



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**SECRETARÍA DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN**

**“Fibrosis medular como factor pronóstico en pacientes adultos con Leucemia
Linfoblástica Aguda: experiencia de un centro de referencia en México”.**

TESIS DE POSGRADO

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN HEMATOLOGÍA**

**PRESENTA:
DR. ANA CATALINA COOKE TAPIA**

**TUTOR DE TESIS:
DRA. ROBERTA DEMICHELIS GÓMEZ**

Ciudad de México, julio de 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

DR. SERGIO PONCE DE LEÓN ROSALES

Director de Enseñanza

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

DRA. DÉBORAH MARTÍNEZ BAÑOS

Profesor Titular del Curso de Hematología

Departamento de Hematología

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

DRA. ROBERTA DEMICHELIS GÓMEZ

Tutor de Tesis

Departamento de Hematología

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

DRA. ANA CATALINA COOKE TAPIA

Residente de Hematología

Departamento de Hematología

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

CONTENIDO

	PAG.
AGRADECIMIENTOS	VI
ABREVIATURAS	VII
RESUMEN	VIII
INTRODUCCIÓN	1-8
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
JUSTIFICACIÓN	2
FUNDAMENTO TEÓRICO	2
OBJETIVOS	7
PREGUNTA CENTRAL	8
HIPÓTESIS	8
METODOLOGÍA	9-20
UNIVERSO	9
CRITERIOS DE INCLUSIÓN	9
CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	9
DEFINICIÓN OPERACIONAL DE LAS VARIABLES	10
DISEÑO DEL ESTUDIO	18
INSTRUMENTO	19
ANÁLISIS DE DATOS	20
PLAN DE TRABAJO	20
IMPLICACIONES ETICAS	20
RESULTADOS	21-27
DISCUSIÓN	28-31
CONCLUSIONES	32
REFERENCIAS	33

LISTA DE TABLAS

PAG

TABLA I. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES AL DIAGNÓSTICO DE ACUERDO CON PRESENCIA O NO DE FIBROSIS SIGNIFICATIVA POR ESCALA MODIFICADA DE BAUERMEISTER

21

TABLA II. FIBROSIS EN MÉDULA ÓSEA DESCRITA POR VOLUMEN DE FIBRAS DE RETICULINA Y ESCALA MODIFICADA DE BAUERMEISTER AL DIAGNÓSTICO Y POST-INDUCCIÓN

24

TABLA III. REDUCCIÓN DE LA FIBROSIS POST-INDUCCIÓN DE ACUERDO CON LAS CARACTERÍSTICAS AL DIAGNOSTICO

26

LISTA DE FIGURAS

	PAG
FIGURA 1. TINCIÓN TRICRÓMICA DE MASSÓN EN BIOPSIA DE MÉDULA ÓSEA.	18
FIGURA 2. CORRELACIÓN ENTRE LA DESCRIPCIÓN DE LA FIBROSIS POR VOLUMEN DE FIBRAS DE RETICULINA Y ESCALA MODIFICADA DE BAUERMEISTER	24
FIGURA 3 A. Y B. SUPERVIVENCIA LIBRE DE RECAÍDA (A.) Y SUPERVIVENCIA GLOBAL (B.) DE ACUERDO CON REDUCCIÓN O NO DE $\geq 50\%$ DE FIBROSIS MEDULAR POST-INDUCCIÓN	26
FIGURA 4 A. Y B. SUPERVIVENCIA LIBRE DE RECAÍDA (A.) Y SUPERVIVENCIA GLOBAL (B.) EN PACIENTES CLASIFICADOS EN TRES GRUPOS DE RECUCIÓN.	27

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por el apoyo recibido estos tres años fuera de mi país de origen.

A mi pareja por su constante motivación.

A mis compañeros de residencia y todo el personal administrativo y científico del Departamento de Hematología del Instituto de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán por su compañerismo y palabras de aliento en momentos de dificultad.

A mis profesores, en especial a la Dra. Roberta Demichelis, por su apoyo para la elaboración de esta tesis.

ABREVIATURAS

En orden de aparición:

LLA	Leucemia linfoblástica aguda
SG	Supervivencia global
MO	Médula ósea
RC	Respuesta completa
SLP	Supervivencia libre de progresión
SLR	Supervivencia libre de recaída
SEER	<i>Surveillance, Epidemiology, and End Results Program</i> (por sus siglas en inglés)
SP	Sangre periférica
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
CXCL12-CAR	Célula reticular con ligando de citosinas 12
EMR	Enfermedad mínima residual
DFR	Densidad de fibras de reticulina
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i> (por sus siglas en inglés)
INCMNSZ	Instituto de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
FECG	Factor estimulante de colonias de granulocitos
OMS	Organización Mundial de la Salud
CL	Células leucémicas
SCF	<i>Stem cell factor</i> (por sus siglas en inglés)

RESUMEN

INTRODUCCIÓN:

El pronóstico de los pacientes con leucemia linfoblástica aguda (LLA) es pobre. En niños, el impacto de la fibrosis medular al diagnóstico ha sido descrito con resultados inconsistentes, en adultos no existe información sobre el significado pronóstico de la misma en LLA. El objetivo de este estudio fue describir el impacto pronóstico de la fibrosis medular en pacientes adultos con LLA.

JUSTIFICACIÓN:

En Estados Unidos, los adultos con LLA tienen una supervivencia global (SG) a 5 años de 42-63% para los adolescentes y adultos jóvenes, 24% para aquellos entre 40-59 años y 17% para los mayores de 60 años. En México la mediana de edad al diagnóstico de la LLA es de 30 años, con una SG a 3 años de 21%. Ante el pobre pronóstico de nuestros pacientes es necesario encontrar mecanismos alternos para mejorar la estratificación de riesgo con los recursos que tenemos disponibles.

OBJETIVOS:

Describir el impacto de la presencia de fibrosis medular al diagnóstico y su reducción post-inducción sobre el pronóstico de pacientes adultos con LLA en una institución de tercer nivel de México.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Se realizó tinción tricrómica de Masson y descripción de la fibrosis en médula ósea (MO) por escala modificada de Bauermeister y cuantificación del volumen de fibras de reticulina. Los pacientes fueron clasificados en 3 grupos: sin fibrosis significativa al diagnóstico (grupo 1), con fibrosis significativa al diagnóstico y reducción de <50% del volumen de fibras de reticulina (grupo 2) y con fibrosis significativa al diagnóstico y reducción de $\geq 50\%$ del volumen de fibras de reticulina (grupo 3).

RESULTADOS:

Incluimos 88 biopsias de MO de 44 pacientes. La mediana de edad al diagnóstico fue de 27 años, 46% tenían cariotipo normal y 23% presentaron cromosoma filadelfia al diagnóstico. Un 71% de los pacientes alcanzaron remisión completa (RC) y 59% recayeron. Veintinueve pacientes (66%) tuvieron fibrosis significativa al diagnóstico, la mediana de volumen de fibras de reticulina al diagnóstico fue de 15.3% y redujo a 9.5% post-inducción. La presencia de fibrosis al diagnóstico no tuvo impacto pronóstico, pero su reducción post-inducción sí. Aquellos que lograron una reducción $\geq 50\%$ en el volumen de fibras de reticulina presentaron menor falla a inducción (10 vs 46%, $p=.018$) y tuvieron una supervivencia libre de recaída (SLR) (12.1 meses vs. 10.5 meses, $p=.037$) y SG (28.3 meses vs 13.1 meses, $p=.028$) más largas. Los pacientes en el grupo 3 tuvieron SLR y SG más largas comparados con los pacientes en los otros grupos.

CONCLUSIÓN:

Este es el primer estudio en demostrar que la reducción de la fibrosis medular post-inducción en adultos con LLA sí tiene un impacto pronóstico positivo.

Introducción

La LLA es una enfermedad hematológica que se caracteriza por una proliferación descontrolada de células linfoides inmaduras. Su incidencia varía entre países. En un análisis internacional se reportó que Costa Rica presentaba la incidencia más elevada con 2.12 casos por 100,000 personas-año y la República Checa, la más baja con 1.08 casos por 100,000 personas-año.¹ En Estados Unidos, la incidencia ajustada para la edad es de 1.58 casos por 100,000 personas-año y representa el 20% de las leucemias en adultos.²

En las últimas décadas la supervivencia ha mejorado sobre todo en la población pediátrica alcanzando SG a 5 años de hasta 90%,^{1,3} pero estos resultados no se han logrado reproducir con el mismo éxito en la población adulta. Según datos del *Surveillance, Epidemiology, and End Results Program (SEER)* los adultos tienen SG a 5 años de 42-63% para los adolescentes y adultos jóvenes, 24% para aquellos entre 40-59 años y 17% para los mayores de 60 años comparado con SG de hasta 89% en niños.⁴

Planteamiento del Problema

En México la mediana de edad al diagnóstico de la LLA es de 30 años, con una SG a 3 años de 21%,⁵ datos desalentadores con respecto a estadísticas internacionales. Por esta razón es necesario encontrar mecanismos alternos para mejorar el pronóstico de nuestros pacientes con los recursos que tenemos disponibles.

