



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIO DE POSTGRADO
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI

“RELEVANCIA CLINICA DEL INMUNOFENOTIPO
ABERRANTE EN PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE
AGUDA MENORES DE 60 AÑOS”

T E S I S
PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALIDAD
EN:

HEMATOLOGÍA

PRESENTA:
DR. GERARDO ERNESTO MARTINEZ POZOS

ASESORES:
DR. EDUARDO TERREROS MUÑOZ
DR. LUIS ANTONIO MEILLON GARCÍA



MÉXICO, D.F

FEBRERO, 2014



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.



Dirección de Prestaciones Médicas
Unidad de Educación, Investigación y Políticas de Salud
Coordinación de Investigación en Salud



"2013, Año de la Lealtad Institucional y Centenario del Ejército Mexicano"

Dictamen de Autorizado

Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud 3601
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES DR. BERNARDO SEPULVEDA GUTIERREZ, CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI,
D.F. SUR

FECHA **12/07/2013**

DR. EDUARDO TERREROS MUÑOZ

P R E S E N T E

Tengo el agrado de notificarle, que el protocolo de investigación con título:

RELEVANCIA CLINICA DEL INMUNIOFENOTIPO ABERRANTE EN PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA MENORES DE 60 AÑOS

que usted sometió a consideración de este Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud, de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores, cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de ética y de investigación, por lo que el dictamen es **A U T O R I Z A D O**, con el número de registro institucional:

Núm. de Registro
R-2013-3601-200

ATENTAMENTE

DR. CARLOS FREDY CUEVAS GARCÍA

Presidente del Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud No. 3601

IMSS

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

DRA. DIANA G. MENEZ DÍAZ
Jefe de la División de Educación e Investigación en Salud
Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI

DR. LUIS ANTONIO MEILLÓN GARCÍA
Jefe del servicio de Hematología
Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI

DR. EDUARDO TERREROS MUÑOZ
Asesor de Tesis
Médico Adscrito al Servicio de Hematología
Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI

Agradecimientos

“A Dios. . .

*A mi Madre Tere, hermana Yussel, ahora Leonardo. . . así como a Guillermo y
Laura Elena. . .*

Familia y gente que siempre supo hincar en mis costillas el castigo a mi galope. . .

“Que el motivo este siempre en el acto, y no en el fruto de su recompensa. . . .”

Gracias. . .

PROTOCOLO DE TESIS
De Especialidad en Hematología

**RELEVANCIA CLINICA DEL INMUNOFENOTIPO ABERRANTE EN PACIENTES CON
LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA MENORES DE 60 AÑOS.**

1. INVESTIGADORES.

1. Dr. Eduardo Terreros Muñoz MBH. Adscrito al servicio de Hematología del Hospital de Especialidades Dr. Bernardo Sepúlveda CMN Siglo XXI IMMS. Correo electrónico: etem@prodigy.net.mx
2. Dr. Gerardo Ernesto Martínez Pozos. Residente de cuarto grado del servicio de Hematología del Hospital de Especialidades Dr. Bernardo Sepúlveda del CMN Siglo XXI IMSS. Correo electrónico: gemp9@hotmail.com
3. M. en C. Laura Josefina Rabelo Carrasco. Encargada del Laboratorio de Hematología especial, del Hospital de Especialidades "Dr. Bernardo Sepúlveda" CMN Siglo XXI IMSS. Correo electrónico: lbelocarrasco72@yahoo.com.mx

2. SERVICIO.

Servicio de Hematología del Hospital de especialidades CMN Siglo XXI IMSS.
Laboratorio de Hematología Especial del Hospital de Especialidades Dr. Bernardo Sepúlveda del CMN Siglo XXI IMSS.

INDICE

	PAGINA
1. RESUMEN	1
2. HOJA DE DATOS	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. JUSTIFICACIÓN	12
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
6. OBJETIVOS	14
7. HIPOTESIS	15
8. MATERIAL Y METODOS	16
9. CONSIDERACIONES ETICAS Y RECURSOS	22
10. RESULTADOS	23
11. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	35
12. ANEXOS	37
13. BIBLIOGRAFIA	40

RESUMEN

Actualmente existen diferentes componentes o elementos que ayudan al diagnóstico de certeza y pronóstico para la Leucemia Mieloide Aguda (LMA), como son: el estudio morfológico, inmunofenotípico, cariotipo y de biología molecular. Únicamente el aspecto morfológico es insuficiente para establecer el diagnóstico de LMA por lo que el estudio del fenotipo de las células leucémicas a través de citometría de flujo multiparámetro ha adquirido gran importancia para la diferenciación respecto al linaje, grado de maduración de las células afectadas, determinación de enfermedad mínima residual y expresión de marcadores inmunofenotípicos aberrantes al diagnóstico. Sin embargo, la relevancia clínica que tiene la expresión de marcadores fenotípicos aberrantes es aún poco clara.

Objetivo: Evaluar la frecuencia y relevancia clínica de la expresión del inmunofenotipo aberrante, determinado por citometría de flujo multiparámetro, en pacientes menores de 60 años con LMA.

Material y método: Se analizaron 18 pacientes diagnosticados desde Enero del 2011 a Diciembre del 2012. Los resultados del inmunofenotipo se obtuvieron de la base de datos que se tiene en el laboratorio de hematología especial del Hospital de Especialidades CMN Siglo XXI.

Resultados: 83.3% de los pacientes presentaron inmunofenotipo aberrante al diagnóstico. El tipo de aberrancia más frecuente fue asincronía en la maduración en 66.7%, la hiperleucocitosis se observó en 4 pacientes del grupo de inmunofenotipo aberrante, respecto a 1 del grupo de inmunofenotipo no aberrante ($p=0.8$). La respuesta al día 14 se obtuvo en 5 pacientes vs 2 pacientes de los grupos con inmunofenotipo no aberrante y aberrante respectivamente ($p=0.58$). La mediana de supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad en el grupo de inmunofenotipo no aberrante fue de 16 meses para las dos variables, y en el grupo de inmunofenotipo aberrante fue de 15 meses y 21 meses respectivamente.

Conclusiones: Establecimos la frecuencia del inmunofenotipo aberrante al diagnóstico en pacientes menores de 60 años con LMA, la cual coincide con lo reportado en la literatura internacional. Existió cierta tendencia hacia la hiperleucocitosis y mayor trombocitopenia en pacientes con inmunofenotipo aberrante. Es el primer estudio en México, que reporta la frecuencia del inmunofenotipo aberrante al diagnóstico de pacientes con LMA.

1.- DATOS DE ALUMNO (AUTOR)	DATOS DEL ALUMNO
Apellido paterno Apellido materno Nombre Teléfono Universidad Facultad o escuela Carrera No. de cuenta	Martínez Pozos Gerardo Ernesto (0155) 43 444 390 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Medicina Especialidad de Hematología 511231160
2.- DATOS DEL ASESOR	DATOS DEL ASESOR
Apellido paterno Apellido materno Nombre	Terroros Muñoz Eduardo
3.- DATOS DE LA TESIS	DATOS DE LA TESIS
Título No. de paginas Año Número de registro	Relevancia clínica del inmunofenotipo aberrante en pacientes con leucemia mieloide aguda menores de 60 años. páginas 2014 R-2013-3601-200

INTRODUCCION

La leucemia mieloide aguda (LMA) es un grupo de desórdenes neoplásicos hematológicos de origen clonal, fenotípica y genotípicamente heterogéneas, derivados de linaje hematopoyético mieloide, caracterizadas por una expansión anormal de blastos (células leucémicas) en la médula ósea, sangre periférica y otros tejidos, con la consecuente falla en la producción y maduración normal, de las células sanguíneas¹.

Estos desordenes son la forma más común de leucemia aguda entre la población adulta, representando el 80% de éstas. En Estados Unidos de América (EUA) se estima que 13780 personas fueron diagnosticadas en el año 2012, y 10200 murieron a consecuencia de ésta neoplasia²

En México al igual que en el resto del mundo el cáncer ocupa los primeros lugares como causa de muerte y la leucemia aguda representa el 4.2% de éstas. El registro epidemiológico de Neoplasias Malignas (RHNM) en México, reporta una incidencia anual de las leucemias agudas en la población general de 2/100,000 habitantes/año, y para la leucemia mieloide aguda de 0.7/100,000 habitantes/año, lo que coincide con las incidencia en otros países. Con una mediana de edad al diagnóstico de 66 años, y 54% de éstas, diagnosticadas a los 65 años de edad^{3,4}.

Las características clínicas de esta neoplasia hematológica incluyen palidez, fatiga, debilidad generalizada y palpitations (síndrome anémico); gingivorragia fácil, epistaxis y hemorragia conjuntival (síndrome hemorrágico), éstos dependiendo del grado de las citopenias. Las infecciones piógenas en la piel son comunes, síndrome consuntivo y fiebre pueden estar presentes. La hepatomegalia y esplenomegalia ocurren en aproximadamente el 25% de los pacientes al diagnóstico. La presencia de sarcoma granulocítico (tumor compuesto por mieloblastos, monoblastos o megacariocitos), aparece en 2.5% a 9.1% de los pacientes al diagnóstico, incluso sin evidencia de leucemia en sangre periférica y médula ósea^{5,6}.

La anemia, la cual suele ser de moderada a grave (entre 8-9grs/dL) al diagnóstico, es secundaria a una producción inadecuada y disminución de la vida media de los eritrocitos; la trombocitopenia

frecuentemente menor de 50000/mm³, se presenta en el 50% de los pacientes al diagnóstico. El conteo de leucocitos totales es menor de 5000/mm³ en el 50% de los pacientes, y en el resto pueden presentarse con hiperleucocitosis (más de 100,000 leucocitos/mm³). Los mieloblastos casi siempre están presentes e

n sangre periférica, estas células leucémicas son clásicamente de tamaño grande, con citoplasma basófilo, agranular o ligeramente granulares, con cromatina nuclear inmadura y presencia de uno a dos nucléolos prominentes. La presencia de bastones de Auer ocurre en un 15% de los casos, con excepción en la variante promielocítica aguda en la que éstos, están presentes en una alta proporción⁵.

El aspirado de médula ósea es parte de la rutina diagnóstica en pacientes con sospecha de LMA. La biopsia de hueso se considera opcional, pero debe ser realizada en pacientes con aspirado seco. Las muestras de sangre periférica y médula ósea deben ser examinadas usando tinción de My-Grünwald-Giemsa o Wright-Giemsa, se recomienda que al menos 200 leucocitos en sangre periférica y 500 células nucleadas en médula ósea, sean contadas¹.

Para el diagnóstico de LMA el conteo de 20% o más blastos en sangre periférica y/o médula ósea se requieren, excepto para la LMA con t(15;17), t(8;21), inv(16) o t(16;16) y algunos casos de eritroleucemia. Los mieloblastos, monoblastos y megacarioblastos son incluidos en el conteo de blastos. En LMA con diferenciación monocítica o mielomonocítica, los monoblastos, promonocitos, pero no monocitos anormales deben ser contados como equivalentes a blastos. Los eritroblastos no se cuentan como blastos a excepción de casos raros de leucemia eritroide pura¹.

