

Fenotipificación y clasificación francesa-americana- británica de la leucemia linfoide aguda infantil

Luz María Rivera, Esteban Echavarría, Maribel Martínez,
Olga L. Martínez, Margarita M. Toro · Medellín

*'La vida es tristeza, supérala...
La vida es un combate, acéptalo...
La vida es una tragedia, domínala...
La vida es la vida, defiéndela "*
Madre Teresa de Calcuta.

Objetivo: describir el inmunofenotipo determinado mediante citometría de flujo láser de una población de niños con leucemia linfoide aguda y su correlación con la clasificación morfológica FAB.

Diseño: estudio descriptivo.

Pacientes: se estudiaron 38 niños con sospecha de LLA, que consultaron al Servicio de Hematología Infantil de la Universidad de Antioquia y el Hospital Universitario San Vicente de Paúl entre octubre de 1996 y marzo de 1997.

Mediciones: se confirmó el diagnóstico de leucemia con el aspirado de médula ósea y la coloración citoquímica del Sudán Negro B. Se usó la clasificación morfológica del grupo FAB y se correlacionó con el inmunofenotipo por citometría de flujo láser usando los anticuerpos monoclonales (AcMo) CD10, CD19, CD20 para linaje B y CD2, CD7 para linaje T.

Resultados: en 32 pacientes se confirmó el diagnóstico de LLA, 26 con morfología L1 y 6 con morfología L2; 81,2% de linaje B y 18,8% de linaje T. Seis pacientes que no marcaron para estirpe linfoide, se identificaron con los AcMo CD13 (4 pacientes) y CD 41 (2 pacientes).

Conclusiones: se enfatiza en la necesidad de identificar correctamente la clona maligna, desde el momento mismo del diagnóstico, dado el pésimo pronóstico de las LLA de linaje T, para poder ofrecer a cada paciente protocolos de tratamiento más adecuados a su patología.

Palabras claves: *inmunofenotipo, citometría, anticuerpos monoclonales, clasificación FAB, leucemia linfoide aguda.* (Acta Med Colomb 2000;25:12-17).

Introducción

La leucemia linfoide aguda es una neoplasia originada en una clona linfoide maligna que afecta el sistema hematopoyético al igual que otros órganos y tejidos ajenos a éste (1). El sistema de clasificación de las leucemias agudas más ampliamente usado es el sistema FAB (French-American- British Classification) (2). Este sistema clasifica casos individuales de leucemia aguda de acuerdo con su apariencia morfológica en los aspirados de médula ósea coloreados con Wright (3). En esta clasificación, la LLA se divide en tres subtipos denominados L1, L2 y L3, mientras que las leucemias mieloides agudas se subdividen en ocho subtipos, desde MO hasta M7 (2,4).

Otra clasificación de la LLA se basa en las características inmunológicas de las membranas celulares; la citometría de flujo láser ha facilitado la identificación de estos marcadores inmunológicos que se encuentran distribuidos

A mi inolvidable esposo, el investigador Rafael Caldas Zárate, asesinado en los predios universitarios cuando se encontraba trabajando en sus proyectos de vida académica.

Dra. Luz María Rivera S.: Bacterióloga, Especialista en Hematología y Manejo de Banco de Sangre, Profesora Titular de la Universidad de Antioquia; Dr. Esteban Echavarría E.: Médico Internista, Jefe del Laboratorio Médico de la Clínica Las Américas; Lic. Maribel Martínez Y., Olga L. Martínez A. y Margarita M. Toro A.: Estudiantes de Bacteriología. Universidad de Antioquia, Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Centro de Investigación y Extensión. Medellín, Colombia

en "grupos de diferenciación", en inglés "*cluster of differentiation*" (CD) (1, 5, 6).

