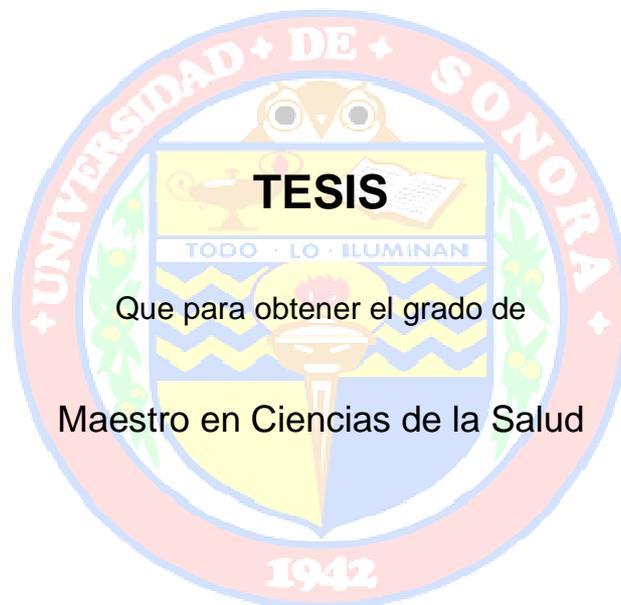


UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

Determinación Cuantitativa de la Enfermedad Mínima Residual por
Citometría de Flujo en Pacientes con Leucemia Aguda Linfoblástica
del Hospital Infantil del Estado de Sonora, 2009-2010



PRESENTA

Homero Rendón García

Hermosillo Sonora

Junio de 2011

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del Jurado Calificador designado para revisar el trabajo de Tesis de **Homero Rendón García**, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Salud.

Director Académico
Dr. Gerardo Álvarez Hernández

Secretario
Dra. María Guadalupe Burboa Zazueta

Vocal
Dr. Gilberto Covarrubias Espinoza

Suplente
M.C. Alfonso Ramos Salazar

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

*A mi familia Fátima y pool Rendón Sierra
por su amor, paciencia, apoyo y empuje que
me han dado siempre en forma incondicional
Por ustedes gracias*

*A mis Padres que me enseñaron el sentido
de la superación y colocaron en mi
las bases del hombre que soy hoy*

*A mis profesores y asesores de la Maestría en Ciencias de la
Salud en especial al Dr. Gerardo Álvarez por su
Interés incondicional en la investigación haciendo
Crecer el corazón de la sabiduría*

*A las agrupaciones de ayuda a niños
Con cáncer ANLAC y LABORATORIO
RAMOS quienes permitieron con su apoyo que el avance
De la ciencia, basada en la investigación
Mejore el resultado de niños
Con leucemia*

*A la ciencia: “si supiese qué es lo que estoy haciendo,
no le llamaría investigación, verdad?”*

Albert Einstein

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABLAS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vii
OBJETIVOS.....	viii
RESUMEN.....	ix
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	3
Enfermedad Mínima Residual.....	7
Valor Clínico de la Enfermedad Mínima Residual.....	10
Citometría de Flujo.....	12
Enfermedad Mínima Residual por Citometría de Flujo.....	16
Importancia del Volumen Tumoral.....	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
Pregunta de Investigación.....	22
Hipótesis.....	22
Generalidades.....	22
Fuentes de Datos.....	24
Aspectos Bioéticos.....	26
Muestreo y Tamaño de la Muestra.....	26
Criterios de Selección.....	27
Criterios de Inclusión.....	27
Criterios de Exclusión.....	27
Criterios de Eliminación.....	28
Procesamiento de la Muestra para Determinación de la Enfermedad Mínima Residual por Citometría de Flujo.....	28
Procesamiento de las Muestras para Marcadores Citoplásmicos.....	29
Caracterización de los Inmunofenotipos Aberrantes.....	29
Reconocimiento de Inmunofenotipos Aberrantes.....	30

Plan de Análisis.....	31
RESULTADOS.....	32
DISCUSIÓN.....	46
CONCLUSIONES.....	57
RECOMENDACIONES.....	58
BIBLIOGRAFÍA.....	59
ANEXOS.....	67

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Características citológicas de la leucemia aguda linfoblástica.....	4
II	Expresión antigénica en leucemia aguda linfoblástica.....	5
III	Clasificación pronóstica de la leucemia aguda linfoblástica.....	8
IV	Características de las tres técnicas para determinación de la enfermedad mínima residual en la leucemia aguda linfoblástica.....	11
V	Inmunofenotipos aberrantes en leucemia aguda linfoblástica.....	25
VI	Diferencia de medias en variables seleccionadas en pacientes pediátricos con leucemia aguda linfoblástica, según estatus de Enfermedad Mínima Residual (EMR) HIES, 2009-2010.....	33
VII	Distribución de estándares pronósticos, según estatus de la EMR en pacientes pediátricos con leucemia aguda linfoblástica, HIES, 2009-2010.....	34
VIII	Características bioquímicas de los sujetos de acuerdo a su estatus de EMR HIES, 2009-2010.....	36
IX	Características inmunomoleculares de los sujetos de estudio, de acuerdo a su estatus de EMR HIES, 2009-2010.....	37
X	Criterio de Respuesta al Tratamiento de Inducción de los sujetos investigados.....	39
XI	Criterio de Respuesta Medular según reporte de EMR en pacientes pediátricos con leucemia aguda linfoblástica, HIES, 2009-2010....	40
XII	Distribución proporcional de la expresión de marcadores en pacientes pediátricos con leucemia aguda linfoblástica de células B, HIES, 2009-2010.....	42
XIIa	Distribución proporcional de la expresión de marcadores en	

	pacientes pediátricos con leucemia aguda linfoblástica de células T. HIES, 2009-2010.....	43
XIII	Características clínica–biológicas de los pacientes pediátricos con EMR HIES, 2009-2010.....	45

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Anticuerpos monoclonales de las células linfoides en fase de maduración.....	6
2	Principio general de la citometría de flujo.....	14
3	Volumen tumoral y su evolución en el paciente con leucemia.....	19
4	Patrón de respuesta celular temprana en la terapia antileucémica.....	20
5	Diagrama causal de la enfermedad mínima residual de la leucemia aguda linfoblástica.....	21
6	Cuantificación de células malignas residuales en niños con leucemia aguda linfoblástica. HIES, 2009-2010.....	41

OBJETIVOS

General

Determinar mediante citometría de flujo, la prevalencia de Enfermedad Mínima Residual en niños con leucemia aguda linfoblástica que se encuentran en la 5ª semana de la quimioterapia de inducción¹ en el Hospital Infantil del Estado de Sonora en el periodo comprendido del 1º de Enero del 2009 al 30 de Junio del 2010.

Específicos

1. Identificar mediante citometría de flujo, la proporción de individuos que no tienen remisión inmunohematológica y compararla con la detectada por la citomorfología.
2. Reconocer los inmunofenotipos aberrantes en las LAL con Enfermedad Mínima Residual positiva en la semana 5 de haber iniciado la quimioterapia de inducción.
3. Describir y analizar los factores clínicos pronósticos de los pacientes con Enfermedad Mínima Residual positiva y negativa.

¹ Se entenderá a este periodo al posterior a la 4ta. semana de iniciada la quimioterapia establecida de acuerdo al protocolo de manejo del niño con LAL del Hospital Infantil del Estado de Sonora

RESUMEN

Introducción. La prueba de inmunofenotipificación por citometría de flujo (CF) es rutinariamente empleada en países desarrollados para identificar la carga tumoral elevada o Enfermedad Mínima Residual (EMR) en pacientes con leucemia aguda linfoblástica (LAL). La determinación cuantitativa de la EMR tiene relevancia médica porque niños en aparente remisión clínica y hematológica pueden tener hasta 10^{10} células leucémicas, lo que ensombrece su pronóstico. No obstante esto, no hay evidencia reciente que documente en México la utilidad de la CF para detectar EMR en niños con LAL. Este estudio compara la utilidad de la CF para la identificación temprana de EMR en niños y adolescentes con LAL que recibieron atención oncológica en el Hospital Infantil del Estado de Sonora (HIES) durante el periodo del 1° de Enero de 2009 al 31 de Junio de 2010.

Material y métodos. Se diseñó un estudio transversal para identificar EMR mediante CF en una muestra no probabilística de pacientes hospitalizados por LAL y que recibieron quimioterapia en el servicio de oncología del HIES. La EMR fue examinada en un aspirado de médula ósea que se tomó en las semanas 5 y 52 del tratamiento. Se consideró EMR presente si se detectó una cantidad mayor a 0.01% de células mononucleares con antígenos aberrantes, en tanto fue calificada como EMR ausente cuando se detectó una cantidad menor a 0.01% de células mononucleares con expresión de antígenos aberrantes. Los sujetos fueron agrupados en pacientes con EMR y pacientes sin EMR. Se comparó la distribución de las características clínicas y biológicas. Para evaluar las diferencias en la distribución proporcional de la expresión de anticuerpos monoclonales, se estratificó a los pacientes de acuerdo al tipo de LAL que se diagnosticó, es decir, pacientes con LAL de células B y LAL de células T.

Resultados. La muestra incluyó a 35 sujetos. La prevalencia de EMR detectada por la CF fue de 14.3%, lo que significó la identificación de cinco pacientes que se encontraban a la semana 5 (día 35) posterior al tratamiento antineoplásico, en aparente recuperación total de sus médulas óseas. Esta aparente recuperación fue determinada

mediante el estudio citomorfológico del mismo aspirado de médula ósea que fue examinado mediante CF. La mayor proporción (91%) de pacientes estudiados correspondió a LAL de linaje B, mientras el resto fue clasificado como de linaje T. Tres de cada cuatro sujetos tuvo un cariotipo normal y en el 80% de los pacientes, el índice de DNA fue ≥ 1 . Por lo que respecta a los anticuerpos (Ac) monoclonales para diagnóstico, en los pacientes (32) con LAL-B los que se observaron con más frecuencia fueron los CD10, CD22, CD19, CD79A, e Igc, mientras en sujetos (3) con LAL-T, los Ac identificados fueron Tdt, CD2, CD3, CD7 y CD5.

Conclusión. Comparada con la citomorfología, la CF permite un monitoreo más preciso de la remisión inmunológica de LAL en niños y adolescentes. La CF permite reconocer casos de EMR con expresión inmunofenotípica distinta a la clona inicial, de manera independiente a los factores clínicos pronósticos, lo que puede definir la respuesta al tratamiento antineoplásico.

INTRODUCCIÓN

La sobrevivencia de los niños con leucemia aguda linfoblástica (LAL) se ha incrementado en los últimos 20 años, gracias a avances en el conocimiento de la historia natural de la enfermedad, a la generación de nuevos antineoplásicos, a la identificación de grupos de riesgo, así como a la aplicación de técnicas de la inmunología y biología molecular para el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad.

En tal contexto, la prueba de inmunofenotipificación por citometría de flujo (CF) y la detección de secuencias específicas de DNA de las células neoplásicas mediante PCR, son técnicas utilizadas ya rutinariamente en países desarrollados para identificar la carga tumoral elevada o enfermedad mínima residual (EMR) leucémica. La determinación cuantitativa de la EMR tiene relevancia pronóstica porque niños en completa remisión clínica y hematológica pueden tener hasta 10^{10} células leucémicas y los estudios de la LAL en niños han demostrado el valor pronóstico de la detección y cuantificación de la EMR. (Zhou et al, 2007; Coustan et al, 2006).

No obstante lo anterior, no tenemos conocimiento de reportes de investigación que hayan empleado alguna de las técnicas para la detección temprana de EMR. Esto es posible que se deba a los elevados costos económicos de la prueba y a la falta de equipamiento y reactivos específicos en laboratorios clínicos y servicios de oncología. Sólo conocemos intentos anecdóticos aislados. En nuestro país, cuando se ha realizado la inmunofenotipificación mediante CF se han identificado problemas en la técnica realizada; adicionalmente, es posible que haya poca experiencia clínica para la detección e interpretación de la EMR, lo que condicionaría resultados poco confiables para los oncólogos pediatras. Por tal motivo, se realizó un estudio transversal, cuyo propósito central es cuantificar la EMR, mediante inmunofenotipificación por CF, en pacientes pediátricos con LAL que recibieron atención oncológica en el Hospital Infantil del Estado de Sonora durante el año 2009.

El estudio parte del supuesto que la cuantificación de EMR mediante CF en niños y adolescentes con LAL, permitirá identificar oportunamente a los pacientes en aparente estado de remisión clínica que presenten carga tumoral de leucemia aún activa, así como la variabilidad de la leucemia residual, lo que les hará acreedores a una quimioterapia más intensiva. Adicionalmente, la CF permitirá identificar incluso a aquellos niños que no requieran tratamiento más intensivo, lo que contribuirá a disminuir la toxicidad del tratamiento. Ambos eventos pueden incrementar la sobrevida al final del tratamiento, aunque éste no es uno de los propósitos del estudio.

Otros beneficios adicionales con la CF es que se podrá definir la variabilidad leucémica residual, la respuesta al tratamiento, la sensibilidad a la quimioterapia en la fase de inducción, e indirectamente aportará experiencia en la técnica de citometría de flujo, que como se apuntó anteriormente no ha sido documentada en pacientes pediátricos mexicanos con LAL. Porque el inmunofenotipo es fácilmente reproducible, es probable que los resultados de la investigación permitan recomendarla como prueba de rastreo tumoral en el país. Los hallazgos del proyecto pueden generar información basal para sustentar futuras líneas de investigación sobre el tópico (p. e. terapéuticas, ensayos clínicos), tanto a nivel local como nacional.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

La leucemia aguda linfoblástica (LAL) es una neoplasia hematológica caracterizada por la proliferación desordenada de células mutadas linfoides transmitidas a todas sus descendientes y caracterizada biológicamente por inmadurez. Se clasifica de acuerdo a las características morfológicas de las células blásticas; se divide en L1, L2 y L3. (Federación Américo-Británica), como se muestra en la tabla I.

La leucemia aguda linfoblástica se puede clasificar por inmunofenotipo en células B y células T. (Pizzo, 2006). Cada grupo puede ser diferenciado por un marcaje de anticuerpos monoclonales, que pueden ser detectados por citometría de flujo (CF). Dichos anticuerpos monoclonales de los linfoblastos se pueden localizar en la superficie, núcleo y citoplasma de las células malignas y serán específicos para la etapa evolutiva en que sea detectada la leucemia con lo cual, se genera la clasificación inmunológica de la leucemia aguda linfoblástica (pre B temprana, B, B transicional y B madura); la tabla II y la figura 1 muestran los anticuerpos monoclonales de la LAL y su frecuencia de expresión antigénica.

La LAL es la neoplasia maligna más comúnmente diagnosticada en los niños, representando casi un tercio de todos los cánceres pediátricos. La incidencia anual es cercana a 30 casos por millón de personas, con un incremento entre los 2 y 5 años de edad, particularmente en individuos del sexo masculino (Satake, 2006). En los Estados Unidos representa el 27% de la enfermedad maligna entre los niños menores de 15 años (Pui, 2002) y se diagnostican entre 2000 y 2500 casos nuevos cada año.

Aunque no hay consenso, se cree que la incidencia mundial es similar a la de los E.U. Tampoco es claro el comportamiento de su tendencia, aunque en México se ha reportado un incremento de la morbilidad que se cree se debe a mejoría en el registro y clasificación de los casos (Mejía-Aranguré, 2000). En el servicio de Oncología Pediátrica del Hospital Infantil del Estado de Sonora (HIES) la frecuencia detectada en

Tabla I. Características citológicas de la leucemia aguda linfoblástica.

Características Citológicas	L1	L2	L3
Tamaño de la célula	Pequeña	Grande y heterogénea	Grande y heterogénea
Cromatina Nuclear	Homogénea	Heterogénea y variable	Homogénea y fina
Núcleo	Regular indentado en forma ocasional	Irregular comúnmente indentado	Regular y ovalado
Nucléolos	No visibles o incúspicos	Presentan más de uno y grandes	Prominentes y vesiculares
Cantidad de Citoplasma	Escaso	Variable y moderadamente abundante	Moderadamente abundante
Basofilia Citoplasmática	Leve a moderada rara vez intensa	Variable, algunos casos severa	Muy profunda
Vacuolas Citoplasmáticas	Negativas	Variable	Prominentes

Lanzkowski P. Manual of Pediatric Hematology and Oncology. Academic Press. Third Edition. 1999

Tabla II. Expresión antigénica en leucemia aguda linfoblástica (% de casos positivos).