El estudio inmunofenotípico usando citometría de flujo multiparametro es utilizado para determinar el linaje involucrado en leucemias agudas recientemente diagnosticadas (tabla 2). No existe un consenso general respecto al punto de corte para considerar un marcador inmunofenotípico positivo en leucemia aguda, sin embargo el punto de corte más comúnmente usado y recomendado por la European LeukemiaNet es de 20% o más, de células leucémicas que expresen el fenotipo específico. Sin embargo la cuantificación de blastos por citometría de flujo no debe ser usado como sustituto de la evaluación morfológica, para el diagnóstico¹.

El análisis citogenético convencional es un componente mandatorio en la evaluación diagnóstica de un paciente con sospecha de leucemia aguda. Las anormalidades cromosómicas son detectadas en 55% de los adultos con LMA. Siete translocaciones balanceadas recurrentes e inversiones, y sus variantes se reconocen en las categorías de la Organización Mundial de la Salud (OMS), lo que tiene gran valor pronóstico. Un mínimo de 20 células en metafase analizadas de médula ósea es necesario para establecer el diagnóstico de un cariotipo normal y lo recomendado para definir un cariotipo anormal¹.

La búsqueda de mutaciones en genes *NPM1*, *CEBPA* así como de la mutación *FLT3* debe hacerse en estudios clínicos y en pacientes con cariotipo normal, debido al gran valor que tienen estas alteraciones sobre el pronóstico de los pacientes. Así como el estudio de otros genes recurrentes, tales como *RUNX1-RUNX1T1*, *CBFB-MYH11*, *MLLT3-MLL*, *DEK-NUP214*.¹

Durante las pasadas tres décadas, el sistema de clasificación para leucemia mieloide aguda ha sido establecido por la French American British (FAB) system, basado en tinciones citoquímicas y características morfológicas, así como el grado de diferenciación mieloide y monocítica. Durante la transición del sistema FAB a la clasificación de la OMS, el rango de porcentaje de blastos disminuyó a 20% o más, esto basado en el comportamiento biológico de los subgrupos de síndrome mielodisplásicos establecidos por la FAB (anemia refractaria con exceso de blastos en transformación), ya que con 20% de blastos, el pronóstico era igual de grave que con 30% (rango de blastos en el sistema anterior definido por la FAB), además el sistema de clasificación de la OMS permitió que la LMA fuera diagnosticada con la presencia de alteraciones citogenéticas características, a pesar del porcentaje de blastos⁷.

En 2008 la OMS revisó los criterios diagnósticos y de respuesta para LMA, a lo que incluyó anormalidades genéticas recurrentes creadas por inversiones/traslocaciones recíprocas, y una nueva categoría para algunos de los marcadores moleculares que han tenido impacto pronóstico.

Por lo que la reciente clasificación de la OMS (2008) refleja el hecho de que un gran número de leucemias agudas pueden ser categorizadas de acuerdo a sus anormalidades genéticas y moleculares⁸ (tabla 1).

Existen factores clínicos y de laboratorio que afectan el pronóstico de los pacientes, y se pueden dividir en aquellos relacionados al paciente y los relacionados a las características biológicas de la LMA¹.

El principal factor de riesgo relacionado al paciente es la edad, que le confiere un peor resultado en cuanto a tasas de supervivencia y respuesta al tratamiento, con respecto a pacientes jóvenes. Aun a pesar de otros factores como la citogenética, alteraciones moleculares, el tipo de LMA (de novo o con historia previa de mielodisplasia) y estado funcional¹.

Los factores pronósticos relacionados a la LMA incluyen el conteo de leucocitos al diagnóstico (>100000/mm³ leucocitos), antecedente de síndrome mielodisplásico, terapia citotóxica previa, así como cambios citogenéticos y moleculares en las células leucémicas al diagnóstico. Con respecto a la citogenética el cariotipo de las células leucémicas es el factor pronóstico con mayor impacto para la respuesta a la terapia de inducción y la supervivencia. Por lo que en pacientes menores de 60 años se categorizaron tres grupos de riesgo de acuerdo a la presencia de anormalidades citogenéticas¹ (tabla 3).

Respecto al tratamiento de la LMA existen dos principios básicos, 1) la quimioterapia de inducción a la remisión y 2) quimioterapia postremisión (consolidación). Aunque el primer paso es obtener la remisión completa, es necesaria la terapia de intensificación (consolidación) para obtener un control prolongado de la enfermedad. Los pacientes que no reciben una quimioterapia postremisión, experimentan recaída dentro de los próximos 6 a 9 meses⁵. La estrategia de inducción se establece de acuerdo a las características del paciente como la edad, presencia de comorbilidad y mielodisplasia preexistente. Los pacientes a quienes su estado funcional, no les permite ser candidatos a esquemas de quimioterapia estándar, pueden participar en estudios clínicos usando terapia epigenética, si estos estudios tampoco son opción, entonces los regímenes de intensidad reducida o solo cuidados de apoyo, son el tratamiento de elección. En pacientes jóvenes, las estrategias de quimioterapia de consolidación son basadas sobre el potencial riesgo

de recaída, con quimioterapia más agresiva en pacientes de alto riesgo, con respecto a los factores mencionados anteriormente, las lesiones citogenéticas y moleculares, así como carga tumoral con más de 100000/mm³ leucocitos siendo estos últimos los indicadores pronósticos con mayor importancia, para lograr remisión completa después del primer ciclo de inducción, y otorgándole al paciente bajas tasas de supervivencia a largo plazo^{1,5}.

Previo a la introducción de la quimioterapia hace 55 años, la mediana de supervivencia de los pacientes era de aproximadamente 6 semanas, solo 3% alcanzando 1 año de supervivencia, y supervivencias largas ocurrían en menos de 1%. Las tasas de supervivencia relativa a 5 años de pacientes en EUA del 1999 al 2004 de acuerdo al Programa de vigilancia, epidemiología y resultados finales del Instituto Nacional del Cáncer, va de 50% a 80% en pacientes de 45 años, y de 4.5% en mayores de 65 años. Tomando en cuenta que la mediana de edad, al inicio de la enfermedad es de aproximadamente 70 años y el 75% de los pacientes son mayores de 45 años. La media global de supervivencia es de aproximadamente 12 meses^{1,5}.

El tratamiento de inducción estándar actual para LMA comprende regímenes de quimioterapia de dos o más agentes que incluyen una antraciclina y citarabina. Las tasas de remisión varían de 55 a 90% en pacientes adultos. Las dos variables más importantes son la edad del paciente, y si tiene antecedente de leucemia relacionada a tratamiento o secundaria a neoplasia mieloide. Se han utilizado dosis altas de citarabina como esquema de inducción sin embargo no incrementan las tasas de remisión y si incrementan la toxicidad comparada con dosis convencional, especialmente en pacientes mayores de 60 años. La supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global pueden ser mejores que los obtenidos con la terapia estándar, lo que ha sugerido el uso de éste régimen como inducción en pacientes menores de 50 años, sin embargo su uso no está estandarizado⁵.

Los pacientes quienes no alcanzan remisión completa después de la primera inducción, generalmente se someten a un segundo curso de inducción con el mismo esquema, sin embargo esto varía de acuerdo al centro de atención. Con lo que se obtiene aproximadamente un 40% de tasa de remisión y una supervivencia libre de enfermedad a 5 años del 10%⁵.

En la terapia post remisión la intención es prolongar la duración de la remisión y supervivencia global, por lo que los esquemas utilizados deben ser de gran intensidad. Varios estudios aleatorizados han estudiado si los pacientes con LMA en primera remisión deben recibir solo quimioterapia de consolidación, trasplante autólogo o alogénico de medula ósea, sin alcanzar un consenso. Se comparó el trasplante alogénico contra el autólogo, posterior a dos cursos de quimioterapia intensiva, en la que se reportó una supervivencia libre de enfermedad fue de 53% a 4 años para aquellos que recibieron trasplante alogénico, 48% de quienes recibieron trasplante autólogo y 30% de pacientes que recibieron quimioterapia intensa. La supervivencia global fue similar en los tres grupos después de la remisión completa ⁹.

Por lo que la decisión de utilizar trasplante de células hematopoyéticas autólogo o alogénico, o dosis altas de citarabina ya sea sola o combinada con antraciclina o inhibidor de topoisomerasa II, para consolidación debe ser individualizada, tomando como base la edad del paciente y otros factores pronósticos como citogenética de alto riesgo y antecedentes de neoplasia hematológica. Los pacientes con riesgo citogenético favorable deben recibir por lo menos cuatro ciclos de dosis altas de citarabina. Los pacientes con pobre riesgo citogenético deben ser considerados candidatos a trasplante alogénico o autólogo de células hematopoyéticas después de uno a dos ciclos de dosis altas de citarabina. Con el objetivo de alcanzar largos periodos de supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global ¹⁰.

Existen varias formas de terapia adicional de mantenimiento, posterior a la remisión completa o consolidación, muchos regímenes consisten en quimioterapia mensual, por ejemplo con dosis bajas de 6-tioguanina o citarabina. Aunque en algunos estudios se lograron supervivencias libres de enfermedad, ninguna ha demostrado mejoría en la supervivencia global ¹¹.

La citometría de flujo y sus aplicaciones clínicas en hematología.

La citometría de flujo es un método diagnóstico que evalúa a las células de forma individual en una suspensión, e identifica la presencia o ausencia de antígenos específicos de la superficie

(membrana) celular y algunos que se encuentran dentro del citoplasma celular obteniendo así un fenotipo de cada célula en particular^{5,12}.

Actualmente, la citometría de flujo es reconocida como una herramienta indispensable para diagnosticar, clasificar, estadificar y monitorizar enfermedades hematológicas en las cuales ya se encuentra estandarizada y validada su utilidad, este es el caso de las leucemias agudas¹².

En una descripción breve, este método de diagnóstico hace pasar de forma individual, a cada una de las células que se encuentran suspendidas en un fluido (sangre periférica, médula ósea, líquido cefalorraquídeo) a través de un espacio en el que un láser incide sobre su superficie, en la cual hay anticuerpos fluorescentes (los cuales son específicos) que a su vez reflejarán longitudes de onda de diferentes características y estas serán medidas por detectores específicos¹².

Dichas variaciones en las longitudes representan diferencias en la cantidad de fluorocromo adherido a la superficie celular traduciendo esto en la presencia o ausencia del antígeno estudiado y que cada una de las células está expresando, logrando así mediciones precisas y objetivas que se pueden expresar en eventos y a su vez representarse en gráficas susceptibles de análisis con rigor matemático¹².

