambios megaloblásticos</i>	22	37.3
Displasia granulocítica	14	23.7
<i>Asincronismo madurativo</i>	7	11.9
<i>Cariorexix</i>	1	1.7
<i>Hipogranularidad/agranularidad</i>	6	10.2
<i>Hipolobulación</i>	9	15.3
<i>Clumping</i>	3	5.1
<i>Cambios megaloblásticos</i>	3	5.1
Displasia megacariocítica	33	55.9
<i>Segmentación nuclear</i>	5	8.5
<i>Asincronismo madurativo</i>	1	1.7
<i>Micromegacariocito</i>	7	11.9
<i>Mayor tamaño</i>	3	5.1
<i>Tamaño pequeño</i>	18	30.5
<i>Hiperlobulados</i>	8	13.6
<i>Monolabados</i>	9	15.3
<i>Hipolobulados</i>	17	28.8

Las alteraciones morfológicas por biopsia se presentaron en el 66.1% de los casos (n=39) con alteraciones principalmente de la línea megacariocítica, con megacariocitos hipolobulados en el 27.1% (n=16) de los pacientes, seguido de los cambios megaloblastiodes presentados en la línea eritroide, en el 8.4% (n=5). La evaluación de la celularidad mostró que el 49.1% (n=29) de los pacientes presentó hiper celularidad, el 40.7% (n=24) fueron normocelulares y el 10.2% (n=6) hipocelulares. La fibrosis evaluada por coloración de retículo y tricrómico estuvo presente en 11.9% (N=7) y la alteración arquitectónica dada por distribución anormal de precursores se evidenció en 13.6% (n=8) de los pacientes. Se comparó la correlación entre anormalidad de megacariocitos para biopsia y mielograma y no presentaron asociación estadística, el mielograma presentó 66.7% de cambios citológicos anormales frente a un 33.3% en la biopsia. Estos datos se resumen en la tabla 4.

Tabla 4 Frecuencia de alteraciones morfológicas en la biopsia según la línea celular

Alteraciones histomorfológicas en biopsia medular	n	%
Displasia eritroide	6	10.2
<i>Cambios megaloblastiodes</i>	5	8.5
<i>Hipercromasia</i>	1	1.7
<i>Macrociticos</i>	1	1.7
<i>Hipolobulación</i>	1	1.7

Displasia megacariocítica	18	30.5
<i>Cambio megaloblástico</i>	2	3.4
<i>Hiperlobulación</i>	2	3.4
<i>Disminución tamaño</i>	6	10.2
<i>Monolobulación</i>	3	5.1
<i>Hipolobulación</i>	16	27.1
<i>Hipercromasia</i>	3	5.1
<i>Micromegacariocito</i>	1	1.7
Arquitectura anormal	8	13.6

Las anomalías genéticas se hallaron en el 52.5% (n=31) de todos los pacientes evaluados, donde el más frecuente fue el cariotipo complejo en el 10.2%(n=6), seguido de la nulisomía Y en el 8.5% (n=5), la trisomía 8 en el 6.8% (n=4) y por último la del 5q en el 5% (n=3). Estos hallazgos se resumen en la **tabla 5**.

Tabla 5: Alteraciones citogenéticas en pacientes con SMD

Citogenética	n	%
Del 5q	3	5.1
Del 7q o monosomía	2	3.4
trisomía 8	4	6.8
Del 12p	1	1.7
nulisomía Y	5	8.5
Del 17p	0	1.7
Cariotipo complejo	6	10.2
otros	10	16.9
normal	27	47.5

En cuanto a la citometría de flujo, las alteraciones se evidenciaron en el 64.4% (n=38) de los pacientes analizados, de estos, el 49.2% (n=29) presentaron anomalías fenotípicas en la línea granulocítica, donde se observó expresión anormal de CD35/CD64 y bloqueos en los patrones de maduración (CD13/CD11b, CD13/CD16 y CD16/CD10), ambos en el 27.1% (n=16); también se evidenció que 2 pacientes tuvieron expresión anómala de CD56, marcador de infidelidad de la línea granulocítica, estos pacientes estaban clasificados con SMD con exceso de blastos tipo 1 y LMA con cambios relacionados a la mielodisplasia. El 42.4% (n=25) de los pacientes presentaron alguna alteración en la línea eritroide, encontrándose, que en el 28.8% (n=17) se observó expresión de CD36 (patrón de maduración) heterogénea y por último en el 8.5% (n=5) se observó alteración en el linaje monocítico, en el cual, se presentó con mayor frecuencia disminución de la expresión de HLA-DR en el 6.8% (n=4) de los evaluados. Las frecuencias de alteraciones citométricas por análisis convencional se resumen en la **figura 1**, donde se

observa como la displasia citométrica reportada fue más frecuente en la línea neutrófilo seguido de las observadas en línea eritroide.

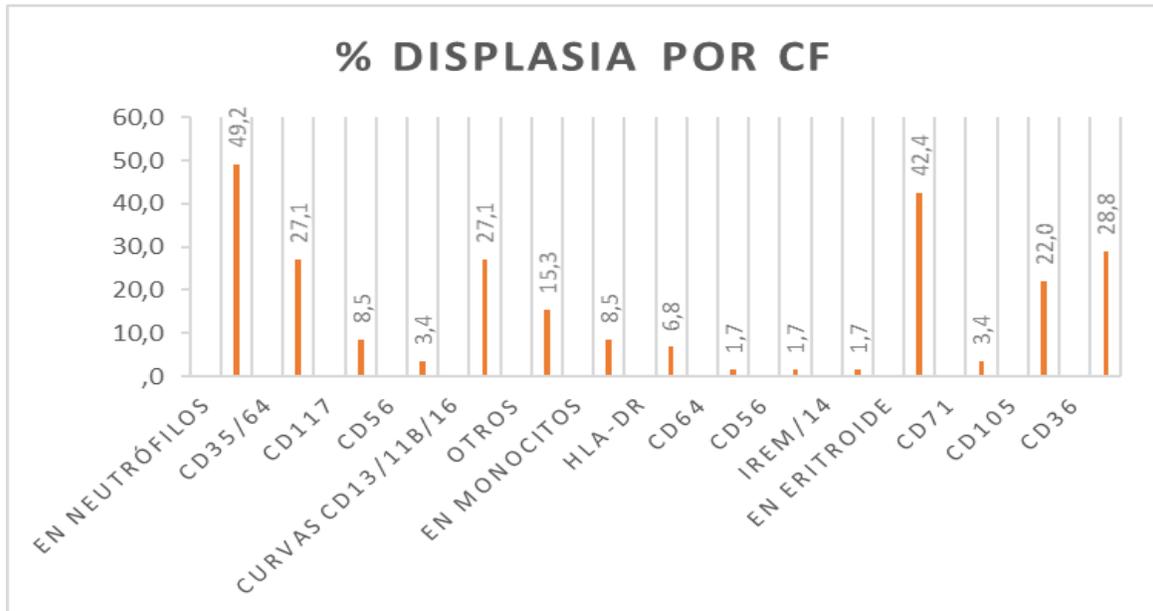


Figura 1. Porcentaje de alteraciones citométricas de los marcadores monoclonales para cada línea celular evaluada mediante análisis convencional.

El porcentaje de blastos evaluados por mielograma y citometría de flujo arrojó como resultado que el porcentaje en mielograma fue mayor con una mediana en el grupo de pacientes con SMD de 2% (RI 0.7% - 4.10%) mientras en CF fue de 0.7% (RI 0.5% - 3.0%), estas dos variables tuvieron correlación positiva donde la Rho de Spearman tuvo un valor r de 0.775 evidenciando una asociación positiva fuerte $p=0.001$ visualizado en la **figura 2**. Un hallazgo similar se observó cuando se compararon los recuentos de eritroblastos sobre el total de células nucleadas por las dos técnicas, así en mielograma se obtuvo un valor promedio en el grupo de pacientes con EB de 21.9% (RI 9% - 44.2%) mientras que en la CF su valor promedio fue de 12.98% (RI 7.09% - 18.2%) con una correlación positiva donde la Rho de Spearman tuvo un valor r de 0.725 evidenciando una asociación positiva de moderada a fuerte $p=0.001$ **figura 2**. El mismo ejercicio se realizó comparando el recuento de eritroblastos en el panel de eritrocito con los paneles para estudio de monocito $p=0.001$ y neutrófilo $p=0.001$ y aunque en los dos casos dio asociaciones positivas sus valores promedio fueron superiores.

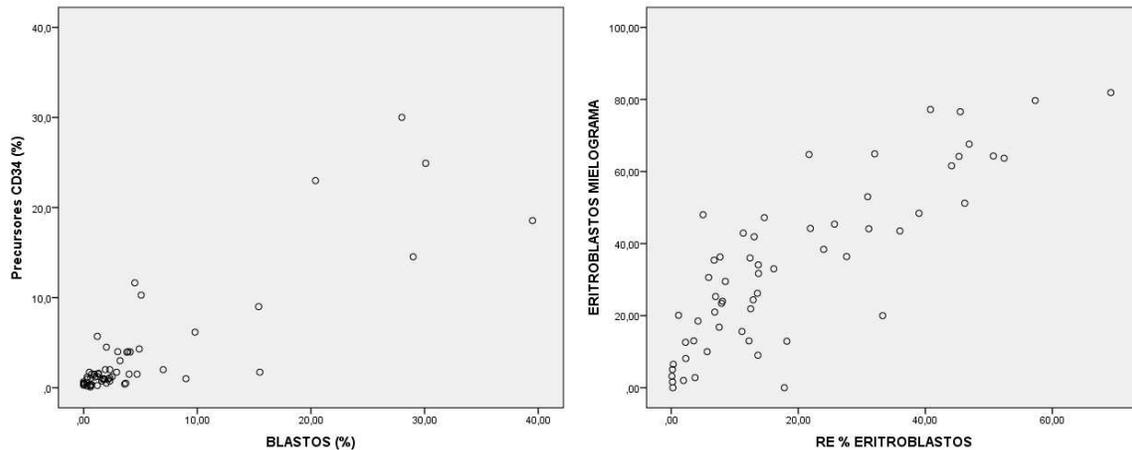


figura 2: Análisis de correlación entre el recuento de blastos y eritroblastos realizado por mielograma y citometría de flujo en donde se observa correlación entre el recuento realizado por ambas técnicas a. Blastos en mielograma vs CF Rho spearman $p=0.001$ $r=0.775$ b. Recuento de eritroblastos en mielograma con concordancia citometría de flujo vs citometría de flujo Rho spearman $p=0.001$ $r=0.725$.

Construcción de Índices citométricos y correlaciones

Con el objetivo de plantear los índices citométricos a evaluar se revisó en la literatura las publicaciones de consenso en donde los grupos de trabajo en CF para SMD acordaron paneles de anticuerpos necesarios para realizar una debida caracterización de las células inmaduras, así como el patrón de maduración de linajes mieloides, monocíticos y eritroides que deberían ser estudiados^{17,20,33-35}, con esta información se construyeron índices citométricos que pudieran tener valor diagnóstico a partir de los tubos dirigidos al estudio del neutrófilo, monocito y eritrocito desde los cuales se dan opciones de índices que puedan estudiar el compartimento evaluado, además de algunas características físicas o de precursores. Los índices citométricos evaluados son resumidos en la **tabla 6**.

Se tomaron las alteraciones citométricas que con más frecuencia se documentan en los pacientes evaluados y se midió la expresión de cada antígeno involucrado, en el mismo momento, se midió también la expresión de una población control interno que fueron los linfocitos totales, T, B o NK según el caso. Para diferenciarlos en los tubos mieloides se tomó los linfocitos B a través de la expresión fuerte de HLA DR, los linfocitos NK a través de la expresión fuerte de CD16 y los linfocitos T a través de la ausencia de expresión de cualquier marcador de tubos mieloides. Sin embargo, es necesario aclarar que se puede presentar expresión débil de HLA DR en linfocitos T.

