



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E  
INVESTIGACION  
SECRETARIA DE SALUD  
HOSPITAL INFANTIL DE MEXICO FEDERICO GOMEZ

**DETERMINACIÓN DEL INMUNOFENOTIPO Y DEL REARREGLO DEL GEN DE LA CADENA PESADA DE LAS INMUNOGLOBULINAS EN LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO (LCR) DE NIÑOS CON LEUCEMIA AGUDA LINFOBLÁSTICA (LAL) COMO PRUEBA DIAGNÓSTICA PARA DETECTAR INFILTRACIÓN A SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC).**



**TRABAJO FINAL QUE PRESENTA  
MIGUEL ANGEL PALOMO COLLI**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS MEDICAS**

**TUTORA  
MARTA MARGARITA ZAPATA TARRES**

MÉXICO D.F. Junio de 2012





UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E  
INVESTIGACION  
SECRETARIA DE SALUD  
HOSPITAL INFANTIL DE MEXICO FEDERICO GOMEZ

**DETERMINACIÓN DEL INMUNOFENOTIPO Y DEL REARREGLO DEL GEN DE LA CADENA PESADA DE LAS INMUNOGLOBULINAS EN LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO (LCR) DE NIÑOS CON LEUCEMIA AGUDA LINFOBLÁSTICA (LAL) COMO PRUEBA DIAGNÓSTICA PARA DETECTAR INFILTRACIÓN A SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC).**



**TUTORA  
MARTA MARGARITA ZAPATA TARRES**

MÉXICO D.F. Junio de 2012



## **AGRADECIMIENTOS**

**A mis profesores no solo del aula, también los de la vida diaria.**

**A mis amigos y compañeros de los cuales aprendí cosas nuevas.**

**A todos los niños.**

**A todos aquellos que se esfuerzan a diario para ser mejores.**

**“Dios Todopoderoso ha creado la mente libre”**

**Thomas Jefferson**

## **RESUMEN:**

**PROBLEMA:** Evaluar la validez del inmunofenotipo por citometría de flujo comparado con la citología clásica como prueba diagnóstica de infiltración a Sistema nervioso central en Leucemia Aguda Linfoblástica.

**OBJETIVOS:** Evaluar la utilidad diagnóstica del inmunofenotipo en el Líquido Cefalorraquideo en una cohorte de niños con Leucemia Aguda Linfoblástica.

**METODOS Y MATERIAL EMPLEADO:** estudio de prueba diagnóstica (transversal comparativo) se llevó a cabo a partir de marzo de 2010 a enero del 2012 en el Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG). Se incluyeron un total de 125 muestras de LCR de pacientes con LAL, menores de 18 años. Se informó a los padres y/o tutores de los pacientes candidatos a participar en el protocolo sobre el mismo y aquellos que aceptaron participar fueron incluidos.

**RESULTADOS:** se incluyeron 111 LCRs para evaluación, por citomorfología 85 LCRs se clasificaron como negativos (76.5%) de los cuales 3 fueron SNC2 y 82 SNC1, 26 líquidos fueron clasificados como positivos, SNC3 (23.5%). Para validar los resultados de la citología referidos se realizó un análisis interobservador el cual fue de 0.8466 (IC 95% 0.5526-1.0) y para el análisis intraobservador fue de 0.8780 (IC 95% 0.6432-1.0). La sensibilidad y especificidad fueron de 76.92 y 87.06 respectivamente, el valor predictivo positivo fue de 64.52 y el valor predictivo negativo de 92.50, la razón de verosimilitud positiva fue de 5.94 y la negativa de 0.27.

**CONCLUSIONES:** Es necesario incluir en la evaluación del LCR de los pacientes con LAL como una prueba en paralelo con el objeto de aumentar la sensibilidad y hacer una correcta evaluación del paciente.

## **INDICE**

<b>I ANTECEDENTES.....</b>	<b>6</b>
<b>1.1 Leucemia Aguda Linfoblástica</b>	
<b>1.2 Infiltración a Sistema Nervioso Central</b>	
<b>1.3. Citometría de Flujo</b>	
<b>II JUSTIFICACION.....</b>	<b>13</b>
<b>III PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>16</b>
<b>IV PREGUNTA DE INVESTIGACION.....</b>	<b>16</b>
<b>V OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
<b>VI HIPOTESIS.....</b>	<b>16</b>
<b>VII MATERIAL Y METODOS.....</b>	<b>17</b>
<b>7.1 Diseño del estudio y selección de pacientes</b>	
<b>7.2 Sitio del estudio y población objetivo</b>	
<b>7.3 Criterios de inclusión y exclusión</b>	
<b>7.4 Definición operacional de variables</b>	
<b>VIII CÁLCULO DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA.....</b>	<b>20</b>
<b>IX METODOLOGIA.....</b>	<b>20</b>
<b>X ANALISIS ESTADISTICO.....</b>	<b>23</b>
<b>XI RESULTADOS.....</b>	<b>25</b>
<b>XII DISCUSION.....</b>	<b>30</b>
<b>XIII CONCLUSIONES.....</b>	<b>33</b>
<b>XIII BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>34</b>
<b>XIV ANEXOS.....</b>	<b>37</b>

## **I. ANTECEDENTES**

### **1.1 Leucemia Aguda Linfoblástica**

La Leucemia Aguda Linfoblástica (LAL) se define como una alteración citogenética que tiene como consecuencia la proliferación monoclonal maligna de células precursoras de estirpe linfoide. Las LAL se caracterizan por el remplazo variable de la celularidad de la médula ósea por blastos. Es la neoplasia maligna más frecuente en la edad pediátrica con una incidencia entre 3 y 4 pacientes por cada 100,000 habitantes por año. El pico de presentación es entre los 2 y 5 años.<sup>1</sup>

El diagnóstico de sospecha de LAL se hace con base en las manifestaciones clínicas, exploración física y hallazgos de laboratorio. El diagnóstico de certeza se establece al encontrar más de 25% de blastos de características linfoides en la médula ósea.<sup>1, 2</sup>

Los niños con LAL se tratan según grupos de riesgo definidos por características clínicas y de laboratorio. La intensidad del tratamiento necesario para obtener desenlaces favorables varía entre los subconjuntos de niños con LAL. Se utiliza la asignación de un tratamiento sobre la base del grado de riesgo para que los pacientes con características clínicas y biológicas favorables, con probabilidades de presentar un desenlace muy bueno con un tratamiento modesto, se puedan librar de un tratamiento más enérgico y tóxico; al mismo tiempo, se puede proporcionar un tratamiento más enérgico y potencialmente más tóxico a los pacientes que tienen probabilidades más bajas de supervivencia a largo plazo.<sup>3, 4, 5</sup>

Algunos grupos de estudio de la LAL usan un régimen de inducción a la remisión intensivo, con base en un subconjunto de factores previos al tratamiento; mientras que otros grupos administran un régimen de inducción similar a todos los pacientes. Todos los grupos modifican la intensidad de la terapia de postinducción con base en una variedad de factores pronósticos.

La asignación de tratamiento de acuerdo con el grado de riesgo exige que se disponga de factores pronósticos confiables para predecir el resultado. Para los niños que padecen de LAL, hay un número de características clínicas y de laboratorio que demostraron tener valor

pronóstico. Los factores descritos se agrupan en las siguientes categorías:

- Características del paciente en el momento del diagnóstico.
- Características de las células leucémicas en el momento del diagnóstico.
- Respuesta al tratamiento inicial.<sup>6</sup>

### **1.2 Infiltración a Sistema Nervioso Central**

La presencia de leucemia en el Sistema Nervioso Central (SNC) al momento del diagnóstico tiene significado pronóstico. Los pacientes con diagnóstico de punción lumbar no traumática, se pueden ubicar en una de las tres categorías siguientes de acuerdo con la cantidad de glóbulos blancos (GB)/ $\mu$ l y la presencia o ausencia de blastos en la citocentrífuga:

**SNC1:** LCR que resulta negativo para la presencia de blastos en la citocentrífuga, independientemente del recuento de GB.

**SNC2:** LCR con menos de 5 GB/ $\mu$ l y citocentrífuga positiva para blastos.

**SNC3:** LCR con 5 o más GB/ $\mu$ l y citocentrífuga positiva para blastos.

En comparación con los pacientes clasificados como SNC1 o SNC2, los niños con LLA que presentan enfermedad del SNC es decir, SNC3 al momento del diagnóstico, corren un mayor riesgo de recaída dentro del SNC como sistémicamente.<sup>7</sup> La importancia pronóstica adversa relacionada con el estado SNC2, si lo hubiera, se puede superar mediante la aplicación de terapia intratecal más intensa, especialmente durante la fase de inducción.<sup>7, 8</sup> Una punción lumbar traumática ( $\geq 10$  eritrocitos/ $\mu$ l) que incluya blastos en el momento del diagnóstico parece relacionarse con un aumento del riesgo de recaída al SNC e indica un desenlace general más precario.<sup>7, 9, 10</sup>

La infiltración al SNC es un hallazgo frecuente de las neoplasias hematológicas con incidencias mayores del 25% en leucemias y linfomas.<sup>11, 12</sup> En la evaluación inicial de pacientes con LAL, el LCR debe ser examinado cuidadosamente y dependiendo del grado de observación y la experiencia del observador, se pueden identificar

blastos hasta en un tercio de los pacientes al diagnóstico, la mayoría de los cuales carece de síntomas neurológicos. El análisis citológico convencional ha demostrado su utilidad, sin embargo, el análisis de las células en el LCR, especialmente cuando el recuento celular es bajo, es más difícil de lo que es ampliamente admitido y no siempre es concluyente. Independientemente del riesgo al que el paciente se asigne, todos reciben tratamiento contra enfermedad no medible en SNC debido a que la capacidad del estándar de oro, es insuficiente para demostrar que los pacientes tienen infiltración a SNC. Sin embargo las modalidades de tratamiento varían de acuerdo al estado del SNC al momento del diagnóstico. El involucro del SNC en las LAL tiene una incidencia de 5 a 10%. El diagnóstico de infiltración a SNC tiene tanto implicación pronóstica como terapéutica, ya que aquellos niños con infiltración al SNC al diagnóstico requieren de un tratamiento más intenso tanto sistémico como local.<sup>13</sup> (anexo 1)

En todos los centros de tratamiento, el diagnóstico de infiltración del SNC se definió como la presencia 5 o mas leucocitos por milímetro cúbico de LCR con blastos presentes en una muestra citocentrifugada, o por la presencia de parálisis de pares craneales o de masa cerebral por estudio de imagen.<sup>14, 15</sup> La clasificación actual del estado del SNC en LAL es la siguiente:

<b>ESTATUS DEL SNC EN LAL</b>	
<b>SNC 1</b>	Ausencia de blastos leucémicos identificables en LCR.
<b>SNC2</b>	Presencia de células leucémicas en una muestra que contiene menos de 5 leucocitos por microlitro.
<b>SNC3</b>	Muestra no traumática que contiene 5 o más leucocitos por microlitro con blastos identificables, presencia de masa cerebral o parálisis de pares craneales con células leucémicas en LCR.