INMUNOFENOTIPO SUBGRUPOS DE LAL											
SUBTIPO	CD19	CD22	CD79A	CD10	CD7	CD5	CD3	CIG	slg	slg κ OR λ	(%)
Pre-B Temprana	100	>95	>95	95	5	0	0	0	0	0	60–65
Pre-B	100	100	100	>95	0	<2	0	100	0	0	20–25
Pre-B Transicional	100	100	100	50	0	0	0	100	100	0	1–3
B	100	100	100	50	0	0	0	>95	>95	>95	2–3
T	<5	0	30	45	100	95	100	0	0	0	15–18

LAL: Leucemia Aguda Linfoblástica, c, citoplásmica; clg μ, inmunoglobulina citoplásmica μ cadena; slg μ, inmunoglobulina superficie, μ cadena; slg κ or λ, inmunoglobulina superficie κ or λ cadena. (Pui Ching-Hou.2002 Leukemias)

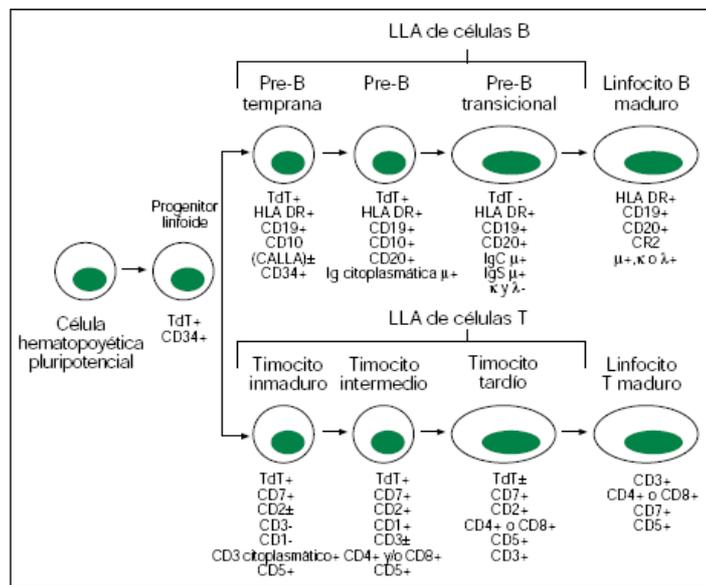


Figura 1. Anticuerpos monoclonales de las células linfoides en fase de maduración.

Fuente: Luis Madero López .Arturo Muñoz Villa, Hematología y Oncología Pediátrica 2 edición, Ed. Ergon. 2005.

neoplasias malignas es de 42% y es el cáncer diagnosticado con mayor frecuencia (Miramón, 2000).

El reconocimiento temprano de factores pronóstico que orientan el tratamiento (Tabla III) ha sido un pilar fundamental para incrementar la sobrevida de los niños. En el HIES predominan los pacientes (54%) de alto riesgo. La sobrevida libre de enfermedad con los protocolos establecidos en él es cercana al 78% para el grupo de bajo riesgo y de 55% para el de alto riesgo (Rendón y Covarrubias, 2003).

Los actuales protocolos de tratamiento citotóxico inducen completa remisión, de acuerdo a criterios citomorfológicos, en 95 a 98% de los niños con LAL (Childhood ALL Collaborative Group, 1996). Sin embargo, entre 25 y 30% de esos niños sufren recaídas, lo que implica que no todas las células leucémicas son eliminadas. En la actualidad los criterios citomorfológicos son insuficientes para evaluar adecuadamente la remisión del padecimiento porque el umbral de detección de las células leucémicas es apenas de 1 a 5% (Van et al, 1998).

Enfermedad Mínima Residual

Cuando se diagnostica leucemia linfoblástica aguda (LAL) en un paciente, el número total de células leucémicas se encuentra entre 10^{12} y 10^{13} . La mayoría de los pacientes alcanzan la remisión completa después de 4 semanas de quimioterapia. La remisión completa no significa que las células de la leucemia hayan sido erradicadas del cuerpo, sino que su nivel está más allá del nivel de sensibilidad de los métodos citomorfológicos clásicos (por ejemplo, 1 a 5%). Aún en aparente remisión clínica, hasta 10^{10} células malignas puede permanecer en el paciente, esta carga de células malignas es conocida como Enfermedad Mínima Residual (EMR) (Campana 2004).

Tabla III. Clasificación pronóstica de la leucemia aguda linfoblástica.

Grupo de Riesgo	Características	%
Bajo	Fenotipo de células B Edad 1 a 9 años Leucocitos < 50000mm ³ al diagnóstico Masa en Mediastino (-) Citogenética: TEL—AML Hiperdiploidia >50 Índice de DNA >1.16 *Infiltración a santuarios (-)	50—55%
Intermedio	Fenotipo de Célula T Células B que no entren en el criterio de bajo riesgo	35—45%
Alto	Edad mayor a 10 años Leucocitos > 50000mm ³ al diagnóstico Masa en Mediastino (+) Menor de 12 meses t(9;22) Respuesta temprana pobre al tratamiento Re arreglo cromosómico MLL t(4;11) *Infiltración a santuarios (+)	6—8%

Basado en: Lankowsky P. Manual of Pediatric Hematology and Oncology. Academic Press. Third Edition. 2000

Los estudios de EMR son parte del manejo integral de los niños con leucemia. Con las actuales tasas de curación de LAL en torno a 70-80%, el reto es como incorporar nuevas técnicas diagnósticas de EMR a los protocolos terapéuticos. La predicción de recaídas, a través del desarrollo de la inmunología y biología molecular han permitido mejorar el tratamiento de la LAL. Dentro de los métodos más empleados actualmente destacan la amplificación de genes receptores de antígenos mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR) y la detección de inmunofenotipos aberrantes o ectópicos a través de citometría de flujo (CF) (Campana, 2004). Cuando la EMR es mayor a 1% de células leucémicas la sobrevida de los niños con LAL es mala, cuando por el contrario, se detectan menos de 1% de tales células la sobrevida es muy buena (Hunger, 2005). Se considera una prueba más exacta que la tradicional detección de linfoblastos en el día 14 en muestras de médula ósea.

La determinación de la EMR tiene un potencial de aplicación en el manejo clínico de la LAL que incluye la identificación temprana de pacientes con alto riesgo de recaída y la detección oportuna de inminente recaída clínica. En suma, la EMR es un estudio que ha mostrado ser una herramienta confiable para evaluar la médula ósea y sangre periférica que ha sido cosechada de trasplante de células progenitoras de células hematopoyéticas y determinar la eficacia de la purga. Adicionalmente, puede demostrar la presencia de células leucémicas involucradas en el sistema nervioso central (Campana, 1999).

La detección de EMR en los primeros tres meses de quimioterapia ha permitido mejorar la evaluación del tratamiento en LAL. Esto contribuye favorablemente para tomar decisiones clínicas acerca de la potencial intensificación del tratamiento, incluyendo el trasplante de médula ósea o en algunos casos, la reducción del tratamiento. No obstante, la identificación de pacientes en riesgo depende de varios factores, entre ellos, el tiempo de seguimiento de las muestras y de la sensibilidad del método empleado para detectar EMR (SIOP Educational Book, 2010).

En las últimas décadas múltiples estudios clínicos han demostrado la utilidad de la detección de EMR en pacientes con LAL, esto porque permite detectar células leucémicas entre menos de $\leq 10^3$ leucocitos normales, preferiblemente $\leq 10^4$.

Los métodos para detectar EMR deben cumplir varios requerimientos.

1. Tener sensibilidad menor a 10^3 , preferiblemente $\leq 10^4$
2. Aplicabilidad en la mayoría de los pacientes
3. Alta reproducibilidad
4. Posibilidad de estandarización inter-laboratorio y control de calidad internacional

Tres técnicas cumplen los requerimientos para llevar a cabo la determinación de la EMR: (a) El inmunofenotipo por citometría de flujo, (b) La reacción de cadena de polimerasa basada en la detección de sitios de transcripción en genes de fusión en cromosomas a nivel de RNA o DNA, y (c) PCR basada en la detección de región funcional de Ig y receptor de célula T. La tabla IV resume la aplicabilidad, sensibilidad, especificidad, ventajas y desventajas de estas técnicas.

Valor Clínico de la Enfermedad Mínima Residual

La principal aplicación clínica de la EMR es en la evaluación de la respuesta inicial a la quimioterapia de inducción. Numerosos estudios han demostrado bajos niveles y ausencia de EMR después de completar la terapia de inducción, lo que predice excelentes resultados. La EMR detectada por PCR después de la terapia de inducción, ha sido considerada independiente de otros factores de riesgo clínico y es al momento, el factor de pronóstico más potente de recaída clínica (SIOP Educational Book, 2010).

Dependiendo del protocolo y de la sensibilidad de la técnica con que se realice la EMR, así como, del tiempo de seguimiento de las muestras de médula ósea, la negatividad de EMR ha sido asociada con un 2%-10% de recaída total, contrario a lo

Tabla IV. Características de las tres técnicas para determinación de la enfermedad mínima residual en la leucemia aguda linfoblástica.

Variable	Inmunofenotipo por citometria de flujo	Reordenamiento genético Ig-/TCR	Transcripción del gen de fusión
Aplicabilidad			
LAL B			
Lactantes	Desconocida	70-80%	60-65%
Niños	70-95%	>95%	35-40%
Adultos	70-85%	90%	40-45%
LAL T			
Niños	> 95%	>95%	10-20%
Adultos	~95%	>90%	10%
Sensibilidad	$10^3 - 10^4$	10^4-10^5	10^4-10^5
Ventajas			
	Rápido 1 a 2 días Específico Informa acerca de células normales Técnica relativamente simple Análisis particular de células Evaluación de la viabilidad de las células	Alta estabilidad de DNA Alta especificidad de pacientes Cantidad de DNA por célula relativamente estable	Objetivo "target" Simple relatividad Rápido resultado
Desventajas			
	Subclonas Requiere alta sensibilidad ~ 5×10^6 células	tiempo de consumo bajo Antecedente de células normales Alto nivel de complejidad Pérdida de "targets"	expresión Especificidad del tumor Riesgo de contaminación

SIOE Educational Book 2010 International Society of Paediatric Oncology, (2010). Agarwal B, Claminus G, Diller L, Egeler M. 42nd Congress of the International Society of Paediatric Oncology. Boston, USA October 21-24, 2010

mostrado en otros estudios, donde niveles elevados de EMR al fin del tratamiento de inducción predicen recaída de 70 a 100% (SIOP Educational Book, 2010).

El análisis de la EMR proporciona información pronóstica valiosa pero no suficientemente precisa, para definir los grupos de bajo y alto riesgo. Realizar la EMR al fin de la inducción, identifica sólo pacientes de bajo riesgo de recaer o más exclusivamente pacientes de alto riesgo. El grupo Internacional de Estudio Franco-Británico-Alemán (BFM) ha demostrado que las mediciones de EMR negativas al final de inducción y antes de la consolidación, tiene una menor probabilidad de recaída de 2% (SIOP Educational Book, 2010). Por otra parte, pacientes de alto riesgo con EMR clasificada como intermedia (10^{-3} células leucémicas) o riesgo alto (10^{-2} células leucémicas), han mostrado recaídas en 80% y 22% respectivamente. En tanto, la estratificación en leucemias de células T de los grupos de bajo, intermedio y alto riesgo mostró un porcentaje de recaída homogéneo de 25%.

La EMR ha tenido su utilidad clínica en protocolos que evalúan el trasplante de médula ósea. La intensificación del tratamiento es una de las aplicaciones de la EMR referida en aproximadamente 10% de los niños con leucemia aguda linfoblástica en los que puede incluir como terapia de intensificación el trasplante progenitor hematopoyético en primera remisión.

Citometría de Flujo

La citometría de flujo (CF) es una técnica de análisis celular que mide las características de dispersión de luz y fluorescencia que poseen las células conforme pasan a través de un rayo de luz. Para su análisis por CF, las células deben encontrarse individualmente en suspensión en un fluido. Las células sanguíneas pueden analizarse prácticamente de manera directa. Las células pueden hacerse pasar a muy altas velocidades (p.e. 100,000 células por segundo).

Al atravesar el rayo de luz, las células interaccionan con este causando dispersión de la luz; basándose en la difracción de la luz en sentido frontal, puede evaluarse el tamaño

de las células que pasan y al medir la reflexión de la luz de manera lateral se determina la granularidad o complejidad de éstas. Además de la dispersión de la luz, si previamente a su análisis se coloca a las células en presencia de anticuerpos monoclonales marcados con moléculas fluorescentes, se pueden evaluar qué células poseen los antígenos complementarios a los anticuerpos monoclonales usados (Barrera, 2004).

A las células que serán examinadas se les acopla un fluorocromo, generalmente a través de un anticuerpo monoclonal que reconoce una estructura específica en la célula. Posteriormente, las células son suspendidas en el centro de un flujo de líquido isotónico que es impulsado a gran velocidad por un orificio estrecho y deben pasar a través de una fuente luminosa (láser) de forma secuencial. El láser, al incidir con cada célula, se desvía y este cambio de dirección es registrado por detectores especiales. Por otra parte, el reactivo fluorescente al ser excitado, emite luz en una longitud de onda determinada (color) que es registrado por detectores colocados de forma perpendicular al rayo láser. Cada uno de los detectores del equipo ofrece una información que es convertida en impulsos eléctricos y posteriormente en códigos digitales que pueden ser visualizados a través de los programas de computación especializados (Fig. 2) (Barrera, 2004).

En la actualidad existen equipos con diferentes detectores de fluorescencia, con los cuales pueden determinarse diferentes características que coexistan en determinadas poblaciones celulares.

Conociendo la información que aporta cada uno de los detectores de señal luminosa y teniendo en cuenta las necesidades del operador, se pueden elaborar histogramas con información de 1, 2 o más parámetros diferentes. La citometría de flujo es una técnica que permite un análisis celular multiparamétrico de forma rápida, sensible y específica. La disponibilidad de amplios paneles de reactivos de calidad facilita la aplicación de este método analítico en el diagnóstico, clasificación, evaluación pronóstica y valoración de enfermedad mínima residual. La citometría de flujo permite el análisis de un gran número de células (habitualmente entre 10,000 células por

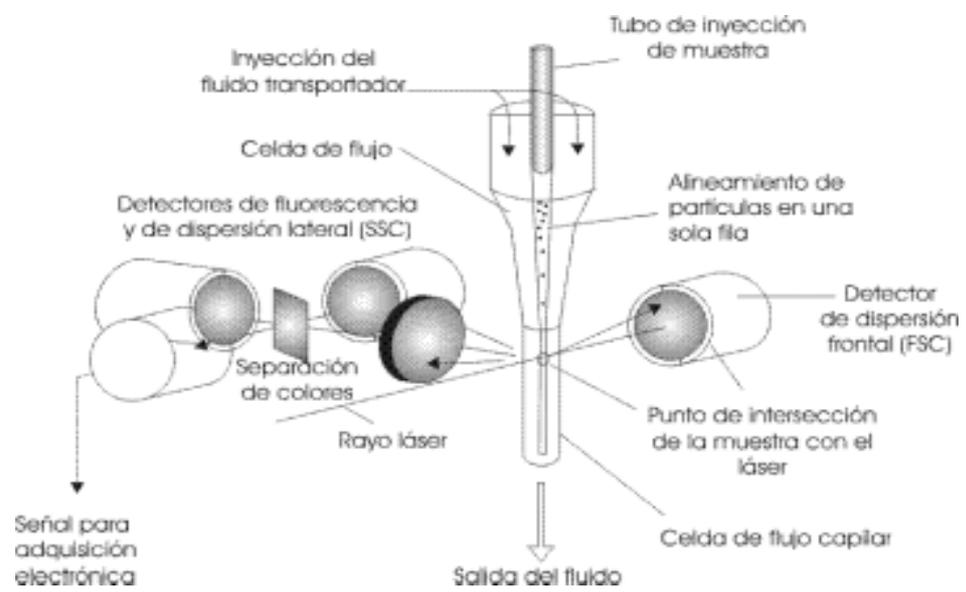


Figura 2. Principio general de la citometría de flujo.

muestra), y más de un millón en los estudios de enfermedad mínima residual (Hunger, 2005).

La aplicación de la CF al análisis celular permite conocer aspectos físicos de la célula (tamaño y complejidad) y determinar la presencia o ausencia de determinados antígenos (habitualmente entre 3 y 4) en los diferentes compartimentos celulares (superficie celular, citoplasma, mitocondria, núcleo), lo que contribuye a aumentar tanto la especificidad como la sensibilidad de la prueba. Esto soporta que en la actualidad la citometría de flujo sea una herramienta básica para el estudio de las hemopatías malignas por lo que se considera una práctica médica ampliamente aceptada.

Su aplicación permite una correcta clasificación de la gran mayoría de las leucemias, desde un punto de vista diagnóstico, su utilización permite una correcta clasificación de la neoplasia en más del 90% de los casos definiendo patrones fenotípicos de normalidad y fenotipos aberrantes leucémicos. Estos patrones fenotípicos aberrantes reflejan un patrón genético anormal presente en estas células leucémicas, estas características permitirán el seguimiento sensible de la respuesta al tratamiento y el diseño de esquemas terapéuticos en función de este seguimiento (detección de EMR).

Para identificar tal patrón, se utilizan anticuerpos monoclonales dirigidos frente a antígenos específicos de línea: CD79a citoplásmico y CD19 para la definición de línea linfocítica B; CD3 citoplásmico para la definición de línea linfocítica T y Mieloperoxidasa (MPO) para la definición de línea mielocítica. La utilización posterior de una batería más amplia de anticuerpos monoclonales permite establecer una subclasificación de las leucemias

El estudio de estos fenotipos aberrantes permite la detección de poblaciones leucémicas en más del 90% de las neoplasias hematológicas y con un nivel de sensibilidad entre 0.01 y 0.001%, próximo al obtenido con otras técnicas más laboriosas, como la amplificación de PCR.

