



Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay

PROYECTO
ANII



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



SOCIEDAD LATINOAMERICANA DE ONCOLOGÍA VETERINARIA

Citometría de flujo al servicio de los pacientes oncológicos

DCV. MSc. Rosina Sánchez
FACULTAD DE VETERINARIA, UDELAR, URUGUAY

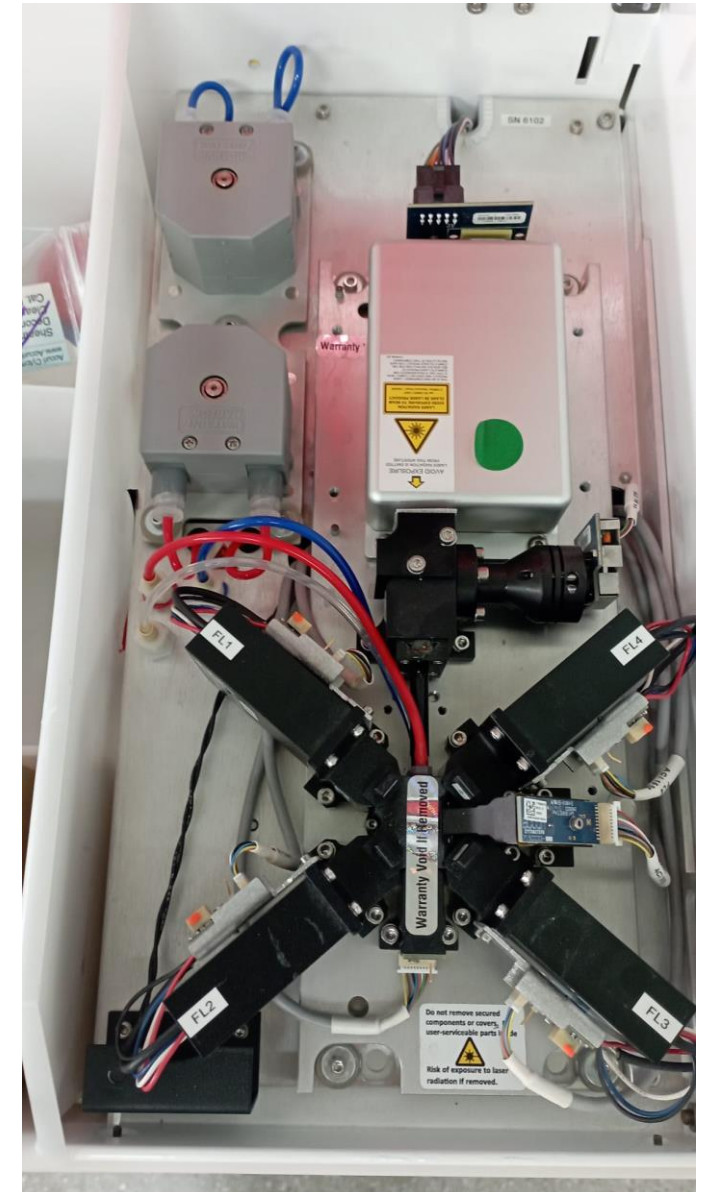
Bogotá, Colombia





DEPARTAMENTO DE CLÍNICAS
Y HOSPITAL VETERINARIO
FACULTAD DE VETERINARIA - UDELAR



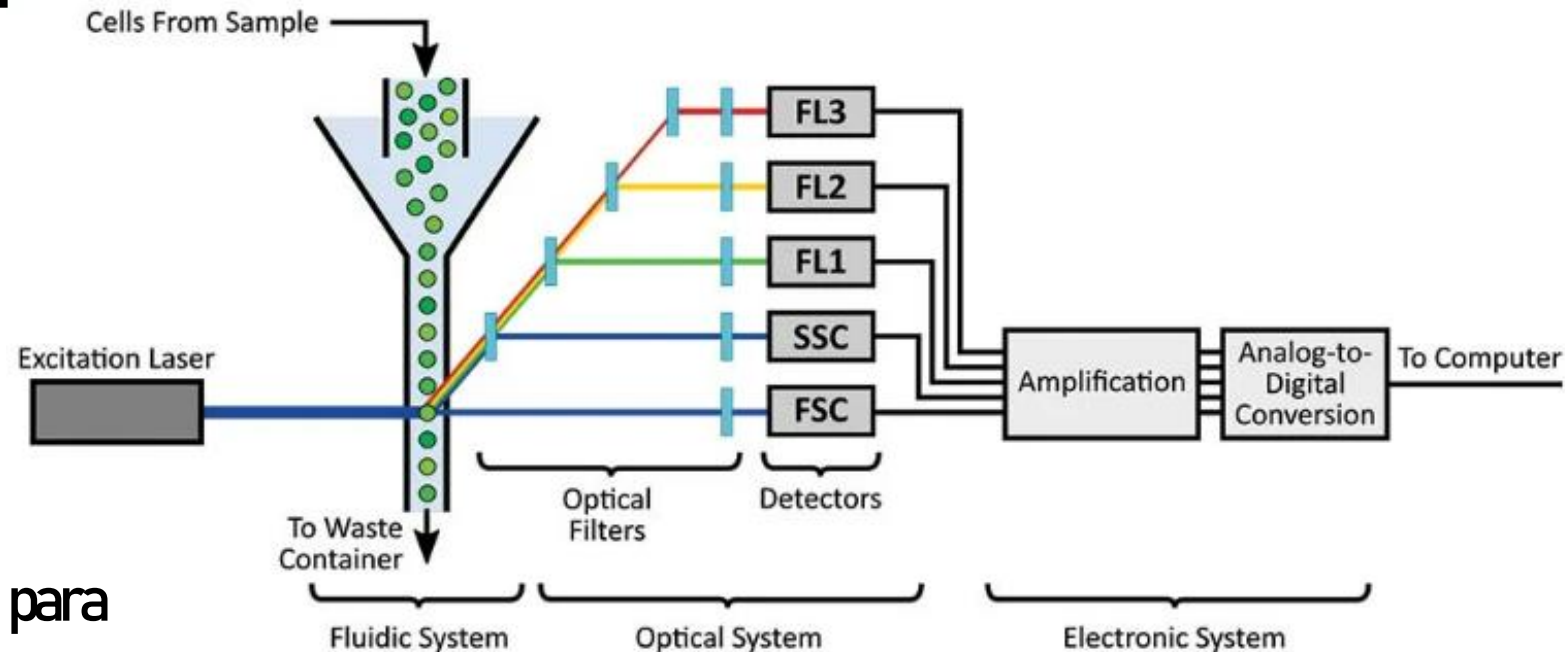


CITOMETRÍA DE FLUJO

Herramienta diagnóstica

Suspensión de partículas alineadas
que serán incididas por un láser

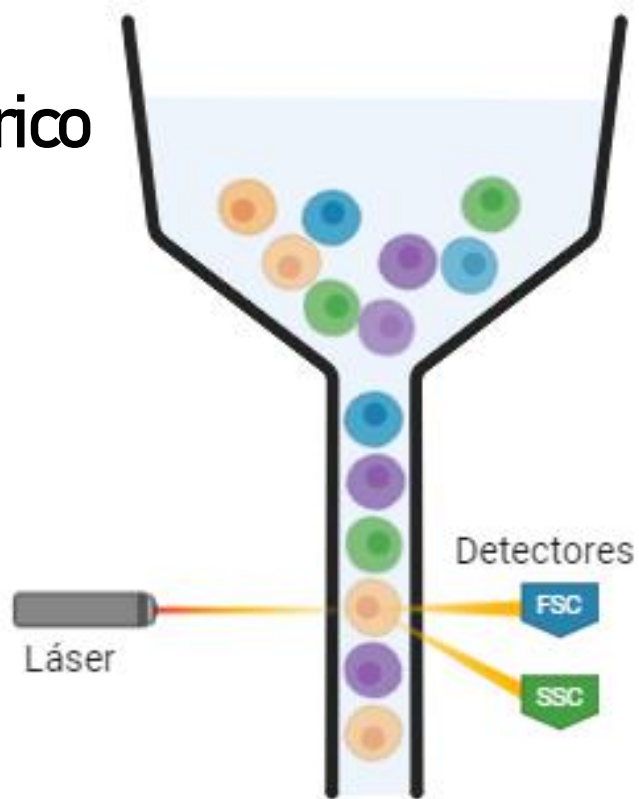
Dispersión de luz es detectada y procesada para
transformarla en una señal digital



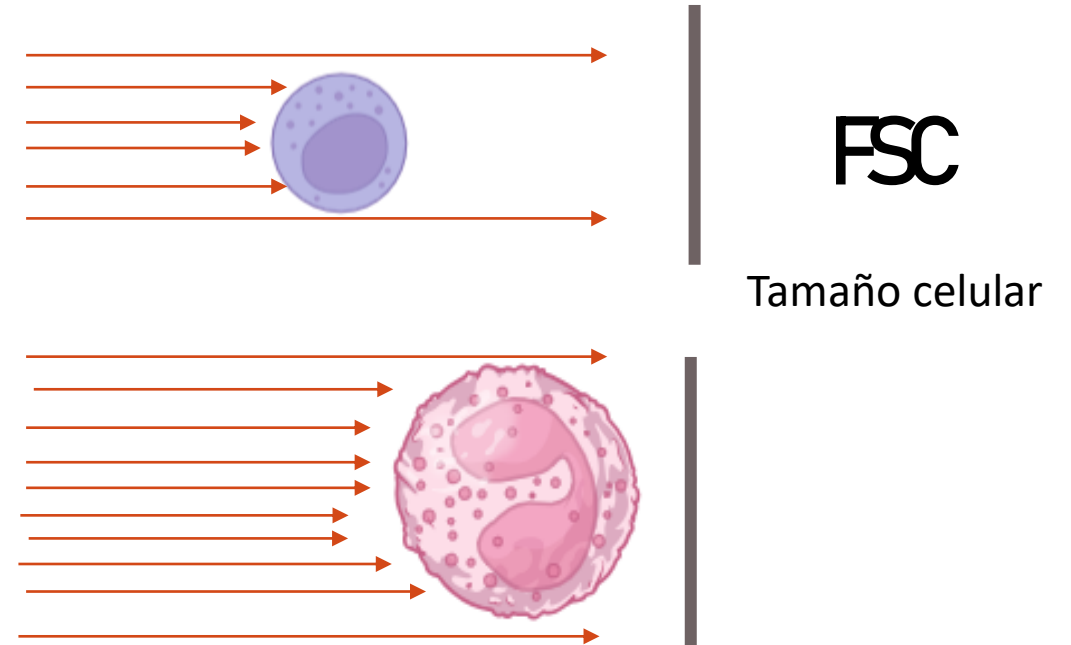
(Comazzi y Gelain, 2011; Aniolek y col., 2014 ; Sanchez y col., 2020)

CITOMETRÍA DE FLUJO

Método
multiparamétrico



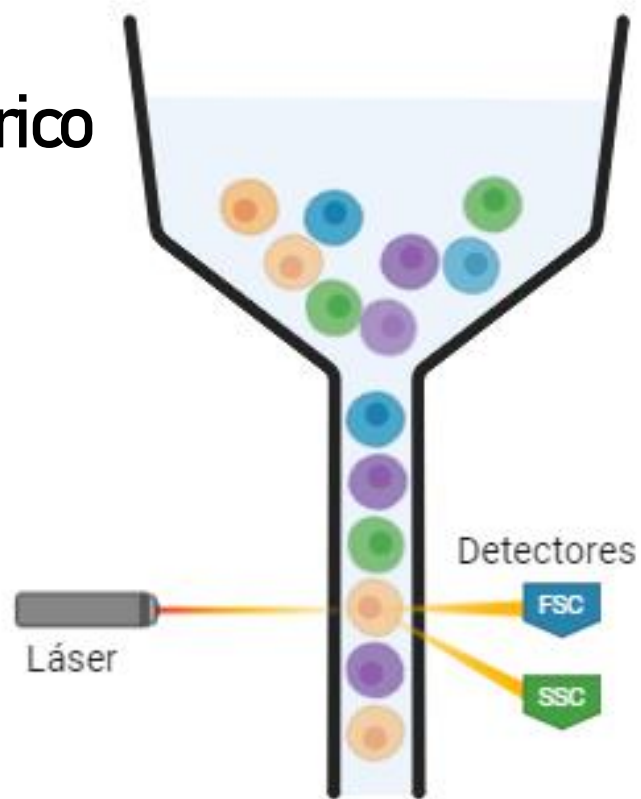
Diferente morfología:
diferente difracción de la luz