La incidencia de infiltración del sistema nervioso central al diagnóstico puede variar considerablemente dependiendo de los criterios diagnósticos empleados; algunos de los factores que contribuyen a la dificultad en establecer el diagnóstico son la cuenta baja de células presentes en las muestras de LCR y la dificultad para interpretar el significado de anomalías morfológicas en una cantidad pequeña de células en el LCR en preparaciones citocentrifugadas. El examen citomorfológico del LCR no demuestra las células malignas hasta en un 45% de los casos con infiltración meníngea.<sup>11</sup>

Uno de los problemas al evaluar involucro de LAL en el LCR ocurre cuando existe una cuenta baja de células y cuando se tienen que distinguir infiltrados neoplásicos de enfermedades inflamatorias e infecciosas. El demostrar la presencia de antígenos de superficie celular y deoxynucleotidil transferasa terminal (TdT) puede aumentar la información disponible de la morfología celular y determinar si las células son o no de origen leucémico.<sup>12, 18</sup>

El examen citológico del LCR constituye la prueba diagnóstica que se emplea para detectar la infiltración al SNC, empleando microscopía de luz; desafortunadamente esta técnica tiene baja sensibilidad y especificidad.

Los falsos negativos pueden ser debidos a la escasez de células en el LCR de pacientes con bajo grado de enfermedad o al aspecto inocente de las células neoplásicas. Los falsos positivos resultan de la confusión de linfocitos atípicos como los reactivos; sin embargo, son infrecuentes y en general son referidos como atípicos y sospechosos.<sup>12</sup>

En la práctica clínica actual, la determinación del inmunofenotipo por citometría de flujo se acepta como un valioso complemento a los métodos clásicos en el diagnóstico de las leucemias y constituyen un estándar en la evaluación de sangre y médula ósea; sin embargo, no se aplica a la evaluación del LCR de forma rutinaria en todos los centros especializados de tratamiento.

### **1.3 Citometría de Flujo**

La citometría de flujo es una técnica de análisis celular que implica medir las características de dispersión de luz y fluorescencia que poseen las células conforme se les hace pasar a través de un rayo de luz. Para su análisis, las células deben encontrarse individualmente en suspensión en un fluido. Al atravesar el rayo de luz, las células interaccionan con éste causando dispersión de la misma, basándose en la difracción de la luz en sentido frontal se puede evaluar el tamaño de las células que pasan y al medir la reflexión de la luz de manera lateral se evalúa la granularidad o complejidad de las células. 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

puede evaluar qué células poseen los antígenos complementarios a los anticuerpos monoclonales usados, esto debido a moléculas de diferenciación presentes en la superficie de los leucocitos y otras células que reflejan su estirpe celular y su grado de diferenciación.

Algunas de las moléculas de los anticuerpos monoclonales (CD) son particulares de ciertas líneas celulares, mientras que otras son compartidas por varias células. En la actualidad sabemos que no es fácil identificar subpoblaciones de linfocitos con base en su morfología macroscópica, pero se sabe que existen subpoblaciones de células que son distinguibles entre sí por los marcadores que expresan en su membrana nuclear, en el citoplasma y en la membrana celular. En forma global hay dos subpoblaciones de linfocitos, los linfocitos T y los linfocitos B, que difieren en sus funciones y productos proteicos, a pesar de que morfológicamente sean similares.<sup>17</sup>

Se conoce ya bien el desarrollo del linfocito, el grupo que se encuentra en fase G0 o de reposo del ciclo celular; cuando existe un estímulo antigénico, los linfocitos entran a la fase G1 del ciclo celular, aumentan de tamaño y toman el nombre de linfoblastos. La progresión a la fase S del ciclo celular continúa y los linfoblastos activados se dividen. Esta secuencia de acontecimientos se llama “transformación blástica”.<sup>18</sup> El uso de distintas moléculas fluorescentes (distintos colores de fluorescencia) permite analizar la presencia de varios marcadores de manera simultánea. Los citómetros de flujo pueden analizar partículas en función de su fluorescencia y tamaño, pueden también purificar poblaciones de características determinadas.

La citometría de flujo es un método objetivo y cuantitativo que permite identificar pequeñas poblaciones celulares con fenotipos identificados; metodológicamente la citometría puede detectar células que constituyen hasta 0.01% del total de la población linfocitaria, lo que supera a la examinación citológica del LCR, el estándar de oro, la cual tiene baja sensibilidad, con una tasa de falsos negativos de 20 a 60%.<sup>19, 20</sup> Esto debe tenerse en cuenta al examinar los leucocitos en el SNC ya que su cifra es baja en el LCR y en el parénquima cerebral, aún en condiciones normales, y son dependientes de la tasa de flujo del LCR.<sup>21, 22, 23</sup>

En un estudio para evaluar el valor del inmunofenotipo mediante citometría de flujo para detectar enfermedad en LCR en pacientes con linfomas contra la citomorfología, se encontró que la citometría de flujo fue capaz de detectar poblaciones anormales en 11 de 42 pacientes (26%) contra 4 de 42 (9.5%) en la citomorfología. La diferencia entre el porcentaje de casos positivos por citometría de flujo y morfología

convencional fue estadísticamente significativa ( $X^2 = 3.97$ ;  $p = 0.046$ ). Concluyendo que la citometría de flujo puede ofrecer un método único y no subjetivo para evidenciar infiltración a SNC, esto sumado a la citomorfología convencional.<sup>12</sup>

Homans y colaboradores estudiaron el inmunofenotipo del LCR en niños con LAL y un grupo control. Se obtuvieron 61 muestras de LCR en pacientes con LAL (excluyéndose 18 por contaminación y 10 por número insuficiente de células viables). Se analizaron 33 muestras, de las cuales 6 mostraron anomalías: 3 diagnósticas y 3 sospechosas y 27 sin alteraciones citomorfológicas identificables. El grupo control incluyó 104 niños. El inmunofenotipo en el grupo control mostró que la mayoría (73%) de los linfocitos en LCR fue positiva para CD2. En las muestras de niños con LAL existió una disminución ligera (62%) pero significativa del porcentaje de linfocitos con expresión de CD2 (62 vs 73%,  $p = 0.05$  en controles). El porcentaje de células CD10 positivo fue de 50 a 88% en las tres muestras diagnósticas de infiltración a sistema nervioso central, contra 4 a 9% en los pacientes con LCRs sospechosos. Los pacientes con citología normal mostraron también un incremento en el porcentaje de células CD10 positivas (5.4%). Cuando se comparó la diferencia entre las medias de positividad de CD10 entre los pacientes con citología normal al diagnóstico y el grupo control, existió significancia ( $p = 0.001$ ).

En este estudio se definió anormalidad como una muestra que contenía células CD10 positivas dos desviaciones estándar por arriba de lo normal ( $> 3\%$  de células CD10 positivas por muestra). Empleando este criterio, 9 de 27 niños con LAL con LCR normal al diagnóstico tuvieron inmunofenotipos anormales contra 4 de 104 pacientes en el grupo control ( $p = 0.001$   $x^2$ ). Estos resultados pueden ser alterados por células neurales que expresan CD10 o por la absorción de CD10 por los linfocitos normales; para evitar eso, se estudió la presencia de CD10 y TdT nuclear. En 15 pacientes con LCR normal, se obtuvo que la media de células TdT positivas fue 7.2% vs 0.8%, las células que expresaban simultáneamente CD10 y TdT fueron 6% versus 0.05% en 28 niños del grupo control ( $p=.04$ )<sup>24</sup>

Existen diversos estudios que han tratado de comparar el valor diagnóstico del inmunofenotipo por medio de la citometría de flujo y la citomorfología en la detección de infiltración a sistema nervioso central en neoplasias hematológicas en forma retrospectiva para ver también el desenlace, en uno de ellos se estudiaron 219 muestras de LCR

evaluadas al momento del diagnóstico. Existieron 48 pacientes que tuvieron LCR positivo por cualquier técnica: 19 (32%) por citomorfología, 44 (73%) por citometría de flujo y 15 (25%) por ambos métodos. Cuatro pacientes que tuvieron citomorfología positiva y citometría de flujo negativa, fueron evaluados teniendo 2 de ellos progresión de la enfermedad y muerte. En el grupo de los 24 pacientes que tuvieron citometría de flujo positiva y citomorfología negativa, 10 de ellos tuvieron enfermedad recurrente o progresiva. Cuando se evaluó la presencia de células sospechosas, en 16 pacientes la citomorfología fue sospechosa y de ellos 4 murieron de progresión de la enfermedad: uno en SNC y 3 con diseminación sistémica. Cuando se evaluaron las recurrencias en 12 pacientes con un tiempo medio de seguimiento de 144 días (30 – 322), todos ellos tuvieron una citometría de flujo positiva, 4 con citomorfología positiva, 4 dudosas y 4 negativas. La sensibilidad de la citometría de flujo fue de 78% y la especificidad de 84%.<sup>25</sup>

El empleo del inmunofenotipo mediante anticuerpos monoclonales diversos dirigidos contra antígenos de los linfocitos T y B es capaz de detectar células neoplásicas que pueden constituir 0.2% del total de la población celular linfoide en SNC. El inmunofenotipo tiene una sensibilidad de 46 a 89% en LAL, y su valor diagnóstico en LCR es más de 2 veces el de la citomorfología.<sup>25, 26, 27</sup>

Uno de los problemas principales de la citomorfología es la variabilidad interobservador e intraobservador que puede existir, y que esta puede ser condicionada por la experiencia de los observadores y de las características del LCR a evaluar ya que sabemos que en forma normal en el SNC existen leucocitos circulantes y que las subpoblaciones de ellos varían en número de acuerdo a variables como pueden ser la edad, la hora en que estos son obtenidos para su estudio.