Es conocido que los pacientes con leucemia aguda presentan mayor fibrosis medular al diagnóstico que pacientes con otras enfermedades neoplásicas,⁶ y que la fibrosis reduce de manera significativa posterior a tratamiento.⁷⁻¹¹ Estudios previos han descrito de manera contradictoria el papel del microambiente medular y la fibrosis en el pronóstico de la LLA. Algunos autores proponen que la presencia de fibrosis en la MO sirve como santuario a los blastos, reduciendo la respuesta a quimioterapia.^{12,13} En otros reportes clínicos en pacientes pediátricos, la fibrosis en MO se asoció a menores cuentas de leucocitos y blastos en sangre periférica (SP), características usualmente asociadas a mejor pronóstico.^{14,15}

Justificación y uso de resultados

La fibrosis en MO puede ser estimada por evaluación directa de la biopsia con tinciones especiales como la tricrómica de Masson o por estimación indirecta a través de niveles en suero de citocinas como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-por sus siglas en inglés).¹⁶⁻¹⁹ Hasta el momento no existe en la literatura descripción del rol pronóstico de la fibrosis en MO en la población adulta con LLA. Ante el pobre pronóstico de nuestros pacientes, planteamos la posibilidad de evaluar el microambiente medular de manera indirecta a través de la evaluación morfológica de la fibrosis medular.

Los resultados obtenidos de esta investigación serán de beneficio para todas aquellas instituciones que se encarguen del cuidado de pacientes mayores de 18 años con diagnóstico de LLA.

Fundamento Teórico

Existen micro-nichos en la MO, de los cuales dos están bien descritos, el micro-nicho vascular que sirve como barrera entre las células madre hematopoyéticas y la circulación y el micro-nicho endosteal. Éste está compuesto por osteoblastos y células del estroma incluida la célula reticular con ligando de citosinas 12 (CXCL12-CAR).²⁰ Las células del estroma producen fibras de reticulina y colágeno que, en estrecha relación con el endotelio vascular, proveen soporte a las células hematopoyéticas.

Existen vías de señalización entre el endotelio vascular y los blastos linfoides con regulación hacia la baja de la apoptosis a través de aumento de bcl-2 y bcl-xL. Los blastos linfoides producen citocinas adhesivas como LFA-1 y VLA-4, VLA-4 se une a VCAM-1 y a la fibronectina en la superficie de las células estromales. Los blastos linfoides y las células estromales producen TGF β 1 y BMP-6 que aumenta la fibrosis medular.^{12,13,20,21} La interacción entre los blastos linfoides por CXCR4 y la célula reticular con ligando de citosina 12 por CXCL12 aumenta la producción de IL-8 a través del NF κ B y JNK/AP-1 y el aumento de IL-8 aumenta la angiogénesis.²⁰ El microambiente medular es hipóxico y esto aumenta el HIF-1 α que a su vez aumenta la interacción CXCL12-CXCR4 que permite la supervivencia de los blastos con gran expresión de CXCR4.²⁰

Mudry R. y colaboradores evaluaron el efecto protector de la interacción entre VLA-4 y VCAM-1 exponiendo blastos linfoides cultivados con o sin células estromales a citarabina y etopósido con posterior

evaluación de su viabilidad y lo compararon con los resultados obtenidos al agregar células estromales tratadas con anticuerpos antiVCAM-1. Encontraron que aquellos blastos linfoides cultivados con células estromales tenían mayor viabilidad luego del tratamiento con quimioterapia y que esta protección se perdía al agregar anticuerpos antiVCAM-1.¹²

Aguayo A. y colaboradores evaluaron de manera retrospectiva 208 biopsias de MO de 192 pacientes adultos referidos al departamento de Leucemias del *MD Anderson Cancer Center* y las compararon con 16 biopsias de pacientes con tumores sólidos que no tenían evidencia de infiltración. Se midieron además el VEGF, FGFβ, HGF, TNFα. De todos los pacientes analizados, 20 tenían LLA. Encontraron mayor vascularidad en pacientes con LLA al comparar con controles ($p < 0.05$), que el VEGF no se aumenta de manera significativa en la LLA con respecto a controles (28.16 vs 26.74 pg/mL), pero sí presentaron aumento de FGFβ, HGF y TNFα.¹⁷

Faderl S. y colaboradores evaluaron de manera prospectiva las concentraciones séricas de VEGF, FGFβ, IL-1, IL-6, IL-1Rα, IL-8, VEGF-R1, VEGF-R2 y TPO de 95 pacientes adultos con reciente diagnóstico de LLA tratados en el *MD Anderson Cancer Center* con esquema HyperCVAD y un seguimiento de 2.5 años. Todos los factores estaban elevados en pacientes con LLA ($p < 0.01$) excepto VEGF, se encontró que el riesgo relativo de muerte fue mayor en pacientes que tenían VEGF menor a 19.1 pg/mL (RR 4.16, $p = .008$); VEGF-R1 mayor de 482 pg/mL (RR 7.69 $p = .0045$), VEGF-R2 mayor de 8222 pg/mL (RR 3.78, $p = .021$), manteniendo significancia estadística para el riesgo de muerte en el análisis univariado el VEGF, IL1Rα y VEGF-R2.¹⁶

Aref S. y colaboradores evaluaron las biopsias de MO de 25 pacientes adultos con reciente diagnóstico de LLA B y lo compararon con biopsias de 13 individuos sanos. Midieron además niveles séricos de factores proangiogénicos (VEGF, TNFα y MMP-9) y factores inhibidores de la angiogénesis (endostatina). Encontraron disminución en los niveles séricos de VEGF y MMP-9 al diagnóstico ($p < 0.001$, $p = .004$) y aumento a niveles casi normales a la remisión; aumento de los niveles de TNFα y endostatina al diagnóstico ($p > 0.05$), con reducción de los niveles de TNFα a la remisión, pero sin cambios en los niveles de endostatina. Ellos plantean que al diagnóstico existe un consumo elevado de VEGF y MMP-9 medular de tal manera que no es expresado en suero.¹⁸

Dosen-Dahl G. y colaboradores cultivaron células progenitoras hematopoyéticas con TGFβ1 y BMP-6 y agregaron citarabina. Encontraron que la presencia de TGFβ1 y BMP-6 reduce la muerte inducida por citarabina luego de 48 horas de tratamiento a través de la inducción del gen TIEG-1 (TGFβ1 *inducible early gene 1*).¹³

En 1978 Hann I. y colaboradores describieron los resultados del análisis de 37 biopsias de MO de niños con LLA de 1974 a 1975. El 57% presentó aumento anormal de las fibras de reticulina y la fibrosis mejoró en todos los casos luego del tratamiento de inducción, pero no encontraron valor pronóstico claro de estos hallazgos.⁷

Wallis JP. y colaboradores analizaron 63 biopsias de MO en niños con LLA de 1984 a 1989 tratados con el protocolo UKALL. Encontraron fibrosis de manera importante ($p < 0.005$), con desaparición de ésta luego de la inducción en casi todos los pacientes. Aquellos con fibrosis tenían menor leucocitosis al diagnóstico. No encontraron relación entre el grado de fibrosis y la citogenética, ni impacto en el pronóstico.¹⁴

Perez-Atayde A. y colaboradores publicaron en 1997 el análisis de 61 biopsias de MO de 40 niños con diagnóstico de LLA *versus* controles con otras enfermedades no leucémicas. Encontraron que al diagnóstico los pacientes con LLA tenían mayor densidad vascular ($p < 0.0001$), vasos más tortuosos y lumen casi indistinguible lo que sugiere microvasculatura recientemente formada. No encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la densidad vascular al diagnóstico y la remisión ni un valor pronóstico de la misma con respecto a recaídas, pero sí observaron un cambio en la morfología de los vasos volviéndose más sinusoides, grandes y con lumen mejor definido luego de la inducción.⁸