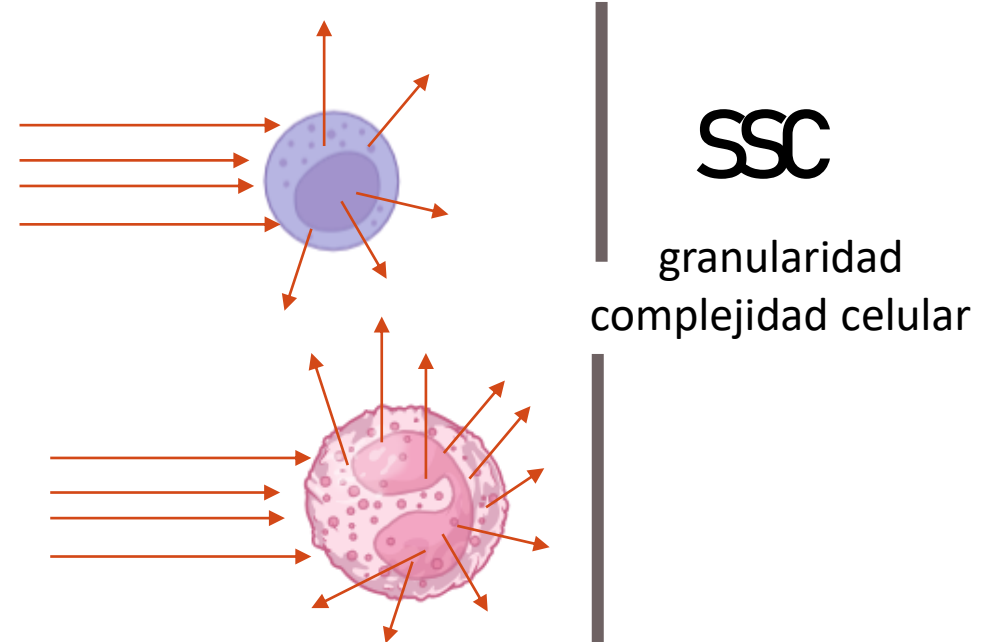
(Comazzi y Gelain, 2011; Aniolek y col., 2014 ; Sanchez y col., 2020)

CITOMETRÍA DE FLUJO

Método
multiparamétrico



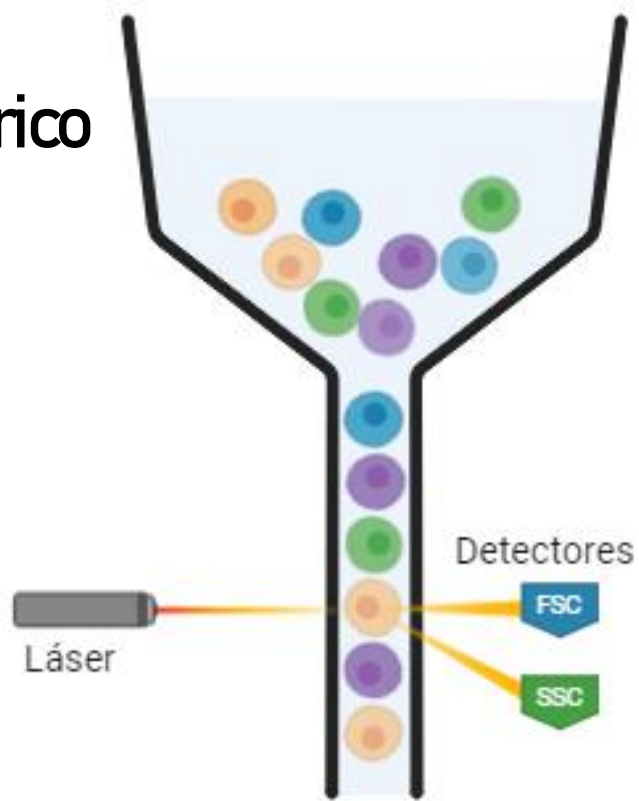
Diferente morfología:
diferente reflexión y refracción de la luz



(Comazzi y Gelain, 2011; Aniolek y col., 2014 ; Sanchez y col., 2020)

CITOMETRÍA DE FLUJO

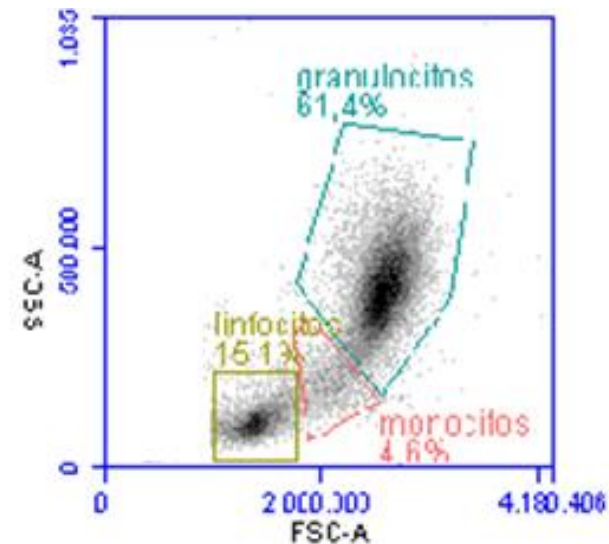
Método
multiparamétrico



FSC y SSC son únicos para cada tipo celular

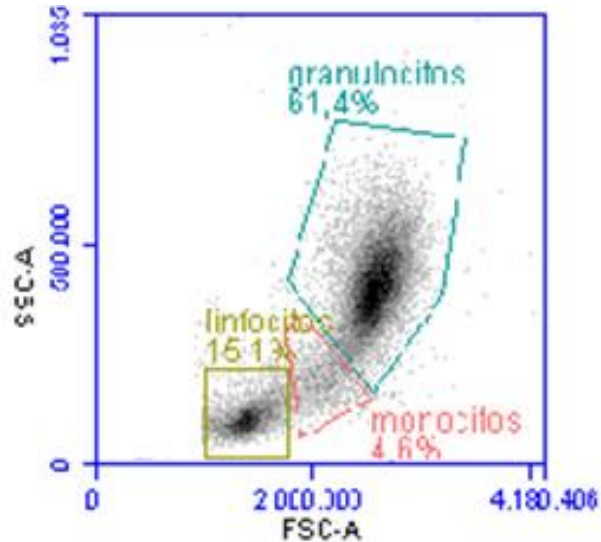


Combinados pueden identificar poblaciones en una
mezcla heterogénea

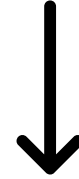


CITOMETRÍA DE FLUJO

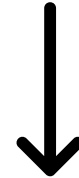
Método
multiparamétrico
Fluorescencia



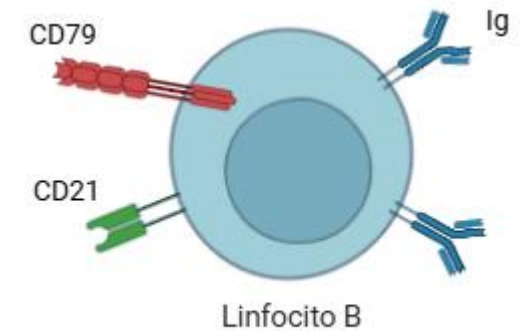
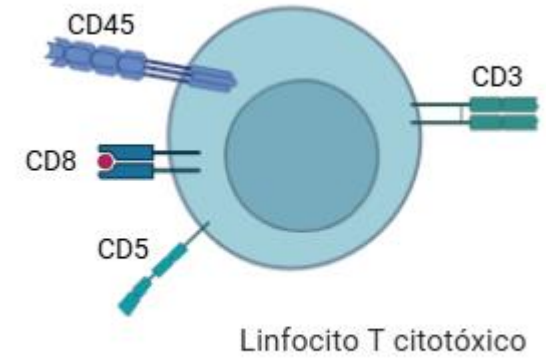
Cada linaje celular presenta un patrón
antigénico específico



Marcado con anticuerpos monoclonales
específicos



INMUNOFENOTIPO

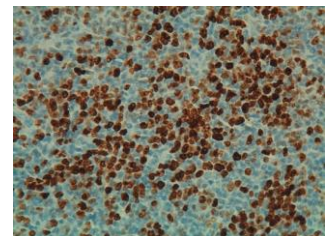


Identificación de **sub-poblaciones** celulares mediante el uso de **Anticuerpos** contra **moléculas** de superficie y/o intracitoplasmáticas

Proporciona información acerca de:

- ☼ Linaje celular (mieloide vs linfoide)
- ☼ Grado diferenciación
- ☼ Estado activación Inmunidad

También podría utilizarse IHQ



The diagram illustrates the differentiation of T cells. It starts with **Células tronco** (stem cells) in the bone marrow, which differentiate into **Progenitor Linfóide** (lymphoid progenitors). These progenitors migrate to the **Timo** (thymus), where they become **Linfócito T** (T lymphocytes). The thymus is shown as a yellow, textured organ. From the thymus, T cells can differentiate into various subsets, including **CD4** and **CD8** T cells. The diagram also shows a feedback loop where T cells can return to the bone marrow. A small map of Brazil is visible in the bottom right corner.

Antígenos **intracelulares** vs de superficie

USO EN COMBINACIÓN

CITOMETRÍA DE FLUJO



Tipo de muestra

Sangre periférica, linfonódulos

Médula ósea, Biopsia de tejido

Líquido pleural, ascítico, LCR

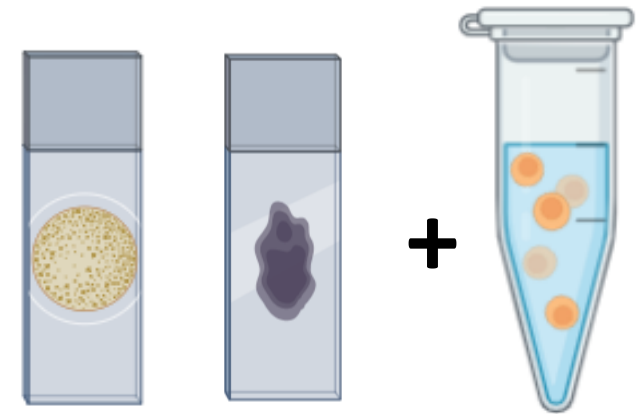
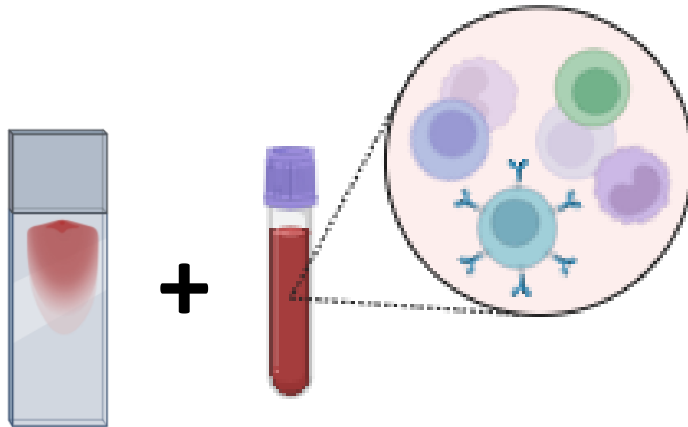
Suspensión
celular



Elección correcta del medio

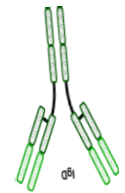
EDTA, PBS+EDTA

Suero fisiológico NaCl 0.9% + 10% suero del paciente, PBS, RPMI, RPMI+AZIDA Na+SFB
TRANSFIX



(Evans, 2023)