La sensibilidad de la citomorfología es de 0.27 contra 0.58 de la PCR de inmunoglobulinas, y la especificidad es de 1 para la citomorfología y de 0.85 para la PCR; cuando se comparan con la citometría de flujo ésta tiene una sensibilidad de 0.1 y una especificidad de 0.95. El empleo de las tres pruebas en forma conjunta mejora la sensibilidad a 0.67.<sup>30</sup>

<b>Método</b>	<b>Sensibilidad</b>	<b>Especificidad</b>
<b>Citomorfoloía</b>	0.27	1
<b>Inmunofenotipo</b>	0.49-0.89	0.95
<b>PCR</b>	0.58	0.85

Tomando en cuenta la literatura previa y debido a los diversos resultados reportados en pacientes con neoplasias hematológicas y a la importancia que tiene la adecuada clasificación de los pacientes con LAL para lograr mejores tasas de éxito, nosotros decidimos realizar el estudio del inmunofenotipo por medio de la citometría de flujo que es una técnica que puede ser empleada en forma rápida y en conjunto con la citomorfoloía para tratar de clasificar en una mejor forma o con mayor precisión la presencia de células malignas en el LCR. Tomamos como consideraciones de importancia los siguientes puntos: la expresión de los marcadores de subpoblaciones de linfocitos es superior en cuanto a la sensibilidad en la mayoría de los estudios en lo que se refiere al inmunofenotipo, en aquellos casos en los que la presencia de células de características anormales identificadas como dudosas nos permitiría clasificar correctamente a los pacientes. Creemos que es necesario disponer de herramientas que nos permitan aumentar la precisión diagnóstica.

## **II. JUSTIFICACIÓN**

La LAL es la neoplasia más frecuente en pediatría, el tratamiento con protocolos dirigidos al riesgo permite la curación del 90% o más de los niños en la actualidad. La infiltración al SNC tiene implicación pronóstica y terapéutica.

El Hospital Infantil de México Federico Gómez es un instituto nacional de salud y un centro de referencia para la atención de enfermedades oncológicas en pacientes pediátricos. El manejo de los pacientes con cáncer en este hospital inicio en 1947 con antifolatos, medidas de soporte como terapia transfusional y manejo de infecciones , es en el año 1951 cuando se crea un servicio en forma de quimioterapia y en 1954 el servicio de radioterapia con lo que se inicia el tratamiento integral del paciente con cáncer, en 1992 se crea el servicio de quimioterapia ambulatoria, a partir de este momento hasta aproximadamente el año 2005 cuando se crea el fondo de gastos catastróficos del seguro popular en el hospital se atienden al año aproximadamente 400 niños con cáncer de los cuales 25-30% son niños

afectados por Leucemias Agudas. Se tratan aproximadamente entre 80-120 pacientes con Leucemia Aguda Linfoblástica por año siendo esta cifra variable dado que se tienen cada vez mas centros acreditados para el tratamiento de neoplasias en los estados que se encuentran cercanos al Distrito Federal.

Los pacientes que son tratados en nuestro hospital se clasifican de acuerdo a los criterios internacionales establecidos para el diagnostico de LAL. Cuando nosotros evaluamos la incidencia de LCRs en este grupo de pacientes encontramos que nuestro porcentaje de infiltración al SNC es mayor que la que se reporta en los grupos internacionales. Además en un intento por conocer las características de los LCRs en la población que es tratada se evaluó en el periodo de 2006-2008 en el Hospital Infantil de México Federico Gómez un total de 3209 LCRs de niños con LAL de los cuales 166 fueron positivos para infiltración por LAL (4.7%), 3043 fueron negativos y dentro de este grupo 974 punciones lumbares fueron clasificadas como traumáticas sin presencia de blastos, solo 5 se clasificaron como dudosas.

Con estos puntos previos y conociendo que el SNC es un sitio santuario denominado así por la pobre capacidad que tiene la quimioterapia para penetrar la barrera hematoencefálica y que tenemos estrategias que nos permiten lograr concentraciones terapéuticas en dicho sitio como son: las altas dosis de fármacos como el metotrexate y el arabinósido de citosina, el empleo de la quimioterapia intratecal y en ocasiones la radioterapia a sistema nervioso central que puede ser profiláctica o de tratamiento es importante disponer de nuevas herramientas diagnósticas que nos permitan definir en forma adecuada el estado del SNC ya que es bien conocido que aunque menos del 5% de los pacientes tiene infiltración al SNC, más del 50% recaería si no se administrará tratamiento profiláctico.

Con los protocolos actuales de tratamiento en los cuales la profilaxis a SNC está bien establecida, la incidencia de recaída a SNC ha disminuido a menos del 6%; sin embargo, la recaída a SNC continúa siendo un obstáculo importante para la curación definitiva de la LAL ya que por historia natural de la enfermedad se sabe que la recaída a SNC durante el tratamiento o posterior al termino precede a la recaída a medula ósea que conlleva a un pronostico desfavorable condicionado por una menor posibilidad de curación.

En nuestro hospital tenemos recaídas a SNC entre 10-15% lo cual es superior a lo reportado en la literatura, esto mencionándolo solo en un

plano descriptivo ya que no se tiene un análisis de los factores que han condicionado estos eventos, esto es un punto mas por el que nosotros queremos tener nuevas herramientas diagnosticas para una clasificación correcta de nuestros pacientes y para documentar en forma precisa los eventos considerados recaídas.

A pesar de que existen diversos métodos para el estudio de infiltración a SNC, el estudio de LCR en una muestra citocentrifugada por examen microscópico de luz continúa siendo el método estándar. El estudio citológico de LCR se considera el estándar de oro, sin embargo falsos positivos y falsos negativos pueden ocurrir de acuerdo a los criterios empleados en cada centro de tratamiento a pesar de tenerse una clasificación para el mismo, este estándar puede fallar cuando se tienen cifras bajas de leucocitos y tiene el inconveniente de no poder definir en algunas situaciones a la población celular referida como atípica o sospechosa de acuerdo a la morfología observada. Es decir se trata de un estándar imperfecto.

En los últimos años la citometría de flujo y el diagnóstico molecular ha tenido un papel que va en incremento en relación a la detección de clonas celulares que pueden no ser identificadas por el estándar de oro. En el caso de la citometría, permite identificar poblaciones celulares muy reducidas en cuanto al número (0.2%) de linfocitos en LCR, lo cual supera a la citomorfología; por otro lado, la PCR tiene la ventaja que no requerir una población celular intacta para poder ser empleada.

El motivo de este estudio es mejorar la precisión diagnóstica ya que esto nos permite tener una terapia dirigida contra el SNC más apropiada, pues el subestadificar al paciente implicaría una recaída a SNC con el subsecuente riesgo de recaída a medula ósea en el caso contrario el sobrestadificar a los pacientes implicaría una terapia más agresiva como es el empleo de radioterapia a SNC la cual conlleva un mayor costo y secuelas graves como segundas neoplasias, endocrinopatías y defectos neurocognitivos en quien la recibe.

### **III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Evaluar la validez del inmunofenotipo por citometría de flujo comparado con la citología clásica como prueba diagnóstica de infiltración a SNC en LAL.

### **IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Es la determinación del inmunofenotipo en LCR de niños con LAL una prueba diagnóstica útil para detectar infiltración SNC?

### **V. OBJETIVOS**

#### **OBJETIVO GENERAL:**

Evaluar la utilidad diagnóstica del inmunofenotipo en el LCR en una cohorte de niños con LAL.

### **VI. HIPÓTESIS**

La determinación del inmunofenotipo es una herramienta diagnóstica útil para detectar casos de infiltración a SNC en pacientes con LAL.

## **VII. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **7.1 Diseño del estudio y selección de pacientes.**

El estudio de prueba diagnóstica (transversal comparativo) se llevó a cabo a partir de marzo de 2010 a enero del 2012 en el Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG). Se incluyeron un total de 125 muestras de LCR de pacientes con LAL, menores de 18 años. Se informó a los padres y/o tutores de los pacientes candidatos a participar en el protocolo sobre el mismo y aquellos que aceptaron participar fueron incluidos.

El protocolo fue revisado y aceptado por el Comité de Investigación del HIMFG (Registro protocolo HIM 2010/034) y se obtuvo el consentimiento informado de cada uno de los responsables de los pacientes incluidos en el estudio y el asentimiento de los niños que requirieran explicación para participar en el estudio.

### **7.2 Sitio del estudio:**

Hospital Infantil de México Federico Gómez. Distrito Federal, México.

**POBLACIÓN OBJETIVO:** Pacientes pediátricos con diagnóstico de LAL.

**POBLACIÓN ELEGIBLE:** Pacientes que acudieron al HIMFG a partir de Marzo del 2010.

### **7.3 Criterios de Inclusión:**

- Pacientes diagnosticados de LAL en el periodo de marzo de 2010 a enero de 2012.

- Pacientes sin tratamiento previo con quimioterapia, radioterapia o ambos.
- Pacientes menores de 18 años.
- Pacientes que aceptaron participar en el estudio.

### **7.3 Criterios de exclusión:**

- Muestra de LCR hemorrágico que contenga más de un eritrocito por 100 en campo de alto poder en el estudio citomorfológico mediante preparación con citocentrífuga.

### **7.4 Definición de variables:**

LEUCEMIA AGUDA LINFOBLASTICA (LAL): presencia de más de 25% de blastos linfoides en una muestra de aspirado de médula ósea al momento del diagnóstico.

ESTADO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL: Sistema de clasificación empleado para definir la presencia o ausencia de leucemia en el sistema nervioso central y que tiene implicación en el tratamiento y pronóstico, se definen 3 estados.

SNC1: LCR que resulta negativo para la presencia de blastos en la citocentrífuga, independientemente del recuento de glóbulos blancos.

SNC2: LCR con menos de 5 glóbulos blancos/ $\mu$ l y citocentrífuga positiva para blastos.

SNC3: LCR con 5 o más glóbulos blancos/ $\mu$ l y citocentrífuga positiva para blastos.

LIQUIDO CEFALORRAQUÍDEO POSITIVO: Todos los líquidos cefalorraquídeos clasificados como SNC3.

LIQUIDO CEFALORRAQUÍDEO NEGATIVO: Todos los líquidos cefalorraquídeos clasificados como SNC1 y SNC2.

INMUNOFENOTIPO POSITIVO EN LCR: Todos los LCRs que en el estudio de inmunofenotipo expresen 3% o más de CD10, TdT o ambos en la población celular.

INMUNOFENOTIPO NEGATIVO EN LCR: Todos los LCRs que en el estudio de inmunofenotipo expresen menos de 3% de CD10, TdT o ambos en la población celular.

## **VIII. CÁLCULO DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA**

Muestreo no probabilístico de casos consecutivos.

## **IX. METODOLOGÍA**

**PROCEDIMIENTO PARA LA TOMA DE LCR:** La muestra del LCR se tomó en el momento de realizar los estudios para integrar el diagnóstico, se tomaron 3 muestras en el momento de realizar la punción lumbar diagnóstica, cada una de al menos 1 ml para estudios de citomorfología, inmunofenotipo mediante citometría de flujo. La toma de la muestra de LCR no implicó ninguna maniobra invasiva adicional para los pacientes. La cantidad de LCR utilizada (1 ml) no representa ningún riesgo adicional severo para el paciente. En ningún caso se puncionó al paciente exclusivamente con el fin de tomar la muestra para el estudio y tampoco si la realización de la punción lumbar repercutiría en su estado de salud.

