

Inmunofenotipificación Celular: Leucemias y Linfomas por Citometría de Flujo

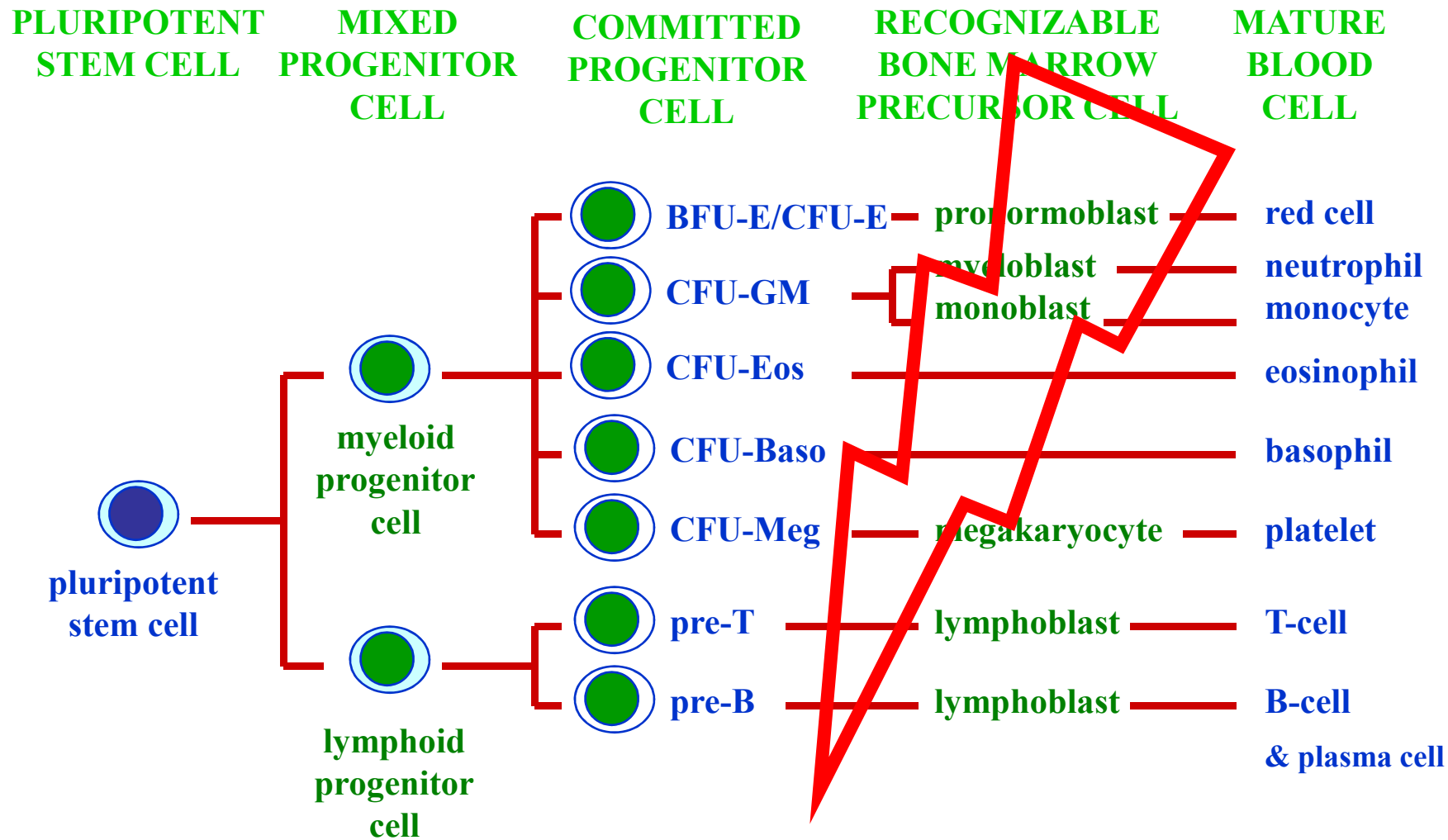
*Juan Luis Castillo N., T.M. MsC
Laboratorio de Citometría de Flujo
Hospital del Trabajador Concepción.
Departamento de Especialidades Médicas
Facultad de Medicina
Universidad de Concepción*



INMUNOFENOTIPIFICACION DE LEUCEMIAS

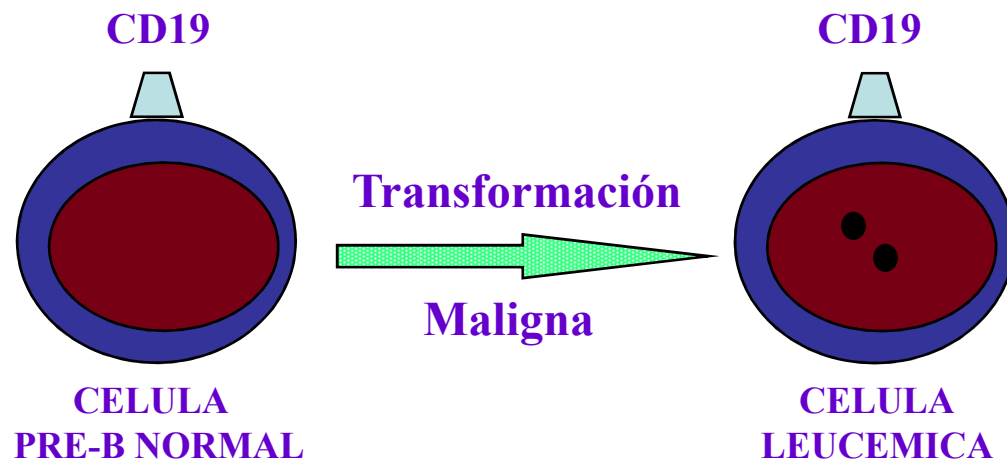
“Los distintos tipos de leucemias son un grupo heterogéneo de patologías resultantes de una proliferación descontrolada de una o más tipos celulares hematopoyéticos tanto en médula ósea como sangre periférica”

Hematopoiesis

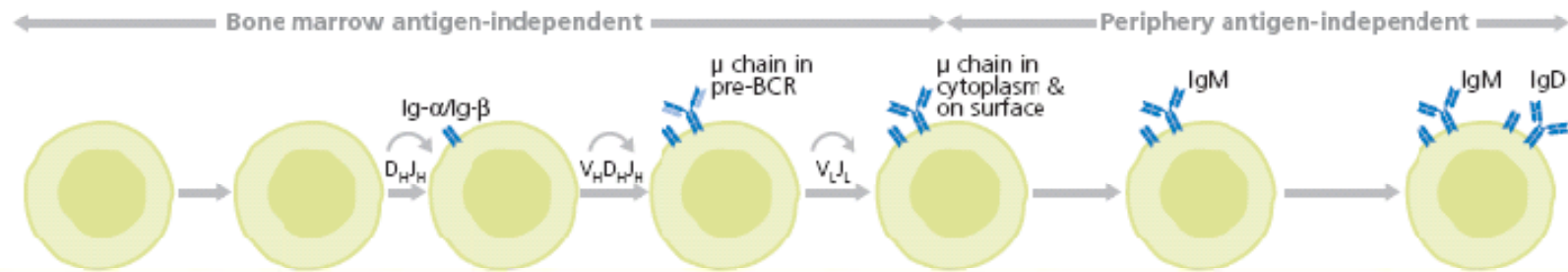


RETENCION DE ANTIGENOS

Células malignas frecuentemente conservan antígenos asociados con la célula normal a partir de la cual fueron derivados



Stages in B Cell Development



	HEMATOPOIETIC STEM CELL	EARLY PRO-B CELL	LATE PRO-B CELL	LARGE PRE-B CELL	SMALL PRE-B CELL	IMMATURE B CELL	MATURE B CELL
H chain genes	Germline	D-J joining	V-DJ joining	VDJ rearranged	VDJ rearranged	VDJ rearranged	VDJ rearranged
L chain genes	Germline	Germline	Germline	Germline	V-J joining	VJ rearranged	VJ rearranged
Ig expression	None	None	None	μ chain in pre-B receptor	μ chain in cytoplasm	Membrane IgM and on surface	Membrane IgM and IgD
RAG, TdT expression	No	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No
Membrane markers		CD24	CD19	CD19	CD19	CD19	CD19
			CD24	CD24	CD24	CD24	CD21
				CD25	CD25		CD22
	CD34	CD34					CD23
			CD40	CD40	CD40	CD40	CD24
	CD43	CD43	CD43	CD43	CD43	CD40	CD40
		CD45R/3220	CD45R/B220	CD45R/3220	CD45R/B220	CD45R/B220	CD45R/B220
	CD117	CD117	CD117	CD117	CD117		
		CD127	CD127	CD127	CD127		
		CD179a	CD179a	CD179a			
		CD179b	CD179b	CD179b			
	Early B lineage	Early B lineage	Early B lineage	Early B lineage	Early B lineage	Early B lineage	
		MHC Class II	ly-51	ly-51	ly-51	MHC Class II	MHC Class II
			MHC Class II	MHC Class II	MHC Class II	MHC Class II	
				Pre-BCR	Pre-BCR		

CLASIFICACION INMUNOFENOTIPICA (LA)

•LLA-B :

- BI-pro B: CD79a y/o CD22 Y/o CD19.
- BII Común : CD10.
- BIII Pre B: clg.
- BIV Madura : slg

•LLA-T :

- TI-proT: CD7
- TII-pre T: CD2 y/o CD5 y/o CD8
- TIII-Cortical: CD1a
- IIV-Madura: CD1a y CD3mb

•LMA :

- LMA-M6 : glicoforina A
- LMA-M7 : CD61, CD41, CD42b
- LMA-M3 : HLA-DR(-)
- LMA-M4 : HLA-DR(+)

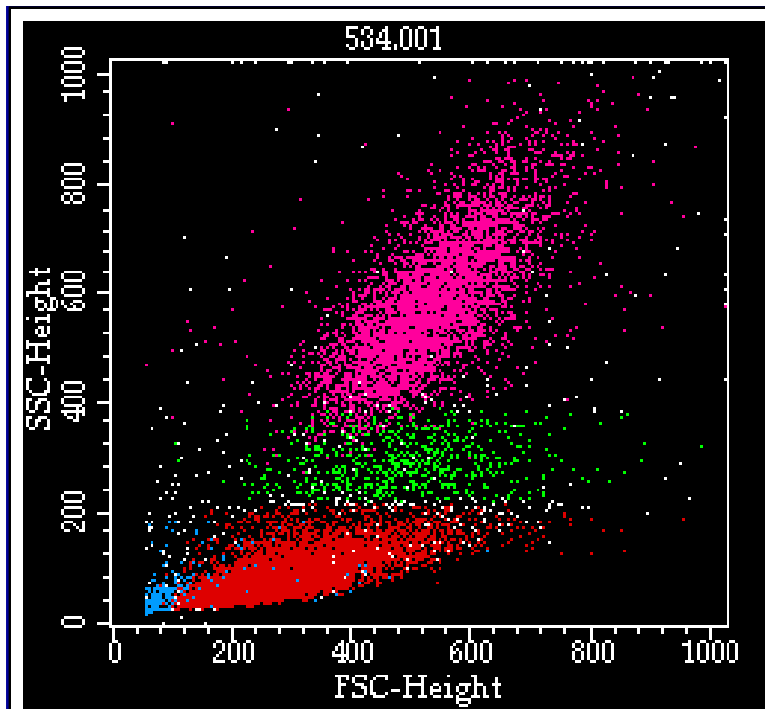
Leucemias Agudas: Definición de Linaje y Grado de Madurez.

Propósito	LLA-B	LLA-T	LMA
Definir linaje	CD19 CD20 CD79α CD22	CD3c CD3m CD7 CD2	CD13 CD33 MPO
Definir grado de madurez	CD34 CD117 TdT CD10(CALLA) Ig cit. Ig sup.	CD34 CD117 TdT CD10(CALLA) CD1a	CD34 HLA-DR CD15

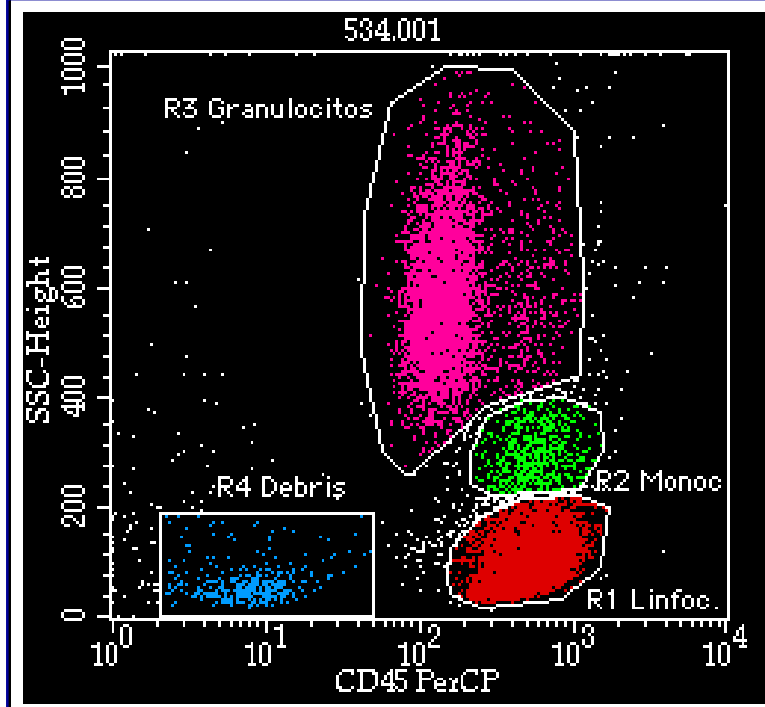
INMUNOFENOTIPO DE LEUCEMIAS

Aplicaciones

- **Evaluación de linfocitosis de etiología no determinada.**
- **Identificar desordenes linfoproliferativos crónicos de células T y B.**
- **Diferenciar entre leucemia linfoblástica y leucemia mieloblástica.**
- **Subtipificar inmunológicamente leucemias agudas.**



- **Paciente sexo femenino**
- **45 años**
- **Sangre periférica**
- **Compromiso general severo**
- **Falla hepática**