CITOMETRÍA DE FLUJO



Anticuerpo anti-CD21

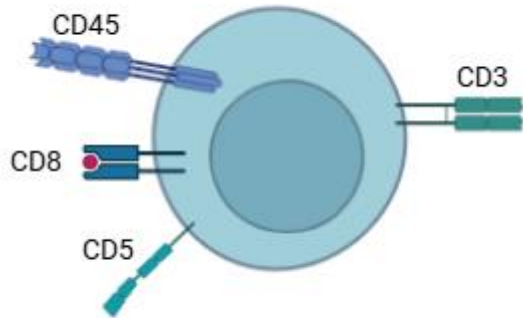
Fluorocromo



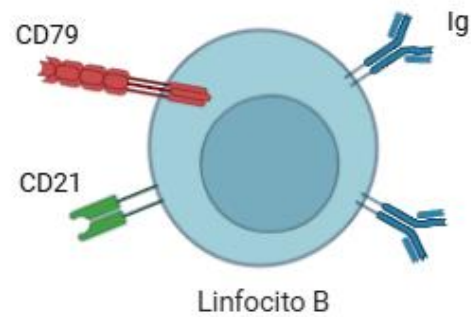
Fluorocromo



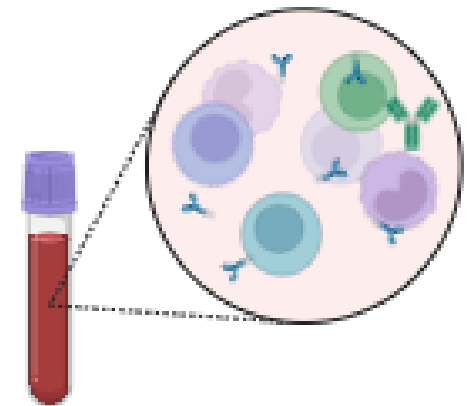
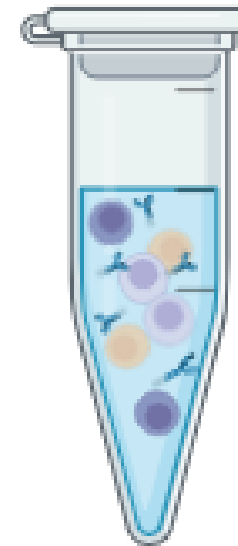
Anticuerpo anti-CD3



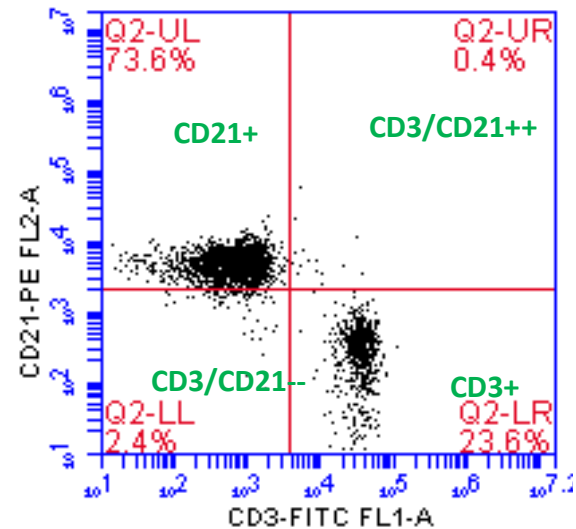
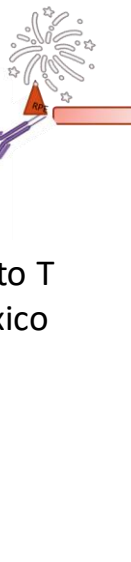
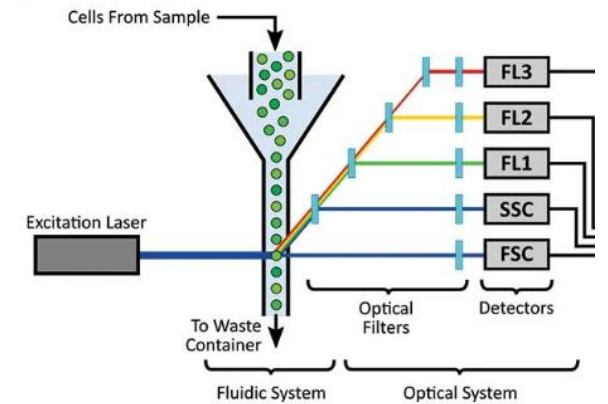
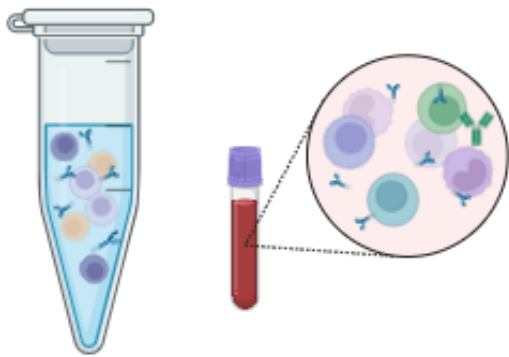
Linfocito T citotóxico



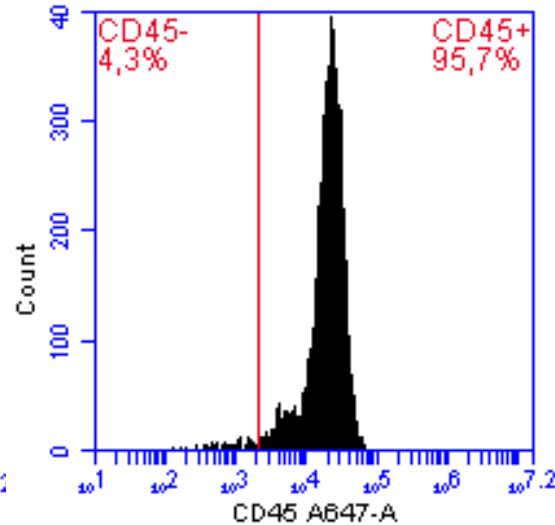
Linfocito B



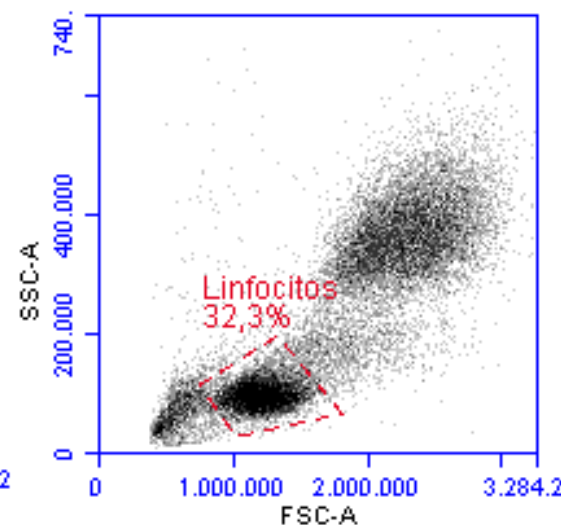
CITOMETRÍA DE FLUJO



Dot plot



Histograma



Ventajas



Facilidad en la toma de muestras

Determina en **TIEMPO REAL** las características de una población celular

Información de **MÚLTIPLES PARÁMETROS** para el análisis de las células individualmente

Analiza a alta velocidad gran cantidad de células, **RAPIDEZ** en obtención de resultados!

Alta sensibilidad para poblaciones celulares poco abundantes: 10^4 - 10^5

Desventajas



Costo de equipamiento, reactivos, anticuerpos

Viabilidad de las muestras

Conocimiento para la **interpretación** de resultados (inmunología, fisiopatología)

No aporta información acerca de la **arquitectura** del tejido

Método **destructivo** que no permite re-utilizar el material analizado (excepto sorting)

La información que podemos obtener por CF depende en gran medida de la **CALIDAD** de la muestra a analizar

NECESITAMOS CÉLULAS VIVAS



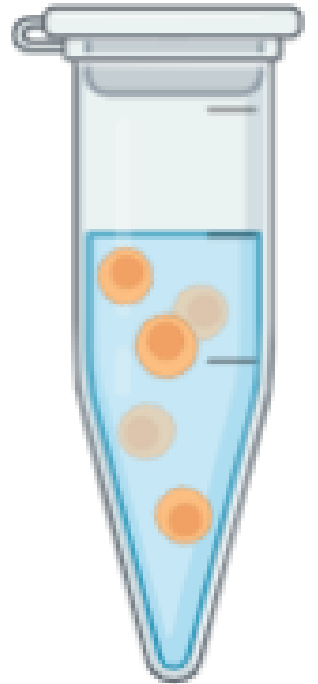
Refrigerada



Procesar dentro de las 24 (96) hs post extraída



Viabilidad celular

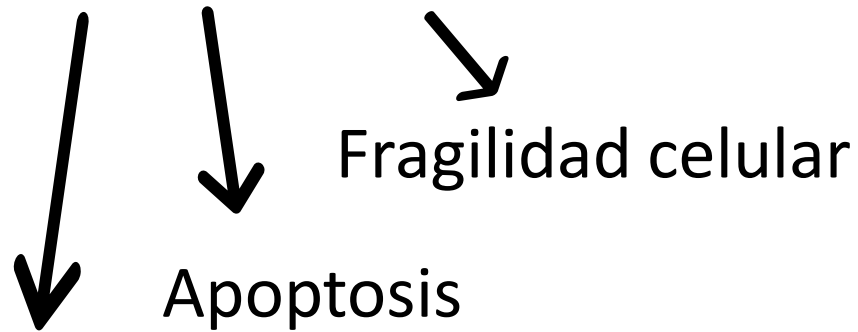


Tener en cuenta...



Fármacos administrados:

Glucocorticoides



Fragilidad celular

Apoptosis

Inhibición expresión de marcadores

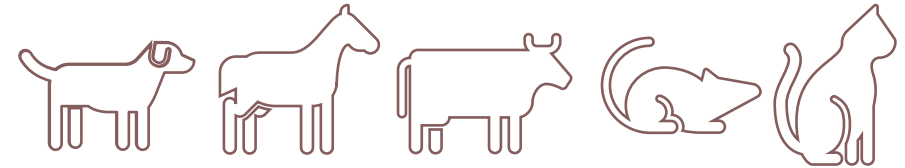
J Vet Intern Med 2006;20:1166–1171

The Effect of Glucocorticoids on Canine Lymphocyte Marker Expression and Apoptosis

M.A.G. Ammersbach, S.A. Kruth, W. Sears, and D. Bienzle

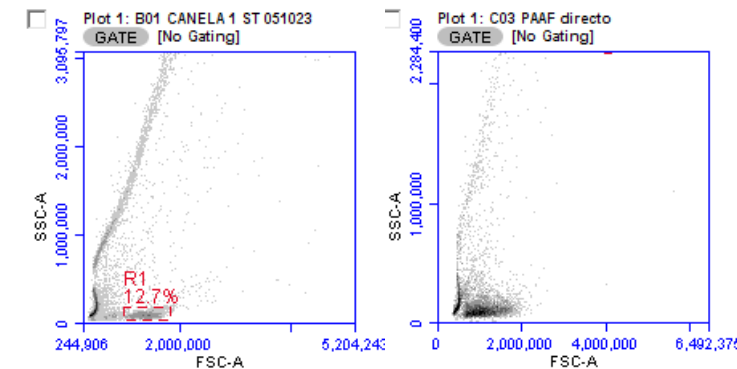
Each dog received 50 mg (range 1.66–2.24 mg/kg) of prednisone orally once a day for 3 consecutive days.

Especie:



Anticuerpos monoclonales específicos de especie
Reactividad cruzada

Ayuno



“serpentina” de lípidos

PRINCIPALES USOS DE LA CF EN ONCOLOGÍA VETERINARIA

¿Qué pacientes son candidatos?



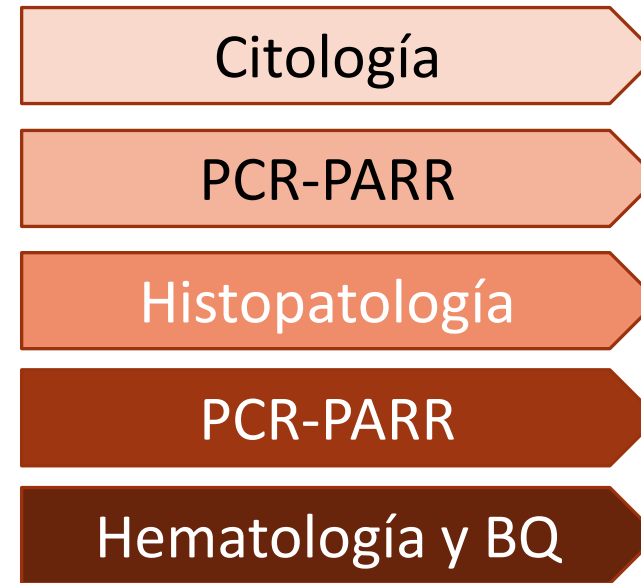
Citometría de flujo como herramienta complementaria!!

⊕ **No debe ser la primera opción de diagnóstico**

Alteraciones clinicopatológicas:

- Linfadenopatía generalizada
- Masas mediastínicas
- Efusiones cavitarias
- Linfocitosis persistente y marcada
- Presencia de blastos en SP
- Hipercalcemia
- Pancitopenia
- Hiperglobulinemia/Gammapatías
- Hepatomegalia
- Esplenomegalia

Oncohematología



La citometría de flujo no está indicada en pacientes con neutrofilia, eosinofilia, basofilia o monocitosis!!