Se tomó una muestra de LCR para el estudio citológico y 2 muestras de al menos 1 ml cada una para el análisis del inmunofenotipo por citometría de flujo y del rearreglo del gen de la cadena pesada por PCR. Todas las muestras se obtuvieron mediante punción lumbar con aguja espinal tipo Quincke, No. 22 Ga 3 ½", en los quirófanos de medicina ambulatoria y general, bajo anestesia general inhalatoria o endovenosa de acuerdo a la decisión del médico anesthesiólogo a cargo de la sala en la que se realizó el procedimiento.

El estudio del inmunofenotipo en LCR fue cegado al estudio por microscopía de luz (citomorfología).

Se asignó un número consecutivo cronológico a cada paciente y sus LCRs.

Se evaluaron los LCRs de los niños con diagnóstico de LAL mediante la determinación del inmunofenotipo y del rearreglo del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas.

**ESTUDIO DE CITOMORFOLOGIA:** se realizó en el laboratorio de Oncología del HIM Federico Gómez, se realiza por dos observadores expertos en este método de en forma independiente.

**CITOMETRÍA DE FLUJO:** El estudio de citometría de flujo se realizó en el laboratorio central del Hospital Infantil de México Federico Gómez empleando el citómetro de flujo FACS Calibur para análisis de 6 subpoblaciones celulares, con 6 parámetros de lectura simultáneo, en donde 4 de estos son parámetros de fluorescencia (FL1, FL2, FL3, FL4).

Sistema de electrónica y óptica para capacidad de una cuarta fluorescencia FL4: Incluye un segundo laser diodo de emisión roja de 635 nm.

Módulo de discriminación de dobletes capaz de medir altura, ancho y áreas de las células en cualquiera de los parámetros de fluorescencia (FL1, FL2, FL3, FL4).

Una caja de perlas para calibración del Instrumento (CaliBRITE Beads) para inmunotipificación y una caja de perlas para calibración del Instrumento (DNA QC Particles).

Estación de Trabajo para FACS Calibur – FAC Station.

Computadora Power Macintosh G3: CPU Power PC 750 a 300 Mhz 64 MB memoria DRAM, 2 MB VRAM, 512L level 2 cache, disco duro de 4.0 GB y manejador interno de CD ROM 12x, Ethernet interconstruido y Thin-Coax Tranceiver, Monitor a color Multisynch de 17", impresora a color, módem interno de 56 K.

La cuantificación de células en LCR mediante citometría de flujo se realizó de la siguiente manera: se rotularon 6 tubos de polipropileno de fondo redondo de 5 ml con tapón con los nombres de los anticuerpos monoclonales y el fluorocromo correspondiente: isotiocianato de fluoresceína (FITC) y ficoeritrina (FE) , se pipetearon 20 microlitros del anticuerpo monoclonal correspondiente a cada tubo (CD45 FITC/CD34 PE ; CD3 FITC/CD34 PE; CD3 FITC/CD33 PE; CD19 FITC/ CD10 PE, CD4 FITC/CD8 PE; ANTI TdT FITC ( BD biosciences, San José, CA 9531,USA) a excepción del tubo No. 6; se añadieron 100 microlitros de LCR a cada uno de los tubos, se colocó tapón a cada uno de ellos y se mezclaron en el vortex. Posteriormente se centrifugaron a 1,500 revoluciones por minuto (rpm) en centrifugador, se decantaron los tubos

y se agregaron 500 microlitros de solución de Paraformaldehído al 1%. Al tubo número 6 se le agregaron 500 microlitros de solución permeabilizante y 100 microlitros de LCR, se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos, se agregaron 2 ml de buffer de fosfatos y se centrifugó a 1,500 rpm; se agregaron 20 microlitros de anticuerpo monoclonal anti TdT, se incubó durante 30 minutos en refrigeración y en oscuridad, posteriormente se agregaron 20 ml de buffer de fosfatos y se mezcló en el vortex, se centrifugó durante 5 minutos a 1,500 rpm, se decantó el tubo y se agregaron 500 microlitros de paraformaldehído al 1%. Finalmente se analizaron las muestras en el citómetro de flujo FACSCalibur de 4 colores. El análisis de los datos se realizó mediante el empleo de una grafica que nos permitió interpretar el patrón de distribución de los eventos identificándolos como parte de una población, los eventos se expresan como porcentajes de subpoblaciones identificadas.

**ÉTICA:** Se solicitó el consentimiento y/o asentimiento informado a los padres y/o tutores de los niños que se incluyeron en el estudio ya que se trata de la toma de una muestra de tejido para realizar la prueba. (Anexos 2 y 3)

El presente estudio cumple con lo estipulado en artículo 17, título segundo del Reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud. Según esta ley vigente, el estudio corresponde a la categoría III (Investigación con Riesgo Mayor que el Mínimo) ya que se realiza un procedimiento quirúrgico. Además este estudio fue evaluado por el comité de ética del Hospital Infantil de México Federico Gómez. A los pacientes y familiares se les explicó las características y objetivos del estudio con la finalidad de obtener su consentimiento informado. La información obtenida de los pacientes durante el estudio se mantuvo con estricta confidencialidad por los investigadores participantes.

## X. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para las variables cuantitativas de tipo continuas: número de leucocitos en el LCR por citología, porcentaje de células Cd10 y TdT se realizó el cálculo de la media de la muestra. Se evaluó la validez, la reproducibilidad y la seguridad de las pruebas, dado que los resultados fueron dicotómicos se clasificó a los pacientes en 4 grupos en una tabla de 2 x 2. El resultado de la prueba puede ser correcto (verdadero positivo y verdadero negativo) o incorrecto (falso positivo y falso negativo)

El análisis de la validez de la prueba se realizó calculando los valores de sensibilidad y especificidad de la prueba.

La sensibilidad es la capacidad de la prueba para detectar la enfermedad se calculó empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN}$$

La especificidad es la capacidad de la prueba para detectar a los sanos se calculó empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN + FP}$$

<b>Tabla 1. Relación entre el resultado de una prueba diagnóstica y la presencia o ausencia de una enfermedad.</b>		
<b>Resultado de la prueba</b>	<b>Verdadero diagnóstico</b>	
	<b>Enfermo</b>	<b>Sano</b>
<b>Positivo</b>	Verdaderos Positivos (VP)	Falsos Positivos (FP)
<b>Negativo</b>	Falsos Negativos (FN)	Verdaderos Negativos (VN)

La seguridad de la prueba se determinó mediante el cálculo de los valores predictivos positivo y negativo

El valor predictivo positivo (VPP) definido como la probabilidad de padecer la enfermedad si se obtiene un resultado positivo en la prueba, se estimó mediante la siguiente fórmula:

$$VPP = VP / (VP + FP)$$

El valor predictivo negativo (VPN) se definió como la probabilidad de que un sujeto con un resultado negativo de la prueba este realmente sano, se calculó mediante la fórmula:

$$VPN = VN / (FN + VN)$$

Se evaluaron los cocientes de probabilidad o razones de verosimilitud positivo y negativo mediante las siguientes formulas:

$$RV \text{ positivo} = \text{Sensibilidad} / (1 - \text{especificidad})$$

$$RV \text{ negativo} = (1 - \text{sensibilidad}) / \text{especificidad}$$

Se realizó el cálculo del índice de concordancia de kappa para evaluar la variabilidad intraobservador e interobservador en el estudio citomorfológico de LCR.

## **XI. RESULTADOS**

En el estudio se incluyeron 72 niños y 53 niñas, con edades comprendidas entre los 0 y 17 años, la edad media al momento del diagnóstico fue de 7.4 años, se clasificaron de acuerdo a los criterios de Roma al diagnóstico en 30 de alto riesgo y 95 de riesgo habitual. De los 125 LCRs de niños con LAL, 4 fueron (3.2%) LCRs hemorrágicos los cuales se excluyeron del análisis, 10(8%) se excluyeron por no realizarse la evaluación en el tiempo establecido. Se analizaron en total 111 LCRs. (figura 1).

De los 111 LCRs incluidos para evaluación por citomorfología 85 LCRs se clasificaron como negativos (76.5%) de los cuales 3 fueron SNC2 y 82 SNC1, 26 líquidos fueron clasificados como positivos, SNC3 (23.5%). Tabla 2.

El número de leucocitos en el LCR fue de 2 a 25/  $\mu$ l con una media de 9.24 leucocitos/  $\mu$ l.

De los pacientes con LCR positivo por la citomorfología, 3 (11.5%) tuvieron síntomas sugestivos de infiltración a SNC, cuando esto se aplica a la población total estudiada n = 125, el porcentaje es de 2.4%.

El inmunofenotipo fue positivo en 31 pacientes; la expresión de CD10 fue considerada positiva en 16 pacientes, con una media de expresión de CD10 de 15.44%, el TdT se expresó en 16 LCRs con una media de expresión de TdT fue de 5.80% en 14 LCRs se expresaron CD10 y TdT.