Norén-Nyström U. y colaboradores han sido los únicos en demostrar un valor pronóstico de la fibrosis medular y angiogénesis a través de una serie de reportes retrospectivos en niños con diagnóstico de LLA. Su metodología de evaluación de la fibrosis y angiogénesis es la base de la mayoría de los estudios posteriormente realizados. El primer estudio publicado evaluó las biopsias de 81 pacientes de 1 a 18 años entre 1986 y 2001 en Suecia. Encontraron que, entre pacientes de alto riesgo, aquellos que recaían tenían mayor densidad de fibras de reticulina (DFR) y mayor densidad microvascular al diagnóstico ($p = 0.018$ y $p = 0.031$). También reportaron una SLP más larga entre aquellos pacientes con LLA de alto riesgo que tenían

una densidad microvascular o de fibras de reticulina más baja ($p=0.038$ y $p=0.047$). Estos hallazgos no fueron reproducibles en los pacientes de bajo riesgo. El mismo grupo reporta posteriormente resultados de un análisis retrospectivo de 166 biopsias de niños entre 1 y 15 años con resultados diferentes con respecto al valor pronóstico en grupos de bajo o alto riesgo. La DFR fue mayor en LLA B que en T (17.2% vs 12.7%, $p<0.001$) y se correlaciona de manera inversa con la cantidad de leucocitos al diagnóstico. No encontraron relación con la edad de presentación, enfermedad en sistema nervioso central o citogenética. Pacientes con mayor DFR tenían enfermedad mínima residual (EMR) $\geq 10^{-4}$ al día 29 ($p=.003$). Pacientes de bajo riesgo, hiperdiploides, con aumento de la DFR tenían menor tiempo libre de recaída al comparar con aquellos con menor densidad ($p=.002$). La DFR disminuía luego del tratamiento de inducción y en pacientes de bajo riesgo que presentaban disminución de la DFR por debajo de 20% luego de la inducción tenían tiempo a progresión mayores ($p=.041$). Para evaluar más detenidamente el rol pronóstico de la angiogénesis en LLA este grupo publica en 2009 resultados del análisis retrospectivo de 185 biopsias de MO de pacientes entre 1 y 18 años de 1992 a 2006. La densidad microvascular fue mayor en pacientes con LLA-T que en B (14.3 vs 12.3, $p=.013$), mayor en pacientes con hiperdiploidía que sin esta ($p=.002$) y menor en pacientes con t(12;21) que sin esta ($p=.001$). No se encontró relación entre la densidad microvascular y la leucocitosis al diagnóstico. No se encontró impacto de la densidad microvascular en la SLR al analizar toda la población, pero al analizar de manera independiente aquellos de alto riesgo, tener una mayor densidad microvascular daba un mayor riesgo de recaída (17 vs 75% probabilidad de recaída, $p=.054$) aunque esta significancia se perdió al excluir pacientes con t(9;22). Los pacientes con mayor densidad microvascular y de fibras de reticulina tenían mayor riesgo de recaída ($p=.012$), esta significancia se mantuvo al eliminar aquellos pacientes con t(9;22), lo cual sugiere la importancia de la fibrosis sobre la angiogénesis al diagnóstico.²²⁻²⁴

Bharos A. y colaboradores reportaron en 2010 resultados contradictorios a los de Norén-Nyström U. y colaboradores. Realizaron un análisis retrospectivo de biopsias de 84 niños entre 11 meses y 17 años de 2001 a 2007, tratados con protocolos pediátricos basados en el esquema Berlin-Frankfurt-Munster. La metodología utilizada fue similar a la descrita por Norén-Nyström U. y cols. Encontraron mayor fibrosis en LLA B que en las T ($p=.041$), mayor fibrosis se relacionaba a menor cuenta de leucocitos al diagnóstico (10.7 vs $35.3 \times 10^6/dL$, $p=.045$), un menor número de blastos en SP ($p=0.018$), mayor celularidad ($p=.007$) y más

casos hiperdiploides ($p=.006$). No encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grado de fibrosis y el riesgo del paciente al diagnóstico o el estatus de la enfermedad, tampoco entre la densidad microvascular y cualquiera de las variables. El único factor de riesgo asociado a peor pronóstico fue la EMR.¹⁵

Pulé M. y colaboradores publicaron en 2002 una revisión retrospectiva de 41 biopsias de niños con LLA desde 1992 a 2000, se utilizaron como controles las biopsias de 9 niños pareados por edad con trombocitopenia inmune primaria, linfoma y esplenomegalia. Encontraron mayor densidad microvascular al diagnóstico en pacientes con LLA en comparación con los controles ($p<0.0001$), disminución de la densidad microvascular ($p<0.0001$) y cambio de morfología microvascular a vasos más grandes con lúmenes bien formados ($p<0.0001$) luego de la remisión. No se encontró relación entre la densidad microvascular y el riesgo, citogenética o inmunofenotipo ni fue predictor de recaída.⁹

Nguyen T. y colaboradores reportaron recientemente (2015) la evaluación morfológica de biopsias de MO iniciales y a los 15 días de la inducción de 44 niños de 1 a 17 años con diagnóstico de LLA y lo compararon con 32 controles de edad similar con tumores sólidos (Linfoma no Hodgkin, Linfoma Hodgkin, neuroblastoma, sarcoma de Ewing) sin infiltración a MO de 2009 a 2012. Encontraron que las médulas de pacientes con LLA tenían menos adipocitos, megacariocitos y osteoblastos que en el grupo control ($p<0.001$). Al comparar las biopsias del día 0 con el día 15 encontraron disminución de la celularidad ($p<0.0001$), aumento de los adipocitos y aumento de los sinusoides ($p<0.0002$), aumento del matrix extracelular ($p<0.0004$) y reducción de las fibras de reticulina ($p<0.005$). No encontraron cambios en la cantidad de osteoblastos y osteoclastos. Sugieren que el aumento en adipocitos, sinusoides y normalización de vasos es fundamental para una normal hematopoyesis luego de la remisión.¹⁰

Al diagnóstico, los pacientes con LLA tienen aumento de la fibrosis medular y de la microvasculatura y es consistente su relación inversa con la leucocitosis y el porcentaje de blastos en SP, además a mayor fibrosis, mayor celularidad medular,²¹ sugiriendo que los blastos se encuentran inicialmente resguardados en la MO. Esto puede explicar fallas a la inducción por resistencia a quimioterapia o recaídas posteriores asumiendo que a mayor fibrosis más sitios santuario. También es claro que el aumento de la vascularidad es parte importante en la patogénesis de la LLA, que su presencia al diagnóstico no tiene un claro papel pronóstico, pero que al entrar en remisión la morfología de los vasos cambia haciéndose menos abundantes

y más grandes por lo cual podríamos decir que la persistencia de aumento en la densidad microvascular al evaluar la remisión puede tener algún valor pronóstico.

Objetivos

Objetivo General

- Describir el impacto de la presencia de fibrosis en MO al diagnóstico y su reducción post-inducción sobre en el pronóstico de pacientes adultos con LLA en una institución de tercer nivel de México.

Objetivos Específicos

- Describir la fibrosis en MO al diagnóstico y post-inducción a través del volumen de fibras de reticulina y la escala modificada de Bauermeister.
- Correlacionar la descripción de la fibrosis en MO por volumen de fibras de reticulina y por la escala modificada de Bauermeister.
- Describir la relación entre la presencia de fibrosis significativa por escala modificada de Bauermeister (≥ 2) en MO al diagnóstico y características como la edad, sexo, estado funcional por ECOG (*Eastern Cooperative Oncology Group*), cariotipo, inmunofenotipo, riesgo al diagnóstico, tratamiento de inducción, uso de factor estimulante de colonias de granulocitos (FECG), infección, mediana de hemoglobina, leucocitos y plaquetas al diagnóstico, porcentaje de blastos en SP y MO y celularidad en MO.
- Describir la relación entre la presencia de fibrosis significativa por escala modificada de Bauermeister (≥ 2) en MO al diagnóstico y la respuesta completa (RC), falla a la inducción, SLR y SG en toda la población.
- Describir el impacto de la reducción de $\geq 50\%$ de la fibrosis en MO post-inducción medida por volumen de fibras de reticulina en la falla a la inducción, SLR y SG.
- Describir la relación entre la media de reducción de la fibrosis en MO post-inducción medida por volumen de fibras de reticulina con la edad, sexo, estado funcional por ECOG, cariotipo, inmunofenotipo, riesgo al diagnóstico, tratamiento de inducción, uso de FECG, infección, mediana

de hemoglobina, leucocitos y plaquetas al diagnóstico, porcentaje de blastos en SP y MO y celularidad en MO.

- Describir el impacto en la SLR y SG de acuerdo con la clasificación de los pacientes en tres categorías: sin fibrosis significativa al diagnóstico (grupo 1), con fibrosis significativa y reducción de <50% del volumen de fibras de reticulina (grupo 2) y con fibrosis significativa al diagnóstico y reducción de $\geq 50\%$ del volumen de fibras de reticulina (grupo 3).

Pregunta Central:

¿Cuál fue el impacto de presencia de fibrosis significativa en MO y su reducción post-inducción sobre el pronóstico de los pacientes adultos con LLA del Instituto de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) durante el periodo comprendido entre febrero 2011 a febrero 2016?

Hipótesis:

La presencia de fibrosis significativa en MO al diagnóstico y su reducción post-inducción tiene un impacto pronóstico en los pacientes adultos con LLA del INCMNSZ.

Hipótesis Nula:

La presencia de fibrosis significativa en MO al diagnóstico y su reducción post-inducción no tiene un impacto pronóstico en pacientes adultos con LLA del INCMNSZ.

Metodología:

Tipo y diseño general del estudio

Estudio descriptivo retrospectivo.

Universo

La población estudiada correspondió a todos los pacientes adultos con diagnóstico de LLA y biopsias de MO evaluables, obtenidas por el Servicio de Hematología del INCMNSZ al diagnóstico y post-inducción, en el periodo comprendido entre febrero 2011 a febrero 2016.

Muestra

Pacientes que cumplan con los criterios de inclusión y exclusión.

