



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

EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE CD96 EN CÉLULAS
TRONCALES HEMATOPOYÉTICAS PROVENIENTES DE
PACIENTES PEDIÁTRICOS CON LEUCEMIA MIELOIDE
AGUDA

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN:

PEDIATRÍA

PRESENTA:

DR. RUBÉN FIGUEROA PORTILLO

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. ELISA DORANTES ACOSTA



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

MÉXICO, D. F.

FEBRERO 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

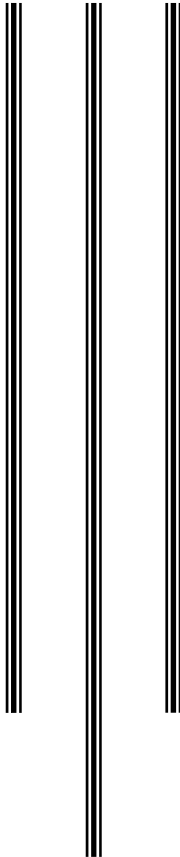
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



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



**EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE CD96 EN CÉLULAS
TRONCALES HEMATOPOYÉTICAS PROVENIENTES DE
PACIENTES PEDIÁTRICOS CON LEUCEMIA MIELOIDE
AGUDA**

DIRECTORA DE TESIS

DRA. ELISA DORANTES ACOSTA
Médica adscrita al servicio de Oncología Pediátrica
Hospital Infantil de México “Federico Gómez”



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

AGRADECIMIENTOS:

A mis padres y hermanos por todo el esfuerzo, apoyo y dedicación que me han brindado a lo largo de mi vida, simple y sencillamente sin ellos no hubiera llegado hasta donde estoy en estos momentos. Gracias.....

A mi esposa por todo el apoyo y cariño manifestado a lo largo de estos últimos años..... A María Sofía que tanto anhelo su llegada y que me ha impulsado a luchar cada día más por lograr mis objetivos.....

A la Dra. Elisa Dorantes, infinitamente agradecido por su apoyo y dedicación en este proyecto de investigación.....

Título

Expresión diferencial de CD96 en células troncales hematopoyéticas provenientes de pacientes pediátricos con leucemia mieloide aguda

Índice

	Página
Resumen	1
Introducción	3
Antecedentes históricos	4
Marco teórico	
Leucemia mieloide aguda en pediatría	7
Enfermedad mínima residual en leucemias agudas en pediatría	11
Enfermedad mínima residual en leucemias mieloides agudas	13
Pregunta de investigación	15
Planteamiento del problema	15
Justificación	16
Hipótesis	17
Objetivos	17
Metodología del diseño del estudio	
Diseño del estudio	18
Población blanco	18
Procedimientos y supuestos para el cálculo del tamaño de la muestra	19
Método de muestreo	19
Criterios de selección de pacientes	
Criterios de inclusión, exclusión y eliminación	19
Ensayos de laboratorio	20
Definición operativa de las variables y su escala de medición	21
Plan de análisis de los datos	22
Limitaciones del estudio	22
Consideraciones éticas	22
Resultados	23
Discusión	30
Conclusiones	34
Referencias	35
Anexos	
Anexo 1 Protocolo de tratamiento con quimioterapia	39
Anexo 2 Carta de consentimiento informado	41

Expresión diferencial de CD96 en células troncales hematopoyéticas provenientes de pacientes pediátricos con leucemia mieloide aguda

RESUMEN:

La cura permanente de la leucemia mieloide aguda por la quimioterapia ha sido durante muchos años un reto, debido a que en algunos casos no es posible erradicar a las células leucémicas hematopoyéticas lo que condiciona un componente que se asocia a recaídas. El desarrollar terapias más efectivas para erradicar las células leucémicas hematopoyéticas y el establecer nuevas marcadores específicos para identificar la existencia de clonas leucémicas podría mejorar el pronóstico de estos pacientes.

El CD 96 es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas que se propone para identificar CTL y en un futuro utilizarlo en estudios de detección de enfermedad mínima residual y de esta manera dirigir la intensidad y la duración de los tratamientos para su beneficio.

Este trabajo tuvo el objetivo de determinar y cuantificar la presencia de CD96 en membrana celular de células troncales hematopoyéticas leucémicas (CD34+38-Lin-) ya que se conoce que en estas células es donde se encuentra la producción neoplásica. Se determinó el porcentaje de este antígeno al diagnóstico, y después del primer ciclo de quimioterapia y se estableció la correlación clínica con el curso de la enfermedad a 1 año en pacientes pediátricos con LMA. Este marcador solo había sido probado en adultos.

Se utilizaron 14 muestras de pacientes con LMA a los que se les dio seguimiento de 1 año con el mismo protocolo de tratamiento y 3 hematológicamente sanos que fueron sometidos a cirugías ortopédicas o pacientes pediátricos donadores de sangre periférica movilizada. Todos los procedimientos se realizarán bajo consentimiento informado y todos los pacientes se trataron bajo el mismo protocolo de tratamiento.

Se realizó estadística descriptiva e inferencial, con medias, medianas, rangos así como prueba de Chi-cuadrada para establecer diferencias entre porcentaje de expresión del antígeno CD96 entre los pacientes sanos y con leucemia y entre los pacientes de riesgo alto y estándar. Se consideró como diferencia significativamente estadística el valor de $p < 0.05$.

Las muestras analizadas de pacientes con LMA, 6 con correspondieron a riesgo alto y 8 a riesgo estándar, tres pacientes presentaron recaída y se registró un fallecimiento en un paciente con riesgo estándar con recaída temprana que falleció en actividad neoplásica y leucemia refractaria.

Se encontraron diferencias significativamente estadísticas de los niveles de expresión del antígeno CD96 entre los pacientes hematológicamente sanos y los pacientes con reciente diagnóstico de LMA ($p= 0.001$), sin embargo no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de riesgo estándar y alto riesgo ($p= 0.81$), esto puede deberse a que no existen diferencias en el seguimiento de estos niños.

Estos resultados reflejan que el CD96 es un marcador de superficie que está presente en las CTL provenientes de pacientes con LMA. Sin embargo en este estudio los resultados no fueron significativos al correlacionar el porcentaje de CD96 y la respuesta terapéutica, probablemente debido a la pequeña población estudiada.

INTRODUCCIÓN:

El cáncer es la segunda causa de mortalidad infantil en niños mayores de 4 años, las leucemias agudas constituyen el 30% del cáncer infantil y las leucemias mieloides agudas (LMA) son el 20% de las leucemias agudas en pediatría. La supervivencia global a cinco años de pacientes con LMA es de 60% con un 30% de recaídas independientemente del tratamiento. Las células leucémicas provienen de células troncales leucémicas (CTL), y actualmente muchas terapias se basan en desarrollar estrategias para diferenciar a las clonas leucémicas de las células troncales hematopoyéticas normales.

El CD96, se propone como un candidato para convertirse en un antígeno específico para identificar a la CTL y en un futuro utilizarlo en estudios de detección de enfermedad mínima residual (EMR), definiendo EMR como el conjunto de técnicas utilizadas para detectar CTL, y de esta manera dirigir la intensidad y la duración de los tratamientos en pacientes pediátricos con LMA.

ANTECEDENTES HISTORICOS

La leucemia descrita por primera vez por Alfred-Armand-Louis-Marie Velpeau, médico francés en 1827 describiendo el caso de una florista de 63 años de edad con una enfermedad cuyos principales síntomas eran fiebre, debilidad, cálculos renales y hepatoesplenomegalia. Velpeau advirtió que la sangre de esta paciente tenía una consistencia semejante a la "papilla de avena" e hipotetizó que este aspecto de la sangre era debido a los glóbulos blancos ¹.

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

El término "*leucemia*" fue acuñado por Rudolf Virchow, renombrado patólogo alemán, en 1856. Pionero en el uso del microscopio óptico, Virchow fue el primero en describir el exceso anormal de glóbulos blancos en pacientes con el síndrome clínico descrito por Velpeau y Bennett. Así mismo reporta dos tipos de leucemia: el esplénico, asociado con esplenomegalia, y el linfático en donde se encontraba aumento de tamaño de los ganglios linfáticos.

Neumann en 1878 estableció la existencia de la leucemia mielógena. Sin embargo, la clasificación y el estudio de la leucemia no se pudo visualizar hasta que se conoció la tinción de Erlich en 1891, tinción que permitió diferenciar la maduración de los leucocitos y así identificar las variantes leucémicas ².

Desde 1976 se realizó una clasificación de las leucemias mieloides agudas basándose en el tipo de células leucémicas y en el grado de madurez celular, denominada FAB "Clasificación Franco-Americano-Británica" y las divide en 8 subtipos, desde el M0 al M7 (TABLA 1). Mediante un examen de la apariencia de las células leucémicas al microscopio óptico o mediante técnicas citogenéticas, con el fin de caracterizar las posibles anomalías cromosómicas ³.

TABLA 1. CLASIFICACION FRANCO AMERICO BRITANICO DE LAS LEUCEMIAS MIELOIDES AGUDAS

M0	Leucemia mieloblástica aguda sin diferenciación localizada.
M1	Leucemia mieloblástica aguda sin maduración.
M2	Leucemia mieloblástica aguda con maduración.
M3	Leucemia promielocítica aguda (con translocación t(15;17)).
M4	Leucemia mielomonocítica aguda (LMMA).
M4eo	Leucemia mielomonocítica aguda con eosinofilia en médula ósea.
M5	Leucemia monocítica aguda (LMoA).m,
M5a	LMoA sin diferenciación (monoblástica).
M5b	LMoA con diferenciación (monocítica).
M6	Eritroleucemia aguda; son precursoras de globos rojos.
M7	Leucemia megacariocítica aguda.

Por otro lado en el intento de hacer una clasificación más útil desde el punto de vista clínico se realizó La clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) con el objetivo de proporcionar información más significativa relacionada al pronóstico de la LMA. Cada una de las categorías de la OMS contiene numerosas subcategorías descriptivas de gran interés para el hematopatólogo y para el oncólogo. Sin embargo, la mayor parte de la información clínicamente significativa se encuentra categorizada en uno de los cinco subtipos listado a continuación ^(TABLA 2) 4.

