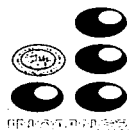




65
11227



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS SUPERIORES Y POSGRADO

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

Utilidad de la citología en el diagnóstico de infiltración leucémica del sistema nervioso central en pacientes con leucemia aguda linfoblástica: ¿Debe ser la citología el estándar de oro?

Tesis en opción al título de:
Especialista en Medicina Interna

Presenta:
Eric Takehiro Kimura Hayama

Dirigida por:
Dr. Xavier López-Karpovitch

México, D.F.

Febrero 2003

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

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

**TESIS EN OPCIÓN AL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN MEDICINA INTERNA**

TÍTULO: *Utilidad de la citología en el diagnóstico de infiltración leucémica del sistema nervioso central en pacientes con leucemia aguda linfoblástica: ¿Debe ser la citología el estándar de oro?*

AUTOR: DR. ERIC TAKEHIRO KIMURA HAYAMA

SEDE: Departamento de Medicina Interna y Departamento de Hematología y Oncología. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

TUTOR: Dr. Xavier López-Karpovitch

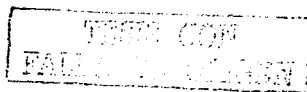
COLABORADORES:

QFB. Josefa Piedras

Dr. Erick Crespo Solís

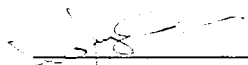
Dr. Rodrigo Ruiz Soto

Dr. J. Abraham Simón





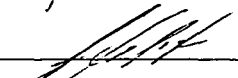
INCIMNSZ
INSTITUTO NACIONAL
DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICION
"DR. SALVADOR ZUBIRAN"
DIRECCION DE ENSEÑANZA



Dr. Luis Federico Uscanga Domínguez
Subdirector Médico de Enseñanza



Dr. Alfonso Gullías Herrero
Director del Curso de Medicina Interna



Dr. Xavier López-Karpovitch
Tutor de tesis y Jefe del Departamento
de Hematología y Oncología

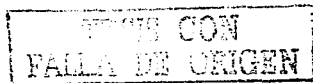
**COPIA CON
SALA DE ORIGEN**

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por su apoyo incondicional para mi formación profesional.

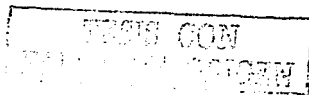
A Gaby, mi esposa, razón de mi superación personal.

A todos los pacientes, motivo de nuestra profesión.



ÍNDICE

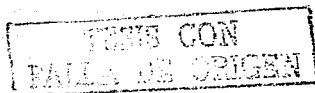
1. Introducción.....	1
2. Hipótesis.....	6
3. Objetivo.....	6
4. Material y métodos.....	6
a. Procedimientos de laboratorio.....	9
b. Análisis estadístico.....	12
c. Consideraciones éticas.....	12
5. Resultados.....	13
6. Discusión.....	16
7. Conclusión.....	20
8. Bibliografía.....	21
9. Tablas.....	26



INTRODUCCIÓN

Las leucemias agudas resultan de la transformación y expansión clonal de un progenitor celular de la médula ósea o timo. Las leucemias agudas linfoides (LAL) en el adulto tienen una frecuencia de 1/100.000 habitantes por año. Se pueden clasificar en base a la expresión de antígenos celulares (inmunofenotipo) identificados mediante citometría de flujo, los cuales permiten determinar la estirpe y el grado de maduración de las células neoplásicas.^{1,2}

La infiltración del sistema nervioso central (SNC) por vía hematogena o invasión directa puede involucrar las meninges, raíces nerviosas y parénquima cerebral^{3,4} y ocurre entre el 1-15% de los adultos al momento de su presentación. Sin el empleo de profilaxis al SNC, aproximadamente un tercio de los pacientes desarrollará eventualmente infiltración nerviosa, y la supervivencia libre de eventos a SNC a 5 años es del 42%.^{5,6} De acuerdo a informes del departamento de Hematología y Oncología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), el 15% de los pacientes con LAL recaen de manera aislada en el SNC y el 4% lo hacen de manera concomitante en médula ósea (Velázquez, datos no publicados de pacientes vistos en el INCMNSZ de 1995 al 2001). Aproximadamente, el 20-40% de los pacientes con recaída en el SNC permanecen sin afección leucémica en otros sitios corporales.⁷ Por otro lado, los pacientes con LAL e infiltración al SNC pueden cursar asintomáticos hasta en una tercera parte de los casos; mientras que en aquellos con síntomas, éstos incluyen datos de



cráneo hipertensivo, afección de par craneal y nervios periféricos, así como síndrome hipotalámico, entre otros.³

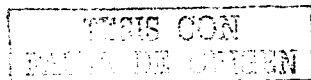
La variabilidad en la prevalencia de infiltración al SNC en pacientes con LAL descrita en series previas, en parte puede deberse a la falta de una adecuada prueba diagnóstica. La observación directa de las células a través de la microscopia —citología—, reconocida como el estándar de oro, tiene una sensibilidad que oscila entre 45-94% en análisis de una muestra, y del 93% en muestras seriadas.^{8,9} Esta sensibilidad es sumamente variable, ya que la adecuada interpretación del LCR depende del tipo infiltración (focal o difusa), la forma de recolección, cantidad y procesamiento de la muestra, debido a que la citocentrifugación puede ocasionar lisis celular,⁹ lo que puede dar lugar a la alta frecuencia de falsos negativos (40%).^{3,4} Por otra parte, los falsos positivos pueden deberse a la presencia de elementos hematológicos anormales, los cuales pueden reflejar cambios por quimioterapia previa, infección intercurrente o dilución de sangre periférica.^{9,10} Para evitar la falta de detección de casos verdaderamente positivos, se ha recomendado obtener muestras de por lo menos 10.5 mL, de preferencia del sitio con afección conocida, un procesamiento inmediato, y confirmación en caso de una citología inicial positiva,⁸ siendo la gran mayoría de estas recomendaciones de difícil aplicación en la práctica clínica.

