



HOSPITAL INFANTIL *de* MÉXICO
FEDERICO GÓMEZ
Instituto Nacional de Salud

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIO DE POSGRADO
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

“ASOCIACION ENTRE EL INMUNOFENOTIPO AL
DIAGNOSTICO EN PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE
AGUDA INFANTIL Y EL CURSO CLINICO DE LA
ENFERMEDAD “

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN
ONCOLOGIA PEDIATRICA

PRESENTA:

DRA. LIZETTE BOJORQUEZ STEFFANI

DIRECTORA DE TESIS:

DRA ELISA DORANTES ACOSTA

CIUDAD DE MEXICO D.F. FEBRERO 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TITULO
**ASOCIACION ENTRE EL INMUNOFENOTIPO AL DIAGNOSTICO EN PACIENTES
CON LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA INFANTIL Y EL CURSO CLINICO DE LA
ENFERMEDAD**
INDICE

	Página
Resumen	3
Antecedentes históricos	5
Marco teórico	7
Leucemias agudas en pediatría	7
Hematopoyesis normal y leucémica	8
Alteraciones citogenéticas de LMA	9
Clasificación de LMA	12
Manifestaciones clínicas	13
Diagnóstico de LMA	14
Antígenos expresados en las células de LMA	17
Tratamiento	18
Fenotipo y curso de la leucemia	22
Justificación	24
Planteamiento del problema	25
Objetivos	25
Metodología del diseño del estudio.	25
Diseño del estudio	25
Población blanco	25
Variables independientes	26
Variables dependientes	26
Metodología y plan de análisis	27
Resultados	28
Conclusiones	36
Referencias	41

RESUMEN: El cáncer en pediatría es la segunda causa de mortalidad, y de todos los tipos de cáncer, las leucemias agudas son las enfermedades neoplásicas más comunes en la infancia, representando entre el 30 y 40% de todos los casos registrados.

Las leucemias se clasifican de acuerdo a la célula progenitora hematopoyética que les dio origen, es decir, tenemos leucemias agudas linfoblásticas y leucemias agudas mieloides.

La leucemia mieloide aguda (LMA) representa del 15 al 20% de las leucemias agudas, y se define como un trastorno clonal ocasionado por una transformación maligna de una célula troncal autorrenovable, derivada de la médula ósea, la cual demuestra una disminución en la tasa de apoptosis así como una diferenciación aberrante.

Para llamarse aguda, la médula ósea generalmente debe de incluir más de 20% de blastos leucémicos. El diagnóstico de LMA es morfológico de acuerdo a los criterios de la FAB en forma complementaria se realiza Inmunofenotipo y citogenética.

El uso de anticuerpos monoclonales para determinar los antígenos de la superficie de las células de la LMA, ayuda a reforzar el diagnóstico morfológico.

En el diagnóstico inicial de leucemia deben emplearse varios anticuerpos monoclonales específicos según el linaje que detectan los antígenos en las células de la LMA, junto a una batería de marcadores específicos del linaje de los linfocitos T y B que ayuden a distinguir la LMA de la LLA .

Las expresiones de varias proteínas o CD, consideradas como relativamente específicos al linaje para la LMA comprenden la expresión de uno o varios de los siguientes antígenos: CD33, CD13, CD14, CDw41 (o antiglicoproteína plaquetaria IIB/IIIA), CD15, CD11B, CD36 y antiglicoforina; los cuales deberán expresarse en más del 25% de las células. Este fenotipo leucémico ha llegado a tener importancia no solo diagnóstica, sino que actualmente se propone que su expresión podría afectar el curso clínico de la enfermedad en estudios realizados en la población adulta y los estudios en la población pediátrica son controvertidos, Se desconoce cuál pueda ser el valor del inmunofenotipo como predictor de curso clínico de la enfermedad en pacientes pediátricos.

El presente trabajo trata de buscar la asociación entre el inmunofenotipo al diagnóstico y la evolución clínica de pacientes pediátricos con LMA, para lo cual se determinó el inmunofenotipo a todos los pacientes con sospecha diagnóstica de leucemia aguda del 2002 al 2009 del HIMFG, se identificó a todos los pacientes con LMA y se realizó la revisión de curso clínico de su enfermedad en los expedientes clínicos. De las características generales encontramos relación masculinos y femeninos de 1:1.1, el síndrome anémico fue el más encontrado en nuestros pacientes y la LMA M2 la más frecuente. Los porcentajes de recaída y supervivencia global son similares a los de la literatura internacional, sin embargo tenemos un mayor porcentaje de muertes en la inducción. En el análisis de regresión logística binaria encontramos que 3 de los 22 antígenos resultaron como factores protectores de la variable muerte. Estos antígenos fueron CD34 (OR 0.24 con IC95% 0.07-0.84) CD15 (OR 0.30 IC 0.12-0.76) y MPOX (OR 0.24 IC 0.07-0.81) lo que abre una línea de investigación para la relación del fenotipo con el curso clínico de la enfermedad.

ANTECEDENTES HISTORICOS

El término "*leucemia*" fue acuñado por Rudolf Virchow, un renombrado patólogo alemán, en 1856. Virchow fue pionero en el uso del microscopio óptico en el campo de la patología y fue el primero en describir el exceso de glóbulos blancos en pacientes y utilizó el término puramente descriptivo de "leucemia" (del griego *sangre blanca*), para darle su nombre a esta patología.¹

El primer artículo publicado que describe un caso de leucemia en la literatura médica data de 1827, por Alfred-Armand-Louis-Marie Velpeau, quien describió el caso de una florista de 63 años de edad con una enfermedad cuyos principales síntomas eran fiebre, debilidad y hepatosplenomegalia, Velpeau consideró que la sangre de esta paciente tenía una consistencia semejante a la "papilla de avena" e hipotetizó que este aspecto de la sangre era debido a los glóbulos blancos.²

En 1845, el patólogo J.H. Bennett reportó una serie de casos similares de pacientes que fallecieron con esplenomegalia y cambios "en el color y la consistencia de la sangre". Bennett utilizó el término "leucocitemia" para describir esta condición patológica.²

En 1877, Paul Ehrlich desarrolló una serie de técnicas de tinción de células sanguíneas que le permitieron describir en detalle y diferenciar los glóbulos blancos normales y anormales.

Wilhelm Ebstein introdujo el término "*leucemia aguda*" en 1889 para diferenciar las leucemias progresivas de las leucemias crónicas. El término "*mieloide*" fue acuñado por Neumann en 1869, tras ser el primero en determinar que los glóbulos blancos provenían de la médula ósea (del griego *μυελός*, *myelos* = médula).³

Mosler quien, diez años más tarde (1879), fue quien describió por primera vez una técnica para examinar la médula ósea y diagnosticar la leucemia. Finalmente, en el año 1900, Naegli caracterizó los mieloblastos, que pertenecen a la estirpe celular afectada en la LMA, y dividió los tipos de leucemia en mieloides y linfoides, según la estirpe celular sanguínea que se viera afectada.³

Actualmente se define a la Leucemia Mieloide Aguda como una neoplasia clonal del tejido hemopoyético, caracterizada por la proliferación de

células blásticas anormales de estirpe mieloide en la médula ósea, producida por daños genéticos adquiridos en el DNA de las células de la médula ósea produciendo un crecimiento incontrolado de células blásticas y menor producción de células hemáticas normales.⁴

MARCO TEÓRICO: Leucemias agudas en pediatría

La incidencia de cáncer en la infancia incrementó significativamente de 1975 a 2006, con tasas de aumento más notables en leucemia linfoblástica aguda. Las tasas de curación de 1976 a 2006 incrementaron en más del 50%, y particularmente en leucemias y linfomas se logró un descenso en la mortalidad en un lapso de 32 años, aunque el descenso en la mortalidad se desaceleró después de 1998.⁵

La leucemia aguda representa 44,240 casos nuevos anuales en Estados Unidos, aproximadamente 21,790 mueren por esta enfermedad. La leucemia mieloide aguda corresponde el 25% de las leucemias agudas, presentándose en 3.7 por cada 100,000 habitantes. No hay diferencias entre femenino y masculino en incidencia de leucemia mieloide aguda.⁵

Se ha asociado la presencia de los siguientes síndromes como predisponentes para Leucemia mieloide aguda; Síndrome de Down, síndrome de monosomía familiar 7, Síndromes de inestabilidad cromosómica, Anemia de Fanconi, Síndrome de Bloom, Síndromes de crecimiento y defectos de las vías de señalización celular, Neurofibromatosis tipo 1, Síndrome de Noonan, Síndrome de Kostmann, Anemia de Diamond Blackfan tipo I.^{2,4,5}

El más estudiado ha sido el síndrome de Down por su paradójico incremento en la frecuencia de leucemia mieloide aguda y su alta sensibilidad a la quimioterapia.⁶

En 1990 se realizó una revisión por la Sociedad Americana de Hematología e investigadores de Pediatric Oncology Group (POG) ahora parte de Children's Oncology Group (COG), realizando un informe de más de 1992 publicaciones con la finalidad de definir las bases moleculares, bioquímicas y farmacológicas de los pacientes con Síndrome de Down y Leucemia mieloide aguda.⁷

El riesgo de los pacientes con síndrome de Down de presentar Leucemia mieloide aguda, en especial de subtipo M7 y síndrome mieloproliferativo transitorio, es debido a mutaciones en el gen GATA 1, están presentes prácticamente en todos los niños con síndrome de Down.⁶

Además el síndrome de Down se relaciona con un incremento en la producción de radicales libres en las células previamente dañadas por la quimioterapia induciendo en un mayor grado apoptosis.⁷