TABLA 2. CLASIFICACION ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD DE LAS LEUCEMIAS MIELOIDE AGUDAS.

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

MARCO TEORICO

Leucemias agudas en pediatría

Las leucemias se clasifican en agudas y crónicas y dependiendo el linaje en linfoides y mieloides. En la edad pediátrica más del 90% de las leucemias mieloides son agudas y el resto son trastornos mieloproliferativos crónicos y subagudos.

Las leucemias mieloides agudas son un grupo heterogéneo de leucemias que son resultado de la transformación y proliferación clonal de precursores mieloides por cambios cromosómicos y múltiples mutaciones génicas con el consecuente reemplazo en la medula ósea de las células normales ⁵.

Las leucemias agudas son el cáncer más frecuente en edad pediátrica en países desarrollados, se reportan hasta 6500 niños y adolescentes con leucemia aguda en EUA por año. Las leucemias linfoblásticas ocupan el 80% de las leucemias agudas, la edad de presentación más habitual es entre los dos y los 5 años. Por otro lado las leucemias mieloides agudas ocupan del 15 al 20% de las leucemias agudas y se estima una incidencia de 5 a 7 casos por millón de habitantes con un patrón bifásico a los dos años y en la adolescencia con una incidencia de 11 y 9 casos por millón de habitantes, respectivamente y con una disminución significativa de presentación a los 9 años.

Existen factores de riesgo tanto del huésped como del medio ambiente altamente relacionados con las LMA. Dentro de los factores de riesgo del huésped se encuentran los gemelos homocigotos, síndromes predisponentes que resultan de inestabilidades cromosómicas, defectos en la reparación del DNA, alteraciones en el receptor de la citocina y alteración en la síntesis de proteínas, algunos ejemplos son: la anemia de Fanconi, ataxia-telangiectasia, neurofibromatosis, síndrome de Bloom, inmunodeficiencia congénitas, incluyendo agammaglobulinemia infantil ligada al cromosoma X y síndrome de Down, este último se incrementa hasta 14 veces la posibilidad de desarrollar leucemia aguda. En general se han encontrado anomalías cromosómicas en el 75% de los niños con LMA⁶⁻⁷. Por otro lado se encuentran los factores externos al huésped como síndromes mielodisplásicos, radioterapia, administración quimioterapia, solventes orgánicos como el benceno y otros productos derivados del petróleo ⁸.

Leucemias mieloides agudas en pediatría

Según la OMS⁴, para el diagnóstico de leucemia mieloide aguda se necesitan al menos 20% de blastos leucémicos en médula ósea. La tinción de inmunohistoquímica para mieloperoxidasa es el mejor método para determinar que células provienen de una línea mieloide. La citometría de flujo y citogenética se utilizan para diferenciar los distintos subtipos de AML.

El tratamiento de las leucemias mieloides agudas se basa en regímenes de quimioterapia intensos que han sido diseñados por diferentes grupos mundiales. Los primeros estudios para el tratamiento de la leucemia aguda se realizaron entre 1955 a 1957, publicados por la Acute Leukemia Chemotherapy Cooperative Study Group A (ALCCSGA) actualmente Children's Cancer Group (CCG). Este grupo actualmente se rige a través de su protocolo, que consiste en la terapia de inducción con cinco fármacos dexametasona, citarabina, 6TG, etopósido, daunorrubicina y reporta sobrevida global a 10 años de 40-46%, EFS 32%, DFS 44%⁹ (TABLA 3).

TABLA 3. PRONOSTICO DE LOS DIFERENTES GRUPOS DE TRATAMIENTO PARA LEUCEMIAS MIELOIDES AGUDAS.

GRUPO	EFS	DFS	OS
NOPHO-AML 93	48%	52%	65%
BFM-AML 93	51%	58-64%	55-59%
CCG-2891	32%	44%%	40-46%
St. Jude AML 97	45%	58.5%	47.5%
MRC AML 10-12	52%		61%

* **NOPHO**: Nordic Society of Pediatric Hematology and Oncology . * **BFM**: Berlin–Frankfurt–Munster. ***CCG**: Children's Cancer Group. * **MRC**: Medical Research Council global. ***EFS**: Sobrevida libre de recaída ***DFS**: Sobrevida libre de enfermedad. ***OS**: Sobrevida

El esquema de quimioterapia que se usa en el Hospital Infantil de México Federico Gómez es modificado del NOPHO^(ANEXO1) ya que es el que ha demostrado mayor supervivencia y menor tasa de recaídas. Los primeros estudios con esta esquema (NOPHO-LMA) se iniciaron en 1984, reportaban una supervivencia libre de recaída (EFS) del 29% y consistía en inducción con tres ciclos de citarabina, 6 tioguanina y

doxorubicina (ATDox), seguida de la consolidación con cuatro ciclos de citarabina y una dosis de metotrexate intratecal. Para 1988 NOPHO-LMA con la finalidad de reducir las recaídas y la mala respuesta a tratamiento, agregó mitoxantrona y etoposido en la inducción y en la consolidación reportando una (EFS) del 41%, pero incrementó la mortalidad por efectos tóxicos de la quimioterapia. En 1993 NOPHO-LMA se utilizan los mismo medicamentos pero deciden estratificar a los pacientes de acuerdo al riesgo asignado y a la respuesta al primer ciclo de quimioterapia, con lo que consiguieron una respuesta al primer ciclo en el 67% de los pacientes y logrando una supervivencia libre de recaída (EFS) del 48%, supervivencia libre de enfermedad (DFS) 52% y supervivencia global (SO) de 65% ¹⁰ (TABLA 3).

Otro protocolo de tratamiento es el (BFM-AML 93) Berlin–Frankfurt–Munster consiste en administrar citarabina, daunorubicina y etopósido en la inducción a la remisión y seis ciclos de consolidación con: 6 tioguanina, prednisona, vincristina, doxorubicina, citarabina y ciclofosfamida ^(TABLA 4). Obteniendo una EFS del 51%, una DFS del 58-64% y una SO del 55-59% ¹¹ (TABLA 3).

TABLA 4. PROTOCOLO DE TRATAMIENTO DEL GRUPO DE BERLIN-FRANKFURT-MUNSTER (BFM-AML 93)

BFM-AML 93	
INDUCCION	Citarabina, daunorubicina y etoposido ó citarabina y etoposido
CONSOLIDACION	<p><u>6 ciclos:</u></p> <p>6-tioguanina 60mg/m2/día, día1–43 vía oral</p> <p>prednisona 40 mg/m2/día, día 1–28 orally;</p> <p>vincristina 1.5 mg/m2/día, día 1,8, 15, 22;</p> <p>doxorubicina 30 mg/m2/día, día 1,8, 15, 22;</p> <p>citarabina 75 mg/m2/día, día 3–6,10–13, 17–20, 24–27, 31–34, 38–41;</p> <p>ciclofosfamida 500mg/m2 /días 29, 43</p>

*BFM: Berlin–Frankfurt–Munster. Tomado de Leukemia (2005) 19,2030.2042

El grupo de St. Jude combina citarabina con 2-CDA en la inducción a la remisión y posterior a la remisión continua con DAV y altas dosis de citarabina, logrando una remisión completa de más del 90%, EFS 45%, DFS 58.5% y SO 47.5% (TABLA 3).¹²

El grupo de estudio Council, (Medical Research Council, MRC 97) agrega posterior a la remisión 4 o 5 ciclos de quimioterapia reportando una DFS 45% y SO 61% (TABLA 3). Característicamente en este grupo las dosis acumuladas de antraciclicos eran muy elevadas y 7 de 9 muertes se asociaron a sepsis¹³.

Otro grupo de leucemias que se tratan de manera diferente son las promielocíticas (LMA M3) que son altamente susceptibles al ácido transretinoico alcanzando una remisión completa en el 90%, con una mortalidad del 30% asociada a este tratamiento¹⁴.

En general la mayoría de los grupos utilizan antraciclicos, citarabina y etopósido mínimo cuatro ciclos, las diferencias de algunos regímenes de tratamiento incluyen dosis acumulada de los medicamentos, el antracíclico, número e intensidad de ciclos de tratamiento y quimioterapia intratecal profiláctica. Muchos grupos reportan RC (remisión completa) en el 80-90%, alcanzando hasta 100% en pacientes con Sx de Down, la sobrevida libre de recaída 50% y con sobrevida global del 60%.

El trasplante de médula ósea idealmente se debe realizar en pacientes que remitan después del primer ciclo de quimioterapia y se considera que no son candidatos los que pacientes con LMA y síndrome de Down, LMA y t(8:21) o inversión 16. La sobrevida depende del esquema de quimioterapia pero en general oscila entre 56 y 65% a 5 años (MRC AML10 y CCG 2891 reportan una SG del 58% y 47-49%, respectivamente).

El riesgo de recaída es alrededor del 30-40%. Las recaídas a sistema nervioso central, ocurre en el 2-9 % de pacientes. Después de la recaída la sobrevida disminuye a 21-33%¹⁵⁻¹⁶.

En esta neoplasia maligna se han identificado factores clínicos de mal pronósticos como edad mayor de 10 años y cuenta de leucocitos mayor a 50 000, esta última incrementa el riesgo de recaída de 17%-67%. En casos especiales como en las leucemias mieloides congénitas la sobrevida no supera el 30%^{17,18,19}.

Otro de los factores pronósticos más importantes es el análisis citogenético de la médula ósea y en base a las alteraciones encontradas podemos clasificarlas en tres grupos en base a la respuesta terapéutica.

Grupo de buen pronóstico: Representa del 10 al 15% de los pacientes, corresponde a aquellos con t (8; 21), t (15; 17), inversión de 16, t (16/16) y deleción (16q), en los pacientes con LMA promielocítica se llegan a encontrar estas aberraciones cromosómicas en un 21 a 47% ²⁰ con tasas de supervivencia a largo plazo (8.3años) del 60%.

Grupo de pronóstico intermedio: Corresponden al 60% de los pacientes y se caracterizan por tener cariotipo normal, 11q23, deleción 9 y 7q con supervivencia a largo plazo del 32%.

Grupo con pobre pronóstico: Monosomías y deleciones de brazos largos y cromosomas 5 – 7, cariotipos complejos (más de 5 anormalidades cromosómicas), t(9:22) y t(6:9) con una sobrevida menor de 20% ²¹⁻²².