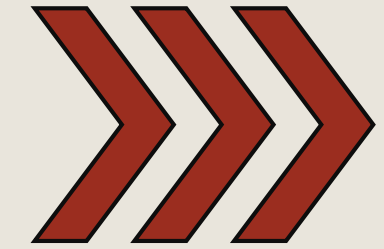
Mastocitomas, algunos desordenes histiocíticos, mieloma múltiple, linfomas extranodales ??

los marcadores disponibles actualmente no permiten un diagnóstico definitivo

(Martini y col., 2018; Evans, 2023)

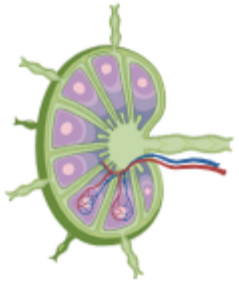
La Citometría se ha establecido como una herramienta indispensable en la Hemato-oncología, ya que permite realizar el diagnóstico, pronóstico y dirigir el tratamiento de leucemias y linfomas

**¿Cuál es el aporte de la CF en
el manejo clínico de los
pacientes oncológicos?**



Diagnóstico o aproximación al mismo





LINFOMAS

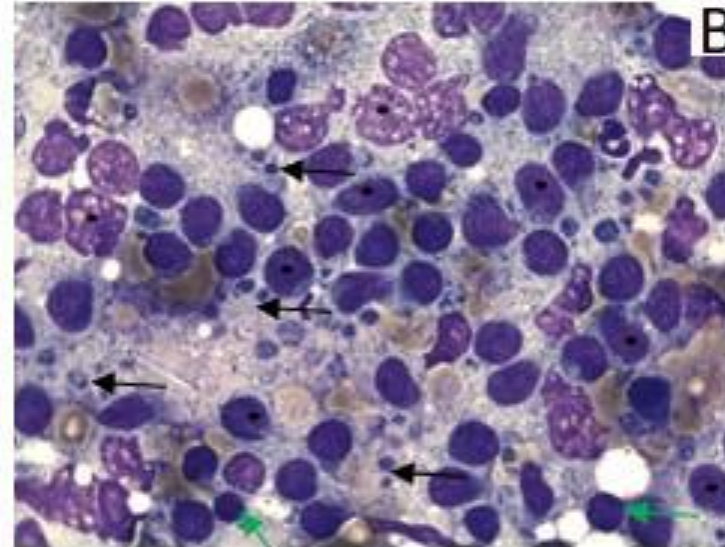
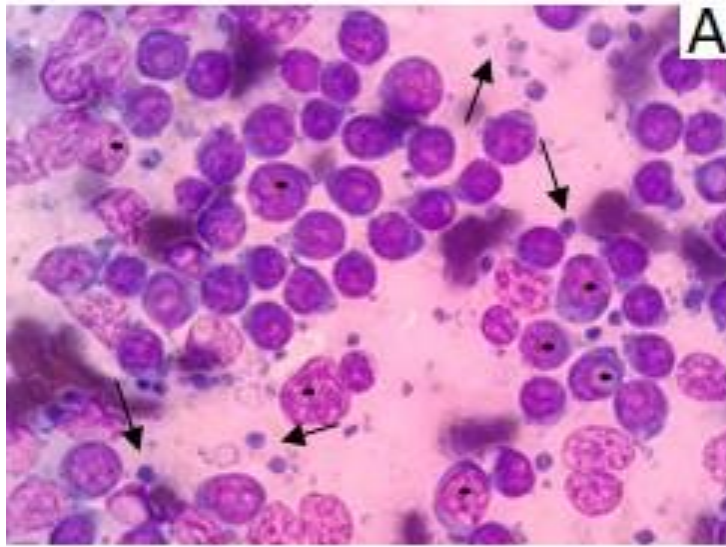
Tumor maligno **linfoide** que se origina en órganos sólidos (**linfonódulos**, hígado, bazo, piel, SNC, ojo, riñón, intestino)



Panel Diagnóstico



SIEMPRE PARTIMOS DE UN DIAGNÓSTICO CONFIRMADO



Tomado de Sánchez et al., 2020

STANDARD ARTICLE

Journal of Veterinary Internal Medicine **ACVIM**
Open Access American College of
Veterinary Internal Medicine

Performance of lymph node cytopathology in diagnosis and characterization of lymphoma in dogs

Valeria Martini¹ | Giuseppe Marano² | Luca Aresu³ | Ugo Bonfanti⁴ |
Patrizia Boracchi² | Mario Caniatti¹ | Francesco Cian⁵ | Matteo Gambini¹ |
Laura Marconato⁶ | Carlo Masserdotti⁷ | Arturo Nicoletti³ | Fulvio Riondato³ |
Paola Roccabianca¹ | Damiano Stefanello¹ | Erik Teske⁸ | Stefano Comazzi¹

Capaz de
diagnosticar el 85-
90% de los linfomas
(alto grado)
Dificultad en los de
bajo grado



SIEMPRE PARTIMOS DE UN DIAGNÓSTICO CONFIRMADO

ESTUDIO CITOLÓGICO

Descripción de la lesión: Linfonodo preescapular izquierdo

Técnica de biopsia: PAAF

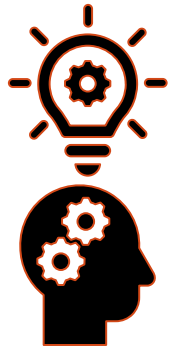
Tinción: T15

Evaluación celular: -

Obs: Citograma de aspecto linfoide constituido en su mayor porcentaje (70%) por elementos linfoides de alta talla, nucleolados, compatibles con linfoblastos. En la zona puncionada no se observaron elementos de origen extraganglionar

Interpretación Compatible con síndrome linfoproliferativo: linfoma. Se recomienda complementar con estudio de inmunofenotipo





Utilidad relacionada a recursos diagnósticos de cada clínico/ país

Tener en cuenta.. ¿qué quiero responder?

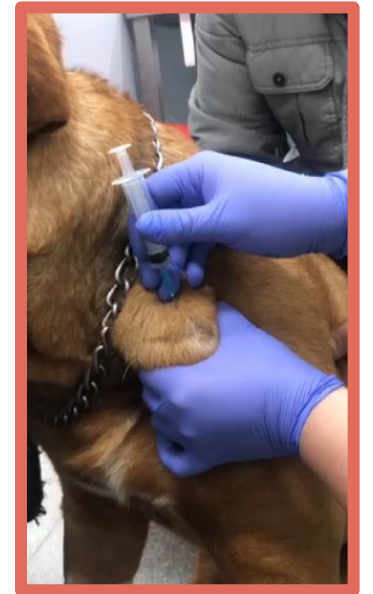
Diagnóstico o
aproximación al mismo

Tamaño celular

Inmunofenotipo

Aberraciones

Proliferación celular



No hay estudios que correlacionen Ki-67 y tamaño celular con tipo histológico

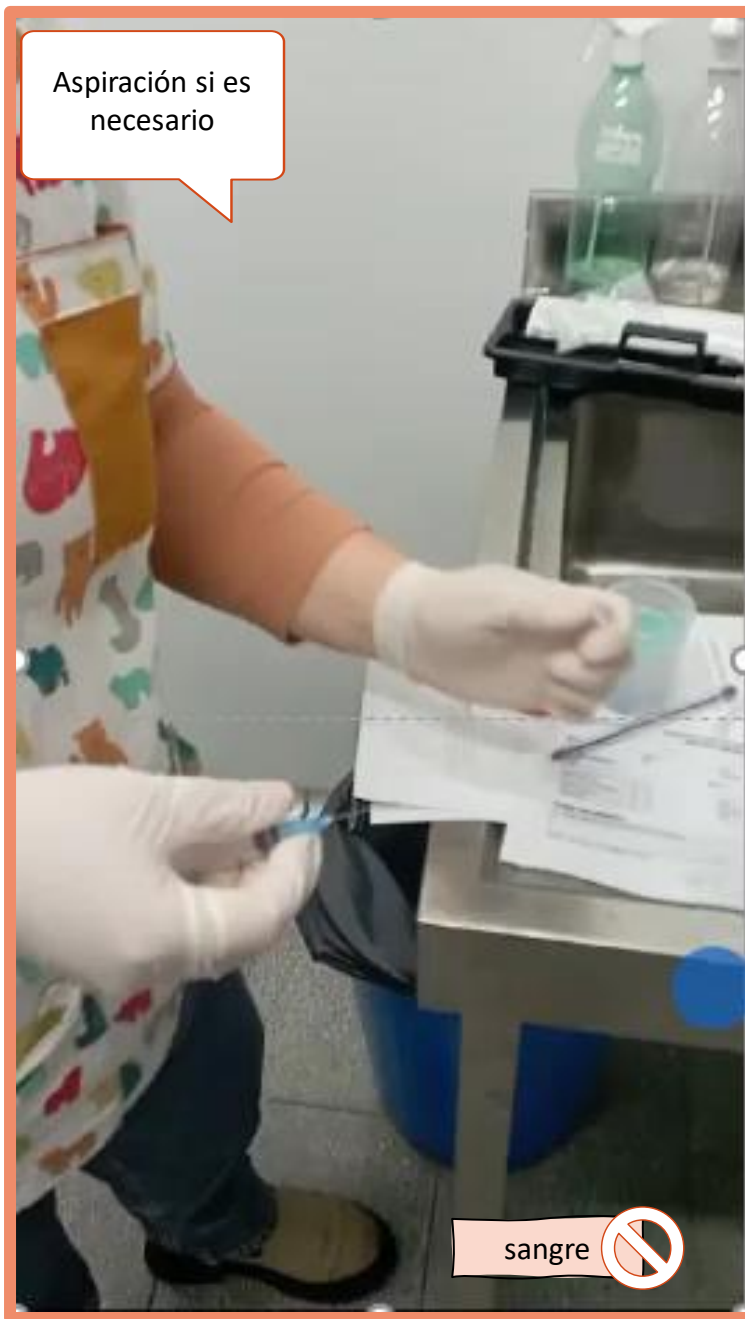
Evitar
submandibulares
+ 1 LN



citología



¿Cómo obtener la muestra?



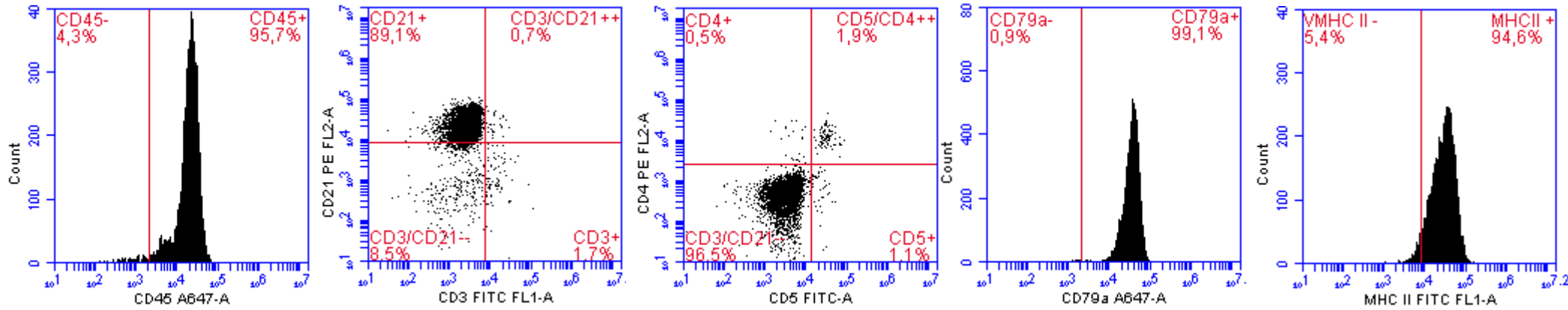
¿Cómo obtener la muestra?



¿Cómo obtener la muestra?