La aplicación de la citometría de flujo en la LMA

En las últimas décadas la caracterización inmunofenotípica ha sido incorporada en distintas clasificaciones de leucemias agudas, como la clasificación inmunológica del European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL) y la clasificación de tumores de tejido hematopoyéticos y linfoides de la OMS. Actualmente la citometría de flujo multiparamétrica es el método diagnóstico de elección para la caracterización inmunofenotípica de los blastos leucémicos y permite detectar alteraciones en la expresión de antígenos capaces de diferenciar células hematopoyéticas normales de las células neoplásicas, lo que ha traído gran utilidad para el

monitoreo de enfermedad mínima residual, y actualmente la relevancia clínica de expresiones fenotípicas aberrantes¹³.

El inmunofenotipo en LMA es esencial para el diagnóstico de leucemia aguda con mínima diferenciación, leucemia megacarioblastica aguda y leucemias agudas de linaje ambiguo. La LMA con mínima diferenciación es una LMA sin evidencia citoquímica y morfológica de diferenciación mieloide. Muchos casos expresan antígenos asociados a hematopoyesis temprana (CD34, CD38 y HLA-DR) y carecen de la mayoría de marcadores de maduración mieloide y monocítica; mientras que la MPO es negativa por citoquímica, la detección de antígenos de MPO intracitoplasmáticos puede ser positiva por citometría de flujo en al menos una fracción de los blastos. La leucemia megacarioblastica aguda es una leucemia con 20% o más de blastos de los cuales el 50% o más son de linaje megacariocítico; los megacarioblastos expresan típicamente una o más de la glicoproteínas plaquetarias CD41 y/o CD61, y menos frecuente CD42 siendo estas determinadas por citometría de flujo. Las leucemias agudas de linaje ambiguo comprenden aquellos casos que ninguna evidencia de diferenciación de linaje es mostrada (ej. Leucemia aguda indiferenciada [LAI]) o aquellas con blastos que expresan marcadores de más de un linaje (Leucemia aguda de fenotipo mixto [LAFM]). Algunas LMA con anomalías genéticas recurrentes son asociadas a características inmunofenotípicas. Por ejemplo, LMA con t(8;21) frecuentemente expresa el marcador linfocítico CD19 o, menos frecuente CD7; estas también pueden expresar CD56 (fenotipo de células NK), las LMA con inv(16) frecuentemente expresan el marcador de linaje linfocítico-T CD2; y la LMA con la mutación NPM1 típicamente tienen alta expresión de CD33 pero ausente o baja expresión de CD34¹.

Respecto a la expresión de inmunofenotipos aberrantes estos se consideran como: 1) Infidelidad de linaje o coexpresión de antígenos asociados a otro linaje, 2) ausencia de expresión de antígenos específicos de linaje, 3) alteración de la expresión de antígeno, ya sea por sobreexpresión, menor expresión o expresión parcial de cierto antígeno por célula, 4) asincronismo madurativo en el cual, antígenos de estadios inmaduros son coexpresados con antígenos presentes en estadios maduros, 5) fenotipo ectópico o presencia de células con fenotipo no

presente en este tipo de muestra en condiciones normales, 6) características anormales de tamaño y complejidad interna en la población celular^{14,15}.

De acuerdo a sus características antigénicas, la LMA usualmente expresa fenotipos neutrofilicos o de diferenciación monocítica tales como CD13, CD15, CD33, CD64, CD117 y mieloperoxidasa. Como se describió anteriormente los blastos leucémicos pueden expresar antígenos aberrantes de otro linaje, como lo son los antígenos de linaje linfóide que incluyen CD7, CD56, CD2 y CD19. La determinación del linaje puede ser difícil si los blastos leucémicos expresan antígenos de más de una línea celular o demuestra muy pocos antígenos asociados a linaje. Con el advenimiento de citometría de flujo más detallada, aproximadamente 5% de las leucemias agudas demuestran heterogeneidad de linaje, tanto de leucemia bifenotípica (expresión de antígenos de más de un linaje en una sola población de blastos) como leucemia bilineal (dos poblaciones de blastos de diferentes linajes), lo que se relaciona con un comportamiento biológico diferente¹⁶.

Métodos de análisis de leucemia mieloide aguda por citometría de flujo.

Al evaluar la leucemia aguda con citometría de flujo lo que se lleva a cabo es determinar de forma cuantitativa y cualitativa el fenotipo de las células leucémicas, así como también determinar aberrancias fenotípicas que puedan expresar¹⁷.

La definición de la aberrancias identificada por citometría de flujo ha resultado de estudios comparativos entre pacientes con leucemia mieloide aguda conocida y definida por medios citomorfológicos y citogenéticos que confrontan o comparan la expresión de antígenos con sujetos sanos (expresión normal de antígenos en sus células). Y también con otras patologías causantes de citopenias periféricas como deficiencias nutricionales o padecimientos sistémicos de causa no hematológica, que provocan procesos reactivos que son los responsables de las citopenias que se presentan, esto último permite que la citometría de flujo tenga la capacidad de ser útil dentro del diagnóstico diferencial de neoplasias hematológicas¹⁷.

JUSTIFICACIÓN.

La citometría de flujo es capaz de determinar de forma específica el linaje hematopoyético al que pertenecen las células leucémicas así como identificar alteraciones en su expresión fenotípica.

El determinar estas alteraciones de forma temprana puede marcar la diferencia en cuanto al curso de la enfermedad y con ello dar una pauta para la estrategia del tratamiento que impactan en el pronóstico.

La coexpresión de antígenos linfoides correlaciona con los subtipos de LMA de acuerdo a la clasificación de la FAB, expresión fenotípica asincrónica y su correlación con los subtipos de LMA de acuerdo a la FAB, así como fenotipos aberrantes y su correlación con las características clínicas de la LMA. Se ha reportado una prevalencia de 88.6% de fenotipos aberrantes en los casos estudiados, expresión de antígenos de otra línea en 34.3% y asincronismo en la expresión en 82.4%. CD7 es el antígeno linfoide encontrado con mayor frecuencia. Entre los casos de asincronismo el fenotipo más frecuente fue CD117+ y o CD34+ en asociación con CD11c, seguido por CD15 y CD65, correspondiendo a 67.6%, 61.7% y 50% de los casos respectivamente. La expresión de CD117+CD15+ se correlaciona significativamente con tasas de remisión completa y con escasa asociación con alteraciones cromosómicas desfavorables¹⁴.

Debido a que existe poca información acerca de la relevancia clínica en pacientes con LMA que expresan fenotipos aberrantes determinados por inmunofenotipo, intentamos buscar el impacto en las tasas de supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global de pacientes con leucemia mieloide aguda, menores de 60 años, que expresan fenotipos aberrantes al diagnóstico, como lo son la coexpresión de fenotipo linfoide, ausencia de expresión de antígenos de linaje, alteración de la expresión de antígenos (mayor o menor expresión), fenotipos que determinen asincronismos de maduración, características anormales de tamaño y complejidad en la población celular .

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

¿Cuál es la relevancia clínica que tiene la expresión del inmunofenotipo aberrante en blastos leucémicos, de pacientes con LMA menores de 60 años de edad de reciente diagnóstico?

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la relevancia clínica que tiene la expresión del inmunofenotipo aberrante en blastos leucémicos de pacientes con LMA menores de 60 años de reciente diagnóstico.

Objetivos específicos

1. Determinar la frecuencia de inmunofenotipos aberrantes por citometría de flujo de los pacientes mexicanos con LMA menores de 60 años de reciente diagnóstico en el Hospital de Especialidades “Bernardo Sepúlveda” del Centro Médico Nacional Siglo XXI IMSS.
2. Determinar la relación que existe entre la expresión de fenotipo aberrante en células leucémicas y la cifra de leucocitos, al diagnóstico, de pacientes menores de 60 años con leucemia mieloide aguda de reciente diagnóstico.
3. Determinar el impacto que tiene la expresión de inmunofenotipo aberrante en pacientes menores de 60 años con LMA de reciente diagnóstico, sobre la respuesta al día 14 (MO sin blastos), supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global.

HIPÓTESIS.

El inmunofenotipo aberrante en blastos leucémicos, de pacientes con LMA menores de 60 años de edad de reciente diagnóstico tiene relevancia clínica.

Hipótesis específicas

1. La prevalencia del inmunofenotipo aberrante en pacientes con LMA menores de 60 años, es alta.
2. Existe relación entre la expresión de fenotipos aberrantes y el conteo de leucocitos, al diagnóstico en pacientes con LMA menores de 60 años.
3. Existe impacto en las tasas de respuesta al día 14 posterior a la inducción a la remisión, supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global, en pacientes con LMA menores de 60 años con expresión de inmunofenotipo aberrante al diagnóstico.

PACIENTES Y MÉTODOS.

El Servicio de Hematología y el laboratorio de hematología de la UMAE Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS, es un centro de referencia de pacientes con enfermedades hematológicas, tanto para el diagnóstico como para el tratamiento. Entre ellos recibe y concentra un gran número de pacientes con LMA.

En el laboratorio de Hematología especial se cuenta con un citómetro de flujo multiparamétrico y personal especializado que cumple con los estándares de calidad internacional.

Universo de trabajo

Serán incluidos pacientes 18 a 60 años de edad, de cualquier género, derechohabientes, con diagnóstico de LMA que cuenten con estudio morfológico de médula ósea, biopsia de hueso e inmunofenotipo de médula ósea al diagnóstico, realizado en el laboratorio de hematología especial del Servicio de Hematología. En una base de datos recopilada a partir del año 2008 al 2011. En este estudio no se incluyen pacientes con leucemia promielocítica aguda, debido al pronóstico favorable que por sí misma tiene esta entidad con los tratamientos actuales, y que pueden influir sobre las tasas de supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global.

Criterios de Inclusión:

1. Mayores de 18 años hasta 59 años de edad.
2. Cualquier género
3. Con LMA diagnosticada por criterios morfológicos e inmunofenotipo.
4. Sin tratamiento previo para alguna neoplasia mieloide.
5. Con biometría completa al diagnóstico

Criterios de exclusión:

1. Pacientes sin inmunofenotipo al diagnóstico.
2. Pacientes mayores de 60 años de edad.
3. Pacientes con diagnóstico de leucemia promielocítica aguda.

Se utilizará una base de datos de los pacientes con Leucemia Mieloide Aguda (LMA) que cuentan con estudio citomorfológico para su adecuada clasificación como determina la FAB y estudio inmunofenotípico de médula ósea al diagnóstico.

El panel del inmunofenotipo será el aceptado a nivel internacional con el estándar de 4 colores para el estudio de inmunofenotipo en la serie eritroide, mieloide (granulocitos y blastos) y monocitoide.