Criterios de inclusión

- Pacientes mayores de 18 años con diagnóstico de LLA B o T, con tratamiento y seguimiento por el Servicio de Hematología del INCMNSZ que contaran con biopsias de MO almacenadas en los archivos de patología del instituto.
- Biopsias de MO con más de tres espacios medulares evaluables y en buenas condiciones (Nóren-Nyström et.al 2008).
- Tener biopsias de MO al diagnóstico de la enfermedad y post-inducción.

Criterios de exclusión

- Tener neoplasia previa
- Tener alguna otra comorbilidad que produzca fibrosis medular (enfermedades mieloproliferativas, neoplasias no hematológicas, mastocitosis sistémica, síndromes mielodisplásicos, leucemia mieloide aguda, hemoglobinuria paroxística nocturna, linfoma, mieloma, enfermedades del tejido

		<p>validada por la Organización Mundial de la Salud (OMS)</p>	<p>impiden realizar trabajos arduos, aunque se desempeña normalmente en sus actividades cotidianas y en trabajos ligeros. El paciente sólo permanece en la cama durante las horas de sueño nocturno.</p> <p>2: El paciente no es capaz de desempeñar ningún trabajo y se encuentra con síntomas que le obligan a permanecer en la cama durante varias horas al día además de la noche, pero que no superan el 50% del día. El individuo satisface la mayoría de sus necesidades de la vida diaria sin ayuda.</p>	<p>2</p> <p>3</p>
--	--	---	--	-------------------

			<p>3: El paciente necesita estar encamado más del 50% del día por la presencia de síntomas. Necesita ayuda para la mayoría de las actividades de la vida diaria.</p> <p>4: El paciente permanece encamado el 100% del día y necesita ayuda para todas las actividades básicas de la vida diaria.</p> <p>5: Paciente que fallece</p>	<p>4</p> <p>5</p>
Cariotipo	Cualitativa nominal	Es el patrón cromosómico de una especie expresado a través de un código y por las características de sus cromosomas	Cariotipo descrito en el expediente por el servicio de genética del INCMNSZ	<p>Cromosoma</p> <p>Filadelfia</p> <p>Cariotipo normal</p> <p>Otros cariotipos</p> <p>No evaluable</p>
Inmunofenotipo	Cualitativa nominal	Proteínas expresadas por las células leucémicas en su superficie que las clasifican como linfocitos B o T y que	Inmunofenotipo descrito en el expediente del paciente	<p>Pro-B</p> <p>B-común</p> <p>Pre-B</p> <p>T</p>

		son identificadas por citometría de flujo		
Riesgo al diagnóstico	Cualitativa nominal	Riesgo de la LLA al diagnóstico descrito por criterios clásicos (>35 años, >30x10 ⁶ leucocitos/μL, leucemia T temprana, presencia de cromosoma filadelfia, cariotipo complejo y falla a la inducción)	Riesgo alto se definió como la presencia de al menos uno de los criterios clásicos y riesgo estándar como la ausencia de alguno de los criterios de riesgo	Riesgo Alto Riesgo Estándar
Inducción	Cualitativa nominal	Primera línea de tratamiento en LLA que consiste en una combinación de medicamentos quimioterapéuticos cuyo objetivo es alcanzar la remisión completa	Tratamiento de inducción utilizado como primera línea de tratamiento y descrito en el expediente clínico	HyperCVAD +/- Rituximab Otros
Uso de FECG	Cualitativa nominal	Uso de FECG durante el periodo de neutropenia grave (leucocitos < de 0.5 x10 ³ /μL) secundario a tratamiento de inducción.	Uso o no de FECG como reportado en el expediente clínico	Sí o No
Infección durante inducción	Cualitativa nominal	Presencia de cualquier proceso infeccioso en los	Presencia de proceso infeccioso como	Sí o No

		28-30 días posterior al tratamiento de inducción.	reportado en el expediente clínico	
Leucocitos al diagnóstico	Cuantitativa continua	Glóbulos blancos o leucocitos son las células del sistema inmune involucradas en la protección contra elementos extraños al cuerpo, incluida las infecciones.	Valor de leucocitos totales como reportado en el expediente clínico al momento del diagnóstico	$\times 10^3/\mu\text{L}$
Hemoglobina al diagnóstico	Cuantitativa continua	Proteína en los glóbulos rojos de todos los vertebrados que transporta oxígeno	Valor de hemoglobina como reportado en el expediente clínico al momento del diagnóstico	g/dL
Plaquetas al diagnóstico	Cuantitativa continua	Fragmentos citoplasmáticos de los megacariocitos, irregulares, con alto contenido granular importante para la hemostasia	Valor de plaquetas como reportado en el expediente clínico al momento del diagnóstico	$\times 10^9/\text{L}$
Blastos en SP al diagnóstico	Cuantitativa discontinua	Porcentaje del total de leucocitos al diagnóstico reportados como blastos linfoides (células inmaduras del linaje linfoide) luego de	Porcentaje de blastos en SP como reportado en el expediente clínico al momento del diagnóstico	%

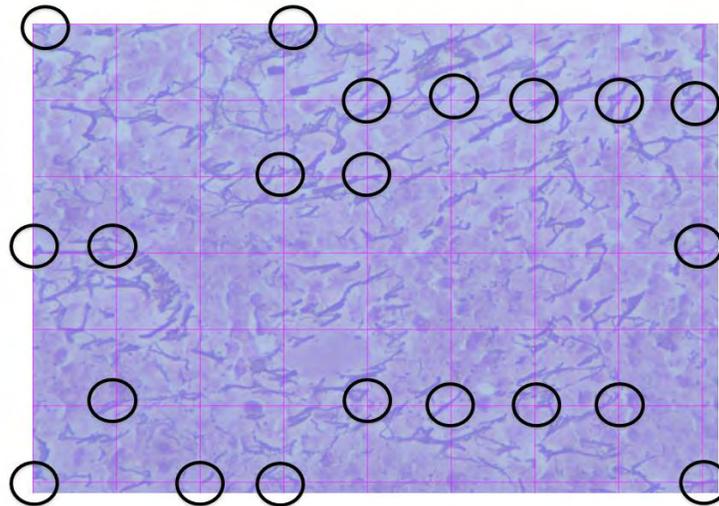
		evaluación morfológica del frotis de SP.		
Blastos en MO al diagnóstico	Cuantitativa discontinua	Porcentaje del total de la serie mieloides reportados como blastos linfoides (células inmaduras del linaje linfoide) luego de la evaluación morfológica de la MO	Porcentaje de blastos en MO como reportado en el expediente clínico en el aspirado de MO del diagnóstico	%
Celularidad en MO al diagnóstico	Cuantitativa discontinua	Relación que existe entre las células hematopoyéticas y el tejido adiposo en la MO expresado como el porcentaje de ocupación de las células hematopoyéticas con respecto a tejido adiposo en un campo a 10x. Dependerá de la edad del individuo.	Porcentaje de ocupación de las células hematopoyéticas en MO como descrito en el expediente clínico	%
Fibrosis medular por volumen de fibras de reticulina	Cuantitativa discontinua	Ocupación del espacio medular en diverso grado por fibras de reticulina evaluado luego de tinción con tricrómico de Masson evaluada por volumen de fibras de reticulina	Se determinará por un promedio de 10 áreas medulares por muestra, seleccionadas al azar, y calculando el porcentaje de estas que tengan fibras de	%

			reticulina entrecruzas en relación con el resto del espacio medular utilizando un cuadrículado de 25 micras ² con una magnificación x400. Ver Figura 1	
Fibrosis medular por escala modificada de Bauermeister	Cualitativa ordinal	Ocupación del espacio medular en diverso grado por fibras de reticulina evaluado luego de tinción con tricrómico de Masson evaluada por escala modificada de Bauermeister	Es una medición subjetiva de la ocupación de fibras de reticulina del espacio medular evaluable como determinado por el patólogo en el expediente clínico.	0: sin fibras de reticulina demostrables 1: fibras finas ocasionales e individuales o una malla muy fina de fibras escasa 2: malla de fibras finas en casi toda la muestra sin fibras gruesas 3: malla de fibras finas difusa con algunas fibras gruesas pero sin colágeno maduro

				4: malla de fibras gruesas difusas con áreas de colagenización
Respuesta completa	Cualitativa nominal	Estado de la enfermedad al momento de la evaluación post-inducción donde las células leucémicas no son detectables por microscopía electrónica en SP o líquido cefalorraquídeo y existe <5% de blastos en MO con hematopoyesis trilineal.	Como definido en el expediente clínico al momento de la evaluación post-inducción. Para su definición la cuenta absoluta de neutrófilos debió ser $> 1.0 \times 10^9/L$ y la cuenta plaquetaria $> 100 \times 10^9/L$.	Sí o No
Falla a la inducción	Cualitativa nominal	Falla al tratamiento de primera línea al momento de la evaluación post-inducción	Falla como descrito en el expediente clínico.	Sí o No
Supervivencia libre de recaída	Cuantitativa discontinua	Tiempo transcurrido en meses entre el diagnóstico y la primera recaída de la enfermedad.	Tiempo calculado al restar los meses entre el día de la recaída y el día del diagnóstico como documentado en el expediente clínico	Meses

Supervivencia global	Cuantitativa discontinua	Tiempo transcurrido en meses desde el día del diagnóstico hasta el día de la muerte o último seguimiento.	Tiempo calculado al restar los meses entre el día de la muerte o último seguimiento y el día del diagnóstico como documentado en el expediente clínico.	Meses
----------------------	--------------------------	---	---	-------

Figura 1.