Hace más de 40 años la muerte en estos pacientes era inevitable y durante los últimos 30 años la respuesta al tratamiento de la leucemia mieloide aguda en niños se ha mejorado considerablemente. En los años 90s, se obtenía remisión completa en casi el 80% de pacientes a 5 años, pero la sobrevida libre de recaída era del 30%. En la actualidad, como ya se mencionó previamente las tasas de respuesta a tratamiento han aumentado considerablemente y ha disminuido el índice de mortalidad.

Se considera que en estos pacientes el pronóstico es heterogéneo y una minoría de ellos tiene características clínicas y biológicas que se asocian con un riesgo muy elevado de recaída. Para el resto de los pacientes sin factores pronósticos claros se pueden identificar al momento del diagnóstico. El grado de respuesta al tratamiento es probable que sea un factor predictor de los resultados para estos pacientes ^{23,24,25}.

Enfermedad mínima residual en leucemias agudas

Dado el porcentaje de recaídas reportados en todos los grupos que se han realizado ensayos modernos para detectar células de leucemia mieloide aguda que no son detectables mediante técnicas morfológicas convencionales, es decir, la enfermedad mínima residual (**EMR o MDR** por sus siglas en inglés), y con esto incrementar la respuesta al tratamiento. Es plausible que las modificaciones al tratamiento basado en los

resultados de estos ensayos será mejorar la gestión clínica y en definitivamente, incrementaría las tasas de curación ²⁶.

Como la morfología de células leucémicas generalmente se parece a la de las células progenitoras linfohematopoyéticas, es difícil diferenciarlas. De hecho, la identificación de células leucémicas en la médula ósea para un hematopatólogo podría ser imposible a no ser que los blastos tengan rasgos típicamente morfológicos como cuerpos de Auer. Estas semejanzas morfológicas pueden conducir a errores diagnóstico y podría provocar la intensificación de tratamiento innecesaria y toxicidades ²⁷.

Actualmente los ensayos más útiles en EMR son la PCR, reacción en cadena de polimerasa (amplificación de genes antígeno receptor basada en RNA) y la citometría de flujo que detecta y cuantifica fenotipos anormales ²⁸.

La cuantificación de transcritos por medio de **PCR** para alteraciones conocidas en LMA, están fuertemente relacionados con el pronóstico al terminar la consolidación. La detección de genes fusionados por PCR es de 20 - 25% en pacientes con LMA en cambio en la citometría de flujo se detecta la mayoría. Sin embargo, QRT-PCR es todavía más sensible en la mayoría de los casos. Así, es deseable establecer nuevos marcadores moleculares para estudios PCR. Ensayos clínicos grandes determinarán el papel inmunológico y el monitoreo con PCR en el pronóstico y etapificación de pacientes con LMA ²⁹⁻³⁰.

En pacientes con leucemia aguda, los estudios de enfermedad mínima residual (MRD) proporcionan la información de pronóstico poderosa e independiente. La citometría de flujo es extensamente aplicable y confiable para supervisar EMR. Usando combinaciones de marcador triples o cuádruples, perfiles aberrantes o raros fenotipos pueden ser identificados en aproximadamente el 80 % de pacientes con leucemia mieloide aguda y el 95 % de pacientes con leucemia linfoblástica aguda. Estos perfiles pueden revelar la existencia de células leucémicas incluso cuando estos no son evidentes por el análisis morfológico. Así, una célula leucémica entre 1000 - 10 000 células normales en la médula ósea o sangre periféricas rutinariamente puede ser descubierta ³¹.

Debido a que existe una alta correlación entre la EMR y el riesgo de recaída, hasta 8.5 veces más³² los regímenes de tratamiento deben ser más intensos en pacientes con

EMR alta. Además de la aplicación clínica, las medidas de EMR puede ser usadas para entender mecanismos moleculares y celulares de resistencia a la quimioterapia in vitro.

Los blastos de la LMA no expresan antígenos específicos que puedan servir como marcadores simples o ambiguos de enfermedad residual (RD) en medula ósea regenerada por lo tanto es necesario tener métodos que sean sensibles para diferenciar entre blastos residuales y células hematopoyéticamente normales durante cada etapa de tratamiento. Otro obstáculo para EMR en la monitorización de la LMA es la inestabilidad de los blastos para expresar un patrón de antígenos. En la mayoría de los casos de LMA los blastos sufren un cambio en la expresión del patrón de antígenos entre el diagnóstico y la recaída. Es por lo tanto indispensable para evaluar EMR, supervisar una amplia gama de asociaciones entre leucemias e inmunofenotipos.^{15,33,34,35}

Hasta ahora hay poca información sobre la importancia de la supervisión de enfermedad mínima residual y el pronóstico en pacientes pediátricos³⁶⁻³⁷.

Enfermedad mínima residual en leucemias mieloides agudas en pediatría

Inicialmente, los estudios de la MRD en LMA se realizaron en pacientes adultos, utilizando la técnica de RT-PCR (Amplificación de fusión de transcritos por transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa)³⁸⁻³⁹ o por medio de citometría de flujo⁴⁰. Estos estudios demostraron el potencial clínico de monitorizar aspectos de la EMR en pacientes con LMA.

En pediatría, el grupo de investigadores Children's Oncology Group, detectaron EMR en la médula ósea de 42 de 252 niños con LMA, todos ellos habían alcanzado la remisión clínica y morfológica. Los pacientes con EMR tenían un riesgo de 4.8 veces más de probabilidad de recaída en un modelo multivariado, siendo la EMR el factor pronóstico de mayor peso⁴¹.

También se estudió la EMR por citometría de flujo en 46 niños con LMA de reciente diagnóstico en el Hospital St. Jude, bajo el protocolo AML97. En este estudio se observó que la media estimada de supervivencia a 2 años para pacientes con EMR positiva después de la terapia de inducción, fue 33% comparada con 72% en aquellos con EMR menor a 0.1% o no detectable. En ese estudio los pacientes fueron examinados para EMR después del primer ciclo de inducción a la remisión.

El grupo de Oncología pediátrica alemana en el 2006, estudiaron EMR por citometría de flujo en 150 niños y encontraron que la detección de EMR en LMA se asoció de una manera significativamente estadística con una menor supervivencia libre de evento, con una posibilidad de recaída de 2 veces más que los pacientes sin EMR, sin embargo en este estudio, en el análisis multivariado, a EMR perdió significancia estadística.

El problema al que se enfrentan los investigadores que cuantifican EMR es que las células leucémicas se producen por las células troncales leucémicas, (CTL) y se piensa que en ellas se encuentra la causa de las recaídas, por ello es necesario desarrollar terapias para erradicar a las CTL para lo cual es necesario contar con marcadores que puedan diferenciar a las clonas leucémicas de las células troncales hematopoyéticas normales ⁴².

El CD96 es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas, se propone en la literatura científica como un candidato para convertirse en un antígeno específico para identificar a las CTL y en un futuro utilizarlo en estudios de detección de enfermedad mínima residual y de esta manera dirigir la intensidad y la duración de los tratamientos para el beneficio de estos pacientes.

Recientemente se publicó por el centro de cáncer de Stanford (Stanford Cancer Center) en el 2007 un estudio en adultos sobre la expresión de CD96 en células troncales leucémicas de pacientes con LMA y encontraron la expresión de este antígeno en un 70% \pm 25.3% en 19 de 29 pacientes (60%) con LMA comparado con la expresión de 4.9 \pm 1.6% en las células de pacientes hematológicamente sanos (n = 3). Por otro lado la expresión de CD96 fue más frecuente en pacientes con LM2 comparada con el resto de las leucemias mieloides agudas ⁴³.

PREGUNTA DE INVESTIGACION:

¿Existe correlación entre la expresión de CD 96 en las CTL y la respuesta clínica al tratamiento después de la inducción a la remisión y al momento del inicio de la vigilancia en pacientes pediátricos con LMA?

PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA:

El porcentaje de recaídas en las leucemias mieloides agudas es alto y el contar con marcadores específicos para identificar la existencia de clonas leucémicas en estos pacientes, podría servir como pronóstico y para determinar intensidad de tratamiento y duración de la quimioterapia.

JUSTIFICACION:

Las leucemias mieloides agudas en pediatría constituyen un reto terapéutico debido al porcentaje de recaídas que se presentan. Independientemente del subtipo o grupo de riesgo al que pertenezcan, se sabe que el 30% de los pacientes van a presentar recaídas.

Las clonas leucémicas residen en la subpoblación hematopoyética que corresponde a las células troncales leucémicas (CTL) con el fenotipo CD34+ CD38- Lin- , y el contar con marcadores específicos para identificar la existencia de clonas leucémicas en los pacientes podría servir para determinar intensidad de tratamiento y duración de la quimioterapia y pronóstico en estos niños.

Identificar moléculas o marcadores específicos en CTL provenientes de pacientes pediátricos con LMA podría facilitar la caracterización de las clonas celulares resistentes a quimioterapia y así plantear las bases para nuevas terapias blanco en estos pacientes.

El CD96 es un antígeno que se propone como marcador de las CTL, y ha mostrado ser exclusiva del compartimiento de células leucémicas en adulto, sin embargo no ha sido probado en células provenientes de la población pediátrica y podría postularse como un marcador de CTL en la población infantil.

HIPÓTESIS:

Existirán diferencias estadísticamente significativas entre la expresión de CD96 en células troncales (CT) provenientes de pacientes sanos comparadas con CTL provenientes de pacientes pediátricos con LMA. Los niveles de expresión de CD96 en los pacientes pediátricos con LMA se correlacionan con el curso clínico de la enfermedad.

OBJETIVOS:

- 1.- Comparar el porcentaje de expresión de CD96 en células troncales provenientes de pacientes sanos y en células troncales de pacientes con LMA.
- 2.- Comparar la expresión de CD96 en CTL en pacientes con LMA al diagnóstico, después de la inducción a la remisión y al inicio de la vigilancia.
- 3.- Correlacionar los niveles de expresión de CD96 con el pronóstico clínico de pacientes pediátricos con LMA.

METODOLOGÍA:

Diseño del estudio

Este estudio tiene dos partes, una parte biomédica y una parte clínica que se basa en tratar de establecer una correlación.