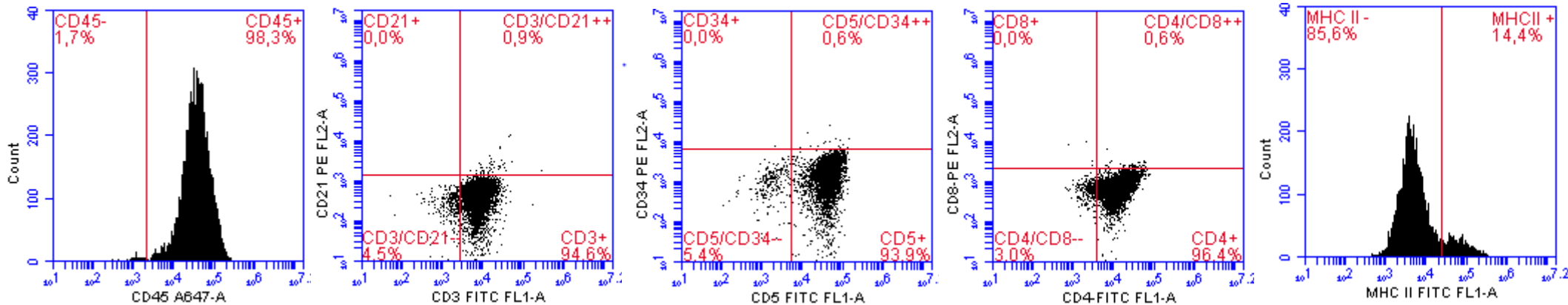
LINFOMA B

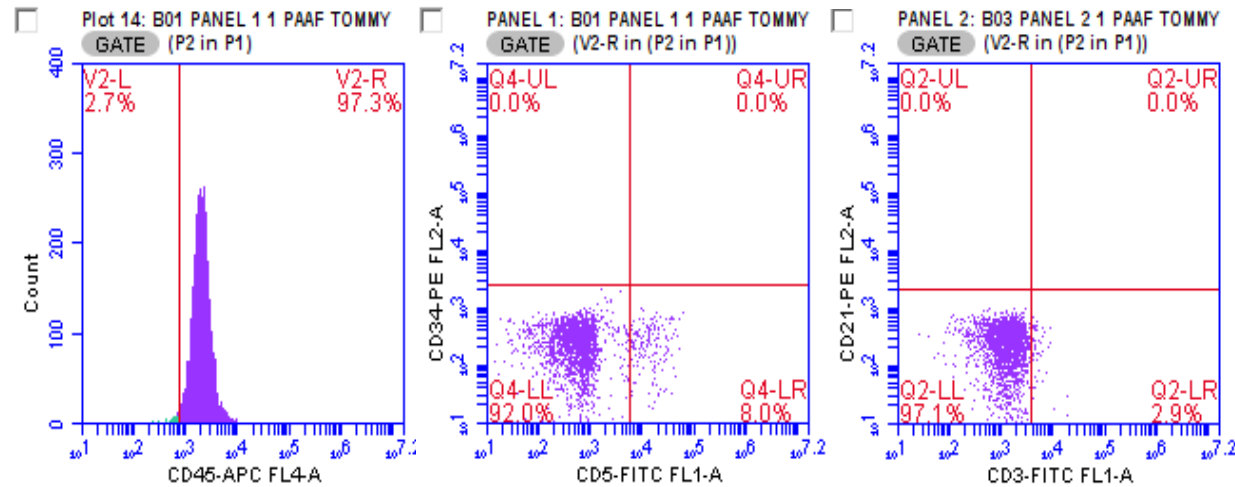
CD21+, CD79a+, CD45+,
MHCII+



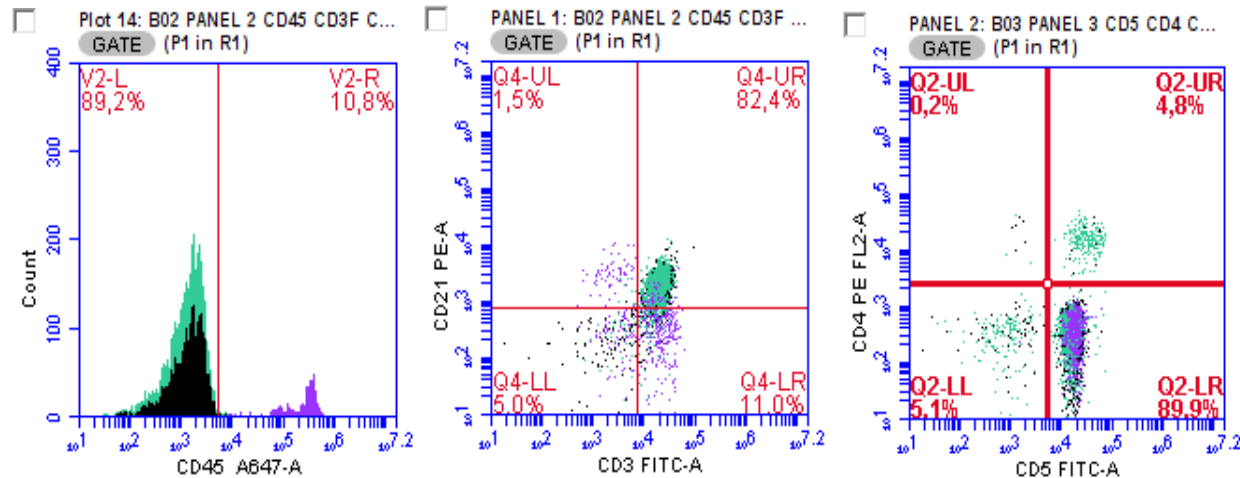
LINFOMA T

CD3+, CD5+, CD45+,
MHCII-, CD4 o CD8+





Linfoma null (CD45+, CD3-, CD5-, CD21-)



Linfoma aberrante (CD3/CD21++)

Aberraciones sinónimo de “pseudoclonalidad”



Review

Use of flow cytometric immunophenotyping to refine the cytological diagnosis of canine lymphoma

S. Comazzi*, M.E. Gelain

Department of Veterinary Pathology, Hygiene and Health, University of Milan, Via Celoria 10, 20133 Milan, Italy



Aberraciones

LINFOMAS B

Co-expresión marcadores T

CD34+

Baja expresión MHCII

Baja expresión CD79a

LINFOMAS T

Falta expresión CD3 o CD5

Co-expresión marcadores B

Pérdida o baja expresión MHCII

CD4/CD8++ CD4/CD8--



(Comazzi y Gelain, 2011; Martini y col., 2013; Avery y col., 2014; Pawlak y col., 2014; Riondato y Comazzi, 2021; Comazzi y Riondato., 2021; Celant y col., 2022)



Linfonodo reactivo

Hiperplasia	Neoplasia
Heterogéneas	Homogéneas (todas del mismo fenotipo)
Tamaño normal	Tamaño aberrante
Sin aberraciones fenotípicas	Fenotipos aberrantes
Aumentadas pero no tanto como las neoplásicas	Cantidades mucho mayores que la contraparte normal

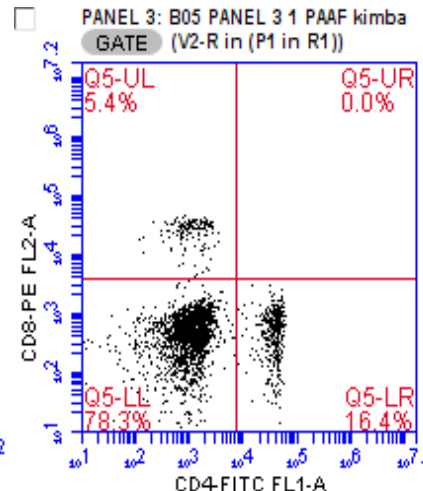
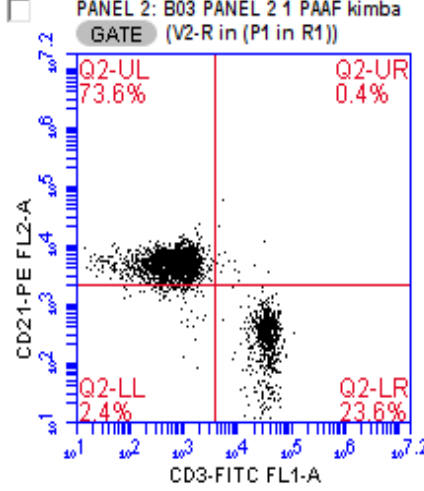
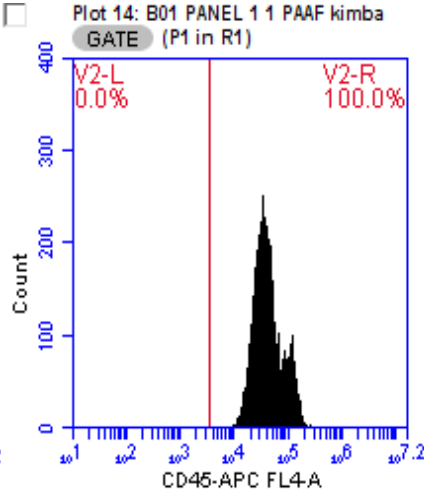
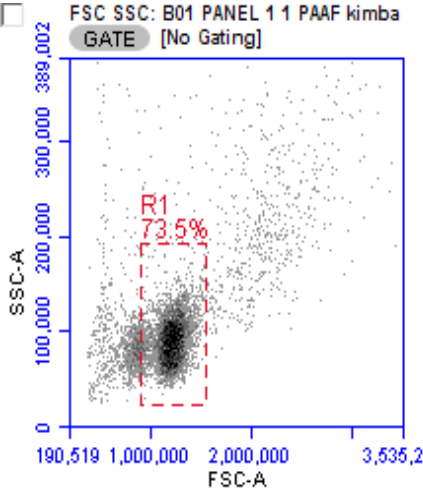
LINFOMA B
CD21+, CD79a+, CD45+,
MHCII+



LINFOMA T
CD3+, CD5+, CD45+,
MHCII-, CD4 o CD8+



Linfadenopatía
Linfocitosis



(Evans, 2023)

Masa mediastinal

J Vet Intern Med 2006;20:1161–1165

Diagnosis of Mediastinal Masses in Dogs by Flow Cytometry

Susan Lana, Susan Plaza, Kerri Hampe, Rob Burnett, and Anne C. Avery

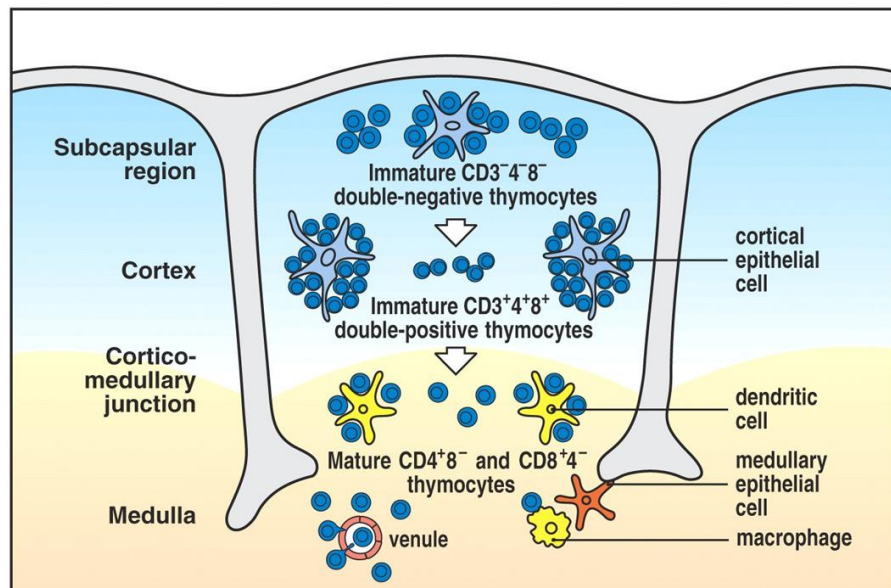
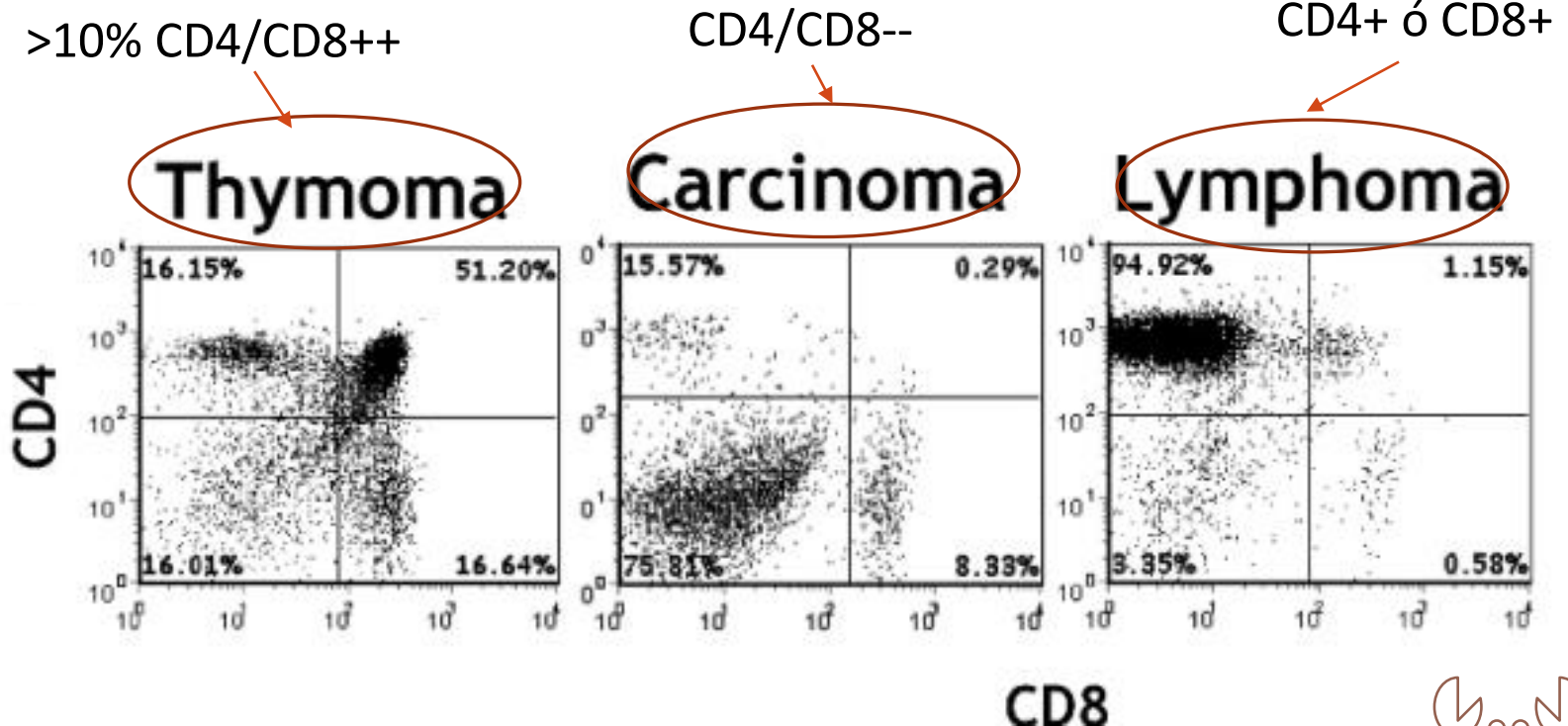
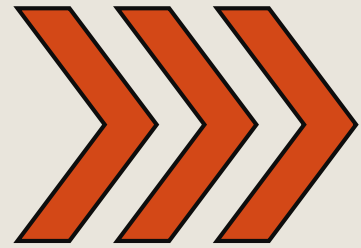