En estas poblaciones se midió las medianas de fluorescencia de cada población y se dividieron entre ellas (índice) calculando así su valor para poblaciones control y patológicas. Estas medidas son el producto de la división de la mediana de fluorescencia (MFI) de poblaciones a estudiar y poblaciones control, un ejemplo sería el índice SSC granulocitos que sería la medida de la MFI de neutrófilos maduros (ej. 81854) sobre la MFI de los linfocitos (10830) para un índice de 7.55 (81854/10830). Cuando la variable era el recuento o porcentaje de poblaciones, también se puede utilizar el producto entre la cuantificación de eventos celulares de poblaciones en estudio y poblaciones control,

ejemplo, índice de precursores linfoides; que sería la medida de la cantidad de precursores (ej. 5000 Cel) con respecto al total de precursores linfoides (ej. 500 Cel) para un índice de 10 (5000/500). **Figura 3.**

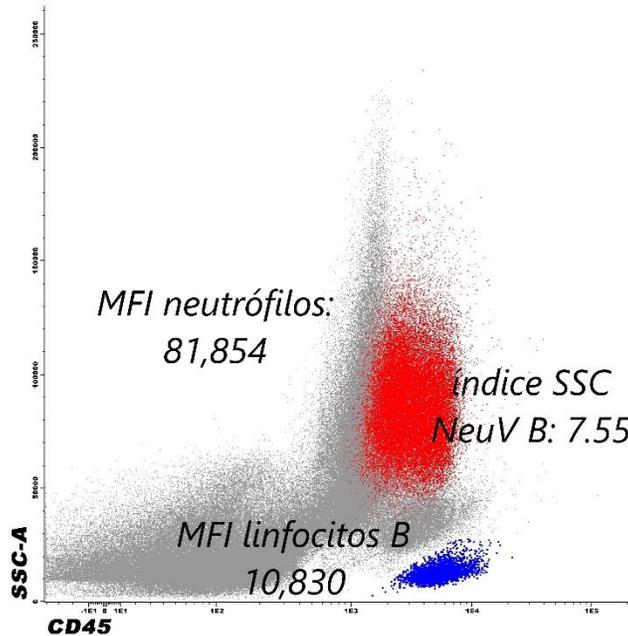


Figura 3. Índice citométrico SSC NeuV B: Comparación entre complejidad interna celular (SSC) de neutrófilos estadio V, maduros (en rojo) y linfocitos B (en azul). MFI mediana de fluorescencia-

Tabla 6 Índices citométricos según línea mieloide estudiada

VARIABLE	SIGNIFICADO	REFERENTE	COMPARADOR	CATEGORIA
INDICES CITOMÉTRICOS EN TUBO NEUTROFILO (RN)				
<u>SSC NeuTot Iy</u>	Cociente complejidad relativa de neutrófilos totales / complejidad relativa linfocitos totales	neutrófilo total	linfocito total	granularidad
<u>SSC NeuTot B</u>	cociente complejidad relativa de neutrófilos totales / complejidad relativa linfocitos B maduros	neutrófilo total	Linfocitos B maduros	granularidad
<u>Bloq Gran</u>	Cociente entre el número de neutrófilos tempranos (promielocitos, mielocitos/ metamielocitos)	neutrófilo inmaduro	metamielocitos	desviación madurativa
<u>Asinc NeuT</u>	expresión de antígenos de inmadurez (CD117, CD34) en neutrófilos maduros	neutrófilo maduro	linfocito T	asincronismo madurativo
<u>CD16 CV NeuTo</u>	Coefficiente de variación en la expresión de CD16 de los neutrófilos totales	neutrófilo total	NA	expresión antígeno
<u>CD11b CV NeuTo</u>	Coefficiente de variación en la expresión de CD11b de los neutrófilos totales	neutrófilo total	NA	expresión antígeno
<u>SSC NeuV B</u>	complejidad de neutrófilos terminales vs linfocitos b maduros	neutrófilos maduros	B maduros	granularidad

<u>FSC NeuV B</u>	tamaño de neutrófilos terminales vs linfocitos B maduros	neutrófilos maduros	B maduros	tamaño
<u>CD45 NeuV IyT</u>	cambio en la expresión de CD45	neutrófilos maduros	linfocito T	expresión antígeno
<u>CD11b NeuV IyT</u>	cambio en la expresión de CD11b	neutrófilos maduros	linfocito T	expresión antígeno
<u>CD16 NeuV IyT</u>	cambio en la expresión de CD16	neutrófilos maduros	linfocito T	expresión antígeno
<u>CD10 NeuV IyT</u>	cambio en la expresión de CD10	neutrófilos maduros	linfocito T	expresión antígeno
<u>CD13 NeuV IyT</u>	cambio en la expresión de CD13	neutrófilos maduros	linfocito T	expresión antígeno
<u>III (no clásicos)</u>	% de monocitos no clásicos en monocitos	monocito no clásico	monocito total	bloqueo madurativo
<u>Pre linfo</u>	% de precursores linfoides en precursores	precursor linfoide	precursor total	bloqueo madurativo
<u>CD13 PrecM IyT</u>	cambio en la expresión de CD13 en precursores mieloides	precursor mieloides	linfocito T	expresión antígeno
<u>INDICES CITOMÉTRICOS EN TUBO MONOCITO (RM)</u>				
<u>SSC NeuTot Iy</u>	complejidad de neutrófilos totales vs linfocitos totales	neutrófilo total	linfocito total	granularidad
<u>SSC NeuTot B</u>	complejidad de neutrófilos totales vs linfo B maduros	neutrófilo total	B maduros	granularidad
<u>Bloq Gran</u>	relación de neutros tempranos vs inmaduros	neutrófilo inmaduro	neutro/bandas	desviación madurativa
<u>Infid Neut</u>	expresión de CD14 e IREM2 en neutrófilos totales	neutrófilo total	linfocito T	infidelidad linaje
<u>CD64 NeuV IyT</u>	expresión de CD64 en neutrófilos maduros	neutrófilos maduros	linfocito T	asincronismo madurativo
<u>SSC NeuV B</u>	complejidad de neutrófilos terminales vs linfo b maduros	neutrófilos maduros	B maduros	granularidad
<u>FSC NeuV B</u>	tamaño de neutrófilos terminales vs linfo B maduros	neutrófilos maduros	b maduros	tamaño
<u>CD45 NeuV IyT</u>	cambio en la expresión de CD45	neutrófilos maduros	linfocito T	expresión antígeno
<u>bloq mon</u>	relación de monocitos maduros vs monocitos tempranos	monocitos maduros	monocitos inmaduros	desviación madurativa
<u>Asinc Mon</u>	expresión lineal de CD35 y CD14 en monocitos totales	CD35	CD14	asincronismo madurativo
<u>AsinII Mon</u>	expresión de antígenos de inmadurez (CD14, CD117) en monocitos totales	monocito total	linfocito T	asincronismo madurativo
<u>CD14 Mon IyT</u>	expresión de CD14 en monocitos maduros	monocito maduro	linfocito T	expresión antígeno
<u>HLA Mon IyT</u>	expresión de HLADR en monocitos maduros	monocito maduro	linfocito T	expresión antígeno
<u>CD35 Mon IyT</u>	expresión de CD35 en monocitos maduros	monocito maduro	linfocito T	expresión antígeno
<u>CD34 Mon IyT</u>	expresión de CD34 en monocitos maduros	monocito	linfocito T	asincronismo

		maduro		madurativo
<u>SSC Mon LyB</u>	cociente complejidad relativa de monocitos maduros / complejidad relativa linfocitos B maduros	monocito maduro	linfocito B	granularidad
<u>FSC Mon LyB</u>	cociente tamaño relativo de monocitos maduros / tamaño relativo linfocitos B maduros	monocito maduro	linfocito B	tamaño
<u>Asinc Prom</u>	Desviación de maduración en curva CD14 e IREM2 en monocitos. Cociente de la expresión de CD14 en promonocitos sobre la expresión de CD14 en linfocitos T, dividido el cociente de la expresión de IREM2 en promonocitos sobre la expresión de IREM2 en linfocitos T.	CD14	IREM2	asincronismo madurativo
<u>CD35 Ery LyT</u>	expresión de CD35 en eritroblastos	eritroblasto total	linfocito T	expresión antígeno
<u>CD45 Pre LyT</u>	expresión de CD45 en precursores totales	precursor total	linfocito T	expresión antígeno
<u>Bloq prec CV</u>	falta de heterogeneidad en precursores totales	precursor total	NA	expresión antígeno
<u>Asinc prec</u>	expresión de CD14 e IREM2 en precursores totales	precursor total	linfocito T	asincronismo madurativo
<u>SSC Prec Lyb</u>	complejidad de precursores totales vs linfocitos b maduros	precursor total	linfocito B	granularidad
<u>Pre mon</u>	% de precursores monocito en precursores totales	precursor monocito	precursor total	bloqueo madurativo
<u>INDICES CITOMÉTRICOS EN TUBO ERITROIDE (RE)</u>				
<u>CD33 baso</u>	expresión de CD33 en granulocitos basófilos	granulocitos basófilos	linfocito T	expresión antígeno
<u>SSC NeuTot ly</u>	complejidad de neutrófilos totales vs linfocitos totales	neutrófilo total	linfocito total	granularidad
<u>SSC NeuTot B</u>	complejidad de neutrófilos totales vs linfo B maduros	neutrófilo total	Linfocitos B maduros	granularidad
<u>CD33 monT LyT</u>	expresión de CD33 en monocitos totales	monocito total	linfocito T	expresión antígeno
<u>CD36 monT LyT</u>	expresión de CD36 en monocitos totales	monocito total	linfocito T	expresión antígeno
<u>FSC Erit LyB</u>	Cociente tamaño relativo eritroblastos totales / tamaño relativo linfocitos B maduros	eritroblasto total	linfocito B	tamaño
<u>SSC Erit LyB</u>	Cociente complejidad relativa eritroblastos totales / complejidad relativa linfocitos B maduros	eritroblasto total	linfocito B	complejidad
<u>CD71cv</u>	Coeficiente de variación en la expresión de CD71	eritroblasto total	NA	expresión antígeno
<u>CD36cv</u>	Coeficiente de variación en la expresión de CD36	eritroblasto total	NA	expresión antígeno
<u>Asinc Eri</u>	expresión lineal de CD36 y CD71 en eritroblastos totales	eritroblasto total	linfocitos T	asincronismo madurativo

<u>Asincli Eri</u>	expresión de antígenos de inmadurez CD34, CD117 en eritroblastos tardíos	eritroblasto total	linfocitos T	asincronismo madurativo
<u>Cam meq term</u>	Cociente tamaño relativo eritroblastos terminales CD105/CD117- / tamaño relativo linfocitos B maduros	eritroblasto terminal	linfocito B	tamaño
<u>CD45 Pre lyT</u>	expresión de CD45 en precursores totales	precursor total	linfocito B	expresión antígeno
<u>Bloq prec CV</u>	falta de heterogeneidad en precursores totales	precursor total	NA	expresión antígeno
<u>SSC Prec Lyb</u>	complejidad de precursores totales vs linfocitos b maduros	precursor total	linfocito B	granularidad
<u>CD33 Pre lyT</u>	expresión de CD33 en precursores totales	precursor total	linfocito T	expresión antígeno
<u>CD105 Pre lyT</u>	expresión de CD105 en precursores totales	precursor total	linfocito T	expresión antígeno
<u>CD71 Pre lyT</u>	expresión de CD71 en precursores totales	precursor total	linfocito T	expresión antígeno
<u>CD36 Pre lyT</u>	expresión de CD36 en precursores totales	precursor total	linfocito T	expresión antígeno
<u>Pre-Eritroides</u>	% de precursores eritroides en precursores totales	precursor eritroide	precursor total	bloqueo madurativo
<u>% eritro</u>	% eritroblastos	eritroblasto total	leucocitos totales	bloqueo madurativo

Correlación estadística de índices citométricos

Parámetros en neutrófilos

En la comparación del grupo de control con los grupos diagnósticos a través del test H de Kruskal-Wallis, se encontró que los índices citométricos que incluían comparación entre complejidades internas de neutrófilos (SSC) tenía valores con diferencia estadística ($p < 0.005$) en los tres paneles evaluados, indicando así diferencias entre la complejidad relativa de neutrófilos, tanto totales como maduros con respecto a los linfocitos tomados como control. El índice SSC NeuTot B que es la comparación de complejidad de los neutrófilos totales con los linfocitos B tuvo un comportamiento similar en los tubos monocito y eritroide sin diferencias estadísticas apreciables. El índice SSC NeuTo Ly que es la comparación de complejidad de los neutrófilos totales con los linfocitos totales tuvo un comportamiento similar en los tubos neutrófilo y eritroide sin diferencias apreciables estadísticamente. Similar al hallazgo anterior RM SSC NeuV B en donde el comparador son los neutrófilos maduros (CD16, CD10+) tampoco tuvo diferencias con los otros índices citométricos, lo que sugiere que cualquiera de los índices citométricos establecidos para SSC sin importar las poblaciones evaluadas brinda similar información. Los hallazgos anteriores fueron confirmados cuando el grupo de comparación fue realizado con la suma de grupos diagnósticos y no por entidades independientes, el hallazgo se muestra en la **figura 4** y un ejemplo se grafica en la **figura 5**.