Figura 1: Diagrama de flujo del estudio

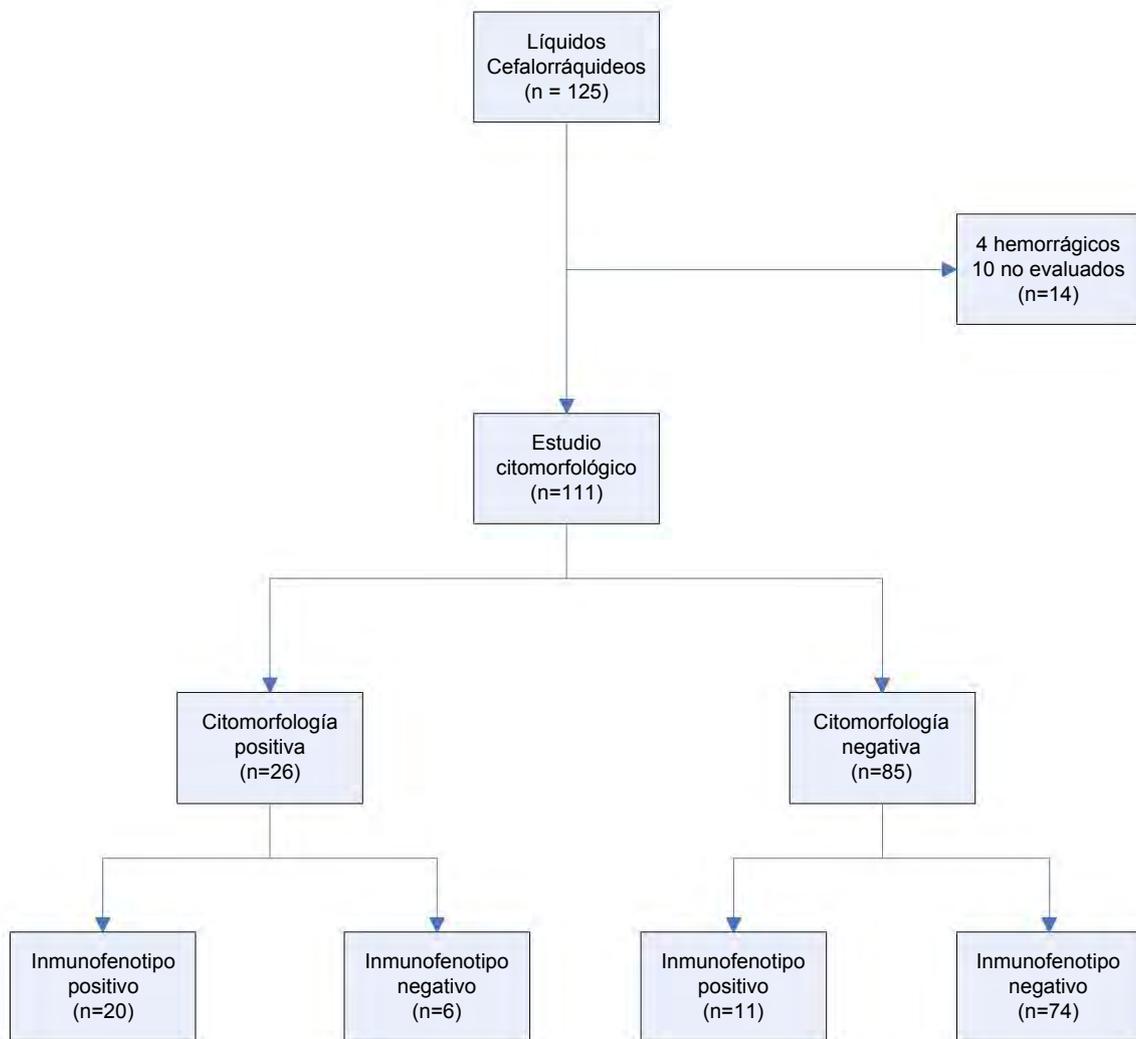


Tabla 2.- Líquidos cefalorraquídeos positivos para infiltración por estudio de citomorfología en pacientes con Leucemia Aguda Linfoblástica.

Estado	Leucocitos/microlitro	% CD 10	% TdT	Síntomas
SNC3	10	12.78	5.93	
SNC3	7	1.23	1.15	
SNC3	25	70.07	28.39	
SNC3	6	4.99	0.66	
SNC3	12	29.63	4.71	
SNC3	8	0.68	4.06	
SNC3	8	1.15	0.09	
SNC3	10	56.08	0.77	
SNC3	20	59.58	1.92	
SNC3	8	0.5	1	
SNC3	8	6.47	7.89	
SNC3	5	0.25	0.26	
SNC3	17	37.32	9.59	
SNC3	18	80.95	0.56	*
SNC3	16	29.42	17.27	
SNC3	14	1.14	4.58	
SNC3	6	0.48	9.60	
SNC3	24	0.23	1.34	*
SNC3	8	1.12	1.24	*
SNC3	7	14.78	7.93	
SNC3	7	11.23	8.15	
SNC3	16	40.07	26	
SNC3	9	8.12	5.66	
SNC3	20	25.63	14.35	
SNC3	8	4.68	7.03	
SNC3	8	2.05	1.12	

Tabla 3. Líquidos cefalorraquídeos negativos por citomorfología y con Inmunofenotipo positivo en el estudio

Estado	Leucocitos/microlitro	% CD10	% TdT	Sintomas
SNC1	6	16.40	0	
SNC1	2	2.06	8.05	
SNC1	3	7.34	1.92	
SNC1	3	2.31	4.61	
SNC1	4	4.99	1.78	
SNC1	3	6.50	2.18	
SNC1	4	1.83	4.91	
SNC1	3	0	3.81	
SNC2	2	16.04	4.19	
SNC2	3	12.77	4.04	
SNC2	4	0.39	9.09	

Tabla 4. - Detección de infiltración a SNC por citometría de flujo en comparación con estudio citológico.

		CITOMORFOLOGÍA		
		Positiva	Negativa	Total
INMUNOFENOTIPO	Positivo	20	11	31
	Negativo	6	74	80
	Total	26	85	111

Tabla 5: Resultados de la prueba diagnóstica relacionada con el inmunofenotipo.

	<b>Valor</b>	<b>IC (95%)</b>
<b>Sensibilidad</b>	76.92	58.81 – 95.04
<b>Especificidad</b>	87.06	79.33 – 94.78
<b>Índice de Validez</b>	84.68	77.53 – 91.83
<b>Valor predictivo positivo</b>	64.52	46.06 – 82.97
<b>Valor predictivo negativo</b>	92.50	86.10 – 98.90
<b>Prevalencia</b>	23.42	15.09 – 31.75
<b>Índice de Youden</b>	0.64	0.46 – 0.82
<b>Razón de verosimilitud positiva</b>	5.94	3.29 – 10.73
<b>Razón de verosimilitud negativa</b>	0.27	0.13 – 0.54

Para validar los resultados de la citología referidos se realizó un análisis interobservador el cual fue de 0.8466 (IC 95% 0.5526-1.0) y para el análisis intraobservador fue de 0.8780 (IC 95% 0.6432-1.0)

La sensibilidad y especificidad fueron de 76.92 y 87.06 respectivamente, el valor predictivo positivo fue de 64.52 y el valor predictivo negativo de 92.50, la razón de verosimilitud positiva fue de 5.94 y la negativa de 0.27 (Tabla 5).

## **XII. DISCUSION**

La infiltración del sistema nervioso central en los pacientes con LAL continúa siendo un reto para el diagnóstico y el tratamiento de los pacientes, ya que sabemos que es un sitio en el cual la población celular se encuentra expuesta en menor concentración a los fármacos empleados para el tratamiento y que a pesar de que la terapia dirigida al SNC ha logrado disminuir el número de recaídas a este sitio santuario, aún tenemos el problema de no contar con un método exacto, que permita la detección de células leucémicas cuando se realiza la evaluación diagnóstica inicial debido a diversos factores, entre ellos uno se relaciona con la prueba diagnóstica que se emplea para la estadificación, ya que aunque se trata de un estudio histológico se incluye dentro de las pruebas diagnósticas imperfectas.

Cuando hablamos de la infiltración del sistema nervioso central por LAL existe falta de patrones objetivos de la enfermedad en la mayoría de los pacientes que la tienen, ya que la sintomatología es inespecífica y solo se presenta en menos del 5% de los pacientes y sus manifestaciones mayormente referidas son la cefalea, náuseas, vómito, parálisis facial, crisis convulsivas.

Dadas estas dificultades no es sorprendente que una pérdida de consenso sobre la definición de Leucemia en el SNC y la proporción de pacientes con enfermedad en el SNC al momento del diagnóstico varíe de 1 a 15% en los estudios, dependiendo de los criterios de valoración empleados.

Debido a la significancia pronóstica y terapéutica atribuida al involucro inicial de LAL en el SNC, es de suma importancia que seamos capaces de identificar con precisión el escaso número de células en el LCR. A pesar de que hay estudios que han demostrado la utilidad de examinar muestras de LCR para determinar las características citoquímicas o de los antígenos de superficie para detectar en forma temprana recaídas a SNC, no hay estándares absolutos para el diagnóstico de infiltración a SNC y todos los métodos convencionalmente aplicados tienen problemas asociados. La citología puede tener problemas como son la pobre fijación de células, los artificios y la consideración morfológica atípica como evidencia no concluyente para malignidad que otros pueden interpretar como positiva.

De los resultados obtenidos el más importante es la presencia de casos positivos por inmunofenotipo que por el estándar de oro esto es un punto

importante en cuanto a la prueba diagnóstica ya que la sensibilidad de la prueba es más alta que la referida en la literatura con respecto al estándar de oro. En nuestro estudio 26 casos tienen la enfermedad según el estándar de oro y en este grupo hay 6 casos que fueron negativos por inmunofenotipo por citometría de flujo; a la inversa, existieron 11 casos en los que el LCR fue negativo pero que tienen positividad para CD10 o TdT, lo cual nos indica que la citología sola puede no evaluar en forma adecuada la infiltración por LAL en el SNC.

Algunos estudios han comprobado la superioridad del inmunofenotipo mediante la citometría de flujo para la detección de células anormales que se encuentran en el SNC comparado con la citomorfología, nuestros resultados coinciden con ellos, con una sensibilidad de la prueba de 76.92; comparado con otros estudios, la sensibilidad por citometría de flujo se encuentra entre 0.27 y 0.78. Teniendo en consideración los resultados de la literatura y los nuestros, consideramos que el estudio del inmunofenotipo en LCR es una herramienta que debe de considerarse en la evaluación del SNC en pacientes con LAL. Debido a su capacidad de explorar poblaciones celulares a un nivel específico, puede ofrecernos un método objetivo y único ya que nos permite combinar diferentes inmunofenotipos; así también es un método simple, rápido y seguro, los resultados pueden disponerse en un lapso menor a las 3 horas y nos puede ayudar a mejorar la estratificación pronóstica, pudiendo incluso ser un factor que nos permita reducir costos ya que el estimado en cuanto a la prueba en estudio oscila entre 1200-1500 pesos el cual si lo comparamos con aquellos casos en los que el estándar de oro clasifica como enfermo al paciente el tratamiento se incrementa en los riesgos a los que el paciente se somete como son mayor número de quimioterapias intratecales lo cual requiere el empleo de un quirófano, personal médico y no médico así como los fármacos que se administran y la radioterapia al sistema nervioso central cuyos costos estimados pueden variar entre 50,000 a 80,000 pesos, y obviamente toda la toxicidad crónica que puede dar el tratamiento como es el mayor riesgo de neoplasias del sistema nervioso central en la edad adulta.

Si consideramos los valores predictivos, que es lo fundamental que nosotros como médicos evaluamos para clasificar a los pacientes y en el caso de enfermedades que requieren tratamiento nos permite clasificar al enfermo en forma adecuada sabemos que estos resultados son dependientes de la prevalencia, que en nuestro caso, por tratarse de un centro de referencia para atención de neoplasias malignas en el niño esta será mayor que la frecuencia que se presente en otros hospitales que no son de concentración el valor predictivo negativo en nuestro

estudio fue de 92.50 lo que nos permite tener una mejor clasificación en aquellos pacientes en los cuales el líquido muestra presencia de células que son dudosas o clasificadas como positivas que dan lugar a estadificaciones erróneas. Finalmente al evaluar los cocientes de probabilidad o razones de verosimilitud nos permite responder a la pregunta de ¿cuántas veces más probable es que la prueba sea positiva en los enfermos que en los no enfermos? , lo calculado con los resultados de nuestro estudio fueron un cociente de probabilidad positivo de 5.94 el cual es aceptable ya que se estima que cuando los valores sean altos la prueba es buena y el cociente de probabilidad negativa es de 0.27 lo cual también apoya la prueba ya que los valores cercanos a cero.