Se definen tres patrones fenotípicos aberrantes:

- A) *Infidelidad de línea*: presencia de un antígeno de una línea celular en una neoplasia de otra línea celular (por ejemplo expresión de antígenos mieloides en una leucemia aguda linfoblástica de línea B o T).
- B) *Asincronismo madurativo*: coexistencia de dos o más antígenos no coincidentes en condiciones normales en una misma célula (por ejemplo, en los linfocitos B normales de sangre periférica los linfocitos B que expresan CD23 son aquellos que expresan más CD22; la diferenciación B normal de médula ósea se caracteriza por una pérdida progresiva del antígeno CD10 junto con un aumento en la expresión de CD20, existiendo ejemplos de LLA-línea B con blastos CD10 intensamente positivos con expresión de CD20).
- C) *Sobreexpresión antigénica*: presencia de un antígeno existente en condiciones normales pero con una intensidad mayor (los linfocitos B de sangre periférica expresan de forma heterogénea el antígeno CD5, mientras que en la LLC-B se observa una sobreexpresión de dicho antígeno).

Enfermedad Mínima Residual por Citometría de Flujo

La diferencia en la expresión antigénica en células blásticas y células progenitoras normales puede ser cualitativa o cuantitativa, o ambas. Diferencias cualitativas son observadas en la combinación de inmunofenotipos expresados por la célula leucémica, algo que es extremadamente raro en médula ósea. La identificación de diferencias cuantitativas en la expresión antigénica puede también ser útil para distinguir células leucémicas de las subclases de células normales, por ejemplo la expresión en LAL de células B de CD10, CD19, y CD34 o sub expresión de CD45 Y CD38 otros marcadores como CD45RA, CD11a y CD44 podrían sobre o subexpresarse . En el caso de LAL de células T, la combinación nuclear de TdT con marcadores citoplasmático CD3 y de superficie CD5 son altamente informativos, mientras que la detección de EMR en LAL de células B usualmente es identificada con la expresión de CD19, CD10, CD34 y/o

TdT, en tanto que entre 30 y 50% de los casos, otros marcadores útiles para detectar EMR son CD38, CD45 y CD22.

La citometría de flujo presenta ciertas desventajas y ventajas (Campana & Pui, 1995). Algunas que deben ser cuidadosamente consideradas son las siguientes:

Desventajas:

1. Relativa baja sensibilidad al ser comparada con técnicas moleculares.
2. Problemas en la estandarización de los laboratorios ya que la realización de esta técnica es relativamente escasa y la poca experiencia en laboratorios limitan la validez y reproducibilidad de la prueba. Por ejemplo, en México no existen técnicas estandarizadas para definir el denominador del citómetro de flujo.

Ventajas:

1. Aplicación universal
2. Prueba de resultados rápidos
3. Costo diez veces menor que las técnicas de amplificación
4. Alta sensibilidad con conteos celulares entre 5×10^6 a 1×10^7

La aplicación de la citometría de flujo está basada en la discriminación entre células de LAL y leucocitos normales con características fenotípicas asociadas a leucemia (LAP), tales como sobreexpresión de CD10 y expresiones de linaje cruzado de antígeno mieloides en precursores de células B o coexpresión de transferasa deoxinucleotidil terminal y marcadores de células T en LAL T y combinación de marcadores que normalmente se encuentran en el timo.

La citometría de flujo de cuatro colores alcanza una sensibilidad de 10^3 a 10^4 sin embargo, de forma cuidadosa se recomienda su interpretación, ya que alrededor de 35% de las veces pueden coexistir, después de una terapia muy intensificada, precursores de células B inmaduros que se encuentran en regeneración normal que pueden obstaculizar la interpretación de la misma. Situación que se disminuye con la técnica de citometría de

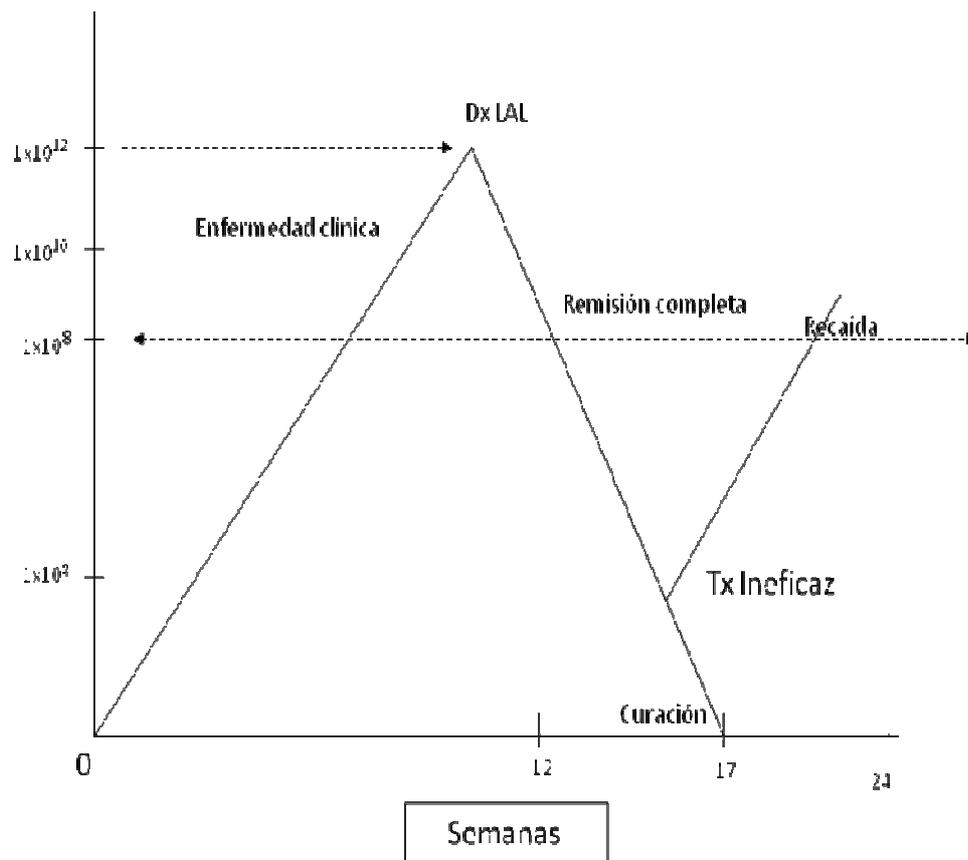
flujo de cuatro colores. Esto afecta particularmente a la citometría durante la segunda fase de inducción hasta la terapia de mantenimiento donde los precursores B extienden su compartimento.

Durante la fase temprana pueden ocurrir cambios en el inmunofenotipo, los cuales pueden ser por efecto de las drogas o por la expresión de varios niveles antigénicos con cambio a un inmunofenotipo más maduro ejemplo:(CD10 disminuye y CD20 aumenta). O relacionarse por la muerte celular a drogas. La detección de EMR en niveles bajos requiere grupos de 20 a 30 células leucémicas.

Importancia del Volumen Tumoral

Desde el punto de vista biológico, se considera que la leucemia cuando se diagnostica presenta una carga tumoral calculada en 1×10^{12} células malignas, que pueden expresarse en diferentes modalidades de presentación clínica (síndrome anémico, síndrome infiltrativo, síndrome febril y síndrome purpúrico). Una vez iniciada la quimioterapia, al finalizar las primeras cuatro semanas (fase de inducción a la remisión), la carga tumoral se habrá reducido a una cantidad de aproximadamente 1×10^8 . Esta reducción estará relacionada con la desaparición de la expresión clínica de la LAL a un estado de apariencia orgánica normal, con una cuenta de linfoblastos en la medula ósea menor a 5% Fig. 3 y 4.

En la figura 5 se muestra la relación teórica entre la EMR y las variables que se incluyeron en el presente estudio. El diagrama causal se realizó para identificar la participación de las variables más importantes. Un diagrama causal permite identificar la relación de variables independientes y covariables como confusoras (variable asociada con la enfermedad como causa de ella) o modificadores de efecto (factor que cambia la fuerza de asociación entre dos variables) con el resultado de interés (Rothman, 1998).



Dx: Diagnóstico, Tx: Tratamiento, LAL: Leucemia Aguda Linfoblástica, Tx Tratamiento

Figura 3. Volumen tumoral y su evolución en el paciente con leucemia.
Fuente: (Valeriotte FA.1984)

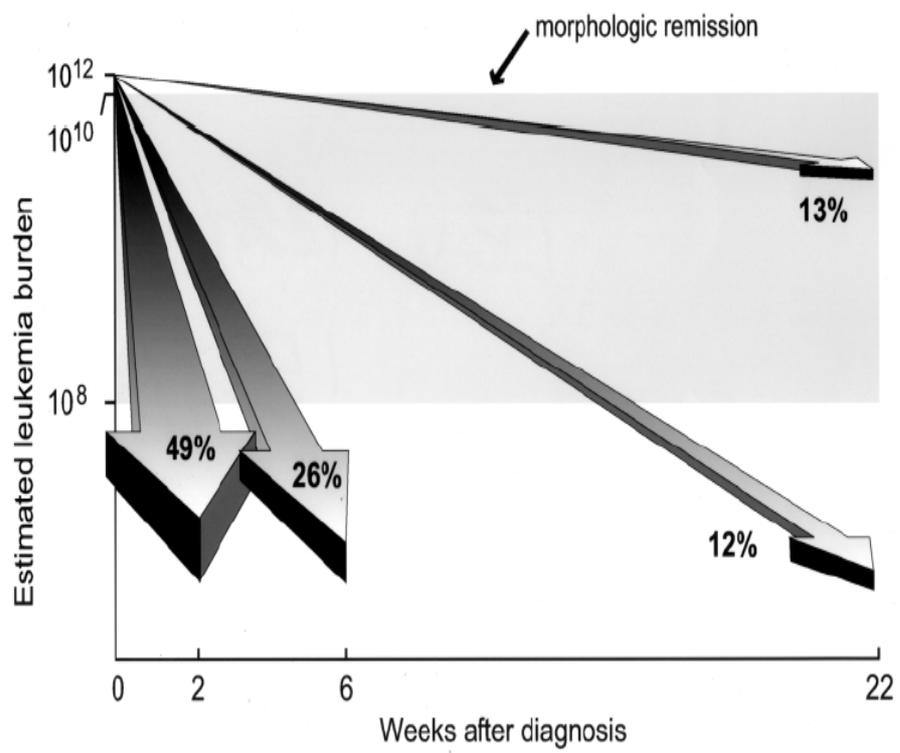


Figura4. Patrón de respuesta celular temprana en la terapia antileucémica.
 Fuente: (C-H Pui and D Campana.2000)

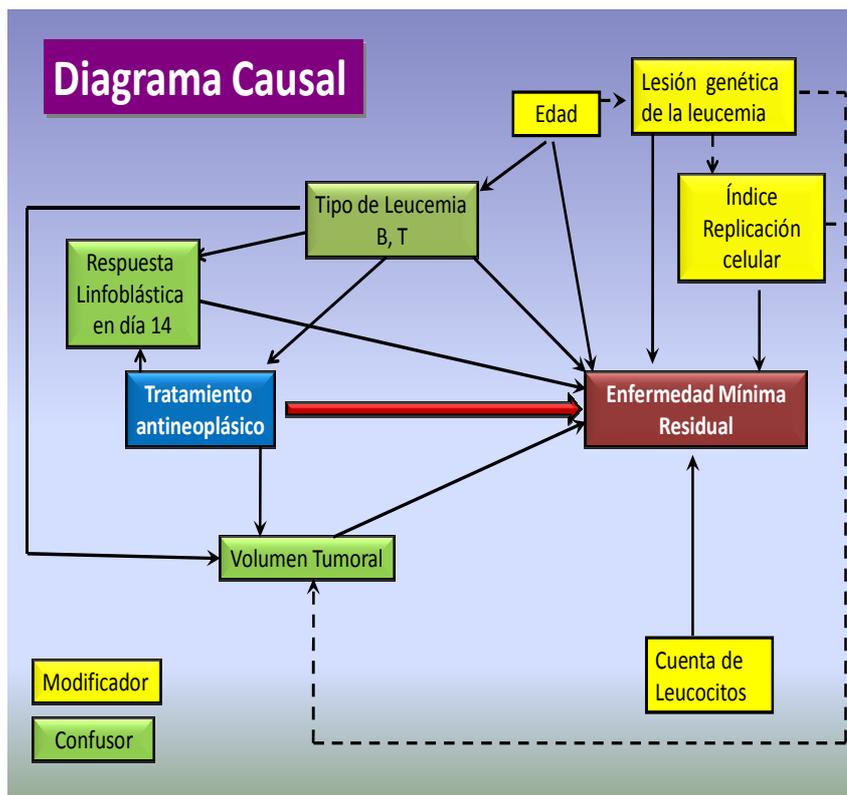


Figura 5. Diagrama causal de la enfermedad mínima residual de la leucemia aguda linfoblástica.

METODOLOGÍA

Pregunta de Investigación

¿Es la citometría de flujo un procedimiento diagnóstico más preciso que la citomorfología para identificar Enfermedad Mínima Residual en la 5ª semana de tratamiento en niños con Leucemia Aguda Linfoblástica (LAL) en aparente remisión inmunohematológica?

Hipótesis

Comparada con la citomorfología, la citometría de flujo identificará Enfermedad Mínima Residual en un mayor volumen de pacientes con Leucemia Aguda Linfoblástica que se encuentran en aparente remisión durante la 5ª semana de tratamiento con quimioterapia en el Hospital Infantil del Estado de Sonora.

Generalidades

Se llevó a cabo un estudio transversal durante 18 meses en pacientes de 0 a 18 años de edad que fueron atendidos en el Hospital Infantil del Estado de Sonora (HIES) debido a leucemia aguda linfoblástica (LAL) diagnosticada mediante aspirado de médula ósea (AMO) en el periodo 1º de Enero de 2009 al 31 de Junio de 2010. Todos los procedimientos del proyecto fueron avalados por el Comité de Ética del HIES.

Para establecer el diagnóstico de LAL se usó el criterio morfológico de la presencia de más de 25% de células blásticas, mismas que fueron clasificadas como L₁, L₂ y L₃ de acuerdo a los criterios de la Federación Franco-Americana-Británica de Morfología de Leucemia Aguda Linfoblástica (FAB) (Pui CH, 2002).

Los sujetos de estudio se agruparon de acuerdo a los factores pronósticos de la LAL recomendados por Lanzkowski (Lanzkowski, 2005). Al inicio del estudio a todos los sujetos se les solicitó inmunofenotipo (conteo de 10,000 células) por citometría de flujo

y citogenética. El inmunofenotipo inicial se determinó con los marcadores CD10, CD19, CD20, CD22, CD45, CD34, HLA-DR, CD38, CD2, CD3, CD5, CD7, TdT, CD58, CD13, CD33, cIgs, sIgs, λ , ésto con el propósito de establecer el linaje celular y diferenciar leucemias mieloides, T o B.

Una vez completada su fase inicial de evaluación clínica de la LAL, se procedió al manejo terapéutico de acuerdo al protocolo 08 ya establecido en el HIES (Anexo 1). El protocolo de manejo en el HIES consiste en la administración de una ventana de prednisona a $40\text{mg}/\text{m}^2$ de superficie corporal (MSC) durante 7 días, más quimioterapia intratecal², a dosis determinada de acuerdo a la edad del paciente como a continuación se menciona: edad menor al año Metotrexate 5mg, citarabina 10mg, hidrocortisona 10mg; edad entre 1 a 2 año con Metotrexate 7.5mg, Citarabina 20mg e Hidrocortisona 20mg en dosis única; edad entre 2 a 3 años con Metotrexate 10mg, Citarabina 30mg e Hidrocortisona 30mg en dosis única; edad > 3 años con Metotrexate 12.5mg, Citarabina 40mg e Hidrocortisona 40mg en dosis única.

Al completar la semana de esteroide, en el día 8 se determinó la cantidad de linfoblastos en un frotis de sangre periférica, para ver la respuesta al esteroide. Subsecuentemente, la fase de inducción quimioterapéutica por 4 semanas fue llevada a cabo con: vincristina $2\text{mg}/\text{m}^2$ IV semanal por 4 dosis, prednisona VO $40\text{mg}/\text{m}^2$ por 4 semanas, L-Asparginasa 6000UI m^2 IM por 6 dosis cada dosis aplicada cada tercer día y doxorubicina $30\text{mg}/\text{m}^2$ IV en la semana 4 tratamiento de acuerdo al protocolo HIES 08 para LAL.

Una vez completado el esquema de quimioterapia de inducción (día 14), se determinó por AMO la persistencia de linfoblastos mediante la búsqueda de células blásticas en el microscopio de luz teñidas por la técnica de Wright. Este reporte fue categorizado como M1= Remisión hematológica con una proporción menor a 5% de células malignas y ausencia de datos clínicos de actividad maligna con datos de

² Se refiere a la administración de los medicamentos antineoplásicos mediante una inyección en la espina dorsal. Intratecal es el espacio localizado entre las capas de tejido que recubren el cerebro y la médula espinal

hematopoyesis eficaz (criterio para considerar al paciente en remisión hematológica); M2= presencia de linfoblastos entre 5% y 29% con hematopoyesis ineficaz; M3= presencia de linfoblastos >30% con hematopoyesis ineficaz y datos clínicos de actividad leucémica.

Finalmente, en una muestra de médula ósea se realizó la determinación de EMR en la semana 5 (día 35) posterior al inicio del tratamiento. Esta muestra fue tomada bajo técnica estéril por un médico oncólogo. Se aspiró una muestra de 5 ml de médula ósea usando Trocar tipo Osgood de calibre 16 o 18 en una jeringa de 10ml, colocada en tubo vacutainer bañado con EDTA 7.5mg. La muestra se envió bajo refrigeración a 4° C a un laboratorio independiente. Esta muestra se preparó para la realización de la citometría de flujo, considerando que el primer reporte de inmunofenotipo al ingreso del paciente es el que permite definir el linaje de la LAL (Tabla II). En el citómetro de flujo se realizó un conteo de al menos 100,000 células mononucleares, buscando intencionadamente la presencia de inmunofenotipos aberrantes persistentes, usando para ello la combinación de cuatro fluorocromos en los anticuerpos (Ac's) monoclonales marcadores señalados en la tabla V.