De tal forma que hasta el momento no se cuenta con un método adecuado para la detección de la infiltración del SNC en pacientes con LAL.^{1,3,5,11-13} Es así como en 1985 un grupo de expertos se reunió con el objeto de definir los



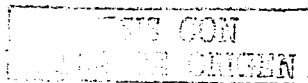
critérios de infiltración del SNC en pacientes con LAL a partir de un Consenso; definición que hasta la fecha se considera como el estándar de oro: la presencia de por lo menos 5 leucocitos/ μ L en el LCR con morfología inequívocamente blástica en una muestra citocentrifugada.¹⁴ A pesar de que algunos autores consideran esta definición como adecuada,¹⁰ recientemente su utilidad ha sido cuestionada,^{13,15,16} ya que las nuevas técnicas de inmunotipificación han permitido una mejor identificación de poblaciones celulares inmaduras aún en células cuya morfología es aparentemente normal. Esto es posible debido a que técnicas como la citometría de flujo pueden identificar la expresión de antígenos específicos de dichas células.¹⁶ La debilidad de la definición del consenso de Roma se hizo evidente en el estudio de Mahmoud *et al*, quienes mostraron que la evolución clínica de pacientes con menos de 5 leucocitos/ μ L fue similar a la de aquellos pacientes quienes cumplan con el criterio de infiltración recomendado por el consenso de Roma.¹⁵

El diagnóstico de leucemia con infiltración del SNC tiene además una implicación pronóstica debido a que se relaciona con la duración de la remisión³ y de su tratamiento. Por otro lado, estos métodos de tratamiento pueden asociarse a la presencia de múltiples efectos colaterales como son los trastornos neuropsicológicos, problemas de aprendizaje y tumores cerebrales secundarios (1-1.39%) —riesgo hasta 20 veces mayor que en la población general—.^{6,9,17-20}



Debido a la gran variabilidad en los resultados de la prueba considerada hasta ahora como el estándar de oro y a que el diagnóstico de infiltración a SNC por leucemia tiene implicación pronóstica, se han tratado de identificar otros métodos diagnósticos más sensibles y específicos, entre ellos la medición del contenido de DNA,²¹ niveles de ferritina, beta 2 microglobulina e isoformas de la lactato deshidrogenasa²² en LCR; además de estudios de imagen.^{1,23}

Pese a que la citometría de flujo ha demostrado ser útil en detectar enfermedad mínima residual en médula ósea de pacientes con LAL,²⁴ los estudios iniciales de inmunotipificación para diagnóstico de infiltración leucémica del SNC han mostrado resultados discordantes;^{13,16,21,25,26} Las investigaciones practicadas por Redner *et al*, y Subirá *et al*^{21,26,27} fueron pioneras en citometría de flujo. Redner empleó la identificación del antígeno CD10 en 5 pacientes, concluyendo que los marcadores celulares podrían ser útiles en el diagnóstico de esta manifestación. Por otra parte, Subirá²⁷ empleó anticuerpos monoclonales contra CD3, CD7, CD5, CD10, CD19 y CD34 en LCR para identificar infiltración del SNC por LAL y encontró que todos los pacientes con citometría de flujo negativa y citología positiva, permanecían sin infiltración. Sin embargo, la administración en el tratamiento ("intensificación"), en aquellos pacientes con citometría de flujo positiva y citología negativa, impidió que pudiese corroborarse la validez de este nuevo método. Los autores concluyeron que la citometría de flujo ofrece resultados más rápidos y con mayor sensibilidad que la citología del LCR en el diagnóstico de infiltración leucémica de leptomeninges, pudiéndose recomendar su uso en todo LCR de



este grupo de pacientes. La combinación empleada por Subirá²⁷ de los marcadores CD10 y CD34, podría tener gran utilidad clínica ya que estos antígenos no son expresados en linfocitos del SNC de pacientes con leucemia sin afección del SNC, pese a que se ha demostrado su existencia en numerosas células del cuerpo, incluidos el endotelio y el tejido cerebral.^{28,29}

Otra técnica empleada en la detección de infiltración del SNC ha sido la medición en LCR de beta 2 microglobulina, que es sintetizada principalmente por linfocitos y cuyo incremento refleja un aumento en el recambio de estas células. No obstante, los resultados como herramienta diagnóstica han sido contradictorios, existiendo incluso cifras de sensibilidad del 100% y especificidad del 75%.^{7,30-34}

Finalmente, la elevación de los niveles de ferritina en el LCR de pacientes con leucemia también ha sido propuesta como un marcador útil en la detección de pacientes con infiltración al SNC, aunque los resultados también han mostrado discordancia.³⁵⁻³⁷

Es así, como la alta prevalencia de infiltración al SNC en pacientes con LAL y la implicación pronóstica de esta manifestación, expresa la necesidad de buscar una mejor herramienta para su diagnóstico temprano. De tal forma que decidimos realizar un estudio con el objeto de evaluar la utilidad de la citometría de flujo, concentraciones de ferritina y beta 2 microglobulina en LCR en el diagnóstico de la infiltración del SNC en pacientes con LAL.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

HIPÓTESIS

Hipótesis 1: La utilidad de la citometría de flujo es superior a la de la citología para el diagnóstico de infiltración del SNC en pacientes con LAL.

Hipótesis 2: La utilidad de la medición de ferritina en el LCR es superior a la de la citología para el diagnóstico de infiltración del SNC en pacientes con LAL.

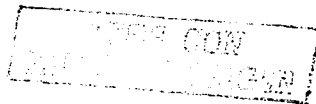
Hipótesis 3: La utilidad de la medición de beta 2 microglobulina en LCR es superior a la de la citología para el diagnóstico de infiltración del SNC en pacientes con LAL.