Hematopoyesis normal y leucémica

La producción de células sanguíneas o hematopoyesis es el proceso por medio del cual las células troncales hematopoyéticas proliferan, y se diferencian dando lugar a los diferentes tipos de células circulantes en la circulación periférica por lo tanto tenemos hematopoyesis linfóide y hematopoyesis mieloide.⁸

Para lograr diferenciación hacia la línea mieloide, se requiere la participación de receptores de factores de transcripción, dentro de los que se encuentran principalmente PTK (tirosine kinase activity), localizado en la membrana celular, que se asocia a ligandos unidos a dominios dependientes de cinasas que una vez fosforiladas activan vías intracelulares que inducen diferenciación. También se requiere de receptores dependientes de ligandos que activan receptores trans membrana; entre los principales se encuentran JAK / STAT que producen activación de las vías intracelulares induciendo proliferación celular.^{3,5,8}

El tamaño de la célula, la regulación de la apoptosis y la diferenciación monocítica está relacionada con la acción de Pi3/AKT (fosfoinositol 3/ Serina trionina kinasa) y cuando ocurre una alteración en la transcripción de estas señales, se produce una alteración clonal de una línea celular produciendo leucemia mieloide aguda.⁸

Otro factor de transcripción importante es el AML (core binding factor alfa) que es clave en la diferenciación mieloide, es por eso que muchas anomalías genéticas de AML se relacionan con la aparición de leucemia mieloide aguda. AML tiene varias isoformas, su isoforma más común es AML 1B, la cual estimula la RNA polimerasa II, al producirse una alteración como la presencia de translocación (8;21), en la se sustituye un C terminal AML por el ETO; se produce falta en la regulación en la hematopoyesis de la línea mieloide.

Por otro lado el factor de transcripción MYH 11 (Muscle Myosin Heavy Chain) es necesario para la hematopoyesis normal de los monocitos, este factor es codificado en el cromosoma 16.

Alteraciones citogenéticas el LMA

Se conoce que hasta el 75% de los pacientes con LMA tienen alguna alteración citogenética en los blastos leucémicos y su identificación se basa en la aplicación de técnicas de citometría, FISH y reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La determinación de las alteraciones citogenéticas es tan importante que actualmente se considera que existen alteraciones que confieren buen o mal pronóstico a su portador. A continuación se describen las más importantes: ⁹

La translocación (8;21) (q22;q22) es una de las alteraciones cromosómicas más frecuentes en Leucemias mieloides agudas, se presenta en 8% de los pacientes pediátricos, representando el 40% de la leucemia mieloides M2 de acuerdo a la FAB. ¹⁰

La inversión 16 se encuentra en el 6% de los pacientes pediátricos con Leucemia mieloides aguda. Se debe a la inversión 16 (p13;q22) ó t (16;16) (p13;q22), lo cual produce una disregulación en la hematopoyesis normal, produciendo la alteración clonal de la línea monocitoide. ^{11,12}

La translocación (15;17) PML RAR α se presenta en la leucemia promielocítica, se considera un factor determinante en la patogénesis, ya que en el rearreglo 17q21 codifican los receptores de ácido retinoico (RAR α).

RAR α es un receptor que funciona como factor regulador de la transcripción inducida por un ligando, que participa en la patogénesis de la leucemia promielocítica por medio de el reclutamiento de receptores de histona de acetilasa, complejos necesarios para reprimir los genes implicados en la diferenciación mieloides. RAR α induce a la célula troncal hematopoyética a su diferenciación hacia célula granulocítica, induciendo la transcripción en bloque de la serie promielocítica. ¹³

PML (promyelocytic leukemia acute) controla el crecimiento celular a través de la regulación de la proteína NB, la sobreexpresión de PML produce crecimiento celular exagerado; a demás de que forma parte de los núcleos

maduros siendo necesario para la integridad funcional celular de los promielocitos.¹³

Al haber translocación (15:17) se produce un incremento en la expresión de PML lo cual induce un crecimiento de promielocitos exagerado y anormal. Las leucemias agudas M3 con positividad para esta translocación tienen respuesta a el tratamiento con acido trans retinoico (ATRA) ya que este se une a PML RAR α induciendo un cambio conformacional que resulta en la disociación del complejo activador de los genes que permiten que las células promielocíticas se diferencien, así como induce la degradación por medio de caspasas de PML RAR α . Además ATRA induce la liberación de factor de necrosis tumoral e induce la apoptosis celular por medio de BCL 2 A y MCL1¹².

Gen MLL (Mixed Linaje Leukemia) localizado en el rearreglo 11q23, es un gen de 90 kb con 38 exones, el cual codifica una proteína de 396 aminoácidos, en el cual se localiza las señales de inhibición de la transcripción de la serie hematopoyética. Se asocia a la alteración de la serie monocitoide, encontrándose aumentada en la leucemia mieloide aguda M5. El reordenamiento del gen MLL se correlaciona con la presencia de afección a cromosoma 11, como t(4;11) t(9;11) t(11;19).¹⁴

El Gen GATA 1 es un factor iniciador de la transcripción, por medio de la introducción de un codón interruptor antes del codón 84 trastornando el corte e implante del DNA, por lo que los pacientes con síndrome de Down tienen riesgo incrementado de presentar de leucemia aguda. El Gen GATA 1 es un elemento regulador de la diferenciación de eritrocitoblastos y megacarioblastos, estableciéndose así la influencia que tiene este síndrome con la presencia de leucemia mieloide aguda M7 de acuerdo a FAB⁶

En el cromosoma 21 se expresan los genes encargados de la producción de Cistationina B sintetasa (CBS) y superóxido dismutasa (SOD 1), el incremento en la actividad de CBS ha sido vinculado a los niveles de homocisteína, metionina, s- adenosil metionina y una deficiencia relativa de folato en relación a CBS, produciendo disminución en la generación de Trifosfato de timidina, como resultado de la inhibición de deaminasa desoxicitidina, resultando en un incremento en la actividad de arabinósido de citocina.¹⁵

Por otro lado en el cromosoma 21 se localiza un carboxilo involucrado en el metabolismo de las antraciclinas, (Daunorrubicinol) incrementando la sensibilidad a las antraciclinas en pacientes con síndrome de Down.¹⁵

Aunque las alteraciones numéricas y estructurales antes mencionadas son las más frecuentemente encontradas no son las únicas ya que pueden estar presentes en los pacientes con leucemia aguda entre otras puede encontrarse monosomía 7, trisomía 8, t(10;11) (p13q21), t(6;9)(p23q34), t(1;22) (p13;q13).

Así como la presencia de t(8;21), inversión 16 y t(15;17) es un factor determinante en la patogénesis de la leucemia mieloide, la presencia de las siguientes traslocaciones se asocian a recaídas tempranas y falta de respuesta a tratamiento monosomía 5, monosomía 7, t (11q23) t(9;11).^{8,10,11,12,14,}

El grupo internacional Pediatric Oncology Group determino la frecuencia y tipo de alteraciones cromosómicas encontrados 643 pacientes pediátricos con leucemia mieloide aguda en su estudio 8821 reportando que 109 pacientes (22,8%) tenía cariotipos normales, 280 pacientes (58.6%) presentaban anormalidades 11q23, las cuales fueron sub clasificadas encontrando que 88 pacientes (18.4%) con t(8;21), 56 (11.7%) con t (15;17), y 55 (11.5%) con inversión 16, 9 (1.9%) con trisomía 21, monosomía 7⁹

Clasificación de la Leucemia Mieloide Aguda

Leucemia mieloide aguda se clasifica de acuerdo a la sociedad Franco Estadounidense Británica (FAB) en 8 subtipos, del M0 a M7, en base a las características morfológicas de las células leucémicas, los subtipos de acuerdo a la FAB son: ¹⁶

M0	Leucemia mieloblástica aguda sin diferenciación.
M1	Leucemia mieloblástica aguda sin maduración.
M2	Leucemia mieloblástica aguda con maduración.
M3	Leucemia promielocítica aguda.
M4	Leucemia mielomonocítica aguda.
M4eo	Leucemia mielomonocítica aguda con <u>eosinofilia</u> en médula ósea.
M5	Leucemia monocítica aguda.
M6	Eritroleucemia.
M7	Leucemia megacarioblástica.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica a la leucemia mieloides agudas en 5 subtipos: ¹⁷

LMA con anomalías genéticas características	Incluyen aquellas LMA con translocaciones entre los cromosomas 8 y 21 [t(8;21)], inversiones en el cromosoma 16 [inv(16)] o translocaciones entre los cromosomas 15 y 17 [t(15;17)]. Los pacientes con este tipo de LMA presentan una elevada tasa de remisión y un mejor pronóstico comparado con otros tipos de LMA.
LMA con displasia multilineaje	Esta categoría incluye a los pacientes que han sufrido previamente un síndrome mielodisplásico (SMD) o mieloproliferativo (SMP) y este ha derivado en una LMA. Este tipo de LMA tiene una mayor incidencia en pacientes de edad avanzada y suele presentar un peor pronóstico.
LMA y SMD asociados al tratamiento	Esta categoría incluye a los pacientes que han sido sometidos a quimioterapia o radiaciones, y posteriormente desarrollaron LMA o SMD. Estas leucemias pueden ser caracterizadas por anomalías cromosómicas específicas y suelen presentar un mal pronóstico.
LMA no categorizada	Incluye subtipos de LMA que no pueden ser incluidos en ninguna de las categorías anteriores.
Leucemias agudas de linaje ambiguo	En este tipo de leucemia (también conocido como fenotipo mixto o leucemia aguda bifenotípica) las células leucémicas no pueden ser clasificadas como mieloides o linfoides, o bien ambos tipos de células están presentes

Conforme ha pasado el tiempo y se ha mejorado el comprensión de la enfermedad, así como el desarrollo de mejores herramientas diagnosticas se han modificado los criterios diagnósticos para esta patología, actualmente para realizar el diagnostico de leucemia mieloide aguda, se requiere del 20% ó más de blastos en médula ósea o la presencia de menos del 20% de blastos asociado a una de una translocación especifica t (8;21), t(15;17), o inversión 16.