En los últimos años la citometría de flujo ha adquirido gran difusión debido a su rapidez y objetividad. Es de mucha utilidad sobre todo para las leucemias en las que la morfología y la citoquímica no son concluyentes y al permitir identificar grupos de pacientes con pronóstico diferente (7), usando anticuerpos monoclonales (AcMo) que reaccionan con antígenos (Ags) bien definidos, específicos para una línea celular determinada o para un estado de maduración específico; otros AcMo detectan Ags más ampliamente distribuidos, pero pueden ser útiles dentro de un "panel" apropiado de AcMo (7).

La citometría de flujo detecta partículas como células, bacterias o cromosomas que se mueven en una corriente líquida a través de una zona sensible controlada por un halo de luz láser. Las partículas en estudio son cuantificadas como "eventos" en una mezcla de partículas normales o contaminantes, gracias a la marcación previa de las proteínas de membrana con los AcMo unidos a sustancias fluorescentes. Los resultados pueden ser graficados a manera de histogramas o diagramas de parámetros más complejos (1, 6, 8).

La fenotipificación de la LLA infantil por citometría de flujo láser permitirá crear una base de datos sobre los inmunofenotipos en nuestro medio, establecer una correlación entre el diagnóstico morfológico e inmunológico de los pacientes y mejorar la precisión diagnóstica.

Material y métodos

Población

Este estudio evaluó 38 pacientes, niños y niñas, con rango de edad de 0 a 12 años, que consultaron al Servicio de Hematología de la Universidad de Antioquia y el Hospital Universitario San Vicente de Paúl (HUSVP) de la ciudad de Medellín (Antioquia), en el período comprendido entre octubre de 1996 y marzo de 1998.

Métodos

A cada paciente con sospecha clínica de leucemia se le extrajeron 3 ml de sangre periférica, en tubo Vacutainer Becton Dickinson con EDTA como anticoagulante, para hacer un hemoleucograma, en el cual se determinaron la hemoglobina, el hematocrito, los leucocitos, el recuento de plaquetas y el recuento diferencial en un aparato automatizado Coulter T-540. Además se efectuó un aspirado de médula ósea que se sometió a la coloración de Wright y a la coloración citoquímica Sudán Negro B (3) para su posterior lectura e interpretación.

La leucocitosis en el hemoleucograma y un porcentaje de blastos en sangre periférica mayor de 80% fueron criterios para hacer el estudio del inmunofenotipo en sangre venosa, usando EDTA como anticoagulante (Vacutainer, Becton Dickinson[®]). Cuando no se cumplió este requisito, la muestra se obtuvo por aspirado de médula ósea en EDTA.

Las muestras fueron procesadas en las siguientes diez horas después de su extracción, siendo mantenidas a temperatura ambiente hasta ese momento.

Para el procedimiento en el citómetro de flujo láser (Coulter Epics XL[®]), las células deben ser primero coloreadas, luego se lisan los eritrocitos y por último se fijan las células. En el estudio se usaron AcMo conjugados, marcados con un fluorocromo, en procedimientos de coloración con doble AcMo. El fluorocromo usado para cada AcMo fue la Rhodamina para CD7 y CD 10 y el FITC (isotiocianato de fluoresceína) para CD2, CD19 y CD20.

Para procesar la médula ósea primero se filtró en una malla especial y se diluyó 1:2 antes de pasarla por el Coulter MAX-M. Esto con el fin de hacer el análisis de dispersión y observar la distribución de la población celular neoplásica.

Con la misma dilución que se trabajó en el MAX-M se trabajó en el citómetro. El objetivo de diluir la muestra es trabajar con recuentos de leucocitos que no sobrepasen los 100.000/mm³.

Para cada AcMo se tomaron 10 lmbdas del fluorocromo y 50 lmbdas de la dilución de la médula. Se incubó por diez minutos en la oscuridad, agitando en el vórtex. Luego se procedió a lisar con inmunoprep, reactivo que consta de tres soluciones: solución A: agente lítico de los glóbulos rojos; solución B: estabilizadora de los leucocitos; solución C: para fijar la membrana celular.