OBJETIVOS

1. Conocer la utilidad de la citometría de flujo en el LCR en el diagnóstico de infiltración leucémica del SNC en pacientes con LAL.
2. Conocer la utilidad de las concentraciones de ferritina en el LCR en el diagnóstico de infiltración leucémica del SNC en pacientes con LAL.
3. Conocer la utilidad de las concentraciones de beta 2 microglobulina en el LCR en el diagnóstico de infiltración leucémica del SNC en pacientes con LAL.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio transversal, en el cual se incluyeron a todos los pacientes con diagnóstico de leucemia aguda linfocítica (LAL) o LAL con expresión aberrante de marcador mielocítico, y pacientes en fase blástica linfocítica de leucemia mielocítica crónica (LMC), atendidos en el departamento de Hematología y Oncología del

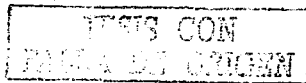


INCMNSZ, entre enero y julio del 2002. El diagnóstico de fase blástica en LMC y de leucemia aguda se estableció con base a la presencia de $\geq 30\%$ blastos en el aspirado de médula ósea; y su estirpe fue definida de acuerdo a la expresión de 2 ó más marcadores linfoides (punto de corte $\geq 30\%$) o mieloides (punto de corte $\geq 20\%$). La leucemia aguda linfoide con expresión aberrante de marcador mieloides fue definida por la expresión de 2 ó más marcadores linfoides y mieloides.

En estos pacientes se determinó a través del expediente clínico las características clínicas y demográficas al momento del diagnóstico; así como la clasificación de la LAL de acuerdo a la *French-American-British (FAB)* y al inmunofenotipo.

De acuerdo al protocolo 0152, la detección y quimioprofilaxis (metotrexate 12.5 mg y arabinósido de citocina 80 mg) de infiltración leucémica al SNC se realizó mediante punción lumbar de la siguiente forma:

1. En caso de existir infiltración: 2 punciones lumbares por semana para la administración de la quimioterapia intratecal (QTIT) hasta que dos muestras consecutivas fueran negativas para infiltración por análisis citológico.
2. En caso de no existir infiltración: punción lumbar en las semanas 0, 1, 4, 5, 7, 9, 11, 25, 28 y 32 de realizado el diagnóstico, y posteriormente cada 3 meses durante los primeros 2 años de vigilancia.



Durante cada una de las punciones lumbares se obtuvo una muestra de 7 mL de LCR previa a la aplicación de la QTIT, la cual fue utilizada de la siguiente manera: 1 ml para conteo celular, 1 mL para realización de citoquímico general (pH, glucosa, DHL, proteínas), 4 mL para medición de beta 2 microglobulina, ferritina y citometría de flujo y 1 mL para la citología.

El estudio citológico fue realizado por un médico hematólogo de base quien estuvo ciego al diagnóstico y condición clínica de los pacientes, así como por 2 médicos residentes de 3er año del curso de Hematología. Las muestras analizadas por citología fueron clasificadas en 4 grupos: 1) Citología positiva para infiltración, si existían más de 5 leucocitos/ μ L con blastos en una muestra citocentrifugada. 2) Citología negativa para infiltración, ante la ausencia de blastos. 3) Citología indeterminada, ya sea por la presencia de núcleos desnudos o células mononucleares en una muestra citocentrifugada, y 4 ó menos leucocitos/ μ L. 4) Traumático, si existían 10 ó más eritrocitos/ μ L. Estas últimas fueron eliminadas del análisis. El resultado definitivo (positivo, negativo, indeterminado o traumático) fue aquel en el que coincidieron por lo menos dos de los tres observadores. Por otra parte, las muestras interpretadas como indeterminadas por dos de los tres observadores fueron consideradas como positivas en el análisis final, ya que se ha demostrado que la evolución clínica de los pacientes con menos de 5 leucocitos/ μ L en el LCR es similar a aquellos cuyo diagnóstico de infiltración considera a los criterios del consenso de Roma.^{14,15}

ANÁLISIS CON
MALLA DE OXIGEN

Como grupo control incluimos 20 pacientes del mismo instituto sin neoplasia hematológica en quienes se realizó punción lumbar y toma de LCR por indicación del médico tratante: 7 muestras correspondieron a pacientes con sospecha no confirmada de neuroinfección, 5 de pacientes sometidos a bloqueo espinal como intervención anestésica previo a un procedimiento quirúrgico, 4 muestras de pacientes con patología inflamatoria del SNC (vasculitis), 2 muestras de pacientes con neuroinfección y 1 muestra de una paciente con aracnoidocele.

Procedimientos de laboratorio. Las muestras obtenidas para citología y citometría de flujo fueron procesadas dentro de las primeras 3 horas después de la toma, mientras que las destinadas para la medición de ferritina y beta 2 microglobulina se almacenaron a -20° C hasta su utilización, previa centrifugación para eliminar las células.

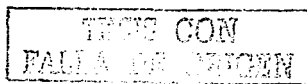
Ferritina: La cuantificación de ferritina en el LCR se realizó mediante un método automatizado en equipo Elecsys de Roche (Hitachi, Tokio, Japón) el cual emplea el principio de electroquimioluminiscencia. El método es el siguiente: en la primera incubación se mezclan 15 μ L de la muestra con el anticuerpo monoclonal ferritina-específico y el anticuerpo monoclonal ferritina-específico marcado con rutenio. En la segunda incubación se agregan las micropartículas marcadas con estreptavidina, formándose el complejo estreptavidina-biotina.



Finalmente, la mezcla es aspirada y colocada en una celda donde las microparticulas son magnéticamente capturadas en la superficie de un electrodo. Las substancias no capturadas son removidas. Al aplicar corriente, se induce la emisión de quimioluminiscencia que es medida con un fotomultiplicador. Los resultados se determinan por una curva de calibración.

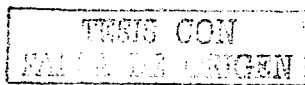
Beta 2 microglobulina: La beta 2 microglublina se midió por un método semiautomatizado nefelométrico (Minineph, The binding site, Birmingham, UK) basado en la reacción de la beta 2 microglublina con un anticuerpo específico unido a partículas de látex. El método es el siguiente: se diluyen 780 μ L de buffer y 20 μ L de la muestra control o del LCR (dilución 1/40). De dicha dilución se colocan 30 μ L, y se agrega el anticuerpo, dejándose en incubación en 30 minutos para la lectura final por el sistema nefelométrico.