Una vez detectados los inmunofenotipos aberrantes se determinó la cantidad de células leucémicas residuales detectadas por citometría de flujo en la muestra de médula ósea; la respuesta se agrupó de acuerdo al porcentaje de células detectadas como persistentes. Se consideró EMR negativa cuando se detectó una cantidad menor a 0.01% de células mononucleares con expresión de antígenos aberrantes; fue considerada como EMR positiva si se detectó una cantidad mayor a 0.01% de células mononucleares con antígenos aberrantes.

Fuentes de Datos

Se usó una hoja de recolección diseñada específicamente para el estudio, basados en consulta con expertos y literatura publicada (Pui CH, 2002; Lankowski, 2005; Pizzo PA, 2005) en la que se registró información tanto sociodemográfica como clínica,

Tabla V. Inmunofenotipos aberrantes en leucemia aguda linfoblástica.

Linaje de Células	Combinación de Marcadores	Aplicabilidad, %
LAL linaje T	Tdt/CD5/CD3/(CD19/CD33/HLA-DR	92
	CD34/CD5/CD3/(CD19/CD33/HLA-DR	21
LAL linaje B	CD19/CD34/CD10/CD38	52
	CD19/CD34/CD10/CD58	49
	CD19/CD34/CD10/CD45	47
	CD19/CD34/CD10/TdT	43
	CD19/CD34/CD10/CD66C	31
	CD19/CD34/TdT/IgM	17
	CD19/CD34/CD10/CD22	11
	CD19/CD34/CD10/CD13	10
	CD19/CD34/CD10/CD15	10
	CD19/CD34/CD10/CD21	6
	CD19/CD34/CD10/CD33	6
	CD19/CD34/CD10/CDNG2	5
CD19/CD34/CD10/CD65	4	

Fuente: (Campana D y cols. 2004)

reportes de laboratorio clínico, oncológico y de replicación celular de la citometría de flujo y biología molecular. La definición operacional de las variables estudiadas se detalla en los anexos 5-7.

Aspectos Bioéticos

En los sujetos elegidos se tomó en cuenta la integridad y autonomía de los sujetos en investigación, por lo que sus tutores y ellos mismos, decidieron libremente participar en el estudio. Dado que el propósito central de esta investigación fue reconocer en cada paciente y en forma independiente, la respuesta al tratamiento de inducción, al detectar EMR estuvimos en posibilidad de realizar ajustes en el protocolo de tratamiento lo que constituye un beneficio clínico para los sujetos de investigación.

Ninguno de los sujetos seleccionados o sus familias, erogó gasto alguno por la determinación de los estudios diagnósticos incluidos en el estudio. Dado que uno de los procedimientos, el aspirado de médula ósea, tiene implicaciones potencialmente peligrosas (p.e. infección, dolor en el sitio de punción, sangrado o en casos muy raros ruptura de aguja en el procedimiento para los pacientes), recalamos que aunque es un procedimiento clínico rutinario en niños con LAL, fuimos particularmente cuidadosos en proporcionar información suficiente tanto a los responsables de los niños como a ellos mismos. No se usaron identificadores personales con el propósito de garantizar la confidencialidad de los pacientes, en ningún caso, los resultados individuales serán objeto de publicación y únicamente resultados globales podrán difundirse en ámbitos académicos y científicos.

Muestreo y Tamaño de la Muestra

El tipo de muestreo que se empleó fue de tipo no probabilístico, intencionado; este tipo de muestreo se consideró apropiado dada la naturaleza exploratoria del estudio, además de que asuntos financieros y técnicos dificultaron la posibilidad de aleatorizar la

muestra. Una precaución asociada a este tipo de muestreo es que probablemente los hallazgos no podrían generalizarse a poblaciones distintas a las del estudio.

Los casos fueron elegidos del registro de diagnósticos de primera vez de cáncer infantil ingresados en la unidad de oncología pediátrica del HIES. Se estimó que en un periodo de 10 años, de 500 casos nuevos de patología oncológica, 40% corresponden a LAL, es decir 200 nuevos casos de la enfermedad en el periodo mencionado. Así, se esperaba que durante los 18 meses del estudio se reclutara a 30 sujetos con LAL.

A los 30 casos esperados se les determinó el poder estadístico con el programa G* power 3.0.10, por un lado, en base a una prueba de χ^2 , con un tamaño del efecto de 0.50 y 1 grado de libertad y por el otro, con una prueba de T de Student con un tamaño del efecto a 0.80 con intervalos de confianza de 93 y 95%. En ambas pruebas el poder estadístico fue mayor a 80%, lo que garantiza que la muestra esperada de 30 sujetos con LAL podrá determinar diferencias si es que realmente las hubiera y discutir los resultados (Pértegas y Pita,).

Criterios de Selección

Criterios de Inclusión

- Niños recién nacidos y hasta 18 años de edad, independientemente de su lugar de procedencia o residencia.
- Diagnóstico de LAL establecido por el servicio de oncología del HIES.
- Criterio diagnóstico: más de 25% de células blásticas catalogadas de acuerdo a la clasificación de la FAB como L1, L2 y L3.
- Contar con estudio de inmunofenotipo por citometría de flujo y genético basal.

Criterios de Exclusión

- Haber recibido un tratamiento citostático previo.
- Pacientes en recaída clasificados como refractarios a quimioterapia.

Criterios de Eliminación

- Estudio de citometría de flujo para EMR con conteo menor de 100,000 células mononucleares.
- Complicaciones de la LAL indirectas (P.e. Sepsis, Hemorragias severas, desequilibrios metabólicos, etc.) que no completen la quimioterapia de inducción.

Procesamiento de la Muestra para Determinación de la Enfermedad Mínima Residual por Citometría de Flujo

En el día 35 posterior al inicio del tratamiento se tomó una muestra de aspirado de médula ósea para determinar la EMR. La muestra fue tomada por un médico oncólogo y enviada a un laboratorio independiente en donde se procesó de manera inmediata de acuerdo a los siguientes pasos:

- 1) Se realizó el conteo celular para conocer tanto la cantidad y proporción de las poblaciones celulares que componen la muestra. Para ello, se empleó un equipo Cell Dyn 3700 de ABBOTT Laboratorios ®.
- 2) Se ajustó al equipo para efectuar un conteo mínimo de 1 millón de células mono nucleares.
- 3) Al conteo de células mononucleares, se agregó 50 µl de muestra por tubo y 20 ul de cada marcador y se incubó 20 min en la oscuridad a temperatura ambiente.

A la anterior mezcla se le agregan 2 mL de lisante (diluido 1:10 con agua tridestilada filtrada) a cada tubo y se deja reposar a temperatura ambiente por 10 minutos en obscuridad.

- 4) Se centrifugó por 5 minutos
- 5) Posteriormente se decantó, eliminando el sobrenadante y se agregan 2 ml de Facs Flow³ (Fluorescence-activated cell sorting) a cada tubo. Esta mezcla fue centrifugada y decantada.

³ Facs Flow (Beckton Dickinson): solución utilizada para mantener estable la estructura celular, se prepara con 0.5 % de albumina bovina.

- 6) Finalmente se agregaron 250 ul de formaldehído diluido al 2%
- 7) Esta mezcla se guardó en refrigeración hasta su procesamiento en citómetro.

Procesamiento de las Muestras para Marcadores Citoplásmicos

A las muestras de pacientes para detectar los anticuerpos intracitoplasmáticos de las células leucémicas, se les realizó el siguiente procedimiento:

- 1) Colocar 50 ul de la muestra en tubo de poliestireno
- 2) Adicionar 100 ul de fijador (reactivo intraprep BD) agitar vigorosamente
- 3) Incubar a Temperatura ambiente
- 4) Adicionar 4 ul de Facs Flow (BD) y centrifugar 5 min
- 5) Aspirar sobrenadante
- 6) Adicionar 100 ul de permeabilizante (reactivo 2 intraprep) se incubar 5 min.
- 7) Agitar en vortex a baja velocidad 2 segundos
- 8) Adicionar los anticuerpos seleccionados
- 9) Incubar a T ambiente 15 min.
- 10) Adicional 4 ml de facs flow y centrifugar 5 min a 500 g
- 11) Aspirar el sobrenadante
- 12) Re-suspender en 500 ul de formaldehído al 0.5% para analizar en el citómetro

Caracterización de los Inmunofenotipos Aberrantes

Las células mononucleares fueron caracterizadas por citometría de flujo de cuatro colores. El citómetro empleado para tal caracterización fue el FACScalibur (BD) ®, y el análisis celular se realizó con el software CellQuest ®

Para determinar el fenotipo de las células se utilizó la siguiente batería de Anticuerpos monoclonales Fluoromarcados:

FITC (Isotiocianato de Fluoresceína)

Anti-CD13, CD33, CD10, TdT (DakoCytomation, Copenhagen, Denmark)

Anti-CD38, CD58, CD21, CD66c (Beckman Coulter, Fullerton, Ca, USA)

Anti-CD22, CD45, CD15 (Beckton Dickinson, BD, San Jose Ca, USA)

PE (Ficoeritrina)

Anti-CD10 (DakoCytomation)

Anti-CD56 (Beckman Coulter)

Anti-NG2 (Beckman Coulter)

PerCP (Proteina Clorofila Peridinina)

Anti-CD34

APC (Aloficocianina)

Anti-CD19 (Beckton)

Reconocimiento de Inmunofenotipos Aberrantes

Se buscaron los inmunofenotipos aberrantes de LAL utilizando 4 anticuerpos fluoro marcados bajo las siguientes mezclas base CD 19/34/10. Ejemplo:

CD 19/34/10/38

CD19/34/10/59

CD19/34/10/45

CD19/34/10/TdT

(o cualquiera de los demás 66C, IgM, 22, 13, 15, 21, 33, NG2, 56)

Para el reporte de las poblaciones aberrantes encontradas, se realizó un cálculo basado en el porcentaje encontrado de células positivas del conteo total de células analizadas en el citómetro de flujo:

Ejemplo:

1% células aberrantes detectadas = 1000 células aberrantes detectadas en 100,000 contadas

0.1% = 100

0.01% =10
0.001% =1

Célula aberrante detectada en 100,000 contadas.

El límite de detección del citómetro esta precisamente en el rango de 0.001 a 0.01% estableciéndose como punto de corte 0.01% o sea el rango superior del límite de detección.

Plan de Análisis

Para el análisis estadístico los sujetos fueron agrupados en dos grupos: (a) pacientes en los que se detectó EMR y (b) pacientes sin EMR. Las diferencias en la distribución de las características clínicas y biológicas fueron comparadas por una prueba T de Student en el caso de las variables continuas y por una prueba de Chi-cuadrada para variables categóricas. Para evaluar las diferencias en la distribución proporcional de la expresión de anticuerpos monoclonales, se estratificó a los pacientes de acuerdo al tipo de LAL que se diagnosticó, así tuvimos pacientes con LAL de células B y LAL de células T. La proporción de anticuerpos fue categorizada en (a) anticuerpos de linaje y (b) anticuerpos asociados a linaje, y la proporción de ellos fue examinada al momento del diagnóstico, en el seguimiento a la semana 5 y en el seguimiento a la semana 52. Las diferencias fueron examinadas mediante una prueba de chi-cuadrada. Valores de $p < 0.05$ fueron consideradas como significativas. Todos los análisis fueron realizadas con el programa NCSS ® versión 7.

RESULTADOS

Los sujetos de estudio fueron 35, de éstos, 65.4% fueron varones y 34.6% mujeres ($p=0.063$). Respecto a la edad de los sujetos, 68.6% tenían entre 1 y 9 años de edad, y el restante 31.4% se agrupó tenía 10 y más años ($p=0.028$). Al clasificarles de acuerdo a su estatus de EMR, se observó que 5 sujetos (14.3%) fueron positivos a EMR, en tanto en otros 29 (82.8%) no ocurrió, uno de los sujetos no pudo ser clasificado. La edad promedio de los casos de EMR fue de 9.95 ± 6.04 años, mientras la de los sujetos negativos fue de 8.49 ± 4.65 años, una diferencia sin significancia estadística ($p=0.6854$); si se apreciaron diferencias significativas en el número promedio de leucocitos y el riesgo de BFM, no así en el peso corporal (Tabla VI).

Los casos de EMR fueron clasificados de acuerdo a criterios estándares pronósticos (Lanzkowski, 1999), así se detectó que un sujeto con EMR (+) tenía bajo riesgo clínico, dos alto riesgo y dos muy alto riesgo. Cuando usamos la clasificación de riesgo BFM (Sierrasesúmaga, 2005) predominó el riesgo intermedio en 60% de los sujetos con EMR; en tanto 19 (66%) pacientes sin EMR tuvieron un bajo riesgo, seguidos por los de riesgo intermedio, aunque las diferencias no fueron significativas. Independientemente del criterio de clasificación empleado, no apreciamos diferencias al interior de los estratos. Respecto a los sujetos sin EMR, 51.7% de ellos fue clasificado como de bajo riesgo clínico, seguidos por 34.5% para alto riesgo. En general, los pacientes con EMR tenían hepatomegalia⁴ ≥ 10 cm ($p<0.000$), pero sin esplenomegalia⁵ ($p=0.0145$) (Tabla VII).

⁴ Hepatomegalia es el aumento en el tamaño del hígado por sobre los límites estimados para cada grupo de edad

⁵ Esplenomegalia se refiere al incremento en el tamaño del bazo por arriba de los límites estimados para cada grupo de edad

Tabla VI. Diferencia de medias en variables seleccionadas en pacientes pediátricos con leucemia aguda linfoblástica, según estatus de Enfermedad Mínima Residual (EMR) HIES, 2009-2010.

Variable	EMR		p*
	PRESENTE (N=5)	AUSENTE (N=29)	
Edad (años)	9.95 ± 6.04	8.49 ± 4.65	0.0208
Peso (kg)	47.90 ± 34.85	31.47 ± 18.22	0.0577
Leucocitos	135,226±228,151	36677±74,331	0.0325
Riesgo BFM	1.46 ± 0.71	1.06 ± 0.37	0.0298

*Basado en una T de Student para diferencia de dos medias muestrales

Tabla VII. Distribución de estándares pronósticos, según estatus de la EMR en pacientes pediátricos con leucemia aguda linfoblástica, HIES, 2009-2010.

Variable	EMR		p ^{1/}
	Presente. N (%)	Ausente. N (%)	
	N=5	N=29	
Grupo de Riesgo Clínico			
Bajo Riesgo	1 (20.0)	15 (51.7)	0.732
Alto Riesgo	2 (40.0)	10 (34.5)	
Muy Alto Riesgo	2 (40.0)	4 (13.8)	
Visceromegalias (cm)			
Hepatomegalia >10cm	4 (80.0)	1 (3.4)	0.0000
Hepatomegalia <10cm	1 (20.0)	28 (96.5)	
Esplenomegalia > 10cm	1 (20.0)	0 (0.0)	
Esplenomegalia < 10cm	4 (80.0)	29 (100.0)	0.0145
Grupo Riesgo BFM			
Bajo (0.8 - 1.2)	1 (20.0)	19 (65.5)	0.0561
Intermedio (1.2 - 1.7)	3 (60.0)	9 (31.0)	
Alto (>1.7)	1 (20.0)	1 (3.4)	

1/ Basada en una Chi² para diferencia de proporciones

*Determinado por la fórmula (Vol. Tumoral= 0.2 x log (blastos/ml+1)+ 0.6 x hepatomegalia en cm+ 0.04 x esplenomegalia en cm)

La tabla VIII muestra el patrón bioquímico de los sujetos. En general, se observó que la mayoría de pacientes presentaba anemia moderada, su cuenta leucocitaria estaba por debajo de 50,000 mm³, la mayoría tenía plaquetas por debajo de 50,000 mm³, tenían cifras anormales de DHL y estaban con niveles normales de transaminasas hepáticas, glucosa sanguínea y ácido úrico, pero en cuanto la neutropenia⁶, se apreció que en los niños con EMR la de grado I fue más frecuente (80%), en tanto en los pacientes sin EMR la de grado IV (55%) (p=0.0072), aquí llama la atención que ninguno de los sujetos con EMR presentó este grado de severidad neutropénica.

En relación a las características inmunomoleculares, independientemente de su estatus de EMR, se observó que la mayor proporción (91%) de pacientes correspondió a leucemias de linaje B, mientras el resto fue clasificado como de linaje T. Tres de cada cuatro sujetos tuvo un cariotipo normal y en el 80% de los pacientes, el índice de DNA fue ≥ 1 . (Anexo 2). Por otro lado, la mayoría (80%) de los pacientes con EMR (+) fueron diagnosticadas como leucemia de linaje B, únicamente un caso registró inmunofenotipo T. Tres (60%) de los sujetos con EMR (+) tuvieron lesión estructural e índice DNA < 1.

Al tomar en consideración el estatus de EMR, no apreciamos diferencias en cuanto al inmunofenotipo ni la morfología, pero si en el cariotipo (p=0.0071) y en el índice de DNA (p=0.02). En el caso del cariotipo, hubo una mayor proporción (60% vs 10%) de lesiones estructurales en los individuos con EMR (+) y en el índice de DNA, hubo un mayor porcentaje (60%) en los pacientes EMR (+) con índice <1 con EMR (+) (Tabla IX).