Se reclutaron pacientes que presentaban en común el reciente diagnóstico de leucemia mieloide aguda. A estos pacientes se les siguió a través de un año, midiendo los resultados clínicos y de laboratorio. Se investigaron condiciones que se asociaran con un resultado determinado (muerte, recaída, falta de remisión, remisión)

El tiempo cero se consideró como el día del diagnóstico en todos los casos, se siguió a los pacientes por un año y el desenlace se midió de la misma forma en todos los casos, se determinó la remisión por medio de aspirado de médula ósea y además por la determinación por citometría de la molécula CD96, en el caso de recaída o falta de remisión se tomó aspirado de médula ósea en todos los casos y se cuantificó la presencia de la molécula CD96 en todos los aspirados de médula ósea que se necesitaron para valorar respuesta oncológica.

Se consideró que en los individuos enfermos, la cuantificación de CD96 podría contribuir a identificar a grupos de pacientes con diferentes cursos de la enfermedad

Previo consentimiento informado firmado por el responsable del menor, se tomó aspirado de médula ósea a pacientes hematológicamente sanos que sean sometidos a cirugías ortopédicas donde se exponga la cresta iliaca anterosuperior, a estas médulas óseas se les procesó de la misma manera que a las células leucémicas y se determinará la presencia de la molécula CD96

Población diana:

Pacientes pediátricos con leucemia mieloide aguda

Población accesible:

Pacientes pediátricos con diagnóstico de leucemia mieloide aguda sin tratamiento previo que acudan al hospital Infantil de México Federico Gómez a partir de noviembre 2008 hasta noviembre 2009.

Procedimientos y supuestos para el cálculo del tamaño de la muestra

Dado que la incidencia de esta enfermedad es de 10-15 pacientes/año en el Hospital Infantil de México Federico Gómez, se estudiaron a toda la población accesible de noviembre del 2008 a noviembre 2009

Método de muestreo

Muestreo de casos consecutivos

Criterios de selección de pacientes

Criterios de inclusión

- Pacientes menores de 18 años de edad que cumplan con los criterios oncológicos para diagnóstico de leucemia mieloide aguda
- Sin tratamiento previo
- Que aceptaron participar en el estudio

Criterios de exclusión

- Pacientes con leucemia mieloide aguda secundaria a quimioterapia
- Que no aceptaran participar en el estudio

Criterios de eliminación

- Pacientes que cambien de domicilio o entidad
- Abandono de tratamiento

Ensayos de laboratorio

Todos los ensayos de laboratorio se llevaron a cabo en la Unidad de Investigación Médica en Oncología (UIMEO) del Hospital de Oncología del CNS XXI, bajo convenio de colaboración con la directora de esta de tesis. Todos los pacientes y sus expedientes e historias clínicas provinieron del HIMFG.

Se obtuvieron alícuotas del aspirado de médula ósea que habitualmente se toma a niños con diagnóstico de LMA, al diagnóstico, posterior al primer ciclo, hasta la remisión completa y al momento del inicio de la vigilancia.

De cada muestra se seleccionaron células mononucleares por gradiente de Ficoll. Las células fueron resuspendidas en solución salina de fosfatos (PBS) al 10% de Suero Fetal Bovino (FBS) para evaluar el número total de células nucleadas y viables mediante conteo con hemocitómetro, usando solución de Turk y azul tripano, respectivamente.

Las células troncales hematopoyéticas se seleccionaron por medio de citometría de flujo. Las células CD34+CD38-lin- fueron fijadas con metanol al 70%, y ya fijadas se lavaron con PBS y se incubaron con anticuerpo específico para CD96. Posteriormente las células fueron lavadas, resuspendidas en formaldehído al 1% y almacenadas a 4°C, protegidas de la luz, para finalmente analizar 50,000 eventos un citómetro.

Se utilizaron 14 muestras de pacientes con LMA a los que se les dio seguimiento de 1 año con el mismo protocolo de tratamiento y 1 paciente hematologicamente sano que fue sometidos a cirugías ortopédica y 2 pacientes pediátricos donadores de sangre periférica movilizada.

Todos los procedimientos se realizaron bajo consentimiento informado y todos los pacientes se trataron bajo el mismo protocolo de tratamiento

Definición operativa de las variables y su escala de medición

Variables independientes:

Células troncales hematopoyéticas provenientes de pacientes sanos (Cuantitativa discreta) Número de células troncales hematopoyéticas provenientes de pacientes hematológicamente sanos, purificadas por citometría que expresen el fenotipo CD34+CD38-lin-

Células troncales hematopoyéticas provenientes de pacientes con LMA (Cuantitativa discreta) Número de células troncales hematopoyéticas provenientes de pacientes con LMA obtenidas por selección negativa que expresen el inmunofenotipo CD34+CD38-lin-
Edad del niño Cuantitativa continua Número de años y meses al momento del diagnóstico de LMA

Grupo de riesgo: (alto o estándar) categoría ya definida previamente a la que pertenece el paciente dadas sus condiciones citogenéticas, número de leucocitos al diagnóstico y respuesta al primer ciclo de la quimioterapia.

Variables Dependientes:

Respuesta a la inducción a la remisión (Cualitativa nominal). Se define por aspirado de médula ósea posterior al segundo ciclo de quimioterapia, si el paciente tiene menos del 5% de blastos se considera buena respuesta, si tiene más del 5% de blastos mala respuesta.

Células troncales hematopoyéticas provenientes de pacientes sanos positivas para CD96 (Cuantitativa discreta). Número de células troncales hematopoyéticas provenientes de pacientes hematológicamente sanos, obtenidas por selección negativa y purificadas por citometría que expresen el fenotipo CD34+CD38-lin- y sean positivas para CD96.

Células troncales hematopoyéticas provenientes de pacientes con LMA positivas para CD96. Al diagnóstico, posterior a la inducción a la remisión, al momento de la vigilancia. (Cuantitativa discreta) Número de células troncales hematopoyéticas provenientes de pacientes con LMA obtenidas por selección negativa que expresen el fenotipo CD34+CD38-lin- y sean positivas para CD96.

Análisis de los datos

Se realizó estadística descriptiva e inferencial de los datos obtenidos, a través de medias, medianas, rangos y desviaciones estándar. Se analizó la distribución de los datos por su sesgo y curtosis, encontrando que la distribución no se encontró semejante a la distribución Gaussiana. Por esta razón se analizaron los datos de acuerdo a pruebas no paramétricas. Se decidió utilizar la prueba de Chi-cuadrada cuando se buscaron diferencias entre proporciones de dos poblaciones. Se analizó específicamente el porcentaje de expresión entre diferentes poblaciones de pacientes, entre los pacientes sanos y con leucemia, entre los pacientes de alto riesgo y los de riesgo estándar. Se consideró estadísticamente significativa la diferencia en los porcentajes de expresión cuando la p fuera menor a 0.05

Se utilizaron los paquetes estadísticos Excel para Windows y SPSS versión 16.

Limitaciones del estudio

Consideramos que las principales limitaciones de este estudio son dos: la n y el tiempo de seguimiento. Estas limitantes podrán resolverse dado que los investigadores responsables pretenden extender el estudio un año más.

Consideraciones éticas

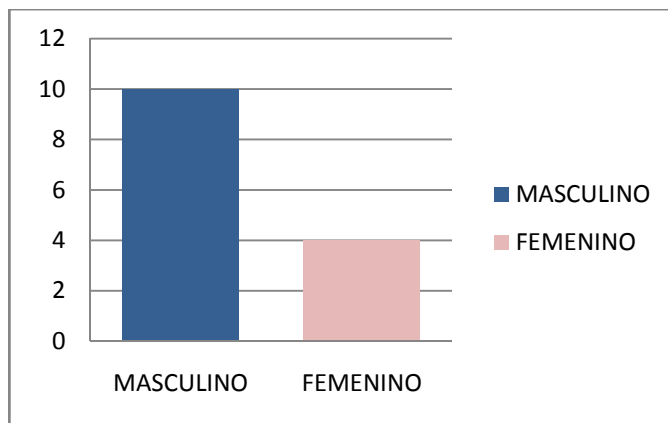
Este estudio fue registrado en el Comité de Ética y Bioseguridad de este Hospital bajo el número de registro HIM/2009/020

RESULTADOS:

Se analizaron los datos clínicos y las muestras de médula ósea de 14 pacientes con reciente diagnóstico de Leucemia mieloide aguda desde junio del 2008 hasta abril del 2010.

Las características generales de los pacientes fueron las siguientes: La edad de presentación de LMA en este grupo de pacientes osciló entre 1.1 y los 14.4 años, con un promedio de edad de 7 años. Del total de la muestra estudiada, 10 pacientes fueron del sexo masculino y 4 femeninos (GRAFICA 1).

GRAFICA 1: DISTRIBUCION POR GÉNERO



***SEXO MASCULINO: 10/14 *SEXO FEMENINO: 4/14**

Se revisaron los expedientes clínicos de los pacientes para conocer sus características clínicas al diagnóstico y encontramos que casi tres cuartas partes (71.4%) se presentaron con síndrome anémico, la mitad de ellos con síndrome hemorrágico, el (28.5%) con síndrome febril y (57.1%) con síndrome infiltrativo. (TABLA 5).

TABLA 5. CARACTERISTICAS CLINICAS AL DIAGNOSTICO DE PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA.

PACIENTE	EDAD	SINDROME ANEMICO	SINDROME HEMORRAGICO	SINDROME FEBRIL	SINDROME INFILTRATIVO
1	12	X		X	
2	7	X			
3	4			X	X
4	4.9	X			X
5	9	X	X	X	X
6	1.9	X	X		X
7	6.3	X			X
8	5.4	X	X		
9	10.9		X		
10	9	X	X		
11	1.1	X	X		
12	12		X	X	
13	1.1				X
14	14.4	X			

*Edad: Expresada en años. *Síndrome anémico (10/14). Síndrome hemorrágico (7/14) * Síndrome febril (4/14) * Síndrome infiltrativo (8/14).