El procedimiento con inmunoprep dura 35 segundos y se hace en el Coulter Q-Prep (Epics). Ya la muestra está lista para ser leída en el citómetro. Antes de leer cada AcMo se pasa el isotipo, que es el mismo para cada marcador ya que no posee fluorocromo.

El análisis estadístico se hizo con el test exacto de la Fisher y prueba de Chi cuadrado para proporciones.

Resultados

Se estudiaron 38 pacientes, 21 niños (55,2%) y 17 niñas (44,8%) con edades comprendidas entre 7 meses y 13 años, con una mediana de cuatro años, que consultaron en el servicio de Hematología de la Universidad de Antioquia y el HUSVP desde octubre de 1996 hasta marzo de 1998, con sospecha clínica de LLA. En el momento del diagnóstico los pacientes consultaron por fiebre (66,7%), palidez (42%), dolor óseo (25,6%), adinamia (18,4%) y otras causas (Tabla 1).

Al hacer el examen físico se encontró palidez (42,0%), adenopatías generalizadas (39,4%), hepatoesplenomegalia (36,8%), petequias (29,0%) y equimosis (21,0%) (Tabla 2).

Como se puede observar en la Tabla 3, todos los pacientes tuvieron trombocitopenia y algún grado de anemia, con un recuento de leucocitos en el momento del diagnóstico que es superior a 11.000/mm³ en 81,6% de los pacientes; sólo 18,4% estaban dentro de los valores de referencia para el laboratorio (4.000-11.000/mm³). Únicamente uno de los pacientes estaba leucopénico en el momento del diagnóstico.

Tabla 1. Motivos de consulta de niños con sospecha de LLA.

Motivo de consulta	Pacientes	Frecuencia (%)
Fiebre	26	66,7
Palidez	16	42,0
Dolor óseo	10	25,6
Adinamia	7	18,4
Astenia	5	13,0
Anorexia	5	13,0
Equimosis	4	10,5
Pérdida de peso	3	7,8
Dolor abdominal	3	7,8
Dificultad para la marcha	3	7,8
Edema	3	7,8
Petequias	2	5,0
Artralgias	2	5,0
Adenomegalias	2	5,0
Epistaxis	2	5,0
Cefalea	2	5,0
Otros	10	26,0

Tabla 2. Hallazgos en el examen físico de los niños con sospecha de LLA.

	Examen físico	Pacientes Frecuencia (%)
Palidez	16	42,0
Adenopatías generalizadas	15	39,4
Hepatoesplenomegalia	14	36,8
Petequias	11	29,0
Equimosis	8	21,0
Hepatomegalia	7	18,4
Esplenomegalia	6	15,7
Adenopatías cervicales o inguinales	6	15,7
Ensanchamiento mediastinal	3	7,8
Fiebre	2	5,0
Otros	9	23,0

Todos los pacientes, excepto uno, tuvieron blastos en el extendido de sangre periférica cuando se les hizo el hemoleucograma (Tabla 3).

La sospecha diagnóstica de LLA fue confirmada con un aspirado de médula ósea, si había infiltración de más de 30% de blastos compatibles con linfoblastos y coloración citotóxica de Sudán Negro B negativa (3, 8).

Los aspirados de médula ósea fueron casi siempre hiper celulares, sin contenido de grasa y las células hematopoyéticas normales notablemente escasas o ausentes. Sólo hubo necesidad de repetir los aspirados en las leucemias de morfología dudosa y cuya celularidad no era representativa para hacer un diagnóstico morfológico adecuado. En estos casos, el inmunofenotipo fue la herramienta tecnológica más importante para identificar el linaje de la clona maligna.

Los pacientes con diagnóstico de LLA confirmado por aspirado de médula ósea se estudiaron con los AcMo CD 10 (también conocido como CALLA), CD 19 y CD 20 para linaje B y con CD 2 y CD 7 para linaje T.

Los resultados de la clasificación FAB e inmunológica se presentan en la Tabla 4.

Clasificación FAB: la lectura del aspirado de médula ósea de los pacientes con diagnóstico de LLA, mostró un

Tabla 3. Resultados del hemoleucograma de los niños con sospecha de LLA.