⁶ Neutropenia es la disminución aguda o crónica de granulocitos, también conocidos como leucocitos polimorfonucleares, en la sangre, lo que puede predisponer a la adquisición de infecciones.

Tabla VIII. Características bioquímicas de los sujetos de acuerdo a su estatus de EMR HIES, 2009-2010.

Variable	EMR		p ^{1/}
	Presente. N (%)	Ausente. N (%)	
	N=5	N=29	
Anemia (g/dl)			
Leve (>10gr/dl)	0	2(6.9)	
Moderada(<10 - 6gr/dl)	4(80.0)	22(75.9)	0.8403
Severa(<6gr/dl)	1 (20.0)	5(17.2)	
Leucocitos(mm3)			
< 50000	3(60.0)	25(86.3)	0.1557
> 50000 - 99999	1(20.0)	1(3.4)	
> 100000	1(20.0)	3(10.3)	
Neutropenia %			
Grado I	4(80.0)	6(20.7)	0.0072
Grado II	0 (0.0)	2(6.9)	
Grado III	1(20.0)	4(13.8)	
Grado IV	0 (0.0)	16(55.1)	
Plaquetas (mm3)			
<50000	3(60.0)	16(55.1)	0.8409
51000 A 100000	2(40.0)	8(27.6)	
> 101000	0 (0.0)	5(17.2)	
DHL (U/dl)			
Normal (240-480)	1(20.0)	4(13.8)	0.7174
Anormal	4(80.0)	25(86.3)	
Transaminasas (U/dl)			
TGO			
Normal (0-38)	4(80.0)	13(44.8)	0.217
Anormal	1(20.0)	13(44.8)	
TGP			
Normal (7-41)	3(60.0)	22(75.9)	0.2858
Anormal	2(40.0)	5(17.2)	
Glicemia (mg/dl)			
Normal (<110)	4(80.0)	18(62.1)	0.9315
Anormal	1(20.0)	5(17.2)	
Acido Úrico (mg/dl)			
Normal	5(100.0)	18(62.1)	0.1873
Anormal		9(31.0)	

1/ Basada en una Chi2 para diferencia de proporciones

Tabla IX. Características inmunomoleculares de los sujetos de estudio, de acuerdo a su estatus de EMR HIES, 2009-2010.

Variable	EMR		p ^{1/}
	Presente. N (%)	Ausente. N (%)	
	N=5	N=29	
Inmunofenotipo			
<i>Células B</i>	4 (80.0)	27 (93.1)	0.3894
Pre-B	2 (40.0)	6 (20.7)	
Pre-B Temprana	1 (20.0)	20 (68.9)	
Pre-B con expresión CD7	0 (0.0)	0 (0.0)	
Pre-B Temprana con expresión CD33	1 (20.0)	1 (3.4)	
<i>Células T</i>	1 (20.0)	2 (6.9)	
Morfología			
L1	1 (20.0)	13 (44.8)	0.2975
L2	4 (80.0)	16 (55.2)	
Cariotipo			
Lesión Estructural	3 (60.0)	3 (10.3)	0.0071
Normal (46XX, 46XY)	2 (40.0)	23 (79.3)	
Sin reporte		3 (10.3)	
Indice de DNA			
Indice DNA ≤ 1	3 (60.0)	2 (6.9)	0.002
Indice DNA = 1		11(37.9)	
Indice DNA ≥ 1	1 (20.0)	13 (44.8)	
Sin Reporte	1 (20.0)	3 (10.3)	

1/ Basada en una Chi2 para diferencia de proporciones

La Tabla X describe el criterio de respuesta terapéutica de todos los pacientes. Se observó que 34 sujetos (97%) tuvieron una respuesta adecuada al tratamiento de inducción; además, en la semana 5 --por citomorfología del aspirado de médula ósea, al 100% de los sujetos no se les detectó actividad leucémica. Se apreció que a pesar de una aparente total recuperación de las médulas óseas, únicamente 83% de los pacientes estaba libre de actividad leucémica cuando fueron evaluados por citometría de flujo a la semana 5 de tratamiento. Así, la EMR fue positiva en 5 pacientes (14%), determinada por el análisis de citometría de flujo con una ($P=0.00$).

Todos los casos con EMR negativa tuvieron una buena respuesta al día 14 por análisis de microscopía de luz, aunque 59% de ellos tenían médula ósea no recuperada (Tabla XI).

La figura 6 muestra el resultado de 34 casos evaluados de acuerdo a su estatus de enfermedad mínima residual y la cantidad de células malignas detectadas a la semana 5 del tratamiento de inducción. Observamos que todos los sujetos con EMR negativa tuvieron un conteo de células malignas residuales menor a 1000 ($<0.01\%$), con una media de 0.1706 ± 0.2139 . Los 5 casos positivos con EMR (+) tuvieron un conteo mayor a 1000 ($>0.01\%$) células malignas residuales con una media de 3.1566 ± 2.0385 , esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p= 0.0153$).

Las tablas XII y XIIa muestran la expresión inmunofenotípica inicial de los 35 sujetos con leucemia aguda linfoblástica (LAL) de células B (LAL-B) y T (LAL-T), y en ellas se despliegan los anticuerpos (Ac) monoclonales aberrantes residuales de la EMR identificados por citometría de flujo en la semana 5 de inducción y en el seguimiento clínico a la semana 52 del tratamiento.

Los Ac monoclonales para diagnóstico de LAL-B más frecuentes fueron los CD10, CD22, CD19, CD79A, e Igc (Tabla 7); por lo que respecta a LAL-T, los Ac identificados fueron Tdt, CD2, CD3, CD7 y CD5 (Tabla 7-A).

Tabla X. Criterio de Respuesta al Tratamiento de Inducción de los sujetos investigados.

Variable	N=35	%	p ^{1/}
Medula Ósea del día 14^{a/}			
Negativa	34	97.1	0.000
Positiva	1	2.9	
Medula Ósea semana 5^{a/}			
Negativa	35	100	0.000
Positiva	0	0	
Criterio de Respuesta Medular			
M 1 (Médula ósea normal)	16	45.7	0.612
M 2 (Médula ósea sin blastos, no recuperada)	19	54.3	
M 3 (Médula ósea con más de 5% de blastos)	0	0	
Enfermedad Mínima Residual^{b/}			
EMR positiva	5	14.3	0.000
EMR negativa	29	82.8	
Sin Reporte	1	2.9	

a/ Se consideró positiva si la cuenta de linfoblastos era >0.05%, y negativo cuando la cuenta era <0.05%

b/ EMR positiva si la cuenta de inmunofenotipos aberrantes era >0.01%, y negativa si la cuenta era <0.01%. Esta clasificación se realizó en la semana 5 del tratamiento de inducción

1/Basado en una prueba de Chi² para diferencia de proporciones

Tabla XI. Criterio de Respuesta Medular según reporte de EMR en pacientes pediátricos con leucemia aguda linfoblástica, HIES, 2009-2010.

Variable	EMR		p ^{1/}
	Presente. N (%)	Ausente. N (%)	
	N=5	N=29	
Respuesta Medular del día 14			
Negativa	1(20.0)	29 (100.0)	0.000
Positiva	4(80.0)		
Criterio de Respuesta Medular			
M 1 (Médula ósea normal)	4(80.0)	12(41.4)	0.110
M 2 (Médula ósea sin blastos no recuperada)	1(20.0)	17(58.6)	
M 3 (Médula ósea con más de 5% de blastos)	0 (0.0)	0 (0.0)	

1/ Basada en una Chi2 para diferencia de proporciones

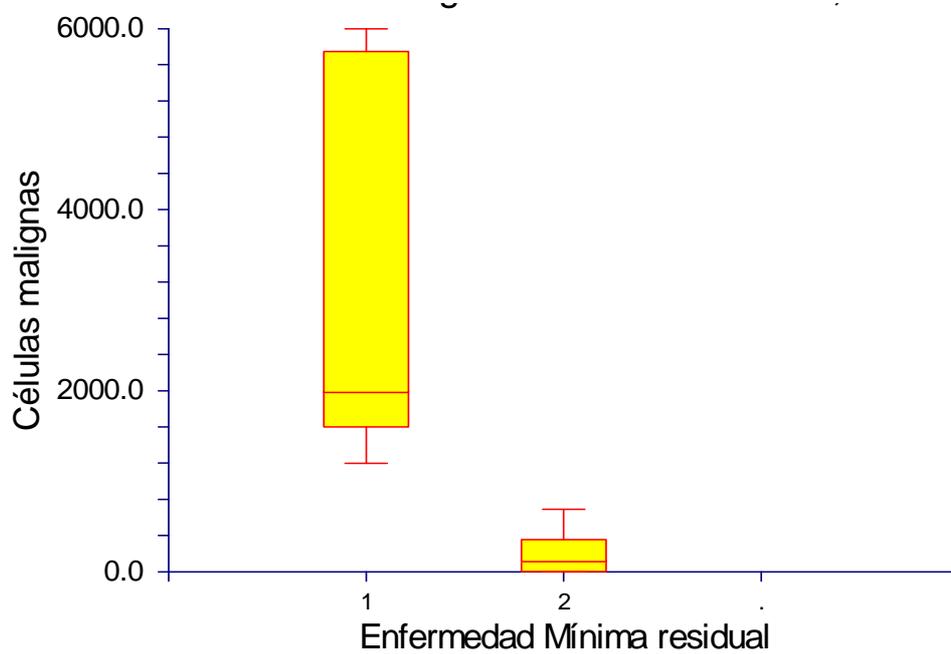


Figura 6. Cuantificación de células malignas residuales en niños con leucemia aguda linfoblástica. HIES, 2009-2010

1= Enfermedad Mínima Residual= EMR (+)

2= Enfermedad mínima Residual= EMR (-)

Tabla XII. Distribución proporcional de la expresión de marcadores en pacientes pediátricos con leucemia aguda linfoblástica de células B, HIES, 2009-2010.

Panel diagnóstico	Inmunofenotipo diagnóstico		Inmunofenotipo Aberrante semana 5		Inmunofenotipo Aberrante semana 52		p ^{1/}
	N = 35	%	N = 34	%	N = 16	%	
Marcador de célula B							
CD10	26	74	19	56.0	2	12.5	0.1816
CD22	25	71.5	22	65	0	0	0.5491
CD19	24	68.5	21	62	0	0	0.5528
CD79a	23	67.6	12	35	2	12.5	0.0086
IgC	7	20.0	1	3.0			0.0269
Marcadores asociados							
CD34	25	71.5	22	65.0	4	25	0.5491
HLADR	25	71.5	17	50.0	3	18.8	0.0682
CD45	24	68.5	11	32.0	1	6.3	0.0026
CD38	22	62.8	12	35.0	3	18.8	0.0220
CD24	15	43.0	7	20.5	1	6.3	0.0472
CD20	10	28.5	7	20.5	2	12.6	0.4417
Tdt	7	20	6	18.0	2	12.6	0.7578
CD11c	2	6	0	0.0	0	0	0.1572
CD7	1	2.85	1	3.0			1
CD 33,21,56, 13	1	2.85	0	0.0	0	0	0.3208
CD 58	0	0	3	9.0	1	6.3	0.0853
No detectado	0	0	2	6.0	3	12.6	0.1454
CD5	0	0	1	3.0	1	6.3	0.3068
IgM	0	0	1	3.0			0.3068
Defunción	0	0	0	0	2	12.6	
No realizados	0	0	0	0	7	43.8	

1/ Basada en una Chi2 para diferencia de proporciones

Tabla XIIa. Distribución proporcional de la expresión de marcadores en pacientes pediátricos con leucemia aguda linfoblástica de células T. HIES, 2009-2010.

Panel diagnóstico	Inmunofenotipo diagnóstico		Inmunofenotipo Aberrante semana 5		Inmunofenotipo Aberrante semana 52*		p ^{1/}
			N=3	%	N	%	
Marcador de celula T							
Tdt	3	100.0	1	33.3			
CD3c	3	100.0	3	100.0			
CD5	3	100.0	3	100.0			
CD7	3	100.0	3	100.0			
CD2	3	100.0	1	33.3			
Marcadores asociados							
CD38	3	100.0	0	0.0			
HLADR	1	33.3	2	66.6			
CD45	2	66.6	1	33.3			
CD58	1	33.3	0	0.0			
CD22,10,20,33,8,	1	33.3	0	0.0			
CD38	1	33.3	1	33.3			
Referido					1	33.3	

* Ningún paciente había completado el seguimiento al momento del corte del estudio

En el seguimiento a la semana 5, se apreció en general una reducción en el volumen de células malignas residuales en la LAL-B, aunque sólo fue significativa para CD79a ($p=0.0086$) e Igc ($p=0.0269$). Otros Ac expresados que no son muy frecuentes en LAL-B fueron Tdt, CD58 e IgM, y estos dos últimos incrementaron su expresión a la semana 5, mientras en dos sujetos no hubo registro de Ac monoclonales aberrantes. También encontramos que dos pacientes con LAL-B expresaron Ac monoclonales que son exclusivos de LAL-T, tales Ac fueron CD5 y CD7.

En el seguimiento a la semana 52, se observó que se mantuvo la reducción en la expresión de Ac monoclonales aberrantes. Aunque es conveniente señalar que en el grupo de pacientes con LAL-B, hubo dos defunciones y a otros siete sujetos no fue posible determinar la expresión de Ac's por diversos motivos (p.e. muestra inadecuada, proceso séptico, entre otros)

Una situación particular fue la detección de un sujeto con EMR positiva con expresión de inmunofenotipo de células pre B (CD10, CD22, CD24, CD79a, IgC, Co-expresión CD13), CD34, CD48, CD45, HLADR, que cambió a la semana 5 de seguimiento por una línea de expresión inmunofenotípica leucémica de CD19, CD22, CD24, CD34, CD38, CD45, HLADR, CD10(-), que clínicamente es considerada como de mal pronóstico.

Por otro lado, aunque sólo se encontraron 3 pacientes con LAL-T los Ac monoclonales más frecuentes fueron Tdt, CD3, CD5, CD7 y CD2, y a la semana 5 no se apreciaron cambios en su expresión cuantitativa (tabla 7-a).

Finalmente, la tabla XIII resume los hallazgos clínicos más significativos en los niños que tuvieron EMR (+). En ella, se aprecia que en cuanto al criterio de pronóstico clínico, estos pacientes fueron clasificados principalmente como pacientes de alto y muy alto riesgo de recaída; también destaca que hubo un predominio de LAL de linaje B en los casos. En este grupo de pacientes, también se detectó la presencia de una lesión genética en tres de los cinco sujetos. De los pacientes, sólo en uno de los cinco, se documentó una recaída temprana.

Tabla XIII. Características clínica–biológicas de los pacientes pediátricos con EMR. HIES, 2009-2010.

Características	Sujetos				
	1	2	3	4	5
Sexo	M	M	F	M	F
Edad	5.25	4	14.2	7.3	18.3
Grupo de Riesgo Clínico	MAR	MAR	AR	BR	AR
Leucocitos mm³	540,000	78,410	40,810	15,010	57,000
Riesgo BFM*	2.6	1.48	1.31	1.25	0.65
Respuesta a la inducción día 14	M2	M2	M2	M1	M1
Morfología	L2	L2	L2	L1	L2
Inmunofenotipo	Pre-B	T 47XY+22	Pre-B	Pre-B Temprana	Pre B
Cariotipo	46XY;t(9;22)	t(8;11)	Normal	46XY;t(6;14)	Normal
Índice DNA	1	1	1.09	1	Sin registro
EMR % Células	4.58	2	1.2	2	6
Estado Actual	Recaída	Referido	Remisión	Remisión	Abandono

MAR: Muy Alto riesgo, AR: Alto Riesgo, BR: Bajo Riesgo

M1:Médula ósea normal; M 2 :Médula ósea sin blastos no recuperada), M3: Médula ósea con >25% blastos

*Determinado por la fórmula (Vol. Tumoral= 0.2 x log (blastos/ml+1)+ 0.6 x hepatomegalia en cm+ 0.04 x esplenomegalia en cm)

DISCUSIÓN

Los hallazgos de este estudio corroboran que la citometría de flujo (CF) es una herramienta útil para identificar Enfermedad Mínima Residual (EMR) en niños con Leucemia Aguda Linfoblástica (LAL) que reciben quimioterapia de inducción, tal como ha sido demostrado en otros países (Björklund, 2003; Vidriales, 2003; Borowitz, 2003; Borowitz, 2008) y sugieren la conveniencia de su uso sistemático en hospitales similares al del estudio, donde la CF no es empleada rutinariamente como herramienta pronóstica. La identificación oportuna de EMR tiene relevancia clínica pues permite la estimación de la carga leucémica, ayuda a seleccionar las estrategias terapéuticas más apropiadas y constituye un predictor importante de recaída clínica en pacientes con LAL (Coustan, 2006; Borowitz, 2008).

Aunque es posible argumentar que los estudios de EMR no predicen con total precisión la recaída clínica, la CF ha mostrado complementar adecuadamente el estudio minucioso de factores de pronóstico clínico como los que fueron empleados en este estudio. El valor de la CF para detectar EMR ha sido ya demostrado e independientemente de la modalidad técnica empleada en su ejecución, las mejoras en su validez, confiabilidad, simplicidad y costo-beneficio, han por un lado, incrementado su capacidad como predictor independiente de recaída clínica (Dworzak, 2002) y como instrumento discriminatorio para estratificar los protocolos de manejo terapéutico (Attarbashi, 2008).