Citometría de flujo: Para la identificación de los antígenos asociados a linaje linfóide de células B y de células T (inmunofenotipo), así como para evaluar la maduración de las células presentes en el LCR, se emplearon las siguientes combinaciones de anticuerpos monoclonales conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) o con ficoeritriná (PE): CD19/CD5, CD10/CD34 y CD4/CD8. Se incluyó además un control de isotipo para eliminar la autofluorescencia y el CD45 (conjugado con PerCP) para identificar a la población de blastos. El LCR se distribuyó en 3 tubos, cada uno con 500 μ L del LCR y 10 μ L de la combinación de anticuerpos monoclonales. Una vez mezclados, se incubó por 30 minutos a 4-8° C, y posteriormente fue lavado con buffer salino fosfato (PBS) para eliminar los anticuerpos no fijados. La muestra fue centrifugada a



1200 rpm durante 5 min. y decantado el sobrenadante. Se agregaron 400 μ L de PBS y 100 μ L de paraformaldehído 1% para fijar la muestra. Para la lectura de fluorescencia se utilizó un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, San José California, EUA) y el porcentaje de células expresando los marcadores de línea se obtuvo por análisis con el programa Cellquest (Becton Dickinson).

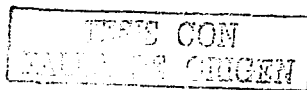
Las muestras obtenidas de los controles no fueron analizadas por citometría de flujo por dos razones: 1) en el estudio efectuado por Subirá *et al*, no se demostró la presencia de células con expresión de CD10 y CD34 en el líquido de los pacientes controles.²⁷ 2) Por otro lado, Homans *et al*,¹³ quien empleó anticuerpos monoclonales para la identificación de linfoblastos en el LCR mediante técnica de microesferas de látex (inmunoesferas), demostró que en los individuos sanos y con LAL sin infiltración en SNC empleados como controles, la expresión de CD10 osciló entre 0-3% y 0-10% respectivamente, mientras que en aquellos infiltrados la expresión varió entre 13-92%. Estos hallazgos fueron concordantes al estudio realizado por la misma autora en 1990.¹⁶ donde la expresión de CD10 en células blásticas osciló entre 55 y 88%, mientras que la de los controles (pacientes con LAL en remisión o en mantenimiento e individuos sanos) entre $0.8 \pm 1.1\%$. En este último estudio el punto de corte para positividad de CD10 se estableció a 2 desviaciones estándar del normal, es decir $>3\%$. Con este punto de corte prácticamente todos los pacientes con LAL al diagnóstico tuvieron LCR positivos para CD10 ($5.4 \pm 11\%$) sin tener datos de infiltración. Dicho hallazgo no pudo tener una



adecuada explicación por parte de los autores, hipotetisándose que dicha población fuera de sangre periférica (poco probable), y concluyéndose que dicho hallazgo pudiese significar infiltración leucémica oculta. Por este motivo nuestro estudio tomó como punto de corte 10%. Finalmente, dado que la cantidad de células en el LCR es sumamente variable —el número de eventos contados (programados en el citómetro) osciló entre 500 y 10000, y los eventos en ventana entre 30 y 8000— se eliminaron aquellas muestras con 30 ó menos células, con el objeto de que la positividad de una sola célula para CD10 ó CD34 no excediera el límite normal superior encontrado en otros estudios.^{13,16}

Análisis estadístico. Las variables dicotómicas fueron expresadas en frecuencias y porcentajes, mientras que las continuas en medias, medianas y desviación estándar. La utilidad diagnóstica de los diferentes métodos evaluados fue determinada con base a los valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo, y razón de verosimilitud positivo y negativo. Para evaluar la precisión del estándar de oro (citología) realizamos pruebas de concordancia entre los 3 observadores. Las diferencias fueron evaluadas utilizando la prueba de Kappa simple. El análisis bivariado fue realizado con la prueba de χ^2 con corrección de Yates en el caso de las variables dicotómicas y U Mann-Whitney en el caso de las continuas.

Consideraciones éticas. Este proyecto fue registrado y aprobado por el Comité Institucional de Investigación Biomédica en Humanos del INCMNSZ



(número de proyecto 1144). El ingreso al protocolo no modificó la vigilancia ni el tratamiento de la leucemia.

RESULTADOS

Se incluyeron 75 muestras de LCR de 31 pacientes (tabla 1): 16 mujeres (53.3%) y 15 hombres (46.7%), con diagnóstico de LAL (25), LAL con expresión aberrante de marcador mielóide (3), crisis blástica de LMC (1), linfoma linfoblástico (1), y 1 paciente del cual no pudieron ser obtenidos sus datos clínicos. De acuerdo a la expresión de antígenos específicos, 25 pacientes presentaron leucemias de estirpe B (80.6%) y 5 pacientes cursaron con leucemias de estirpe T (16.1%). La media de edad fue de 30.47 ± 12.43 años (intervalo 16-62 años).

De las 75 muestras iniciales, 5 fueron eliminadas del análisis por citometría de flujo por ser insuficientes (3.3%); mientras que las 2 muestras (1.5%) traumáticas no se emplearon para ninguna de las pruebas estudiadas en el trabajo. El número final de muestras analizadas fue de 68, y de acuerdo al examen por citología 5 fueron positivas, 5 indeterminadas y 58 negativas. Además, de las muestras obtenidas para el análisis de beta 2 microglobulina y ferritina, 2 (1.5%) y 3 (2.25%) muestras se extraviaron respectivamente. El análisis citoquímico del LCR no se realizó en 11 muestras (8.25%).

ESTUDIOS CON
FALLA DE CENSUR

En el análisis interobservador no existió buena concordancia de resultados entre los médicos, siendo la máxima variación entre las muestras reportadas como indeterminadas (κ 0.148-0.387) (tabla 2).

En la tabla 3 se muestran los pacientes con citología positiva e indeterminada y aquellos con citometría positiva y citología negativa, con sus valores de ferritina, beta 2 microglobulina, y expresión de los antígenos CD10, CD34, CD10/34 y CD19 correspondientes.