Los hallazgos en la citometría hemática y en las pruebas de coagulación ^(TABLA 6) de estos pacientes al diagnóstico fue como sigue: anemia en el 92.8% de ellos con media de 7.9gr/dl, el 64.2% tenía Hb menor de 11gr/dl y el 42.8% tenía Hb menor a 7gr/dl. La cuenta de leucocitos fue heterogénea desde 1 500cm³/dl a 108 000cm³/dl, con una media de 26 800cm³/dl. En general se encontró trombocitopenia solo en un caso el nivel de plaquetas era normal, el rango de cuenta de plaquetas osciló desde 6000 a 303000. En nuestra población estudiada el 37.5% de los pacientes debutó con coagulación intravascular diseminada.

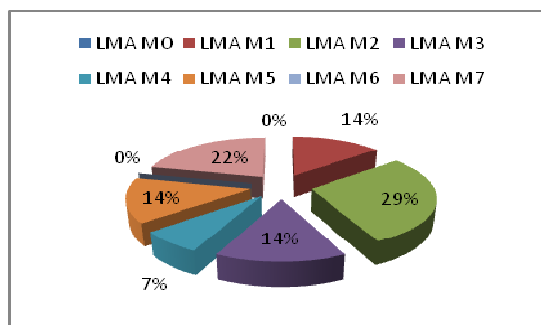
TABLA 6. CARACTERISTICAS DE LABORATORIO AL DIAGNOSTICO DE PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA.

PACIENTE	Hb	Hto	Leucos	Blastos	Plaquetas	CID
1	11gr/dl	32%	26 800 cm ³ /dl	43%	110 000 cm ³ /dl	
2	11.7gr/dl	36.70%	1 500 cm ³ /dl	0%	36 000 cm ³ /dl	X
3	7.3gr/dl	21.40%	108 000 cm ³ /dl	76%	48 000 cm ³ /dl	
4	7.2gr/dl	22%	5 300 cm ³ /dl	96%	6 000 cm ³ /dl	
5	3.5gr/dl	9.80%	41 200 cm ³ /dl	51%	12 000 cm ³ /dl	X
6	4.1gr/dl	11.90%	37 000 cm ³ /dl	80%	9 000 cm ³ /dl	X
7	6.6gr/dl	19.70%	13 000 cm ³ /dl	53%	39 000 cm ³ /dl	
8	3.9gr/dl	11%	70 200 cm ³ /dl	65%	303 000 cm ³ /dl	X
9	11.9gr/dl	33.30%	2 700 cm ³ /dl	0%	17 000 cm ³ /dl	X
10	4.6gr/dl	12.90%	9 900 cm ³ /dl	70%	9 000 cm ³ /dl	
11	13.9gr/dl	41.20%	8 900 cm ³ /dl	0	99 000 cm ³ /dl	
12	8.3gr/dl	22%	12 200 cm ³ /dl	82%	6 000 cm ³ /dl	
13	11.9gr/dl	35%	54 500 cm ³ /dl	60%	24 000 cm ³ /dl	
14	3.3gr/dl	9.60%	9 200 cm ³ /dl	88%	10 000 cm ³ /dl	

*Hb: Hemoglobina en gramos/decilitro: Hb>11gr/dl: (5/14). Hb 7-11gr/dl: (3/14). Hb<7gr/dl (6/14). *Leucos: Leucocitos en cm³: >100 000 cm³: (1/14). 50 000- 100 000 cm³: (2/14). < 50 000 cm³: (11/14). Plaquetas en cm³: >100 000cm³: (2/14). 50 000 – 100 000cm³: (1/14). <50 000cm³: (11/14). CID: Coagulación intravascular diseminada: (5/14).

Todos los pacientes fueron clasificados de acuerdo a los criterios morfológicos de la FAB, todos tenían fenotipo por citometría de flujo y citogenética. De los 14 pacientes estudiados el 29% de las leucemias mieloides agudas fueron M2, el 22% M7, el 14% tanto las M1, como las M3 y M5, la M4 ocupó el 7% y ningún caso de M0 y M6 (GRAFICA 2). Estas a su vez se clasificaron según el riesgo, encontrando en esta población un alto riesgo para recaída del (42.8%) (TABLA 7). Es importante señalar que el riesgo de los pacientes se estableció de acuerdo a criterios convencionales, es decir, cuenta de leucocitos mayor a 50000, alteraciones citogenéticas desfavorables, y mala respuesta al primer ciclo de la quimioterapia.

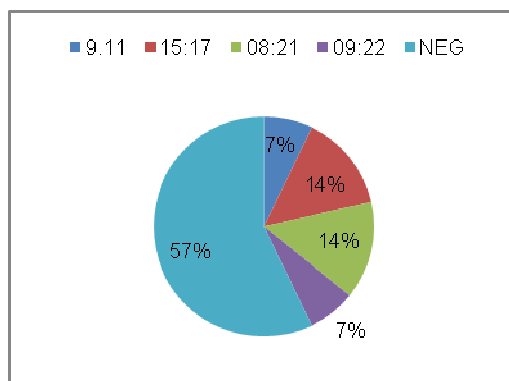
GRAFICA 2. DISTRIBUCION SEGÚN FAB



*LMA M0: (0/14 - 0%). LMA M1: (2/14 - 14%), LMA M2: (4/14 - 29%), LMA M3: (2/14 - 14%), LMA M4: (1/14 - 7%), LMA M5: (2/14 - 14%), LMA M6: (0/14 - 0%), LMA M7: (3/14 - 22%)

Se documentaron alteraciones citogenéticas en el 42% de los pacientes, dos de ellas se encontraron con: $t(15:17)$ y dos con $t(8:21)$, representando el 14%. Se encontró una paciente con $t(9:11)$ y otro con $t(09:22)$ (GRAFICA 3).

GRAFICA 3. ALTERACIONES CITOGENETICAS



*ALTERACIONES CITOGENETICAS: $t(9:11)$: (1/14 - 7%), $t(15:17)$: (2/14 - 14%), $t(08:21)$: (2/14 - 14%)

Las alteraciones citogenéticas se determinaron por técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en el laboratorio de este Hospital. No se realizaron otras determinaciones como monosomía 5 o 7 o alteraciones 11q23 o translocación (4:11) por falta de sondas apropiadas.

Además de realizarse el diagnóstico en forma convencional, se decidió de acuerdo a la metodología previamente descrita, que se mediría el porcentaje de expresión del antígeno CD96 al diagnóstico y durante el curso del tratamiento. La expresión de este antígeno se comparó inicialmente con los pacientes que se utilizaron como controles, y posteriormente se determinó como seguimiento en los pacientes con LMA donde obtuviéramos suficientes células para citometría.

En la siguiente tabla ^(TABLA 7) se muestran los porcentajes de expresión de CD96 en células troncales leucémicas de los pacientes con LMA y el riesgo clínico asignado, así como la evolución de la expresión del marcador estudiado después del primer ciclo de quimioterapia.

TABLA 7. PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOBLASTICA AGUDA SEGÚN LA CLASIFICACION FAB Y CUENTA DE CD96.

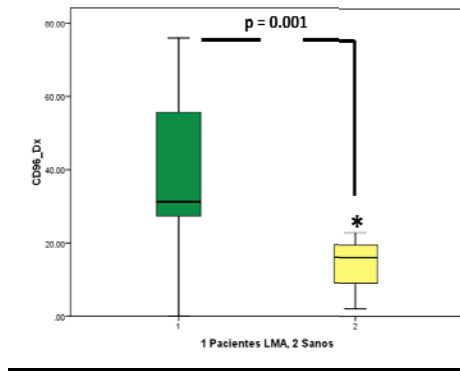
PACIENTE	CLASIFICACION FAB	RIESGO	ALTERACIONES CITOGENETICAS	CD96 DIAGNOSTICO	CD96 1ER CICLO	DELTA CAMBIO	REMISION 1ER CICLO
1	LMA M1	ESTANDAR	9:11	31.8%			X
2	LMA M3	ESTANDAR	15:17	52.7%			X
3	LMA M4	ALTO	NEG	37.9%	50.9%	13%	X
4	LMA M2	ESTANDAR	NEG	71%	69.7%	-1.3%	X
5	LMA M2	ALTO	08:21	27%	27.3%	-0.3%	X
6	LMA M7	ESTANDAR	NEG		69.7%		X
7	LMA M2	ALTO	NEG	76%			
8	LMA M2	ALTO	NEG	31.2%			
9	LMA M3	ESTANDAR	15:17	73%	0%		X
10	LMA M1	ESTANDAR	08:21	29.5%	46%	16.5%	X
11	LMA M7	ESTANDAR	NEG	8.1%	0%	-8.1%	X
12	LMA M5	ALTO	NEG	58.7%			
13	LMA M7	ESTANDAR	09:22	27.7%	80%	5.2%	X
14	LMA M5	ALTO	NEG	5.74%			X
Mediana y rangos				37.9% (5.7%-76%)			
PS 1				16.1%			
PS 2				22.9%			
PS 3				2.01%			
Mediana y rangos				16.1% (2.01%-22.9%)			

*LMA M1: (2/14), LMA M2: (4/14), LMA M3: (2/14), LMA M4: (1/14), LMA M5: (2/14), LMA M7: (3/14). *ALTO RIESGO: (6/14), RIESGO ESTANDAR: (8/14). *ALTERACIONES CITOGENETICAS: t(9:11): (1/14), t(15:17): (2/14), t(08:21): (1/14), t(09:22): (1/14) PS paciente sano hematológicamente referido como control.

Al compara las medianas del porcentaje de expresión de los pacientes con LMA y la de los pacientes sanos por medio de la prueba Chi-Cuadrada, encontramos diferencias significativamente estadísticas con una p de 0.001^(GRAFICA 4), sin embargo al comparar las medianas entre el porcentaje de expresión entre los pacientes con alto riesgo y riesgo estándar no encontramos diferencias estadísticamente significativas (p 0.81).

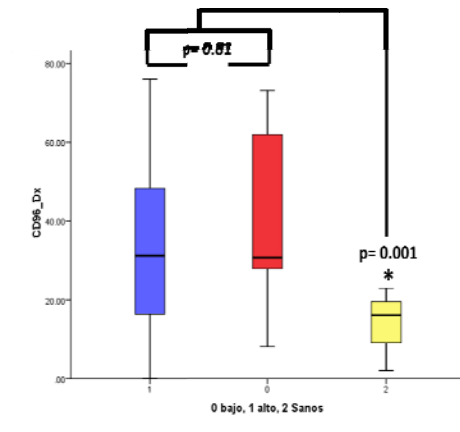
No encontramos diferencias estadísticamente significativas en el seguimiento de los pacientes con leucemia mieloide aguda al comparar a los pacientes con LMA entre los del riesgo alto y estándar (p 0.81)^(GRAFICA 5)

GRAFICA 4. Determinación de CD96 en pacientes con LMA y sanos.