La presencia de alteraciones estructurales y numéricas asociadas a leucemia mieloide aguda más comunes son t(15;17) (q22;q12-21), t(8;21) (q22;q22), t(9;11) (p22;q23) t(11;19) (q23;p13) t (1;11) (p32;q23), inversión 16, t(6;9) (p23;q34), monosomía 7 y trisomía 8.⁹

En estudios internacionales se ha documentado la presencia de un índice de remisión mayor en los pacientes con t(8;21) e inversión 16, alcanzando una remisión de más del 90% en pacientes con (15;17).

Manifestaciones clínicas

La presentación clínica de los pacientes con leucemia mieloide aguda se caracteriza por alteraciones secundarias a la infiltración de la médula ósea por células blásticas; infiltración extra medular de estas células anormales; así como alteraciones en coagulación secundarios a liberación de sustancias de estas células.⁴

Las manifestaciones más comunes son síndrome anémico, síndrome hemorrágico, síndrome infeccioso, infiltración cutánea (leucemia cutis) ó infiltración orbitaria.^{3,4,5}

Las alteraciones que se presentan más frecuentemente en la citometría hemática son: hiperleucocitosis (más de 100,000 leucocitos) lo que produce “estancamiento” o estasis a nivel vascular, ya que cuando el número de blastos es muy alto aumenta la viscosidad de la sangre, se reduce el flujo sanguíneo por la acumulación de células tumorales, las células mieloides primitivas pueden atravesar el endotelio y producir hemorragia, los sitios más afectados son sistema nervioso central, pulmonar y renal.¹⁸

En cuanto al incremento en la cuenta de glóbulos blancos, se conoce desde los años 70s por el grupo BFM, que la leucocitosis está relacionada con riesgo de muerte temprana por sangrado pulmonar y sistema nervioso central en pacientes con leucemia mieloide aguda. ¹⁸

Los blastos pueden invadir al cerebro y a la médula espinal (sistema nervioso central), cuando existe trombocitopenia al diagnóstico, lo cual que incrementa el riesgo de micro sangrados en sistema nervioso conduciendo a la diseminación de células blásticas; o por la realización de una punción lumbar traumática que disemina en forma iatrogénica las células blásticas a sistema nervioso central. ⁴

Las manifestaciones clínicas pueden ser desde cefalea, debilidad, crisis convulsivas, vómito, y visión borrosa, o afección a pares craneales, esta tipo de infiltración se presenta en el 2% de los casos de leucemia mieloide. Con mayor frecuencia asociada a leucemia mieloide aguda M4 y M5 que están en relación con la presencia de hiperleucocitosis al diagnóstico y trombocitopenia. ⁵

También, aunque más excepcional, puede encontrarse el síndrome de Sweet, considerada como una inflamación para neoplásica producida por citoquinas secretadas por las células tumorales o por el sistema inmune en respuesta al tumor.

Diagnóstico de leucemia mieloide aguda

El estándar de oro es el aspirado de médula ósea. Para el diagnóstico de leucemia mieloide aguda la inmunohistoquímica es el complemento de la citología convencional, la cual permite la identificación celular, por medio de reacciones inmunoenzimáticas de las distintas líneas de diferenciación y funcionalidad celular. Esta consiste en la aplicación directa de los anticuerpos policlonales sobre los parámetros morfológicos, aumentando la sensibilidad y especificidad diagnósticas⁴.

Las tinciones más empleadas para el diagnóstico de leucemia mieloide aguda es mieloperoxidasa; MPOX (peróxido de hidrógeno oxidoreductasa), una glicoproteína de 4 subunidades formando por 2 homodímeros; cada uno

tiene una subunidad alfa de 59 kd y una subunidad B de 14 Kda, que se unen a través de un puente disulfuro, esta reacciona con H_2O_2 por medio de 5 tipos de reacciones, la reacción MPOX y leucocitos es característica de los linajes mielocíticos y monocíticos, y es codificada en el CD 34 presente en los mieloblastos y se considera positiva al presentarse reacción en el 3% de las células contabilizadas en el AMO, o puede detectarse por medio de citometría de flujo.¹⁹

La tinción de PAS (Ácido Peryódico de SHIFF) o leucofusina es una reacción colorimétrica, que se torna rojo al contacto con los grupos aldehídos, revelando presencia de todo tipo de carbohidratos tras su oxidación con ácido peryodico, aunque la reacción de PAS no es específico de células hematológicas es de interés para diferenciar leucemias linfoblásticas de mielodes de tipo eritroleucemia.⁴

El Sudán negro es otra tinción que pigmenta grasas neutras, fosfolípidos y esteroides, todas las estructuras peroxidasa positiva son sudanofílicas, por lo que se comporta igual que la mieloperoxidasa, linfocitos y normoblastos son negativos.¹⁹

Las esterasas son un grupo de enzimas capaces de hidrolizar ésteres en sus componentes ácidos y alcoholes, y de acuerdo al sustrato usado se pueden estar presentes en la serie granulocítica y monocítica. La esterasa inespecífica es aquella que reacciona ante sustratos de naftol-As-d-Acetato o naftibutirato, es positiva en la serie monocítica y negativa en neutrófilos y sus precursores por contener fluoruro de sodio, que inhibe a esta enzima. Es útil en la diferenciación de los blastos de origen mieloides y monocítico. La esterasa específica es aquella que reacciona con los sustratos de cloro acetato de esterasa, siendo positiva en la serie granulocítica y negativa en la serie monocítica, no es sensible a la inhibición con fluoruro de sodio, permitiendo la diferenciación de leucemia de serie granulocítica.⁴

En base a las características morfológicas y la presencia de reacciones por inmunohistoquímica realizados a las muestras obtenidas de un aspirado de médula ósea se llega al diagnóstico de Leucemia mieloide aguda.

A diferencia de la Leucemia linfoblástica aguda en el que el reconocimiento morfológico de las células blásticas es más homogéneo, en la línea mieloide hay varios factores que pueden producir activación celular, modificando la morfología celular, así como otros procesos que también son capaces de modificar la morfología celular tales como procesos infecciosos, o alteraciones clonales crónicas, por lo que el diagnóstico morfológico puede complicarse. Es por eso que con el advenimiento de técnicas de análisis molecular, que han permitido el reconocimiento del linaje celular, el estadio de diferenciación y la clonalidad, se ha facilitado el estudio de este tipo de leucemias.

En los últimos años se ha avanzado mucho en la caracterización fenotípica de las células normales de la médula ósea y las neoplásicas hematológicas, por un gran progreso en la citometría de flujo, en la química de los fluorocromos, en la tecnología láser y en los métodos de separación celular²⁰

La citometría de flujo es un método rápido, objetivo y cuantitativo de análisis de células u otras partículas en suspensión. Esta técnica se basa en hacer pasar las células u otras partículas en suspensión, alineadas y de una en una, frente a un haz luminoso, detectando por medio de una reacción antígeno anticuerpo, un anticuerpo monoclonal específico de un linaje celular.²⁰

Múltiples "Clusters of Differentiation" (CD) se han estudiado y agrupado por el Grupo Internacional de diferenciación de antígenos leucocitarios, por medio del uso de fluorocromos, agrupando a los CD de acuerdo a el linaje celular que lo expresa.²¹

El diagnóstico del Inmunofenotipo de leucemias se ha centrado fundamentalmente en leucemias agudas, ya que el diagnóstico de las demás hemopatías se basa en los criterios morfológicos. La médula ósea es la fuente más adecuada de las células para la evaluación de las leucemias agudas.²⁰

Inicialmente debe de diferenciarse si se trata de leucemia de progenitores linfoides o mieloides. Dentro del linaje linfoide se utiliza la citometría de flujo para diferenciar entre células B y células T. Por su parte las células derivadas del linaje B expresan uno o varios de los siguientes

antígenos: CD10, CD 19, CD 24 CD 34, CD 45 (commun Leukocyte Atigen) HLA DR, CD 22.²¹

Los linfocitos de linaje T, aunque adquieren su linaje en timo, se caracterizan por expresar en médula ósea CD34, CD7 CD2, CD3, CD4, CD 5, CD8.

El linaje mieloide muy temprano expresan CD 34 y HLA DR pero pierden su expresión conforme tiene estadio de promielocito, el antígeno CD34 disminuye su expresión conforme incrementa la maduración granulocítica. El antígeno CD13 también expresa en la activación granulocítica.

CD 33 es una gluco proteína transmembrana expresada por los precursores mieloides, (GFU-GEMM, CFU-GM, CFU-G, BFU-E), precursores de granulocitos, monocitos, y macrófagos. CD 13 y CD 33 son los marcadores más sensibles de leucemia mieloide aguda, expresado en el 95% de estas.

Antígenos expresados en las células de leucemia mieloide aguda

De acuerdo al subtipo morfológico de la FAB se ha determinado que existen ciertos CD expresados con mayor frecuencia de acuerdo a subtipo morfológico de la LM, continuación se describen algunos de ellos.²⁰

Leucemia mieloblástica sin diferenciación (LMA M0), se caracterizan por mínima diferenciación, sin expresar mieloperoxidasa, y puede expresar tanto CD 2, CD3, CD7, CD9, CD10, (de estirpe linfóide), así CD13, CD15, CD33, CD65 (de estirpe mieloide).