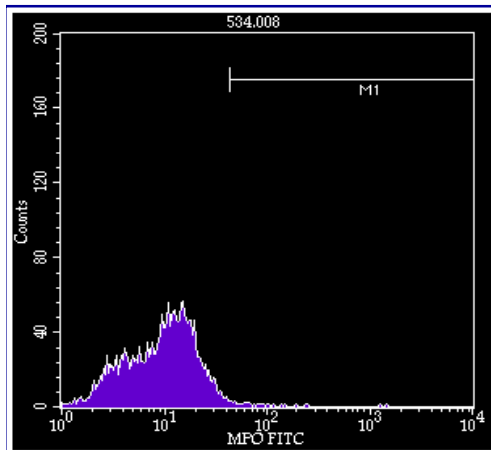
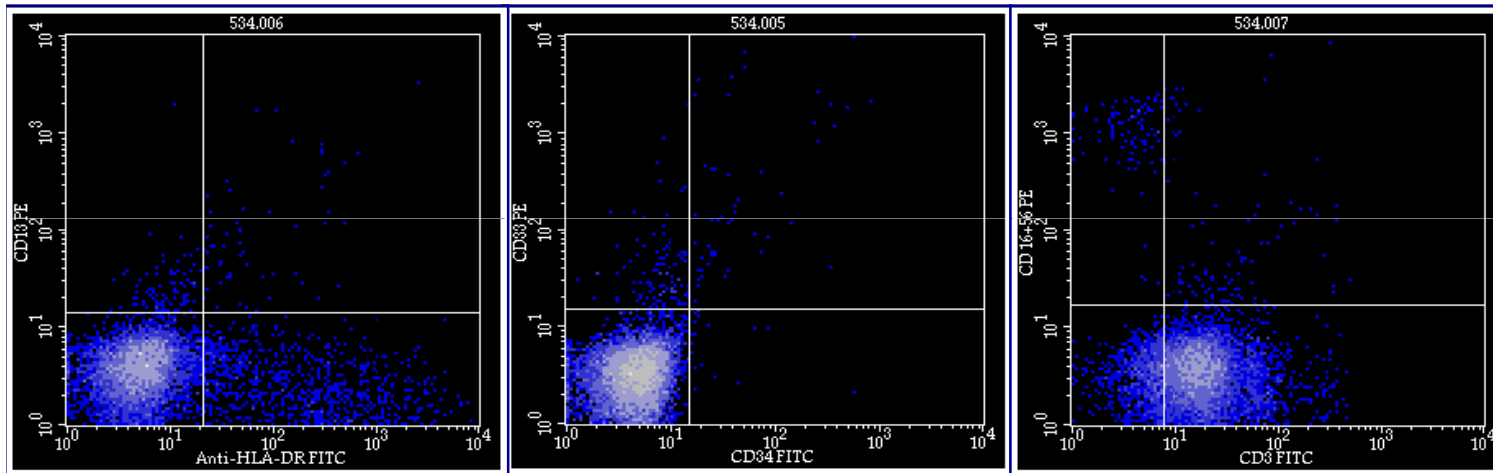
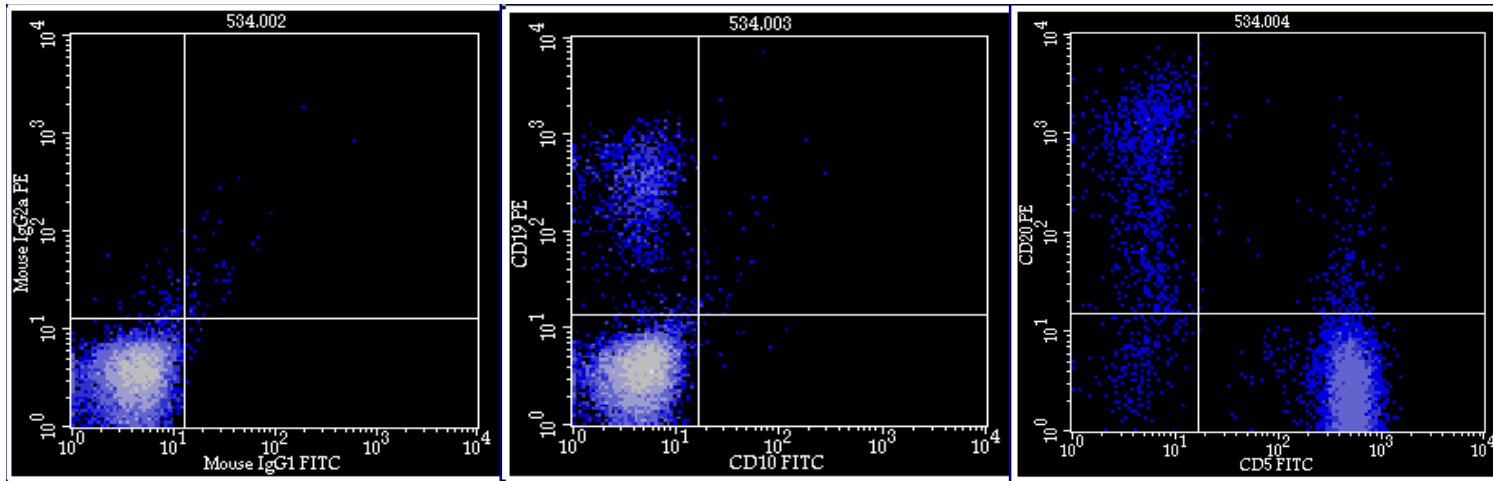
File: 534.001

Sample ID: SANGRE PERIFERICA

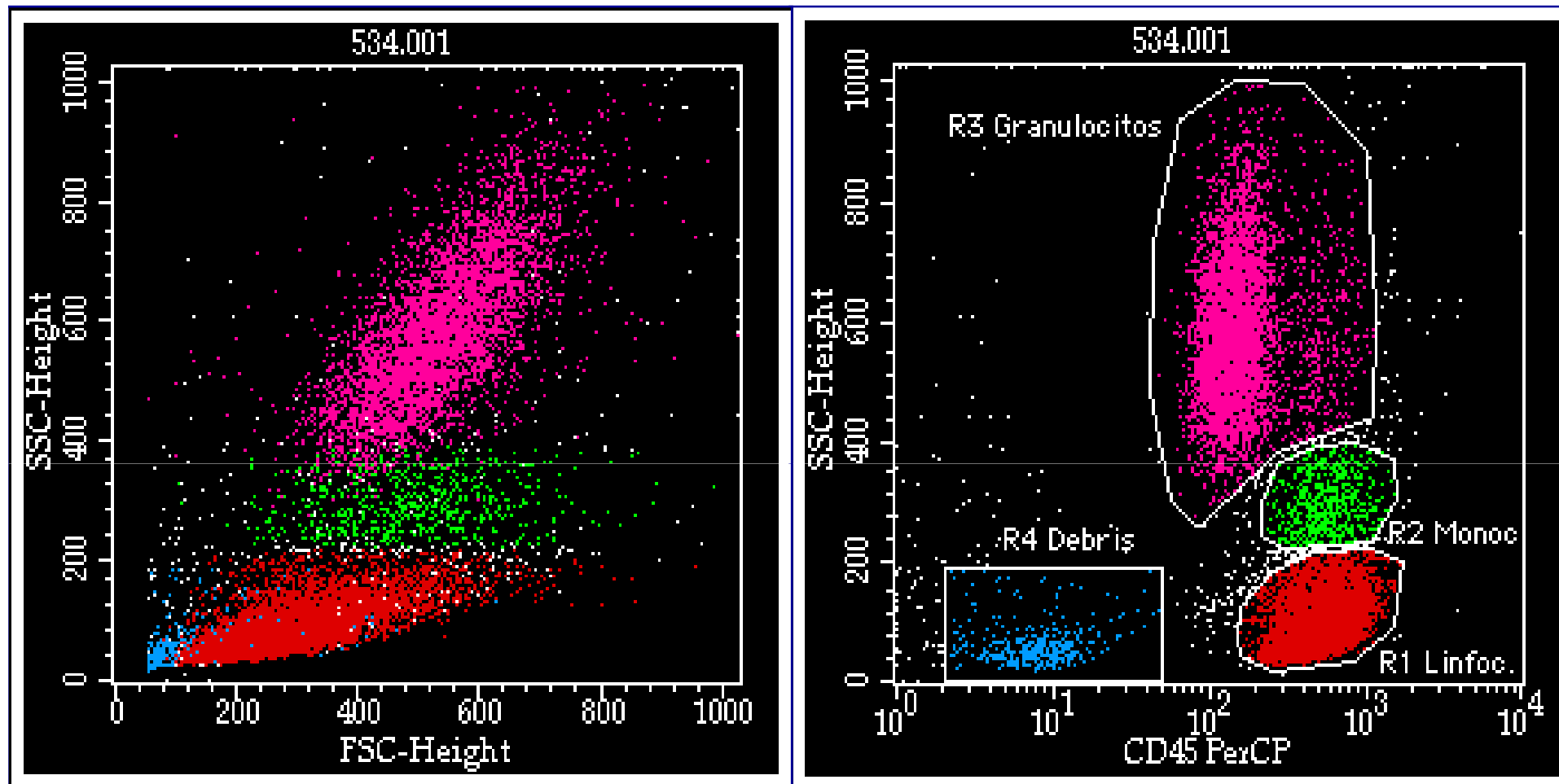
Acquisition Date: 26-Mar-01

Total Events: 15000

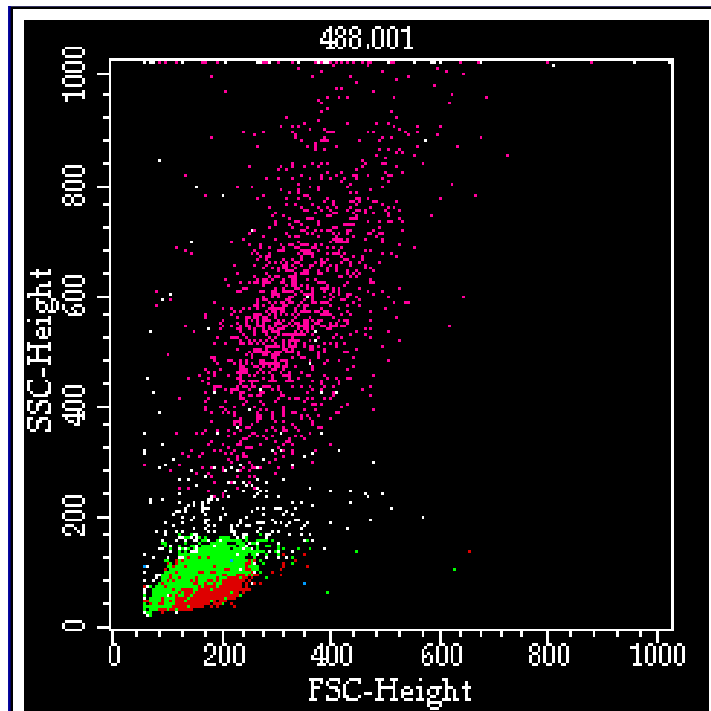
Region	Events	% Gated
R1 Linfoc.	8727	58.18
R2 Monoc.	611	4.07
R3 Granulocitos	4835	32.23
R4 Debris	382	2.55



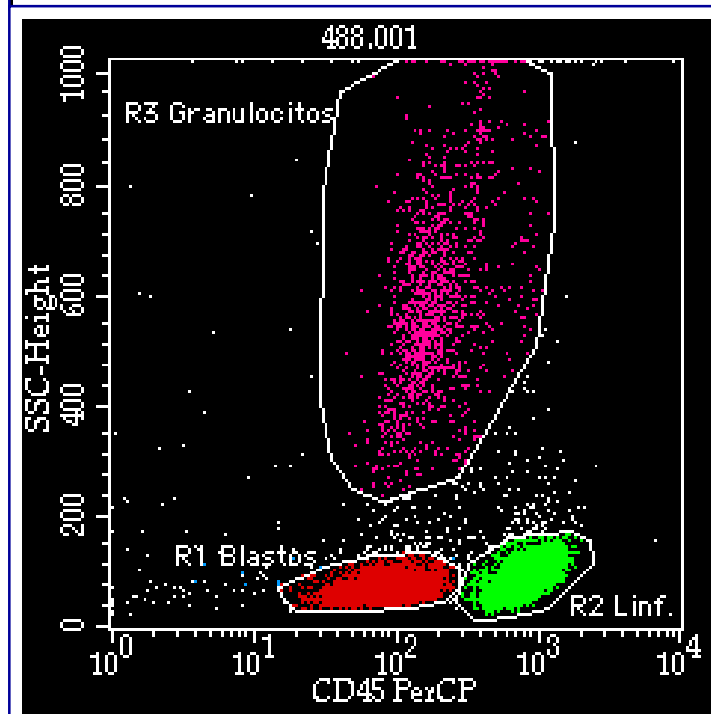
- **Inmunofenotipo normal**
- **Paciente fallece**