Cuadro verde corresponde a la determinación del porcentaje de expresión de CD96 en 14 pacientes con LMA y el recuadro amarillo corresponde a la determinación del porcentaje de expresión de CD96 en 3 pacientes hematológicamente sanos

GRAFICA 5. Comparación de CD96 en pacientes con LMA, según el riesgo.



Determinación del porcentaje del antígeno CD96 en 8 pacientes con LMA riesgo estándar (barra azul) y en 6 pacientes con LMA alto riesgo (barra roja). Se comparó con determinación de porcentaje de expresión de CD96 en 3 pacientes hematológicamente sanos (barra amarilla)

Sobre el estado actual de los pacientes, el 85.7% de los pacientes que recibieron esquema NOPHO modificado han respondido a la quimioterapia. De los cuales el 50% están en tratamiento y el otro 50% se encuentran en vigilancia. Solo en un paciente no se logró la remisión con este esquema y se encuentra en cuidados paliativos. La mortalidad hasta el momento ha sido de 7.1% de los pacientes y hasta el momento actual 3 de los 14 pacientes estudiados han presentado recaída de la enfermedad. (TABLA 8).

TABLA 8. ESTADO ACTUAL DE LOS PACIENTES ESTUDIADOS CON LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA.

PACIENTE	VIVO SIN ENFERMEDAD	VIVO CON ENFERMEDAD	VIVO EN TRATAMIENTO	MUERTO	TIEMPO DE SEGUIMIENTO
1	VIGILANCA				18 MESES
2	VIGILANCIA				17 MESES
3	VIGILANCIA				15 MESES
4	VIGILANCIA				12 MESES
5			X		
6				X	
7	VIGILANCIA				11 MESES
8	VIGILANCIA				4 MESES
9			X		
10			X		
11			X		
12		X			
13			X		
14			X		

* VIVO SIN ENFERMEDAD: (6/14) *VIVO CON ENFERMEDAD: (1/14) *VIVO EN TRATAMIENTO: (6/14)
 *MUERTO:(1/14). *SEGUIMIENTO EN MESES DE PACIENTES EN VIGILANCIA.

DISCUSIÓN:

La leucemia mieloide aguda es una de las neoplasias con mayor tasa de mortalidad además de su importante incidencia de recaídas, esto constituye un reto terapéutico, por lo que es indispensable identificar la falla en el manejo o seguimiento de estos pacientes y el desarrollar métodos más específicos para detectar células leucemias residuales en cualquier fase del tratamiento podría contribuir para mejorar las condiciones clínicas, disminuir la toxicidad de los fármacos y la mortalidad secundaria, así como aumentar la supervivencia.

Otra de las situaciones de interés es la presentación clínica de los pacientes con leucemia mieloide aguda ya que se sabe es heterogénea. Puede presentarse a cualquier edad pero en pediatría tiene dos picos de presentación en preescolares y adolescentes, sin embargo, en este grupo estudiado, encontramos una media de edad de 7 años, lo cual puede corresponder al pequeño grupo de pacientes estudiados.

Dentro de las manifestaciones clínicas iniciales de los pacientes con leucemia mieloide aguda, la principal es el síndrome anémico, si bien clínicamente los pacientes estudiados no lo manifestaron, en el 92% se documentó anemia (media de Hb 7.9gr/dl). Otra de las manifestaciones importantes y que habitualmente es por lo que acuden a recibir atención médica es el síndrome hemorrágico que puede estar dado por la trombocitopenia o por coagulopatía. La trombocitopenia habitualmente está presente en el 50% de los pacientes que debutan con leucemia, datos similares a los encontrados en este estudio, por otro lado la CID es relativamente frecuente en este tipo de leucemias debido a la liberación de factores que producen coagulopatía, específicamente el promielocito (LMA M3) que encontramos en el 37.5% de la población estudiada, esto debe alertar al médico de primer contacto, para tomar en cuenta que es imprescindible realizar perfil de coagulación completo en los pacientes con sospecha de leucemia aguda en pediatría.

El síndrome infiltrativo puede llegar a presentarse en tres cuartas partes de la población, sin embargo en éste estudio lo presentaron apenas más de la mitad de ellos (57%).

De acuerdo a la clasificación de la FAB de las leucemias mieloides agudas las LMA M3 se asocia invariablemente con $t(15:17)$ dato que se cumplió con los únicos 2

pacientes, de cualquier manera no fue así en la LMA M2 en donde la $t(8:21)$ solo se encontró en un 25% .

Uno de los objetivos en el tratamiento de estos pacientes es lograr una remisión en el primer ciclo de quimioterapia, que se alcanza en la mayoría de ellos pero otro gran porcentaje no lo es así, por eso es imperativo el desarrollar esquemas de tratamiento que sean capaces de lograr el mayor índice de remisión sin causar efectos secundarios mortales por la citotoxicidad de los medicamentos, para ello es necesario estratificar a los pacientes con LMA, situación que se realizó con los pacientes estudiados, sin embargo, en algunos de ellos la estratificación no predijo el curso de la enfermedad, por lo que deben existir otros factores, probablemente genéticos y moleculares que influyan en el riesgo asignado a los pacientes.

Otro de los aspectos fundamentales es el seguimiento de estos pacientes en cada fase de tratamiento, durante años se han utilizado técnicas morfológicas convencionales para detectar células leucémicas residuales que en ocasiones es imposible detectarlas por las características similares entre las células linfohematopoyéticas normales con las células leucémicas. Por lo que se han desarrollado técnicas más útiles como reacción en cadena polimerasa (PCR) y la citometría de flujo que detecta y cuantifica fenotipos anormales.

En este estudio piloto se encontraron resultados estadísticamente significativos ($p.001$) al comparar la expresión del antígeno CD96 en pacientes con LMA 37.9% (Rango. 5.7 – 76%) con los pacientes sanos 16.1% (Rango 2.01 - 22.9%), tal como lo reportaron Hosen y cols en un estudio realizado en adultos, en donde encontraron la expresión del 70% \pm 25.3% en 19 de 29 pacientes adultos analizados comparados con 4.9 \pm 1.6% de los pacientes sanos.

Por otro lado, al comparar las medianas entre el porcentaje de expresión entre los pacientes con alto riesgo y riesgo estándar y en el seguimiento de estos pacientes no encontramos diferencias estadísticamente significativas (p 0.81). Esto probablemente al número reducido de pacientes, por lo que el continuar y aumentar con este proyecto de investigación podría cambiar los resultados.

Con este estudio podemos proponer que la expresión de CD96 en las células leucémicas troncales hematopoyéticas sea utilizada como marcador para diferenciar a las

células troncales leucémicas de las células troncales no leucémicas al diagnóstico, esto de acuerdo a la comparación entre las células troncales de los pacientes con leucemia mieloide aguda y las células troncales hematopoyéticas de los pacientes hematológicamente sanos, sin embargo, en este estudio no existió correlación estadísticamente significativa para poder asociar los niveles de expresión este antígeno (CD96) con la respuesta al tratamiento por lo que se deberá incrementar la n y continuar con la búsqueda de marcadores específicos que sean capaces de detectar células neoplásicas residuales.

En este estudio tuvimos 3 pacientes con recaída, que corresponde al 21.4%, lo que corresponde a lo encontrado en la literatura, sin embargo el seguimiento ha sido corto. De los 3 pacientes con recaída el primero correspondió a un paciente con riesgo estándar con LMA M7, y aunque presento buena respuesta al primer ciclo de quimioterapia, debutó con leucocitos menores a 50 000 e inició vigilancia de acuerdo al esquema de quimioterapia, presentó recaída temprana y una leucemia refractaria a tratamiento, y posteriormente falleció con actividad neoplásica. Es importante señalar que este paciente no tenía síndrome de Down, que es una patología que se asocia a este subtipo de LMA. En este caso, los niveles del marcador propuesto no se relacionaron a la evolución clínica de la enfermedad (13.9%)

El segundo paciente con recaída correspondió a un paciente con LMA M2, y en este paciente la mala respuesta al primer ciclo de quimioterapia definió su riesgo como alto. Al momento de este trabajo el paciente se encuentra vivo con enfermedad y en tercera línea de tratamiento. En este caso los niveles de CD96 debutaron en 20.2% y subieron a 36% en la recaída, lo cual tiene significancia clínica aunque no estadística.

El tercer paciente con recaída correspondió a un paciente con leucemia mieloide de estirpe monocitoide con el principal factor independiente para riesgo de recaída, que es el de falta de respuesta al primer ciclo de quimioterapia. Presentó recaída temprana y la familia rechazó quimioterapia, el paciente se encuentra vivo bajo cuidados paliativos. En éste paciente el porcentaje de expresión del antígeno CD96 fue de 12.4% y no se estableció correlación clínica en este caso.

La mortalidad en este grupo fue del 7.1% pero es importante señalar que el grupo analizado fue muy pequeño, así como el tiempo de seguimiento muy corto. El paciente que falleció correspondió a un paciente con LMA M7 riesgo estándar que teóricamente

tenía el 60% de sobrevida, pero otro lado por pertenecer al grupo de las M7 es conocido que la respuesta a la quimioterapia es heterogénea y en algunos pacientes disminuye la tasa de respuesta a quimioterapia. Otro paciente sin bien no ha fallecido ya se encuentra fuera de tratamiento médico y con la neoplasia hematológica fuera de control.

CONCLUSIONES:

El interés de los investigadores de esta tesis versó sobre tipo de cáncer más frecuente en la edad pediátrica, las leucemias agudas, de ellas las leucemias mieloides agudas presentan hasta un 50% de supervivencia global a 5 años, por lo que consideramos que es importante determinar los factores que influyen en el curso clínico de la enfermedad. Existen factores ya establecidos y otros que están en estudio.