La prevalencia de EMR que observamos para el día 35 fue únicamente del 14.7% (5/32), una cifra inferior a lo reportado en otros países en los que la prevalencia de EMR oscila entre 20 y 35%. (Coustan, 1998; Coustan, 2000; Borowitz, 2003; Stow, 2010). No obstante la baja prevalencia de EMR que encontramos, es conveniente señalar que en México no se conoce con precisión esta cifra, probablemente porque el uso de la CF para detectar EMR no es rutinario en el país, aunque se reconoce la utilidad de la CF (Coronel, 2005).

De esos cinco pacientes con EMR, sólo tres fueron inicialmente categorizados como "pacientes con alto riesgo" de falla al tratamiento de inducción, lo que muestra que los factores de pronóstico clínico aunque buenos, no son suficientes para detectar posibles recaídas en pacientes pediátricos con LAL. No tenemos evidencia concluyente para generalizar nuestros hallazgos, entre otros motivos por el pequeño número de sujetos que estudiamos, pero es posible inferir que una proporción cercana al 10% de pacientes con mediano y bajo riesgo de recaída no podrían ser identificados sino mediante el empleo de la CF.

La baja prevalencia de EMR observada pudiera ser explicada por la variabilidad biológica del tipo de leucemia. En nuestros sujetos, se apreció que solamente dos de ellos (6%) correspondieron a leucemia de células T, que se asocian a un mayor riesgo de recaída. Otros estudios revelan que la proporción de individuos con LAL de células T es cercana al 15% (Pui, 2002, Pizzo, 2005). Esto correlaciona también, con el hecho de que usando marcadores clínicos como el riesgo BFM (Larios, 2010) y las visceromegalias, uno de cada tres pacientes fue categorizado como con "bajo riesgo" de recaída clínica al comienzo del estudio, mientras que únicamente dos pacientes (6.2%) fueron clasificados como de "alto riesgo", lo que nos indica que la determinación de EMR mediante CF puede apoyar positivamente al oncólogo en su decisión de inducir nuevos esquemas terapéuticos o reforzar los seleccionados. Los análisis multivariados que han controlado el efecto de variables como el inmunofenotipo, la edad, el sexo, la cuenta leucocitaria y tipo de tratamiento, han mostrado que la EMR es un predictor independiente de recaída clínica (Van, 1998), pero estudios adicionales que incorporen aberraciones cromosómicas y el índice de DNA son aún necesarios.

Por otra parte, se apreció que 83% de todos los pacientes estudiados tuvo una EMR negativa, es decir, inmunofenotipos aberrantes en células mononucleares $< 0.01\%$, cuando lo esperado es una proporción cercana al 75%. Esta prevalencia de EMR negativa es mayor a la reportada por (Borowitz, 2003, Coustain, 2000), pero es inferior a la consideración clínica de que hasta 97% de los pacientes oncológicos atendidos en el HIES y que son estudiados únicamente por citomorfología, tendrían una respuesta

medular negativa (Rendón, 2000). Esto también sustenta nuestra recomendación de usar CF para determinación de EMR, pues la medición de células residuales en LAL mediante morfología convencional tiene únicamente una sensibilidad de 1 a 5% para detectar blastos, lo que le confiere una validez clínica limitada. (Pui, 2000; Meshinchi, 2001; Coustan, 2006; Coustan, 2009.)

También es posible que la elevada proporción de sujetos con EMR negativa que identificamos al final del tratamiento de inducción sea consecuencia de una respuesta favorable al protocolo empleado en el HIES. En este hospital, dicho protocolo incluye menos antineoplásicos (vincristina, prednisona, doxorrubicina, quimioterapia intratecal con metotrexate+citarabina y L-asparaginasa), que en otros hospitales, en los que se llegan a emplear hasta 8 fármacos (Coustan, 2006; Viridiales, 2003). Por lo que es posible inferir que usando un esquema antineoplásico estándar se disminuye la citotoxicidad y se prolonga la remisión completa de pacientes con LAL (Mörcke, 2008), lo que implica que este esquema empleado en el HIES puede constituir una herramienta terapéutica eficaz para reducir la ocurrencia de EMR, pero es conveniente que nuevos estudios observacionales prospectivos y ensayos clínicos se diseñen para probar esta hipótesis.

Por otro lado, uno de los objetivos de este estudio fue identificar los inmunofenotipos aberrantes en niños con LAL. Dicha caracterización fenotípica es posible debido a los progresos logrados en la CF; su relevancia clínica es irrefutable, porque entre otras cosas, contribuye a identificar el origen de células neoplásicas, definir grupos de riesgo y detectar EMR en pacientes que alcanzaron remisión clínica (Campana, 1995; Sánchez, 2002; Björklund, 2003; Borowitz, 2008). Lo que nosotros encontramos es consistente con la literatura. La CF permitió clasificar a las LAL de acuerdo su linaje precursor; así, encontramos la expresión de los inmunofenotipos CD10, CD22, CD19, CD34 y HLA-DR en aproximadamente 70% de los pacientes con LAL de linaje B (LAL-B), lo que es semejante a reportes previos que han señalado que la presencia de estos antígenos oscila entre 80-100% de todas las LAL-B pediátricas (Pui, 2004; Marsán, 2004). Adicionalmente, tres de cada cuatro pacientes con LAL-B

expresaron CD10, lo que tendría una relevancia clínica, pues dicha expresión ha sido vinculada a mejor pronóstico clínico (Dakka, 2009), aún cuando no existe consenso al respecto (Consolini, 1998; Rivera, 1997). Estudios futuros pueden evaluar la correlación entre la expresión de CD10 y la supervivencia a largo plazo en niños con LAL-B como los del presente estudio.

Otros inmunofenotipos aberrantes que se detectaron en al menos dos tercios de los casos de LAL-B fueron CD79a, CD45 y CD38. Este hallazgo es semejante a lo reportado en la literatura, en donde se ha documentado que los patrones de expresión inmunofenotípica más prevalentes en pacientes con LAL incluyen a los fenotipos CD10/CD34/CD19/CD45 y CD10/CD38/CD19/CD45, ambos hasta en el 100% de los pacientes (Jmili, 2010) aunque otros patrones comunes son CD34/CD22/CD19/CD45 (66%) y HLA-DR/CD20/CD19/CD45 (60%). La expresión de CD19, CD10 y HLA-DR ocurre en general, entre 80 y 85% de las LAL-B pediátricas, semejante a nuestros resultados, aunque en nuestros pacientes se apreció que la expresión de CD19 (68.5%) fue algo inferior. Por otro lado, hasta en 75% de los pacientes con LAL de precursor B tienen el fenotipo pre-B temprano, lo que se asocia a mejor pronóstico. Los pacientes con pre-B tienen inmunoglobulina citoplásmica (IgC), lo cual es indicador de una etapa intermedia de células B diferenciadas. En nuestra serie de casos solamente se observó IgC en 20% de los pacientes con LAL-B, lo que requiere confirmarse en adicionales investigaciones locales.

En nuestro estudio, una situación particular fue la detección de un caso de EMR positiva con expresión inmunofenotípica pre-B temprana que cambió su expresión a un linaje pre-B. Al respecto, algunos investigadores (Campana 1999; Pui, 2002) han descrito la pérdida entre un 10 y 20% de marcadores de superficie como CD10, TdT, HLADR, CD20, lo que puede provocar variaciones en el inmunofenotipo de linaje (lineage switch). Esta variación se considera como de células leucémicas no relacionadas a la clona leucémica original, lo que puede ser un indicador de malignidad secundaria.

Por otra parte, apreciamos que la expresión inmunofenotípica en pacientes con LAL de células T (LAL-T) es consistente con lo reportado en la literatura. Así, los marcadores de linaje Tdt, CD3c y CD5 se observaron en los tres pacientes identificados con LAL-T; de hecho, la sola detección de CD3c y CD5 son suficientes para establecer el diagnóstico inmunológico (Campana, 1990). En el seguimiento a la semana 5 de nuestros sujetos no se apreciaron cambios en la expresión de los marcadores de linaje; cambios en la expresión fenotípica ocurren con frecuencia tanto en pacientes con LAL-B y LAL-T, lo que puede estar relacionado con respuesta adversa al tratamiento (Campana, 1990).

En todo caso, la identificación de estos patrones de expresión sea en LAL-B o en LAL-T, es posible mediante la determinación de EMR por CF, lo que contribuye a que la estratificación del riesgo de recaída sea más precisa, entre otras cosas debido a que la determinación cuantitativa de la EMR permite diferenciar la probabilidad de recaída en pacientes con EMR detectable de aquellos que no lo son, lo que justifica decisiones clínicas para intensificar o modificar los esquemas de tratamiento (Goulden, 2001). En adición a la utilidad de la citometría, otro método que en el futuro conviene examinar es la reacción en cadena de polimerasa (PCR) ya sea para detectar la amplificación de los reordenamientos de antígenos receptores de inmunoglobulina o de receptores de células T, que también han mostrado ser herramientas valiosas para predecir recaídas en niños con LAL de linaje B (Zhou, 2007)

Aunque hay evidencia científica que avala la utilidad de la CF como marcador pronóstico en LAL que permite distinguir linfocitos y células hematopoyéticas indiferenciadas, incluso en momentos en que la médula ósea puede estar con muy baja celularidad (Elanie, 2000). No obstante esto, uno de los problemas de la CF en EMR es que requiere el uso de diferentes anticuerpos monoclonales para su rastreo (Elaine, 2000) lo que eleva considerablemente los costos de la prueba y constituye un argumento para no usarla sistemáticamente en escenarios como el nuestro. Es posible usar estrategias para disminuir los costos de la CF, por ejemplo, un estudio en Brasil se limitó al empleo de tres marcadores (CD19/CD10/CD34) en niños con leucemia de células B

(Elanie, 2006), algo que es razonable pues son los marcadores más frecuentemente detectados. También podemos argumentar que la CF es una técnica reproducible en laboratorios de mediana complejidad técnica y más barata que la biología molecular.

Por lo que respecta los factores clínicos pronósticos de los pacientes con EMR, observamos que la CF nos ayudó a identificar 5 pacientes con EMR (+) que estaban aparentemente en remisión clínica completa después de la terapia de inducción. Como señalamos anteriormente, en tales sujetos predominó la clasificación clínica pronóstica de “alto” y “muy alto riesgo”, según (Lansowsky, 2005). Estos criterios son auxiliares importantes para detectar si un paciente tiene una mayor probabilidad de recaída clínica, pero no parecen suficientes para detectar a todos los pacientes con riesgo de EMR. Los hallazgos de nuestro estudio muestran que mediante el examen morfológico y el empleo de esos criterios de riesgo, se habría pronosticado que 97% de los sujetos estarían libres de EMR, cuando solamente 83% en realidad lo estuvo. Los criterios de riesgo y el estudio de médula ósea son la herramientas diagnósticas tradicionales para demostrar EMR, pero como ha sido señalado, tienen limitada sensibilidad al término del tratamiento de inducción (Elanie, 2005)

Diversos son los criterios clínicos pronósticos que se emplean sistemáticamente en pacientes con LAL, e incluyen entre otros a la edad, la cuenta leucocitaria ($>50,000\text{mm}^3$), el ensanchamiento mediastinal, el inmunofenotipo, el cariotipo, el índice DNA, infiltración a órganos santuarios (p.e. testículos y sistema nervioso central), respuesta inicial al esteroide, respuesta al día 14 y recientemente, el resultado de EMR. Todos estos criterios son usados en conjunto, y ninguno de ellos de forma individual posee la suficiente validez para pronosticar recaídas clínicas. Esto es importante que se tome en cuenta en hospitales como el del presente estudio.

En los sujetos con EMR (+) se observó que tenían una edad promedio (5.6 años) inferior que los niños con EMR (-), este hallazgo es diferente de lo reportado en la literatura, pues en general los pacientes con EMR (+) suelen tener o menos de 1 año o más de 10 años de edad (Pizzo PA, 2005). Además, tres de los casos de EMR (+)

tuvieron cuentas leucocitarias $<50,000 \text{ mm}^3$, lo que sugeriría un pronóstico favorable al tratamiento de inducción (Pizzo, 2005) y que sin la CF probablemente no hubieran sido identificados.

Por otra parte, en el estudio del cariotipo, tres pacientes tuvieron una lesión estructural cromosómica de mal pronóstico, en tanto los otros dos tenían cariotipo normal. No tenemos ninguna evidencia para concluir a este respecto, pero algunos reportes han señalado que aproximadamente 50% de los pacientes con fenotipo pre-B tienen cariotipo normal, mientras que la detección de hiperdiploidia en niños con pre-B temprana es una señal de buen pronóstico (Hamouda, 2007). Es conveniente que se realicen a nivel local, estudios para examinar la correlación entre el estudio del cariotipo, la detección de EMR y la recaída clínica en pacientes con LAL.

La clasificación de riesgo BFM (Madero, 2005; Sierrasesumaga, 2005) usada por grupos europeos ha mostrado ser útil. En nuestro estudio, esos criterios ayudaron a clasificar a tres de los sujetos como de riesgo intermedio, uno más como de “alto riesgo” y otro como de “bajo riesgo.” Esta clasificación ha sido poco utilizada en América Latina, pero recomendaríamos su empleo rutinario pues permite apreciar una estratificación de riesgo en estos pacientes, lo que eventualmente ayuda a decisiones terapéuticas. Lo que conviene, es ejecutar nuevos estudios para evaluar la correlación entre los criterios BFM y la CF.

Una situación interesante fue que en cuatro de los cinco casos con EMR (+) se detectó la presencia de índices de DNA distintos de 1.16 (punto de corte) en la CF. A este respecto se ha reportado que un índice de DNA menor a 1.16 tiene peor pronóstico que los casos con índices entre 1.16 y 1.6 (Ghazi Al-Harbi, 2000; Ulrikka N). Mientras los índices elevados de DNA se han asociado a la presencia de hiperdiploidias en LAL y a una mejor respuesta terapéutica a los regímenes empleados (Forestier, E). Basados en los hallazgos, sugerimos que en pacientes con EMR (+) se considere la posibilidad de falla al tratamiento cuando exista un reporte de índice de DNA $<$ a 1.16, aunque conviene que se ejecuten nuevos estudios multicéntricos para incrementar el poder

estadístico del análisis.

Cuando se examinó el inmunofenotipo de los pacientes con EMR (+), fue evidente el predominio de LAL de linaje B. No obstante, es conveniente señalar que la LAL B que observamos mostraron algunas particularidades de expresión fenotípica que pudieron contribuir a la positividad de EMR, por ejemplo, apreciamos en dos casos la expresión de inmunoglobulina citoplasmática, co-expresión de CD7 y co-expresión de CD33, lo que no ha sido asociado a resultados desfavorables al tratamiento antineoplásico (Drexler, 1991; Neg, 2000). Esto constituye otra evidencia adicional de la utilidad de la CF, pues la identificación de la expresión de marcadores de superficie define de mejor modo la línea leucémica.

Por otro lado, aunque no hay consenso al respecto, parece que la detección de EMR mediante CF al final de la inducción es el único factor pronóstico independiente para predecir recaída clínica de LAL, y su capacidad predictiva es excelente cuando se encuentran valores menores de 1%, pues se han identificado recaídas entre el 70 a 100% de los pacientes con EMR positivas mientras que EMR negativas han reportado 2 a 10% de recaídas (SIOP, 2010; Van Dogen et al, 1998). No obstante, aún es conveniente realizar evaluaciones adicionales acerca de la validez de la CF como instrumento para identificar EMR en pacientes como los que estudiamos.

Limitaciones del Estudio

Los procedimientos técnicos para detectar EMR en pacientes con leucemia aguda han avanzado considerablemente y se han convertido en una herramienta confiable para correlacionar el estatus clínico y la respuesta al tratamiento. No obstante su utilidad, existen algunas limitaciones que deben considerarse cuidadosamente al interpretar los hallazgos. Dos de ellas pueden haber afectado a nuestro estudio, la primera es que el inmunofenotipo de las células leucémicas puede cambiar durante la evolución de la enfermedad. Si esos cambios, o la velocidad con que ocurran, afectan a los marcadores utilizados para monitorear el comportamiento de la EMR, entonces es probable que

ocurran falsos negativos (Oelschlegel, 2000; Campana, 2004). Si esto sucede no es claro para el oncólogo si se deba llevar a cabo una reducción terapéutica, lo cual depende claramente de la variabilidad biológica del caso de LAL.

Dado que no fue posible extender en demasía el número de combinaciones de marcadores, lo que reduciría el potencial efecto de tener falsos negativos, no podemos asegurar que no hubiera ocurrido este fenómeno. En laboratorios con mayor capacidad (p.e. que cuenten 5 fluorocromos o conteos elevados de células), es posible prevenir los falsos negativos usando paneles más amplios de anticuerpos marcadores.

La segunda limitación se relaciona con el hecho de que la sensibilidad de la CF es superior al 90% cuando existe 1 célula leucémica por 10^4 células normales, pero es inferior cuando hay 1 célula leucémica por 10^5 o más células normales (Campana, 2004). Nosotros observamos una proporción de estos pacientes de 10%, lo que implica que habríamos dejado de identificar a algunos sujetos con EMR, lo que tiene una relevancia clínica que no es posible determinar con el estudio que realizamos.