A pesar de lo anterior, al aplicar el test de Bonferroni para comparar entre grupos independientes se evidencia que no hay diferencias con significancia estadística entre el grupo de SMD inclasificable o con otras alteraciones citogenéticas como en del5q- en donde el valor p fue de 0.80. El grupo control tuvo una mediana para este índice de 7.99 (6.23-8.95) mientras que el SMD con EB1 tuvo una mediana de 3.69 (2.73-4.83).

Este índice se comparó en los pacientes que presentaron hipogranularidad morfológica y de los seis pacientes con dicho hallazgo, cinco la presentaron por CF. Sin embargo, por CF se presentó índice sugestivo de hipogranularidad en 42 pacientes, de los cuales solo 5 fue morfológica, por lo que la sensibilidad para este índice fue del 83.3%, especificidad 30.2%, valor predictivo positivo 11.9% y valor predictivo negativo 94.1%.

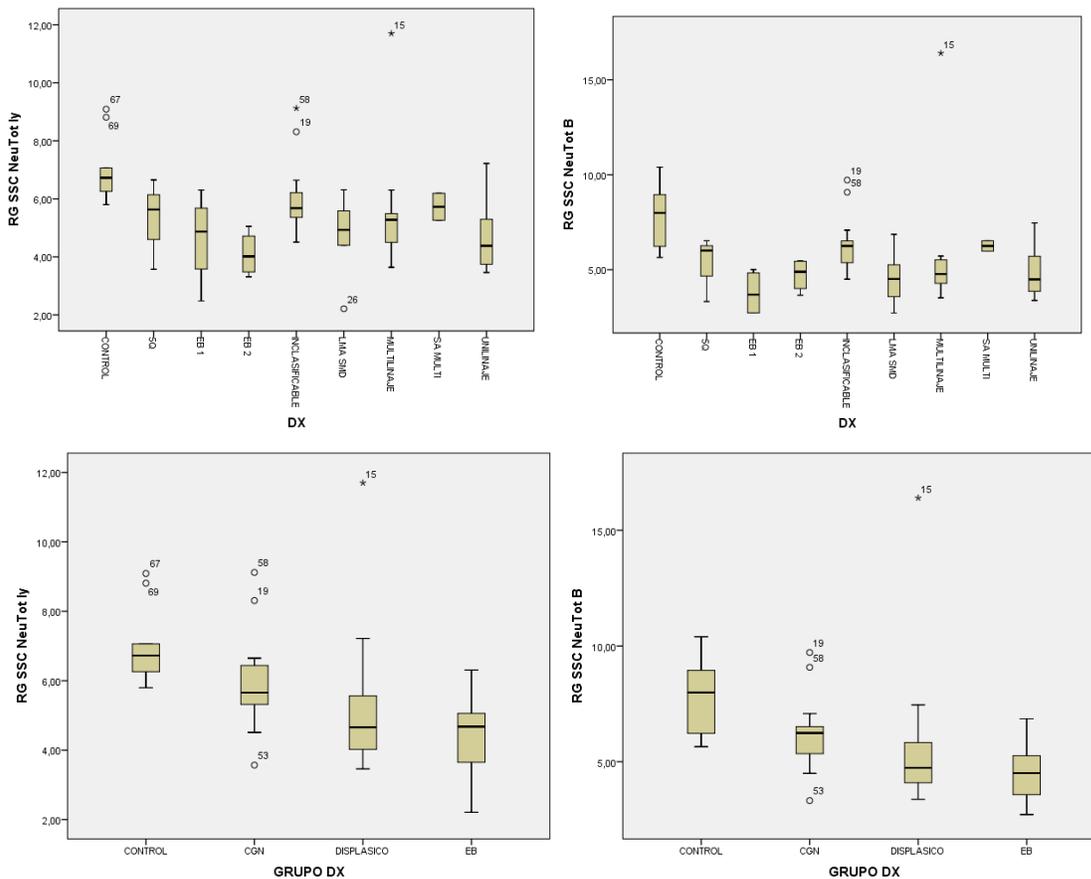


Figura 4 Índices citométricos de complejidad interna celular en relación con controles: a. índice RG SSC NeuTotLy: comparación de complejidad entre neutrófilos y linfocitos totales del grupo control y subgrupos de SMD. b. índice SSC NeuTot B comparación de complejidad entre neutrófilos totales y linfocitos B del grupo control y subgrupos de SMD. c. índice RG SSC NeuTotLy comparación de complejidad entre neutrófilos y linfocitos totales del grupo control y agrupaciones diagnósticas. d. índice SSC NeuTot B comparación de complejidad entre neutrófilos totales y linfocitos B del grupo control y agrupaciones diagnósticas. Kruskal-Wallis $p < 0.005$, prueba post hoc: prueba de Bonferroni. CG grupo citogenético, EB exceso de blastos, LMA leucemia mieloide aguda secundaria a SMD, SA sideroblastos en anillo. Los puntos y número representan los pacientes con valores atípicos.

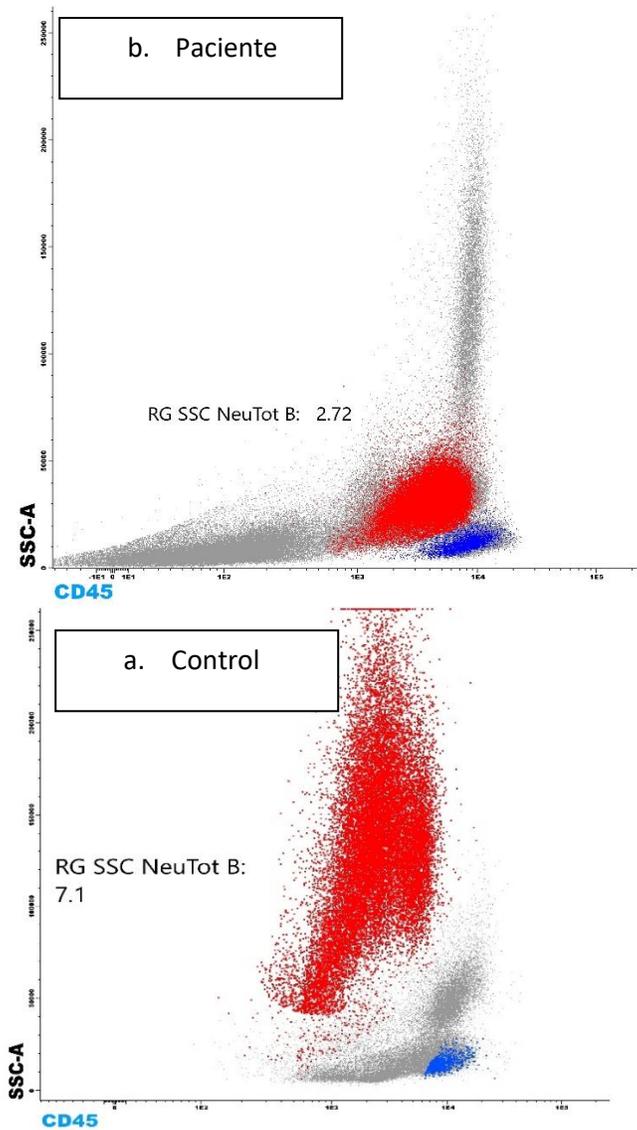
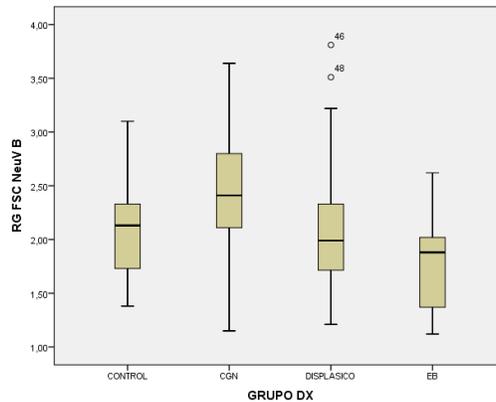


Figura 5. índice SSC NeuTot B comparación de complejidad entre neutrófilos totales y linfocitos b de un paciente en relación con un control. Nótese el valor bajo de índice para el paciente y una visualización baja de la complejidad relativa (SSC) con un índice de 2.72 vs 7.1 del grupo control.

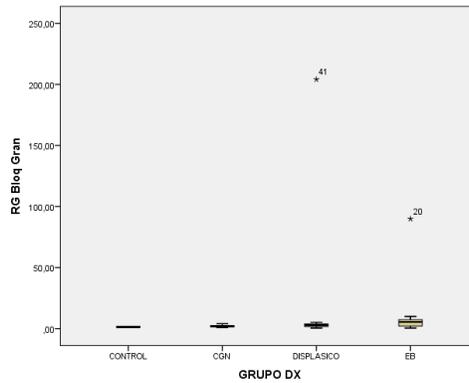
El índice RG FSC NeuV, índice que evidencia la comparación de tamaño de los neutrófilos maduros CD16⁺⁺, CD10⁺, indicó que entre la comparación del grupo control con los grupos diagnósticos, el grupo de SMD con alteraciones citogenéticas (5q en inclasificables) tuvo una diferencia con el grupo control (**figura 6**). Este índice indica la relación entre el tamaño de los neutrófilos maduros (CD16/CD10⁺) y los linfocitos B lo que indica que en este grupo de análisis los neutrófilos tenían un tamaño superior con respecto al grupo control.



	RG SSC NeuTot B	Percentil 25	Mediana	Percentil 75
DX	CONTROL	6.23	7.99	8.95
	5Q	3.32	6.01	6.52
	EB 1	2.73	3.69	4.83
	EB 2	4.01	4.89	5.45
	<i>Inclasificable*</i>	5.35	6.25	6.55
	LMA relacionada a SMD	3.58	4.51	5.26
	Multilínea	4.28	4.77	5.52
	Sideroblastos en anillo	5.98	6.25	6.52
	Unilínea	3.86	4.49	5.71

Figura 6 tamaño celular de neutrófilos maduros en relación con linfocitos B: $p=0.12$: A. índice citométrico RG FSC NeuV Se observa un índice superior entre los neutrófilos del grupo control (más pequeños) con relación al grupo citogenético (más grandes). **B. tabla de análisis bivariado entre grupos dx para el índice RGSSCneuTotB**, con* grupos sin diferencias estadísticas con respecto al control Los puntos y número representan los pacientes con valores atípicos. prueba post hoc: prueba de Bonferroni

El índice RG Bloq Gran es la relación entre neutrófilos maduros e inmaduros o el índice de bloqueo granulocítico, y está dada por la suma de promielocitos + mielocitos/metamielocitos. Ese índice presentó diferencias respecto al grupo control ($p<0.005$) en los grupos diagnósticos displásicos y con exceso de blastos, es decir, no hubo diferencias en el grupo citogenético. El mismo hallazgo se presentó en el tubo de antígenos monocitos, indicando que es adecuada para evaluación en ambos tubos. La mediana de este parámetro en el grupo control fue de 1.28 (RI 1.25-1.79), es decir, por cada neutrófilo en estadio inmaduro I-II-III CD13+, CD16- en médula ósea (grado madurativo similar a promielocitos y mielocitos) se encuentran 1.28 neutrófilos en estadio semiduro o tipo IV CD16+CD10- (similar a metamielocitos), en contraste, en el grupo de SMD EB1 el valor promedio de este índice fue de 4.76 (RI 2.85-7.99) evidenciando la acumulación de formas tempranas. Para el cálculo de este índice se utilizó el valor de neutrófilos tipo IV y no tipo V (maduros CD16,CD10+) debido a la posible contaminación con neutrófilos de sangre periférica al momento del aspirado. La estadística descriptiva se encuentra en la **tabla 7** y se esquematiza en la **figura 7 y 8**.