El contar con marcadores específicos para identificar la existencia de clonas leucémicas en los pacientes podría servir para determinar intensidad de tratamiento y duración de la quimioterapia en estos niños.

Este trabajo tuvo el objetivo de determinar y cuantificar la presencia de CD96 en membrana celular de células troncales hematopoyéticas leucémicas (CD34+38-Lin-) ya que se conoce que en estas células es donde se encuentra la producción neoplásica en diferentes etapas del diagnóstico y seguimiento, y se estableció la correlación clínica con el curso de la enfermedad a 1 año en pacientes pediátricos con LMA. Este marcador no había sido probado en células provenientes de la población pediátrica, sin embargo en la población adulta resultó de gran interés al diagnóstico en pacientes con LMA.

Dado que la n fue pequeña y el seguimiento corto, no encontramos diferencias significativamente estadísticamente estadísticas entre todos los grupos analizados comparando el porcentaje de expresión del antígeno CD96.

Donde sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas fue entre los pacientes sanos y los pacientes con leucemia mieloide aguda, ($p= 0.001$), lo cual es muy relevante dado que en los pacientes con leucemia mieloide aguda uno de los principales problemas es que los criterios estándar para definir recaída son insuficientes debido a que se conoce que a pesar del tratamiento persisten células iniciadoras de leucemia (células troncales leucémicas). Este trabajo propone una herramienta para diferenciar a las células troncales leucémicas de las sanas y esto podría facilitar a mediano plazo la caracterización de las clonas celulares resistentes a quimioterapia y así plantear las bases para nuevas terapias blanco en estos pacientes.

REFERENCIAS:

- 1.- Hoffman R. et al. *Basic Principles and Practice, Hematology: 4th. ed. edición*, St. Louis, Mo.: Elsevier Churchill Livingstone, 2005. pg. 1071
- 2.- Jimenez R. Historia e Investigación de la Leucemia. *Rev. Biol. Trop.* 2004;52(3):559-569.
- 3.- Bennett J, Catovsky D, Daniel M, Flandrin G, Galton D, Gralnick H, Sultan C. «Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group». *Br J Haematol* 1976;33(4):451-8.
- 4.- Vardiman J, Harris N, Brunning R. «The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms». *Blood* 2002;100(7):2292-302.
- 5.- Jabbour EJ, Estey E, Kantarjian HM. Acute myeloid leukemia. *Mayo Clin Proc.* 2006;81(2):247-60.
- 6.- Steuber CP, Civin C, Krischer J, et al: A comparison of induction and maintenance therapy for acute nonlymphocytic leukemia in childhood: Results of a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol* 1991;9:247-258.
- 7.- Vijaykrishnan J, Houlston R. Candidate gene association studies and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia: a systematic review and meta-analysis. *Haematologica* 2010;95:1-29.
- 8.- Scélo G, Metayer C, Zhang L, Wiemels J, Aldrich M, Selvin S, Month S, Smith M, Buffler P, Household exposure to paint and petroleum solvents, chromosomal translocations, and the risk of childhood leukemia. *Environ Health Perspect* 2009; 117(1):133-9.
- 9.- Smith FO, Alonzo TA, Gerbing GB, Woods WG, RJ Arceci. Long-term results of children with acute myeloid leukemia: a report of three consecutive Phase III trials by the Children's Cancer Group: CCG 251, CCG 213 and CCG 289. *Leukemia* 2005; 19: 2054–2062
- 10.- Lie SO, Abrahamsson J, Clausen N, Forestier E, Hasle H, Hovi L, Jonmundsson G, Mellander L, Siimes MA, Yssing M. Long-term results in children with AML: NOPHO-AML Study Group – report of three consecutive trials. *Leukemia* 2005;19: 2090–2100
- 11.- Creutzig U, Zimmermann M, Ritter J, Reinhardt D, Hermann J, Henze G, Ju'rgens H, Kabisch H, Reiter A, Riehm H. Treatment strategies and long-term results in paediatric patients treated in four consecutive AML-BFM trials. *Leukemia* 2005;19:2030–2042
- 12.- Ribeiro RC, Razzouk BI, Pounds S, Hijya N, Pui CH, Rubnitz JE. Successive clinical trials for childhood acute myeloid leukemia at St Jude Children's Research Hospital, from 1980 to 2000. *Leukemia* 2005;19:2125–2129.

- 13.- Gibson BES, Wheatley K, Hann IM, Stevens RF, Webb D, Hills DK, De Graaf SNN, Harrison CJ. Treatment strategy and long-term results in paediatric patients treated in consecutive UK AML trials. *Leukemia* 2005;19: 2130–2138.
- 14.- Tallman MS, Altman JK. Curative Strategies in Acute Promyelocytic Leukemia. *Hematology* 2008:391-9
- 15.- Jeffrey E. Rubnitz, MD, Gibson B, Smith FO. Acute Myeloid Leukemia. *Hematol Oncol Clin N Am* 2010;24: 35-63.
- 16.- Kaspers GJL, Creutzig U. Pediatric acute myeloid leukemia: international progress and future directions. *Leukemia* 2005;19: 2025–2029.
- 17.- Pui CH. Prognostic factors in infants with acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2000;14: 684-687.
- 18.- Rubnitz J. Prognostic Factors and outcome of recurrence in childhood acute myeloid leukemia. *Cancer* January 2007;109(1): 157-153.
- 19.- Sung TJ, Lee DH, SK Kim, Junio YH. Congenital acute myeloid leukemia with t(8;16) and t(17;19) double translocation: case presentation and literature review. *J Korean Med Sci.* 2010;25(6):945-9.
- 20.- Arber DA, Carter NH, Ikle D, Slovaj ML. Value of Combined Morphologic, Cytochemical, and Immunophenotypic Features in Predicting Recurrent Cytogenetic Abnormalities in Acute Myeloid Leukemia. *Human Pathology* 2003; 34(5) 479-483
- 21.- Byrd JC, Mrozek K, Dodge RK, Carroll AJ, Edwards CG, Arthur DC, Pettenati MJ, Patil SR, Rao KW, Watson MS, Koduru PR, Moore JO, Stone RM, Mayer RJ, Feldman EJ, Davey FR, Schiffer ChA, Larson RA, Bloomfield CD. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). Blood.* 2002;100(13):4325-36.
- 22.- Ferrara F, Palmieri S, Leoni F. Clinically useful prognostic factors in acute myeloid leukemia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2008;66:181–193.
- 23.- Richard F, et al. Marked improvements in outcome with chemotherapy alone in paediatric acute myeloid leukaemia: *Br J Haematol* 1998;101(1):130-40.
- 24.- Rai KR, Holland JF, Glidewell OJ, et al. Treatment of acute myelocytic leukemia: A study by Cancer and Leukemia Group B. *Blood* 1981;58:1203-1212.
- 25.- Perel Y, Auvrignon A, Leblanc T, Vannier JP, Michel G, Nelken B, Gandemer V, Schmitt C, Lamagnere JP, Lumley DL, Bader-Meunier B, Couillaud, B, Schaison G, Landman-Parker J, Thuret I, Dalle JH, Baruchel A. *Journal of Clinical Oncology* 2002;20(12):2774-2782.

- 26.- Shook D, Coustan-Smith E, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Campana D. Minimal residual disease quantitation in AML- Clinic Lymphoma Myeloma. 2009;9:281–285.
- 27.- Dario Campana. Status of minimal residual disease testing in childhood haematological malignancies. St. Jude Children’s Research Hospital. British Journal of Haematology; 2008, 1-9
- 28.- Langebrake C, Creutzig U, Dworzak M, Hrusak O, Mejstrikova E, Griesinger F, Zimmermann M, Reinhardt D. Residual Disease Monitoring in Childhood Acute Myeloid Leukemia by Multiparameter Flow Cytometry: The MRD-AML-BFM Study Group. Journal of clinical oncology 2006; 24(22):3686-92.
- 29.- Kern W, Schoch C, Haferlach T, Schnittger S. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. Critical Reviews in Oncology/Hematology 2005;56(2): 283-309.
- 30.- Freeman SD, Jovanovicb JV, Grimwadeb D. Development of Minimal Residual Disease–Directed Therapy in Acute Myeloid Leukemia. Seminars in Oncology 2008;35(4) 388-400.
- 31.- Minimal residual disease monitoring by flow cytometry. Vidriales MB, San-Miguel J, Orfao A, Coustan-Smith E, Campana D. Clinical Haematology 2003;16(4) 599-612.
- 32.- Hess CJ, Feller N, Denkers F, Kelder A, Merle PA, Heinrich MC, Harlow A, Berkhof J, Ossenkoppele JG, Waisfisz Q, Schuurhuis GJ. Correlation of minimal residual disease cell frequency with molecular genotype in patients with acute myeloid leukemia. Haematologica 2009;94(1):46-53
33. Langebrake C, Brinkmann I, Teigler-Schlegel A, et al: Immunophenotypic differences between diagnosis and relapse in childhood AML: Implications for MRD monitoring. Cytometry B Clin Cytom 2005;63:1-9.
34. Baer MR, Stewart CC, Dodge RK, et al: High frequency of immunophenotype changes in acute myeloid leukemia at relapse: Implications for residual disease detection (Cancer and Leukemia Group B Study 8361). Blood 2001;97:3574-3580.
- 35.- Oelschlagel U, Nowak R, Schaub A, et al: Shift of aberrant antigen expression at relapse or at treatment failure in acute leukemia. Cytometry 2000;42:247-253.
- 36.- Coustan-Smith E, Ribeiro RC, Rubnitz JE, et al: Clinical significance of residual disease during treatment in childhood acute myeloid leukaemia. Br J Haematol 2003;123:243-252.
37. Sievers EL, Lange BJ, Alonzo TA, et al: Immunophenotypic evidence of leukemia after induction therapy predicts relapse: Results from a prospective Children’s Cancer Group study of 252 patients with acute myeloid leukemia. Blood 2003;101:3398-3406
- 38.- Tobal K, Newton J, Macheta M, Chang J, Morgenstern G, Evans PA, Morgan G, Lucas GS, Liu YJ Molecular quantitation of minimal residual disease in acute

myeloid leukemia with t(8;21) can identify patients in durable remission and predict clinical relapse. *Blood* 2000;95:815–819