Leucemia mieloblástica sin maduración (LMA M1) generalmente expresa CD 13, CD33, CD34, CD117, con menor proporción de expresión HLA DR, CD11, CD15 y CD64

Leucemia mieloblástica con maduración (LMA M2) expresa CD 15, CD34, CD65, pero la expresión de CD13 y CD33 es en ocasiones no detectables, no así en los pacientes con presencia de translocación (8;21) que tiene una expresión mayor de CD13 y CD 33.^{22,31}

Leucemia promielocítica aguda (LMA M3) expresa fuertemente CD9, CD 13, CD33, CD65 y CD 68. La presencia de CD 11b, CD15, CD117 es variable.

Leucemia mielomonocítica aguda (LMA M4) expresa CD4, CD 11a, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD33, CD65; con baja expresión de CD 34³¹.

Leucemia monocítica (LMA M5) expresan HLA DR, CD4, CD11b, CD 11c, CD 34, CD 33 CD 64, CD 65, C D15²¹.

Eritroleucemia (LMA M6) expresa CD36, CD71 y Glicoforina A (CD235) CD13 y CD 33.^{22,31}

Leucemia megacarioblástica (LMA M7) espresa en el 90 a 97% CD41a y CD 61^a aunque también expresan CD13, CD34 y HLA DR.

El objetivo inicial es diferenciar la clona linfoide de la mioide, y posteriormente si es mioide, y actualmente además de los fines diagnósticos, se puede determinar con mayor precisión el subtipo morfológico de leucemia aguda, es por eso que al diagnóstico de leucemia deben emplearse varios anticuerpos monoclonales, específicos según el linaje, que detectan los antígenos en las células de la leucemia mioide, junto con una batería de marcadores específicos del linaje de los linfocitos T y B que ayuden a distinguir leucemia mioide de linfoide o leucemias de linaje mixto.²²

Tratamiento de la LMA infantil

Desde 1978 el grupo de estudio de leucemia mioide aguda BFM (Berlin Frankfur Muster) estableció las estrategias de tratamiento para leucemia mioide aguda, en base a el tratamiento establecido para leucemia linfoblástica aguda. Este protocolo no contaba con una etapa de inducción a la remisión, utilizaban radioterapia a sistema nervioso central reportándose entonces una mortalidad del 42 al 46% con antecedente de muerte temprana; definida esta como la muerte dentro de los primeros 16 días del diagnóstico del 12%.²³

En 1983 este mismo grupo BFM reporto el cambio de tratamiento el cual estaba basado en la administración de inducción a la remisión con Arabinósido de citocina, Daunorrubicina y Etopósido, con terapia de mantenimiento de 12 meses, reportando una mejoría en la supervivencia de 52% pero aun con muerte temprana de hasta el 11%. Estos resultados ofrecieron mejor

supervivencia, pero con una alta morbilidad por toxicidad y actividad de la enfermedad.²³

En 1987 el grupo BFM incrementó la dosis de medicamentos en inducción, acortó la terapia de mantenimiento y eliminó la radiación a sistema nervioso central, sin embargo se registró incremento en la mortalidad con respecto a protocolo de 1983 con una sobrevida de 49% y 9% de muertes tempranas. En este entonces la terapia se basó principalmente en tres fármacos Arabinósido de citocina, Etopósido y Daunorrubicina. Este incremento a la mortalidad y la persistencia de alta mortalidad temprana, llevo el grupo BFM a la búsqueda de modalidades terapéuticas para disminuir la mortalidad por toxicidad, sin sub ni sobre tratar a los pacientes con leucemia mieloide aguda, por ello se dieron a la tarea de revisar los factores pronósticos de recaída, ya que hasta este entonces los factores se basaban en estudios realizados en adultos. Los factores considerados eran la extensión de la enfermedad, referida como infiltración a sistema nervioso central y presencia de algunas alteraciones genéticas como inversión 16, translocación 8;21 que jugaban un papel primordial en la evolución de la enfermedad.²⁴

Actualmente este grupo considera este grupo como factor determinante de mal pronóstico, la presencia de leucemia mieloide aguda M2 con ausencia de translocación (8;21), así como translocación 8;21 con presencia de más de 20,000 leucocitos, introduciendo el concepto de respuesta al tratamiento al día 16. La respuesta a día 16 se definió como la presencia de menos de 5% de blastos en médula ósea, con presencia en sangre periférica de hemoglobina de 10, plaquetas de 80,000, neutrofilos totales de 1000. Fue entonces que el tratamiento en 1993 de BFM se estratifico de acuerdo al riesgo, en base a respuesta en el día 16. A los pacientes de alto riesgo se intensificó el tratamiento con altas dosis de Arabinosido de citocina y Etopósido, utilizando trasplante de médula ósea en pacientes con donadores compatibles. Con estas modificaciones se obtuvo una supervivencia global del 57% con muertes tempranas de 7%.²⁴

El grupo de tratamiento de países nórdicos protocolo NOPHO trataba a los pacientes en 1984 con base en tres fármacos para la inducción, Arabinósido de citocina, 6 Tioguanina y Doxorrubicina , una terapia de

consolidación con altas dosis de Arabinosido de citocina en 4 ciclos, así como trasplante en los que tenían donador. Obteniendo una supervivencia del 29%, con supervivencia global de 38%, muertes tempranas del 5% pero con un porcentaje de falta de remisión del 14% y una muerte por aplasia del 7%. Con la finalidad de disminuir el número de no respuesta a tratamiento y las recaídas en pacientes con leucemia mieloide aguda se planeó el NOPHO AML 88 con etopósido y mitoxantrona en inducción a la remisión junto con los tres fármacos ya utilizados y seguidos de consolidación con ciclos de ARA C a altas dosis y etopósido. Obteniendo una supervivencia global del 48%, no respuesta a tratamiento del 3.7%, pero con muerte por aplasia del 18% y una muerte temprana del 9%.²⁵

Para disminuir la toxicidad NOPHO AML 93 estratifico a los pacientes en base a respuesta a tratamiento en primer ciclo de quimioterapia, definiendo como esta la presencia de menos de 5% de blastos en médula ósea en el día 16 de tratamiento. Al no responder en inducción a la remisión se utilizó Ara C y Mitoxantrona y al responder a tratamiento se continúa con los cinco fármacos utilizados previamente, y trasplante en los pacientes que tenían donador, lográndose una tasa de no remisión del 5%, muerte temprana del 2% y una supervivencia global del 65%. También determinó otros factores asociados a no respuesta a tratamiento como la presencia de leucos de 50,000 al diagnóstico, edad menor de 2 años y mayor de 10 años.²⁵

El grupo de tratamiento del Medical Research Council (MRC) para pacientes con leucemia mieloide aguda, (MRC 10) se llevó a cabo de 1988 a 1995 y se dio tratamiento en forma aleatoria con dos esquemas de inducción a base de Daunorrubicina, Arabinósido de citocina y 6 Tioguanina ó con Daunorrubicina, Arabinósido de citocina y Etopósido, seguida por consolidación a base de Amsacrina, arabinocido de citocina y etopósido en un primer ciclo y un segundo ciclo a base de mitoxantrona, Arabinocido de citocina, seguida de trasplante alogénico en los que tenían donador y de trasplante autólogo en los pacientes que no tenían donador. Con ello obtuvieron los siguientes resultados: Remisión completa 93%, Supervivencia global del 58%, Muerte durante inducción del 4%. Sin encontrar diferencia en la administración de 6 Tioguanina y etoposido en inducción a la remisión.

Posteriormente el grupo de tratamiento de Medical Research Council estratificó su tratamiento (MRC 12) en base a la presencia o no de alteraciones citogenéticas considerando como buen pronóstico la presencia de t(8;21) t(15;17) e inversión 16. Considerándose como de mal pronóstico la ausencia de estas translocaciones, leucocitos al diagnóstico mayores de 100,000 y la presencia de leucemia mieloide de morfología M4 y M5. ²⁶

En inducción a la remisión los pacientes de bajo riesgo recibieron Arabinocido de citocina, Daunorrubicina y Etopósido y un segundo ciclo de Mitoxantrona, Arabinocido de citocina y Etoposido. Los pacientes de alto riesgo recibieron Amsacrina, Arabinocido de citocina y etopósido seguido de Mitoxantrona y Arabinósido de citocina, consolidando con ARA C y L asparginasa y transplantando a los pacientes con donador, obteniendo los siguientes resultados remisión completa 92% Muerte temprana 4% Sobrevivida a 5 años 66% Remisión completa en inducción en bajo riesgo 92% y Alto riesgo 90%, Muerte por toxicidad 18% ²⁶

Posterior los años 90 en el que la respuesta al día 16 de tratamiento tiene un factor determinante en la evolución de leucemia mieloide aguda, se da trascendencia a la Enfermedad mínima residual se define como la persistencia de un pequeño número de células malignas indetectables por morfología convencional. Es la causa de la recaída de leucemia. ²⁷

La masa de actividad leucémica en remisión completa va de 10^0 a 10^6 células leucémicas, permitiendo adecuar de acuerdo a esta el tratamiento con la finalidad de no dar sobre ni infratratamientos. El análisis de enfermedad mínima residual, puede realizarse a través de varios métodos estudio citogenético convencional hibridación in situ de fluorescencia (FISH) y biología molecular (PCR y Southern Blot) ²⁷

La citometría de flujo ha sido incorporada en el diagnóstico de leucemia mieloide aguda, así como una herramienta de interés para el análisis de enfermedad mínima residual (EMR).