METODO DE TINCIÓN PARA ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO:

MARCAJE DE ANTIGENOS DE MEMBRANA E INTRACELULARES

Rotular los tubos con un número progresivo y añadir 100 ml de muestra (concentración de células de 10^7 /ml) a cada tubo. En aquellas en donde no se disponga de suficiente número de células (p/e leucopenia) se podrá añadir a los tubos cantidades inferiores de muestras, quedando registrado en el informe. Se añaden cantidades saturantes de anticuerpo entre 5 y 20 ml. La cantidad es la recomendada por el fabricante o bien tras las pruebas de titulación. Agitar los tubos 10 segundos, incubar 15 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente se procede a realizar la lisis de los hematíes y la fijación de los leucocitos con 2 mL de solución de lisis diluida 1/10 en agua destilada del producto "FACSlising solution" (BDB, San José CA USA).

Incubar 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Al término de la incubación, se centrifuga 5 min a 2000 rpm, se decanta el sobrenadante una vez centrifugado, invirtiendo el tubo una sola vez en el contenedor habilitado para ello y se re suspende el botón celular en 2 mL de FACFlow. Se realiza una nueva centrifugación de 15 min a 2000 rpm, tras decantar el sobrenadante invirtiendo el tubo una sola vez en el contenedor habilitado para ello, se re suspende el botón celular en 0.3 ml de FACFlow y se procede a la lectura en el citómetro de flujo FACSCANTO II.

MÉTODO DE LECTURA Y ANÁLISIS CON EL CITÓMETRO DE FLUJO FACSCANTO II.

Se utilizó el método empleado por el grupo EuroFlow con equipo FACSCANTO II de 4 colores y con el software de adquisición y análisis de datos BD Diva.

El análisis de los compartimentos hematopoyéticos en las muestras de médula ósea con citometría de flujo se evaluó y analizó bajo una visión de teoría de conjuntos en la siguiente forma:

- a) Se identifica de forma inicial la distribución celular por medio de análisis de tamaño FSC (forward light scatter) contra complejidad SSC (Sideward light Scatter) que tiene dos propósitos, el primero es obtener un primer conjunto de acuerdo a la distribución celular sobre el cual se realizará el análisis (células nucleadas) y el segundo se depura las poblaciones de detritus celulares que pudieran interferir con el análisis.
- b) Posteriormente se utilizó CD45 contra complejidad (SSC) en el conjunto anterior lo que nos agrupa cada compartimento de acuerdo a su desarrollo o madurez, y agrupa a las células en compartimentos. Serie eritroide, granulocitos, monocitos, linfocitos y el área de progenitores.
- c) Se realizaron combinaciones de marcadores para analizar cada uno de los compartimentos. En este apartado es donde surgen las posibilidades de estandarizar un panel de para análisis de blastos leucémicos.
- d) El panel que se ocupó en el estudio se apega a los estándares de grupos de estudio internacionales como el grupo europeo.
- e) Las combinaciones de anticuerpos para cada tubo fueron:
CD45+/PE, CD45/PerCP. CD45/CD19/CD2, CD45/CD7/CD5, CD45/CD15/CD16, CD45/CD33/CD13, CD117/PE, CD45/CD64/CD14, CD45/CD38/CD34, CD45/CD16/CD56, CD45/CD71/CDGpA, CD45/CD123, CD45/MPO.
- f) Finalmente se realiza el análisis de cada uno de los compartimentos de acuerdo a las ventanas o dot plots en donde se identificaron, cuantificaron y caracterizaron cada una de las poblaciones.

- g) Los resultados se reportaron en un formato ya utilizado en el servicio de hematología especial el cual incluye: identificación del paciente, porcentaje de expresión de antígenos y comentarios de acuerdo a la población blástica.

Variables dependientes:

Supervivencia global

Definición conceptual: Se define como al periodo que transcurre desde el diagnóstico de la enfermedad hasta la muerte del paciente.

Definición operacional: En este trabajo determinaremos como el periodo de tiempo en meses que transcurra desde la fecha del diagnóstico de LMA, hasta la fecha de muerte o fecha de último seguimiento.

Supervivencia libre de enfermedad

Definición conceptual: Esta se define como el tiempo transcurrido desde el diagnóstico de la enfermedad, hasta la fecha de recaída de la misma.

Definición operacional: Consideraremos el tiempo en meses transcurridos desde el diagnóstico de LMA hasta la recaída de la enfermedad, documentada por conteo de más de 20% de blastos en AMO.

Respuesta al día 14

Definición conceptual: Se considera como la ausencia de blastos en aspirado de médula ósea al día 14, posterior a la quimioterapia de inducción a la remisión. Lo que se ha asociado con mejores tasas de supervivencia global en pacientes con LMA menores de 60 años.

Definición operacional: Consideraremos respuesta al día 14 cuando el paciente con LMA de reciente diagnóstico menor de 60 años, en el día 14 post quimioterapia de inducción a la remisión con esquema 7+3 (citarabina + antraciclina), cumpla con 0% de blastos en AMO.

Conteo de leucocitos al diagnóstico

Definición conceptual: Se define como el conteo de leucocitos por milímetro cubico (mm^3), al diagnóstico. Se conoce que la hiperleucocitosis definida como leucocitos por arriba de

100000/mm³, es un factor de riesgo independiente que impacta en las tasas de supervivencia de pacientes con LMA menores de 60 años.

Definición operacional: Consideraremos hiperleucocitosis, a la cifra de leucocitos por arriba de 100000/mm³ al diagnóstico, en pacientes con LMA menores de 60 años de edad.

Variables independientes:

Fenotipo con infidelidad de linaje:

Definición conceptual: Se define a la expresión de antígenos ya sea de superficie o citoplasmáticos, que no pertenecen al linaje hematopoyético de las células en estudio.

Definición operacional: Consideraremos la expresión de fenotipo con infidelidad de linaje en los blastos de pacientes con LMA menores de 60 años, cuando estos expresen por arriba del 20% de uno o más de los siguientes antígenos, no específicos de linaje mieloide: CD7, CD2, CD3, CD4, CD5, CD19, CD10, CD20 y CD22.

Fenotipo con ausencia de expresión de antígenos específicos de linaje

Definición conceptual: Se define como la ausencia de la expresión de antígenos específicos del linaje hematopoyético en estudio.

Definición operacional: Consideraremos al fenotipo con ausencia de expresión de antígenos específicos a la ausencia de expresión de antígenos DR, CD33, CD117, CD13, CD4 y CD14, en los blastos de pacientes con LMA menores de 60 años de reciente diagnóstico.

Fenotipo con alteración de la expresión de antígeno

Definición conceptual: Se define como la sobreexpresión, o expresión parcial de ciertos antígenos específicos de linaje mieloide.

Definición operacional: Consideraremos al fenotipo con alteración de la expresión de antígenos, a la alteración en la expresión y en la intensidad media de fluorescencia de los antígenos específicos de linaje mieloide, por arriba o debajo del 20% respecto a la expresión y de niveles bajo, medio y alto respecto a la intensidad media de fluorescencia, de los blastos de pacientes con LMA menores de 60 años.

Fenotipo con asincronismo madurativo

Definición conceptual: Se define cuando los antígenos de estadios inmaduros son coexpresados con antígenos presentes en estadios maduros.

Definición operacional: Consideraremos al fenotipo con asincronismo madurativo a la expresión de antígenos en las siguientes posibilidades: CD34(+)CD15(+), CD34(+)CD117(-), CD13(-)CD33(+), CD13(+CD33(-), CD117(+CD15(+), DR (+)CD15(+), CD34(+)DR(-).

Fenotipo con características anormales de tamaño y complejidad

Definición conceptual: Se define como la alteración en el tamaño de la población mieloide y la ausencia o hipergranularidad en los blastos.

Definición operacional: Se mide en base a la localización en el gráfico de la población de células mieloides, considerando en base a la distribución normal de las células hematopoyéticas en el tamaño y granularidad como lo son, linfocitos (200-400), monocitos (400), y granulocitos (500-600).

Tamaño de muestra: Serán incluidos todos los estudios de inmunofenotipo de los pacientes con LMA menores de 60 años, de reciente diagnóstico, de los años 2011 al 2012, se estima que se tendrán 30 o 40 casos nuevos por año y de acuerdo a la literatura 60 a 80% de ellos tendrán inmunofenotipos aberrantes.

Análisis estadístico: En el programa SPSS se realizará el análisis de los datos. La descripción de las variables se realizará con medianas y cuartiles o con media e intervalo de confianza del 95% de acuerdo a la distribución de los datos. Se realizarán estudios de correlación entre los meses de supervivencia libre de enfermedad y el porcentaje de inmunofenotipos aberrantes con la r-Pearson o r-Spearman de acuerdo a la distribución de los datos. Se realizarán curvas de supervivencia de Kaplan y Meyer para los grupos de inmunofenotipo aberrante y el grupo sin inmunofenotipo aberrantes.

CONSIDERACIONES ÉTICAS.

Los estudios que se realizarán a los pacientes son los necesarios aceptados mundialmente para el diagnóstico de las neoplasias hematológicas. La muestra médula ósea se obtiene, previa anestesia local y con el consentimiento del paciente. En esta punción se obtienen muestras para el estudio de inmunofenotipo por citometría de flujo, requiriendo de 5-10 ml de muestra. El paciente no se somete a un riesgo extra que el habitual considerando el tipo de enfermedad y el tipo de estudio. Las muestras sólo se utilizan para determinar el panel de anticuerpos recomendados por los grupos de estudio. No se utilizan para otro tipo de estudios genéticos y las muestras no son almacenadas. No se requiere carta de consentimiento.

RECURSOS PARA EL ESTUDIO.

Se cuenta con un citómetro marca FACScanto II de 8 colores, los reactivos para el estudio de inmunofenotipo por citometría de flujo se tienen disponibles en el laboratorio de Hematología especial. La MC. Laura Rabelo Carrasco es experta en citometría de flujo con entrenamiento en el extranjero y más de 5 años de experiencia, realizando e interpretando el procedimiento. Se cuenta con un médico residente de 4º año de Hematología, quien se encargará de recabar los datos y médicos de base que supervisarán el desarrollo de la tesis.

RESULTADOS

En total se analizaron 32 pacientes con LMA menores de 60 años diagnosticados de Enero del 2008 a diciembre del 2012, en el Hospital de Especialidades “Dr. Bernardo Sepulveda” C.M.N. Siglo XXI IMSS, de los cuales 18 fueron mujeres (56.3%) y 14 hombres (43.8%), con una media de edad de 44 años al diagnóstico. (Tabla 1).

TABLA 1. CARACTERISTICAS DEMOGRAFICAS DE LA POBLACION DE PACIENTES CON LMA MENORES DE 60 AÑOS.	
EDAD	Media de 44 (intervalo de 18 a 59 años)
GENERO (%)	Mujeres 56.3% Hombres 43.8%
LEUCOCITOS (/mm³)	Media de 72,611/mm ³ (intervalo de 300 a 389000/mm ³).
DHL	Media de 816UI (intervalo de 208 a 2631UI)
HEMOGLOBINA	Media de 7.5grs/dL (intervalo de 3.8 a 14.2grs/dL).
PLAQUETAS	Media de 53,062/mm ³ (intervalo de 18000 a 196000/mm ³).
SUBTIPOS DE LMA (%)	LMA M1 18.8% LMA M2 40.6% LMA M4 15.6% LMA M5 21.9%

Tabla 1. Se muestran las características clínicas y de laboratorio de los pacientes al momento del diagnóstico.