39.- LoCoco, F, Ammatuna, E. Front line clinical trials and minimal residual disease monitoring in acute promyelocytic leukemia. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 2007;313:145–156

40.- Campana D, Coustan-Smith E, Janossy G. The immunologic detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood* 1990;76:163–171

41.- Sievers EL, Lange BJ, Alonzo TA, Gerbing RB., Bernstein ID, Smith FO, Arceci, RJ, Woods WG, Loken MR. Immunophenotypic evidence of leukemia after induction therapy predicts relapse: results from a prospective Children's Cancer Group study of 252 acute myeloid leukemia patients. *Blood* 2003; 101: 3398–3406

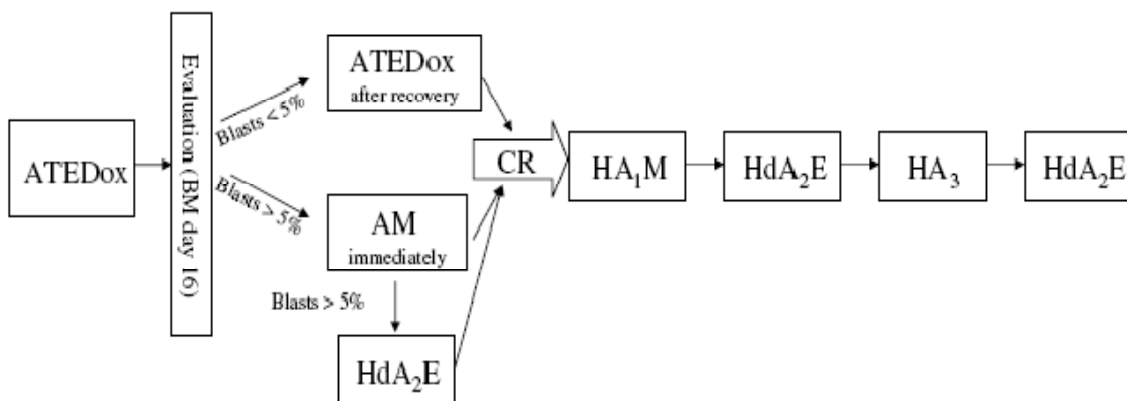
42.- Langebrake, C, Creutzig U, Dworzak, M, Hrusak O, Mejstrikova E, Griesinger F, Zimmermann M, Reinhardt, D. Residual disease monitoring in childhood acute myeloid leukemia by multiparameter flow cytometry: the MRD-AML-BFM Study Group. *Journal of Clinical Oncology* 2006;24:3686–3692

43.- Hosen N, Christopher YP, Naoya T, Yusuke O, Haruo S, Gramatzki H, Krensky A, Irving L. Weissman. CD96 is a leukemic stem cell-specific marker in human acute myeloid leukemia. *PNAS* 2007;104(26):11008 – 11013.

ANEXOS:

ANEXO 1. ESQUEMA NOPHO .

NOPHO-AML93



Leukemia (2005) 19, 2090-2100

Inducción

ATEDox

TODOS LOS PACIENTES:

Todos los pacientes incluidos en este protocolo iniciarán quimioterapia tan pronto se haya conseguido estabilización metabólica y/o hematológica y/o coagulación, sin retrasar el inicio de la inducción por más de 72 horas. Dado que en nuestro país no contamos con tioguanina, se sustituirá por otro medicamento del mismo grupo, la 6 mercaptopurina.

AraC 200mgm2día en infusión continua días 1-4

6-Mercaptopurina 75mgm2día en días 1-4

Etopósido 100mgm2día en infusión continua día 1-4

Doxorrubicina 75mgm2 en infusión de 8 horas día 5

Quimioterapia intratecal con tres medicamentos, día 1 de la inducción. En los casos de hiperleucocitosis (GB>200,000/mm³.) y blastos en la sangre periférica debe diferirse la primera punción lumbar (PL) hasta que haya reducción en los blastos periféricos preferiblemente hasta <100,000/mm³.

Segunda inducción

ATEDox

PACIENTES CON MENOS DE 5% BLASTOS EN MÉDULA OSEA DÍA 16

Todos los pacientes que en la médula ósea del día 16 después de iniciada la primera inducción tengan MENOS de 5% blastos o todos los pacientes con LMA, recibirán una segunda inducción igual a la primera. Esta segunda inducción iniciará hasta que haya evidencia de recuperación hematológica -glóbulos blancos >1,500 x mm³, neutrófilos absolutos > 1,000 x mm³ y plaquetas > 80,000 x mm³.

AraC 200mgm2día en infusión continua días 1-4

6-Mercaptopurina 75mgm2día en días 1-4

Etopósido 100mgm2día en infusión continua día 1-4

Doxorrubicina 75mgm2 en infusión de 8 horas día 5

Quimioterapia intratecal con tres medicamentos día 1.

Segunda inducción

AM

SOLAMENTE PARA PACIENTES CON BLASTOS \geq DE 5% EN MÉDULA OSEA DE DÍA 29:

Todos los pacientes que en la médula ósea del día 16 después de iniciada la primera inducción tengan \geq 5% blastos, recibirán una segunda inducción que iniciará lo mas pronto posible después haber hecho la médula ósea **-siempre que no haya una condición de infección que amenace la vida del paciente-** sin importar la cuenta de glóbulos blancos, neutrófilos absolutos y/o plaquetas.

AraC 100mgm²día en infusión continua día 1-5

Mitoxantrona 10mgm²día en infusión de 30 minutos días 1 a 3

Quimioterapia intratecal día 1

Tercera inducción

HA₂E

SOLAMENTE PARA PACIENTES QUE NO RESPONDAN A SEGUNDA INDUCCION:

Todos los pacientes que persistan con blastos en la médula ósea del día 14 después de iniciada la segunda inducción AM recibirán una tercera inducción que iniciará lo mas pronto posible **-siempre que no haya una condición de infección que amenace la vida del paciente-** sin importar la cuenta de glóbulos blancos, neutrófilos absolutos y/o plaquetas.

HdA₂E:

AraC 2grm² en infusión de 2 horas cada 12 horas días 1 a 3

Etopósido 100mgm² día en infusión de 1 hora días 2 a 5

Quimioterapia intratecal Día 1

CONSOLIDACION

Cada bloque de quimioterapia de consolidación se debe diferir si hay plaquetas $< 80,000 \times \text{mm}^3$, leucocitos $< 1,500/\text{mm}^3$ y neutrófilos absolutos $< 1,000 \times \text{mm}^3$

Primera consolidación

HA₁M

TODOS LOS PACIENTES:

HA₁M:

AraC 1grm² en infusión de 2 horas cada 12 horas en días 1 a 3

Mitoxantrona 10mgm² en infusión de 30 minutos en días 3-5

Quimioterapia intratecal día 1

Segunda consolidación

HdA₂E:

AraC 2grm² en infusión de 2 horas cada 12 horas días 1 a 3

Etopósido 100mgm² día en infusión de 1 hora días 2 a 5

Quimioterapia intratecal Día 1

Tercera consolidación

HA₃

TODOS LOS PACIENTES

HA₃:

Ara C 3grm³ en infusión de 2 horas cada 12 horas en días 1-3

Quimioterapia intratecal día 1

Cuarta consolidación

CUARTA CONSOLIDACION - HA₂E

PACIENTES CON POBRE RESPUESTA A LA PRIMERA INDUCCION

Ara-C 2g/m²/dosis IV. Infusión de 2 horas cada 12 horas, los días 1-3 .

Etoposido 100 mg/m²/día, IV. Infusión de 1 hora, los días 2-5.

Intratecal en dosis de acuerdo a la edad, en el día 1

Anexo 2

Carta de consentimiento informado

Hospital Infantil de México Federico Gómez



Por medio de la presente autorizo y estoy enterado de que a mi hijo (a) _____ de _____ años y _____ meses de edad, con número de expediente _____ atendido (a) en éste hospital le será tomada una muestra de médula ósea, misma que se utilizará con fines de investigación en el protocolo **CO-2009-020**, titulado "Expresión diferencial de CD96 en células troncales hematopoyéticas provenientes de pacientes pediátricos con leucemia mieloide aguda"

Estoy enterado que los objetivos de dicha investigación son aportar información sobre el comportamiento biológico las células madre o células troncales de niños con Leucemia Mieloide Aguda y compararlos con células que provengan de pacientes sin leucemia con el fin de que a mediano o largo plazo se puedan proponer alternativas terapéuticas que contribuyan a mejorar el diagnóstico y tratamiento de dicha enfermedad.

Así mismo estoy consciente que la toma de la muestra será tomada bajo anestesia general, como parte del estudio diagnóstico del paciente y en su caso como parte del procedimiento quirúrgico a realizarse, tomando en cuenta que el procedimiento de aspirado de médula ósea tiene una probabilidad mínima de complicaciones causadas por el propio aspirado de médula, sin embargo en caso de presentarse alguna complicación, el paciente será atendido en el Hospital Infantil de México para resolver su problema de salud consecuencia del Aspirado de Médula ósea.

Además en el caso yo lo desee me será proporcionada cualquier tipo de información o explicación en relación a este protocolo de estudio. Para ello tendré que acudir o comunicarme con la responsable del estudio, la Dra. Elisa Dorantes Acosta en el Hospital Infantil de México Federico Gómez (TEL 52289919 Ext. 1238 y 1128)

Finalmente hago manifiesto que la autorización la emito en pleno uso de mi libertad y sin coacción alguna, asegurándome que se mantendrá la confidencialidad de los datos del menor, así como que en el momento en el que yo decida podré retirar la autorización para proporcionar la muestra biológica antes mencionada.

Se firma la presente para los fines que haya lugar en México D. F a los __ días del mes de _____ de 200__ en dos tantos (uno para el responsable del paciente y otro para los responsables de la investigación), y en la presencia del responsable legal del menor, responsable de la investigación y dos testigos.

Nombre y firma del responsable legal del menor

Nombre y firma del responsable de la investigación

Dra Elisa Dorantes Acosta. Oncóloga Pediatra del Hospital Infantil de México Federico Gómez. Tel 52289919 ext 1238 y 1128

Nombre y firma del testigo 1

Teléfono: _____

Nombre y firma del testigo 2

Teléfono: _____