Características normales



- **Paciente sexo masculino**
- **43 años**
- **Dgto. Leucemia Aguda**



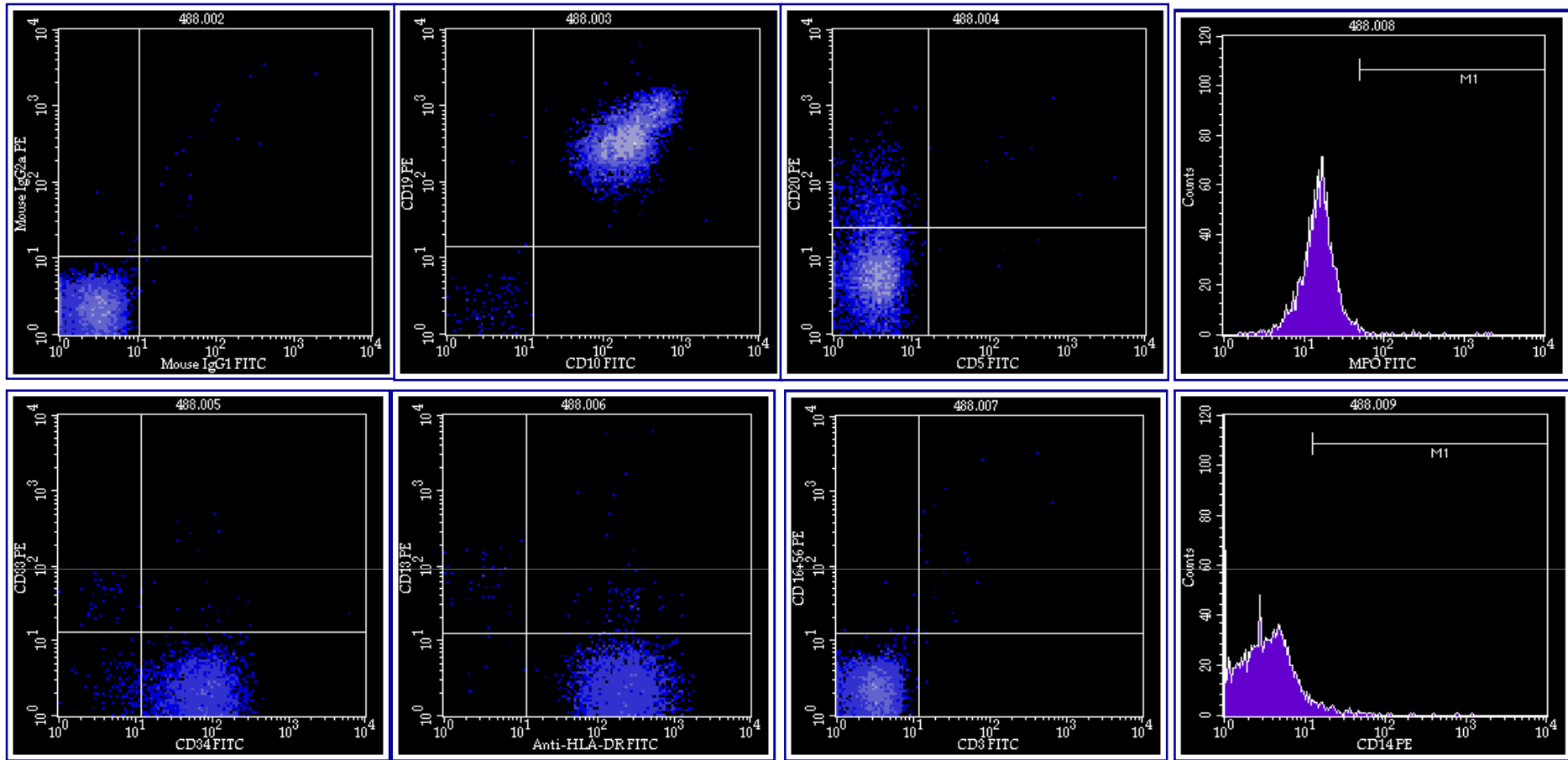
File: 488.001

Sample ID: SANGRE PERIFERICA

Acquisition Date: 27-Nov-00

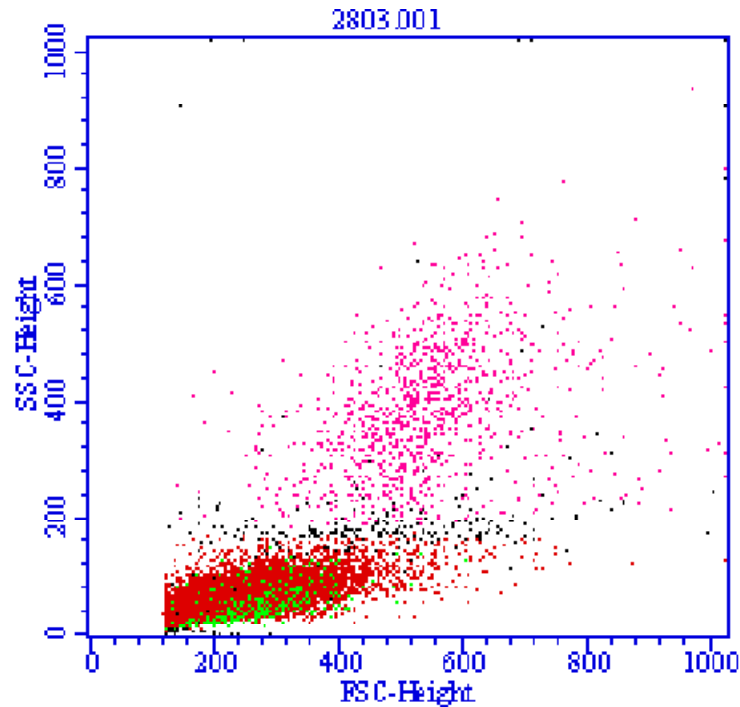
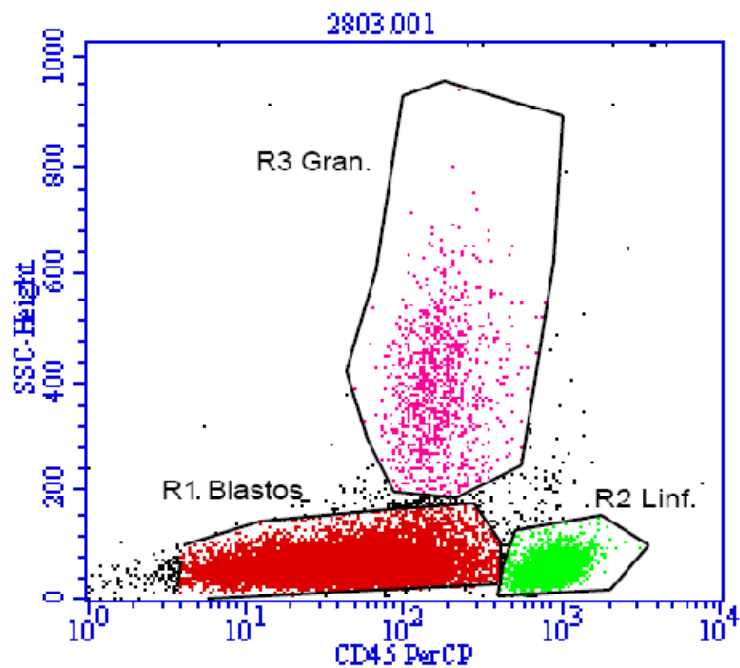
Total Events: 15000

Region	Events	% Gated
R1 Blastos	5823	38.82
R2 Linf.	7379	49.19
R3 Granulocitos	1421	9.47



Positivo	Negativo	Positivo Débil
CD10	CD5	CD20
CD19	CD33	
CD34	CD13	
HLA-DR	CD3	
	CD16+56	
	MPO	
	CD14	

**Leucemia Linfoblástica
De Línea B (B-II: Común)**



- **Médula ósea**
- **Sexo femenino**
- **18 años**

File: 2803.001

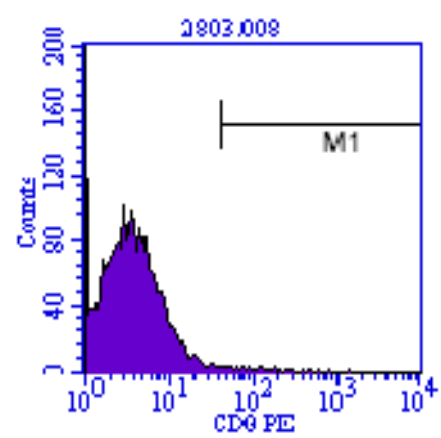
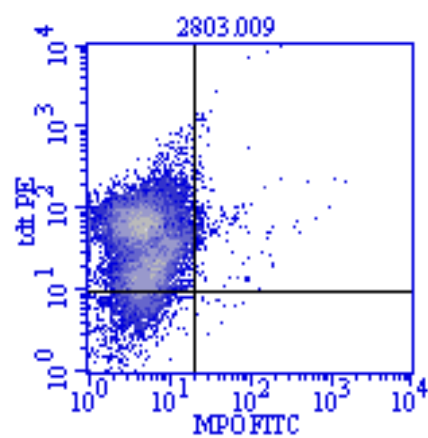
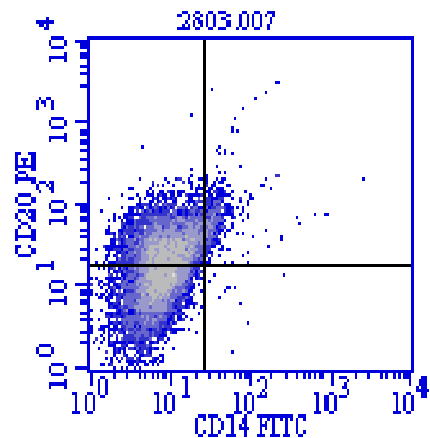
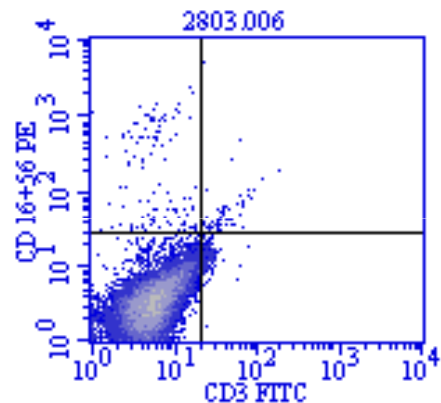
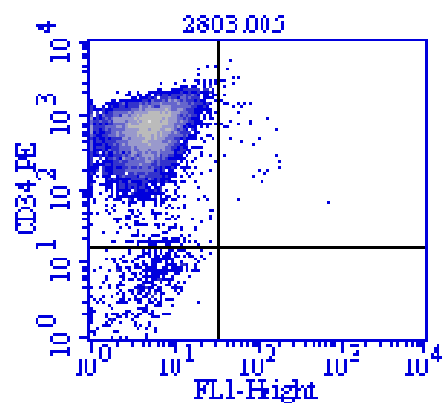
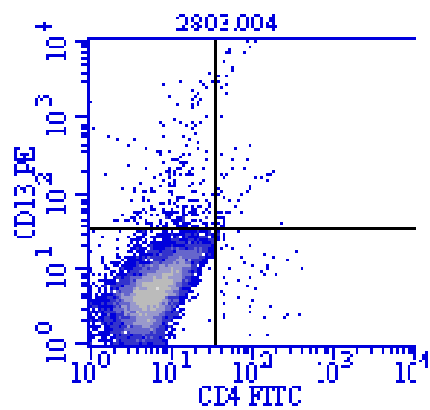
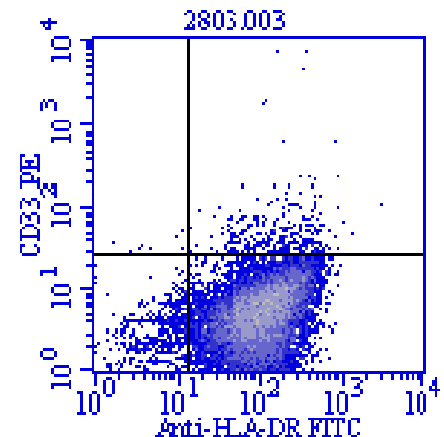
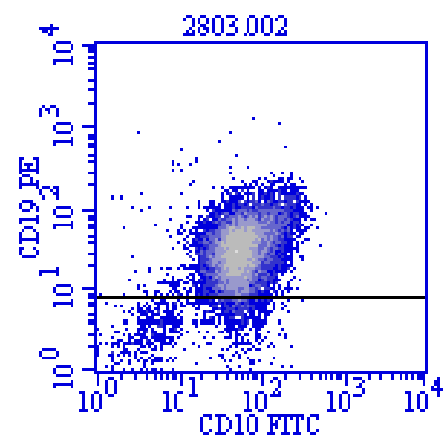
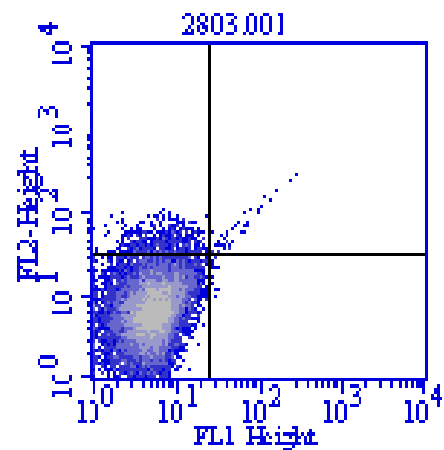
Sample ID: MEDULA OSEA

Patient ID:

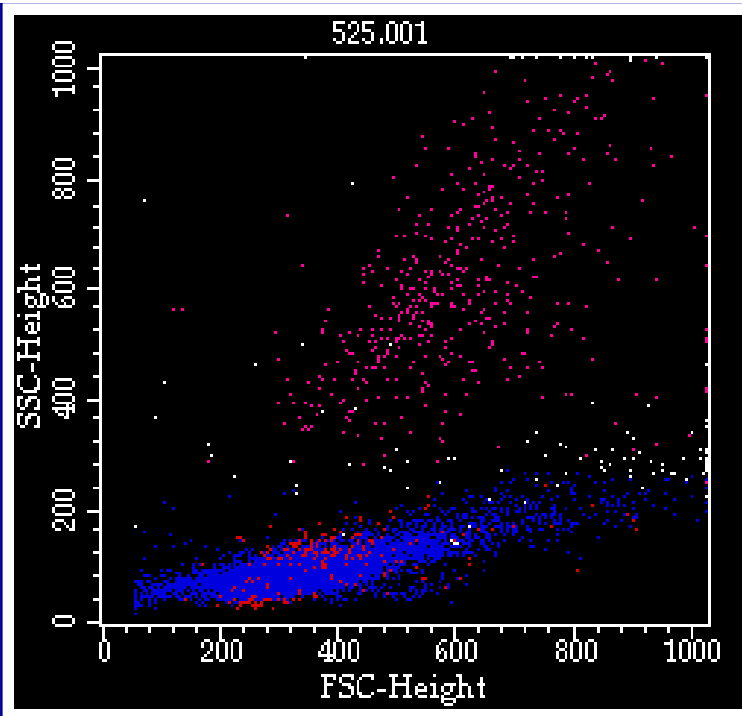
Acquisition Date: 29-Aug-06

Total Events: 20000

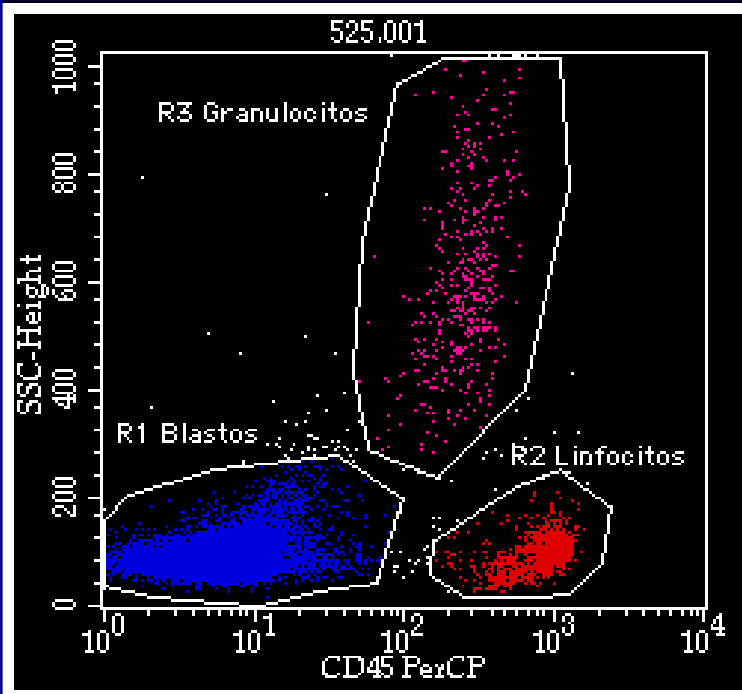
Region	Events	% Gated
R1 Blastos	16043	80.22
R2 Linf.	2582	12.91
R3 Gran.	997	4.98



LLA-B (BIII- pre B)