Hemoleucograma	Valor mínimo	Valor máximo	Mediana
Hemoglobina (gm%)	4,2	14,5	7,6
Hematocrito (%)	12,8	46,6	24,3
G. Rojos (mm ³)	1.290.000	5.580.000	2.910.000
Leucocitos (mm ³)	2.600	1.060.000	40.000
Plaquetas (mm ³)	8.000	134.000	31.000
Blastos en sangre periférica (%)	0	100	82

Tabla 4. Clasificación morfológica FAB y marcadores inmunológicos en niños con diagnóstico de leucemia aguda.

Paciente No.	Clasificación FAB	Marcadores inmunológicos
1	L1	CD19 CD20
2	L1	CD10
3	L1	CD10 CD19
4	L2	CD2 CD7
5	L1	CD19
6	L1	CD10 CD19
7	L2	CD2 CD7
8	L1	CD2
9	L1	CD19
10	De difícil interpretación	CD41
11	L1	CD19
12	L1	CD10 CD19
13	L2	CD2 CD7
14	L1	CD10 CD19
15	L1	CD10 CD19
16	L1	CD10 CD19
17	L1	CD10 CD19
18	L1	CD2 CD7
19	L1	CD10 CD19
20	L1	CD10 CD19
21	L1	CD19
22	L1	CD10 CD19
23	M2	CD13
24	L1	CD10 CD19
25	L1	CD10 CD19
26	L1	CD10 CD19 CD20
27	L1	CD2 CD7
28	L1	CD19
29	L1	CD10 CD19 CD20
30	L1	CD10 CD19
31	L1	CD10 CD19
32	L1	CD10 CD19
33	L1	CD19 CD20
34	M4	CD13
35	De difícil interpretación	CD13
36	M4	CD13
37	L2	CD10 CD19 CD20
38	De difícil interpretación	CD41

predominio franco de la morfología L1, encontrada en 28 pacientes, lo que corresponde al 73,7% del total de la muestra. La morfología L2 se encontró en cuatro pacientes (10,5%). No hubo ningún caso con morfología L3. Seis pacientes (15,8%) tuvieron una morfología dudosa en el momento del diagnóstico con coloración Sudán Negro B negativa, lo que hizo que se incluyeran en el estudio para identificar de cuál tipo de leucemia se trataba.

Marcadores inmunológicos: el marcador CD 10 (CALLA) fue positivo, bien sea de manera independiente o acompañado de CD 19, CD20 o ambos en 49,9% de los niños con leucemia aguda, y en 59,3% de los niños con LLA. Los pacientes negativos para CD 10 y positivos para CD 19, CD20 o ambos correspondieron a 18,5% de las leucemias agudas de la infancia y a 21,9% de las LLA en los niños. Por lo tanto existe una diferencia estadísticamente significativa entre las LLA CALLA positivas y las CALLA negativas (Tabla 5).

Los seis pacientes con morfología dudosa y coloración Sudán Negro B negativa que fueron estudiados para inmunofenotipo con el fin de definir a qué linaje pertenecían, reaccionaron con los siguientes AcMo: CD 13 en 4 de ellos (10,5%), correspondiendo a una M5 según la clasificación FAB, ya que fueron negativos para el CD33, lo que descarta el componente mieloide y CD41 en los otros dos pacientes (5,3%), AcMo que marca la glicoproteína IIb/IIIa de las plaquetas y por lo tanto corresponde a una leucemia M7 (megacarioblástica) según la clasificación FAB.

Tabla 5. Frecuencia de los diferentes marcadores (AcMo) encontrados en los niños con leucemia aguda.

Marcadores (AcMo)	Pacientes	Frecuencia (%)
CD10	1	2,6
CD10 CD19	15	39,4
CD10 CD19 CD20	3	7,9
CD19	5	13,2
CD19 CD20	2	5,3
CD2	1	2,6
CD2 CD7	5	13,2
CD13	4	10,5
CD41	2	5,3
Total	38	100,0
P : 0,002		

Tabla 6. Clasificación de acuerdo al linaje de las leucemias agudas.