Figure 7-14 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

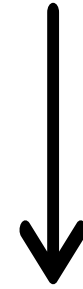




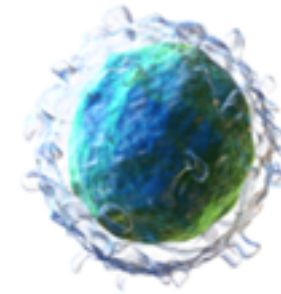
Estadificación pronóstica



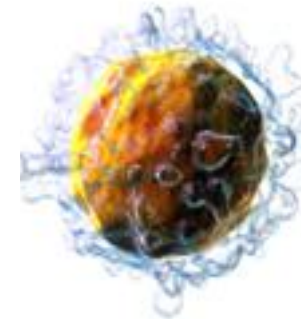
“El inmunofenotipo celular es el factor más importante asociado con el pronóstico”



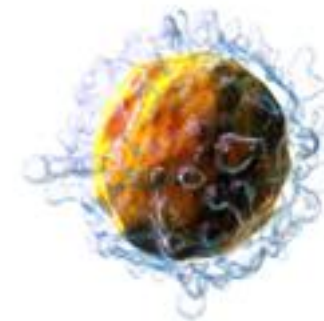
En las personas y en los perros : LT agresivos peor pronóstico que los LB, atribuible a características clínicas más adversas y una mayor incidencia de recaídas con menores tasas de respuesta completa al mismo tratamiento



Linfoma B



***Linfoma de
zona T***

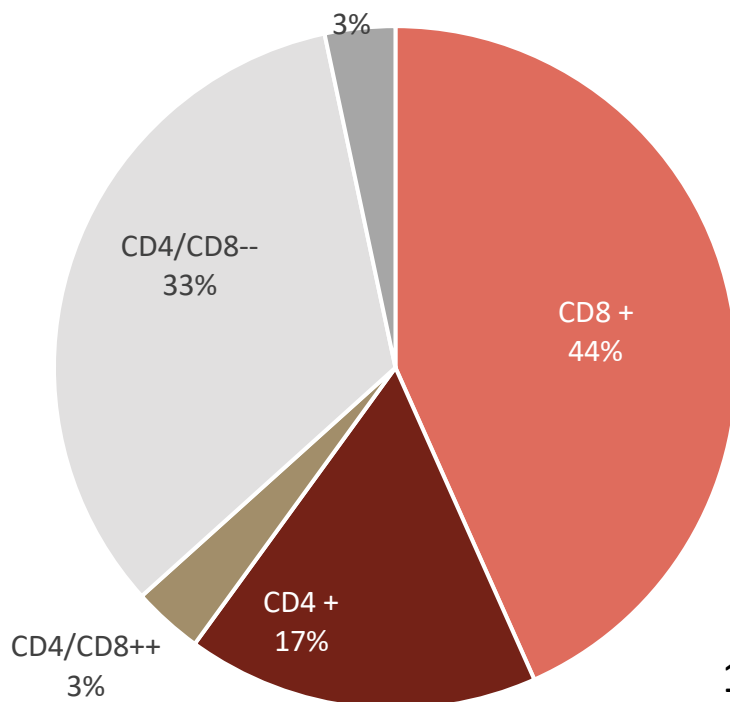
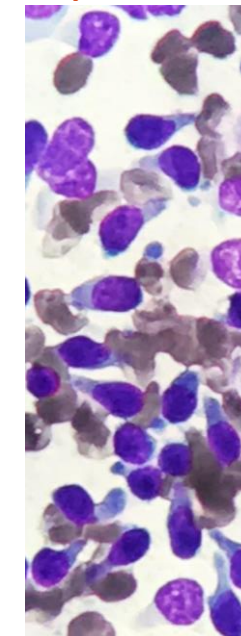
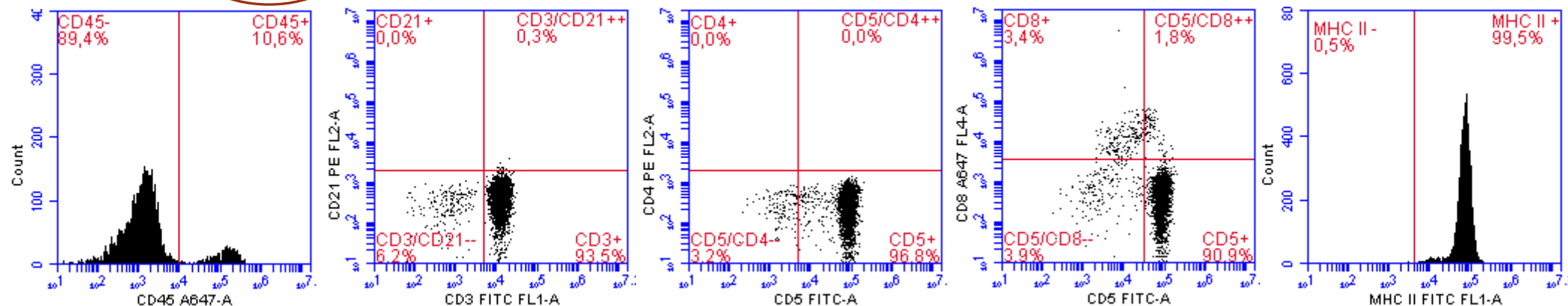


Linfoma T

HALLMARK DEL CÁNCER

CD45-, CD3+, CD5, **CD21+**, MHC II+, CD25+, **CD4/CD8 VARIABLE**

Estadificación pronóstica



16/30 Golden Retriever

ORIGINAL ARTICLE

Increased frequency of CD45 negative T cells (T zone cells) in older Golden retriever dogs

K. L. Hughes | J. D. Labadie | J. A. Yoshimoto | J. J. Dossey | R. C. Burnett | A. C. Avery

GR como raza predispuesta

Posibilidad de estado preneoplásico

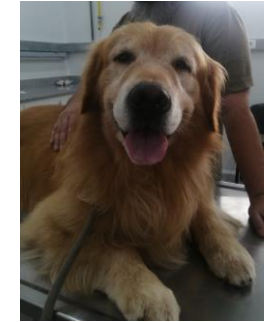
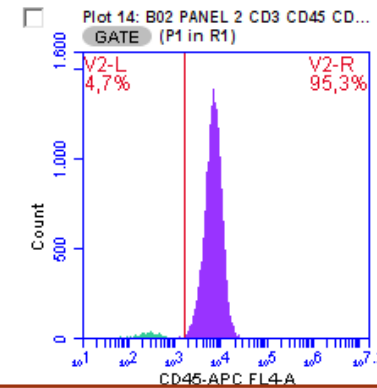
(Avery y col., 2014; Seelig y col., 2014; Martini y col., 2015)

LINFOMA T INDOLENTE

Interpretación

Obs: Citograma compatible con síndrome linfoproliferativo: posible linfoma de células en espejo de mano. Se recomienda complementar el diagnóstico con estudio de inmunofenotipo.

CD45+ y comportamiento clínico indolente



CASE REPORT

WILEY *Veterinary Clinical Pathology*
An International Journal of Laboratory Medicine

A case of canine high-grade T-cell lymphoma
immunophenotypically consistent with T-zone lymphoma

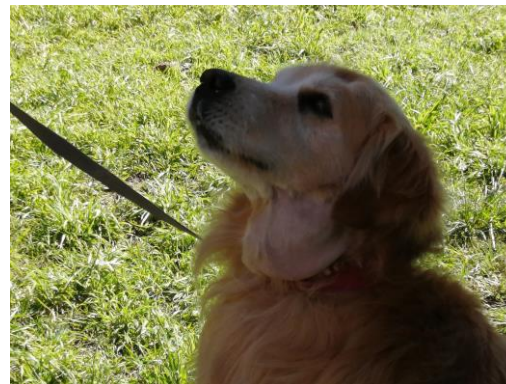
Cyril Parachini-Winter¹ | Kaitlin M. Curran¹ | Duncan S. Russell² | Elena Gorman²

No existen técnicas perfectas, 100% sensibles y 100% específicas!

Pruebas complementarias



6 meses



Class II Major Histocompatibility Complex Expression and Cell Size Independently Predict Survival in Canine B-Cell Lymphoma

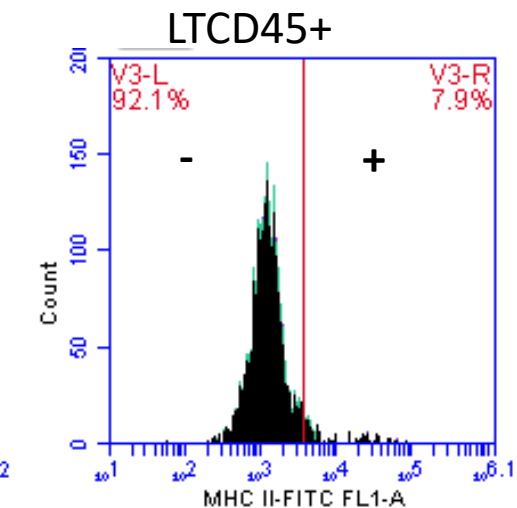
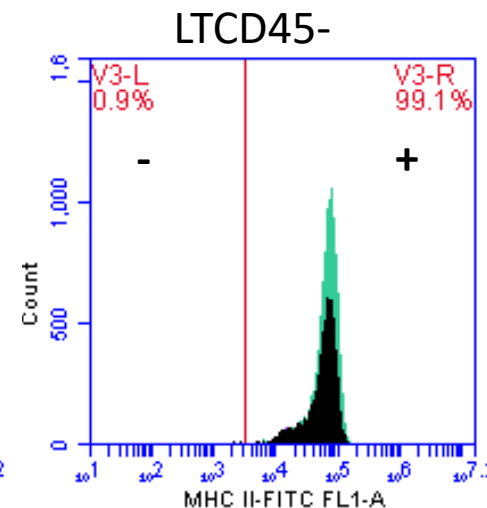
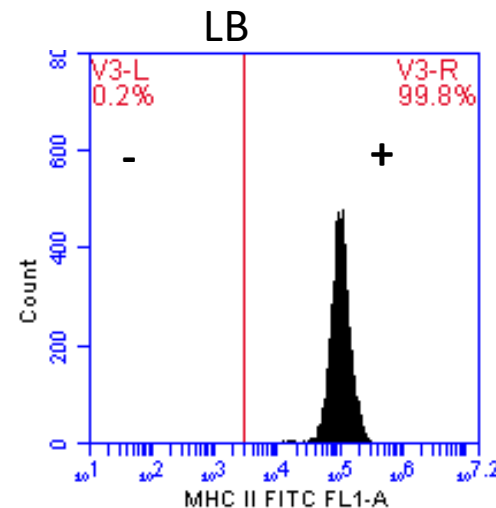
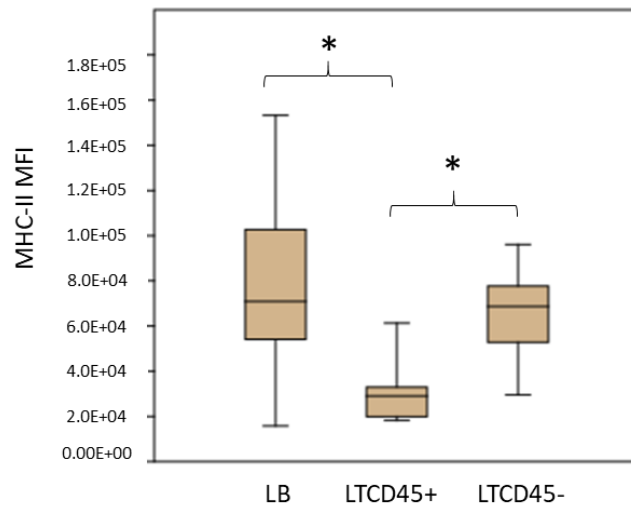
S. Rao, S. Lana, J. Eickhoff, E. Marcus, P.R. Avery, P.S. Morley, and A.C. Avery