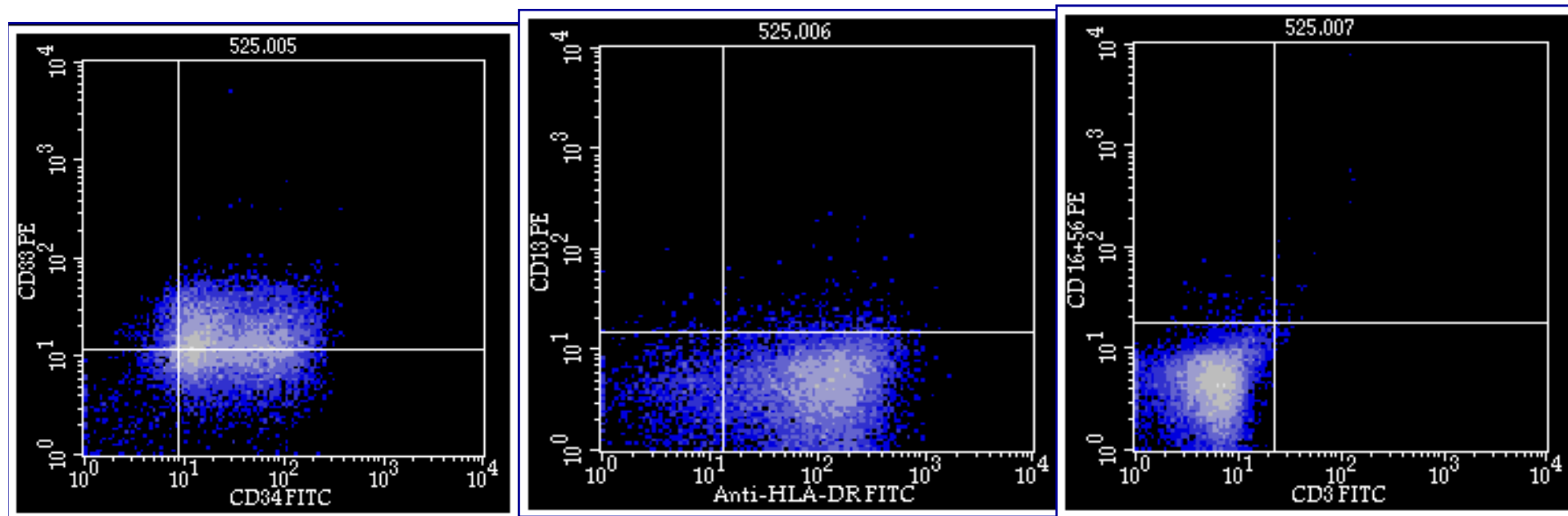
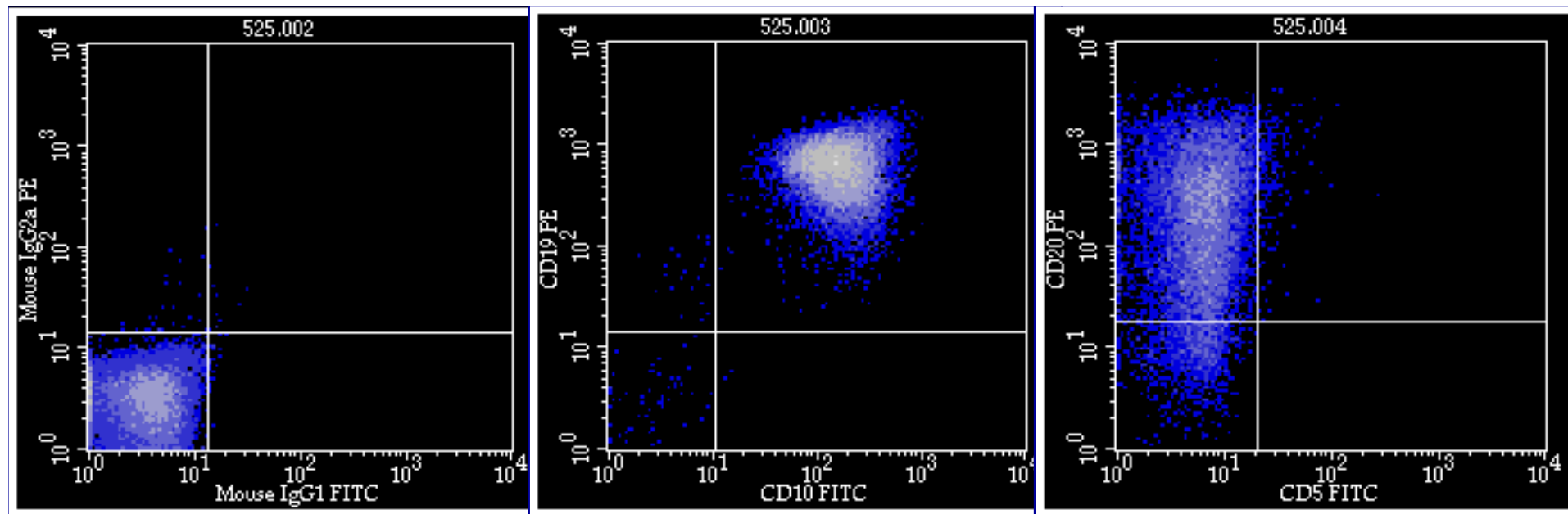


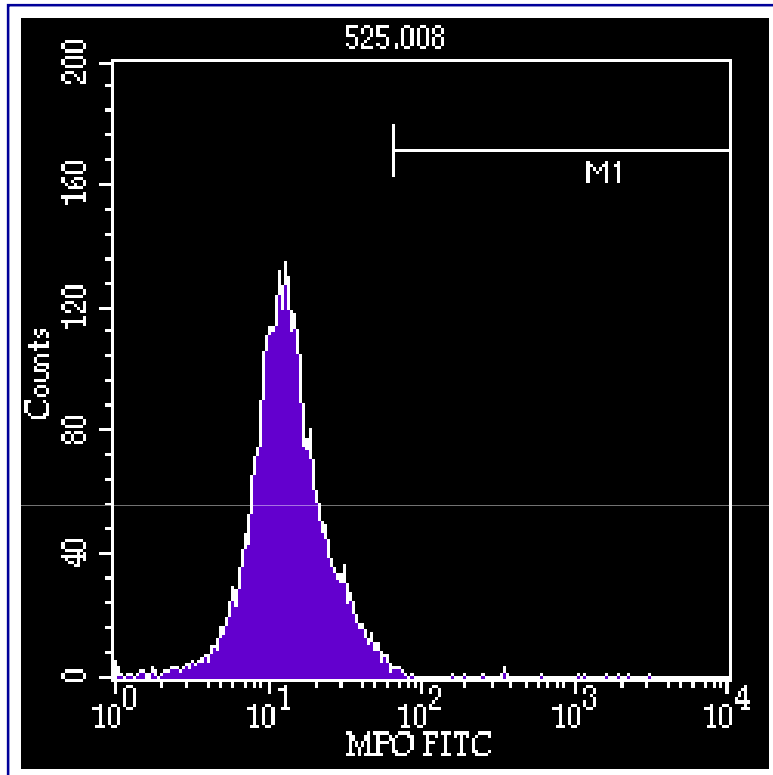
- **Paciente sexo femenino**
- **80 años**
- **Diagnóstico: Proceso linfoproliferativo crónico**



File: 525.001
 Sample ID: SANGRE PERIFERICA
 Acquisition Date: 09-Mar-01
 Total Events: 15000

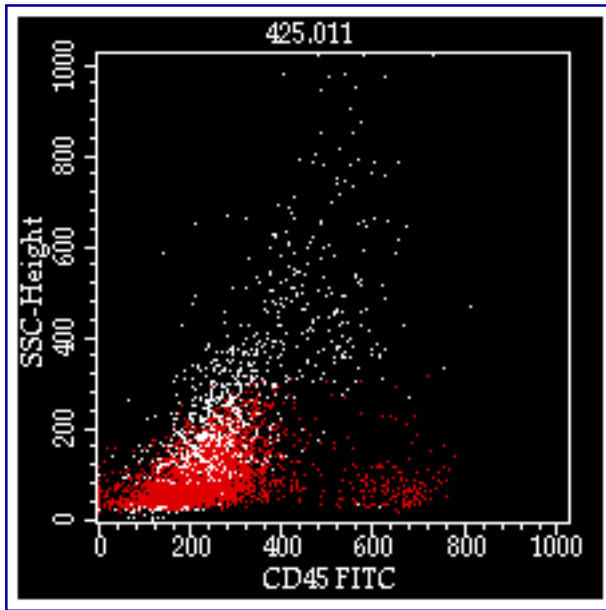
Region	Events	% Gated
R1 Blastos	13379	89.19
R2 Linfocitos	1034	6.89
R3 Granulocitos	468	3.12



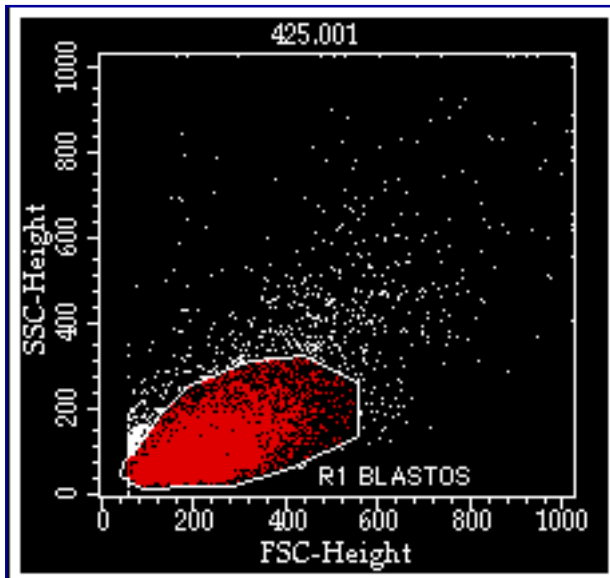


Positivo	Negativo	Positivo Débil
CD10	CD5	
CD19	CD13	
CD20	CD3	
CD34	CD16+56	
CD33	MPO	
HLA-DR		

Leucemia Linfoblática de Línea B (B-III - pre B)



- **Paciente sexo masculino**
- **6 años 5 meses**
- **Medula ósea**



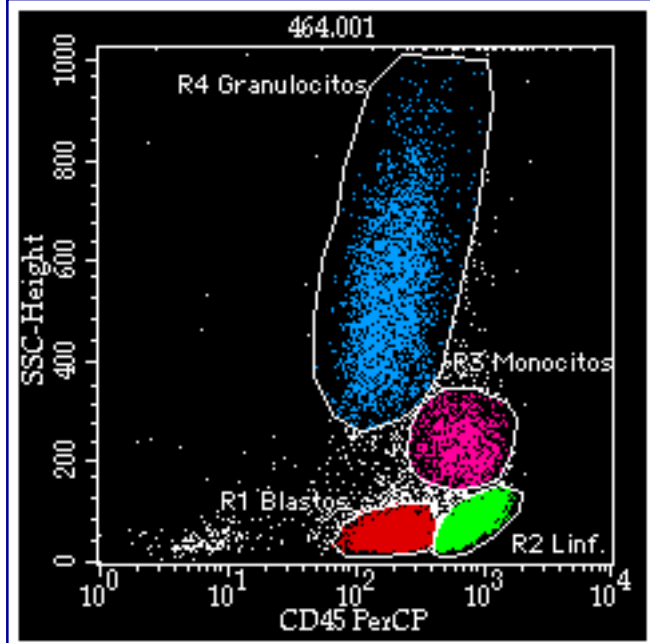
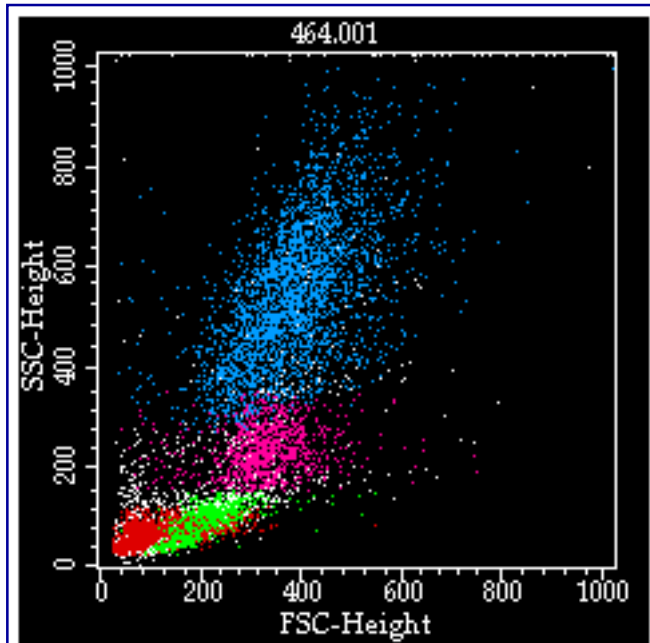
File: 425.001
 Sample ID: MEDULA OSEA
 Acquisition Date: 18-Aug-00
 Total Events: 15000

Region	Events	% Total
R1 BLASTOS	13482	89.88

Positivo	Negativo	Positivo Débil
-----------------	-----------------	-----------------------

CD10	CD20
CD19	CD5
CD34	CD3
CD33	CD8
CD13	CD16+56
HLA-DR	MPO
TdT	CD14

Leucemia Linfoblástica de tipo B-II (Común), con expresión mieloide aberrante



- **Paciente sexo masculino**
- **21 años**
- **Sangre periférica**

File: 464.001

Sample ID: SANGRE PERIFERICA

Acquisition Date: 23-Oct-00

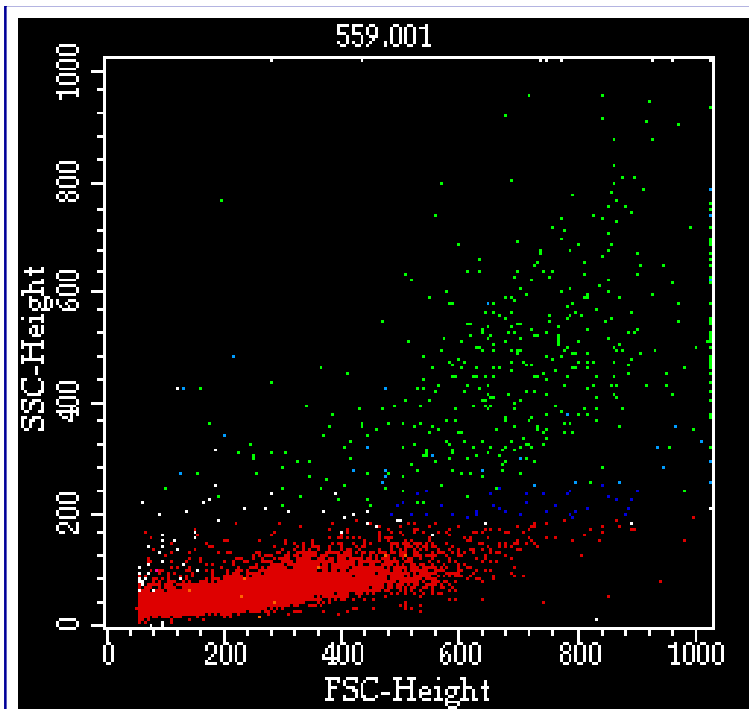
Total Events: 15000

<u>Region</u>	<u>Events</u>	<u>% Gated</u>
R1 Blastos	7919	52.79
R2 Linf.	2740	18.27
R3 Monocitos	940	6.27
R4 Granulocitos	2636	17.57

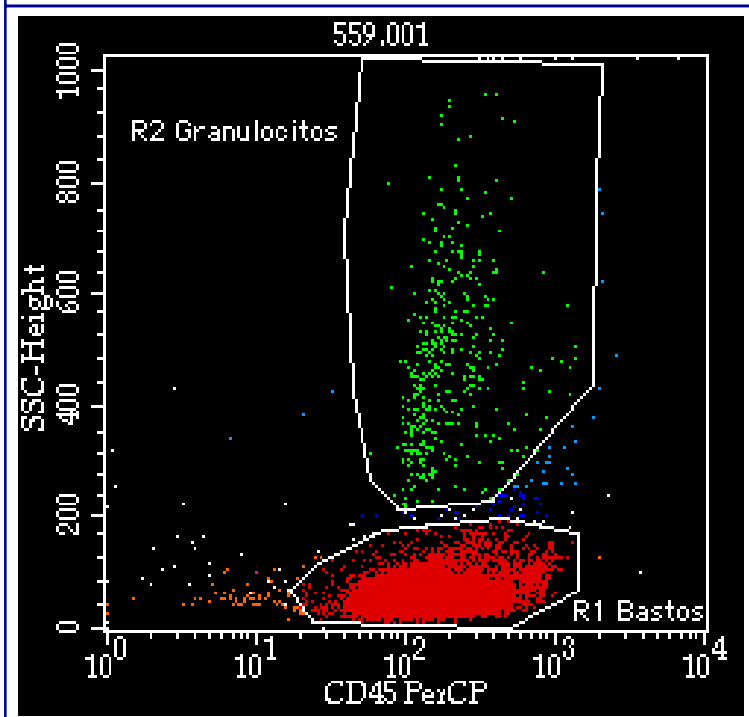
Positivo	Negativo	Positivo Débil
-----------------	-----------------	-----------------------

CD5	CD3	
CD4	CD10	
CD8	CD19	
CD2	CD20	
CD7	CD34	
CD3c	CD33	
TdT	CD13	
	CD16+56	
	HLA-DR	
	MPO	
	CD14	

Leucemia Linfoblástica de Línea T (Pre T)