Biopsia de MO con tinción tricrómica de Masson evaluada a 25 micras², aumento x40, utilizando una gradilla de 63 puntos que representa el 100%. En esta figura hay 25 puntos cruzados por fibras de reticulina que corresponden a 33% del campo o 33% de volumen de fibras de reticulina.

Diseño del Estudio

El diagnóstico de LLA fue establecido de acuerdo a los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 2016.^{25,26} El riesgo al diagnóstico fue establecido de acuerdo a los criterios de riesgo clásicos (>35 años de edad, >30x10⁶ leucocitos/ μ L, LLA T temprana, presencia de cromosoma filadelfia, cariotipo

complejo y falla al tratamiento de inducción).³ La respuesta completa (RC) se definió como la ausencia de células leucémicas en sangre periférica y líquido cefalorraquídeo y <5% de blastos en una MO con hematopoyesis trilineal evaluadas por microscopía de luz. Para la definición de RC, la cuenta absoluta de neutrófilos debía ser mayor de $1.0 \times 10^9/L$ y la cuenta plaquetaria mayor de $100 \times 10^9/L$ y no debía documentarse recaída por 4 semanas.^{4,27} La falla a la inducción se definió como la no RC luego del tratamiento de quimioterapia de inducción, la recaída se definió como la reaparición de blastos en sangre periférica o médula ósea de más del 5%.

La supervivencia libre de recaída (SLR) se definió como el tiempo transcurrido en meses entre el diagnóstico y la primera recaída de la enfermedad y la supervivencia global (SG) como el tiempo transcurrido en meses desde el día del diagnóstico hasta el día de la muerte o último seguimiento.

Las muestras de MO fueron obtenidas luego de la firma de un consentimiento informado aprobado por el comité de ética del Instituto. Las muestras fueron fijadas en formaldehído, decalcificadas y tratadas con parafina. Se realizó tinción de hematoxilina-eosina y tricrómica de Masson en todas las muestras. Se estimó el porcentaje de blastos y celularidad de la MO al diagnóstico y post-inducción y la fibrosis fue evaluada por el Hematopatólogo del Instituto usando la escala modificada de Bauermeister¹⁹ y el volumen de fibras de reticulina²². Se utilizó una cámara para microscopio de luz Lumera y el software *Infinity Analyze* versión 6.4.1.

Para el análisis de supervivencias, los pacientes fueron clasificados en 3 grupos: sin fibrosis significativa al diagnóstico (grupo 1), con fibrosis significativa al diagnóstico y reducción de <50% del volumen de fibras de reticulina (grupo 2) y con fibrosis significativa al diagnóstico y reducción de $\geq 50\%$ del volumen de fibras de reticulina (grupo 3).

Instrumento

Se llenó un formulario tipo encuesta con los datos de los expedientes clínicos otorgados por la sección de archivos del Instituto y se llenó una base de datos tipo Excel con los datos proporcionados por el Hematopatólogo.

Análisis de datos

Las variables cualitativas se describieron en frecuencias y proporciones, las variables cuantitativas mediante medianas e intervalos, la comparación de las variables cualitativas se realizó por Chi cuadrado y prueba exacta de Fisher, la comparación de medianas se realizó por la prueba de U de Mann Whitney. Se utilizó la prueba de Kaplan-Meier para SLR y SG y se compararon con prueba log-Rank. El análisis estadístico se realizó con SPSS versión 21.0.

Plan de trabajo

De la base de datos de la clínica de leucemias se realizó la selección de pacientes de acuerdo a los criterios de inclusión y exclusión. Los datos se obtuvieron del expediente clínico y fueron recopilados retrospectivamente desde la fecha de diagnóstico al último seguimiento. Se realizó la evaluación de las MO al diagnóstico y post-inducción por el Hematopatólogo del Instituto. El análisis estadístico se realizó en toda la población.

Implicaciones Éticas del Estudio

Se realizó un estudio observacional y retrospectivo. Ya que no se realizaron intervenciones, no representó riesgo alguno para los pacientes incluidos. Todos los datos obtenidos del expediente fueron utilizados con discreción y capturados de manera anónima, identificando a los pacientes por folio progresivo en la base de datos y a través de número de expediente clínico únicamente para referencias y evaluaciones posteriores.

RESULTADOS

Características basales

Un total de 44 pacientes fueron incluidos. La edad media al diagnóstico fue de 27 años (rango, 17-67 años), 54% fueron hombres (n=43). Treintaiocho (86%) pacientes tenían un ECOG de 0-1. Veinte (46%) pacientes tenían un cariotipo normal al diagnóstico y 1 (2%) presentó un cariotipo complejo (≥ 5 anormalidades cromosómicas). Se identificó la presencia del cromosoma filadelfia por FISH o cariotipo en 10 pacientes (23%). No encontramos ningún paciente con LLA de inmunofenotipo T o B madura, 25 (57%) pacientes tuvieron LLA B-común y 28 (64%) fueron clasificados de alto riesgo por criterios de riesgo clásico. El resto de las características basales se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de los pacientes al diagnóstico de acuerdo con presencia o no de fibrosis significativa por escala modificada de Bauermeister.

Característica	Todos los pacientes N=44	Con fibrosis significativa (Bauermeister ≥ 2) N=29	Sin fibrosis significativa (Bauermeister <2) N=15	P
Sexo, n (%)				0.213*
Hombre	23 (52)	13 (45)	10 (67)	
Mujer	21 (48)	16 (55)	5 (33)	
Edad media en años (rango)	27 (17-67)	26 (17-67)	28 (18-56)	0.907 [†]
ECOG, n (%)				0.277*
0-1	38 (86)	23 (79)	15 (100)	
2-3	6 (14)	6 (21)	0	
Cariotipo, n (%)				0.636*
Cromosoma Filadelfia	10 (23)	6 (21)	4 (27)	
Normal	20 (46)	12 (41)	8 (53)	

Otros	3 (7)	2 (7)	1 (7)	
No evaluable	11 (25)	9 (31)	2 (13)	
Inmunofenotipo, n (%)				0.283*
Pro B	2 (5)	2 (7)	0	
B común	25 (57)	16 (55)	12 (80)	
Pre B	17 (39)	11 (38)	3 (20)	
Riesgo, n (%)				0.185*
Estándar	16 (36)	13 (45)	3 (20)	
Alto	28 (64)	16 (55)	12 (80)	
Inducción, n (%)				0.333*
HyperCVAD +/- Rituximab	27 (61)	16 (55)	11 (73)	
Otros	17 (39)	13 (45)	4 (27)	
Infección en inducción, n (%)	34 (77)	23 (79)	11 (73)	0.714*
Hemoglobina (g/dL),				0.225[†]
Mediana (rango)	8.1 (4.1-15.3)	7.7 (4.1-12.4)	8.8 (6.5-15.3)	
Leucocitos x10³/μL,				0.154[†]
Mediana (rango)	9.7 (1-384)	7.4 (1-384)	20.7 (1.9-272)	
Plaquetas x10⁹/L,				0.682[†]
Mediana (rango)	37.5 (8-205)	38 (11-205)	37 (8-158)	
Blastos en sangre periférica (%),				0.063[†]
Mediana (rango)	40 (0-90)	35 (0-87)	66 (1-90)	
Blastos in MO (%),				0.554[†]
Mediana (rango)	64 (20-95)	64 (20-95)	68 (36-91)	
Celularidad en MO (%),				0.907[†]
Mediana (rango)	88 (20-100)	90 (20-100)	90 (60-100)	

*Chi2, † Mann-Whitney U

Tratamiento de inducción y evaluación de la respuesta

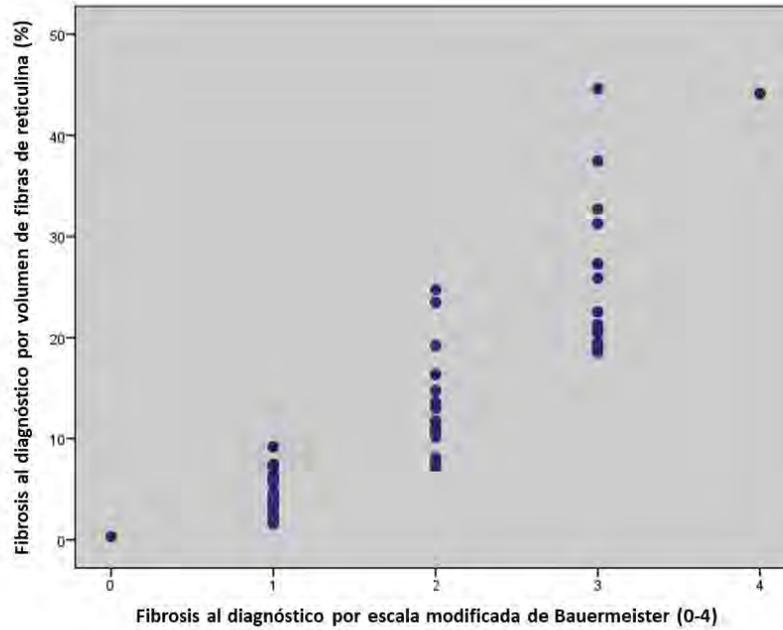
Veintisiete (61%) pacientes recibieron tratamiento de inducción con HyperCVAD con o sin Rituximab, el resto recibió un protocolo institucional. Durante la inducción, 25 (57%) recibieron FECG y 34 (77%) tuvieron algún proceso infeccioso.