	RG Bloq Gran	Percentil 25	Mediana	Percentil 75
DX	CONTROL	1.25	1.28	1.79
	5Q*	1.32	1.41	2.38
	EB 1	1.27	3.21	5.76
	EB 2	2.85	4.76	7.99
	Inclasificable*	1.29	2.06	2.83
	LMA relacionada a SMD	5.51	7.30	9.55
	Multilínea	1.32	2.62	2.82
	Sideroblastos en anillo	1.66	2.17	2.68
	Unilínea	2.57	3.76	4.45

Figura 7 relación entre la cantidad de neutrófilos inmaduros y maduros en relación con controles: $p=0.001$: a. se observa como el grupo de EB (exceso de blastos) presenta mayor índice evidenciando mayor cantidad de neutrófilos inmaduros con respecto a los otros grupos diagnósticos. b. tabla de análisis bivariado entre grupos dx para el índice RG Bloq Gra, con* grupos sin diferencias estadísticas con respecto al control n. Los puntos y número representan los pacientes con valores atípicos. prueba post hoc: prueba de Bonferroni

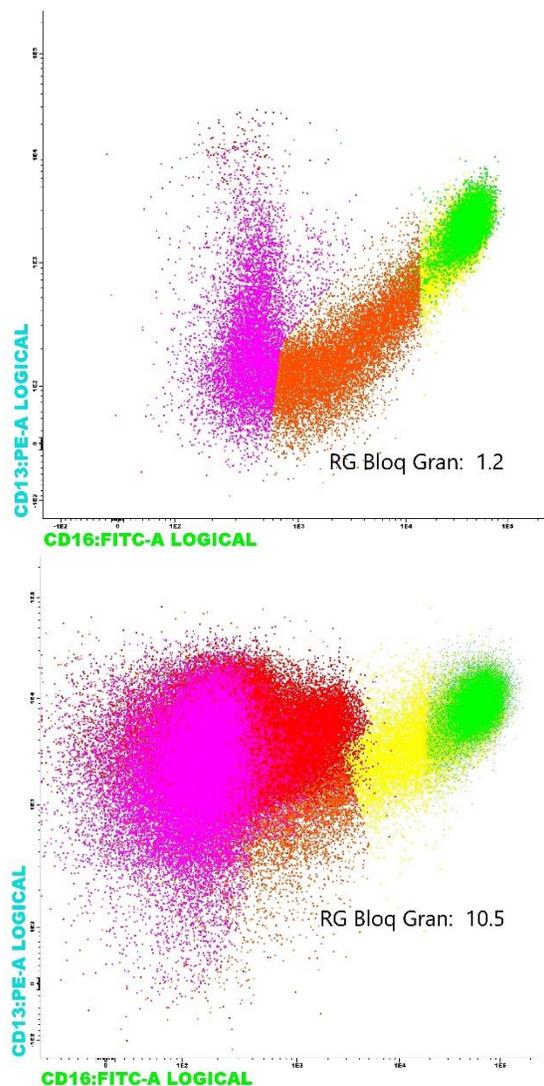


Figura 8. Índice RG Bloq Gran: relación entre neutrófilos maduros e inmaduros o el índice de bloqueo granulocítico, índice dada por la suma de promielocitos + mielocitos/metamielocitos. **A.** paciente control con cantidades similares de células en estadio temprano y terminal. **B.** Paciente con SMD con acumulación de formas en estadio temprano. En rojo neutrófilos CD117+ (I similares a promielocitos tempranos), en morado neutrófilos CD117-/CD13- (II similares a promielocitos tardíos), en naranja neutrófilos CD16+-(III similares a mielocitos), en amarillo neutrófilos CD16+/CD10- (IV similares a metamielocitos) en verde neutrófilos CD16+/CD10+ (V similares a bandas/neutrófilos maduros).

Tabla 7 estadística descriptiva de algunos índices citométricos granulocíticos (RG)

Diagnóstico	Índice	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75
CONTROL	RG SSC NeuTot B	1.69	5.65	10.40	6.23	7.99	8.95
	RG Bloq Gran	.37	.76	1.83	1.25	1.28	1.79
5Q	RG SSC NeuTot B	1.72	3.32	6.52	3.32	6.01	6.52
	RG Bloq Gran	.59	1.32	2.38	1.32	1.41	2.38

EB 1	RG SSC NeuTot B	1.22	2.72	5.01	2.73	3.69	4.83
	RG Bloq Gran	2.73	.89	6.74	1.27	3.21	5.76
EB 2	RG SSC NeuTot B	.88	3.66	5.47	4.01	4.89	5.45
	RG Bloq Gran	3.46	2.13	10.04	2.85	4.76	7.99
INCLASIFICABLE	RG SSC NeuTot B	1.40	4.50	9.72	5.35	6.25	6.55
	RG Bloq Gran	.96	.75	4.04	1.29	2.06	2.83
LMA SMD	RG SSC NeuTot B	1.59	2.72	6.86	3.58	4.51	5.26
	RG Bloq Gran	37.79	.46	89.88	5.51	7.30	9.55
MULTILINAJE	RG SSC NeuTot B	3.78	3.52	16.40	4.28	4.77	5.52
	RG Bloq Gran	1.16	.46	4.28	1.32	2.62	2.82
SA MULTI	RG SSC NeuTot B	.38	5.98	6.52	5.98	6.25	6.52
	RG Bloq Gran	.72	1.66	2.68	1.66	2.17	2.68
UNILINAJE	RG SSC NeuTot B	1.33	3.38	7.46	3.86	4.49	5.71
	RG Bloq Gran	50.19	1.42	204.10	2.57	3.76	4.45

El índice RG CD11b CV NeuTo evidenció diferencias de los diagnósticos agrupados con respecto al grupo control. Este índice evidencia el coeficiente de variación de CD11b en la totalidad de neutrófilos (maduros e inmaduros), es decir, la heterogeneidad de la expresión antigénica en dicha población, sin embargo, este hallazgo solo fue significativo para los grupos de exceso de blastos $p=0.35$. Al comparar el hallazgo con la observación visual del patólogo encargado de interpretar las curvas se observó que el índice tuvo una sensibilidad del 73.7%, especificidad del 95%, valor predictivo negativo 88.4% del y valor predictivo del 87.5% para una buena correlación, $p=0.001$.

En la comparación de subgrupos independientes se observó que el índice RG Asinc NeuT que indica la expresión de antígenos de inmadurez en neutrófilos totales como HLADR, CD34 Y CD117 (asincronismo madurativo) presentó diferencias con los controles, sin embargo, esta diferencia solo fue significativa en el grupo de pacientes en estadio LMA, las diferencias se muestran en la **figura 9**

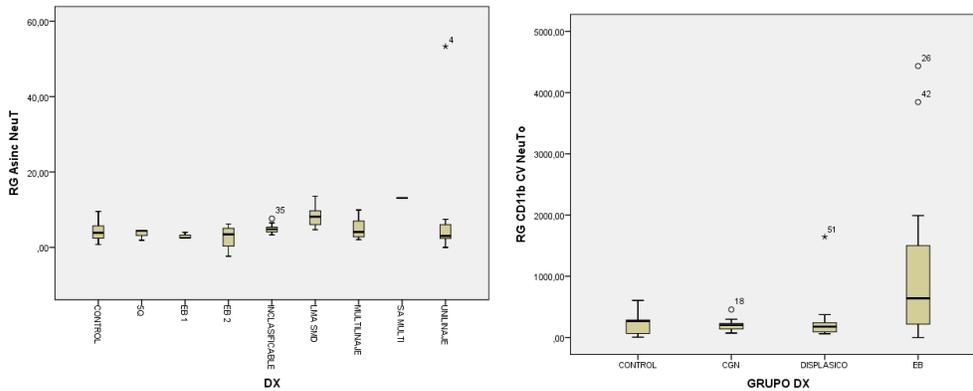


Figura 9 comportamiento de índices citométricos de expresión de antígenos de neutrófilo con respecto a grupo de controles: a. RG AsincNeuT (asincronismo madurativo, expresión de antígenos de inmadurez en neutrófilos maduros) con diferencias marcadas entre los neutrófilos del grupo LMA $p=0.032$ b. RG CD11b CV neuTo (heterogeneidad en la expresión de CD11b en neutrófilos totales), en este grupo se evidencia la diferencia de los pacientes con EB con respecto al control. Los puntos y número representan los pacientes con valores atípicos

Parámetros en monocitos

Se observaron diferencias para el índice RG III (no clásicos) entre la cantidad de monocitos no clásicos e intermedios (CD16+) de los grupos diagnósticos y control, con una disminución relativa para los primeros. En el grupo control el promedio de este tipo de monocitos fue superior al 20%, mientras que fue inferior a este valor en los subgrupos diagnósticos $p=0.001$. Las diferencias se muestran en la **figura 10**

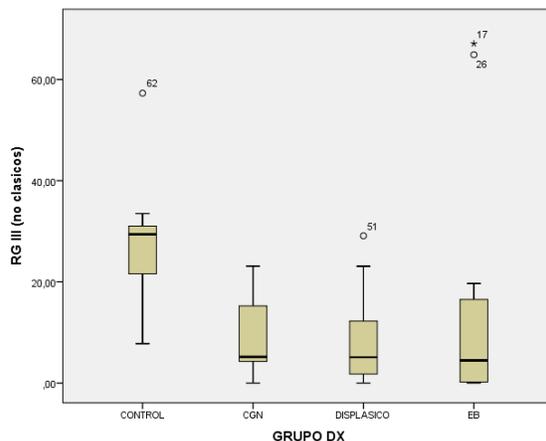


Figura 10 comportamiento de índices citométricos de expresión de antígenos de neutrófilo con respecto a grupo de controles: a. RG AsincNeuT (asincronismo madurativo, expresión de antígenos de inmadurez en neutrófilos maduros) con diferencias marcadas entre los neutrófilos del grupo LMA $p=0.032$ b. RG CD11b CV neuTo (heterogeneidad en la expresión de CD11b en neutrófilos totales), en este grupo se evidencia la diferencia de los pacientes con EB con respecto al control. Los puntos y número representan los pacientes con valores atípicos

Parámetros en precursores CD34+

Se observó que la cantidad relativa de precursores linfoides sobre el total de células CD34+ (RG pre linfo), tuvo diferencias observándose un valor superior en los pacientes control. Esta diferencia se observó en los grupos de SMD de más alto grado (multilínea, EB, LMA), el promedio de porcentaje de precursores en pacientes normales fue de 7.66%

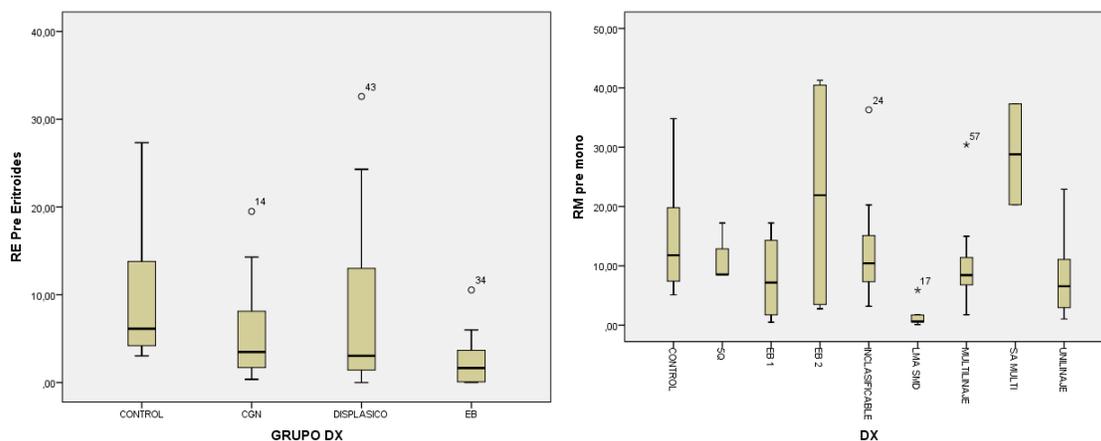
(RI 0.25-0.75 5.97%-8.70%) mientras que en el grupo de displasia multilínea fue de 1.83% (RI 0.85%-2.29%).

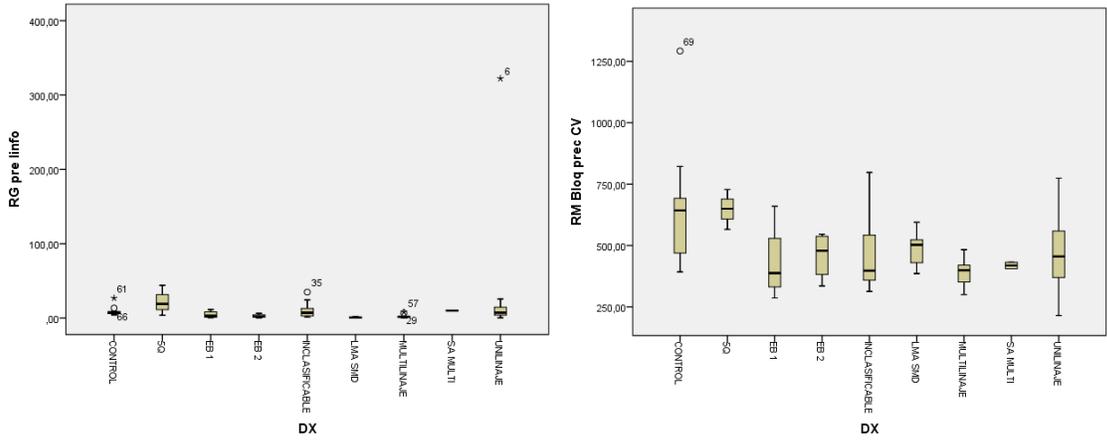
Un hallazgo similar al anterior se observó en la comparación con los SMD agrupados en el índice RM pre mono que evidencia el porcentaje de precursores de monocito (CD64, CD34+, HLADR+) presentó diferencias con respecto al grupo control siendo significativamente más bajas $p=0.01$ en el subgrupo de SMD multilínea **figura 11**.