También se reconoce que la detección de EMR por CF tiene algunas dificultades específicas al momento de su interpretación y es que sus resultados en ocasiones pueden ser interpretados erróneamente de acuerdo a la calidad del aspirado de médula ósea o a una potencial contaminación de la muestra de médula ósea con células hematopoyéticas de tipo hematogonias, ambos hechos pueden modificar las características inmunofenotípicas distintivas de la leucemia o células inmaduras normales, y es que los resultados que produce no son binarios (si/no) como son los de PCR debido a que las características inmunofenotípicas distintivas de la leucemia son frecuentemente, aunque no siempre, el resultado de diferencias cuantitativas en la expresión antigénica de células leucémicas y células normales. Esto puede evitarse si se usan inmunofenotipos que se traslapan con los de células normales para lo cual se recomienda usar tres o cuatro Ac's conjugados con fluorocromos (Campana, 1995) en el presente trabajo se uso rastreo de cuatro fluorocromos.

Por otra parte, el periodo de seguimiento de nuestro estudio no parece ser suficiente para determinar a cabalidad la probabilidad de recaída clínica, por lo que recomendamos que el periodo de seguimiento y las determinaciones inmunofenotípicas se extiendan por lo menos un año después de haber finalizado cada tratamiento. También es posible que tuviéramos falsos negativos debido a que la muestra de médula ósea analizada no fuera representativa de la distribución leucémica. La relativa poca experiencia técnica a nivel regional para detectar EMR mediante la CF pudo también haber afectado la validez y confiabilidad del método, por lo que recomendamos que se realicen adicionales estudios en la región.

Respecto a las limitaciones metodológicas del presente estudio podemos apuntar que la naturaleza transversal del diseño si bien nos permitió probar la hipótesis de trabajo, no es suficiente para responder si la remisión clínica observada, es decir, libre de EMR permanecerá sin cambios en un futuro próximo. Restricciones de tiempo han limitado el proyecto a 18 meses y dada la baja prevalencia de la LAL en el sitio de estudio, el tamaño de muestra fue pequeño lo que resta poder estadístico a los hallazgos. También el tipo de muestreo que empleamos, impidió el cálculo de intervalos de confianza, y por lo tanto desconocemos la variabilidad que introduce la aleatoriedad.

Es posible también que haya un potencial sesgo de selección pues por un lado sólo incluimos sujetos sin derechohabencia a seguro médico (i.e. homogéneos en sus características socioeconómicas) y por otro, no evaluamos ciertas características clínicas y biológicas, como la dosis de quimioterapia, anormalidades genéticas y el metabolismo de drogas antineoplásicas, que pueden estar relacionadas con la velocidad inicial de citoreducción y por lo tanto con la EMR.

Las limitaciones metodológicas pueden ser superadas en nuevos estudios prospectivos y multicéntricos que incluyan a un tamaño de muestra apropiado, para de esta forma incrementar el poder estadístico de los hallazgos, y aportar más evidencia para el uso rutinario de la CF en pacientes pediátricos con LAL tal como se hace en

otros países del mundo (Campana, 1995; Sánchez, 2002; Björklund, 2003; Borowitz, 2008; Elanie, 2000, 2006).

CONCLUSIONES

1. El presente estudio corrobora que la citometría de flujo (CF) es una técnica útil para la detección de Enfermedad Mínima Residual (EMR), que permite un monitoreo más preciso acerca de la remisión inmunológica de la Leucemia Aguda Linfoblástica en niños y adolescentes.
2. La CF permite reconocer casos de EMR con expresión inmunofenotípica distinta a la clona inicial, de manera independiente a los factores clínicos pronósticos, lo que puede definir la respuesta al tratamiento antineoplásico
3. La EMR debe ser utilizada como un factor pronóstico en los protocolos de LAL cuando la positividad se encuentre por arriba de 1%, lo que puede orientar la decisión clínica de intensificar el tratamiento
4. Si únicamente se usa citomorfología como método para detectar remisión clínica en pacientes con LAL, es probable que se pierda hasta 14.3% de pacientes que aún tienen células leucémicas. La CF ayuda a detectar esta proporción
5. La prevalencia observada (14.7%) de EMR para el día 35 fue inferior a lo reportado en otros países en los que la prevalencia de EMR oscila entre 20 y 35%

RECOMENDACIONES

a) Metodológicas

- Incrementar el tamaño de la muestra, dos estrategias son pertinentes: (1) realizar estudios multicéntricos a nivel regional y/o nacional; (2) extender el periodo del estudio por al menos tres años
- Diseñar un estudio de cohorte prospectiva para examinar la EMR y su efecto en la sobrevivida a 5 años, libre de recaída de LAL

b) De investigación

- Restringir el estudio inmunofenotípico con los marcadores CD19, CD10 y CD34 en LAL de células B en el día 19, así como con CD5, CD2 Y CD7 para células T; lo que reduciría los costos de la prueba
- Examinar la correlación de aspectos biomoleculares (cariotipo e índice de DNA) como factores clínicos pronósticos y la EMR para predecir falla al tratamiento de inducción en niños con LAL

c) De políticas de salud

- Que el Seguro Popular mantenga la cobertura de la CF como método de apoyo para detectar EMR en niños con LAL atendidos en el Hospital Infantil del Estado de Sonora, y eventualmente extender dicha cobertura a hospitales similares al del presente estudio.
- Adquirir un citómetro de flujo en el Hospital Infantil del Estado de Sonora para la detección sistemática de EMR en niños y adolescentes con LAL

BIBLIOGRAFIA

- Al-Harbi G, El-Solh H, Al-Nasser A, Khalil S, Mahgoub N et al. (2000) DNA Index in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Correlation with Other Prognostic Factor. *Proc Am Soc Clin Oncol* 19 (abstr 2322)
- Attarbaschi A, Mann G, Panzer-Grümayer R, Röttgers S, Steiner M, König M, et al. (2008) Minimal residual Disease Values Discriminate Between Low and High Relapse Risk in Children With B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia and an Intrachromosomal Amplification of Chromosome 21: The Austrian and German Acute Lymphoblastic Leukemia Berlin-Frankfurt-Münster (ALL-BFM) Trials. *J Clin Oncol*; 26 (18): 3046-3050
- Barrera-Ramírez LM, Drago Serrano ME, Pérez Ramos J, Zamora AC, Gomez- Arroyo F y Cols, (2004) Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*,; 17: 42-55
- Béné M, Kaeda JS. (2009) How and why minimal residual disease studies are necessary in leukemia: a review from WP10 and WP12 of the European LeukaemiaNet. *Haematol*; 94 (8): 1135-1150
- Björklund E, Mazur JS, Porwit-McDonald A. (2003) Flow Cytometric follow-up of minimal residual disease in bone marrow gives prognostic information in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*; 17: 138–148
- Borowitz MJ, Pullen DJ, Shuster JJ, Viswanatha D, Montgomery K et al. (2003); Minimal Residual Disease in Childhood precursor- B- Cell acute Lymphoblastic Leukemia : Relation to other risk factors. A children's Oncology Group Study. *Leukemia*; 17: 1566-1572
- Borowitz MJ, Devidas M, Hunger SP, Bowman WP, Carroll AJ, Carroll WL et al. (2008) Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study. *Blood*; 111: 5477-5485

- Campana D, Coustan-Smith E, Jannosy G. (1990). The immunologic Detection of Minimal Residual disease in Acute Leukemia [Publisher erratum appears in Blood; 76:163-171
- Campana D, Pui C-H. (1995) Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodological advances and clinical significance. Blood; 85: 1416-1434
- Campana D, Coustan-Smith E. (2004) Minimal Residual Disease Studies by Flow Cytometry in Acute Leukemia. Acta Haematol; 112:8–15
- Campana D, Coustan-Smith E. (2004) Detection of Minimal Residual Disease in Acute Leukemia by Flow Cytometry. Cytometry;38:139-152
- Campana D (2007). Monitoring Minimal Residual Disease in Pediatric Hematologic Malignancies. Clinical Advances in Hematology and Oncology.;5 376-378
- Campana D (2009). Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia. Semin Hematol; 46; 100-106
- Campana D, (2010). Progress of Minimal Residual Disease Studies in Childhood Acute Leukemia. Curr Hematol Malig Res;5; 169-176
- Chen JS, Coustan-Smith E, Suzuki T, Neale GA, Pui CH, Campana (2001), Identification of Novel Markers for Monitoring Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia. Blood; 97; 2115-2120
- Ciudad J, San Miguel JF, López-Berges MC, Vidriales B et al. (1998) Prognostic Value of Immunophenotypic Detection of Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia. J Clin Oncol 16:3774-3781.
- Coustan-Smith E, Behm FG, Sancho J, Boyett JM, Hancock ML, Raimondi SC, et al. (1998) Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukaemia. Lancet; 351 (9102): 550-554
- Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, Boyett JM, Behm FG, Raimondi SC, et al (2000) Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood; 96 (8): 2691-2696

- Coustan-Smith E, Ribeiro RC, Stow P et al. (2006) A simplified flow cytometric assay identifies children with acute lymphoblastic leukemia who have a superior clinical outcome. *Blood*; 108: 97-102.
- Coronel-Moran RC. (2005) Importancia del laboratorio en el diagnóstico y pronóstico de leucemia aguda linfoblástica de la infancia. *Acta Pediatr Mex*; 26 (3): 129-136
- Dakka N, Bellaoui H, Bouzid N, Khattab M, Bakri Y, Benjouad A.(2009) CD10 AND CD34 expression in childhood acute lymphoblastic leukemia in Morocco: clinical relevance and outcome. *Pediatr Hematol Oncol* ; 26 (4): 216-231
- Drexler HG, Thiel E, Ludwig WD, 1991.Review of the incidence and clinical relevance of myeloid antigen-positive acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*: 5(8): 637-45
- Dworzak MN, Fröschl G, Printz D, Mann G, Pötschger U, Mühlegger N, et al. (2002) Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*; 99: 1952-1958
- Greenland S, Pearl J, and Robins JM, (1999) Causal Diagrams for Epidemiology Research. *Epidemiology* 10: 37-48
- Hamouda F, El-Sissy A, Radwan AK, Hussein H, Gadallah FH, Al-Sharkawy N et al.(2007) Correlation of karyotype and immunophenotype in childhood acute lymphoblastic leukemia; experience at the National Cancer Institute, Cairo University, Egypt. *J Egypt Nat Cancer Inst* ; 19 (2): 87-95
- Hunger SP, Voss SD. (2005) Detection of Minimal Residual Disease in Childhood Cancer: Educational Book. American Society of Clinical Oncology. Technology and Applications. 41st Annual Meeting
- Jmili BN, Jacob MC, Yacoub S, Youssef YB, Laatiri MA, Braham Y et al. (2010) Flow cytometry evaluation of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia type B. *Open Leuk J*; 3: 47-54

- Lanzkowsky P. (2005) Pediatric Hematology and Oncology. Academic Press. Cuarta edición pag. 359-411
- Larios-Farak TC (2010) Evaluación de los Factores de Riesgo Intermedio en niños con Leucemia aguda Linfoblástica en el Hospital Infantil del Estado de Sonora . Tesis de Especialista en Oncología Pediátrica. Hermosillo, Son. UNAM
- Lopez-Almaraz R, Raya-Sanchez J, Martinez-Pineda B, Cabrera-Rodriguez R, Rodriguez-Luis J, (2004) Estudio de Enfermedad Mínima Residual en cáncer Infantil. *Oncologia*; 27(10) 569-578
- Madero-López L, Muñoz-Villa A. Hematología y Oncología Pediátrica 2 edición. 2005 editorial Ergon
- Mandrell BN, Pritchard M, 2006. Understanding the Clinical of Minimal Residual Disease in Childhood Leukemia. *Journal of Pediatric Oncology Nursing*; 23;38-44
- Marsán-Suárez V, Sánchez-Segura M, Socarrás-Ferrer BB, Martínez-Machado M, Cos-Padrón Y, Del Valle-Pérez L, et al. Leucemia linfocítica aguda común. Estudio del inmunofenotipo y las características clínicas y morfológicas. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* [online]. 2004, vol.20, n.2 [citado 2011-04-18], pp. 0-0. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892004000200006&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0864-0289. Consultado el 18 de abril de 2011
- Marshall GM, Haber M, Kwan E, Zhu L, Ferrara D, Xue C et al (2003) Importance of Minimal Residual Disease Testing During the Second Year Therapy for Children with Acute Lymphoblastic Leukemia, *J of Clin Onc*;21, 704-709.
- Meshinchi S, Thomson B, Finn LS, Leisenring W, Green C, et al. (2001) Comparison of Multidimensional Flow Cytometry with Standar Morphology for Evaluation of Early Marrow Response in Paediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *J of Pediatric Hematology/Oncology*; 23: 585-590
- Möricke A, Reiter A, Zimmerman M, Gadner H, Stanulla M, Dördelmann M et al.(2008) Risk-adjusted therapy of acute lymphoblastic leukemia can decrease unselected pediatric and adolescent patients enrolled in the trial treatment burden

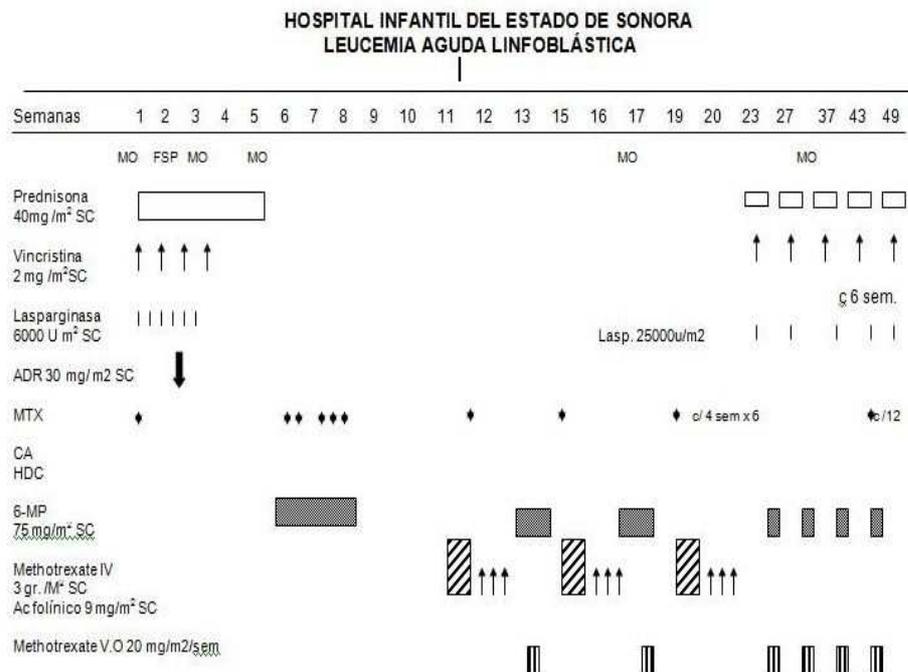
- and improve survival: treatment results of 2169 unselected pediatric and adolescent patients enrolled in the trial ALL-BFM 95. *Blood*; 111 (9): 4477-4489
- Miramón-Mendoza R. (2000) Epidemiología del niño con Cáncer. Experiencia de 20 años en el Hospital Infantil del Estado de Sonora. Tesis de Especialidad Médica: Hermosillo Sonora. UNAM
- Mortuza FY, Papaioannou M, Moreira IM. (2000) Minimal Residual Disease Tests provide an Independent Predictor of Clinical Outcome in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Oncol*: 1094-1104.
- Neg SM, Ariffin WA, Lin HP, Chan LL, Chin YM,(2000) Clinical features and treatment outcome of children with myeloid antigen coexpression in B-lineage acute lymphoblastic leukemia: a study of 151 Malaysian children *J Trop Pediatric* 46(2):73-8.
- Oelschlagel U, Nowak R, Schaub A, Koppel C, Herbst R, Mohr B et al. (2000) Shift of aberrant antigen expression at relapse or at treatment failure in acute leukemia. *Cytometry*; 42 (4): 247-253
- Pértegas Díaz, S. Pita Fernández, S. Calculo del poder estadístico de un estudio Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística. Complejo Hospitalario-Universitario Juan Canalejo.A Coruña (España).
- Pizzo AP, Poplack DG. Principles and practice of Pediatric Oncology, Germ Cell Tumors. Third edition, editorial Lippincott- raven, 538-590.
- Pui CH and D, Campana. (2000). New definition of remission in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*; 14, 783–785
- Pui CH. (2002) Childhood Leukemias. Cambridge University Press. St Jude Children's Research Hospital Memphis, Tennessee.
- Pui CH, Relling MV, Pharm D, Downing JR. (2004) Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*; 350: 1535-1548
- Rendón-García H, Covarrubias-Espinoza G. (2003) Leucemia Linfoblástica Aguda. Resultados de Tratamiento con el protocolo HIES 06. *Bol Med Hosp Infantil del Estado de Sonora*; 20; 24-29.