Con respecto a la evaluación de la respuesta, 31 (71%) pacientes alcanzaron RC luego de la inducción y 13 (29%) fallaron a la inducción. Luego de 24 meses de seguimiento, 29 (59%) pacientes recayeron. La SLR fue de 10.6 meses (IC95%, 7.08-14.07 meses) y la SG fue de 17.1 meses (IC95% 10.33-23.96 meses).

Evaluación de la Fibrosis en Médula Ósea

Realizamos la evaluación de la fibrosis medular por dos métodos: volumen de fibras de reticulina y escala modificada de Bauermeister. Ambos métodos tuvieron buena correlación ($p=.000$) para definir la presencia de fibrosis (Figura 2). Ya que la escala modificada de Bauermeister es ampliamente utilizada, comparamos a los pacientes de acuerdo con la presencia (\geq grade 2) o ausencia (grado 0-1) de fibrosis significativa al diagnóstico (Tabla 1). Veintinueve (66%) pacientes tenían fibrosis significativa en MO al diagnóstico. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con las características basales entre aquellos con y sin fibrosis significativa. Hubo más pacientes con LLA B-común (55% vs. 80%, $p=.283$) y de alto riesgo (55% vs. 88%, $p=.185$) en el grupo sin fibrosis significativa. La mediana de cuenta de leucocitos ($7.4 \times 10^3/\mu\text{L}$ vs. $20.7 \times 10^3/\mu\text{L}$, $p=.154$) y de blastos en sangre periférica (25% vs. 66%, $p=.063$) fue más baja en pacientes con fibrosis significativa al diagnóstico. Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Figura 2.



Correlación entre la descripción de la fibrosis medular al diagnóstico por volumen de fibras de reticulina y escala modificada de Bauermeister (p=.000).

La reducción de la fibrosis post-inducción se muestra en la Tabla 1. La mediana del volumen de fibras de reticulina fue de 15.3% (rango, 0.32%-44.6%) al diagnóstico y 9.5% (rango, 0.16%-38.6%) post-inducción. Posterior a la inducción ningún paciente tenía fibrosis grado 4 o 4, 19 (43%) tenían fibrosis grado 1 y 22 (50%) pacientes tenían fibrosis grado 2.

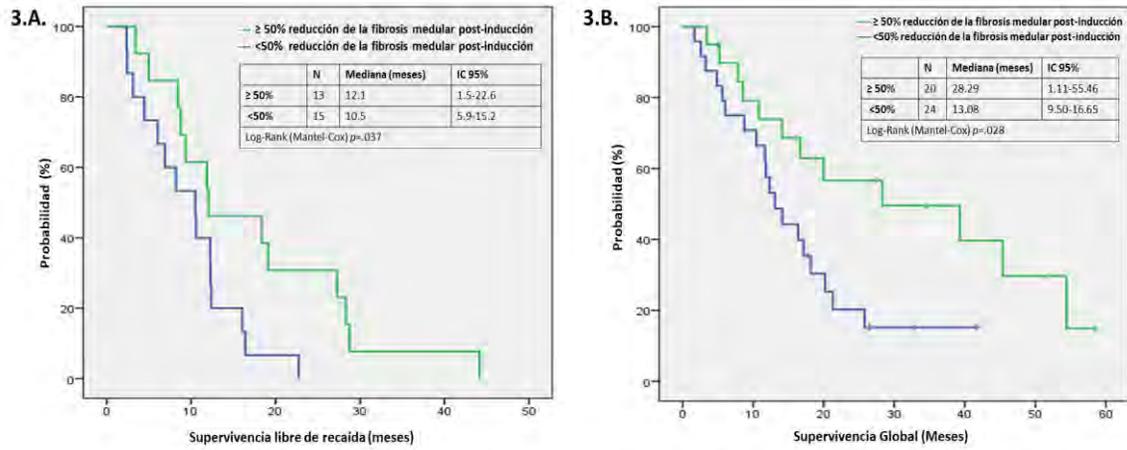
Tabla 2.

Tabla 2. Fibrosis en médula ósea descrita por volumen de fibras de reticulina y escala modificada de Bauermeister al diagnóstico y post-inducción		
Fibrosis	Diagnóstico	Post-inducción
Volumen de fibras de reticulina		

Mediana (rango)	15.3 (0.32-44.6)	9.48 (0.16-38.6)
Fibrosis por escala modificada de Bauermeister	N (%)	N (%)
<i>0 sin fibras de reticulina demostrables</i>	1 (2.3)	3 (6.8)
<i>1 fibras finas ocasionales e individuales o una malla muy fina de fibras escasa</i>	14 (31.8)	19 (43.2)
<i>2 malla de fibras finas en casi toda la muestra sin fibras gruesas</i>	14 (31.8)	22 (50)
<i>3 malla de fibras finas difusa con algunas fibras gruesas, pero sin colágeno maduro</i>	14 (31.8)	0
<i>4 malla de fibras gruesas difusas con áreas de colagenización</i>	1 (2.3)	0

Posteriormente evaluamos si existían diferencias estadísticamente significativas entre aquellos que lograron reducción de la fibrosis post-inducción contra aquellos que no. Veinte (45%) pacientes alcanzaron una reducción de $\geq 50\%$ del volumen de fibras de reticulina. Los que lograron esta reducción tuvieron menos falla a la inducción (10% vs. 46%, $p=.018$), SLR (12.1 meses vs. 10.5 meses, $p=.037$) y SG (28.3 meses vs. 13.1 meses, $p=.028$) más largas (Figura 3). Cuando analizamos la mediana del cambio del volumen de fibras de reticulina post-inducción, encontramos que los pacientes con cariotipo normal aumentaron la fibrosis medular post-inducción en un 19.4% en lugar de reducirla. Los pacientes con inmunofenotipo Pro-B fueron los que lograron mayor reducción de la fibrosis post-inducción. De manera interesante, los pacientes sin fibrosis al diagnóstico aumentaron el volumen de fibras de reticulina post-inducción en un 71.3% (Tabla 3).

Figura 3.



Supervivencia en pacientes con o sin reducción de $\geq 50\%$ del volumen de fibras de reticulina post-inducción. **3.A.** SLR 12.1 vs 10.5 meses, $p=.037$. **3.B.** SG 28.3 vs 13.1 meses, $p=.028$.

Tabla 3.

Table 3. Reducción de la fibrosis post-inducción de acuerdo con características al diagnóstico

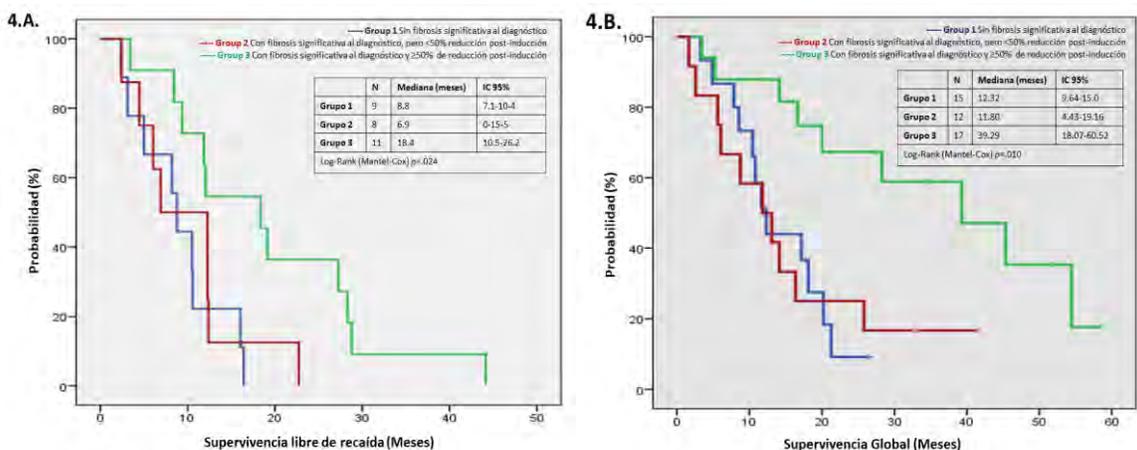
Característica	Media de reducción de fibrosis (%)	P
Cariotipo		0.041 [†]
Cromosoma Filadelfia	-40.7	
Normal	+19.4	
Otros	-17.5	
No evaluable	-17.5	
Inmunofenotipo		0.041 [†]
Pro-B	-51.9	
B Común	-8.9	
Pre-B	-17.7	
Fibrosis significativa por escala modificada de Bauermeister (≥ 2) al diagnóstico		0.006 [†]

Sí	-40.4
No	+71.3

† Mann-Whitney U

En el análisis de supervivencia de acuerdo con categoría de reducción, los pacientes del grupo 3 tuvieron mejor SLR (18 meses vs 9 meses para el grupo 1 y 7 meses para el grupo 2; $p=.024$) y mejor SG (39 meses vs 12 meses para el grupo 1 y 2; $p=.01$) (Figura 4). La SLR a 2 años para el grupo 3 fue de 37% vs 12% para el grupo 2 y 22% para el grupo 1. La SG a 2 años para el grupo 3 fue de 60% vs 17% para el grupo 2 y 9% para el grupo 1.