Linaje	Pacientes	Frecuencia (%)
Pre B temprana	20	52,6
Pre B	7	18,4
T	5	13,2
Monocítica (M5)	4	10,5
Megacarioblástica (M7)	2	5,3
Total	38	100,0

Tabla 7. Correlación de la clasificación FAB con el inmunofenotipo en niños con LLA.

Inmunofenotipo de las LLA	Clasificación FAB					
	L1		L2		L3	
	n	%	N	%	N	%
Pre B temprana	18	56,2	1	3,1	0	0,0
Pre B	7	21,9	0	0,0	0	0,0
T	3	9,4	3	9,4	0	0,0
P : 0,01						

De acuerdo con la ontogenia del linfocito y para una mejor clasificación de las LLA, se establecieron los siguientes subgrupos:

Pre B temprana (pre-pre B): si fue positiva con CD 10.

Pre B: positiva para CD 19, CD20 o ambos, pero negativa para CD 10.

Leucemia de células T: positiva para CD 2 , CD 7 o ambos (Tabla 6).

Todos los pacientes de linaje B tuvieron morfología L1 excepto uno que fue L2, lo que tiene significancia estadística (Tabla 7). Entre los seis pacientes de linaje T tres tuvieron morfología L1 y tres fueron L2.

Discusión

La LLA es la leucemia más común de la infancia, representando alrededor de 80% de los casos. En este estudio se incluyeron 34 pacientes con diagnóstico de LLA (84,2%) y los otros seis pacientes (15,8%) correspondieron a leucemias mieloides (LMA), a los que se les hizo la clasificación inmunofenotípica para identificar adecuadamente el linaje de la clona maligna y poder establecer un tratamiento y pronóstico adecuados. De estos seis pacientes con LMA, cuatro (10,5%) fueron positivos para el marcador CD 13 y negativos para el CD33, lo que indica una población compuesta exclusivamente por células de estirpe monocítica (M5). Los otros dos pacientes (5,3%), a los que se debió efectuar más de un aspirado para poder hacer el diagnóstico ya que su morfología y clínica eran confusas, marcaron con el CD41 y por tanto se trató de leucemias megacarioblásticas (M7). El diagnóstico de este tipo de leucemia no puede hacerse con base en criterios morfológicos únicamente y sólo la citometría de flujo láser o la microscopía electrónica permiten una correcta identificación de esta clona maligna, que antes era erróneamente clasificada dentro de las leucemias indiferenciadas (M0), o como M1.

El uso de la citometría de flujo láser y de los AcMo ha permitido aclarar la heterogeneidad celular de la LLA. Cerca de 80% de los casos de LLA son de linaje B y 20% de linaje T (9). Los linfoblastos de linaje B se pueden encontrar en cualquiera de los estadios de desarrollo de la célula B, pero la mayoría de ellos se encuentran en los estados más tempranos de desarrollo, como son el pre B temprano y el pre B, localizados antes de que aparezca la síntesis de inmunoglobulinas (Igs) (9).

En este estudio, 18 pacientes se clasificaron como leucemias pre B tempranas, ya que fueron positivos para el marcador CD 10, solo o acompañado de CD 19, CD20 o ambos. Para algunos investigadores el Ag CALLA tiene significado pronóstico favorable en la población pediátrica, pero no en la adulta (7, 10).

Siete pacientes se clasificaron como leucemia de células pre B ya que fueron negativos para el antígeno CALLA (CD 10) y positivos para el CD 19, solo o acompañado por el CD20. Su significancia pronóstica y correlación con el

grupo CALLA positivo de nuestro estudio está aún por esclarecer.