En la tabla 4 se muestran los valores del análisis univariado y bivariado de beta 2 microglobulina, ferritina, pH, DHL, glucosa y proteínas del LCR en los pacientes positivos y negativos para infiltración leucémica del SNC. La DHL estuvo elevada (mayor a 40 U/mL) en 4% de las muestras, 2% presentaron hipoglucoorraquia (menos de 40 mg/dL) y 10% tuvieron hiperproteínoorraquia (mayor a 46 mg/dL). De acuerdo al análisis bivariado, ninguna de las variables del estudio citoquímico demostró significancia estadística para infiltración (tabla 4) ni tampoco existió correlación (Spearman) entre ellas.

Los valores de sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo y negativo (VPP, VPN), y las razones de verosimilitud positiva y negativa (RVP, RVN) de las pruebas evaluadas fueron los siguientes:

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Citometría de flujo: (Tablas 5-7)

Para las muestras identificadas como positivas por citología:

- A. Sensibilidad (S): 80
- B. Especificidad (E): 94
- C. Valor predictivo positivo (VPP): 57
- D. Valor predictivo negativo (VPN): 98
- E. Razón de verosimilitud positivo (RVP): 13.3
- F. Razón de verosimilitud negativo (RVN): 0.21

Para aquellas muestras identificadas como indeterminadas, es decir con núcleos desnudos, células mononucleares y 1-4 blastos/ μ L, los resultados de S, E, VPP, VPN, RVP y RVN fueron similares a los obtenidos para las muestras positivas (S=60, E=94, VPP=50, VPN=97, RVP=10 y RVN=0.42). Al considerar tanto a las muestras de LCR positivas como a las clasificadas como indeterminadas por citología como un sólo grupo y al compararlas con los resultados positivos por citometría de flujo, los resultados tampoco variaron: S=70, E=95, VPP=70, VPN=95, RVP=11.6, RVN 0.31.

El valor de referencia de beta 2 microglobulina y ferritina obtenida de los sujetos controles fue de 1.4 ± 2 mg/L y 6.4 ± 8 μ g/L respectivamente, el cual coincide con los valores previamente reportados en otras series.³⁰⁻³⁷ Los valores de referencia para los casos, se establecieron con 2 desviaciones estándar de la media obtenida. La beta 2 microglobulina estuvo elevada en 17

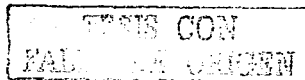
TRIPS CON
FALLA EN ORIGEN

pacientes (22.7%) y la ferritina en 7 pacientes (9.3%) (tabla 8). El promedio de beta 2 microglobulina en las muestras de LCR negativas e indeterminadas por citología fue de 2.05 mg/L (DS 1.51) y en la ferritina fue de 7.03 µg/L (DS 4.63). En las muestras positivas por citología para infiltración estos promedios fueron de 2.29 mg/L (DS 2.52) y 45.76 µg/L (43.43) respectivamente, aunque no alcanzaron significancia estadística ($p=0.846$ y $p=0.160$ de manera respectiva).

DISCUSIÓN

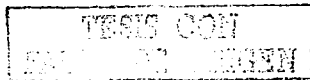
La prevalencia de infiltración leucémica del SNC es elevada en los pacientes con LAL, y tiene una implicación pronóstica y terapéutica. El estándar de oro aceptado actualmente es la citología, sin embargo su utilidad ha sido cuestionada. Es por eso que decidimos evaluar otros métodos diagnósticos como la citometría de flujo y los niveles de ferritina y beta 2 microglobulina.

En el presente reporte encontramos que la citología sólo fue capaz de detectar 5 casos positivos mientras que la citometría detectó 10 (tabla 5). Debido a que el estándar de oro no parece ser tan útil y reproducible (la variabilidad interobservador es muy elevada, aún siguiendo las recomendaciones para la toma y procesamiento de muestras de LCR publicadas por otros autores⁸), los valores de sensibilidad para la citometría de flujo fueron bajos. Sin embargo, como la inmunotipificación identifica la presencia de antígenos leucocitarios, entre ellos el CD34 —evidencia inmejorable de la presencia de células



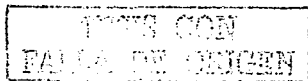
inmaduras en el LCR de estos pacientes—, los casos identificados como falsos positivos probablemente correspondan a verdaderos positivos.

En la investigación de Subirá *et al*²⁷ la citometría de flujo fue considerada como el estándar de oro basándose en su fundamento biológico, por lo que dichos autores administraron tratamiento intratecal a aquellos pacientes con citología negativa pero con resultado positivo por citometría de flujo y no corroborándose la infiltración en base a la evolución natural de la enfermedad. A diferencia del trabajo de Subirá *et al*²⁷, en nuestro estudio los pacientes negativos para infiltración leucémica por citología pero positivos por citometría de flujo sólo recibieron el esquema profiláctico con metotrexate y arabinósido de citocina intratecal de acuerdo al protocolo del departamento. De los 5 pacientes (10 muestras de los pacientes 1 a 5 de la tabla 4) en quienes la citometría de flujo fue positiva para infiltración, 3 de ellos tuvieron resultados por citología negativos o indeterminados (pacientes 2, 4 y 5 de la tabla 4); sin embargo, el análisis de las muestras subsecuentes de los mismos pacientes por citometría de flujo volvió a ser positiva (excepto en el paciente 5 de quien sólo se obtuvo una sólo muestra durante la duración del estudio). Si bien la vigilancia clínica de estos pacientes no demostró ser compatible con infiltración del SNC, es probable que si haya existido infiltración debido a tres razones fundamentales: 1) la concentración y número de células anormales que es capaz de identificar la citología es menor que la que logra reconocer la citometría de flujo; 2) es probable que la dosis administrada de quimioprofilaxis intratecal haya sido



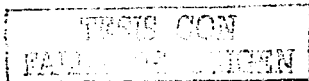
suficiente para eliminar la escasa cantidad de células neoplásicas antes de que la citología pudiese identificarlas o antes de que la carga tumoral fuera suficientemente grande para que los pacientes tuvieran síntomas de infiltración; y, 3) es importante recordar que hasta en una tercera parte de los casos de infiltración leucémica del SNC cursan asintomáticos, por lo que el no haber presentado datos clínicos durante el seguimiento no necesariamente significa que no se encontraran con infiltración.³