En esta población de 32 pacientes la hiperleucocitosis se presentó en 8 (25%) de los pacientes y la respuesta al día 14 la alcanzaron 13 pacientes (40.6%). (Figura 1).

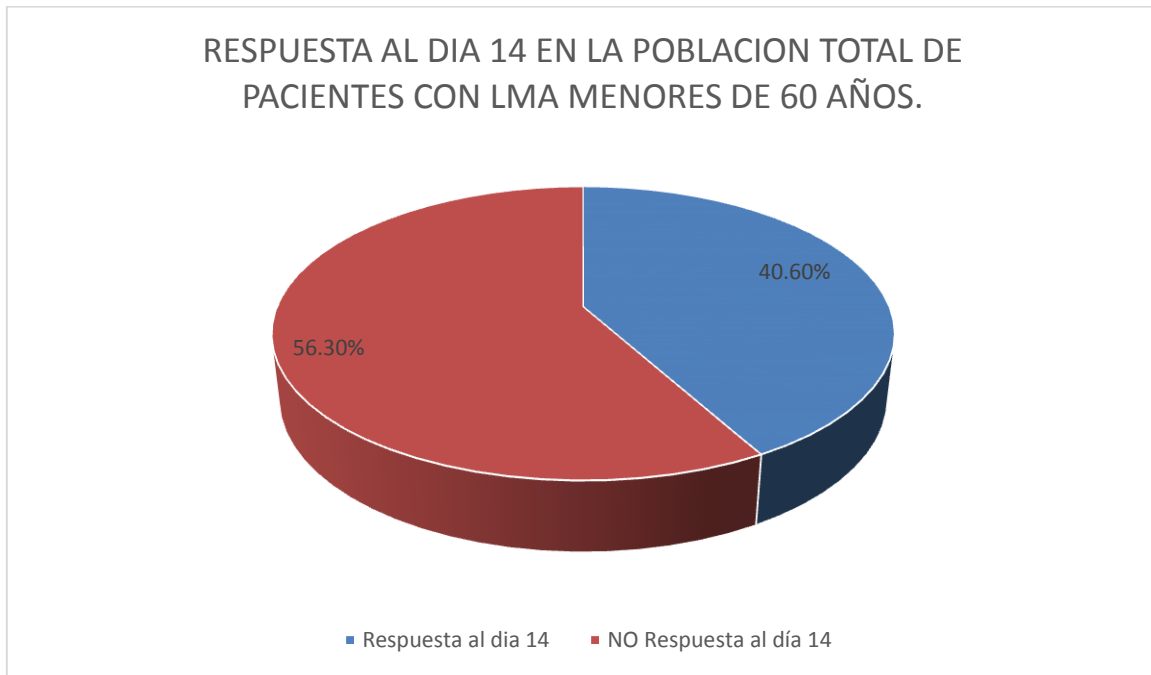


Figura 1. Se muestra el porcentaje de pacientes que alcanzaron respuesta al día 14 de la inducción a la remisión.

La SG fue de 57% a 36 meses en pacientes que alcanzaron respuesta al día 14 (médula ósea sin blastos al día 14), y 22% en pacientes que no alcanzaron RC al día 14. (Figura 2 y 3).

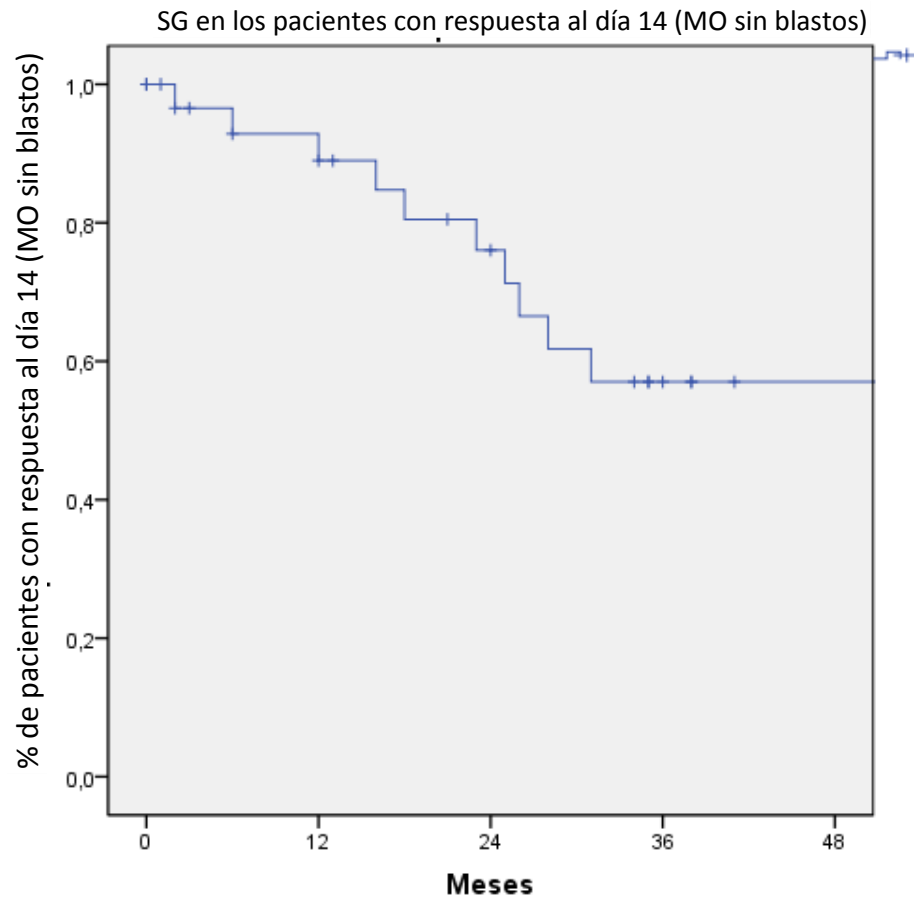


Figura 2. Muestra la SG a 48 meses de pacientes que lograron respuesta al día 14 (MO sin blastos) de la inducción a la remisión.

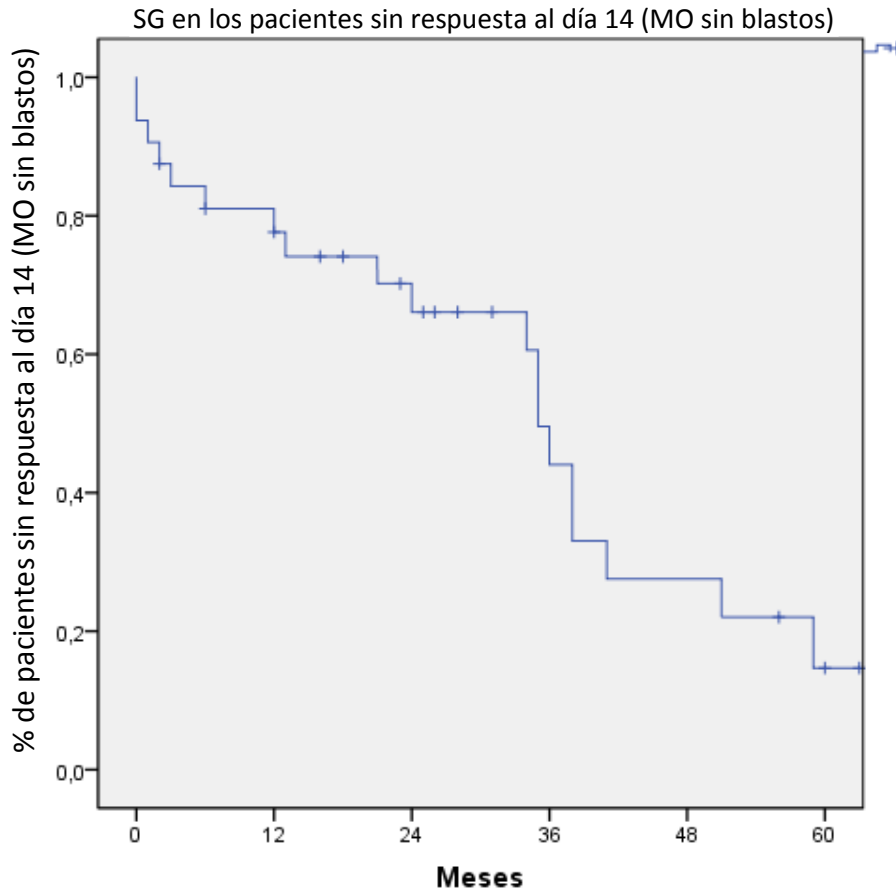


Figura 3. Muestra la SG a 48 meses de pacientes que no lograron respuesta al día 14 (MO sin blastos) de inducción a la remisión.

Se obtuvieron 18 pacientes con caracterización inmunofenotípica completa para fenotipos aberrantes, la edad media al diagnóstico fue de 42 años, de los cuales 11 eran mujeres (66.7%) y 7 hombres (33.3%) (Tabla 2).

**TABLA 2. CARACTERISTICAS DEMOGRAFICAS DE LA POBLACION CON
CARACTERISTICAS FENOTIPICAS COMPLETAS**

EDAD	Media de 42 años (intervalo de 18 a 57 años).
GENERO (%)	Femenino 66.7% Masculino 33.3%
LEUCOCITOS	Mediana 21600/mm ³ (intervalo de 300/mm ³ a 389000/mm ³).
DHL	Mediana 735.5 UI (intervalo de 208 a 2622UI).
HEMOGLOBINA	Mediana de 7.6gr/dL (intervalo de 3.8gr/dL a 14.2gr/dL).
PLAQUETAS	Mediana de 295000/mm ³ (intervalo de 1800/mm ³ a 186000/mm ³).
DIAGNOSTICO (%)	LMA M1 22.2% LMA M4 5.6% LMA M2 44.4% LMA M5 27.8%

Los subtipos de LMA de acuerdo a la clasificación de la FAB al diagnóstico se presentaron, como tipo M1 en 22.2%, M2 44.4%, M4 5.6% y M5 en 27.8% (Figura 4).