- **Paciente sexo masculino**
- **5 años 8 meses**
- **Medula ósea**



File: 559.001

Sample ID: MEDULA OSEA

Acquisition Date: 11-May-01

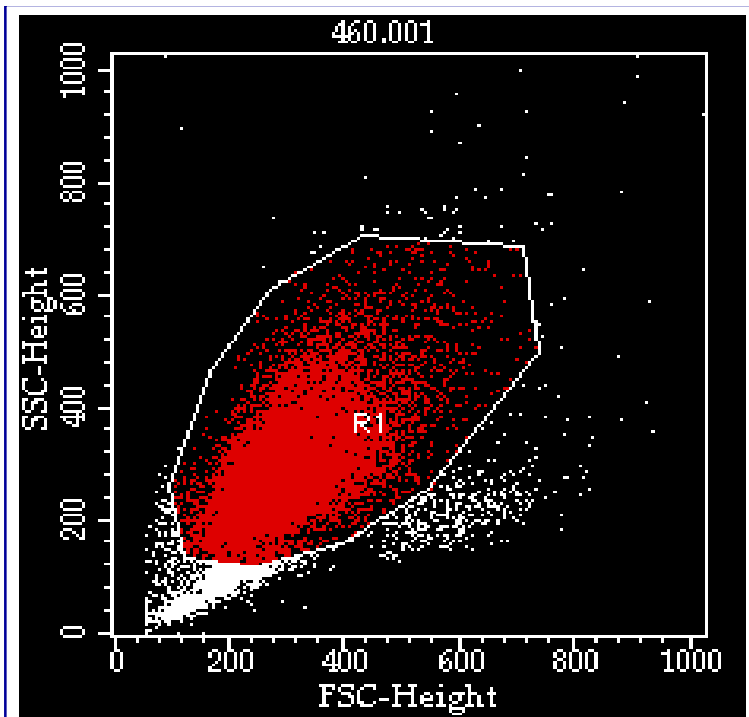
Total Events: 15000

Region	Events	% Gated
R1 Bastos	14370	95.80
R2 Granulocitos	425	2.83

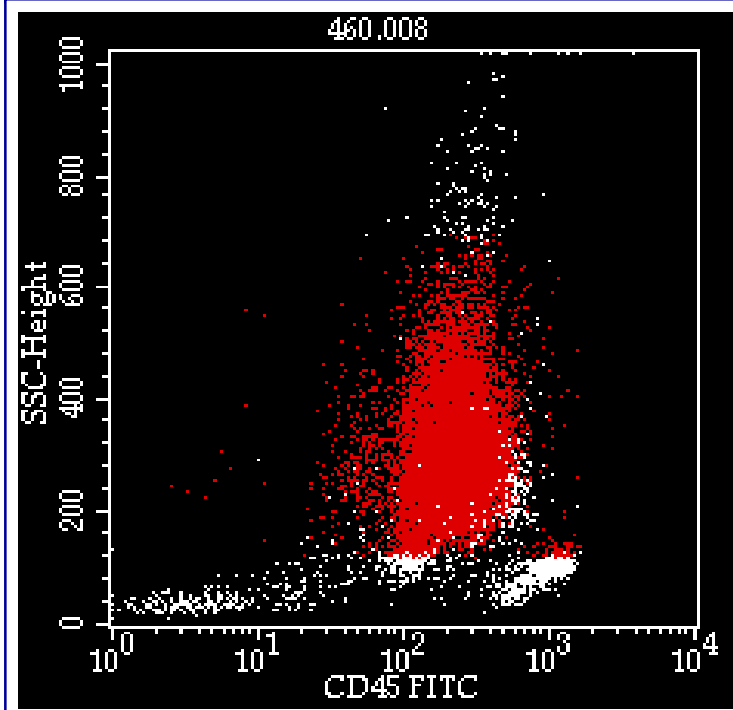
Positivo	Negativo	Positivo Débil
-----------------	-----------------	-----------------------

CD10	CD19
CD5	CD20
CD2	CD33
CD3	CD13
CD7	CD16+56
CD8	MPO
CD4	CD34
	HLA-DR

Leucemia Aguda Línea T (T-IV madura)



- **Paciente sexo femenino**
- **78 años**
- **Sangre periférica**
- **WBC:169.000.**



File: 460.008

Sample ID: SANGRE PERIFERICA

Acquisition Date: 18-Oct-00

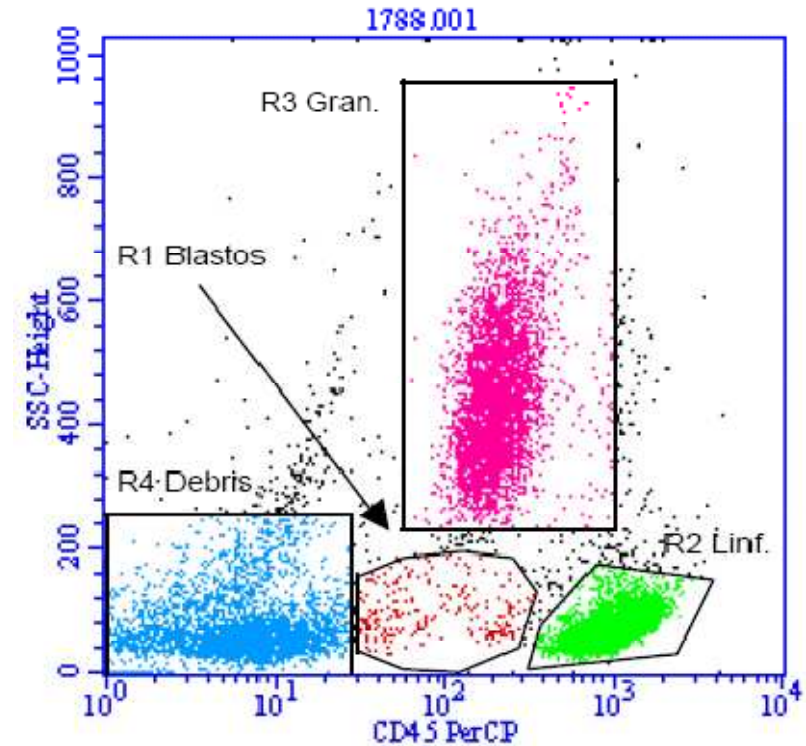
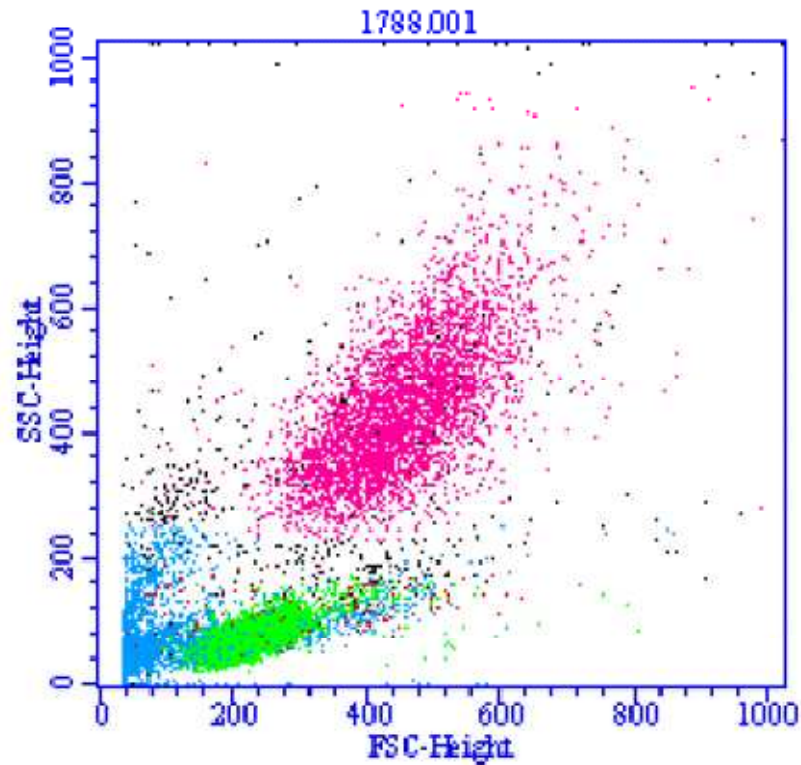
Total Events: 15000

Gate	Events	% Gated	% Total
G1	13448	89.65	89.65

Positivo	Negativo	Positivo Débil
-----------------	-----------------	-----------------------

CD33	CD10	CD14
CD13	CD19	HLA-DR
CD56	CD20	
MPO	CD5	
	CD3	
	CD34	

**Sugerente de una Leucemia Promielocítica
Hipogranular M3 HLA-DR (-)**



File: 1788.001

Sample ID: SANGRE PERIFERICA

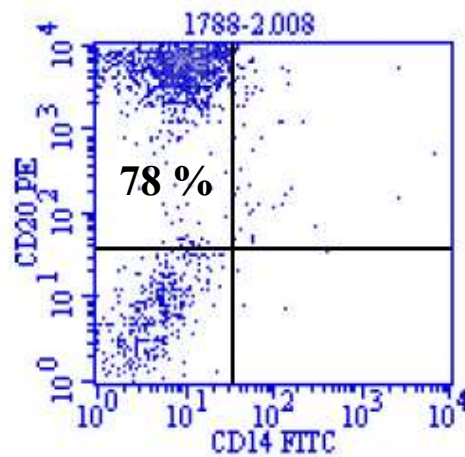
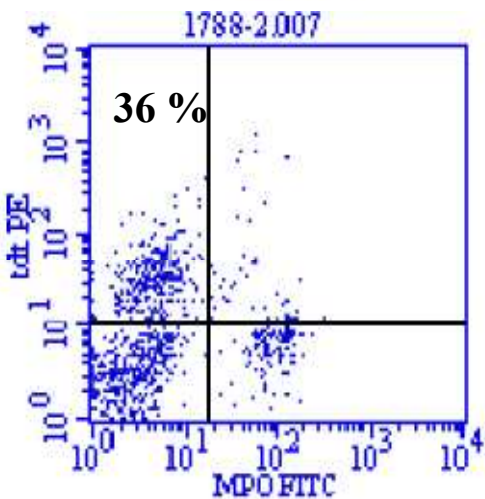
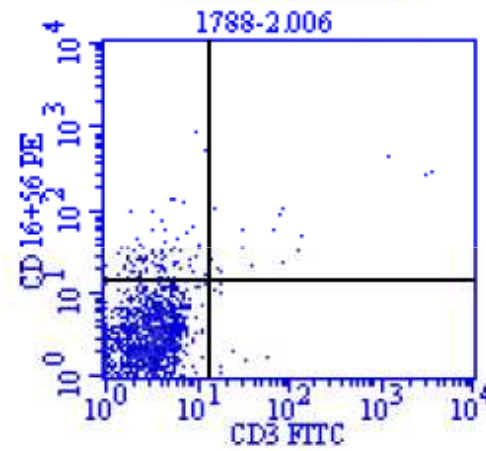
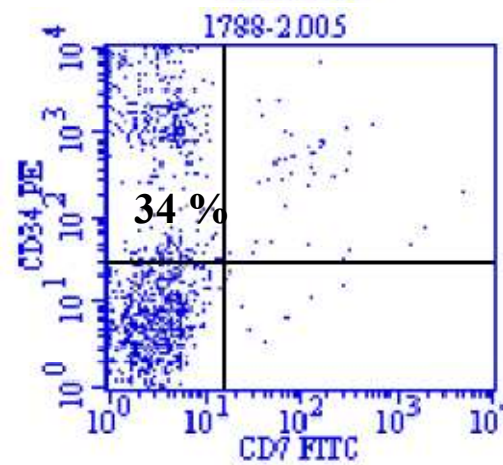
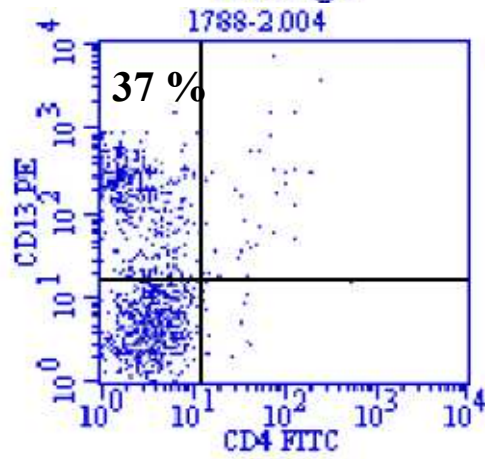
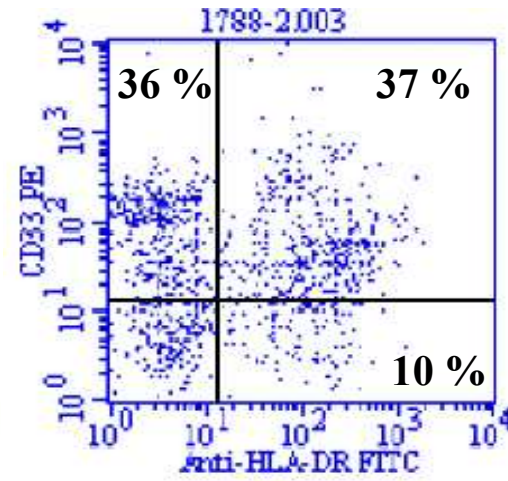
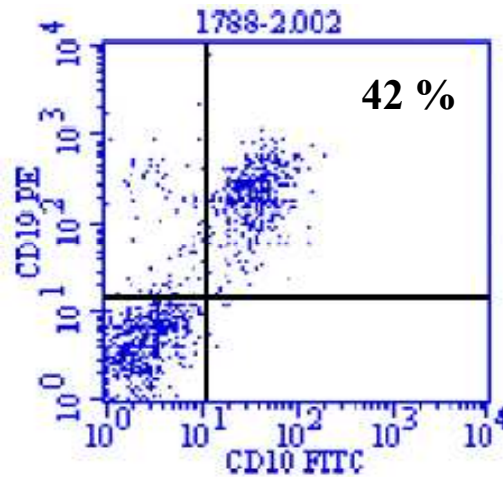
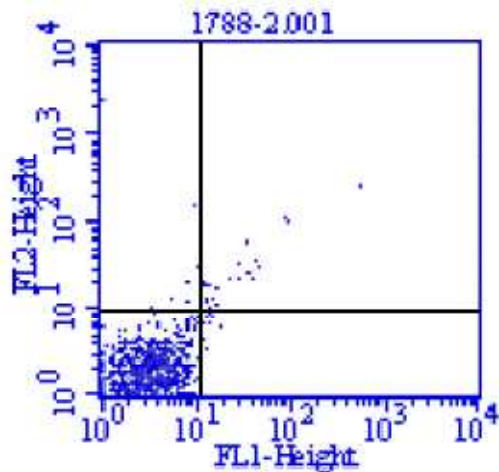
Patient ID:

Acquisition Date: 30-Dec-04

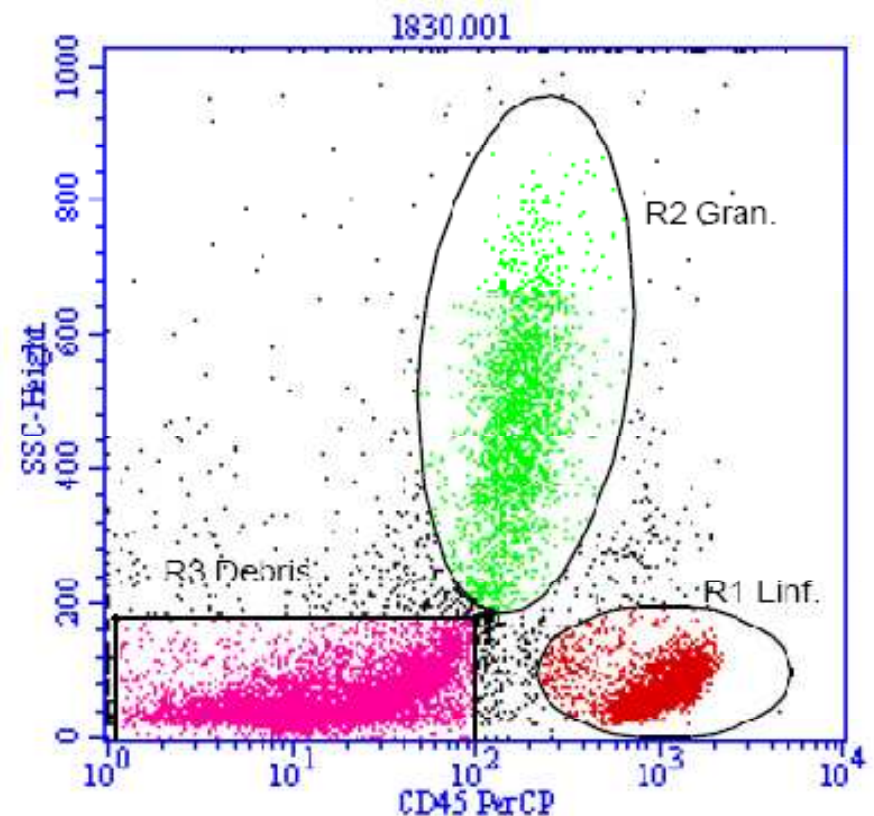
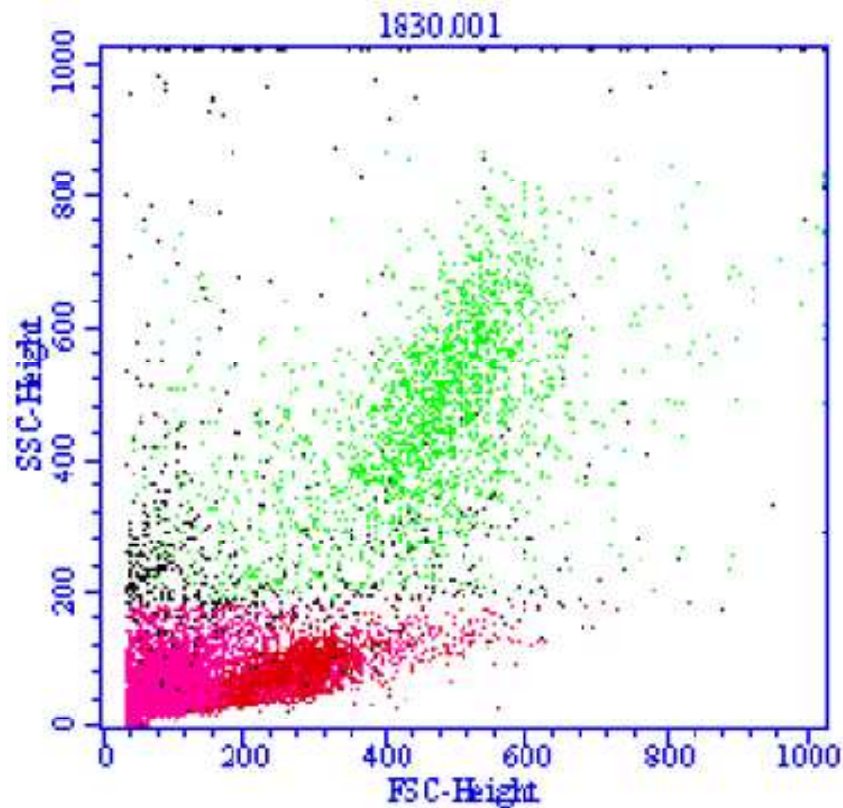
Total Events: 15000

Region	Events	% Gated
R1 Blastos	246	1.64
R2 Linf.	6853	45.69
R3 Gran.	4136	27.57
R4 Debris	3307	22.05

- 30/12/2004
- Sangre Periférica
- Sexo femenino
- 40 años



LLA-B (BIII- pre B)



File: 1830.001

Sample ID: MEDULA OSEA

Patient ID:

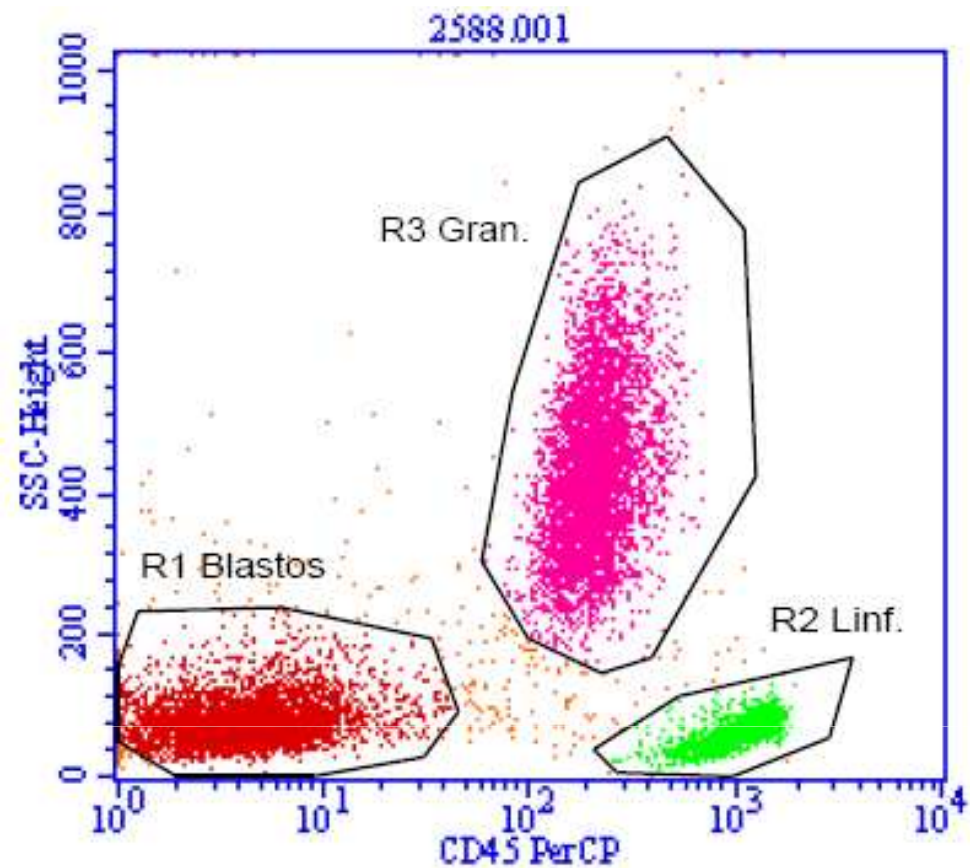
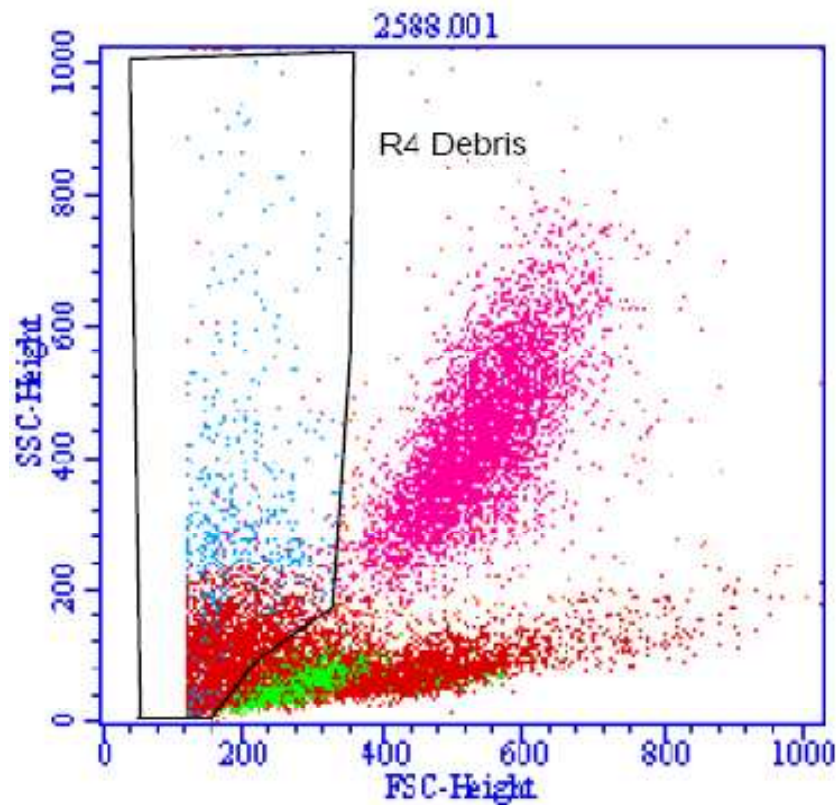
Acquisition Date: 08-Feb-05

Total Events: 15000

Region	Events	% Gated
R1 Linf.	4350	29.00
R2 Gran.	1920	12.80
R3 Debris	7897	52.65

- **Misma Paciente**
- **08/02/2006**
- **Medula ósea**
- **Sexo femenino**
- **40 años**

Sin evidencia de población patológica



File: 2588.001

Sample ID: MEDULA OSEA

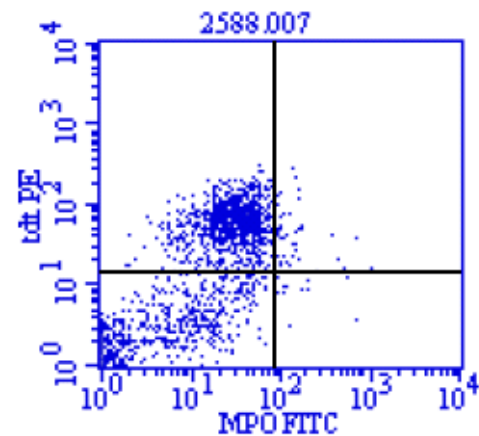
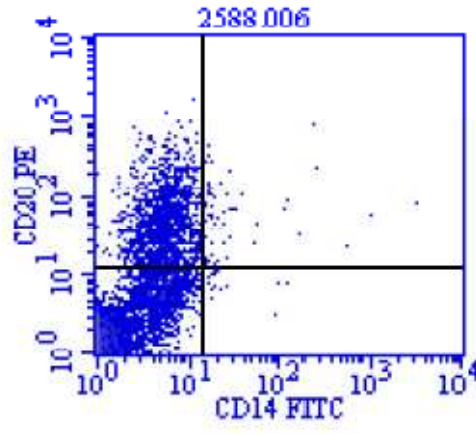
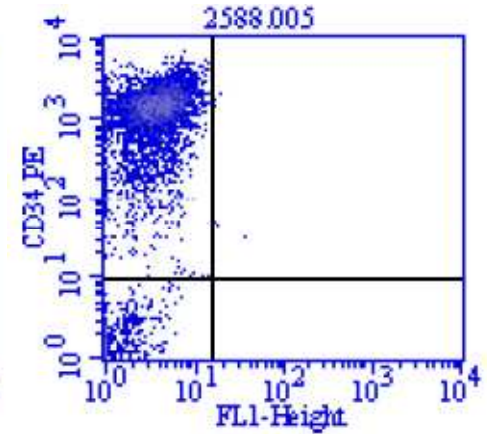
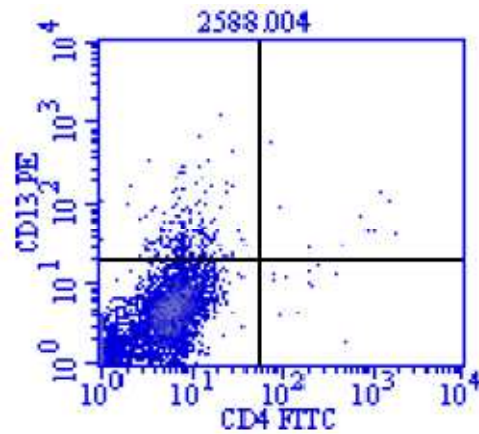
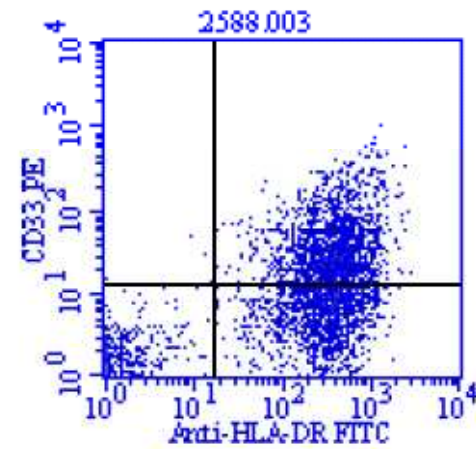
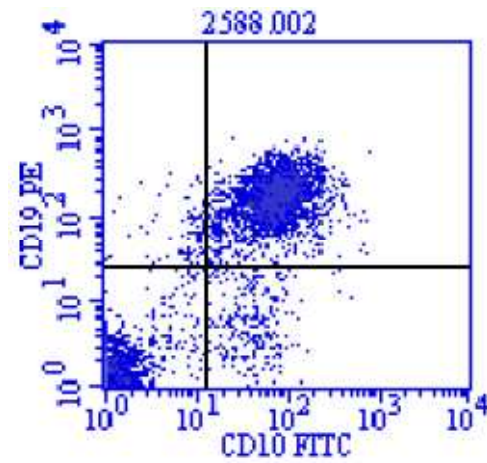
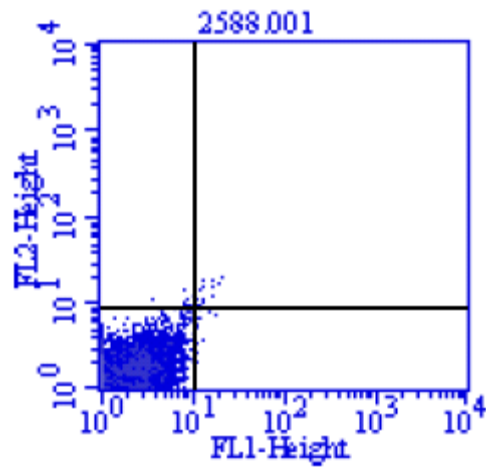
Patient ID:

Acquisition Date: 18-May-06

Total Events: 13965

Region	Events	% Gated
R1 Blastos	4262	37.88
R2 Linf.	2110	18.75
R3 Gran.	4589	40.79