Adicionalmente se observó mediante el índice RE Pre Eritroides que estos grupos de pacientes presentaban un porcentaje inferior de estos, a pesar del incremento de precursores eritroide totales con respecto a la celularidad total. Este hallazgo fue significativo para los pacientes del grupo de exceso de blastos a pesar de que en los otros grupos se observaba leve tendencia a la baja. El promedio de precursores eritroides en el grupo control fue de 6.14% (RI 4.2%-13.8%) mientras que en el grupo de exceso de blastos compuesto por EB y LMA fue de 1.65% (RI 0.08%-3.66%) **figura 11**.

En el índice RM Bloq prec CV, en donde se analiza la heterogeneidad en la expresión de antígenos como CD117, CD34 y HLADR y CD45 en precursores CD34+ medida a través de la suma de los coeficientes de variación de la expresión de cada una de estas proteínas, se observó que los pacientes con SMD de los grupos EB y displásicos, presentaron un patrón CV más bajo con respecto a los controles $p=0.36$, no se hallaron diferencias significativas en los grupos citogenéticos con del (5q), un ejemplo se muestra en la **figura 12**.

También se observó diferencias en los SMD agrupados en el índice RE CD71 Pre lyT que define la intensidad de expresión del CD71 en los precursores con relación a los linfocitos totales, esta diferencia se observó en el grupo de anomalías citogenéticas, pero no en los otros grupos. En el grupo control la expresión de este antígeno en los precursores CD34+ era en promedio 11.08 veces superior a los linfocitos (RI 7.28-16.6), por el contrario, en el grupo citogenético la expresión era en promedio 34.89 veces superior (RI 17.73-65.20)

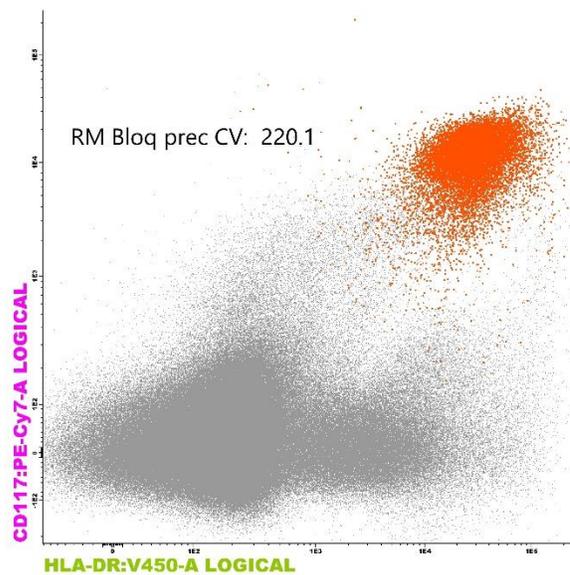
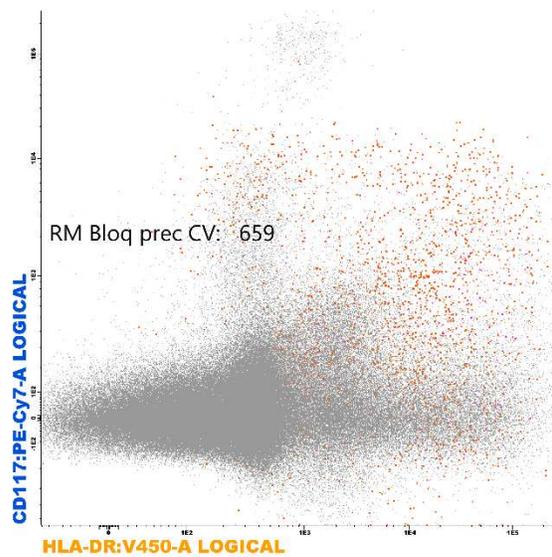




	RE Pre Eritroides	Percentil 25	Mediana	Percentil 75
DX	CONTROL	4.20	6.14	13.80
	5Q*	1.17	3.33	3.34
	EB 1	0.83	2.66	4.37
	EB 2	3.30	4.76	8.28
	Inclasificable*	1.71	4.28	9.58
	LMA relacionada a SMD	0.02	0.08	0.33
	Multilínea*	1.00	5.49	12.80
	Sideroblastos en anillo*	1.49	6.36	11.22
	Unilínea*	1.52	2.82	14.74

	RG pre linfo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75
DX	CONTROL	5.97	7.66	8.70
	5Q*	3.77	19.00	44.06
	EB 1	1.05	3.21	8.26
	EB 2	1.05	1.98	4.27
	Inclasificable*	2.69	7.14	15.30
	LMA relacionada a SMD	0.10	0.50	1.58
	Multilínea	0.85	1.83	2.29
	Sideroblastos en anillo*	9.51	9.94	10.36
	Unilínea*	3.78	5.72	14.30

Figura 11 comportamiento de índices citométricos de expresión de antígenos de precursores o valores relativos con respecto a grupo de controles: a. RE Pre Eritroide (porcentaje de precursores eritroides CD105+ en relación al total de precursores CD34+), nótese la disminución de este valor en el grupo de EB en relación al grupo control b. RM Pre Mono (porcentaje de precursores eritroides CD64+ en relación al total de precursores CD34+) c. RG Pre linfo (porcentaje de precursores linfoides CD10+ en relación al total de precursores CD34+) d. RM bloq prec CV (suma de coeficientes de variación de CD34, HLADR, CD117 en los precursores CD34+). e. tabla de análisis bivariado entre grupos dx para el índice RE Pre Eritroides ,con* grupos sin diferencias estadísticas con respecto al control . f. tabla de análisis bivariado entre grupos dx para el índice RG pre linfo , con* grupos sin diferencias estadísticas con respecto al control Los puntos y número representan los pacientes con valores atípicos



	RM Bloq prec CV	Percentil 25	Mediana	Percentil 75
DX	CONTROL	469.60	643.03	691.95
	5Q*	565.70	649.90	727.80
	EB 1	331.47	387.47	528.95
	EB 2	382.19	479.10	537.72
	Inclasificable	358.26	397.70	591.00
	LMA relacionada a SMD	429.90	503.05	523.20
	Multilínea	351.30	399.20	420.22
	Sideroblastos en anillo	405.90	418.96	432.01
	Unilínea	369.85	455.55	558.75

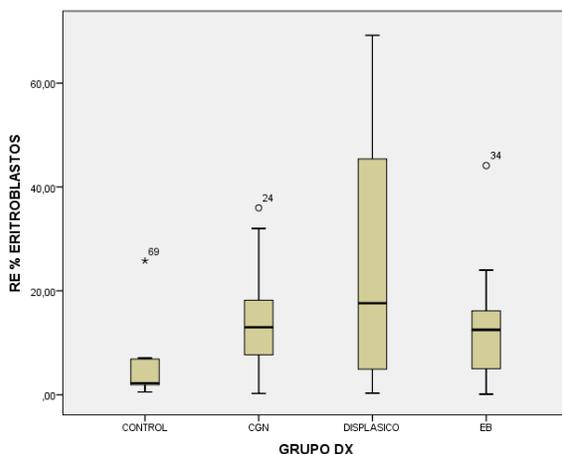
Figura 12. índice RM Bloq prec CV: heterogeneidad en la expresión de antígenos como CD117, CD34 y HLADR y CD45 en precursores CD34+ medida a través de la suma de los coeficientes de variación de la expresión de cada una de estas proteínas). A. paciente control en donde se observa la heterogeneidad en la expresión de HLA DR/CD117 en los precursores CD34+ y alto índice. B. paciente con SMD en donde se observa expresión homogénea de HLA DR/CD117 en los precursores CD34+ y bajo índice. C. tabla de análisis bivariado entre grupos dx para el índice RM Bloq prec CV, con* grupos sin diferencias estadísticas con respecto al control. En naranja precursores CD34+.

Parámetros en eritroblastos

En relación con la expresión de antígenos, se observó que en el grupo citogenético el índice RE AsincII Eri evidenciaba que los eritroblastos tardíos CD71+, CD36+, CD105+, presentaban mayor expresión de antígenos de células tempranas como HLADR, CD34 y CD117 en relación con los controles a modo de asincronismo madurativo. En el grupo control la expresión de dichos antígenos era en promedio 6.82 veces superior a los linfocitos (RI 2.90-10.60), por el contrario, el promedio en el grupo de EB era de 15.43 veces superior a los linfocitos (RI 10.93-112.65).

Los índices citométricos CD71CV y CD36CV presentaron diferencias con el grupo control para el grupo de displasia multilínea con significaciones estadísticas de $p=0.002$ y $p=0.003$. CD71CV mostró un promedio de CV de 95MFI (RI 72-131) para su grupo control mientras que en el grupo de displasia multilínea se observó un promedio de CV de 183 (RI 135-122). CD36CV mostró un promedio de CV de 108MFI (RI 76-152) para su grupo control mientras que en el grupo de displasia multilínea se observó un promedio de CV de 198 (RI 154-232).

Así mismo se observó que el porcentaje de eritroblastos en relación con la celularidad total fue mayor en todos los grupos diagnósticos con una diferencia más marcada entre los grupos displásicos y con EB. El promedio de eritroblastos en el grupo control fue de 2.25% (RI 1.92%-6.86%) mientras que en el grupo de displásicos fue de 17.63% (RI 4.93%-45.40%) **figura 13.**



RE % ERITROBLASTOS	Percentil 25	Mediana	Percentil 75
	25		75

GRUPO DX	CONTROL	1.92	2.25	6.86
	Grupo citogenético*	7.69	12.98	18.20
	grupo displásico	4.93	17.63	45.40
	grupo exceso de blastos	5.00	12.50	16.14

Figura 13 A. Porcentaje de eritroblastos en pacientes y grupo control: *Nótese el incremento en el valor para los subgrupos diagnósticos con respecto al grupo control. B. tabla de análisis bivariado entre grupos dx para el índice RE % ERITROBLASTOS, con* grupos sin diferencias estadísticas con respecto al control_Los puntos y número representan los pacientes con valores atípicos*

El restante de índices citométricos no tuvo una diferencia significativa con el grupo de controles en la comparación de medianas a través del test de kruskal wallis. Los resultados se muestran en la **tabla 8**.

Tabla 8. Significancias estadísticas de los índices citométricos evaluados con $P > 0.05$

ÍNDICE	Chi-cuadrado	gl	Sig. asintót.	ÍNDICE	Chi-cuadrado	gl	Sig. asintót.
RG Asinc NeuT	1.169	3	.761	RM CD45 Pre lyT	5.969	3	.113
RG CD16 CV NeuTo	2.917	3	.405	RM Asinc prec	3.315	3	.346
RG CD45 NeuV lyt	2.665	3	.446	RM SSC Prec Lyb	6.133	3	.105
RG CD11b NeuV lyT	2.405	3	.493	RM pre mono	6.766	3	.080
RG CD16 NeuV lyT	3.494	3	.322	RE CD33 baso	1.679	3	.642
RG CD10 NeuV lyT	6.636	3	.084	RE CD33 monT lyT	3.404	3	.333
RG CD13 NeuV lyT	3.761	3	.288	RE CD36 monT lyT	3.741	3	.291
RM Infid Neut	3.333	3	.343	RE FSC Erit LyB (cambio megaloblástico)	1.663	3	.645
RM CD64 NeuV lyt	.380	3	.944	RE SSC Erit LyB (lobul)	1.350	3	.717
RM FSC NeuV B	6.240	3	.101	RM CD45 NeuV lyt	2.716	3	.438
RM Asinc Mon	.954	3	.812	RE Asinc Eri	5.614	3	.132
RM AsincII Mon	6.896	3	.075	RE AsincII Eri	5.247	3	.155
RM CD14 Mon lyT	1.053	3	.788	RE Cam meg term	5.074	3	.166
RM HLA Mon lyT	3.300	3	.348	RE CD45 Pre lyT	1.377	3	.711
RM CD35 Mon lyT	1.697	3	.638	RE Bloq prec CV	3.819	3	.282

RM CD34 Mon lyT	1.165	3	.761	RE SSC Prec Lyb	2.457	3	.483
RM SSC Mon lyB	7.711	3	.052	RE CD33 Pre lyT	4.892	3	.180
RM FSC Mon lyB	5.241	3	.155	RE CD105 Pre lyT	2.563	3	.464

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: DX

DISCUSIÓN

La evaluación estándar de médula ósea en el estudio de SMD incluye mielograma, biopsia, coloración de hierro y cariotipo para la correcta clasificación de acuerdo al subtipo descritos por la OMS y su estimación de pronóstico³⁶. Sin embargo, muchos pacientes que tienen resultados de morfología o de hierro no concluyentes y un cariotipo normal no se les pueden descartar un SMD²¹. Es en estos casos es donde la CF se describe como capaz de identificar características displásicas y por lo tanto, tener valor en la evaluación diagnóstica en estos pacientes; sin embargo muchos de los hallazgos reportados como anormales están prestos a la subjetividad de operadores expertos lo que le quita reproducibilidad a esta herramienta, de allí la necesidad de estudios que estandaricen este hallazgo²⁴. Se han logrado grandes avances en la estandarización de instrumentos, tanto así que las medidas de una población puedan ser reproducidos intra e inter laboratorio, incluso entre tres marcas de instrumentos distintas³⁷.