Sin embargo considero que una de las principales debilidades que se encuentran en el estudio es que la población celular estudiada es muy amplia en cuanto a número y que los porcentajes del inmunofenotipo también lo son, no tratamos en este estudio evaluar puntos de corte ya que existen ya estudios previos que han fijado el porcentaje en 3% con relación a CD10 y TdT. Es necesario incluir pacientes con menor celularidad por el estudio citomorfológico ya que esto nos permitiría mejorar la evaluación de la prueba en estudio. Cuando se evaluó el LCR por medio de la prueba estándar de oro existieron en su mayoría una población celular incrementada que no implica problemas a la hora de la evaluación ya que la mayor parte de los casos en los cuales puede existir el problema en cuanto al diagnóstico es aquellos LCRs en los que las células son escasas.

### **XIII. CONCLUSIONES**

Es necesario incluir en la evaluación del LCR de los pacientes con LAL como una prueba en paralelo con el objeto de aumentar la sensibilidad y hacer una correcta evaluación del paciente.

En nuestro hospital que es un centro de referencia nacional en la cual se tratan pacientes de estas características y que además cuenta con la infraestructura debe de hacerse en forma rutinaria

En aquellos centros de tratamiento que no cuentan con la infraestructura necesaria es conveniente realizar esta prueba en los casos en los que se tengan líquidos cefalorraquídeos en los cuales exista la duda.

#### **XIV .- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Leukemias in: Lanzkowsky P. Manual of Pediatric Hematology and Oncology, 3<sup>rd</sup> edition. Academic 1999.
2. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. The morphological classification of acute lymphoblastic leukaemia: concordance among observers and clinical correlations. *Br J Haematol.* 1981; 47:553-61
3. Smith M, Arthur D, Camitta B, et al.: Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol.* 14 (1): 18-24, 1996.
4. Carroll WL, Bhojwani D, Min DJ, et al.: Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2003: 102-131.
5. Schultz KR, Pullen DJ, Sather HN, et al.: Risk- and response-based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a combined analysis of prognostic markers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children's Cancer Group (CCG). *Blood.* 109: 926-35, 2007.
6. Vrooman LM, Silverman LB: Childhood acute lymphoblastic leukemia: update on prognostic factors. *Curr Opin Pediatr.* 21 (1): 1-8, 2009.
7. Bürger B, Zimmermann M, Mann G, et al.: Diagnostic cerebrospinal fluid examination in children with acute lymphoblastic leukemia: significance of low leukocyte counts with blasts or traumatic lumbar puncture. *J Clin Oncol.* 2003; 21 (2): 184-8.
8. Pui CH, Campana D, Pei D, et al.: Treating childhood acute lymphoblastic leukemia without cranial irradiation. *N Engl J Med.* 2009; 360 (26): 2730-41.
9. Gajjar A, Harrison PL, Sandlund JT, et al.: Traumatic lumbar puncture at diagnosis adversely affects outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2000; 96 (10): 3381-4.
10. Cherlow JM, Sather H, Steinherz P, et al.: Craniospinal irradiation for acute lymphoblastic leukemia with central nervous system disease at diagnosis: a report from the Children's Cancer Group. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1996; 36 (1): 19-27.
11. Sayed D, Badrawy H, Ali AM, Shaker S. Immunophenotyping and immunoglobulin heavy chain gene rearrangement analysis in cerebrospinal fluid of pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res.* 2009; 33(5):655-61.
12. Di Noto R, Scalia G, Abate G, Gorrese M, Pascariello C, Raia M, Morabito P et al. Critical role of multidimensional flow cytometry in detecting occult leptomeningeal disease in newly diagnosed aggressive B-cell lymphomas. *Leukemia Research.* 2008; 32: 1196-1199.

13. Pui CH, Thiel E. Central nervous system disease in hematologic malignancies: historical perspective and practical applications. *Semin Oncol*, 2009 Aug; 36 (4 suppl 2): s2-s16.
14. Mahmoud HH; Rivera GK; Hancock ML; et al . Low leukocyte counts with blast cells in cerebrospinal fluid of children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*, 1993; 329:314-319.
15. Lauer S; Shuster J, Kirchner P, et al. Prognostic significance of cerebrospinal fluid (CSF) lymphoblast (LB) at diagnosis (dx) in children with acute lymphoblastic leukemia (ALL).*Proc ASCO*, 1994;13:317-9.
16. Roma AA, Garcia A, Avagnina A, Rescia C, Elsner B. Lymphoid and myeloid neoplasm involving cerebrospinal fluid :comparison of morphologic examination and immunophenotyping by flow cytometry. *Diagn Cytopathol*. 2002; 27:271-5.
17. Craig F, Foon K. Flow cytometric immunophenotypin for hematologic neoplasm. *Blood*. 2008; 111: 3941-3967.
18. Rojas EO. Inmunidad adquirida Del sistema linfoide. En Rojas EO *Inmunología (de memoria)*. México. Editorial Médica Panamericana. 2009. P 57-91.
19. Hedge U, Filie A, Little R, et al. High incidence of occult leptomeningeal disease detected by flow cytometry in newly diagnosed aggressive B-cell lymphomas at risk for central nervous system involvement: the role of flow cytometry versus cytology. *Blood*. 2005; 105: 496-502.
20. French CA, Dorfman DM, Shaheen G. Diagnosing lymphoproliferative disorders involving the cerebrospinal fluid: increased sensivity using flow cytometric analysis. *Diagn Cytopathol*. 2000; 23: 369-374.
21. Seabrook T, Johnston M, Hay J. Cerebral spinal fluid lymphocytes are part of the normal recirculating lymphocyte pool. *Journal of neuroimmunology*. 1998; 91:100-107.
22. Reiber H, Peter J. Cerebrospinal fluid analysis:disease-related data patterns and evaluation programs. *Journal of the neurological sciences*. 2001; 184: 101-122.
23. Jerrard D, Hanna J, Schindelheim G. Cerebrospinal fluid. *The Journal of emergency medicine*.2001; 21: 171-178.
24. Homans C, Barker B, Forman E, et al. Immunophenotypic characteristic of cerebrospinal fluid cells in children with acute lymphoblastic leukemia at diagnosis, *Blood*, 1990 ; 76:1807-11.
25. Bromberg JE, Breems D, Kraan J, et al. CSF flow cytometry greatly improves diagnostic accuracy in CNS hematologic malignacies. *Neurology*. 2007; 68: 1674-1679
26. Zeiser R, Burger JA, Bley TA, Windfuhr-Blum M, Schulte-Monting J, Behringer DM. Clinical followup indicates differential accuracy of magnetic resonance imaging and

immunocytology of the cerebral spinal fluid for the diagnosis of neoplastic meningitis - a single centre experience. *Br J Haematol* 2004;124: 762–768.

27. Pui Ch, Thiel E. Central nervous system disease in hematological malignancies: Historical perspective and practical application. *Semin Oncol*. 2009; 36:s2-s16.

## **XV. ANEXOS**

### **ANEXO 1.-**

#### **PROTOCOLO TRATAMIENTO INSTITUCIONAL PARA LAL HIM-2003**

##### **EVALUACIÓN INICIAL**

Exámenes de laboratorio

A todos los pacientes con sospecha de LLA se les deberá realizar:

- Biometría Hemática (**BH**) completa con revisión del frotis de sangre periférica que deberá ser archivado en el laboratorio de oncología.
- Química Sanguínea (**QS**): **glucosa sérica**, urea, creatinina, ácido úrico.
- Electrolitos Séricos (**ES**): sodio, potasio, calcio, **cloro**, fósforo, magnesio.
- Pruebas de Función Hepática (**PFH**): transaminasas (TGO, TGP), bilirrubinas, proteínas séricas.
- Pruebas de Coagulación: TP, TTP, **INR**.
- Otros: deshidrogenasa láctica, amilasa sérica, fosfatasa alcalina.

Estudios de gabinete.

- Radiografía de tórax en proyecciones postero-anterior (PA) y lateral.
- Ecocardiograma con determinación de fracción de eyección ventricular y fracción de acortamiento.
- Tomografía Computarizada (TC) de cráneo cuando exista sospecha de hipertensión o hemorragia intracraneanas o cuando se presenten crisis convulsivas.

Toma y procesamiento de las muestras de Médula ósea (**MO**): La punción de médula ósea deberá realizarse de acuerdo a la edad.

- Tuberosidad anterior de la tibia en menores de 3 meses.
- Cresta iliaca posterior: sitio de elección en la mayoría de los casos.

Tomar tres muestras con diferentes jeringas.

- La primera muestra debe ser de 0.2 a 0.3 ml. En todos los casos deberá teñirse con Wright, PAS.
- La segunda muestra se hará con jeringa de 10 ó 20 ml que contenga 1 ml de heparina y deberán aspirarse 5 ml. Esta muestra se empleará para determinar los marcadores de superficie mediante anticuerpos monoclonales conjugados con diferentes fluorocromos. El panel mínimo deberá incluir CD10, CD19, CD 20, CD 22, CD3, CD4, CD8, CD13, CD14, CD33, CD34, CD45, Cyt TdT y  $\kappa/\lambda$ .
- La obtención de la tercera muestra se hará con heparina de la misma forma que la anterior para estudio citogenético y molecular.

#### Punción Lumbar.

- Deberá realizarse en todos los casos en que se tenga la sospecha diagnóstica de LAL.
- Cuando se tenga certeza en el diagnóstico de LAL, podrá administrarse quimioterapia intratecal de acuerdo al esquema recomendado por edad (ver mas adelante)
- El líquido obtenido de la punción lumbar diagnóstica deberá procesarse para citoquímico y citocentrífuga (para definir el Estado del SNC); en punciones subsecuentes podrá procesarse únicamente para citocentrífuga, a menos que se demuestre la presencia de blastos.

El tratamiento se divide en fases que tienen objetivos precisos:

**Inducción a la Remisión:** es la fase inicial del tratamiento que tiene como objetivo reducir 100 a 1,000 veces (2 a 3 log) la carga leucémica, eliminando en lo posible las células con resistencia primaria. La remisión se ve reflejada en la desaparición clínica de enfermedad detectable, en la recuperación hematológica, en la disminución de los blastos en MO a menos de 5%, ausencia de blastos en el LCR y un nivel de enfermedad mínima residual detectable por PCR o citometría de flujo menor a  $10^{-5}$ . Lo anterior puede ser logrado en 98% de los casos empleando una combinación de 4 a 6 medicamentos en un programa intensivo durante las primeras 4-6 semana e incluye el uso de quimioterapia intratecal.