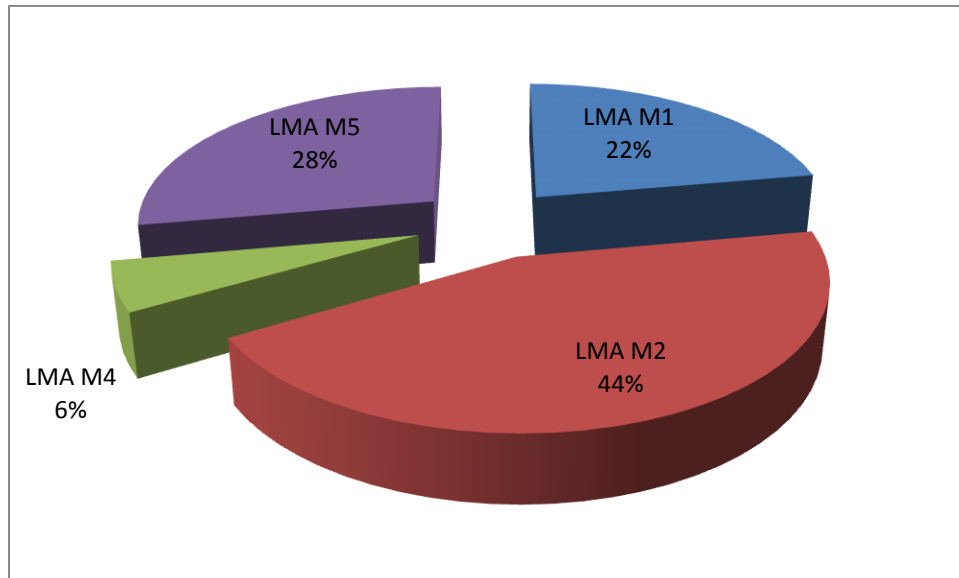


Figura 4. Se muestra la frecuencia de los subtipos de LMA de acuerdo a la clasificación FAB, al momento del diagnóstico de los 18 pacientes con caracterización fenotípica aberrante completa.

Un inmunofenotipo aberrante se observó en 15 pacientes (83.3%), de los 18 con caracterización inmunofenotípica completa (Figura 5), de los cuales el asincronismo madurativo documentado representó el 66.7%, infidelidad de linaje en 27.8%, ausencia de expresión de antígeno específicos en 5.6%, características anormales de tamaño y complejidad en 5.6% y alteración de la expresión de antígenos en ningún paciente (Figura 6).

Figura 5.

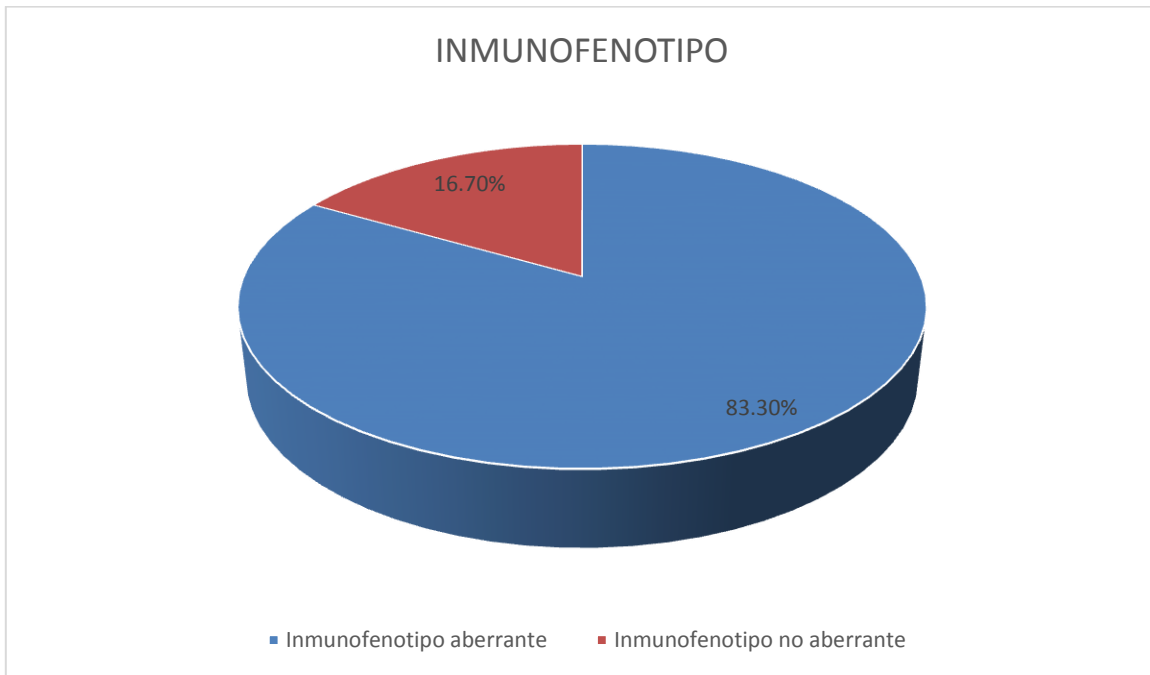


Figura 5. Se muestra la frecuencia en porcentaje, del inmunofenotipo aberrante y no aberrante, al momento del diagnóstico

Figura 6.

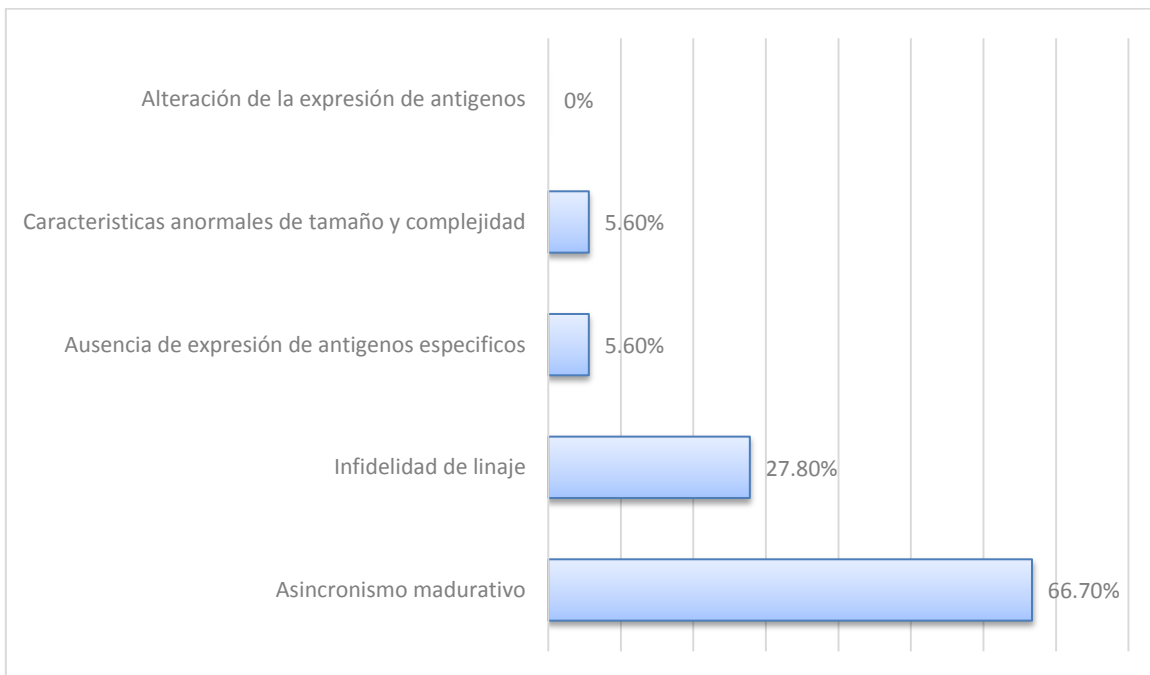


Figura 6. Se muestra la frecuencia de los diferentes tipos de inmunofenotipo aberrante en pacientes con LMA menores de 60 años al momento del diagnóstico.

Respecto a las diferencias clínicas entre pacientes con inmunofenotipo no aberrante y aberrante, se observó que hay cierta tendencia a que el conteo de leucocitos es mayor en el grupo de inmunofenotipo aberrante (Figura 7), así como al conteo de plaquetas es menor en éste mismo grupo, respecto al grupo de no aberrantes (Figura 8), sin embargo no se observó diferencia estadísticamente significativa. (Tabla 3).

Figura 7.

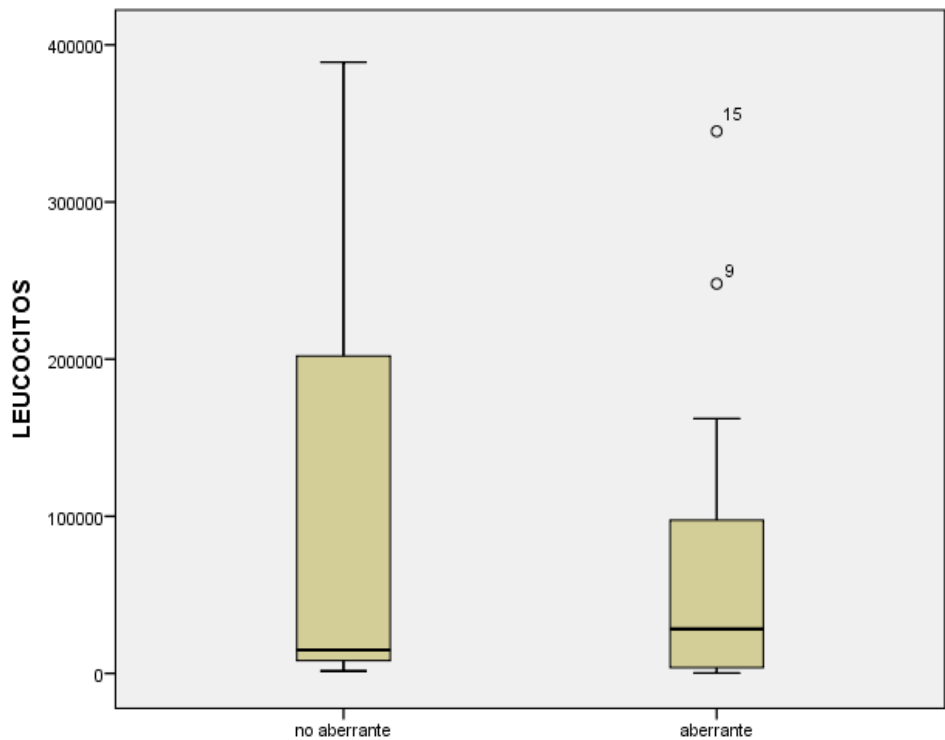


Figura 8.