- Rivera-Luna R, Cardenas-Cardos R, Leal-Leal C, Navarro-Alegría I, Meza-Coria C, Gomez-Martinez R, Veja-Veja L. (1997) B-lineage acute lymphoblastic leukemia of childhood. An institutional experience. Arch Med Res; 28 (2): 233-239
- Rivera Luna (2002), Oncología Pediátrica. Bases conceptuales del tratamiento en el cáncer infantil, Intersistemas SA de CV (pp.253-278) México
- Rothmann KJ, Greenland S.(1998) Causation and causal Inference. Modern epidemiology 2nd edition 7-28.
- Sanchez J, Serrano J, Madero L, Clinical value of immunological monitoring of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia after allogeneic transplantation. Br J Haematol 2002; 9: 686-694
- Satake N, Sakamoto K, Grupp SA. (2006). Acute lymphoblastic leukemia. Recurso en línea: <http://www.emedicine.com/ped/TOPIC2587.HTM>. Consultado el 24 de julio de 2008
- Sierrasesumaga L, Tratado de Oncología pediátrica. Enfermedades Malignas del niño y el adolescente. 251-258, 2005
- Stow P, Key L, Chen X, Pan Q, Neale GA, Coustan-Smith E, et al. Clinical significance of low levels of minimal residual disease at the end of remission induction therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 2010; 115 (23): 4657-4663
- SIOP Educational Book 2010. International Society of Paediatric Oncology, (2010). Agarwal B, claminus G, Diller L, Egeler M. 42nd Congress of the international Society of Paediatric Oncology. Boston, USA October 21-24,2010
- Stephen P. Hunger, Stephan D Voss, et. (2005) Detection of Minimal Residual Disease in Childhood Cancer: Tecnology and Aplications. Educational Book. American Society of Clinical Oncology. 41st Annual Meeting; 771,
- Nygaard U, Larsen J, Kristensen TD, Wesenberg F, Jonsson OG et al. (2006) Flow Cytometric DNA index, G-band Karyotyping, and Comparative Genomic Hybridization in Detection of High Hyperdiploidy in childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. J Peadiat Hematol Oncol; 28: 134-140

- Valeriote FA, (1984) *Clinical Pediatric Oncology*, CV, Mosby, St Louis,
- Van Dongen JJM, Seriu T, Panzer-Grümayer RE, Biondi A, Pongers-Willemse MJ, Corral L et al. (1998) Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia in childhood. *Lancet*; 352: 1731-1738
- Vidriales MB, Perez JJ, López-Berges MC, Gutierrez N, Ciudad J et al. Minimal residual disease in adolescent (older than 14 years) and adult acute lymphoblastic leukemias: early immunophenotypic evaluation has high clinical value. *Clinical Observations, interventions and therapeutic trials. Blood*; 101: 4695-4701
- Wasserman R, Galili N, Ito Y, Silber JH et al. (1992) Residual Disease at the End of Induction Therapy as a Predictor of Relapse During Therapy in Childhood B-Lineage Acute Lymphoblastic. *Leukemia. J Clin Oncol* 10:1879-1888.
- Zhou J, Goldwasser MA, Li A, Dahlberg SE, Neuberg D, Wang H et al. (2007) Quantitative analysis of minimal residual diseases predicts relapse in children with B-lineage acute lymphoblastic leukemia in DFCI ALL consortium protocol 95-01. *Blood*; 110 (5):

ANEXO 1

Protocolo de Manejo de Quimioterapia en Leucemia Aguda Linfoblástica. Hospital Infantil del Estado de Sonora. 2010



ANEXO 2

Características de los Sujetos Investigados

Variable	N	%	p ^{1/}
Inmunofenotipo			
<i>Células B</i>	32	91	0.000001
Pre-B Temprana	22	63	
Pre-B	8	23	
Pre-B con expresión CD7	1	3	
Pre-B Temprana con expresión CD33	1	2	
<i>Células T</i>	3	9	
Morfología			
<i>L1</i>	14	40	0.236724
<i>L2</i>	21	60	
Cariotipo			
Lesión Estructural	6	17	0.000002
Normal (46XX, 46XY)	26	75	
Sin reporte	3	9	
Índice de DNA			
Índice DNA ≤ 1	2	5.71	0.004396
Índice DNA = 1	14	40	
Índice DNA ≥ 1	14	40	
Sin Reporte	5	14.29	

ANEXO 3

Características Bioquímicas de los Sujetos

Biometría Hemática	N (%)	p^{1/}	Perfil Bioquímico	N (%)	p^{1/}
Anemia (g/dl)			DHL		
Leve	2(6)	0.000001	Normal	5(15)	0.000024
Moderada	26(74)		Anormal	30(85)	
Severa	7(20)		Transaminasas		
Leucocitos(mm3)			TGO		
< 50000	29(83)	0.00	Normal	14(40)	0.005676
> 50000 - 99999	2(6)		Anormal	18(51)	
> 100000	4(11)		TGP		
Neutropenia			Normal	26(75)	0.000001
Grado I	10(29)	0.000054	Anormal	7(20)	
Grado II	2(6)		Glicemia		
Grado III	5(14)		Normal	22(63)	0.001022
Grado IV	17(49)		Anormal	6(17)	
Plaquetas (mm3)			Acido Urico		
<50000	20(57)	0.006738	Normal	24(69)	0.00002
51000 A 100000	10(29)		Anormal	9(26)	
> 101000	5(14)				

ANEXO 4

Definición Operacional de Variable Independiente y Dependiente en la Enfermedad Mínima Residual

Variable	Concepto	Medición	Escala	Fuente
Dependiente: Enfermedad mínima residual	Leucemia residual detectada por estudio inmunológico	Proporción de inmunofenotipos aberrantes detectados por citometría de flujo	Categórica Dicotómica 1 = Positiva $\geq 0.01\%$ 0 = Negativa $< 0.01\%$	Reporte de laboratorio clínico
Independiente Dosis de tratamiento antineoplásico de inducción	Tratamiento citotóxico llevado a cabo en las primeras 4 semanas de la LAL, bajo el protocolo HIES08 (1)	Dosis en $\text{mg}/\text{m}^2\text{sc}$ de cada medicamento antineoplásico administrado	*Continua Dosis $\text{mg}/\text{m}^2\text{sc}$	Protocolo de manejo HIES 08

(1) (Vincristina 2 mg/m^2 semanal x 4; prednisona 40 mg/m^2 día por 30 días; L-asparginasa 6000 U/ m^2 por 6 dosis; Doxorrubicina 30 mg/m^2 , una dosis en la semana 4; terapia intratecal DU en la semana 1, con 3 drogas MTX 12.5 mg, Citarabina 40 mg e Hidrocortisona 40 mg.

ANEXO 5

Definición Operacional de Covariables para la Enfermedad Mínima Residual

Variable	Concepto	Medición	Escala	Fuente
EDAD	La medición del tiempo cronológico de un sujeto desde su nacimiento hasta el momento de inclusión en el estudio (Dorland, 2007)	Años cumplidos de vida	Continua, misma que servirá agrupar...	Cuestionario
CUENTA LEUCOCITARIA	Cifra de glóbulos blancos en primera biometría hemática	Cantidad de leucocitos en sangre periférica por mm ³ en niños con Leucemia aguda linfoblástica	Continua, misma que servirá para agrupar a los individuos en las siguientes categorías (1) < a 9999 (2) 10000 a 49999mm ³ (3) 50000 a 999999mm ³ (4) >100000mm ³	Reporte de laboratorio clínico
TIPO DE LEUCEMIA	Linfoblastos de linaje B ó T en proliferación anormal	Detección de anticuerpos monoclonales de superficie específicos para células B o T por citometría de flujo	Cualitativa nominal (dicotómica) 0 = Linaje B 1 = Linaje T	Reporte de laboratorio de oncología

ANEXO 6

Definición Operacional de Covariables para la Enfermedad Mínima Residual

Variable	Concepto	Medición	Escala	Fuente
VOLUMEN TUMORAL	Cantidad de células leucémicas calculada en 1×10^{12} que predice el riesgo de los sujetos	Vol Tumoral= $0.2 \times \log(\text{blastos/ml} + 1) + 0.6 \times \text{hepatomegalia en cm} + 0.04 \times \text{esplenomegalia en cm}$	Continua, misma que servirá para agrupar a los individuos en las siguientes categorías: (1) Bajo Riesgo=0.8 a 1.2 (2) Riesgo Intermedio=1.2a1.7 (3) Alto Riesgo= >1.7	Reporte de laboratorio de oncología
LESIÓN GENÉTICA DE LA LEUCEMIA	Alteración cromosómica o estructural, detectada en la LAL	Resultado genético determinado por técnica de cariotipo por bandeó GTG	Cualitativa nominal 1. Translocación 2. Deleción 3. Inversión 4. Multiarreglos 5. Duplicación 6. Mixta 6. Normal	Reporte de laboratorio de oncología
ÍNDICE DE REPLICACIÓN CELULAR	Contenido celular de DNA medible	Cantidad de DNA determinado por citometría de flujo	Continua, misma que servirá para agrupar a los individuos en las siguientes categorías: 1= > a 1.16 0= < a 1.16	Reporte de replicación celular
RESPUESTA LINFOBLASTICA EN DIA 14	Persistencia de linfoblastos en sangre periférica en día 14 de la quimioterapia	Porcentaje de linfoblastos en medula ósea en el día 14 de la quimioterapia	Continua, misma que servirá para agrupar a los individuos en las siguientes categorías: (1) Buena = < 5% linfoblastos (0) Mala = > 5% linfoblastos	Reporte de laboratorio de oncología

Anexo 7

Cálculo del Poder Estadístico en Base al Programa G Power 3.0.10 de 30 Casos Esperados de Leucemia Aguda Linfoblástica para la Cuantificación de Enfermedad Mínima Residual en una Prueba de χ^2 y t Student

1.	χ^2 tests - Goodness-of-fit tests: Contingency tables
Analysis:	Compromise: Compute implied α & power
Input:	Effect size w = 0.50
	β/α ratio = 1
	Total sample size = 30
	Df = 1
Output:	Noncentrality parameter λ = 7.500000
	Critical χ^2 = 2.429965
	α err prob = 0.119036
	β err prob = 0.119036
	Power (1- β err prob) = 0.880964
2.	t tests - Means: Difference between two independent means (two groups)
Analysis:	A priori: Compute required sample size
Input:	Tail(s) = Two
	Effect size d = 0.8
	α err prob = 0.5
	Power (1- β err prob) = 0.95
	Allocation ratio N2/N1 = 1
Output:	Noncentrality parameter δ = 2.332381
	Critical t = 0.682234
	Df = 32
	Sample size group 1 = 17
	Sample size group 2 = 17
	Total sample size = 34
	Actual power = 0.951833
3.	t tests - Means: Difference between two independent means (two groups)
Analysis:	A priori: Compute required sample size
Input:	Tail(s) = Two
	Effect size d = 0.8
	α err prob = 0.5
	Power (1- β err prob) = 0.93
	Allocation ratio N2/N1 = 1
Output:	Noncentrality parameter δ = 2.190890
	Critical t = 0.683353
	Df = 28
	Sample size group 1 = 15
	Sample size group 2 = 15
	Total sample size = 30
	Actual power = 0.936284

ANEXO 8

Registro para el Protocolo Determinación Cuantitativa de la Enfermedad Mínima Residual en Pacientes con Leucemia Aguda Linfoblástica. Hospital Infantil del Estado de Sonora, 2009-2010

Ficha de Identificación.				
Nombre del paciente _____				
Expediente _____				
Edad años _____ MESES _____				
Exploración clínica.				
Fiebre _____ infección _____				
Microorganismo y foco _____				
Peso _____ Superficie corporal _____				
Datos para el registro clínico de la Leucemia Aguda Linfoblástica				
Fecha de Diagnóstico de la Leucemia Aguda Linfoblástica . _____ dd/mm/aa				
¿Cuál es el tamaño del hígado por debajo del reborde costal en cm? _____ cm				
¿Cuál es el tamaño del bazo por debajo del reborde costal en cm? _____ cm				
¿Cantidad de glóbulos blancos en primera biometría hemática? _____ mm3				
Registro Bioquímico				
Hemoglobina	gr/dl	TGO	U/L	UREA mg/dl
Leucocitos	mm3	TGP	U/L	CREATININA mg/dl
Neutrofilos	%	DHL	U/l	ACIDO URICO
Plaquetas	mm3	FA	U/L	PT g/dl
Blastos	%	GLUCOSA		ALBUMINA g/dl
Grupo de riesgo clínico por volumen tumoral				
Grupo de Riesgo				
Bajo 0.8 a 1.2 ()				
Intermedio 1.2 a 1.7 ()				
Alto 1.7 ()				
Características Inmunológicas y biológicas de la Leucemia Aguda Linfoblástica				
Registro de inmunofenotipo				
Fecha de realización día _____ mes _____ año _____				
Fecha de reporte día _____ mes _____ año _____				
Registro de Marcadores Positivos del inmunofenotipo realizados y porcentaje de positividad				
Anticuerpo	Anticuerpo	Anticuerpo		
Monoclonal	Monoclonal	monoclonal		
Cd21	CD3	CD45		
CD22	CIG μ	Tdt		
CD79a	SIG μ	CD66		
CD10	SIG κ OR λ	CD12		
CD7	CD34			
CD5	CD 58			
CD33	CD13			
CD65	CD15			
Registre el diagnostico inmunológico de la Leucemia Aguda Linfoblástica				
Pre B temprana <input type="checkbox"/> Pre B <input type="checkbox"/> Preb Transicional <input type="checkbox"/> B Madura <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/>				
Registro de lesión genética de la Leucemia Aguda Linfoblástica en estudio de cariotipo				
Lesión Genética Lesión detectada				
1. Translocación				
2. Delección				
3. Inversión				
4. Multiarreglos				
5. Duplicación				
6. Mixta				
7. Normal				
Registro de Índice de DNA de Leucemia Aguda Linfoblástica realizado pro citometría de flujo				
> 1.16 <input type="checkbox"/> < 1.16 <input type="checkbox"/>				
<small>Vol Tumoral= 0.2 x log (blastos/ml+1)+ 0.6 x hepatomegalia por debajo del reborde costal cm+ 0.04 x esplenomegalia por debajo del reborde costal cm</small>				

ANEXO 9

Registro Determinación Cuantitativa de la Enfermedad Mínima Residual en Pacientes con Leucemia Aguda Linfoblástica. Hospital Infantil del Estado de Sonora, 2009-2010.

Médula ósea del día 14 del tratamiento		
Fecha de realización de reporte de médula ósea _____		
Positivo (> 5% de Linfoblastos) SI		
Negativo (< 5% de Linfoblastos) SI		
M1 <input type="checkbox"/>	M2 <input type="checkbox"/>	M3 <input type="checkbox"/>
Médula ósea Semana 5 del tratamiento		
Fecha de realización de reporte de médula ósea _____		
Positivo (> 5% de Linfoblastos) SI		
Negativo (< 5% de Linfoblastos) SI		
Clasificación de respuesta en el día 14 acuerdo a criterio		
M1 <input type="checkbox"/>	M2 <input type="checkbox"/>	M3 <input type="checkbox"/>
Reporte de enfermedad mínima residual		
<u>Registro de enfermedad mínima residual</u>		
Fecha de realización día _____ mes _____ año _____		
Fecha de reporte día _____ mes _____ año _____		
Anticuerpo Monoclonal Positivo y aberrantes		
Anticuerpo Monoclonal	Anticuerpo Monoclonal	Anticuerpo monoclonal
Cd21	CD3	CD45
CD22	CIG μ	Tdt
CD79a	SIG μ	CD66
CD10	SIG κ OR λ	CD12
CD7	CD34	
CD5	CD 58	
CD33	CD13	
CD65	CD15	
Coexpresion aberrante		
Células cuantificadas EMR(cantidad mínima a registrar 100 000 células) _____		
Porcentaje de células detectadas positivas por citometría de flujo en el estudio de EMR _____		
Cantidad de células malignas detectadas en la enfermedad mínima residual _____		
Reporte de Enfermedad mínima residual de acuerdo al porcentaje de células detectadas		
Enfermedad Mínima Residual > 0.01%	<input type="checkbox"/>	
Enfermedad Mínima Residual < 0.01%	<input type="checkbox"/>	

ANEXO 10

Calendarización de Actividades para Pacientes con Leucemia Aguda Linfoblástica de la Enfermedad Mínima Residual Durante el Periodo de 2009-2010

<i>TIEMPO</i>						
<i>ACTIVIDADES</i>	<i>SEMANA 0</i>	<i>SEMANA 1</i>	<i>SEMANA 2</i>	<i>SEMANA 3</i>	<i>SEMANA 4</i>	<i>SEMANA 5</i>
<i>SOSPECHA DIAGNOSTICA DE LAL CLINICO Y HEMATOLOGICO DIAGNOSTICO DE LAL EN ESTUDIO DE MEDULA OSEA</i>	<i>DIA 0 REGISTRO DE DATOS CLINICOS Y LABORATORIO PARA LAL EN HOJA DE RECOLECCION DE DATOS</i>					
<i>SOLICITUD DE INMUNOFENOTIPO Y CITOGENETICA E INDICE DNA PARA LAL</i>	<i>ENVIO DE MUESTRA DE MEDULA OSEA A LABORATORIO</i>					
<i>INICIO DE TRATAMIENTO DE QUIMIOTERAPIA HIES 08</i>		<i>REGISTRO DE TRATAMIENTO SEMANAL EN HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS</i>				
<i>RECABAR RESULTADO DE INMUNOFENOTIPO Y CITOGENETICA</i>				<i>REGISTRO DE ANTICUERPOS MONOCLONALES DETECTADOS PARA LA LEUCEMIA</i>	<i>REGISTRO DE CITOGENETICA E INDICE DNA</i>	
<i>DETERMINACION DE EMR POR CITOMETRIA FLUJO</i>					<i>ENVIO DE MEDULA OSEA A LAB. PARA EMR</i>	