En este estudio se evidenció que los hallazgos en los pacientes y pruebas convencionales en el algoritmo diagnóstico de SMD fueron similares a lo reportado en la literatura como el grupo etario de los pacientes con SMD fue similar a la reportada por la OMS en su última clasificación donde la edad promedio fue de 70 años⁹. En cuanto a la incidencia se encontró que fue más frecuente en mujeres y como reportó Elnahass Y et al. El SMD con del 5q fue más común en mujeres que en hombres⁴. Si bien la clasificación de la OMS 2016 reportó que el SMD que más se presenta en la población es el SMD multilínea, en este estudio predominó el SMD unilínea³⁶. Según lo publicado por Jiménez S.³⁸ la citopenia más frecuente es la anemia, al igual que en esta investigación, donde el 47.5% de los pacientes la presentaron.

Los cambios morfológicos hallados son los reportados en la literatura, por ejemplo, Shaver A et al en su estudio realizado en 2017 enfatizo que en la granulopoyesis los cambios más típicos se presentaban en la lobulación como la hipolobulación, así mismo; manifestó que en la línea megacariocítica hay megacariocitos de menor tamaño, hipolobulados o con lóbulos separados. En el linaje eritroide los cambios más significativos eran la multinuclearidad, alteración en el contorno nuclear, la cariorrexis, el asincronismo madurativo y anormalidad en la condensación cromática³⁹; coincidiendo con los hallazgos de este estudio, donde adicionalmente los cambios macrocíticos fueron los más frecuentes. Es necesario resaltar que los hallazgos no nucleares son pocos específicos ya que pueden manifestarse en otras patologías como en las anemias por

deficiencias de vitamina B12 o ácido fólico, por tanto, siempre hay que soportarlos con otros cambios morfológicos concluyentes de displasia⁴⁰. Los resultados obtenidos en la biopsia demostraron que la hiperplasia es el hallazgo más frecuente, el desarreglo topográfico de las poblaciones en médula ósea en los SMD y la fibrosis medular que fue también similar lo reportado por otros Nieto en su publicación⁴¹, Si bien allí lo reportado es que la citomorfopatología de los megacariocitos es preferible ser analizada en biopsia, en esta investigación se evidenció que se obtuvo mayor anomalía en el mielograma, posiblemente por el uso rutinario de regletas que permiten detectar con mayor objetividad la presencia de formas pequeñas.

Las alteraciones citogenéticas obtenidas en este estudio fueron del 52.5%, estos resultados fueron similares a los reportados por Elnahass y colaboradores quienes documentaban una frecuencia del 46% y por Haase quien reportó 52.3%^{4,42}. En contraste ellos encontraron que las anomalías más frecuentes fueron la del 5q, del o pérdida del 7q, la trisomía 8 y la nulisomía Y, mientras que el hallazgo más frecuente en esta investigación fue el cariotipo complejo (>3 alteraciones genéticas).

Similar a lo reportado por los consensos en el estudio inmunofenotípico para SMD¹⁸, en este estudio se pudo observar que la serie granulocítica presentó alteraciones en los patrones de maduración CD13/CD11b, CD13/CD16 a modo de asincronismo o bloqueo madurativo, también se evidenció que hubo expresión de antígenos linfoides como el CD56 (células NK) en precursores inmaduros de la línea mieloide, que se asocian con progresión de la enfermedad, por ser un marcador de infidelidad. En cuanto a las alteraciones fenotípicas de la serie eritroide, se presentó expresión heterogénea de CD36 (patrón de maduración) negativo, similar a lo reportado por Mathis en su investigación de 2013⁴³.

En la comparación de los blastos, se encontró que a medida que aumenta el porcentaje de blastos contados por mielograma aumenta el porcentaje de precursores CD34 en citometría de flujo, con una correlación positiva y significativa a pesar de que se presenta un mayor número de blastos a través de morfología, este hallazgo ya ha sido reportado por Sandes en 2013 en donde su recuento promedio de blastos por morfología era de $4.5 \pm 4.8\%$ mientras que por CF era del $2.7 \pm 2.8\%$ ⁴⁴, de allí que este método siga siendo recomendado para el recuento de blastos y clasificación de SMD debido a que en los recuentos por citometría de flujo se puede presentar dilución con sangre periférica secundaria al proceso quirúrgico^{45,46}. El mismo hallazgo se presentó al comparar el recuento de eritroblastos por medio de las dos técnicas en donde fue mayor en el mielograma, Western en su publicación de 2017 en su estudio multicéntrico observó que había incremento de estas células por CF en pacientes con SMD y que había correlación entre los recuentos por CF de la cohorte de estudio y la cohorte de validación, sin embargo, encontraron diferencias entre los recuentos de varios centros de diagnóstico ya que el tipo de lisis utilizada puede perder algunos eritroblastos disminuyendo falsamente su valor⁴⁷. Es de resaltar que este recuento es inferior en el panel de eritroblastos al comparar con el panel de monocito y neutrófilo, el cual es más específico por tener marcadores específicos para dicha población, eliminando células falsas positivas que se

ubiquen en la región de eritroblastos y sean contadas falsamente como ellos, como las plaquetas. Es por lo anterior que se sugiere que el recuento diferencial que sea reportado sea a partir de dicho panel.

Índices citométricos en línea granulocítica

Los índices citométricos más ampliamente utilizados han sido los descritos en Ogata en su publicación de 2008⁴⁸ y acorde a esta publicación se encontró que dos de los índices citométricos explorados (SSC y cantidad de precursores linfoides B) tenían hallazgos anormales en los grupos de pacientes con SMD: Estos hallazgos fueron la evaluación de “granularidad” por medio de citometría de flujo a través del análisis de la complejidad interna celular o SSC mediante el uso del índice SSC NeuTo Ly, dado por la división de la complejidad de neutrófilos totales vs linfocitos totales. Hallazgo que en el estudio morfológico es dependiente de una buena coloración que evite falsos negativos y del recuento de pocas células, a menudo en cien neutrófilos^{26,49}. Con este índice se puede evitar este problema ya que se puede tomar como control los linfocitos, células que tienen mínima cantidad de gránulos y hace de este criterio altamente específico al tener un punto de referencia válido y contar un número muy superior de células. En este estudio se evidencia que evaluar este parámetro es útil para detectar baja “granularidad” en los neutrófilos sea maduros o formas tempranas y que el hallazgo fue consistente en todos los paneles evaluados, incluso si su control de linfocitos fueron linfocitos B o totales. En el estudio de Ogata un valor inferior a 6 era considerado patológico, en el nuestro el percentil 25 del control era de 6.23 por lo que valores inferiores a este podrían considerarse altamente sospechosos de hipo granularidad. Es necesario aclarar que en el estudio de Ogata se utilizaba el pico máximo de SSC de neutrófilos contra el pico máximo de SSC de linfocitos y no medianas como en el nuestro, de igual forma los hallazgos fueron significativos. Aunque se obtuvieron valores de sensibilidad y valor predictivo negativo adecuados al comparar con datos morfológicos, es necesario hacer la comparación con series más grandes de datos; Ogata y Reis Alves en sus estudios no compararon este dato con lo morfológico.

El otro hallazgo similar al reportado por Ogata fue la proporción de precursores linfoides (CD10+, SSC bajo) con respecto a la totalidad de precursores CD34+ en donde se encontró que su valor fue inferior para los pacientes con SMD, usualmente inferior al 5%. En el presente estudio este hallazgo solo fue significativo para el grupo de SMD multilínea y los SMD con EB mientras que en el estudio de Ogata⁴⁸ solo se utilizaron SMD de bajo riesgo (sin EB) por lo que los resultados son diferentes ya que se encontraron en SMD de riesgos diferentes, por el contrario en el estudio de Reis Alves⁵⁰ se observó que era más marcado el decremento de esta población en SMD de alto riesgo (Con EB) similar a nuestro estudio. Es necesario tener en cuenta que Reis Alves advierte que se tiene que tener cuidado al interpretar este hallazgo debido a que en pacientes mayores a 55 años la disminución puede ser más marcada independiente del subtipo de SMD debido al decremento de hematogonias propio de este grupo etario por el envejecimiento inmune⁵⁰. También se observó, disminución de precursores de líneas celulares al evaluar la cantidad de eritroblastos y monoblastos CD34+ con respecto al total de células CD34+, lo

que puede explicarse debido al incremento de mieloblastos con diferenciación a línea neutrófilo lo que disminuye su valor relativo, hallazgo similar a lo observado por Reis en donde 8 de los 12 pacientes evaluados presentaron este incremento, también se puede explicar por la hipótesis planteada de que en la disfunción de los progenitores hematopoyéticos se pierden la capacidad de producir otras líneas celulares^{50,51}.

A diferencia del estudio reportado por Ogata y Satoh no se encontraron diferencias con el grupo control al comparar la expresión de CD45 de los precursores CD34+ con respecto a los controles, hallazgo similar al descrito por Reis quien no encontró diferencias para este antígeno⁵⁰. Sin embargo, es necesario resaltar que ellos en su estudio para este índice no utilizaron linfocitos como control negativo de expresión antigénica sino controles de isotipo^{48,52}.

Un hallazgo llamativo fue que los neutrófilos del grupo con alteraciones citogenéticas tuvieron un tamaño mayor medido por citometría y a través del índice RG FSC NeuV, hallazgo que es susceptible de confirmar con una cohorte de validación ya que los pacientes de este estudio solo fueron 15 pacientes. No se encontraron publicaciones que utilizaran esta parámetro como evaluación de displasia citométrica, solo morfológica; en donde se describe que los hallazgos macrocíticos han sido reportados como comunes en SMD, principalmente en formas intermedias tipo metamielocitos, pero pueden ser vistos en condiciones reactivas⁴⁰.

El enfoque más utilizado para evaluar la displasia mielóide mediante CF es el análisis de reconocimiento de patrones, el cual se basa en una evaluación cualitativa de la desviación del patrón de expresión de antígenos en SMD con respecto pacientes control como en el caso de la evaluación de curvas madurativas de tipo CD13/CD11b⁵³.

Es común encontrar que la población de neutrófilos presenta un desplazamiento a la izquierda con incremento de formas tempranas y disminución de formas maduras lo que disminuye su valor relativo y que también es llamado bloqueo o freno madurativo, visto como una desviación a la izquierda de la maduración y en el caso de la CF como una población de neutrófilos más homogénea y débil para CD16 y CD11b^{11,54}. Con respecto a esto Alhan reportó que la sub-expresión de CD11b en neutrófilos maduros CD16+ en pacientes con SMD, corresponde a formas terminales maduras y apoptóticas que al evaluarlos en una curva de maduración en conjunto con CD13, se visualizan como formas tempranas a nivel de mielocito/metamielocito lo que puede sesgar la caracterización, este hallazgo ha sido catalogado como de los más importantes en la línea neutrófilo de SMD⁵⁵. Es necesario resaltar que el freno madurativo o desviación se puede presentar en otras alteraciones como infecciones, deficiencia de cobre o lupus eritematoso sistémico⁴⁰.