Baja expresión de MHC-II: fuerte predictor de mal pronóstico en linfomas caninos de inmunofenotipo B
(314 vs 120 d)



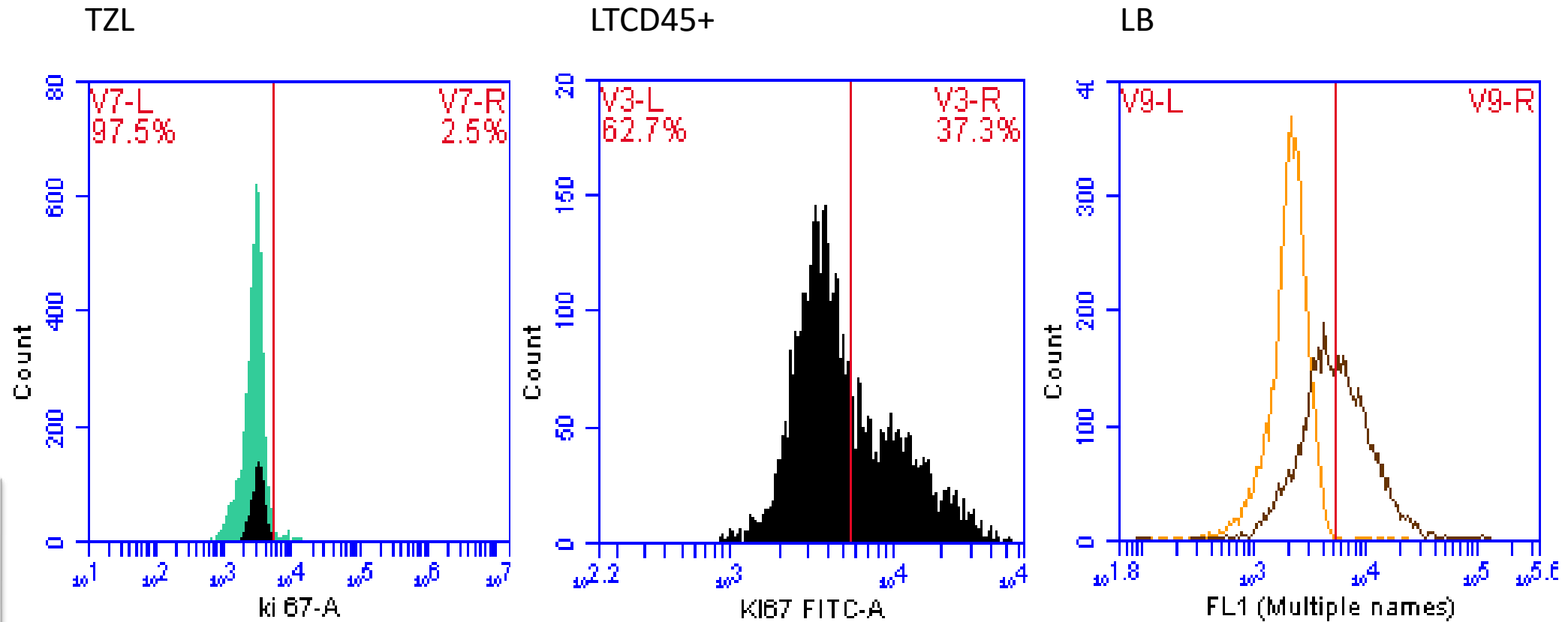
Linfoma T: TZL altos niveles, T alto grado bajos niveles
Pero... reportes de hepatoesplénico y cutáneo con alta expresión

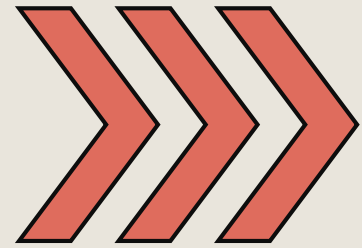
(Avery y col., 2014; Seelig y col., 2014; Deravi y col., 2017; Harris y col., 2019)



MHC-II FACTOR PRONÓSTICO

Ki67 es práctico para determinar el grado de malignidad de los linfomas caninos





Medicina de precisión



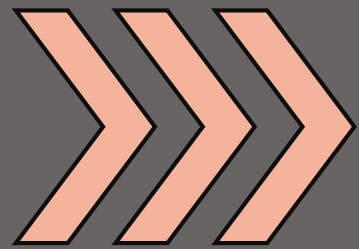
**¿Tratamiento diferencial
acorde al
inmunofenotipo?**

¿TRATAMIENTO DIFERENCIAL ACORDE AL
INMUNOFENOTIPO?

CONTROVERSIA







Seguimiento EMR



Minimal residual disease in lymph nodes after achievement of complete remission predicts time to relapse in dogs with large B-cell lymphoma

Carmit Chalfon, Valeria Martini, Stefano Comazzi, Luca Aresu, Damiano Stefanello, Fulvio Riondato, Roberta Ferrari, Laura Marconato 

La infiltración de LN por $>0,5\%$ de células CD21+ grandes después del tratamiento es un factor pronóstico desfavorable.

Características morfológicas e inmunofenotípicas



The Veterinary Journal

Volume 200, Issue 2, May 2014, Pages 318-324

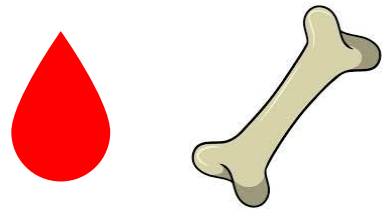


Minimal residual disease detection by flow cytometry and PARR in lymph node, peripheral blood and bone marrow, following treatment of dogs with diffuse large B-cell lymphoma

[Luca Aresu](#)^a  , [Arianna Aricò](#)^a, [Serena Ferraresso](#)^a, [Valeria Martini](#)^b, [Stefano Comazzi](#)^b, [Fulvio Riondato](#)^c, [Mery Giantin](#)^a, [Mauro Dacasto](#)^a, [Eleonora Guadagnin](#)^a, [Patrick Frayssinet](#)^d, [Nicole Rouquet](#)^d, [Michele Drigo](#)^e, [Laura Marconato](#)^f

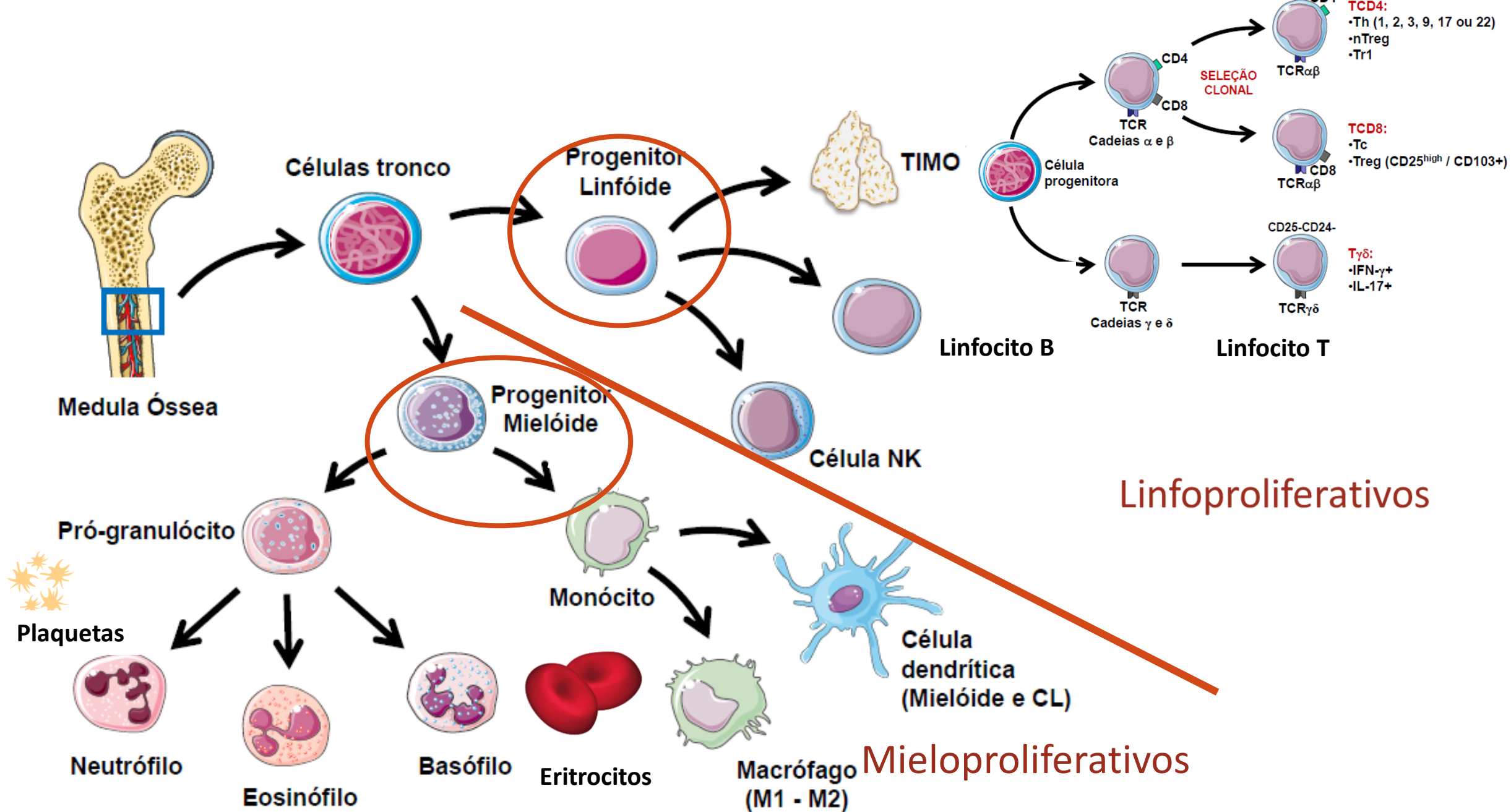
Show more 

LEUCEMIAS



Proliferaciones neoplásicas malignas con
origen en la **médula ósea**

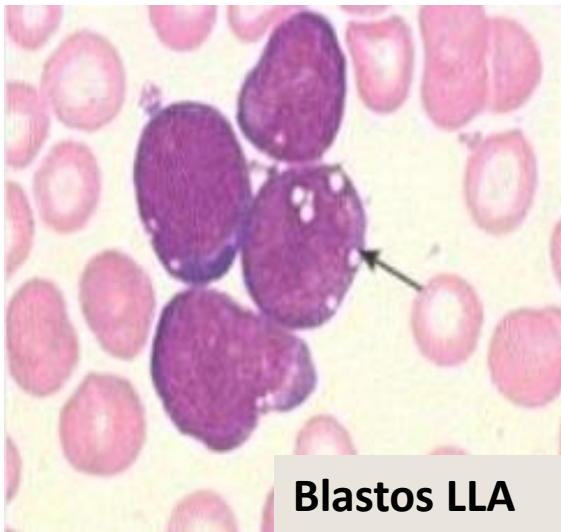
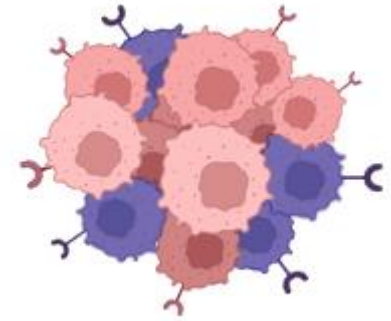