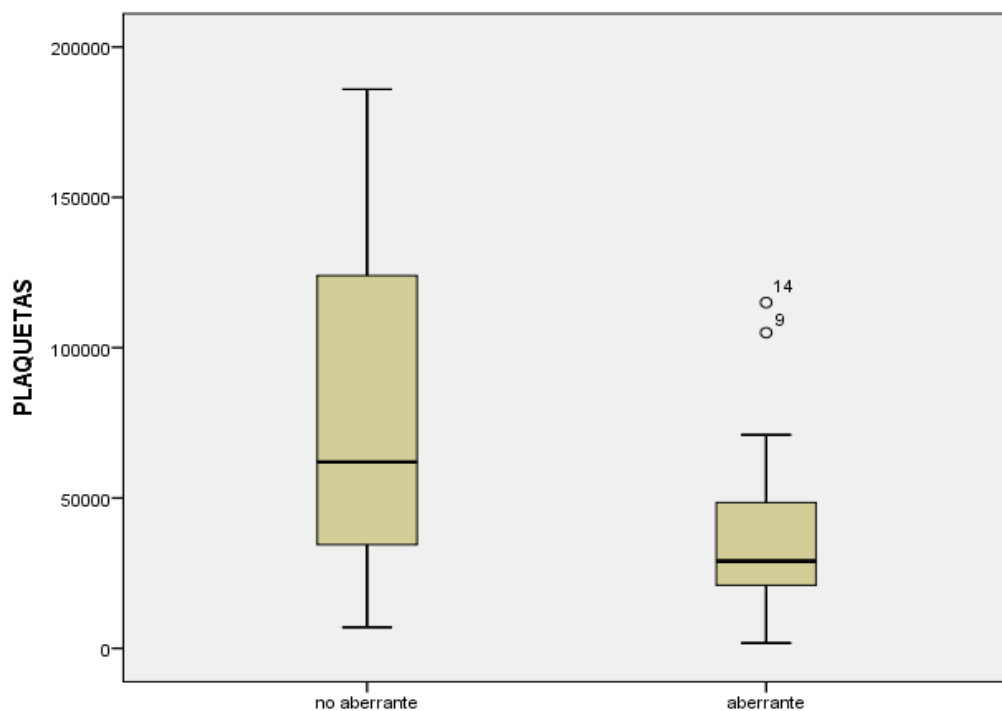
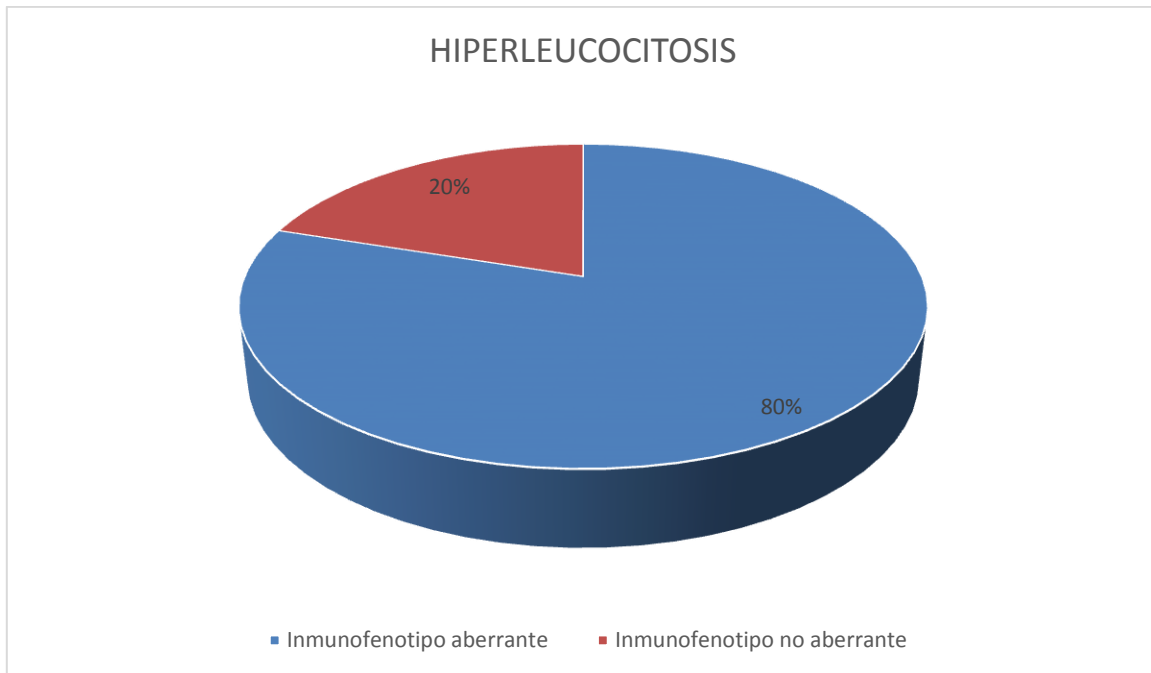


TABLA 3. DIFERENCIAS CLINICAS ENTRE PACIENTES CON INMUNOFENOTIPO NO ABERRANTE Y ABERRANTE

	Inmunofenotipo no aberrante (N= 3)	Inmunofenotipo aberrante (N=15)	Valor de P
	Mediana	Mediana	
Edad	49 años (18 a 54 años)	44 años (20-57 años)	0.82
Hemoglobina	7.7gr/dL (4-11gr/dL)	7.6gr/dL(3.8-14.2gr/dL)	0.55
Plaquetas	62000/mm3 (7000-186,000/mm3)	29000/mm3 (18000-115000/mm3)	0.5
Leucocitosis	149000/mm3(1500-389000/mm3)	283000/mm3(300-345000/mm3)	0.9
DHL	1018UI(600-2622UI)	680UI(208-1717UI)	0.36

La hiperleucocitosis (leucocitos > 100,000/mm³) al diagnóstico, en el grupo de inmunofenotipo aberrante en 4 (80%), respecto del grupo de inmunofenotipo no aberrante que se presentó en 1 (20%) paciente. (Figura 9)

Figura 9.



Se muestra el porcentaje de pacientes con fenotipo aberrante e hiperleucocitosis al diagnóstico.

En el grupo de pacientes con inmunofenotipo aberrante lograron respuesta completa al día 14, 5 (27.7%) pacientes, respecto al grupo de inmunofenotipo no aberrante que alcanzaron 2 (11.1%) pacientes, con un valor de $p=0.58$.

Las tasas de SG se observaron con una mediana de 21 meses en el grupo de inmunofenotipo aberrante, así como de 16 meses en el grupo de inmunofenotipo no aberrante y respecto a la SLE se obtuvieron mediana de 16 meses y 15 meses respectivamente, sin observarse diferencia estadística entre estas. Como se muestra en la tabla 4.

TABLA 4. CARACTERISTICAS CLINICAS ENTRE PACIENTES CON INMUNOFENOTIPO NO ABERRANTE E INMUNOFENOTIPO ABERRANTE

	Inmunofenotipo no aberrante (N=3)	Inmunofenotipo aberrante (N=15)	Valor de P
Respuesta al día 14	2 pacientes	5 pacientes	0.58
Hiperleucocitosis	4 pacientes	1 pacientes	0.8
SG	16 meses	21 meses	0.49
SLE	16 meses	15 meses	0.9

Se determinó por regresión logística que el subtipo de inmunofenotipo aberrante, asincronismo madurativo tuvo impacto estadístico sobre la SG, con una $p=0.017$. De igual forma no fue posible comparar las tasas de SG y SLE entre pacientes con inmunofenotipo aberrante vs inmunofenotipo no aberrante, por el número de casos analizados.

En la figura 10 y 11, se representan las curvas de SG y SLE de los dos grupos, con un valor de $P= 0.76$.

Figura 10.

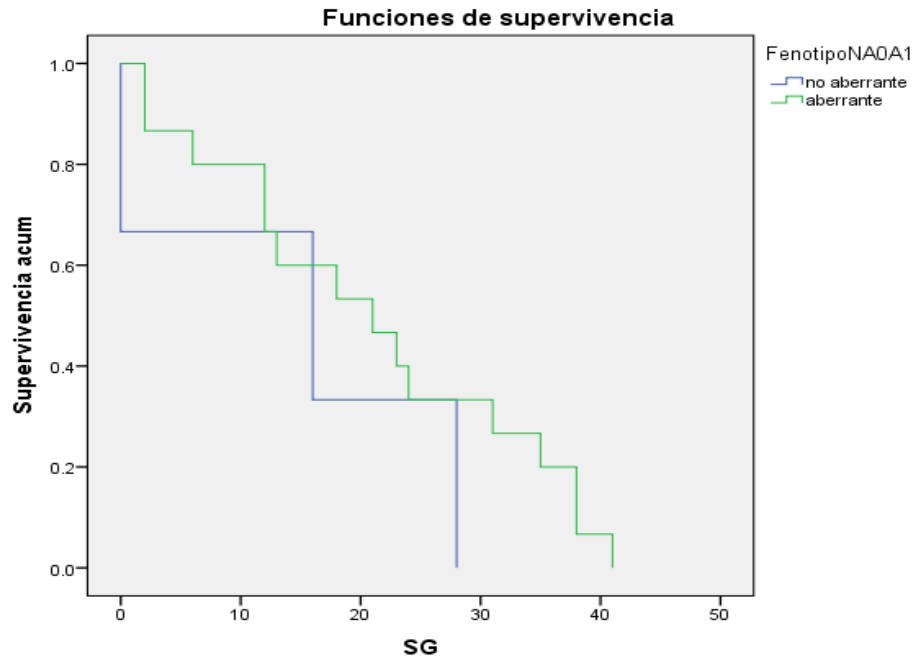
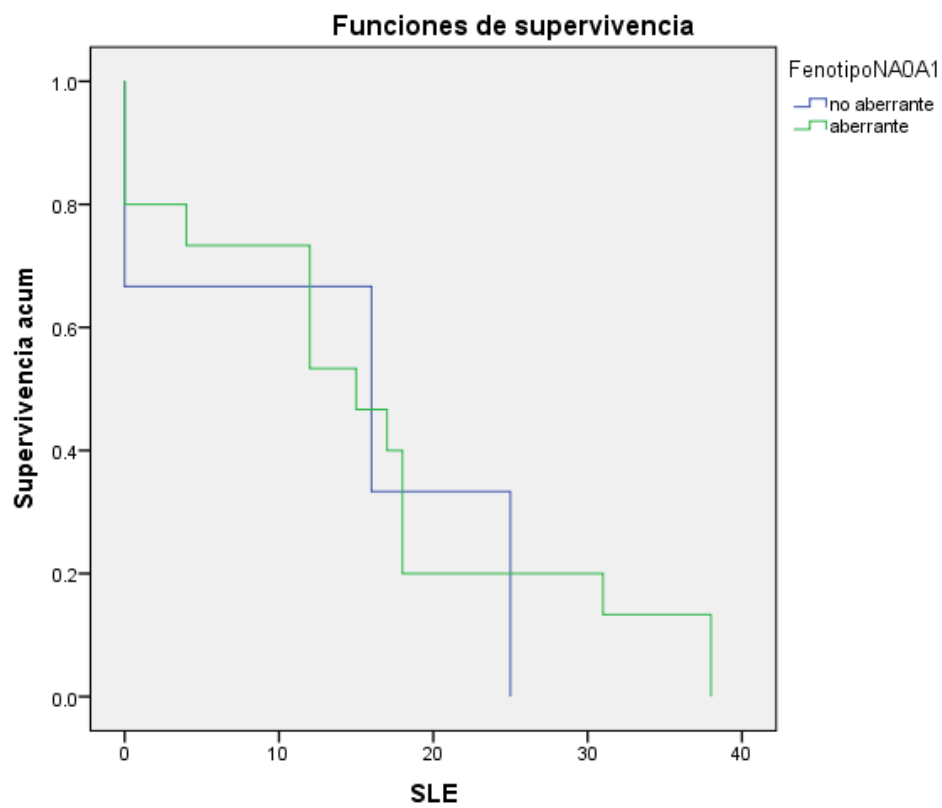


Figura 11.



DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La prevalencia del inmunofenotipo aberrante al diagnóstico en LMA se ha reportado en aproximadamente 88.6% de los pacientes, siendo la más frecuente el asincronismo en la expresión de antígenos en 82.4%. Sin embargo existe poca información acerca del impacto clínico de este factor en cuanto a las características clínicas y respuestas al tratamiento.

En éste estudio no incluimos a paciente con LMA M3 debido a las tasas de respuesta y supervivencia per se de este subtipo de leucemia mieloide. Así como excluimos también pacientes mayores de 60 años eliminando el factor de peor pronóstico que es la edad en éstos casos.

Establecimos la frecuencia del inmunofenotipo aberrante en el grupo de pacientes con caracterización inmunofenotípica completa, coincidiendo con los reportes establecidos en la literatura internacional. Coincidiendo en la frecuencia del inmunofenotipo aberrante en pacientes con LMA de reciente diagnóstico, así como observamos que el subtipo más frecuente es el asincronismo madurativo. En cuanto a la relevancia clínica se observó cierta tendencia a presentar con mayor frecuencia hiperleucocitosis y trombocitopenia en el grupo de pacientes con inmunofenotipo aberrante.

Con respecto a las diferencias estadísticas en los resultados, una explicación es el pequeño número de casos incluidos en el estudio.

Por lo que concluimos que en pacientes con LMA menores de 60 años de edad existe una alta frecuencia de marcadores inmunofenotípicos aberrantes, siendo el más frecuente el asincronismo en la maduración, así como corroboramos la importancia pronóstica de alcanzar la RC al día 14 en pacientes con LMA menores de 60 años. Deberán realizarse mas estudios con las mismas características incluyendo mayor número de casos y probablemente obtenerse diferencias estadísticas entre los pacientes con inmunofenotipo aberrante y no aberrante. Cabe mencionar

también que este es el primer estudio en México, que analiza la frecuencia del inmunofenotipo aberrante, ya que nuestro Hospital es el único centro donde se realiza la caracterización inmunofenotípica completa, contando con la certificación del grupo EuroFlow.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Hartmut Döhner, Elihu H. Estey., Sergio Amadori et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2010. 115:453-474.
2. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* 2013 Jan;63(1):11-30.
3. Erick Crespo Solis. *Revista de Hematología* Vol. 11, Supl. 1, Abril-Mayo 2010; p.37-39.
4. Guía de Práctica Clínica de Diagnóstico y tratamiento de la Leucemia Mieloide Aguda. México; Instituto Mexicano del Seguro Social, 2010.
5. Lichtman M, Kipps T, Sleigshon U. *Williams Hematology* 8e, Chap 89. 2010.
6. Richard L. Bakst, Martin S. Tallman, Dan Douer and Joachim Yahalom. How I treat extramedullary acute myeloid leukemia. *Blood* 2011.118:3785-3793.
7. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J et al. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia. November 1997. *J Clin Oncol* 1999;17:3835-3849.
8. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. eds. *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (ed 4th)*. Lyon: IARC; 2008.
9. Harousseau JL, CahnJY, Pignon B, et al: Comparison of autologous bone marrow transplantation and intensive chemotherapy as postremission therapy in adult acute myeloid leukemia. The Group Ouest Est Leucemies aigues Myeloblastiques (GOELAM). *Blood* 1997 90:2978, 1997.
10. Koreth J, Schlenk R, Kopecky KJ, et al: Allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia in first complete remission; systematic review and meta-analysis of prospective clinical trials. *JAMA* 2009;301:2349.

- 11 Hewlett J, Kopecky KJ, Head D, et al: A prospective evaluation of the roles of allogeneic marrow transplantation and low-dose monthly maintenance chemotherapy in the treatment of adult acute myelogenous leukemia (AML): A Southwest Oncology Group study. *Leukemia* 1995;9:562.
- 12 Craig F., Foon K., Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood* 2008, 111 (8):3941- 3967.
- 13 Bene MC, Castoldi G, Knapp W, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 1995;9:1783-1786.
- 14 Daniella M.M. Bahia, M. Yamamoto, M de L. L.F. Chauffale, Eliza Y.S.Kimura, J.O. Bordin, Ma. A. Filgueiras, J. Kerbauy. Aberrant phenotypes in acute myeloid leukemia: a high frequency and clinical significance. *Haematologica* 2001;86:801-806.
- 15 Al-Mwali A, Gillis D, Hissari P, et al. Incidence, sensitivity and specificity of leukemia associated phenotypes in acute myeloid leukemia using specific five-color multiparameter flow cytometry. *Am J Clin Pathol* 2008;129:934-945.
- 16 Fiona E. Craig and Kenneth A. Foon et al. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasm. *Blood* 2008;111:3941-3967
- 17 Del Cañizo M, Fernández E, López A. Immunophenotypic analysis of myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2003,88(04).

ANEXOS.

Tabla 1. Leucemia mieloide aguda, neoplasias relacionadas a precursores, y leucemias de linaje ambiguo.

Categorías

Leucemia mieloide aguda con anomalías genéticas recurrentes

LMA con t(8;21)(q22;q22);RUNX1-RUNX1T1
LMA con inv (16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11
LPA con t(15;17)(q22;q12); PML-RARA
LMA con t(9;11)(p22;q23); MLLT3-MLL
LMA con t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214
LMA con inv (3)(q21q26.2) o t(3;3)(q21;q26.2);RPN1-EVI1
LMA (megacarioblastica) con t(1;22)(p13;q13); RBM15-MKL1
Entidad provisional: LMA con mutación NPM1
Entidad provisional: LMA con mutación CEBPA

Leucemia mieloide aguda con cambios relacionados a mielodisplasia

Neoplasia mieloide relacionada a terapia

Leucemia mieloide aguda, no especificada

Leucemia mieloide aguda con mínima diferenciación
Leucemia mieloide aguda sin maduración
Leucemia mieloide aguda con maduración
Leucemia mielomonocítica aguda
Leucemia monoblastica/monocítica aguda
Leucemia aguda eritroide
Leucemia eritroide pura
Eritroleucemia
Leucemia megacarioblastica aguda
Leucemia basofílica aguda
Panmielosis aguda con mielofibrosis (mielofibrosis aguda, mioesclerosis aguda)

Sarcoma mieloide

Proliferaciones mieloides relacionados a síndrome de Down

Mielopoyesis anormal transitoria
Leucemia mieloide asociada con síndrome de Down

Neoplasia de células dendríticas blasticas plasmocitoides

Leucemias agudas de linaje ambiguo

Leucemia aguda indiferenciada
Leucemia aguda de fenotipo mixto con t(9;22)(q34;q11.2);BCR-ABL1
Leucemia aguda de fenotipo mixto con t(v;11q23); rearreglo MLL
Leucemia aguda de fenotipo mixto, B/mieloide, NOS
Leucemia aguda de fenotipo mixto, T/mieloide, NOS
Entidad provisional: Leucemia/linfoma linfoblastica-natural killer (NK)

Tabla 2. Expresión de marcadores de superficie celular y citoplasmáticos para el diagnóstico de leucemia mieloide aguda y leucemia aguda de fenotipo mixto.

Expresión de marcadores para el diagnóstico

Diagnóstico de leucemia mieloide aguda	
Precusores	<i>CD34, CD38, CD117, CD133, HLA-DR</i>
Marcadores granulocíticos	<i>CD13, CD15, CD16, CD33, CD65, MPOc</i>
Marcadores monocíticos	<i>NSE, CD11c, CD14, CD64, lisosima, CD4, CD11b, CD36, NG2 homologa.</i>
Marcadores megacariocíticos	<i>CD41(GP IIb/IIIa), CD61(GPIIIa), CD42(GP1b)</i>
Marcadores eritroides	<i>CD235a (glicoforina A)</i>
Diagnóstico de leucemia aguda de fenotipo mixto	
Linaje mieloide	<i>MPO o evidencia de diferenciación monocítica (al menos dos de los siguientes: NSE, CD11c, CD14, CD64, lisosima)</i>
Linaje-B	<i>CD19 (intenso) con al menos uno de los siguientes: CD79a, cCD22, CD10, o CD19 (débil) con al menos dos de los siguientes: CD79a, cCD22, CD10</i>
Linaje-T	<i>cCD3, o CD3 de superficie.</i>

NSE: Esterasa no específica; MPOc: mieloperoxidasa citoplasmática.

Tabla 3. Reporte estandarizado para correlación citogenética y molecular en estudios clínicos de LMA

Grupo genético	Subgrupo
Favorable	<i>t(8;21)(q22;q22);RUNX1-RUNX1T1 inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); CBF-MYH11. Mutación NPM1 sin FLT3-ITD (cariotipo normal) Mutación CEBPA (cariotipo normal)</i>
Intermedio-I	<i>Mutación NPM1 y FLT3-ITD (cariotipo normal) NPM1 no mutado y FLT3-ITD (cariotipo normal) NM1 no mutado sin FLT3-ITD (cariotipo normal)</i>
Intermedio-II	<i>t(9;11)(p22;q23);MLLT3-MLL Anormalidades citogenéticas no clasificadas como favorables o desfavorables.</i>
Desfavorable	<i>Inv(3)(q21q26.2) o t(3;3)(q21;q26.2); RPN1-EVI1 t(6;9)(p23;q34);DEK-NUP214 t(v;11)(v;q23); rearreglo MLL -5 o del(5q); -7anormalidad (17p); cariotipo complejo.</i>

HOJA DE RECOLECCION DE DATOS

Lugar y Fecha: _____.

Nombre del paciente: _____ Edad: _____.

Número de seguridad social: _____ Fecha del diagnóstico: _____

Cifra al diagnóstico de:

Leucocitos: _____ Hemoglobina: _____ Neutrofilos: _____ .

Plaquetas: _____ Deshidrogenasa láctica (DHL): _____ .

Porcentaje de blastos leucémicos en médula ósea: _____ .

Clasificación morfológica de la LMA de acuerdo a la FAB: _____ .

Inmunofenotipo de la clona leucémica al diagnóstico:

_____ .

Porcentaje de blastos en médula ósea al día 14 posterior a quimioterapia de inducción a la remisión: _____.

Meses de supervivencia libre de enfermedad: _____.

Meses de supervivencia global posterior al diagnóstico: _____ .