En este protocolo esta fase de tratamiento dura seis semanas. La primera semana incluye una ventana con esteroide que se emplea con el fin de evaluar la respuesta al medicamento como factor pronóstico, además de reducir las complicaciones metabólicas relacionadas con la carga leucémica que se presentan al iniciar quimioterapia. Las siguientes 3 semanas consisten en la combinación de Vincristina, Daunorrubicina, L-Asparaginasa y Prednisona y las últimas dos semanas de Intensificación de la Remisión incluyen Etopósido y Arabinósido de Citosina. En esta fase debe iniciarse el tratamiento pre sintomático al SNC.

**Consolidación:** esta fase sigue a la inducción y uno de sus principales objetivos es intensificar de manera temprana el tratamiento a sitios santuarios (principalmente sistema nervioso central y testículo), empleando altas dosis de antimetabolitos con intervalos de 1 a 2 semanas por 3 a 4 dosis. En este protocolo se emplearán altas

dosis de Metotrexate a 2 ó 5 g/m<sup>2</sup> dependiendo del grupo de riesgo, inmunofenotipo y características citogenéticas, por tres dosis con intervalos de una semana.

**Mantenimiento:** el objetivo de esta fase es eliminar la enfermedad residual que persiste al final de la inducción y erradicar la clona leucémica. Esta fase debe contemplar el uso de tratamiento pre sintomático al SNC, una fase de re intensificación y esquemas de continuación dirigidos al grupo de riesgo.

**Tratamiento pre-sintomático al SNC.** Tiene el objetivo de reducir el número de recaídas a este sitio empleando diferentes estrategias que en este protocolo incluyen la administración regional de quimioterapia (por vía intratecal) y el empleo de altas dosis de metotrexate.

## MEDICAMENTOS

**Prednisona (PDN):** inicia una vez establecido el diagnóstico (día 0) a dosis de 60 mg/m<sup>2</sup> por vía oral dividida en 3 dosis/día.

**Vincristina (VCR):** Se administra a dosis de 2 mg/m<sup>2</sup> (con tope de 2 mg) en mayores de 10 Kg ó de 0.05 mg/m<sup>2</sup> en menores de 10 Kg. Por vía intravenosa, en bolo. Su aplicación será los días 7, 14, 21 y 28 del tratamiento en todos los casos.

**Daunorrubicina (DNR):** se dará a dosis de 30 mg/m<sup>2</sup>.

**L-Asparaginasa (L-Asp):** se administra a dosis de 10,000 U/m<sup>2</sup> (sin dosis tope) por vía intramuscular en días alternos por no más de tres dosis semanales evitando su aplicación los días en que se administre VCR.

Seguimiento del paciente durante la inducción

- Revisión en consulta externa cada semana (de ser posible los días 7, 14, 21 y 28).
- Biometría Hemática los días 0, 7, 14, 21 y 28 con revisión del frotis de sangre periférica y determinación del porcentaje de blastos en el laboratorio de oncología.
- Amilasa sérica y glucemia durante las tres semanas en que se emplea L-Asparaginasa con glucosuria (labstix) antes de cada aplicación.
- Aspirado de Médula ósea los días 0, 7, 14, 21 y 28.
- Toma de LCR y procesamiento para citoquímico (sólo al diagnóstico) y citocentrífuga (en todas las tomas).

## **EVALUACION DE LA RESPUESTA**

Durante esta fase de tratamiento se realizará MO cada semana (días 0, 7, 14, 21, 28) y en los casos en que no se obtenga remisión al día 28 se hará una MO más en el día 35.

En los días 0 a 7 el paciente recibirá una ventana de esteroide, al término de la cual se determinará la respuesta al medicamento mediante BH y aspirado de MO, considerándose buena respuesta cuando haya menos de 1,000 blastos absolutos en sangre periférica.

**Respondedor temprano rápido:** MO en M1 el día 14 (tomando como día 1 el día de inicio del esteroide).

**Respondedor temprano:** MO en M1 hasta el día 21.

**Respondedor lento:** MO en M1 hasta el día 35.

## **FALLA A LA INDUCCIÓN**

La MO del día 21 (14 de quimioterapia + 7 de esteroide) evalúa la falla en esta fase de tratamiento.

MO en M2 o M3: agregar ciclofosfamida 300 mg/m<sup>2</sup> dosis/6 dosis.

## **RETRASOS EN LA INDUCCIÓN**

Los pacientes en quienes se hayan presentado complicaciones infecciosas, la continuación del tratamiento dependerá de la condición del paciente y de la duración del retraso menor o igual a 2 semanas: continuar esquema en la semana en que se haya interrumpido la inducción retraso mayor de 2 semanas: tomar BH, MO, LCR para determinar continuación o reinicio del esquema.

## **LEUCEMIA EN SISTEMA NERVIOSO CENTRAL**

Es necesario definir el status de la enfermedad en Sistema Nervioso Central (SNC) al diagnóstico.

**SNC1:** ausencia de blastos.

**SNC2:** < 5 leucocitos/ $\mu$ L con evidencia de blastos en el examen de citocentrífuga.

**SNC3:** > 5 leucocitos/ $\mu$ L con evidencia de blastos en el examen de citocentrífuga o pares craneales afectados.

Quimioterapia Intratecal (QT IT).

Metotrexate (MTX), Dexametasona y Arabinósido de Citosina (Ara-C) en un programa de dosis de acuerdo a edad.

Edad	Metotrexate	Dexametasona	Arabinósido de Citosina
< 1 a	6 mg	0.6 mg	20 mg
1 - 2 a	8 mg	0.8 mg	25 mg
2 a 3 a	10mg	0.8 mg	25 mg
3 - 9 a	12 mg	1.0 mg	30 mg
> 9 a	15 mg	1.0 mg	30 mg

- Siempre deberán tomarse las precauciones señaladas para el procedimiento de punción lumbar.
- Si no existe contraindicación para su uso, deberá aplicarse los días 0, 7, 14 y 21 en los pacientes con LCR negativo al diagnóstico y dos veces por semana hasta negativizar + 2 dosis adicionales, en aquellos pacientes con enfermedad en SNC al diagnóstico.

QT IT en mantenimiento

**Riesgo Habitual:** cada 6 semanas por 10 dosis (14 dosis totales).

**Riesgo alto y muy alto:** cada 4 semanas por 12 dosis (16 dosis totales).

## **RADIOTERAPIA AL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL**

Se empleará únicamente en los casos en que se demuestre enfermedad en SNC al diagnóstico\*, en cuyo caso iniciará al cumplirse un año de mantenimiento (semana 52), siempre y cuando el paciente se mantenga en remisión completa.

**Dosis Craneal: 24 Gy**

**Dosis a Medula Espinal: 18 Gy**

Durante las 4 semanas de Radioterapia el paciente recibirá el siguiente esquema de quimioterapia:

- Semana 1: 6MP + MTX.
- Semana 2: VCR + Dexametasona.
- Semana 3: 6MP + MTX.
- Semana 4: VCR + Dexametasona.

## **ANEXO 2.-**

### **CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO**

Título: DETERMINACIÓN DEL INMUNOFENOTIPO Y DEL REARREGLO DEL GEN DE LA CADENA PESADA DE LAS INMUNOGLOBULINAS EN LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO (LCR) DE NIÑOS CON LEUCEMIA AGUDA LINFOBLÁSTICA (LAL) COMO PRUEBA DIAGNÓSTICA PARA DETECTAR INFILTRACIÓN A SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC).

Se me ha invitado, para que mi hijo(a) \_\_\_\_\_ participe en el estudio clínico DETERMINACIÓN DEL INMUNOFENOTIPO Y DEL REARREGLO DEL GEN DE LA CADENA PESADA DE LAS INMUNOGLOBULINAS EN LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO (LCR) DE NIÑOS CON LEUCEMIA AGUDA LINFOBLÁSTICA (LAL) COMO PRUEBA DIAGNÓSTICA PARA DETECTAR INFILTRACIÓN A SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC).

**Estudio No:** HIM/2010/035

**Investigadores:** Dra. Marta Zapata Tarrés; Dr. Miguel Angel Palomo Colli

Dirección del estudio:  
Hospital Infantil de México Federico Gómez  
Departamento de Oncología  
Dr. Márquez 162  
Col Doctores delegación Cuauhtémoc  
CP 06720 México D.F.  
Teléfono 52289917 ext 1223 - 1224

¿Cuál es el propósito de esta carta de consentimiento?

Se le invita a participar en un estudio para niños con leucemia aguda linfoblástica. El objetivo de esta carta de consentimiento es darle información sobre el estudio para que usted pueda decidir si quiere participar o no. Su participación es voluntaria y usted tiene la libertad de retirarse en cualquier momento.

¿Por qué se está llevando a cabo esta investigación?

Los niños que se enferman de leucemia aguda linfoblástica tienen en ocasiones invadido el cerebro por las células malignas. Los métodos para detectar estas células no son perfectos por lo que se está tratando de encontrar nuevos estudios que se

piensan son mejores que el actual. Estos nuevos métodos se llaman citometría de flujo y reacción en cadena de la polimerasa. El propósito es que en un futuro, si este método resulta mejor, sólo se les apliquen quimioterapias intratecales a los niños que tienen el estudio positivo y no como ahora que se deben de medicar niños que aunque salgan “negativos” para esta invasión de células no estamos tan seguros.

¿Cuántos niños participarán en el estudio?

Se calcula que se estudiarán unos 30 niños a los cuales se les tomará la muestra de líquido cefalorraquídeo que se toma de manera habitual para hacer el tratamiento con quimioterapia intratecal.

¿Qué implica participar en el estudio?

Una vez que acepte que su hijo participe en el estudio se procederá a registrar en su expediente que fue incluido en el estudio. Cada vez que su hijo acuda a sus citas programadas a Medicina del Dolor para aplicación de su quimioterapia intratecal le tendrá que avisar al médico que usted es parte de este estudio y cuando el médico le extraiga el líquido cefalorraquídeo necesario para poder aplicar el medicamento dividirá la muestra y se enviará para la revisión en el microscopio normal en el laboratorio de oncología y al laboratorio central para la citometría de flujo y la reacción en cadena de la polimerasa. Los resultados de los estudios se sabrán en 24 horas. Usted podrá conocer el resultado del estudio de su hijo.

¿Cuáles son los riesgos del estudio?