Por otra parte, encontramos que otros de los marcadores propuestos para la detección de infiltración del SNC por leucemia, como son la beta 2 microglobulina y la ferritina, no demostraron ser útiles para este efecto. Sin embargo, al igual que la citometría de flujo, estos resultados pudieron deberse a la pobre sensibilidad del estándar de oro. Si bien la ferritina no se encontró aumentada en los pacientes con infiltración del SNC al momento de su diagnóstico, se observó una tendencia hacia su incremento en los dos pacientes infiltrados y en aquellos positivos por citometría de flujo pero con citología normal, alcanzando una concentración máxima aproximadamente a una semana de haber iniciado tratamiento antineoplásico intratecal, y posteriormente disminuyendo hacia niveles normales (tabla 4). Por lo tanto, es posible que la ferritina sea más bien un marcador bioquímico de resolución de infiltración cuando se cuenta con determinaciones seriadas. Este efecto o alguna otra tendencia en particular no se observó en las concentraciones de beta 2 microglobulina. El efecto de elevación de las cifras de beta 2



microglobulina con la administración de quimioprofilaxis intratecal descrito por Öberg *et al*,³³ sólo se observó en un paciente de los 17 quienes contaban con punciones seriadas.

Los resultados de ferritina y beta 2 microglobulina encontrados en nuestro estudio coinciden con los datos publicados por algunos autores³¹ y difieren con los reportados por otros investigadores.^{7,32-37} Con respecto a los estudios de beta 2 microglobulina, cabe mencionar que la serie con mayor número de casos (30 casos vs 9, 11 y 16 casos) fue la que concluyó, el no recomendar la utilización de esta prueba como marcador de infiltración. Es probable que los resultados de nuestro estudio no hayan coincidido con lo reportado por otros autores debido a los puntos de corte de los valores de referencia incluidos en los demás estudios. Si bien la cifra promedio de los pacientes controles fue concordante con lo reportado en otras series,^{7,32-34} al aplicar dos desviaciones estándar para incluir al 95% de los controles, los valores de referencia incluían a las concentraciones consideradas como anormales en otras series. Esta pudiese haber sido la causa de la discrepancia de resultados, así como también lo pudo haber sido la falta de selección de controles sanos en algunos de los otros estudios.^{7,32,34} También es importante recalcar que en algunos de estos trabajos, la cantidad de pacientes con LAL fue mínima (incluso en la investigación de Öberg *et al*,³³ ninguno de los pacientes incluidos tenía LAL) y basaron su universo de trabajo en pacientes con otras neoplasias sólidas o hematológicas (linfoma), cuyo comportamiento biológico y bioquímico pudiese



ser diferente a las LAL. De manera similar a lo expuesto con anterioridad, los estudios practicados con ferritina tampoco incluyeron sólo pacientes con LAL, sino también otras neoplasias sólidas y hematológicas.³⁵⁻³⁷

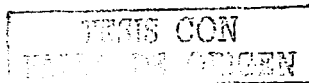
CONCLUSIÓN

Los resultados aquí mostrados sugieren que aún cuando la citología continúa siendo considerada como el estándar de oro en el diagnóstico de infiltración por leucemia en el SNC, la adecuada correlación entre la citología y la citometría de flujo del LCR sugiere que la inmunotipificación podría sustituir a la citología. Principalmente porque la citología no cuenta con adecuada concordancia interobservador, y debido a que la citometría de flujo pudiese ser más sensible —capaz de identificar mayor cantidad de células— y específica —reconoce células que expresan antígenos asociados a leucemia—.

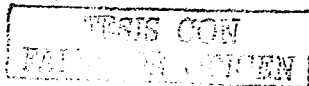
TESIS CON
PALABRAS CLAVES

BIBLIOGRAFÍA

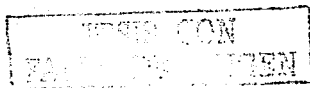
1. Cortes J. Central Nervous System Involvement in adult acute lymphocytic leukemia. *Hematol/Oncol Clin North Am* 2001;15(1):145-162.
2. Russell NH. Biology of acute leukemia. *Lancet* 1997;349:118-122.
3. Stewart DJ, Keating MJ, MaCredie KB, et al. Natural history of central nervous system acute leukemia in adults. *Cancer* 1981;47:184-196.
4. Glass JP, Melamed M, Chernik NL, et al. Malignant cells in cerebrospinal fluid (CSF): the meaning of a positive CSF cytology. *Neurology* 1979;29:1369-1375.
5. Cortes J, O'Brien SM, Pierce S, et al. The value of high dose systemic chemotherapy and intrathecal therapy for central nervous system prophylaxis in different high risk groups of adult acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1995;86:2091-2097.
6. Löning L, Zimmermann M, Reiter A, et al. Secondary neoplasms subsequent to Berlin-Frankfurt-Munster therapy of acute lymphoblastic leukemia in childhood: significantly lower risk without cranial radiotherapy. *Blood* 2000;95:2770-2775.
7. Mavlight GM, Stuckey SE, Cabanillas FF, et al. Diagnosis of leukemia or lymphoma in the central nervous system by beta 2-microglobulin determination. *NEJM* 1980;303:718-722.
8. Glantz MJ, Cole BF, Glantz LK, et al. Cerebrospinal fluid cytology in patients with cancer. Minimizing false-negative results. *Cancer* 1998;82:733-739.