CF en Leucemia aguda

LLA y LMA pueden ser morfológicamente indistinguibles

Citometría de flujo auxilia en la diferenciación (LINAJE)



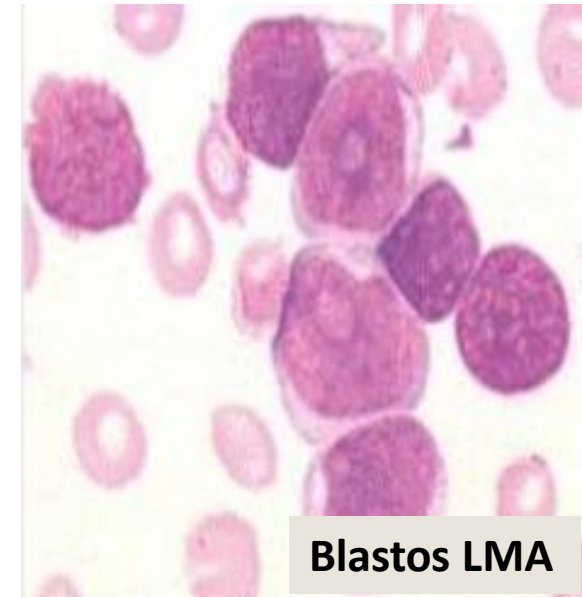
Blastos LLA

LLA:

Forma más común de leucemia aguda
Mayoría Linfoblastos B (CD79a+, CD34+)
Pronóstico malo, agresiva
Mayoría MHCII+

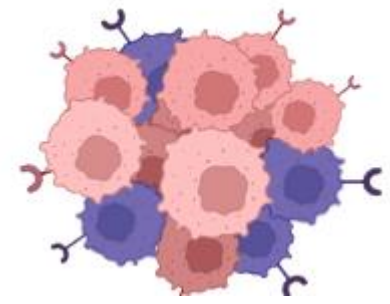
LMA:

Incidencia variable entre estudios
Diagnóstico específico muy difícil (M0-M7)
M4 (mielomonocítica) y M5 (monocítica) las más frecuentes
CD34+/-, MHCII-, CD11+, CD14+, MPO+



Blastos LMA

CF en leucemia crónica



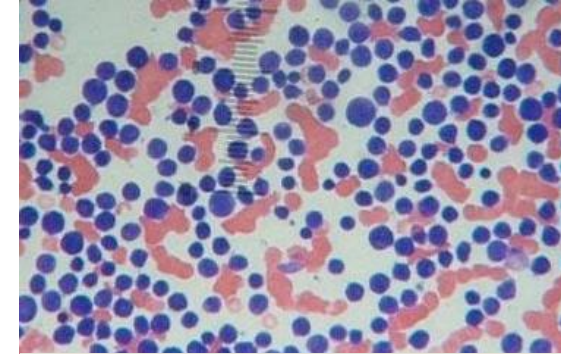
LLC:

La más común en perros (gerontes), “Indolente”, Linfocitos maduros afuncionales

CLL canino no expresa CD5

Mayoría T CD8 (perro) y CD4 (gato). B poco frecuente (linfocitosis > a 5000/uL+ ≥60% CD21+)

Fenotipo como factor pronóstico: controversia (T peor)

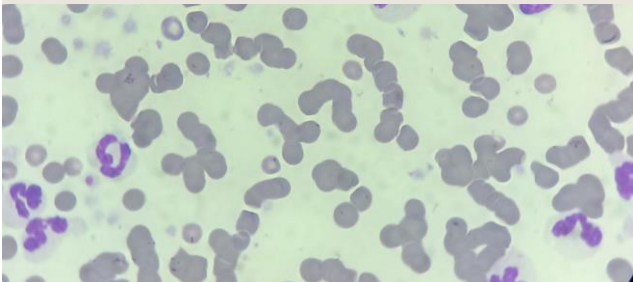


Leucemia linfoide crónica

Diferenciar condiciones reaccionales de neoplásicas – “CLONALIDAD”

Pronóstico??? Controversia

Leucemia mieloide crónica



LMC:

Mielograma con utilidad cuestionable (aumento de proliferación que tb puede ser reaccional)

CF tampoco aporta demasiados datos porque solo va a tipificar pero no indica clonalidad

Generalmente buena sobrevida

(Avery y col., 2007; Comazzi y col., 2015; Bromberek y col., 2016; Rout y col., 2021; Evans, 2023)

¿HACIA
DÓNDE
VAMOS?

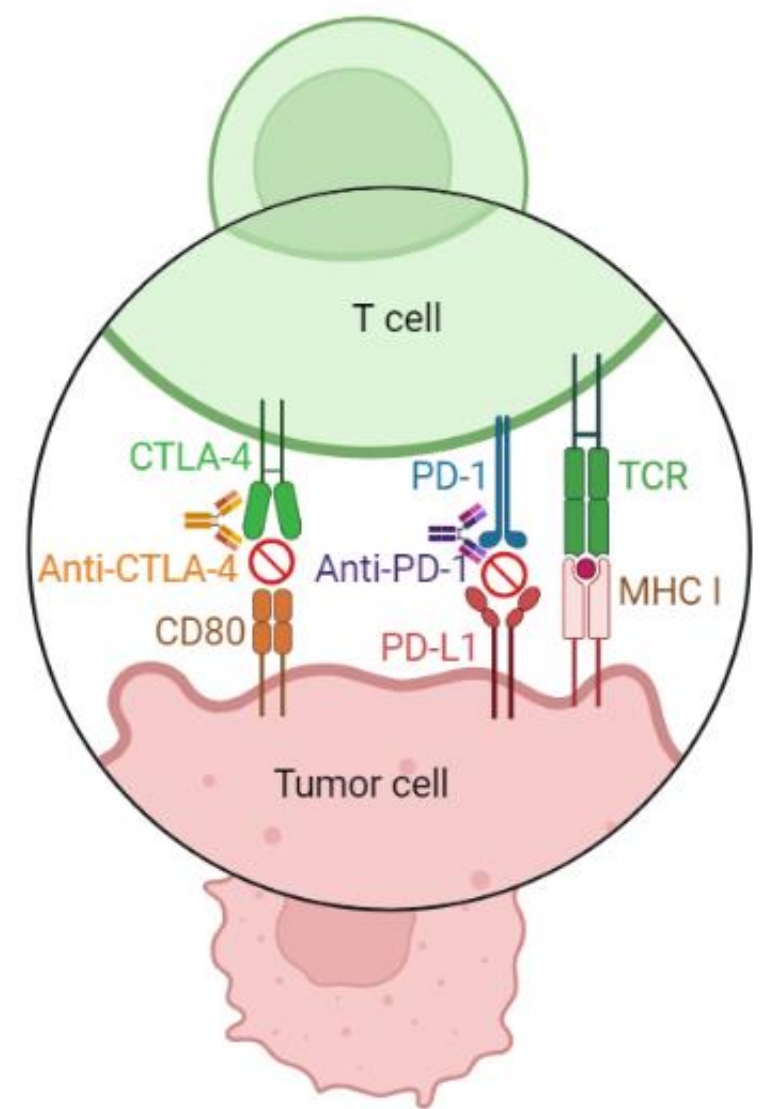
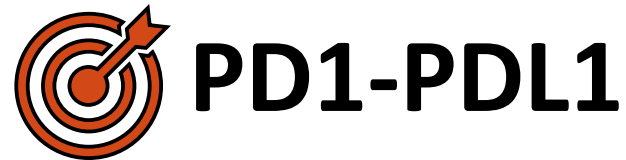


Desarrollo de nanoanticuerpos anti-PD1 y anti-PDL1 para el tratamiento de cáncer en perros

Exploring the dynamics of Programmed Death-Ligand 1 in canine lymphoma: unraveling mRNA amount, surface membrane expression and plasmatic levels

Alessandra Ubiali¹, Luiza Cesar Conti², Paola Dall'Ara¹, Raffaella De Maria², Luca Aresu², Pierangelo Moretti¹, Federica Sini², Fulvio Riondato², Damiano Stefanello¹, Stefano Comazzi¹ and Valeria Martini^{3*}

¹Department of Veterinary Medicine and Animal Sciences, University of Milan, Lodi, Italy; ²Department of Veterinary Sciences, University of Turin, Grugliasco, TO, Italy



INMUNOTERAPIA

Resumiendo... aplicaciones prácticas de la CF



DETERMINAR INMUNOFENOTIPO



MARCADORES PRONÓSTICOS (KI67, MHCII)



DIFERENCIAR LINFADENOPATIAS REACTIVAS Y NEOPLÁSICAS



DIFERENCIAR LLA VS LINFOMA V (CD34)



DIFERENCIAR LINFOMA MEDIASTÍNICO DE TIMOMA (CD4/CD8)

Servicio de inmunofenotipificación de linfomas y leucemias caninos



PAULA
PESSINA



FLORENCIA
MOSQUILLO



PATRICIA
LINDIMAN



MELANIE
BAZZANO



ROSINA
SÁNCHEZ SOLÉ

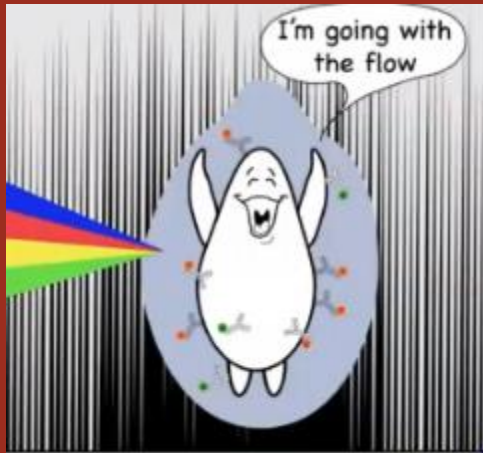
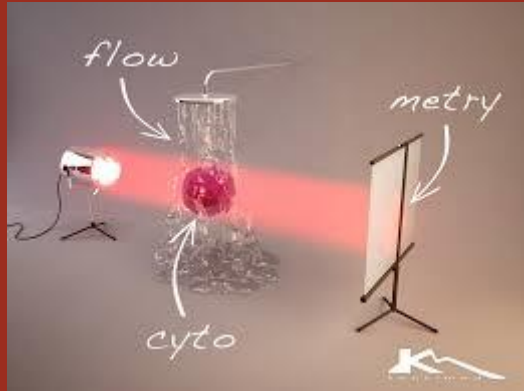
“LA MENTE ES COMO UN PARACAÍDAS, SÓLO FUNCIONA SI SE ABRE”

Albert Einstein



PUNTA BALLENA, URUGUAY

MUCHAS GRACIAS!



rosinasanchsole@gmail.com



Prognostic value of peripheral blood and bone marrow infiltration assessed by flow cytometry in dogs with de novo nodal peripheral T-cell lymphoma receiving alkylating-rich chemotherapy

L. Marconato ^a, S. Comazzi ^b, C. Agnoli ^a, L. Aresu ^c, D. Stefanello ^b, F. Riondato ^c, L. Gamberini ^a, S. Sabattini ^a

- MOR cut-off 5% (114 vs 179d)
- Sangre periférica sin valor pronóstico



Assessment of bone marrow infiltration diagnosed by flow cytometry in canine large B cell lymphoma: Prognostic significance and proposal of a cut-off value

Laura Marconato ^a, Valeria Martini ^b, Luca Aresu ^c, Michele Sampaolo ^a, Fabio Valentini ^a, Valentina Rinaldi ^a, Stefano Comazzi ^b

- MOR cut-off 3% (155 vs 322d)
- Sangre periférica sin valor pronóstico



Prognostic significance of peripheral blood and bone marrow infiltration in newly-diagnosed canine nodal marginal zone lymphoma

Laura Marconato ^a, Stefano Comazzi ^b, Luca Aresu ^c, Fulvio Riondato ^c, Damiano Stefanello ^b, Roberta Ferrari ^b, Valeria Martini ^b

[Show more](#)

- MOR cut-off < 1 % (1403d)
1-20 % (337d)
> 20 % (188d)
- Sangre periférica cut-off 30% (186 vs 543d)