La citometría de flujo permite detectar pequeños porcentajes de células blásticas en pacientes con diagnóstico de leucemias agudas que se encuentran

en remisión completa hematológica de acuerdo a los criterios morfológicos. Este método permite reconocer 1 célula blástica en 10 a la 4 células mono nucleares totales de médula ósea considerando las características inmunofenotípicas al diagnóstico (fenotipos aberrantes, asincrónicos y sobreexpresión antigénica). El principal objetivo de la detección de mínimos niveles de células tumorales es obtener mayor información acerca de la eficacia del tratamiento implementado para: ^{21,28}

Diseñar protocolos en los pacientes de alto riesgo una vez alcanzada la remisión y Predecir recaídas previamente a las manifestaciones clínicas.

La detección de enfermedad mínima residual por medio de PCR ha demostrado su importancia clínica, brindando información sobre la diseminación de la enfermedad, pero se encuentra restringida a los pacientes en los cuales se demostró al diagnóstico la presencia de una translocación específica, el éxito en la terapéutica se basa en que permite estratificar a los pacientes en riesgo bajo cuando presentan 1 célula blástica en 10 a la 4 células. Con un riesgo de recaída del 14%, con riesgo intermedio cuando presenta 1 célula blástica en 10 a la 3 células con riesgo de recaída del 50% y con alto riesgo cuando se encuentra 1 célula en 10 a la 2 células con un riesgo de recaída del 84%²¹

La medición de enfermedad mínima residual por inmunofenotipo, en el que la caracterización de las células mieloides brinda un panel amplio de anticuerpos monoclonales, necesarios para distinguir los diferentes blastos de linaje mieloides que coexisten al diagnóstico. ²⁸

Fenotipo y con el curso clínico de la enfermedad

En 1996 Goedel y colaboradores describieron por primera vez la presencia de una sub población de células madre que se caracterizaban por ser CD 34 negativas, las cuales presentan gran plasticidad y capacidad incrementada para reproducción y auto reproducción, esto fue realizado en modelos murinos, por lo que además de representar un método diagnóstico y de seguimiento por enfermedad mínima residual, el inmunofenotipo se ha propuesto como un parámetro de correlación de la expresión de algunos

antígenos con el pronóstico de Leucemia mieloide aguda, con resultados variables.²⁹

Hematological Oncology publica el seguimiento de 86 pacientes adultos con diagnóstico de leucemia mieloide aguda determinando el inmunofenotipo al diagnóstico de 14 anticuerpos monoclonales utilizados en forma rutinaria en el diagnóstico de leucemia aguda, reportando que la expresión de CD 13 era el antígeno más frecuentemente expresado por el subtipo morfológico de la FAB M5, sin significado para el pronóstico en estos pacientes..

El antígeno CD 34 se expresa en leucemia aguda de componente granulocítico M1 y M2, pero tampoco se encontró significado en el pronóstico. Las diferencias más importantes encontradas fue que CD 14 se expresaba con mayor frecuencia en leucemias M1, M2 y M3 de la FAB con un significado pronóstico con una ($p < 0.0001$) .El antígeno CD 15 se expresó con mayor frecuencia en leucemias M2, M3 y M4 con ($p < 0.0003$)²⁸

Se ha tratado de relacionar la clasificación inmunológica en adultos con base a la expresión inmunológica de más de 2 marcadores mieloides: Mieloperoxidasa (MPO) CD 13, CD 33 y CD 117 con el pronóstico de la enfermedad, y esto fue reportado al estudiar 117 pacientes adultos con diagnóstico de leucemia mieloide aguda, reportando la presencia antígenos pan mieloides de CD 13 en el (95%) CD 33 en el (91%) MPOX (73%) HLA DR (87%) CD 117 (73%) CDE 34 (68%). En este mismo estudio se realizó una asociación con las condiciones clínicas, leucocitos pero principalmente respuesta a tratamiento, reportando una asociación significativa con la presencia de 5 marcadores mieloides MPOX, CD 13, CD 33, CDW65, CD 117, con respuesta a tratamiento de los que si expresaban estos marcadores contra los que no expresaban estos marcadores (80 v/s 48%) con ($p < 0.0001$).³⁰

JUSTIFICACION

A pesar de los avances en el tratamiento de la leucemia mieloide aguda, esta tiene una tasa de supervivencia de alrededor del 60%, y el reto por incrementar la supervivencia global en estos pacientes ha llevado a la revisión de los factores que influyen en la respuesta a tratamiento y evolución de la enfermedad.

Los principales factores relacionados con la evolución de la leucemia mieloide aguda, han evolucionado con el tiempo, inicialmente se tomaron como factores pronósticos características del paciente y clínicas de la enfermedad, como la edad del paciente, cuenta de leucos al diagnóstico, presencia de enfermedad extra medular y sub tipo morfológico de la FAB. A partir del descubrimiento de nuevas técnicas de estudio de esta alteración hematológica, las alteraciones citogenéticas se convirtieron en uno de los factores más importantes que confieren riesgo de recaída o falla al tratamiento y dado el impacto de las alteraciones citogenéticas en el pronóstico, se propuso estratificar a los pacientes en tres grupos de riesgo.

A partir de mediados de los años 90 se empezó a lograr una mejor sobrevida en estos pacientes, sin embargo se incrementó la morbilidad por medicamentos, se inicio a estratificar a los pacientes en base al riesgo de recaída o falla al tratamiento, dándose mayor importancia a la respuesta a primer ciclo de tratamiento.

A pesar de conocer gran número de factores relacionados con el riesgo, es un reto incrementar la sobrevida de los pacientes con leucemia mieloide aguda infantil, en búsqueda de otros factores que intervengan en la evolución de la enfermedad, se han realizado estudios en adultos en los que se ha documentado la asociación entre algunos marcadores de membrana (CD) detectados por citometría de flujo como factor pronóstico adverso o favorable para respuesta a tratamiento en la población adulta, sin embargo hacen falta estudios pediátricos para determinar si las asociaciones realizadas en adultos tienen validez en la población pediátrica.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dado el porcentaje de recaídas en LMA, es necesario determinar factores asociados al curso clínico de la enfermedad para estratificar a los pacientes. Y lograr incrementar la sobrevida de estos pacientes.

La determinación del Inmunofenotipo es una técnica accesible que se propone como un factor asociado a la evolución clínica de estos pacientes.

PREGUNTA DE INVESTIGACION

¿Es posible que el Inmunofenotipo al diagnóstico se asocie a la evolución clínica de la enfermedad?

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.-Identificar a todos los pacientes con LMA desde 2005 al 2010 del HIMFG y realizar la revisión de curso clínico de su enfermedad
- 2.- Determinar si el inmunofenotipo al diagnóstico se asocia con la evolución clínica de los pacientes con LMA

HIPOTESIS

- 1.-La expresión de CD14 y CD15 se asocia con mayor proporción a recaída al compararlo con los que no expresan estos antígenos.
- 2.- La expresión de CD34 se asociará con remisión completa en el primer ciclo de quimioterapia y ausencia de recaída durante tratamiento.

METODOLOGÍA

Diseño del estudio

Este estudio correspondió a tipo retrospectivo, de cohortes históricas

Población blanco

Pacientes con LMA pediátrica que hayan sido tratados en el Hospital Infantil de México Federico Gómez desde el 2002 al 2009.

Método de muestreo

Muestreo no probabilístico de casos consecutivos.

Criterios de selección de pacientes

Criterios de inclusión.- se seleccionaron pacientes con diagnóstico de LMA confirmado por fenotipo con expediente completo

Criterios de exclusión.- expediente incompleto o traslado del paciente a otra Institución

Variables Independientes:

Edad: Tiempo transcurrido en años desde el nacimiento hasta la fecha del nacimiento.

Número de leucocitos al diagnóstico: Número de leucocitos por micro litro reportados por citometría hemática.

Morfología de la FAB: Características morfológicas de las células, en las que en base a su diferenciación clasifican de M0 a M7.

Infiltración al sistema nervioso central: Presencia de más de 5 células en citológico con la presencia de blastos demostrados por citocentrífuga.

Alteraciones genéticas: Presencia de translocaciones o inversiones asociados a leucemia mieloide, determinadas por FISH o PCR.

Variables dependientes:

Respuesta al primer ciclo de quimioterapia: Presencia de menos de 5% de blastos en médula ósea realizada en el día 15 posterior a la aplicación del primer ciclo de quimioterapia. Con presencia de recuperación en sangre periférica; presencia de cuenta de plaquetas mayor de 80 000, neutrófilos totales de 1000 ó más, sin blastos en sangre periférica.

Muerte temprana: Defunción consecuencia de actividad de la enfermedad o por acción de medicamentos durante las primeras 6 semanas de tratamiento.

No remisión a primer ciclo de quimioterapia: Presencia de más de 5% de blastos en aspirado de médula ósea del día 16, posterior al ciclo de quimioterapia.

Recaída. Evidencia de clínica, presencia en aspirado de médula ósea de más del 5% de blastos, habiéndose demostrado previamente ausencia de la enfermedad.

Metodología y análisis de los datos:

Se recabó del expediente de todos los pacientes con diagnóstico de leucemia mieloide aguda, el fenotipo al diagnóstico, se determinó el porcentaje de expresión de cada uno de los marcadores de antígeno y se determinó cual era el grupo de pacientes con LMA por FAB e Inmunofenotipo.

Se realizó seguimiento clínico en los expedientes y se buscó como eventos de desenlace recaída, falta de respuesta a la inducción y muerte.