Es allí cuando el índices citométrico RG Bloq Gran, hacen de esta evaluación más objetiva al dar un valor numérico a esta percepción visual como en este estudio donde un valor alto para este índice indica un freno madurativo o desviación a la izquierda, en donde los controles presentaban valores en promedio de 1.28, a diferencia del grupo con EB que presentaba valores en promedio de 4.26. Reis Alves aunque no utilizó índice pero si una descripción de freno madurativo, no obtuvo diferencias significativas entre

pacientes y controles, sin embargo se puede explicar porque utilizó pacientes reactivos como control y el 21% presentaron este hallazgo a diferencia del 46% de los pacientes con EB⁵⁶. En este estudio no se tuvieron en cuenta los neutrófilos terminales CD10+ debido a que en el momento del aspirado puede incrementarse su número debido a contaminación con sangre periférica⁵⁷.

Otro índice que busca interpretar frenos madurativos es RG CD11b CV ya que interpreta la heterogeneidad de la expresión de CD11b en neutrófilos, así en un escenario de retraso madurativo, será más homogénea la visualización de esta expresión y, por lo tanto, tendrá un valor inferior de CV. En este estudio se observó como los pacientes con SMD tipo EB tenían disminución en este valor y al comparar el índice por la percepción visual de los evaluadores en la prueba de CF se evidenció que había buena correlación y especificidad. Esta expresión a modo de índice ha sido utilizada por Ogata en su estudio de 2006 pero solo fue utilizada en precursores y no en neutrófilos, encontrando diferencias significativas con respecto a sus controles⁵², una evaluación similar pero en eritroblastos fue utilizada por Mathis quien encontró que la visualización heterogénea en la expresión de CD71 se relacionaba con un CV alto, superior a 136 en los pacientes con SMD⁴³.

Índices citométricos en precursores CD34+

De forma normal los precursores CD34+ disminuyen la intensidad en la expresión de CD117, CD34 y HLADR y CD45 lo que se visualiza como una población homogénea, hallazgo que se ha utilizado para asignar características de displasia por CF al interpretarlo como disminución en la expresión de estas proteínas^{18,58}. Acorde a esto un hallazgo adicional de bloqueo madurativo fue el RM Bloq prec CV, en donde se analiza la heterogeneidad en la expresión de antígenos como en precursores CD34, hallazgo que puede ser medido mediante un bajo coeficiente de variación para la intensidad de población de dichos antígenos de forma objetiva y numérica.

Así mismo en casos de SMD con displasia y con EB se observó expresión homogénea, con CV bajo, algo que ya había sido reportado pero no de forma numérica sino subjetiva⁴⁴. Ogata en su estudio de 2006 hizo una aproximación a este hallazgo con el CD117, sin embargo, midió la sobre expresión de dicha proteína mediante la comparación de la MFI de los precursores y controles de isotipo y no su expresión homogénea con CV y obtuvo sobre expresión por su método en el 33% de los pacientes.

El asincronismo madurativo es un hallazgo morfológico frecuente⁴⁰ y está dada por la expresión de proteínas que no corresponden con el estadio madurativo en el que se encuentra la células, así es inusual que los neutrófilos maduros expresen antígenos propios de células inmaduras como HLADR, CD117 o CD34, aunque el HLADR se puede presentar en neutrófilos en algunos estadios inflamatorios⁵⁹. Este criterio ha sido utilizado por los consensos de diagnóstico de mielodisplasia como criterio citométrico anormal^{18,60}, sin embargo tiene el inconveniente de ser subjetivo, al no tener valores estándar para definir desde cuando se define como expresión positiva o débil aunque autores como Reis Alves definen en su trabajo expresiones superiores al 10 o 20% de las células evaluadas de forma arbitraria como valor anormal⁵⁰, o como expresó Alhan, un log superior al valor

de expresión normal o negativa⁴⁴. El índice RG Asinc NeuT indica que hay pacientes con sobre expresión de estos marcadores, aunque estas diferencias solo se evidenciaron entre los grupos control y las LMA secundarias a mielodisplasia, sugiriendo que el asincronismo madurativo antigénico es más probable en desórdenes avanzados y útil para diferenciar desde que punto y de forma objetiva se está expresado un antígeno en una célula madura como el neutrófilo.

De forma similar en linaje eritroide se presenta asincronismo madurativo al evidenciarse que los eritroblastos tardíos presentaban mayor expresión de antígenos de células tempranas como HLADR, CD34 y CD117 a través del índice RE AsinII Eri la cual evidenció expresiones nueve veces en promedio más altas que el grupo control. Otro caso de asincronismo madurativo fue la expresión anormalmente alta de del CD71 en los precursores y documentada con el índice RE CD71 Pre IyT, en donde la expresión fue en promedio 33 veces superior al control, sin embargo, es necesario resaltar que estos hallazgos solo se dan en subgrupos específicos, en este caso en nuestro grupo con alteraciones citogenéticas, lo que puede ser explicado por la alta heterogeneidad de dicho grupo. Estos hallazgos no son reportados por los dos consensos de uso de CF en SMD que se han llevado hasta la fecha^{18,34,61}.

Índices citométricos en línea monocítica

Con respecto a los monocitos, normalmente se pueden distinguir tres tipos de formas; CD14+/CD16- (clásicos), CD14/CD16+ (int) y CD14low/CD16+ (no clásico o activados). En este estudio se evidenció que los monocitos con expresión de CD 16 (no clásicos e intermedios) en pacientes con SMD presentaron un valor inferior con respecto a los controles que presentaban un valor superior al 20%, hallazgo similar al reportado por Selimoglu y col. Quienes reportaron que en comparación con donantes sanos y pacientes con monocitosis reactiva, los pacientes con LMMC mostraron un aumento en la fracción de monocitos clásicos (CD14+/CD16 -)^{11,62}. Lo anterior sugiere que en algunos de estos pacientes hay disminución de células activadas.

Índices citométricos en línea eritroide

Similar a lo reportado por Mathis, se observó como la expresión de CD71 y CD36 es heterogénea al medirla por su alto coeficiente de variación, y como este tipo de mediciones pueden ser útiles para hacer cuantitativo este parámetro, en este trabajo la medición tuvo una diferencia significativa en grupos con displasia multilínea y EB, la razón de que no se presente en otros grupos se puede explicar por qué la displasia se puede presentar en otras línea diferentes a la eritroide⁶³, en el estudio descrito solo se comparó con grupos de bajo riesgo (sin EB) con diferencias significativas en donde el Ods Ratio para CD36 con respecto al grupo control fue de 3.7 y de 3.2 para CD71, sin embargo, es necesario tener en cuenta que en el estudio de Mathis se procesó la muestra sin lisante, lo que lleva a pensar que a pesar del método utilizado el índice es útil para la detección de displasia eritroide. La variación en la expresión del CD71 (receptor de transferrina) se puede explicar por qué las células eritroides en SMD presentan un fenotipo con sobrecarga de hierro caracterizado por un mayor contenido de ferritina y por lo tanto un receptor de transferrina reducido (CD71)²². La disminución de precursores eritroides

evidenciado por su disminución relativa con respecto a precursores totales pudiera explicar un mecanismo adicional a la anemia por destrucción de células displásicas en medula e influenciado por activación de genes proapoptóticos⁶⁴.

CONCLUSIONES Y EXPECTATIVAS

Si bien la CF se ha propuesto como una técnica útil para el apoyo diagnóstico en SMD, la falta de estandarización en interpretación de patrones ha limitado su uso de forma conclusiva, haciéndola cada vez más dependiente de operadores expertos. El uso de índices citométricos es una forma de hacer numérica las mediciones de modo tal que sean más fáciles de interpretar y que mitiguen la subjetividad propia de la interpretación de patrones visuales haciendo más rápido y preciso en análisis y, por lo tanto, más costo efectivo que los enfoques actuales al acelerar el periodo de oportunidad.

En este trabajo se exploraron diversos índices citométricos que pudieran resolver este problema y se detectan varios que pueden ser potenciales candidatos para ser utilizados en la rutina de análisis, sea a través de la incorporación a los software citométricos o para el uso de los analistas. Se observa como los usos de CV en algunos de ellos son reproducibles con trabajos realizados previamente, adicional al uso del cálculo de índices citométricos basados en SSC para la detección de características físicas de neutrófilos o el conteo de poblaciones particulares, como los precursores B.

Los índices citométricos se perfilan como indicadores sensibles de dismielopoyesis, sin embargo, es necesaria una validación futura de estos hallazgos con cohortes más grandes de pacientes y controles para calcular rangos de referencia y así realizar un gran estudio multicéntrico para determinar la reproducibilidad de estos resultados y probar la variabilidad entre diferentes laboratorios y operadores. También es necesario resaltar que estos índices solo son aplicables para los anticuerpos y clonas evaluadas, así como solo es aplicable en el equipo BD Facs Canto II. Estudios posteriores se deben llevar a cabo con otras plataformas para confirmar su reproducibilidad.

REFERENCIAS

1. Ogata K, Sei K, Saft L, et al. Revising flow cytometric mini-panel for diagnosing low-grade myelodysplastic syndromes: Introducing a parameter quantifying CD33 expression on CD34+ cells. *Leuk Res.* 2018;71:75-81. doi:10.1016/J.LEUKRES.2018.07.009
2. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 2016;127(20):2391-2405. doi:10.1182/blood-2016-03-643544
3. Kornblihtt L, Arbeide CJA. Síndromes Mielodisplásicos : Aspectos epidemiológicos. *Hematología.* 2010;14(3):79-85.
4. Elnahass Y, Youssif L. Cytogenetic features in primary myelodysplastic syndrome Egyptian patients. *J Adv Res.* 2018;10:77-83. doi:10.1016/j.jare.2018.02.002
5. Moreno Segura Claudia Marcela. Análisis De Situación De Salud Colombia 2017. Ministerio De Salud Y Protección Social. <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/ED/PSP/asis-nacional->

- 2017.pdf. Published 2017. Accessed September 1, 2019.
6. Mora GE, Espinosa D, Casas C, Abello V, Solano MH. Caracterización clínica de los pacientes con síndrome mielodisplásico. *Acta Médica Colomb.* 2016;41(1):36-41. http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=163145717008%0Ahttp://www.scielo.org/co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-24482016000100008&lang=pt.
 7. Sternberg A, Killick S, Littlewood T, et al. Evidence for reduced B-cell progenitors in early (low-risk) myelodysplastic syndrome. *Blood.* 2005;106(9):2982-2991. doi:10.1182/blood-2005-04-1543
 8. Valent P, Orazi A, Steensma DP, et al. Proposed minimal diagnostic criteria for myelodysplastic syndromes (MDS) and potential pre-MDS conditions. *Oncotarget.* 2017. doi:10.18632/oncotarget.19008
 9. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. *The 2016 Revision of the World Health Organization (WHO) Classification of Lymphoid Neoplasms.*; 2016. doi:10.1182/blood-2016-01-643569
 10. Westers TM, van der Velden VHJ, Alhan C, et al. Implementation of flow cytometry in the diagnostic work-up of myelodysplastic syndromes in a multicenter approach: report from the Dutch Working Party on Flow Cytometry in MDS. *Leuk Res.* 2012;36(4):422-430. doi:10.1016/j.leukres.2011.09.015
 11. Duetz C, Westers TM, Van De Loosdrecht AA. Clinical Implication of Multi-Parameter Flow Cytometry in Myelodysplastic Syndromes. *Pathobiology.* 2019;86(1):14-23. doi:10.1159/000490727
 12. Wimazal F, Fonatsch C, Thalhammer R, et al. Idiopathic cytopenia of undetermined significance (ICUS) versus low risk MDS: the diagnostic interface. *Leuk Res.* 2007;31(11):1461-1468. doi:10.1016/j.leukres.2007.03.015
 13. Cazzola M. Flow cytometry immunophenotyping for diagnosis of myelodysplastic syndrome. *Haematologica.* 2009;94(8):1041-1043. doi:10.3324/haematol.2009.007682
 14. Westers TM, Alhan C, Cali C, et al. Validation Of a Multi-Diagnostic Approach Including Flow Cytometry To Identify Specific Risk Categories Within Low and Intermediate-1 Risk Myelodysplastic Syndromes Within a Prospective Clinical Trial: A Study On Behalf Of The HOVON89 Study Group. Cremers EMP, ed. *Blood.* 2013;122(21):1521 LP - 1521. <http://www.bloodjournal.org/content/122/21/1521.abstract>.
 15. Cremers EMP, Westers TM, Alhan C, et al. Multiparameter flow cytometry is instrumental to distinguish myelodysplastic syndromes from non-neoplastic cytopenias. *Eur J Cancer.* 2016;54:49-56. doi:10.1016/j.ejca.2015.11.013
 16. Della Porta MG, Picone C, Giovanni M, Porta D. Diagnostic Utility of Flow Cytometry in Myelodysplastic Syndromes. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2017;9(1):e2017017. doi:10.4084/mjhjhid.2017.017
 17. Westers TM, Ireland R, Kern W, et al. Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: a report from an international consortium and the European LeukemiaNet Working Group. *Leukemia.* 2012;26(7):1730-1741. doi:10.1038/leu.2012.30
 18. Porwit A, van de Loosdrecht AA, Bettelheim P, et al. Revisiting guidelines for integration of flow cytometry results in the WHO classification of myelodysplastic syndromes - Proposal from the International/European LeukemiaNet Working Group for Flow Cytometry in MDS. *Leukemia.* 2014;28(9):1793-1798. doi:10.1038/leu.2014.191
 19. Della Porta MG, Picone C, Pascutto C, et al. Multicenter validation of a reproducible flow cytometric score for the diagnosis of low-grade myelodysplastic syndromes: Results of a European LeukemiaNET study. *Haematologica.* 2012;97(8):1209-1217. doi:10.3324/haematol.2011.048421
 20. Porwit a, van de Loosdrecht a a, Bettelheim P, et al. Revisiting guidelines for integration of flow cytometry results in the WHO classification of myelodysplastic syndromes-proposal from the International/European LeukemiaNet Working Group for Flow Cytometry in MDS. *Leukemia.* 2014;(June):1793-1798. doi:10.1038/leu.2014.191
 21. Della Porta M, Picone C. Diagnostic Utility of Flow Cytometry in Myelodysplastic Syndromes. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2017;9(1):e2017017. doi:10.4084/mjhjhid.2017.017
 22. Della Porta MG, Lanza F, Del Vecchio L. Flow cytometry immunophenotyping for the evaluation of bone marrow dysplasia. *Cytometry B Clin Cytom.* 2011;80(4):201-211. doi:10.1002/cyto.b.20607
 23. Verigou E, Kolliopoulou G, Smirni N, et al. Hesk Ratio: A Complementary Tool for the Diagnosis of Myelodysplastic Syndromes and a Novel Method for Flow Cytometry Analysis. *Blood.* 2012;120(21).