Los riesgos del estudio van en relación a dos situaciones: una es la punción que se realiza en la espalda (punción lumbar) y otra es la cantidad de líquido que se extrae. Los riesgos del primero son dolor en el sitio de la punción, posible sangrado y en casos raros formación de un canal entre la piel y el espacio donde se aloja el líquido. Las complicaciones por el retiro de mucho o poco líquido son dolor de cabeza y sensación de mareo. También puede haber complicaciones por la anestesia que se aplica para que los niños no tengan dolor.

Todas estas complicaciones existen en todos los niños que tiene leucemia aguda linfoblástica.

¿Tiene beneficio participar en este estudio?

Usted personalmente puede beneficiarse o no con la participación en este estudio ya que el resultado de ambas técnicas puede ser diferente y en ese caso se tomará en cuenta para el seguimiento de la enfermedad de su hijo. En caso de no beneficiarse personalmente podrá beneficiar a otros pacientes contribuyendo a tener información para describir un mejor método diagnóstico.

¿Qué pasa si decido no participar en este estudio?

Su participación en este estudio es voluntaria. Tiene derecho a negarse a participar en este estudio de investigación sin sanciones ni pérdidas de beneficios que de cualquier modo tiene derecho. Si decide participar en el estudio y/o decide retirarse más adelante no habrá ni sanciones ni perderá ningún beneficio.

¿Cuáles son los costos?

No le pagarán por participar en el estudio, ni tendrá que pagar por la realización de los métodos diagnósticos. El costo de la anestesia, el procedimiento, el medicamento será el mismo si participa o no en el estudio.

¿Cuáles son sus derechos?

Las muestras del estudio son confidenciales y serán utilizadas únicamente para fines de esta investigación. No se le otorgará ningún beneficio económico, ni derecho de propiedad que puedan resultar de este estudio.

¿A quién llamo en caso de duda o problema?

Si tiene alguna duda o inquietud respecto a esta investigación deberá comunicarse con la Dra. Marta Zapata Tarrés o con el Dr. Miguel Ángel Palomo Colli a los teléfonos 5228 9917 extensión 1223 o 1224.

Me han explicado los investigadores responsables que:

1. Si acepto que mi hijo participe, conozco que el estudio consiste en la toma de una muestra de LCR de 3 ml para la realización del estudio molecular la cual se tomará junto con la toma de otro producto necesario para el paciente.
2. Se me ha explicado que la toma de esta muestra no modificará el tratamiento del paciente y que la información que resulte de este estudio se mantendrá en forma confidencial. El nombre de mi hijo(a) no aparecerá en ninguna publicación o presentación de datos. He tenido la oportunidad de hacer preguntas al equipo del estudio sobre la investigación y me han contestado satisfactoriamente.

Queda entendido que la participación de su hijo(a) en el estudio es voluntaria y que puede declinar la participación o salir del estudio en cualquier momento, sin ninguna penalización o pérdida de los beneficios a los que tiene derecho. Su participación puede terminarse sin mi consentimiento, si el médico tratante decide que es lo más conveniente para la seguridad de mi hijo(a).

Sé que el estudio seguirá los Lineamientos Internacionales para Investigación Biomédica en seres Humanos (CIOMS-WHO.1993), los principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos de la Asociación Médica Mundial (Declaración Helsinki, Asamblea 2000), además de haber sido previamente aprobado por los Comités de Ética e Investigación del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

Declaro ser mayor de 18 años (padre / madre o tutor legal del menor) y que otorgo mi consentimiento para que mi hijo participe en este estudio.

México, D.F., a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ del 2011

Nombre y Firma del Representante Legal del niño

---

Nombre y Firma del Investigador

---

Nombre y Firma del Testigo \_\_\_\_\_

Nombre y Firma del Testigo \_\_\_\_\_

### **ANEXO 3.-**

#### **CARTA DE ASENTIMIENTO**

Título: DETERMINACIÓN DEL INMUNOFENOTIPO Y DEL REARREGLO DEL GEN DE LA CADENA PESADA DE LAS INMUNOGLOBULINAS EN LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO (LCR) DE NIÑOS CON LEUCEMIA AGUDA LINFOBLÁSTICA (LAL) COMO PRUEBA DIAGNÓSTICA PARA DETECTAR INFILTRACIÓN A SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC).

Se me ha invitado, para que mi hijo(a) \_\_\_\_\_ participe en el estudio clínico DETERMINACIÓN DEL INMUNOFENOTIPO Y DEL REARREGLO DEL GEN DE LA CADENA PESADA DE LAS INMUNOGLOBULINAS EN LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO (LCR) DE NIÑOS CON LEUCEMIA AGUDA LINFOBLÁSTICA (LAL) COMO PRUEBA DIAGNÓSTICA PARA DETECTAR INFILTRACIÓN A SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC).

**Estudio No:** HIM/2010/035

**Investigadores:** Dra. Marta Zapata Tarrés; Dr. Miguel Angel Palomo Colli

Dirección del estudio:  
Hospital Infantil de México Federico Gómez  
Departamento de Oncología  
Dr. Márquez 162  
Col Doctores delegación Cuauhtémoc  
CP 06720 México D.F.  
Teléfono 52289917 ext 1223 - 1224

¿Cuál es el propósito de esta carta de consentimiento?

Se le invita a participar en un estudio para niños con leucemia aguda linfoblástica. El objetivo de esta carta de consentimiento es darle información sobre el estudio para que usted pueda decidir si quiere participar o no. Su participación es voluntaria y usted tiene la libertad de retirarse en cualquier momento.

¿Por qué se está llevando a cabo esta investigación?

Los niños que se enferman de leucemia aguda linfoblástica tienen en ocasiones invadido el cerebro por las células malignas. Los métodos para detectar estas células no son perfectos por lo que se está tratando de encontrar nuevos estudios que se piensan son mejores que el actual. Estos nuevos métodos se llaman citometría de flujo y reacción en cadena de la polimerasa. El propósito es que en un futuro, si este método resulta mejor, sólo se les apliquen quimioterapias intratecales a los niños que tienen el estudio positivo y no como ahora que se deben de medicar niños que aunque salgan “negativos” para esta invasión de células no estamos tan seguros.

¿Cuántos niños participarán en el estudio?

Se calcula que se estudiarán unos 30 niños a los cuales se les tomará la muestra de líquido cefalorraquídeo que se toma de manera habitual para hacer el tratamiento con quimioterapia intratecal.

¿Qué implica participar en el estudio?

Una vez que acepte que su hijo participe en el estudio se procederá a registrar en su expediente que fue incluido en el estudio. Cada vez que su hijo acuda a sus citas programadas a Medicina del Dolor para aplicación de su quimioterapia intratecal le tendrá que avisar al médico que usted es parte de este estudio y cuando el médico le extraiga el líquido cefalorraquídeo necesario para poder aplicar el medicamento dividirá la muestra y se enviará para la revisión en el microscopio normal en el laboratorio de oncología y al laboratorio central para la citometría de flujo y la reacción en cadena de la polimerasa. Los resultados de los estudios se sabrán en 24 horas. Usted podrá conocer el resultado del estudio de su hijo.

¿Cuáles son los riesgos del estudio?

Los riesgos del estudio van en relación a dos situaciones: una es la punción que se realiza en la espalda (punción lumbar) y otra es la cantidad de líquido que se extrae. Los riesgos del primero son dolor en el sitio de la punción, posible sangrado y en casos raros formación de un canal entre la piel y el espacio donde se aloja el líquido. Las complicaciones por el retiro de mucho o poco líquido son dolor de cabeza y sensación de mareo. También puede haber complicaciones por la anestesia que se aplica para que los niños no tengan dolor.

Todas estas complicaciones existen en todos los niños que tiene leucemia aguda linfoblástica.

¿Tiene beneficio participar en este estudio?

Usted personalmente puede beneficiarse o no con la participación en este estudio ya que el resultado de ambas técnicas puede ser diferente y en ese caso se tomará en cuenta para el seguimiento de la enfermedad de su hijo. En caso de no beneficiarse personalmente podrá beneficiar a otros pacientes contribuyendo a tener información para describir un mejor método diagnóstico.

¿Qué pasa si decido no participar en este estudio?

Su participación en este estudio es voluntaria. Tiene derecho a negarse a participar en este estudio de investigación sin sanciones ni pérdidas de beneficios que de cualquier

modo tiene derecho. Si decide participar en el estudio y/o decide retirarse más adelante no habrá ni sanciones ni perderá ningún beneficio.

¿Cuáles son los costos?

No le pagarán por participar en el estudio, ni tendrá que pagar por la realización de los métodos diagnósticos. El costo de la anestesia, el procedimiento, el medicamento será el mismo si participa o no en el estudio.

¿Cuáles son sus derechos?

Las muestras del estudio son confidenciales y serán utilizadas únicamente para fines de esta investigación. No se le otorgará ningún beneficio económico, ni derecho de propiedad que puedan resultar de este estudio.

¿A quién llamo en caso de duda o problema?

Si tiene alguna duda o inquietud respecto a esta investigación deberá comunicarse con la Dra. Marta Zapata Tarrés o con el Dr. Miguel Ángel Palomo Colli a los teléfonos 5228 9917 extensión 1223 o 1224.

Me han explicado los investigadores responsables que:

1. Si acepto que mi hijo participe, conozco que el estudio consiste en la toma de una muestra de LCR de 3 ml para la realización del estudio molecular la cual se tomará junto con la toma de otro producto necesario para el paciente.
2. Se me ha explicado que la toma de esta muestra no modificará el tratamiento del paciente y que la información que resulte de este estudio se mantendrá en forma confidencial. El nombre de mi hijo(a) no aparecerá en ninguna publicación o presentación de datos. He tenido la oportunidad de hacer preguntas al equipo del estudio sobre la investigación y me han contestado satisfactoriamente.

Queda entendido que la participación de su hijo(a) en el estudio es voluntaria y que puede declinar la participación o salir del estudio en cualquier momento, sin ninguna penalización o pérdida de los beneficios a los que tiene derecho. Su participación puede terminarse sin mi consentimiento, si el médico tratante decide que es lo más conveniente para la seguridad de mi hijo(a).

Sé que el estudio seguirá los Lineamientos Internacionales para Investigación Biomédica en seres Humanos (CIOMS-WHO.1993), los principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos de la Asociación Médica Mundial (Declaración Helsinki, Asamblea 2000), además de haber sido previamente aprobado por los Comités de Ética e Investigación del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

Declaro ser mayor de 18 años (padre / madre o tutor legal del menor) y que otorgo mi consentimiento para que mi hijo participe en este estudio.

México, D.F., a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ del 2011

Nombre y Firma del Representante Legal del niño

---

Nombre y Firma del Investigador

---

Nombre y Firma del Testigo \_\_\_\_\_

Nombre y Firma del Testigo \_\_\_\_\_