Realizamos estadística descriptiva e inferencial de los datos obtenidos, inicialmente realizamos medias, medianas y desviaciones estándar. Posteriormente para determinar la asociación entre los datos obtenidos entre el fenotipo y el curso clínico de la enfermedad utilizamos como medida de asociación la Razón de Momios (OR) y el intervalo de confianza. Para ello se realizó regresión logística binaria entre aquellos pacientes que tuvieran expresión positiva de cada CD considerada como mas del 25% y variables de resultado clínicas (vivo, muerte).

RESULTADOS

Se estudiaron un total de 72 expedientes de pacientes pediátricos con LMA que recibieron atención el Hospital Infantil de México Federico Gómez en un periodo de tiempo comprendido entre enero del 2002 y diciembre del 2009. Todos los pacientes habían terminado el tratamiento, se incluyeron en el análisis a los pacientes que recayeron, y a aquellos pacientes que hubieran fallecido en ese periodo de estudio.

En las tablas 1 y 2 observamos las características generales de la distribución de los 72 pacientes con diagnóstico de leucemia mieloide aguda, la cual fue de 39 pacientes para el género femenino y 33 para el masculino, teniendo una edad promedio de 7.1 años con intervalo de 0.1 a 16 años.

Sexo	Total
Femenino	39
Masculino	33

Tabla 1: Distribución de género en pacientes con LMA

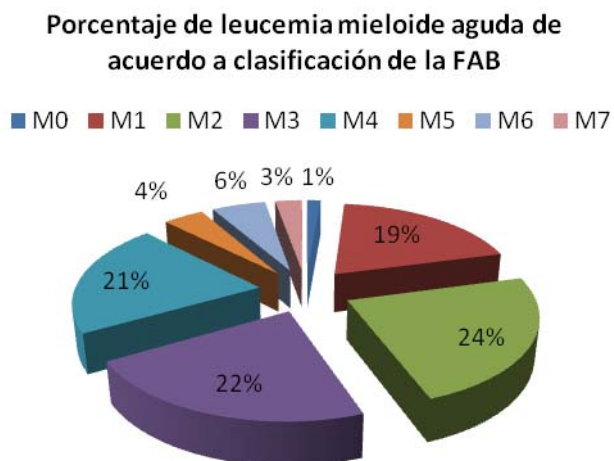
	Promedio	Intervalo
Edad	7.1	0.1 – 16

Tabla 2: Edad promedio en pacientes con LMA

Se agruparon a los pacientes de acuerdo a la clasificación de la FAB, y el mayor porcentaje correspondió a los pacientes con LMA M2, seguido de los pacientes con leucemia promielocítica y en tercer lugar a los pacientes con LMA M4. Los subtipos de LMA menos frecuentes en este estudio correspondieron a los pacientes con LMA M0 y LMA M7. (Tabla 3) El porcentaje encontrado de cada una se encuentra representado en (Grafica 1)

Morfología FAB	Número de pacientes
M0	1
M1	14
M2	17
M3	16
M4	15
M5	3
M6	4
M7	2

Tabla 3: Distribución de LMA en base clasificación FAB



Gráfica 1 : Porcentajes de leucemia mieloide aguda de acuerdo a clasificación de la FAB

Posteriormente se describen los hallazgos en cuanto a la citometría hemática de los 72 pacientes incluidos el estudio. Los rangos fueron heterogéneos, sin embargo se observan medias que revelan al promedio de los pacientes con anemia y trombocitopenia, (Tabla 4), y que la media de leucocitos se ubica hacia la leucocitosis(46 105)

	Hb mg/dl	Hto	Leucos	Neutrófilos	Plaquetas
Media	7.657	22.06	46 105,2	8567	89,700
Intervalo	2.3 – 16	16 -47	400 – 567,700	0 – 304144	2000 – 318900

Tabla 4: Características de citometría hemática al diagnóstico en pacientes LMA.

Dado que estos pacientes cursan con alteraciones en el perfil de coagulación, decidimos analizar los tiempos de coagulación y el estado del fibrinógeno al diagnóstico en los 72 pacientes estudiados. A continuación, se muestran las alteraciones presentadas en el perfil de coagulación de los pacientes incluidos en el estudio al diagnóstico (tabla 5). Se encontró alteración

en el TTP en 10 de los 72 niños, además encontramos TP prolongado en 13 de 72 niños y el fibrinógeno consumido en 4 de los 72 niños estudiados.

	Número de pacientes	Porcentaje	Promedio	Intervalo
TTP Prolongado	10	13%	18.5	12 – 40
TP Prolongado	13	18%	23	16 – 34
Disminución de Fibrinógeno	4	5.5%	250	53 – 596

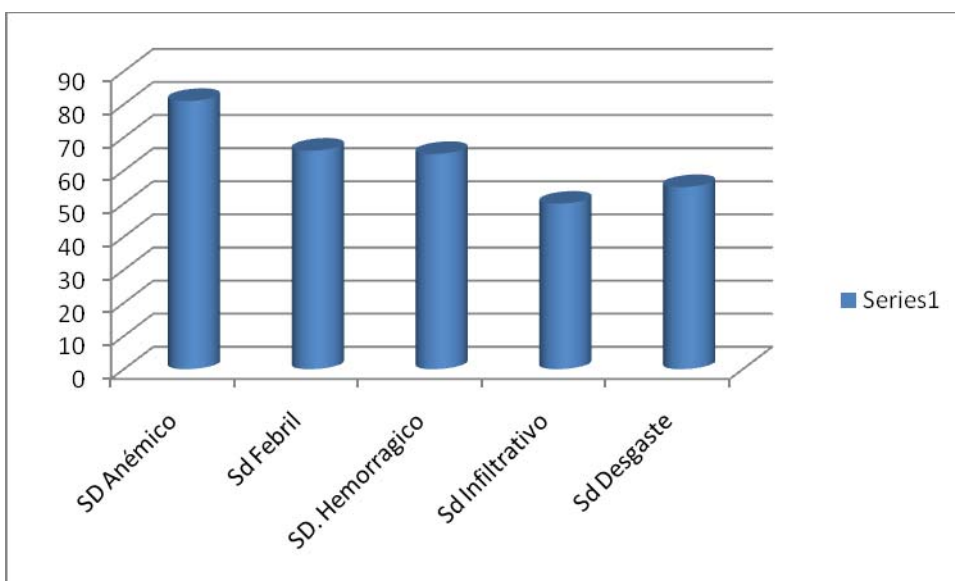
Tabla 5: Pacientes con alteración en la coagulación al diagnóstico de leucemia mieloide aguda. Los resultados se muestran como promedios con intervalos

De acuerdo a la cifra de leucos al diagnóstico, la presentación de traslocaciones de alto riesgo y a la respuesta a tratamiento en el día 16 se clasificaron a los pacientes y bajo y alto riesgo. En base a tabla 7 se muestra la distribución de los 72 pacientes estudiados. En este estudio, la mayor parte de los pacientes correspondían a riesgo bajo o estándar.

	Bajo Riesgo	Alto Riesgo
Número de pacientes	41	31

Tabla 7: Distribución de riesgo en pacientes con diagnóstico de LMA.

Posteriormente analizaos el cuadro clínico al diagnóstico de los 72 pacientes con LMA, se agruparon los signos y síntomas al diagnóstico en síndromes, (hemorrágico, febril, infiltrativo, anémico y de desgaste) La Grafica 2 Muestra la los síndromes clínicos manifestados al diagnostico de leucemia mieloide aguda. Posteriormente se agruparon a los pacientes por número de síndromes al diagnóstico y se detallan en la tabla 8.



Grafica 2: Porcentaje de Síndromes clínicos manifestados en pacientes con diagnóstico de LMA.

La mayor parte de pacientes se presentaron con tres o cuatro síndromes al momento del diagnóstico

Número de síndromes	1	2	3	4	5
Número de pacientes	8	11	22	24	7

Tabla 8: Número de síndromes presentados al diagnóstico en pacientes con LMA.

La tabla 9: Muestra en número de pacientes que presenta alteraciones genéticas al diagnóstico y en número de pacientes en los que no se documentó

alteración genética. De los 72 pacientes encontramos solo 21 pacientes con determinaciones positivas para alteraciones citogenéticas.

	t(8;21)	t(15;17)	t(9;11)	t(11;17)	t(4;11)	Monosomía 5	Trisomía 21	Sin alteración
Número Pacientes	4	11	1	1	2	1	1	51

Tabla 9: Número pacientes que presentaron alteración genética al diagnóstico y pacientes en los que no se documentó alteración genética al diagnóstico de LMA

En cuanto al estado actual de la enfermedad y la condición de los pacientes, es necesario señalar que todos los pacientes habían terminado tratamiento al momento del estudio o habían fallecido.

Al momento actual, tenemos 43 pacientes (59.7%) de pacientes vivos sin enfermedad, cinco pacientes (6.9%) de pacientes vivos con enfermedad, y hasta el momento han fallecido 24 pacientes, que corresponden al 33% de la población estudiada. (Tabla 10).

	VIVOS		MUERTOS
	Con Enfermedad	Sin Enfermedad	
Número de pacientes	5	43	24
Porcentaje	6.9	59.7	33

Tabla 10: Estado actual de los pacientes con diagnóstico de LMA

Para el estudio de los pacientes es necesario contemplar que el tratamiento desde el 2002 al 2010 el Hospital Infantil de México ha tenido 2 eras, la primera usando el esquema de MRC-10 modificado y la segunda etapa desde el 2007 a la fecha con el esquema NOPHO modificado.