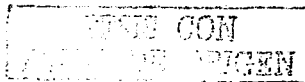
9. Gondos B, King EB. Cerebrospinal fluid cytology: Diagnostic accuracy and comparison of different techniques. *Acta Cytologica* 1976;20:542-547.
10. Gilchrist GS, Tubergen DG, Sather HN, et al. Low numbers of CSF blasts at diagnosis do not predict for the development of CNS leukemia in children with intermediate risk acute lymphoblastic leukemia: A children's cancer group report. *J Clin Oncol* 1994;12:2594-2600.
11. Hoelzer D, Thiel E, Loffler H, et al. Prognostic factors in a multicenter study for treatment of acute lymphoblastic leukemia in adults. *Blood* 1988;71:123-131.
12. Kantarjian HM, O'Brien S, Smith TL, et al. Results of treatment with hyper-CVAD, a dose-intensive regimen, in adult acute lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2000;18:547-561.
13. Homans A, Forman E, Barker B. Use of monoclonal antibodies to identify cerebrospinal fluid lymphoblasts in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1985;66:1321-1325.
14. Mastrangelo R, Poplack D, Bleyer A, et al. Report and recommendations of the Rome Workshop concerning poor-prognosis acute lymphoblastic leukemia in children: Biologic bases for staging, stratification, and treatment. *Med Pediatr Oncol* 1986;14:191-194.
15. Mahmoud HH, Rivera GK, Hancock ML, et al. Low leukocyte counts with blast cells in cerebrospinal fluid of children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia. *NEJM* 1993;329:314-319.



16. Homans AC, Barker BE, Forman EN, et al. Immunophenotypic characteristics of cerebrospinal fluid cells in children with acute lymphoblastic leukemia at diagnosis. *Blood* 1990;76:1807-1811.
17. Bleyer WA, Poptack DA. Prophylaxis and treatment of leukemia in the central nervous system and other sanctuaries. *Semin Oncol* 1985;12:131-148.
18. Crossen JR, Garwood D, Glatstein E, et al. Neurobehavioral sequelae of cranial irradiation in adults: A review of radiation-induced encephalopathy. *J Clin Oncol* 1994;12:627-642.
19. Walter AW, Hancock ML, Pui CH, et al. Secondary brain tumors in children treated for acute lymphoblastic leukemia at St Jude Children's research Hospital. *J Clin Oncol* 1998;16:3761-3767.
20. Relling MV, Rubnitz JF, Rivera GK, et al. High incidence of secondary brain tumors after radiotherapy and antimetabolites. *Lancet* 1999;354:34-39.
21. Redner A, Melamed M, Andreeff M. Detection of central nervous system relapse in acute leukemia by multiparameter flow cytometry of DNA, RNA, and CALLA. *Ann NY Acad Sci* 1986;468:241-255.
22. Lossos IS, Breuer R, Intrator O, Lossos A. Cerebrospinal fluid lactate dehydrogenase isoenzyme analysis for the diagnosis of central nervous system involvement in Hematooncologic patients. *Cancer* 2000;88:1599-1604.



23. Chamberlain MC, Sandy AD, Press GA. Leptomeningeal metastasis: A comparison of gadolinium enhanced MR and contrast-enhanced CT of the brain. *Neurology* 1990;40:435-438.
24. Farahat H, Morilla A, Owusu-Ankomah K, Morilla R, Pinkerton CR, Treleaven JG, Matutes E, Powles RL, Catovsky D. Detection of minimal residual disease in B-lineage acute lymphoblastic leukaemia by quantitative flow cytometry. *Br J Haematol* 1998;101:158-164.
25. Hooijkaas, Hählen H, Adriaansen HJ, et al. Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-positive cells in cerebrospinal fluid and development of overt CNS leukemia: a 5-year follow-up study in 113 children with TdT-positive leukemia or non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1989;74:416-422.
26. del Amo, Subirá D, Leal A, et al. Flow cytometry in diagnosis of central nervous system leukemic involvement. *J Pediat* 1996;129:775-776.
27. Subirá D, Castañón S, Román A, et al. Flow cytometry and the study of central nervous disease in patients with acute leukaemia. *Br J Haematol* 2001;112:381-384.
28. LeBien TW, McCormack RT. The Common Acute Lymphoblastic Leukemia Antigen (CD10) — Emancipation from a Functional Enigma —. *Blood* 1989;73:625-635.
29. Krause DS, Kacler MJ, Civin CI, Stratford WM. CD34: Structure, Biology, and Clinical Utility. *Blood* 1996;87:1-13.
30. Hansen PB, Kjeldsen L, Dalhoff K, Olesen B. Cerebrospinal fluid beta-2-microglobulin in adult patients with acute leukemia or lymphoma: a useful



marker in early diagnosis and monitoring of CNS-involvement. *Acta Neurol Scand* 1992;85:224.

31. Nagelkerke AF, van Kamp GJ, Veerman AJ, de Waal FC. Unreliability of beta-2-microglobulin in early detection of central nervous system relapse in acute lymphoblastic leukemia. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1985;21:659.
32. Clausen N, Ibsen KK. Central nervous system relapse surveillance by serial beta 2-microglobulin measurements in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Acta Paediatr Scand* 1984;73:848-854.
33. Öberg G, Hällgren R, Venge P. Beta 2 microglobulin, lysozyme and lactoferrin in cerebrospinal fluid in patients with lymphoma of leukaemia: relationship to CNS involvement and the effect of prophylactic intrathecal treatment with methotrexate. *Br J Haematol* 1987;66:315-322.
34. Koch TR, Lichtenfeld KM, Wiernik PH. Detection of central nervous system metastasis with cerebrospinal fluid beta-2-microglobulin. *Cancer* 1983;52:101-104.
35. Dillman E, López-Karpovitch X, Álvarez XH, et al. Ferritin and malignant hemopathies I. Ferritin in cerebrospinal fluid as an indicator of central nervous system leukemic involvement. *Rev Invest Clin* 1982;34:95-99.
36. Zandman-Goddard G, Matzner Y, Konijn AM, Hershko C. Cerebrospinal fluid ferritin in malignant CNS involvement. *Cancer* 1986;58(6):1346-1349.
37. Avilés A, Gómez R, Salas J. Ferritin in the cerebrospinal fluid as an early indicator of neuromeningeal involvement in patients with malignant lymphoma. *Gac Med Mex* 1991;127:249-252.