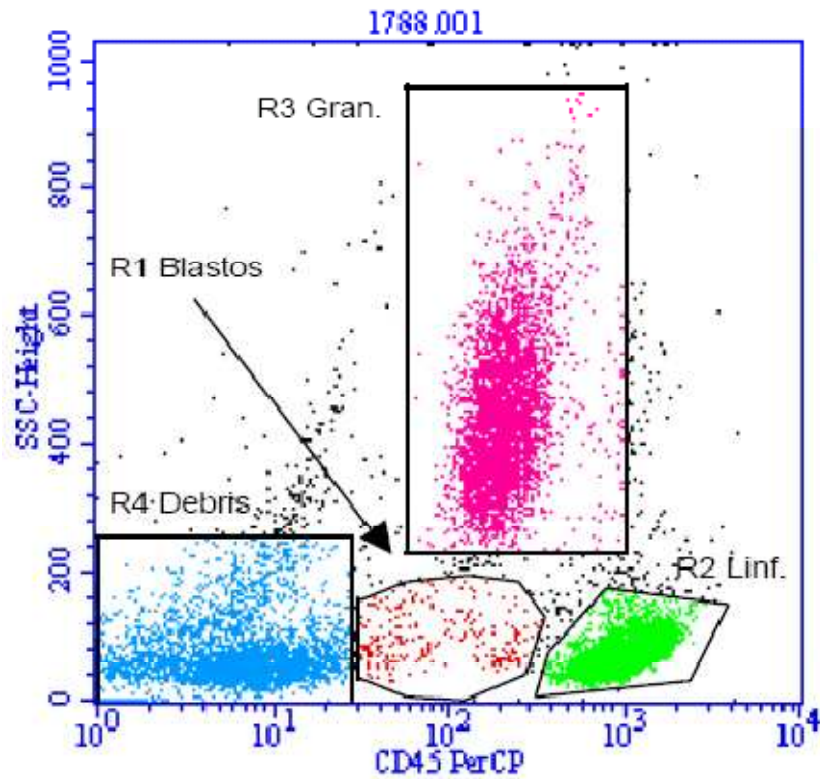
- **Misma Paciente**
- **18/05/2006**
- **Medula ósea**
- **Sexo femenino**
- **41 años**



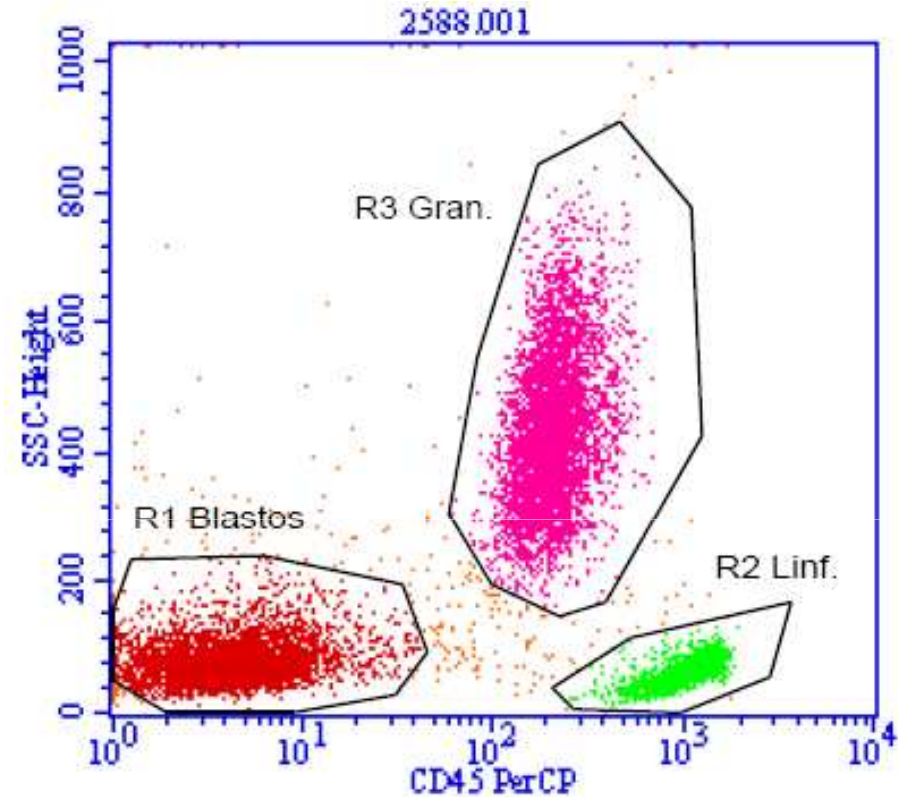
En el contexto de una muestra de **médula ósea hipocelular**, la población celular analizada, presenta características inmunofenotípicas sugerentes de una **Leucemia Linfática Aguda de línea B (B-III PreB)**.

- 30/12/2004
- Sangre Periférica

- 18/05/2006
- Medula ósea

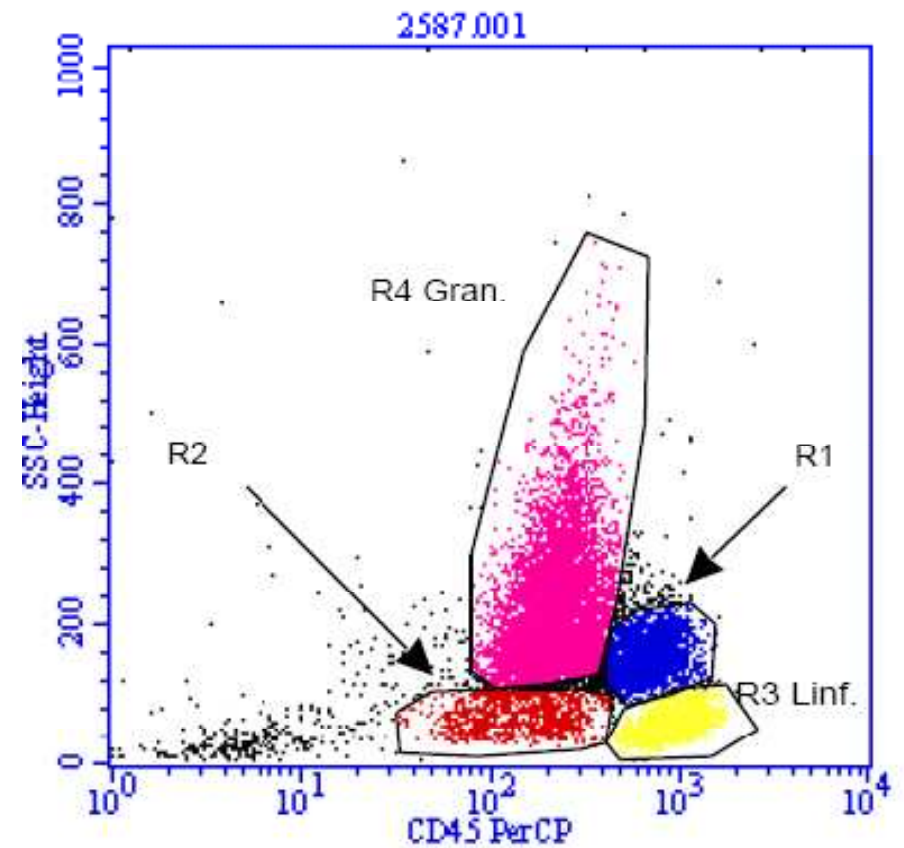
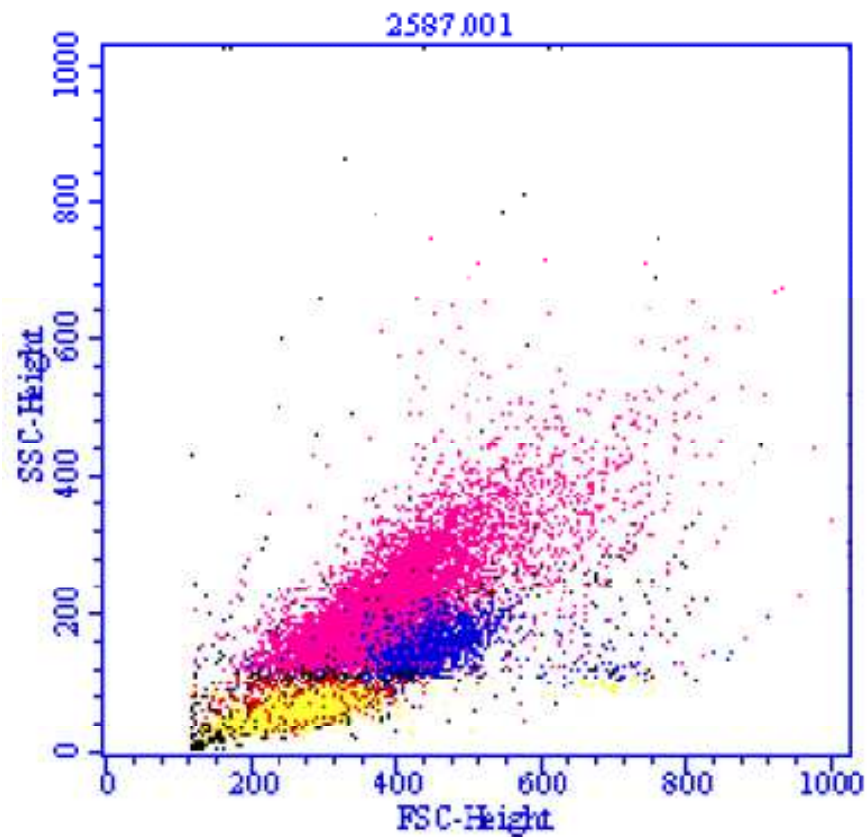


LLA-B (BIII- pre B)



LLA-B (BIII- pre B)

Esta población de blastos, presenta características de expresión de **CD45** y **CD13**, diferentes a las encontradas en el estudio realizado el 30 de diciembre de 2004, lo que podría indicar que **NO** se trata de la misma población celular, detectada en esa ocasión.



File: 2587.001

Sample ID: MEDULA OSEA

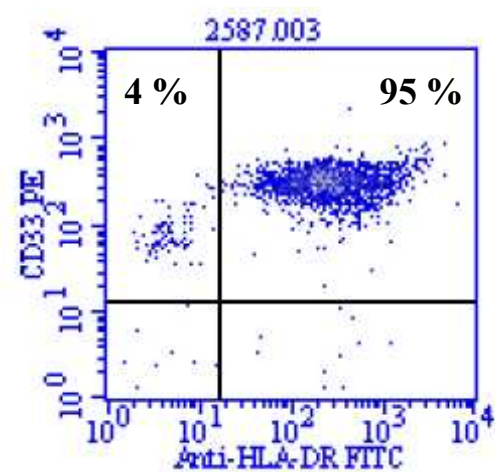
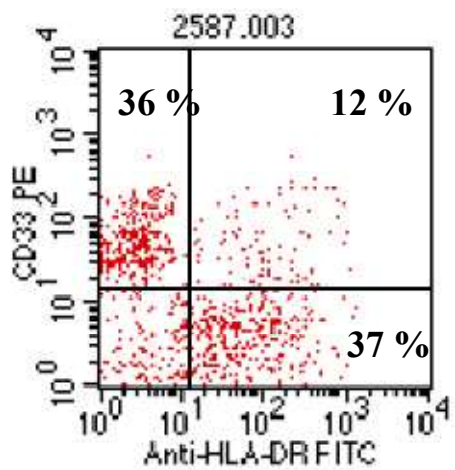
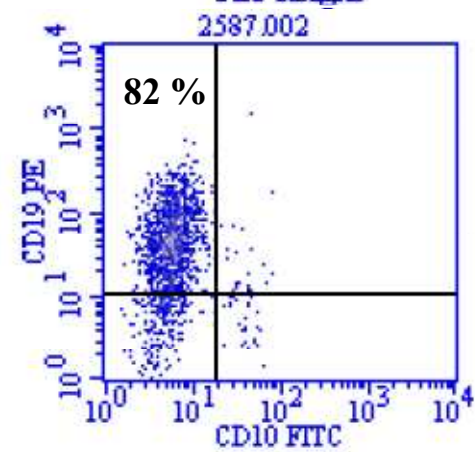
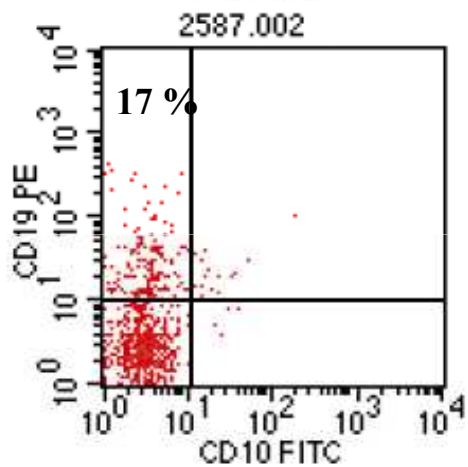
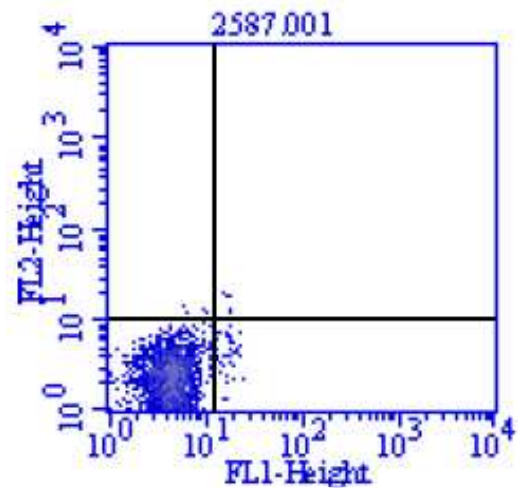
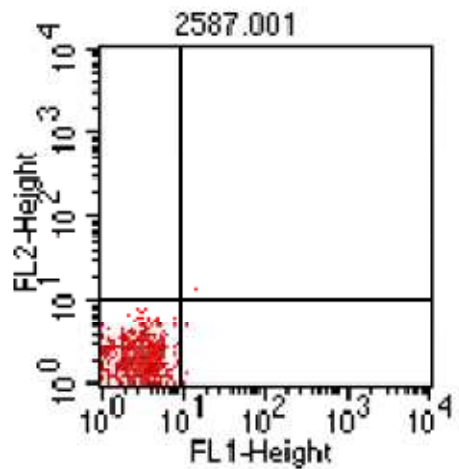
Patient ID: HUGO MUÑOZ PINCHEIRA