En la LLA de linaje T, los linfoblastos corresponden a estados anteriores a la aparición de los antígenos CD4 o CD8 (9). Se estudió el linaje T con los marcadores CD2 y CD7. Otros marcadores que también son usados para las células T son el CD5 y el CD3c. En este estudio seis pacientes (18,8%) fueron T, tres con morfología L2 y tres con morfología L1. A pesar de que es una población muy pequeña de pacientes con linaje T, en la literatura está descrito que las leucemias T pueden tener morfología L1 o L2 (6).

La frecuencia de LLA L2 es más alta en adultos y niños mayores y se sabe del peor pronóstico en estos grupos de edad (9). Con la leucemia T se han asociado recuentos de leucocitos más altos al comienzo de la enfermedad y que progresan rápidamente, masa mediastinal que puede llevar a un síndrome de dificultad respiratoria y obstrucción de la vía aérea, linaje mixto, poca respuesta a la terapia de inducción y por lo tanto, baja tasa de remisión completa (9, 11). La importancia relativa dada a cada factor pronóstico varía entre los diferentes investigadores (12).

La leucemia de células T es considerada un factor pronóstico desfavorable en la mayoría de los protocolos de tratamiento. Por lo tanto, algunos grupos consideran que estos pacientes requieren protocolos de tratamiento más intensos (9). De ahí la importancia de clasificar adecuadamente el linaje de la LLA desde el momento mismo del diagnóstico, ya que cualquier error sería de consecuencias funestas para el paciente.

La clasificación de las leucemias basándose exclusivamente en el sistema FAB tiene problemas debido a que se necesita un especialista en morfología con amplia experiencia, y aun así, faltan criterios cuantitativos y reproducibles lo que dificulta la concordancia entre diferentes observadores, para todas las leucemias diferentes de la L1. La concordancia entre los morfólogos ha variado de 58% a 87%, pero se incrementa a 99% cuando la citoquímica y el inmunofenotipo se añaden a la clasificación morfológica (11,13).

No siempre la morfología L1 está asociada a un mejor pronóstico para el paciente (6, 11). Efectivamente, hubo tres pacientes con morfología L1 que fueron de linaje T y esto los pone en un grupo de riesgo alto (pronóstico desfavorable).

La mejor correlación entre el inmunofenotipo y la morfología FAB ocurre con la L3 y la leucemia/linfoma de células B, con Igs en su superficie, generalmente IgM (9). Esta es la leucemia de peor pronóstico en la infancia, pero afortunadamente constituye menos de 1% de las LLA de los niños (9).

El inmunofenotipo no debe considerarse de manera independiente, sino correlacionarse con hallazgos clínicos como la afección mediastinal, del sistema nervioso central o de otros órganos extramedulares, y de laboratorio como el recuento de leucocitos al comienzo del tratamiento, la

citoquímica y la inmunohistoquímica, para asignar el pronóstico de manera más certera (11).

Además del inmunofenotipo, estudios complementarios como la citogenética y el índice de ADN están siendo usados actualmente para mejorar los protocolos de tratamiento y ofrecer protocolos más "personalizados", de acuerdo con factores de riesgo adicionales a la edad, con el recuento de leucocitos y la morfología según FAB. Para poder llegar a este punto hay que unificar los criterios de información y reporte de los hallazgos en el momento del diagnóstico (factores pronósticos), con cobertura nacional e inclusive conformando grupos cooperativos internacionales (1,10).

En el informe final del Primer Consenso Latinoamericano para Inmunofenotipo por Citometría de Flujo Láser en Leucemias, realizado en Puebla, México, en 1996, en el que participaron representantes de diez países latinoamericanos, se hicieron las siguientes recomendaciones para las leucemias agudas:

- Para definición de linaje se recomienda como mínimo el uso de dos AcMo para la leucemia aguda de células B, otros dos para la leucemia aguda de células T y dos más para las leucemias mieloides agudas.
- En caso de duda deben incluirse dos o tres AcMo adicionales.
- Los participantes estuvieron de acuerdo en que la positividad de CD 10 (CALLA) puede tener implicaciones pronósticas y por lo tanto éste debería ser incluido en todas las subclasificaciones de LLA de la infancia (10).