La Tabla 11 muestra el número de pacientes tratados con cada uno de los protocolos utilizados para el manejo de la leucemia mieloide aguda, así como la respuesta al día 16 de tratamiento, la presencia de recaída durante tratamiento y después de iniciada la vigilancia.

Protocolo	Número de pacientes tratados	Remisión al día 16	Recaída Durante Tratamiento	Recaída menos1 año de vigilancia	Recaída más del año de vigilancia
MRC	34	26	2	8	3
NOPHO	29	23	0	6	0
PML	9	9	0	0	0

Tabla 11: Número pacientes tratados cada protocolo de manejo de leucemia mieloide aguda, respuesta al día 16 de tratamiento y recaída durante tratamiento, así como iniciada vigilancia.

Se analizaron los resultados de los protocolos de las 2 eras de tratamiento, las diferencias consistieron principalmente en el tiempo de seguimiento, ya que el seguimiento de los pacientes con LMA bajo MRC-10 ha sido más largo, y que en el protocolo MRC-10 no había estratificación de los pacientes por riesgo ni había diferencias en la quimioterapia que recibían los pacientes con LMA promielocítica, y en cuanto a las recaídas, muy tempranas, hasta el momento tuvimos 2 con MRC-10, ninguna con NOPHO, 8 recaídas tempranas con MRC y 6 con NOPHO y 3 tardías con el primer esquema y hasta el momento del análisis ninguna tardía con NOPHO, pero esto es muy probable debido al corto seguimiento. De los 2 pacientes que recayeron durante tratamiento, se registraron dos defunciones.

Considerando a los pacientes de manera global, registramos 12 pacientes (16.6%) que fallecieron durante la inducción a la remisión considerándose esta como la muerte en los primeros 16 días de tratamiento.

Otro dato evaluado en estos pacientes fue la aparición leucemia mieloide aguda secundaria, la tabla 12 nos muestra los pacientes que presentaron leucemia mieloide aguda como segunda neoplasia, el subtipo morfológico y así como el diagnóstico previo y el tiempo después del diagnóstico en el que se presentaron las mismas. Los dos pacientes fallecieron con persistencia de la enfermedad.

Diagnóstico Previo	Número de pacientes	Tiempo en meses del diagnóstico inicial a la LMA	Tipo de Leucemia mieloide de acuerdo FAB
Rabdomiosarcoma	1	58	LMA M1
Histiocitosis de células de Langerhans	1	47	LMA M1

Tabla 12: Pacientes que presentaron leucemia mieloide como segunda neoplasia, diagnósticos previos y subtipo morfológico

Se utilizó un panel de 22 anticuerpos para diagnóstico de pacientes con leucemia aguda, se seleccionaron los pacientes con LMA y de los 72 pacientes, se analizaron los porcentajes de expresión de los antígenos y se consideró positivo al antígeno que se expresara en un 25% o más de la población celular analizada.

Se utilizaron razones de momios e intervalos de confianza de los datos obtenidos, relacionando la mortalidad con el porcentaje de expresión de cada uno de los antígenos del fenotipo por medio de regresión logística. En la tabla 13 se observa la asociación entre inmunofenotipo y mortalidad en población pediátrica con leucemia mieloide aguda.

Antígeno	OR	IC 95%
CD 45	0.552	0.15 – 1.9
CD 34	0.244	0.07 – 0.84
CD 5	0.93	0.242 – 3.59
CD 20	0.77	0.131 – 4.54
CD 19	0.58	0.18 – 1.85
CD 33	1.39	0.59 – 3.25
CD 7	1.73	0.56 – 5.34
CD 22	0.70	0.12 – 4.07
CD 2	1.59	0.52 – 4.85
CD 3	0.31	0.06 – 1.56
Glicoforina	0.60	0.10 – 3.43
CD 15	0.30	0.12 – 0.76
CD 79 a	0.81	0.06 – 9.62
CD 41	1.89	0.11 – 32.01
CD 117	0.30	0.82 – 1.11
CD 14	0.80	0.18 – 3.51
HLA DR	0.88	0.30 – 2.52
CD 13	1.19	0.45 – 3.12
Kappa	0.69	0.20 – 2.41
Lambda	0.74	0.22 – 2.4
MPOX	0.248	0.07 – 0.81
TdT	0.97	0.15 – 6.2

Tabla 13 Análisis de regresión logística de cada uno de los antígenos del panel de 22 utilizados para el diagnóstico de leucemia aguda, los resultados se presentan en razón de momios e intervalos de confianza al 95%

Se utilizaron razones de momios e intervalos de confianza de los datos obtenidos, relacionando la mortalidad con el porcentaje de expresión de cada uno de los antígenos del fenotipo por medio de regresión logística. En la tabla 13 se observa la asociación entre inmunofenotipo y mortalidad en población pediátrica con leucemia mieloide aguda.

En el análisis de regresión logística binaria encontramos que 3 de los 22 antígenos resultaron como factores protectores de la variable muerte. Estos antígenos fueron CD34 (OR 0.24 con IC95% 0.07-0.84) CD15 (OR 0.30 IC 0.12-0.76) y MPOX (OR 0.24 IC 0.07-0.81)

CONCLUSIONES

De los datos recabados, de los 72 pacientes con diagnóstico de leucemia mieloide aguda, encontramos que la relación femenino – masculino de 1.1 similar a la reportada internacionalmente.

La edad promedio de presentación de LMA fue de 7.1 años, menor a la reportada internacionalmente, pero dado que la presentación de esta enfermedad varía con la edad y que la edad de presentación es bimodal, en la etapa neonatal y en la adolescencia, los intervalos muestran presencia de enfermedad en pacientes de 1 mes de edad hasta los 16 años. A esto puede deberse la edad promedio de presentación menor a la reportada.

En cuanto a la presentación clínica, en este estudio la mayor parte de los pacientes se presentó con síndrome anémico en el 88% de los casos, confirmándose el promedio de hemoglobina promedio reportado de 7.6 g/dl, por otro lado el síndrome febril se presentó en el 66% de los casos, el síndrome hemorrágico en el 65.2% de los pacientes, llama la atención que más del 60% de los pacientes presentó síndrome hemorrágico al diagnóstico pero solo 18% de los pacientes presentó prolongación de TP y 13.8% prolongación del TPT, y tan solo el 5% presentó disminución de fibrinógeno, esto considero se debe a que nuestro estudio se realizó en forma retrospectiva, y no contamos en todos los casos con parámetros iniciales de coagulación y por otro lado el alto porcentaje de trombocitopenia al diagnóstico, es considerado como otro factor etiológico del síndrome hemorrágico, el menos frecuente de los síndromes clínicos fue el síndrome infiltrativo presentado en el 50% de los pacientes de reciente diagnóstico.

La mayoría de los pacientes presentaba más de un síndrome clínico al diagnóstico, dado que no hay una afección a una sola línea celular en médula ósea.

Los parámetros de la citometría hemática encontrados al diagnóstico de leucemia mieloide aguda, son muy diversos como lo muestran los intervalos encontrados, desde parámetros normales, pancitopenia en sangre periférica, hasta hiperleucocitosis y aunque en la media encontrada de acuerdo a nuestros resultados al diagnóstico de hemoglobina y hematocrito estaban

disminuidos, encontramos media de leucocitosis al diagnóstico y trombocitopenia.

La distribución de los casos de leucemia mieloide aguda en los diferentes subtipos morfológicos de la FAB es similar a la reportada internacionalmente, siendo el subtipo más frecuente la M2, lo cual concuerda con la literatura internacional. El segundo subtipo en frecuencia fue la leucemia aguda mieloide promielocítica, lo cual está de acuerdo con la literatura internacional que reporta una mayor incidencia en los pacientes con LMA M3 en los países latinos.

El porcentaje de no detección de traslocaciones específicas en nuestros pacientes es menor que la reportada internacionalmente, encontrando sin alteración 66% de los casos, debido a que el panel de alteraciones medibles con las que contamos en nuestro hospital son limitadas, comparadas con las determinadas en países industrializados.

Aunque se respeta el patrón de distribución de las translocaciones más frecuentes como t(8;21), t(15;17), esto no sucedió con la inversión 16, que se reportó con mucha menor frecuencia que la reportada internacionalmente. Se detectaron por otro lado la presencia de traslocaciones reportadas en leucemia bilinaje como t(4;11).

Consideramos trascendente para la clasificación y estratificación de riesgo adecuada de las leucemias mieloides agudas, la investigación de más alteraciones genéticas en nuestros pacientes.

La infiltración a sistema nervioso central encontrada en nuestros pacientes representa el 15% de los casos, mucho mayor a lo reportado internacionalmente en donde el porcentaje de infiltración es de 2 a 3%, esto puede deberse a que al diagnóstico los pacientes presentan Trombocitopenia, y en ocasiones el acceso a derivados hematológicos son limitados, lo que favorece la presencia de sangrado microscópico a sistema nervioso central, desarrollando infiltración al mismo.

En cuanto a la clasificación de los pacientes clasificados de bajo y alto riesgo por factores determinados internacionalmente, encontramos que la mayoría de los pacientes presentan características, de bajo riesgo.

El tratamiento de nuestros pacientes se llevo a cabo con tres protocolos basados en tratamientos internacionales para leucemia mieloide aguda, a que

del 2002 al 2007 se dio manejo con protocolo MRC 10, en el cual no se estratificaba a los pacientes por grupo de riesgo, se daba un tratamiento estándar, con disminución del número de ciclos era considerada de acuerdo a la toxicidad que era la limitante de dosis. En base a este protocolo se trataron 34 pacientes obteniéndose un índice de respuesta al día 16 de tratamiento del 76%, similar al reportado en forma internacional.