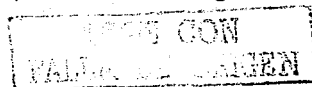


Tabla 1. Características de los pacientes

Características de los pacientes	N	%
Total de pacientes	31	100
- Hombres	15	46.7
- Mujeres	16	53.3
Leucemias T ó B		
- Leucemia de células B	25	80.6
- Leucemia de células T	5	16.1
- Información no incluida en el expediente	1	3.3
Diagnóstico definitivo		
- Leucemia aguda linfoblástica	25	80.6
- LAL con expresión aberrante de marcador mielóide	3	9.9
- Crisis blástica de LGC	1	3.3
- Linfoma linfoblástico	1	3.3
- Información no incluida en el expediente	1	3.3

Tabla 2. Concordancia interobservador de la citología

Resultado de citología	Observador	Kappa
Positiva	MB vs R1	0.653
	MB vs R2	0.485
	R1 vs R2	0.654
Negativa	MB vs R1	0.403
	MB vs R2	0.431
	R1 vs R2	0.523
Indeterminada	MB vs R1	0.148
	MB vs R2	0.387
	R1 vs R2	0.242
Traumática	MB vs R1	0.469
	MB vs R2	0.386
	R1 vs R2	0.386

MB = medico de base. R1 = residente número 1. R2 = Residente número 2.

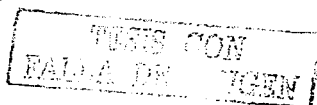


Tabla 3. Resultados de citometría de flujo, ferritina y beta 2 microglobulina en pacientes con citología positiva o indeterminada.

Paciente	Muestra	Citol	CF	Beta 2 MG mg/L (+/-) [¶]	Ferritina µg/L (+/-) [§]	CD10*	CD34*	CD10/ CD34*	CD19*
1	1	+	+	0.750 (-)	7.58 (-)	+	-	+	+
	2	+	+	ND	ND	+	+	+	+
	3	+	+	0.933 (-)	36.7 (+)	-	-	+	+
	4	-	-	1.115 (-)	15.47 (+)	-	-	-	-
	5	-	-	1.110 (-)	12.05 (-)	-	+	-	-
	6	-	-	4.492 (+)	7.45 (-)	-	-	-	-
2	1	Indet	+	1.35 (-)	2.23 (-)	+	-	-	+
	2	-	+	3.67 (+)	9.01 (-)	+	-	-	+
	3	-	+	1(-)	9 (-)	+	-	-	-
	4	Indet	-	4.97 (+)	12.9 (-)	-	-	-	-
	5	-	-	3.56 (+)	14.97 (+)	-	-	-	-
3	1	+	+	ND	ND	-	-	+	+
	2	+	-	5.2 (+)	93 (+)	-	-	-	-
	3	-	-	4.95 (+)	29.6 (+)	-	-	-	-
4	1	Indet	+	1.76 (-)	2.42 (-)	+	-	-	+
	2	Indet	+	1.1 (-)	5.5 (-)	+	-	-	+
	3	-	-	1.56 (-)	5 (-)	-	-	-	-
	4	-	-	1.46 (-)	4.11 (-)	-	-	-	-
	5	-	-	1.24 (-)	5.62 (-)	-	-	-	-
	6	-	-	1 (-)	10.24 (-)	-	-	-	-
	7	-	-	0.79 (-)	9.53 (-)	-	-	-	-
	8	-	-	4.83 (+)	14.75 (+)	-	-	-	-
	9	-	-	5.54	12.54 (-)	-	-	-	-
5	1	-	+	1.85 (-)	7.96 (-)	-	-	+	+
6	1	Indet	-	1(-)	6.2 (-)	-	-	-	-

Citol = citología, CF = citometría de flujo, Indet = indeterminado, (+) = positivo, (-) = negativo, ND = no disponible. ¶ El punto de corte para beta 2 microglobulina fue de 3.4 mg/L. § El punto de corte para ferritina fue de 14 µg/L. * El punto de corte para marcador positivo en LCR se estableció en >10%.

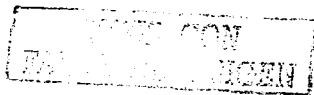


Tabla 4. Análisis de variables estudiadas de acuerdo a citología positiva o negativa

VARIABLE	Promedio	DE	P*
PH en LCR			0.47
- CN	7.88	0.14	
- CP	7.77	0.16	
Glucorraquia			0.86
- CN	65.64	45	
- CP	58.5	12	
DHL en LCR			0.63
- CN	16.29	9	
- CP	59.5	70	
Proteinorraquia			0.8
- CN	40	45.2	
- CP	30	34.6	
Pleiocitosis			0.5
- CN	2.74	6.3	
- CP	772	1092	
Beta 2 microglobulina en LCR			0.85
- CN	2.04	1.48	
- CP	2.98	3.15	
Ferritina en LCR			0.16
- CN	7.55	5.8	
- CP	50.2	60.4	

CN=citología negativa, CP=citología positiva, DE=desviación estándar.

* La p corresponde a la obtenida del análisis bivariable (U Mann-Whitney)

TESIS CON
FALLA EN EL MANEJO



Tabla 5. Tabla de 2x2 para citología positiva y citometría de flujo

Citometría de flujo	Citología positiva		TOTAL
	+	-	
+	4	3	7
-	1	55	56
TOTAL	5	58	63

Tabla 6. Tabla de 2x2 para citología indeterminada y citometría de flujo

Citometría de flujo	Citología positiva		TOTAL
	+	-	
+	3	3	6
-	2	55	57
TOTAL	5	58	63

Tabla 7. Tabla de 2x2 para citología positiva e indeterminada y citometría de flujo

Citometría de flujo	Citología positiva		TOTAL
	+	-	
+	7	3	10
-	3	55	58
TOTAL	10	58	68

Tabla 8. Distribución de los pacientes de acuerdo a sus valores de beta 2 microglobulina y ferritina del LCR

Beta 2 MG	N	%	Ferritina	N	%
Normal (<3.3 mg/L)	56	74.7	Normal (0-13.9 µg/L)	65	86.7
Anormal (>3.4 mg/L)	17	22.7	Anormal (>14 µg/L)	7	9.3
Subtotal	73	97.3	Subtotal	72	96
Faltantes	2	2.7	Faltantes	3	4
TOTAL	75	100	TOTAL	75	100

THIS IS NO SALE