- <http://www.bloodjournal.org/content/120/21/4946?sso-checked=true>. Accessed February 18, 2019.
24. Verigou E, Lampropoulou P, Smyrni N, et al. Evaluation of a Bone Marrow Dysmyelopoiesis Immunophenotypic Index for the Diagnosis and Prognosis of Myelodysplastic Syndromes. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*. 2015;15(2):4946 LP - 4946. doi:10.2174/1871529X15666150701105822
 25. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-2406. doi:10.1182/blood-2016-03-643544
 26. Lee S-HHS-HS-HH, Erber WN, Porwit a., Tomonaga M, Peterson LC, Lee S-HHS-HS-HH. ICSH guidelines for the standardization of bone marrow specimens and reports. *Int J Lab Hematol*. 2008;30(5):349-364. doi:10.1111/j.1751-553X.2008.01100.x
 27. International Standing Committee on Human Cytogenomic Nomenclature, McGowan-Jordan J, Simons A, Schmid M (Michael). *ISCN: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2016)*.
 28. Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VHJ, et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia*. 2012;26(9):1986-2010. doi:10.1038/leu.2012.122
 29. Lorand-Metze I, Blanco A, Colado E, et al. Flow Cytometry diagnosis in Myelodysplastic Syndrome. Current Practice in Latin America and comparison with other regions of the world. *Leuk Res*. January 2019. doi:10.1016/j.leukres.2019.01.009
 30. Jjm VD, Lhermitte L, Böttcher S, et al. Composition of EuroFlow panels and technical information on reagents Updated in Version 1 . 5 • Inclusion of MM MRD panel (page 15) • Inclusion of BCP-ALL MRD panel (page 16) • New titer of Cy / Smlg λ -APCC750 (present in PCD , BCP-ALL and MM-MRD pa. 2017;5(January):1-16.
 31. Flores-montero J. Detailed EuroFlow Standard Operating Procedures (SOPs) for sample preparation and staining.
 32. Lecrevisse Q, Martin-Ayuso M, Brüggemann M, et al. Lot-to-lot stability of antibody reagents for flow cytometry. *J Immunol Methods*. 2017. doi:10.1016/j.jim.2017.03.018
 33. Loken MR, van de Loosdrecht A, Ogata K, Orfao A, Wells DA. Flow cytometry in myelodysplastic syndromes: Report from a working conference. *Leuk Res*. 2008;32(1):5-17. doi:10.1016/j.leukres.2007.04.020
 34. van de Loosdrecht AA, Alhan C, Bene MC, et al. Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: report from the first European LeukemiaNet working conference on flow cytometry in myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2009;94(8):1124-1134. doi:10.3324/haematol.2009.005801
 35. van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*. 2012;26(9):1908-1975. doi:10.1038/leu.2012.120
 36. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016;127(20):2375-2390. doi:10.1182/blood-2016-01-643569
 37. Nováková M, Glier H, Brdičková N, et al. How to make usage of the standardized EuroFlow 8-color protocols possible for instruments of different manufacturers. *Journal of Immunological Methods*. 2017.
 38. Jimenez SI. Síndrome mielodisplásico un reto en medicina clínica-hematología. *Acta Médica Colomb*. 2016;41(1):16-18.
 39. Shaver AC, Seegmiller AC. Nuances of Morphology in Myelodysplastic Diseases in the Age of Molecular Diagnostics. *Curr Hematol Malig Rep*. 2017;12(5):448-454. doi:10.1007/s11899-017-0405-y
 40. Olcay L, Yetgin S, Aoshima H. Disorders Mimicking Myelodysplastic Syndrome and Difficulties in its Diagnosis. *Myelodysplastic Syndr*. September 2016. doi:10.5772/64422
 41. Nieto LH, María J, Sánchez R, Álvarez H, Cabrera A-. Biopsia de la médula ósea Perspectiva clínico-patológica. 2017:268. <https://www.sehh.es/servicios-para-los-socios/447->

- documentos/manuales/122794-biopsia-de-la-medula-osea-perspectiva-clinico-patologica-2-edicion-actualizada-2017. Accessed September 1, 2019.
42. Haase D, Germing U, Schanz J, et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes : evidence from a core dataset of 2124 patients. 2015;110(13):4385-4396. doi:10.1182/blood-2007-03-082404.The
 43. Mathis S, Chapuis N, Debord C, et al. Flow cytometric detection of dyserythropoiesis: a sensitive and powerful diagnostic tool for myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2013;27(10):1981-1987. doi:10.1038/leu.2013.178
 44. Alhan C, Westers TM, Cremers EMP, Cali C, Ossenkoppele GJ, van de Loosdrecht AA. Application of Flow Cytometry for Myelodysplastic Syndromes: Pitfalls and Technical Considerations. *Cytom Part B - Clin Cytom*. 2015;00(April):358-367. doi:10.1002/cyto.b.21333
 45. Sandes AF, Kerbauy DMBB, Matarraz S, et al. Combined flow cytometric assessment of CD45, HLA-DR, CD34, and CD117 expression is a useful approach for reliable quantification of blast cells in myelodysplastic syndromes. *Cytom Part B - Clin Cytom*. 2013;84 B(3):157-166. doi:10.1002/cyto.b.21087
 46. Loken MR, Chu S-C, Fritschle W, Kalnoski M, Wells DA. Normalization of bone marrow aspirates for hemodilution in flow cytometric analyses. *Cytometry B Clin Cytom*. 2009;76(1):27-36. doi:10.1002/cyto.b.20429
 47. Cremers EMP, Westers TM, Alhan C, et al. Implementation of erythroid lineage analysis by flow cytometry in diagnostic models for myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2017;102(2):320-326. doi:10.3324/haematol.2016.147843
 48. Satoh C, Dan K, Yamashita T, Jo R, Tamura H, Ogata K. Flow cytometric parameters with little interexaminer variability for diagnosing low-grade myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*. 2008;32(5):699-707. doi:10.1016/j.leukres.2007.08.022
 49. Florensa L, Recio M. Club Español de Citología Hematológica: reflexiones en el diagnóstico de los síndromes mielodisplásicos. Valoración de las distintas mielodisplásicos. Valoración de las distintas clasificaciones. *Haematologica*. 2003;88(Supl.6):261-284. <http://www.elsevier.es/es-revista-haematologica-49-articulo-club-espanol-citologia-hematologica-reflexiones-13053705> ER. Accessed June 10, 2015.
 50. Reis-alves SC, Traina F, Metze K, Lorand-metze I. Improving the differential diagnosis between myelodysplastic syndromes and reactive peripheral cytopenias by multiparametric flow cytometry: The role of B-cell precursors. *Diagn Pathol*. 2015;10(1):1-9. doi:10.1186/s13000-015-0259-3
 51. Ribeiro E, Matarraz Sudón S, de Santiago M, et al. Maturation-associated immunophenotypic abnormalities in bone marrow B-lymphocytes in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*. 2006;30(1):9-16. doi:10.1016/j.leukres.2005.05.019
 52. Ogata K, Kishikawa Y, Satoh C, Tamura H, Dan K, Hayashi A. Diagnostic application of flow cytometric characteristics of CD34+ cells in low-grade myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2006;108(3):1037-1044. doi:10.1182/blood-2005-12-4916
 53. Kern W, Haferlach C, Schnittger S, Haferlach T. Clinical Utility of Multiparameter Flow Cytometry in the Diagnosis of 1013 Patients With Suspected Myelodysplastic Syndrome. *Cancer*. 2010;116(19):4549-4563. doi:10.1002/cncr.25353
 54. Vikentiou M, Psarra K, Kapsimali V, et al. Distinct neutrophil subpopulations phenotype by flow cytometry in myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma*. 2009;50(3):401-409. doi:10.1080/10428190902755497.
 55. Alhan C, Westers T, Cali C, Ossenkoppele G, van de Loosdrecht A. P037 Apoptotic CD11bdimCD16pos neutrophil subpopulation represents a pitfall in pattern recognition of neutrophil differentiation by flow cytometry in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*. 2009;33(SUPPL. 1):S79-S80. doi:10.1016/S0145-2126(09)70117-1
 56. Reis-Alves SC, Traina F, Saad ST, Metze K, Lorand-Metze I. The impact of several phenotypic features at diagnosis on survival of patients with myelodysplastic syndromes. *Neoplasma*. 2010;57(6):530-536.
 57. Aldawood AM, Kinkade Z, Rosado FG, Esan OA, Gibson LF, Vos JA. A Novel Method to Assess Bone Marrow Purity is Useful in Determining Blast Percentage by Flow Cytometry in Acute Myeloid

- Leukemia and Myelodysplasia. *Ann Hematol Oncol.* 2015;2(5). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26203464>. Accessed February 14, 2019.
58. Della Porta MG, Picone C, Giovanni M, Porta D. Diagnostic Utility of Flow Cytometry in Myelodysplastic Syndromes. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2017;9(91):e2017017. doi:10.4084/mjhid.2017.017
59. Vono M, Lin A, Norrby-Teglund A, Koup RA, Liang F, Loré K. Neutrophils acquire the capacity for antigen presentation to memory CD4+ T cells in vitro and ex vivo. *Blood.* 2017;129(14):1991-2001. doi:10.1182/blood-2016-10-744441
60. Westers TM, Kern W, Ireland R, et al. P-051 Flow cytometry in myelodysplastic syndromes: A report from an international consortium and the European LeukemiaNet Working Group. *Leuk Res.* 2013;37:S45. doi:10.1016/S0145-2126(13)70100-0
61. Westers TM, van der Velden VHJ, Alhan C, et al. Implementation of flow cytometry in the diagnostic work-up of myelodysplastic syndromes in a multicenter approach: report from the Dutch Working Party on Flow Cytometry in MDS. *Leuk Res.* 2012;36(4):422-430. doi:10.1016/j.leukres.2011.09.015
62. Selimoglu-Buet D, Wagner-Ballon O, Saada V, et al. Characteristic repartition of monocyte subsets as a diagnostic signature of chronic myelomonocytic leukemia. *Blood.* 2016;125(23):3618-3627. doi:10.1182/blood-2015-01-620781.The
63. Mathis S, Chapuis N, Debord C, et al. Flow cytometric detection of dyserythropoiesis: a sensitive and powerful diagnostic tool for myelodysplastic syndromes. *Leukemia.* 2013;27(10):1981-1987. doi:10.1038/leu.2013.178
64. Sperling AS, Gibson CJ, Ebert BL. The genetics of myelodysplastic syndrome: From clonal haematopoiesis to secondary leukaemia. *Nat Rev Cancer.* 2017. doi:10.1038/nrc.2016.112