Figura 4.



Supervivencia de acuerdo con 3 categorías de reducción. Grupo 1: sin fibrosis significativa al diagnóstico, grupo 2: con fibrosis significativa al diagnóstico, pero reducción <50% post-inducción, grupo 3: con fibrosis significativa al diagnóstico y reducción $\geq 50\%$ post-inducción. **4.A.** SLR 18.4 meses para el grupo 3 vs 8.8 meses para el grupo 1 y 6.9 meses para el grupo 2, $p=.024$. **4.B.** SG 39 meses para el grupo 3 vs 12 meses para el grupo 1 y 2, $p=.01$.

DISCUSIÓN

Los nichos vascular y endosteal de la MO proveen soporte para el desarrollo de las células troncales hematopoyéticas normales; controlan su proliferación, diferenciación, migración y muerte.^{28,29} Las células leucémicas (CL) comparten los mismos mecanismos de interacción con estos nichos, pero de alguna manera escapan a la apoptosis y reemplazan a las células normales.^{21,28} Estudios previos en LLA han confirmado que al diagnóstico existe una alteración del microambiente medular con aumento de la fibrosis medular y angiogénesis anormal.

Las CLs interactúan a través de VLA-4 con VCAM-1 y fibronectina de las células estromales estimulándolas y llevando a la secreción de TGFβ1 y BMP-6 asociadas con fibrosis medular. También interactúan a través de CXCL12, aumentando la secreción de IL-8 que promueve la angiogénesis. Estas interacciones con el estroma también activan vías bcl2 y bcl-xL que inhiben la apoptosis de las CLs.^{12,13,16,26} Las CLs compiten con las células troncales normales por el espacio medular al secretar SCF (*stem cell factor*) que inhibe las interacciones celulares normales.¹⁷ Al diagnóstico de LLA, la concentración sérica de citocinas asociadas a fibrosis medular como TNFα, FGFβ, HGF y MMP-9 se encuentra elevadas.^{23,24} La concentración de VEGF se encuentra disminuida y regresa a niveles normales luego del tratamiento, lo que sugiere consumo por aumento de la angiogénesis por la LLA.²² Todas estas vías aseguran la proliferación y supervivencia de las CLs.

En 1978 Hann y colaboradores encontraron fibrosis en la MO de 57% de los niños con LLA evaluados. Desde entonces varios estudios han confirmado el papel de microambiente estromal en la patogénesis de la LLA.^{7,22-24} En nuestro estudio encontramos que 66% de los adultos con LLA evaluados tuvieron fibrosis medular significativa al diagnóstico.

Wallis y colaboradores describieron la fibrosis medular en 63 niños con LLA sin encontrar asociación entre la presencia de fibrosis al diagnóstico y características como el cariotipo y valores de laboratorio como la hemoglobina y cuenta plaquetaria.¹⁴ Los pacientes con fibrosis medular significativa al diagnóstico sí tuvieron menores cuentas de leucocitos, y luego del tratamiento de inducción, se redujo la fibrosis medular en casi todos los pacientes. En nuestro estudio tampoco encontramos asociación entre la presencia de

fibrosis significativa al diagnóstico y características como el sexo, edad, ECOG, cariotipo, inmunofenotipo, riesgo de la leucemia, tratamiento de inducción, hemoglobina o cuenta plaquetaria. Como Wallis y colaboradores, también encontramos que los pacientes con mayor fibrosis al diagnóstico tenían cuentas de leucocitos más bajas al diagnóstico ($7.4 \times 10^3/\mu\text{L}$ vs $20.7 \times 10^3/\mu\text{L}$, $p=.125$), pero esto no fue estadísticamente significativo.

Nath y colaboradores también describieron una correlación negativa entre la presencia de fibrosis medular al diagnóstico y la cuenta de leucocitos y blastos en SP, los pacientes con mayor fibrosis medular tenían cuentas de leucocitos y blastos en SP menores.²¹ Ellos encontraron que los pacientes con mayor fibrosis tenían mayor celularidad y que esto podría sugerir un atrapamiento de blastos en la MO fibrótica y propusieron que las CLs estimulan la formación de fibrosis y crean un microambiente que las protegen de la apoptosis, pero que esto puede ser superado por quimioterapia intensiva. Nosotros encontramos que los pacientes con fibrosis significativa al diagnóstico tienen menos blastos en SP (35% vs 66%, $p=.063$), aunque esto no fue estadísticamente significativo. No encontramos asociación entre la presencia de fibrosis y la celularidad en MO.

En una carta al editor de *Leukemia* en 2005 Nören-Nystrom y colaboradores reportan por primera vez el impacto pronóstico negativo de la densidad vascular y fibrosis en MO evaluada por DFR en niños con LLA de riesgo alto.²² Ellos encontraron que los pacientes de alto riesgo tenían más fibrosis al diagnóstico y que estos pacientes recaían más. En 2008, publicaron un reporte completo sobre el efecto pronóstico de la fibrosis medular en niños con LLA.²³ Encontraron que los pacientes con LLA con inmunofenotipo B tenían más fibrosis que los de inmunofenotipo T y describieron una correlación negativa entre la presencia de fibrosis por DFR y la cuenta de leucocitos al diagnóstico. No encontraron una relación entre características basales (sexo, riesgo, infiltración a sistema nervioso central y cariotipo) y la presencia de fibrosis al diagnóstico. En este segundo reporte solo encontraron un impacto pronóstico de la DFR en pacientes de bajo riesgo, aquellos con mayor DFR tenían SLP más cortas. Los pacientes que alcanzaban una mediana de reducción en la DFR mayor (> 8.4%) tenían mejor pronóstico, pero esto sólo fue significativo en aquellos con DFR baja al diagnóstico. En nuestro estudio no encontramos que la presencia de fibrosis significativa al diagnóstico tuviera un impacto pronóstico, pero su reducción post-inducción sí. Aquellos que lograron una

reducción de $\geq 50\%$ de la fibrosis medida por volumen de fibras de reticulina tuvieron menor falla a la inducción (10% vs. 46%, $p=.018$), SLR (12.1 meses vs. 10.5 meses, $p=.037$) y SG más prolongadas (28.3 meses vs. 13.1 meses, $p=.028$).

En 2010 Bharos y colaboradores publicaron resultados contradictorios a los reportados por Nören-Nystrom y cols. Ellos no encontraron que la presencia de fibrosis significativa al diagnóstico tuviera algún impacto sobre la SLP o SG.¹⁵ Ellos describieron la fibrosis por escala modificada de Bauermeister y DFR encontrando una buena correlación entre ambos métodos ($p<.001$). Encontraron que 2.5% de los pacientes tenían fibrosis grado 0, 33.3% fibrosis grado 1, 37% fibrosis grado 2, 19.7% fibrosis grado 3 y 7.5% fibrosis grado 4. Encontraron una correlación negativa entre la DFR y la cuenta de leucocitos y blastos en SP al diagnóstico como descrito por otros autores previamente. En nuestro estudio 2.3% de los pacientes tenían fibrosis grado 0 por escala modificada de Bauermeister, 31.8% tenían fibrosis grado 1, 31.8% grado 2, 31.8% grado 3 y 1% grado 4. Luego de la inducción, la fibrosis medida por volumen de fibras de reticulina se redujo de 15.3% al diagnóstico a 9.48% post-inducción. Thomas y colaboradores²⁸ reportaron más pacientes con fibrosis grado 0 (36%).

En nuestro estudio, los pacientes con cariotipo normal al diagnóstico aumentaron su fibrosis medular post-inducción en lugar de reducirla. Esto puede sugerir que los pacientes con cariotipo normal pueden tener otras mutaciones de alto riesgo que no logramos detectar como mutaciones *Philadelphia-like*.^{30,31} Sería interesante poder evaluar el impacto pronóstico de la fibrosis medular al diagnóstico con estas mutaciones y el efecto que los inhibidores de tirosin cinasas pueden tener en la reducción de la fibrosis.