En nuestra opinión es todavía muy temprano para sacar conclusiones acerca del comportamiento y la sobrevida de los pacientes positivos para CALLA comparados con las otras subpoblaciones de LLA. Cuando haya transcurrido un período de tiempo adecuado, sería deseable observar si hay alguna diferencia entre estos subgrupos en la población pediátrica.

Summary

Objective: the purpose was to establish the immunophenotyping for childhood acute lymphocytic leukemia (lla) and their correlation with the FAB classification.

Design: descriptive study.

Patients: the study included 38 patients -21 boys and 17 girls- in whom childhood acute lymphocytic leukemia was suspected who consulted at the Hemato-Oncology Service at University of Antioquia and San Vicente de Paul Hospital, between october 1996 and march 1998.

Measurements: analysis of bone marrow aspirates with Sudan black B staining were made using the French-American-British classification (FAB) of acute leukemias.

Immunophenotyping was made by flow cytometry utilizing monoclonal antibodies (moabs) cd 10, cd 19, cd20, cd2 and cd7.

Results: childhood lymphocytic leukemia lla diagnosis was confirmed in 32 patients, 26 with 11 FAB morphology

and 6 with 12 FAB morphology; 81,2% of b lineage and 18,8% of t lineage. Six patients without lymphoid lineage were identified by cl3 and cd41 moabs.

Conclusion: emphasis is given to the need for correct identification of malign clone right from the diagnosis due to the poor prognosis of the t lineage 11a.

Key-words: immunophenotyping, citometry, monoclonal antibodies, fab classification.

Referencias

1. **Kipps TJ.** The cluster of differentiation (CD) antigens. En: Williams WJ, ed. Hematology. 5th ed. New York: Mc Graw Hill;1995: 113-140.
2. **Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al.** Proposals for the classification of the acute leukemias French - American - British (FAB) cooperative group. *Br J Haematol* 1976;**33**:451- 458.
3. **Vives JL, Aguilar JL.** Manual de técnicas de laboratorio en hematología. 1 a. ed. Barcelona: Salvat; 1987: 14-15.
4. **Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al.** Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7). A report of the French - American-British cooperative group. *Ann Intern Med* 1985; **103**: 460-462.
5. **Crist WM, Grossi CE, Pullen DJ, Cooper MD.** Immunologic markers in childhood acute lymphocytic leukemia. *Seminars Oncology* 1985; **12**: 105.
6. **Pallister C.** Blood: physiology and pathophysiology. 1st ed. Oxford: Butterworth-Heinemann; 1994: 325-354.
7. **Ruiz-Argüelles GJ, San Miguel JF.** Actualización en leucemias. 1 a. ed. México: Panamericana; 1996: 13-34.
8. **Stevens ML.** Fundamentals of Hematology. 1st ed. Philadelphia: Saunders Company; 1997: 110-114.
9. **Bitter MA, DiBella NJ.** Acute leukemia: classification and laboratory evaluation. Acute myelogenous and lymphocytic leukemia. En: Wood ME, Bunn PA Jr, eds. *Hematology Oncology Secrets*. 1st ed. Philadelphia: Hanley & Belfus Inc/Mosby; 1994: 109-118.
10. **Ruiz Argüelles A, Duque RE, Orfao A.** Report on the first latin american consensus conference for cytometric immunophenotyping of leukemia. *Cytometry (Comm Clin Cytometry)*. 1998; **34**: 39-42.
11. **Miller DR.** Blood Diseases of Infancy and Childhood. 7th ed. St Louis: Mosby; 1995: 660-696.
12. **Niemeyer Ch.M, Sallan E.** Acute lymphoblastic leukemia. En: Nathan D, Oski F, eds. *Hematology of infance and childhood*. 5th ed. Philadelphia: Saunders Company; 1998:1245-1260.
13. **Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al.** The morphological classification of acute lymphoblastic leukemia: concordance among observers and clinical correlations. *Br J Haematol* 1981;**47**:553.