Hasta el momento se reporta de una tasa mayor de recaída en MRC-10 que en el protocolo NOPHO pero es trascendente documentar que el tiempo de seguimiento de los pacientes es mayor en estos pacientes que en los pacientes tratados con protocolo NOPHO, ya que se inicio como forma de tratamiento a partir de 2007. Así como un número mayor de muertes, pero con un número mayor de pacientes.

Con lo que respecta a remisión o respuesta al día 16 de tratamiento con protocolo NOPHO se encontró un índice de remisión del 79%, semejante al reportado por protocolo internacional.

No encontramos diferencias en resultado entre ambos protocolos, en base a eventos medibles en este estudio, dado que uno de las características señaladas internacionalmente con lo que respecta a protocolo NOPHO es una menor toxicidad. No fue propósito del estudio la medición de la toxicidad ni muerte por toxicidad de ambos protocolos.

El tiempo de recaída es un factor determinante para el pronóstico de los pacientes, considerándose a los que recaían después del primer año de vigilancia como de mejor pronóstico. La mayor parte de las recaídas presentadas en nuestros pacientes se presentaron durante el primer año de tratamiento, esto podría ser resultado de un corto seguimiento en algunos pacientes, que eventualmente pueden presentar recaída.

La diferencia en cuanto al tiempo en que se realizó el tratamiento y el diagnóstico, puede modificarse este resultado en el seguimiento posterior.

La muerte durante la terapia de inducción a la remisión es un parámetro importante en la calidad del tratamiento, la muerte durante inducción es reportada internacionalmente de forma variable del 3 al 5% pero la muerte durante la inducción es mucho mayor en nuestra institución. Esto podría tratarse debido a las características basales de los pacientes como podrían ser estado de nutrición, condición social y exposición de procesos infecciosos por

hacinamiento, así como a menor recurso institucional para el tratamiento de estos pacientes que requieren tratamientos intensivos por tiempo prolongado, en comparación con los pacientes tratados en países industrializados.

La supervivencia global en nuestros pacientes es similar a la reportada internacionalmente para pacientes con diagnóstico de leucemia mieloide aguda.

Por otro lado los pacientes que presentaron recaída presentaron una mortalidad del 78%, similar también a lo reportado internacionalmente.

Se tuvieron 2 pacientes con diagnóstico de leucemia mieloide aguda como segunda neoplasia, representando el 2.7% de los casos, cifra similar a la reportada en forma internacional, no así el subtipo morfológico, ya que el mayor relacionado en es subtipo LMA M4 y M5, encontrando en nuestros pacientes en los dos pacientes LMA M2.

De los 22 antígenos de superficie analizados, se seleccionaron como positivos aquellos que se expresaban en 25% o más de la población celular estudiada.

En la literatura internacional, la mayor parte de estudios han sido realizados en adultos, y los resultados son diversos y en algunos casos contradictorios. En aquellos estudios se reporta que el antígeno CD34 confiere valores de protección en los OR con intervalos de confianza que lo confirman, nuestro estudio apoya este resultado encontrado en población adulta, sin embargo, en cuanto al análisis de los marcadores monocitoides (CD14 y 15), algunos estudios reportan factor de riesgo para recaídas o curso clínico adverso en pacientes adultos con LMA. En nuestro estudio no pudimos demostrar el hecho de que CD15 fuera de riesgo, es mas nosotros encontramos a este marcador como factor de protección para muerte, sin embargo, es posible que estos factores sufran alguna modificación cuando se sometan a un análisis multivariado.

Nuestro estudio es concordante con los resultados propuestos en adultos en lo que respecta al valor protector para mal pronóstico de la expresión positiva de la mieloperoxidasa. MPOX OR 0.248 (0.07 – 0.81)

Concluimos que el presente estudio es relevante ya que analiza una serie considerable de pacientes pediátricos con LMA, además se relacionaron

factores clínicos importantes como la probabilidad de estar vivo o fallecer con un método al diagnóstico que es accesible y objetivamente cuantificable.

Este estudio abre una línea de investigación para realizar análisis más detallados estadísticamente y llegar a proponer a mediano plazo la expresión de marcadores monoclonales al diagnóstico con el curso clínico de la enfermedad en nuestros pacientes.

REFERENCIAS

- 1.- Rodolf Virchow A Great French Surgerans. Hist Med. 1970; 211-213.
- 2.- John Hugnes, Benett, Rudolph Virchow and Alfred Donne. The First description leukemia editorial. The hematology Journal (2001).
- 3.- Pathology of leukemia Gorge D. Amromin. JAMA 1968; 205(7) 538 Vol 25.
- 4.- Childhood Leukemias Chin Hon Pui Second Edition 2006 Pag 499 -539.
- 5.- Acute Myeloid leukemia . Bob Lewenberg James R Downing N Engl J Med 1999; 341; 1051 – 1062.
- 6.- Acute Myeloid leukemia: Epidemiology and etiology. Barbara Descher Michael Lubbert. Cancer Journal for Clinicans. 2006 Vol 107, Pag 2099 – 2107.
- 7.- Distintive Demography, Biology and outcome of acute myeloid leukemia and myelodisplasic syndrome in children´s cancer group studies 2861 and 2891. Beverly J Lange, Nathan Kobrinsky, Dorothy R. Bernard. Blood vol 91 No 2 1998 pag 608 – 615.
- 8.- The Molecular phatogenesis of acute myeloid leukemia Bronn Steffen, Carsten Muller Clinical Reviews in Oncology Hematology 2005 195 – 221.
- 9.- Cromosomal Abnormalitives in 478 Childrens with Acute Myeloid Leukemia Clinical Characteristics and treathmentnoutcome in cooperative Pediatric Oncology Group Study POG 8821 . Susana C. Raimondi, Myron Chang Blood vol 94 No 11 (December aa) 1999 pag 3707 – 3716.
- 10.-The 8;21 Cromosomal translocation in acute myelogenous leukemia modifies intranuclear targeting of the AML 1/CBF Alfa 2 transcriptian factor. Sandra Mcneil, Congmei Zeng , Kimberly S. Horrington Scott Hiebert. PNAS December 21 1999, vol 96 No 26.
- 11.- Molecular Pathogenesis of the Chromosome 10 inversion in the M4 subtype of acute myeloid leukemia. P.D Lui, A. Hajra C Huijmenga. F.S.Collins Blood. Mayo 2005 vol 5 No 9 pag 2289- 2302.

12.- Delecion of fusion transcripts generated by inversion 16 Chomosome in acute myelogenous leukemia. Clexon P. Lui, P Mailton. Blood vol 83 No 7 april 2004 pag 1750- 1756.

13.- The molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukemia implication for the clinical management of the disease. Anita R Mistry, Eva W PAdersen Elen Salomon. Blood Reviews 2003 71- 97.

14.- MLL Translocatiosns specify a distinct gene expression profile distinguishes a unique leukemia. S. Armstrong, J. Staunton R. Pietters Nature genetics 200130;41-47.

15.- The role of Cytidine Deaminase and GATA 1 mutation in the increase cytosine arabinoside sensitivity of down syndrome myeloblast and leukemia cell lines. Yulan Ge, Tanya L. Jensen Cancer Research,January 2004; 728-735.

16.- ProposalL for the Classification of acute leukemias French American British (FAB) cooperative group. T. Bennet. C.M Thergse. British Journal of hematology 3;4; 451-458.

18.- Pronostic value of imunophenotyping in elderly patiens with acute myeloid leukemia. C. Plesa Y. Chelgjo. American Cancer 2008;112;3.

19.- Biochemical characterization of human myeloperoxidase using three specific monoclonal antibodies. Monshita Y, Y Ogura M Nagai. Br J Hematol,1996;63(3); 435-444.

20.- Flow cytometric characterization of acute myeloid leukemia. Transtappen L. Safford M Kneman. Leukemia 2001; 5:757-767

21.- Prognostic significance of flow cytometric immunphenotyping in acute myeloid leukemia myeloid leukemia. B. Webber. M. Cushing. Int J. Clin Exp Pathol 2008,1;124-133.

22.- Flow cytometric characterization of acute myeloid leukemia: IV comparison to the differentiation pathway of normal hematopoietic progenitor cells. T. Lui. S. Uterhalt Leukemia 1992;1: 201-210.

23.- Clinical significance of surface antigen expression in children with acute myeloid leukemia: results of study AML BFM- 87. Jochen Herburr, Ursula Crezig. Blood;;1995;p 3097-3108.

24.- Treatment strategies and long term results in pediatric treated in four consecutive BFM trials. U Creutzig M Zimmermann J. Ritter. Leukemia 2005,19,2030.

25.- Long term results in children with AML : NOPHO Study group report of the three consecutive trials. S. Lie A. N Clausen H Hasle; Leukemia 205;19;2090-2100.

26.-Treatment strategy and long term results in paediatric patients treated in consecutive UK AML Trials. B. Gibson, K Wheatley. Leukemia , 2005; 19; 2130-2138.

27.- Minimal residual disease – directed therapy for childhood acute myeloid leukemia: Results of the AML 02 multicentric trial. J Rubritz,. The Lancet 2010, 10 1410-1470.

28.- CD 34 expression Fail to predict the outcome in adult acute myeloid leukemia. Lioni F, Caporale. Hematologica 1993;78;151-155.

29.- Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cell that are replicating in vivo; Goodel MA, Brose K, Paradis G; J exp Med 1996;13;1797-1806.

30.- The immunophenotype of 177 adults with acute myeloid leukemia: Proposal of a prognosis score. O.Legrand; JYves Perrot, M Baudard. Blood 2000;96;3.