Nuestra hipótesis es que las CLs estimulan al microambiente medular aumentando la fibrosis y que ésta protege inicialmente a las CLs de la apoptosis. In-vitro se ha demostrado que estas interacciones con el estroma fibrótico protegen a las CLs de la quimioterapia.^{7,13,14} Nuestros hallazgos sugieren que in-vivo, la quimioterapia intensiva reduce la fibrosis y puede vencer esta protección que el microambiente fibrótico ofrece a las CLs.

Nosotros hemos reproducido de manera exitosa el método para descripción de la fibrosis propuesto por Norén-Nyström y colaboradores en niños,²³ pero ya que la tinción tricrómica de Masson no es ampliamente utilizada y encontramos buena correlación entre este método y la descripción de la fibrosis por

escala modificada de Bauermeister, que es la más utilizada por los patólogos, sugerimos el uso de ésta para la descripción de la fibrosis medular en adultos con LLA y la descripción de su impacto pronóstico estudios futuros.

CONCLUSIONES

Este estudio demuestra el rol pronóstico que tiene la fibrosis medular en pacientes adultos con LLA. Aunque la presencia de fibrosis significativa al diagnóstico no tuvo impacto en los desenlaces, alcanzar una reducción $\geq 50\%$ post-inducción conlleva SLP y SG más largas comparado con aquellos pacientes que no logran esta reducción. Estos resultados deben ser correlacionados con otros factores pronósticos como la EMR y mutaciones tipo *Philadelphia-like*.

REFERENCIAS:

1. Katz AJ, Chia VM, Schoonen WM, Kelsh MA. Acute lymphoblastic leukemia: an assessment of international incidence, survival, and disease burden. *Cancer Causes Control*. 2015;26(11):1627-1642. doi:10.1007/s10552-015-0657-6
2. Howlader N, Noone A, Krapcho M, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2014, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2014/, based on November 2016 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2017. http://SeerCancerGov/Csr/1975_2014/2017:1-101.
https://seer.cancer.gov/csr/1975_2014/results_merged/sect_29_childhood_cancer_iccc.pdf.
3. Curran E, Stock W. How I treat acute lymphoblastic leukemia in older adolescents and young adults. *Blood*. 2015;125(24):3702-3710. doi:10.1182/blood-2014-11-551481
4. National Comprehensive Cancer Network. NCCN Guidelines Version 1.2016 Acute Lymphoblastic Leukemia. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®).
https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/all.pdf. Published 2016.
5. Creso-Solis E, Espinosa-Bautista K, Alvarado-Ibarra M et al. Retrospective Study of Adults With Acute Lymphoid Leukemia in Mexico City: First Report of the Working Group of Acute Leukemia (GTLA). 2017.
6. Ru YX, Zhao SX, Liu EB, et al. Ultrastructural characteristics of bone marrow in patients with hematological disease: a study of 13 cases. *Ultrastruct Pathol*. 2007;31(5):327-332.
doi:10.1080/01913120701643637
7. Hann IM, Evans DI, Marsden HB, Jones PM, Palmer MK. Bone marrow fibrosis in acute lymphoblastic leukaemia of childhood. *J Clin Pathol*. 1978;31(4):313-315.
8. Perez-Atayde AR, Sallan SE, Tedrow U, Connors S, Allred E, Folkman J. Spectrum of tumor angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pathol*. 1997;150(3):815-821.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1857903&tool=pmcentrez&rendertyp>

e=abstract.

9. Pulè MA, Gullmann C, Dennis D, McMahon C, Jeffers M, Smith OP. Increased angiogenesis in bone marrow of children with acute lymphoblastic leukaemia has no prognostic significance. *Br J Haematol.* 2002;118(4):991-998. doi:10.1046/j.1365-2141.2002.03761.x
10. Nguyen T-V, Melville A, Nath S, et al. Bone Marrow Recovery by Morphometry during Induction Chemotherapy for Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *PLoS One.* 2015;10(5):e0126233. doi:10.1371/journal.pone.0126233
11. Belurkar S, Nepali PB, Manandhar B, Manohar C. Evaluation of Post Chemotherapy Bone Marrow Changes in Acute Leukaemia. *Int J Sci Res Publ.* 2015;5(1):2250-3153. www.ijsrp.org.
12. Mudry RE, Fortney JE, York T, Hall BM, Gibson LF. Stromal cells regulate survival of B-lineage leukemic cells during chemotherapy. *Blood.* 2000;96(5):1926-1932. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10961896>.
13. Døsen-Dahl G, Munthe E, Nygren MK, Stubberud H, Hystad ME, Rian E. Bone marrow stroma cells regulate TIEG1 expression in acute lymphoblastic leukemia cells: Role of TGF β /BMP-6 and TIEG1 in chemotherapy escape. *Int J Cancer.* 2008;123(12):2759-2766. doi:10.1002/ijc.23833
14. Wallis JP, Reid MM. Bone marrow fibrosis in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *J Clin Pathol.* 1989;42(12):1253-1254. doi:10.1136/jcp.42.12.1253
15. Bharos A, Jong AJD, Manton N, et al. Bone marrow fibrosis and vascular density lack prognostic significance in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia.* 2010;24(8):1537-1538. doi:10.1038/leu.2010.134
16. Faderl S, Do K, Johnson MM, et al. Angiogenic factors may have a different prognostic role in adult acute lymphoblastic leukemia. *Survival (Lond).* 2005;106(13):4303-4307. doi:10.1182/blood-2005-03-1010.Reprints
17. Aguayo A, Kantarjian H, Manshouri T, et al. Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2000;96(6):2240-2245. doi:https://doi.org/
18. Aref S, Salama O, Shamaa S, El-Refaie M, Mourkos H. Angiogenesis factor pattern differs in acute lymphoblastic leukemia and chronic lymphocytic leukemia. *Hematology.* 2007;12(4):319-324.

doi:10.1080/10245330701340759

19. Kuter DJ, Bain B, Mufti G, Bagg A, Hasserjian RP. Bone marrow fibrosis: Pathophysiology and clinical significance of increased bone marrow stromal fibres. *Br J Haematol.* 2007;139(3):351-362.
doi:10.1111/j.1365-2141.2007.06807.x
20. Ayala F, Dewar R, Kieran M, Kalluri R. Contribution of bone microenvironment to leukemogenesis and leukemia progression. *Leukemia.* 2009;23(12):2233-2241. doi:10.1038/leu.2009.175
21. Nath S V., Nicholson I, Tapp H, Zola H, Zannettino ACW, Revesz T. Reticulin fibres anchor leukaemic blasts in the marrow of patients with acute lymphoblastic leukaemia. *Med Hypotheses.* 2011;77(3):333-335. doi:10.1016/j.mehy.2011.05.007
22. Noren-Nyström U, Roos G, Bergh A, Forestier E. Prognostic impact of vascular density and fibrosis in the bone marrow of children with high-risk acute lymphoblastic leukemia [6]. *Leukemia.* 2005;19(11):1998-2001. doi:10.1038/sj.leu.2403953
23. Norén-Nyström U, Roos G, Bergh A, et al. Bone marrow fibrosis in childhood acute lymphoblastic leukemia correlates to biological factors, treatment response and outcome. *Leukemia.* 2008;22(3):504-510. doi:10.1038/sj.leu.2405072
24. Norén-Nyström U, Heyman M, Frisk P, et al. Vascular density in childhood acute lymphoblastic leukaemia correlates to biological factors and outcome. *Br J Haematol.* 2009;146(5):521-530.
doi:10.1111/j.1365-2141.2009.07796.x
25. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 Revision to the World Health Organization Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemia. *Vol 127.*; 2016. doi:10.1182/blood-2016-03-643544
26. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. WHO Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues Lyon; 2008. *Vol 117.*; 2008. doi:10.1182/blood-2011-01-293050
27. Hoelzer D, Bassan R, Dombret H, et al. Acute lymphoblastic leukaemia in adult patients: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2016;27(March):v69-v82. doi:10.1093/annonc/mdw025

28. *Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. Interaction of bone marrow stromal cells with lymphoblasts and effects of prednisolone on cytokine expression. Ann Hematol. 2015;1863(3):327-332. doi:10.1007/s00277-005-0042-8*
29. *Leiva O, Ng SK, Chitalia S, Balduini A, Matsuura S, Ravid K. The role of the extracellular matrix in primary myelofibrosis. Blood Cancer J. 2017;7(2):1-9. doi:10.1038/bcj.2017.6*
30. *Roberts KG, Li Y, Turner DP, et al. Targetable Kinase-Activating Lesions in Ph-like Acute Lymphoblastic Leukemia. 2014. doi:10.1056/NEJMoa1403088*
31. *Herold T, Schneider S, Metzeler KH, et al. Adults with Philadelphia chromosome – like acute lymphoblastic leukemia frequently have IGH-CRLF2 and JAK2 mutations , persistence of minimal residual disease and poor prognosis. 2017;102(1):130-138. doi:10.3324/haematol.2015.136366*