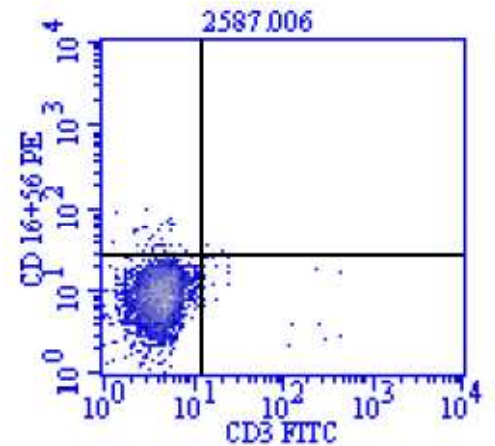
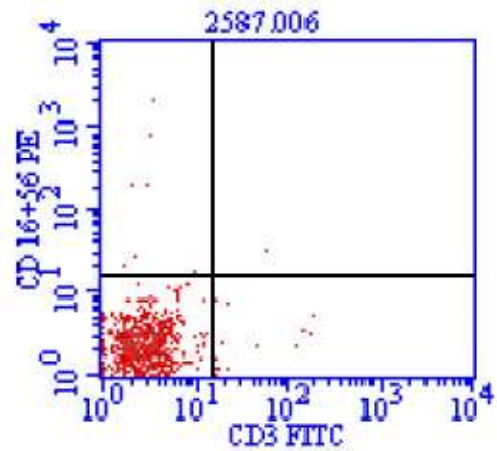
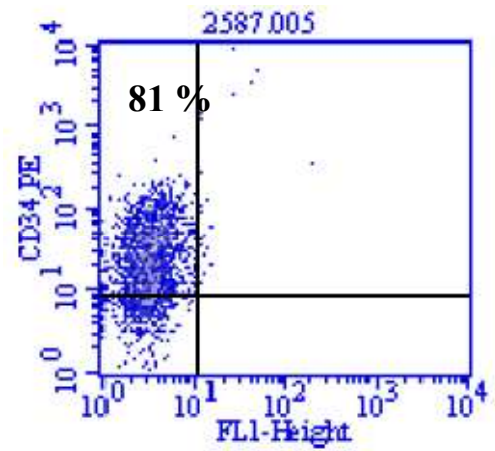
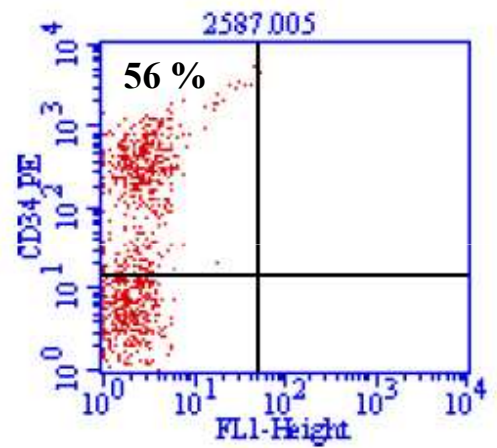
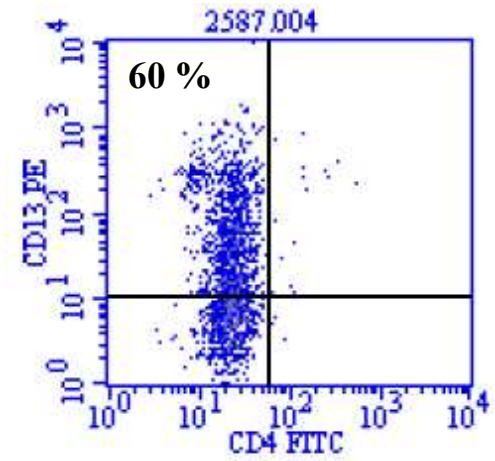
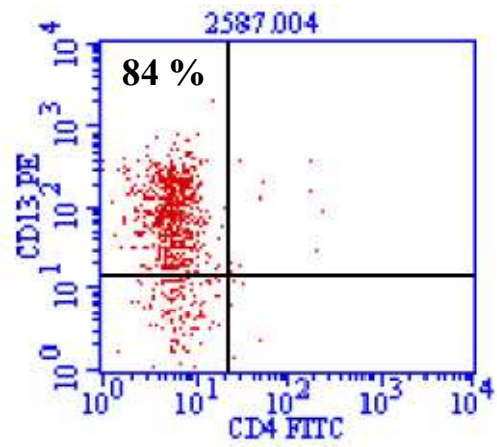
Acquisition Date: 18-May-06

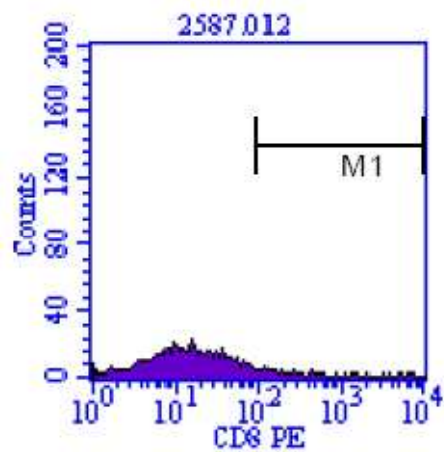
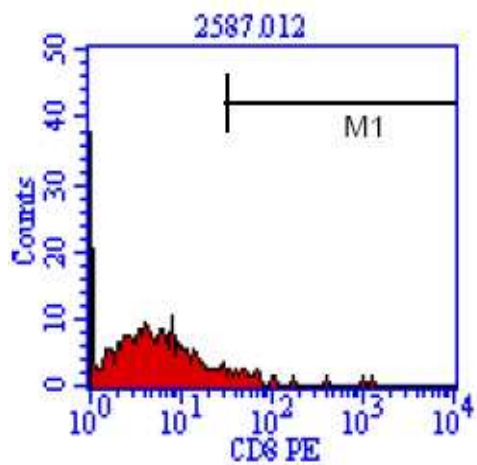
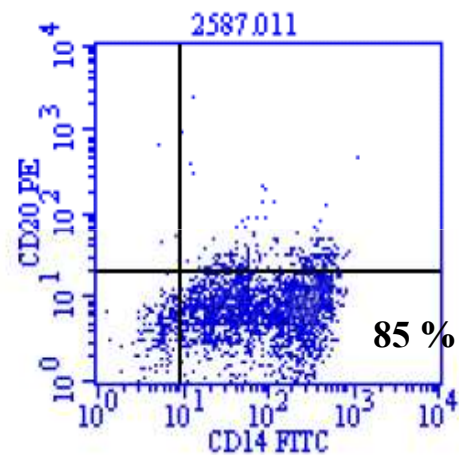
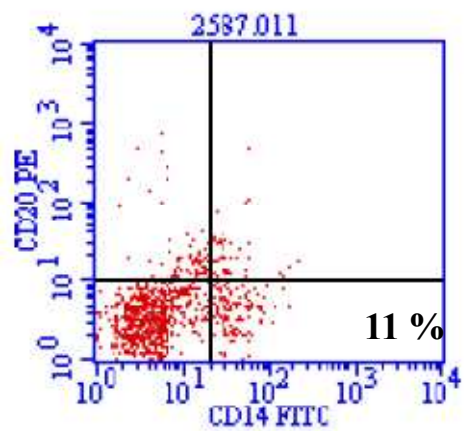
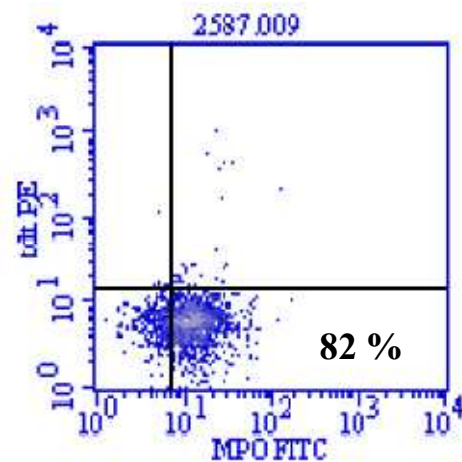
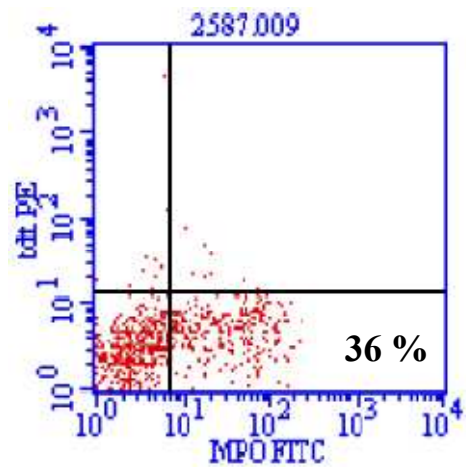
Total Events: 15000

Region	Events	% Gated
R1	2330	15.53
R2	946	6.31
R3 Linf.	3593	23.95
R4 Gran.	7408	49.39

- 19/05/2006
- Medula ósea
- Sexo Masculino
- 56 años
- Diagnóstico ?????







R2 6.31 %

Positivo

Negativo

CD13, CD33

CD34

MPO

HLA-DR

CD19, CD20

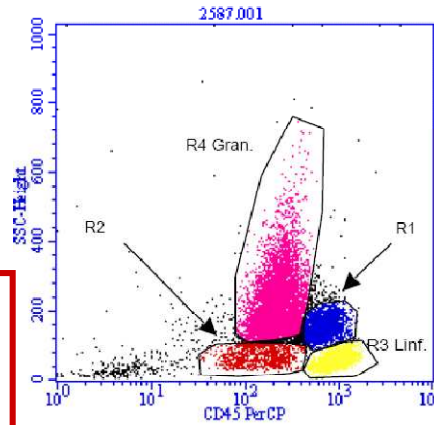
CD10, TDT

CD4, CD8

CD3

CD16+56

CD14



R1 15.53 %

Positivo

Negativo

CD19

CD13, CD33

CD34

MPO

HLA-DR

CD14

CD10, TDT

CD4, CD8

CD3

CD16+56

CD20

R2 6.31 %

Positivo

Negativo

CD13, CD33

CD34

MPO

HLA-DR

CD19, CD20

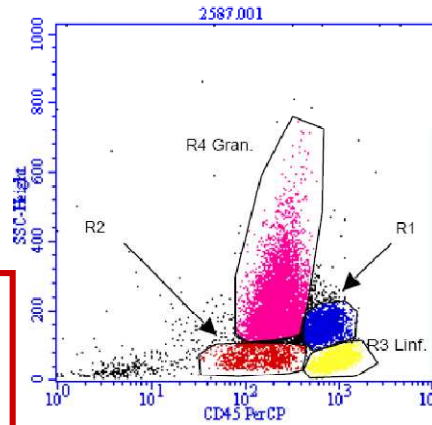
CD10, TDT

CD4, CD8

CD3

CD16+56

CD14



R1 15.53 %

Positivo

Negativo

CD19

CD13, CD33

CD34

MPO

HLA-DR

CD14

CD10, TDT

CD4, CD8

CD3

CD16+56

CD20

- 1. Blastos regenerativos de tipo mieloide, con poca granularidad**
- 2. Blastos regenerativos del tipo basófilos**
- 3. Leucemia Mieloblástica Aguda sin Maduración**
- 4. Leucemia Mieloblástica Aguda con maduración**
- 5. Leucemia Basófila Aguda**

- 1. Leucemia Mielomonocítica Aguda**
- 2. Leucemia Mieloblástica Aguda**
- 3. Síndrome Mielodisplásico Leucemizado**

R2 6.31 %

Positivo

Negativo

CD13, CD33

CD34

MPO

HLA-DR

CD19, CD20

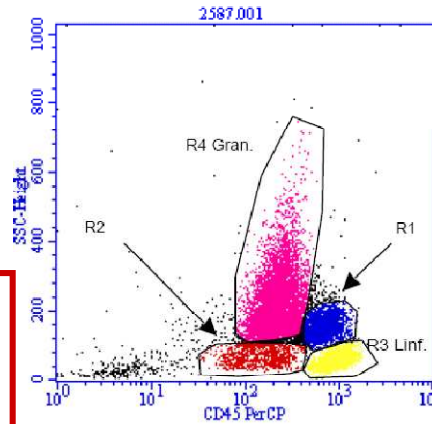
CD10, TDT

CD4, CD8

CD3

CD16+56

CD14



R1 15.53 %

Positivo

Negativo

CD19

CD13, CD33

CD34

MPO

HLA-DR

CD14

CD10, TDT

CD4, CD8

CD3

CD16+56

CD20

1. **Blastos regenerativos de tipo mieloide, con poca granularidad**
2. **Blastos regenerativos del tipo basófilos**
3. **Leucemia Mieloblástica Aguda sin Maduración**
4. **Leucemia Mieloblástica Aguda con maduración**
5. **Leucemia Basófila Aguda**

1. **Leucemia Mielomonocítica Aguda**
2. **Leucemia Mieloblástica Aguda**
3. **Síndrome Mielodisplásico Leucemizado**

- **En su conjunto la muestra analizada PODRÍA corresponder a un trastorno mieloproliferativo bifenotípico**
- **No se puede descartar la presencia de otro inmunofenotipo celular no identificado, ni de un sustrato de base del tipo mielodisplásico**

CONCLUSION:

- La muestra analizada, presenta dos poblaciones celulares con característica inmunofenotípicas diferentes:
 - La población celular correspondiente a la región 1, presenta característica inmunofenotípicas que podrían sugerir:
 1. *Una Leucemia Mielomonocítica Aguda.*
 2. *Una Leucemia Monoblástica Aguda*
 3. *Síndrome Mielodisplásico leucemizado.*
 - La población celular correspondiente a la región 2, presenta característica inmunofenotípicas que podrían sugerir:
 1. *Blastos Regenerativos de tipo mieloide, con poca granularidad*
 2. *Blastos regenerativos del tipo basófilos*
 3. *Una Leucemia Mieloblástica Aguda sin Maduración.*
 4. *Una Leucemia Mieloblástica Aguda con Maduración*
 5. *Una Leucemia Basófila Aguda* (Referencia: American Journal of Hematology, 2004; 76:134-138).
- Tomado en su conjunto la muestra analizada podría corresponder a un trastorno mieloproliferativo bifenotípico.
- No se puede descartar la presencia de otro inmunofenotipo celular no identificado, ni la presencia de un sustrato de base del tipo mielodisplásico.
- Correlacionar con morfología celular y evolución clínica.
- El Tratamiento quimioterápico puede alterar los hallazgos inmunofenotípicos.

- Sexo masculino
- 57 años
- Sangre periférica
- 13 Febrero 2004

Positivo

Negativo Positivo Débil

CD19

CD10

CD20

CD3

kappa

CD4

HLA-DR

CD7

CD16+56

CD34

TdT

CD13

CD33

CD14

MPO

lambda

Trastorno linfoproliferativo crónico de línea B, con expresión clonal de cadenas livianas de inmunoglobulinas del tipo *kappa*.

- Mismo paciente
- 59 años
- Sangre periférica
- 08 de junio 2005



Dgto. y TTO

**Linfoma del
Manto
Leucemizado
etapa IV-B**

Positivo	Negativo	Positivo Débil
----------	----------	----------------

CD19	CD10	
CD20	CD3	
<i>kappa</i>	CD4	
HLA-DR	CD7	
	CD16+56	
	CD34	
	TdT	
	CD13	
	CD33	
	CD14	
	MPO	
	<i>lambda</i>	

Trastorno linfoproliferativo crónico de línea B, con expresión clonal de cadenas livianas de inmunoglobulinas del tipo *kappa*.

- **Sexo masculino**
- **30 años**
- **Abril 2005:**
Adenopatía cervical
sugerente de Linfoma
No Hodgkin Difuso
Mixto.
- **07 de julio 2005**
- **Medula ósea**

Positivo	Negativo	Positivo Débil
-----------------	-----------------	-----------------------

CD33	CD10	CD56
CD34	CD19	CD13
CD7	CD20	
	CD4	
	CD3	
	CD14	
	TdT	
SSC Bajo	HLA-DR	
	MPO	

sugerentes de una leucemia mieloide aguda HLA-DR negativo, con expresión de CD7. ¿Promielocítica hipogranular?.

- **Sexo femenino**
- **42 años**
- **Julio 2001**
- **Medula ósea**



37 % células

Positivo

Negativo Positivo Débil

CD19

lambda

CD20

CD10

kappa

CD3

CD4

CD7

CD33

CD34

CD13

CD14

HLA-DR

*Linfoma de células linfocíticas pequeñas de bajo grado de malignidad
(línea B con expresión clonal de cadenas livianas del tipo kappa)*

- **Misma paciente**
- **44 años**
- **Octubre 2002**
- **Medula ósea**



9.6 % células

Positivo

Negativo Positivo Débil

CD19

lambda

CD20

CD10

kappa

CD3

CD4

CD7

CD33

CD34

CD13

CD14

HLA-DR

*Linfoma de células linfocíticas pequeñas de bajo grado de malignidad
(línea B con expresión clonal de cadenas livianas del tipo kappa)*

- **Misma paciente**
- **45 años**
- **Agosto 2003**
- **Medula ósea**



Medula ósea normal

- **Misma paciente**
- **46 años**
- **Abril 2004**
- **Medula ósea**



Medula ósea normal

Inmunofenotipificación Celular: Leucemias y Linfomas por Citometría de Flujo

*Juan Luis Castillo N., T.M. MsC
Laboratorio de Citometría de Flujo
Hospital del Trabajador Concepción.
Departamento de Especialidades Médicas
Facultad de Medicina
Universidad de Concepción*

