



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MÉXICO**



**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

SECRETARIA DE SALUD

HOSPITAL INFANTIL DEL ESTADO DE SONORA

**“VALIDEZ DE LA ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL
POR CITOMETRÍA DE FLUJO EN LA PREDICCIÓN DE
RECAÍDA EN PACIENTES CON LEUCEMIA
LINFOBLASTICA AGUDA EN HIES ”**

**TESIS PARA OBTENER LA ESPECIALIDAD DE:
ONCOLOGO PEDIATRIA**

PRESENTA:

Dr. ENRIQUE EDUARDO LOPEZ FACIO.



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 AUTONOMA
DE MÉXICO**



**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

SECRETARIA DE SALUD

HOSPITAL INFANTIL DEL ESTADO DE SONORA

**“VALIDEZ DE LA ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL
POR CITOMETRÍA DE FLUJO EN LA PREDICCIÓN DE
RECAÍDA EN PACIENTES CON LEUCEMIA
LINFOBLASTICA AGUDA EN HIES”**

**TESIS PARA OBTENER EL DIPLOMA DE:
ONCOLOGO PEDIATRIA**

PRESENTA

Dr. Enrique Eduardo López Facio.

**DR. DR. LUIS ANTONIO GONZALEZ RAMOS
DIRECTOR GENERAL HIES**

**DRA. ELBA VÁZQUEZ PIZAÑA
DIRECTOR DE LA DIVISION ENSEÑANZA
E INVESTIGACION**

**DR. GILBERTO COVARRUBIAS ESPINOZA
PROFESOR TITULAR DEL CURSO UNIVERSITARIO Y ASESOR DE TESIS**

**DR HOMERO RENDON GARCIA
DIRECTOR DE TESIS**

**DRA. TANIA CLARISSA LARIOS FARAK
ASESOR DE TESIS**

Agradecimientos.

Dios gracias por permitirme ayudar a nuestros niños, dejar continuar mi camino y proteger a mi familia.

A mi esposa, por ser la inspiración necesaria para continuar mi camino, por su apoyo incondicional, y brindarme una sonrisa en los momentos más difíciles, impulsando mi espíritu para ser mejor médico y ser humano.

Mi hijo Enrique Emiliano el tenerte en mis manos ha sido la mayor bendición, eres la estrella que me ilumina, tu mami y yo te amamos.

Mis padres que en todo momento han estado a mi lado, a pesar de la distancia en ningún momento he sentido estar apartado de ellos, así también que mi formación como médico sirva a mi familia y seres amados.

Apoyo incondicional de maestros y compañeros, gracias a todos no solo fue posible realizarme como médico oncólogo, también por ustedes dieron vida a mi familia y jamás olvidare todo el apoyo que he recibido de su parte, dios los bendiga.

A todos nuestros niños que ponen su fe y esperanza en nuestras manos.

Y a todo ser humano que siempre han estado a mi lado, alentándome a continuar gracias.

INDICE

I. Índice.....	4.
2. Introducción.....	5
3. Resumen	7
4. Planteamiento del problema.....	9
5 Pregunta de investigación	12.
6.-Marco teórico.....	13
7. Objetivos de la investigación.....	48
8.-Hipotesis.....	49
9.- Justificación.....	50
10. Material y Métodos.....	52
11. Variables.....	56
12. Resultados.....	57
13. Discusión.....	65
14. Conclusiones.....	71
15. Bibliografía.....	72

Introducción

Avances en el estudio y tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda, han mostrado notable mejoría en la supervivencia de los pacientes. Porcentajes de curación han aumentado desde cero en 1950 hasta el 75%-85% para esta enfermedad hoy en día **(14)**. La evolución del tratamiento ha permitido así mismo la evolución de las herramientas diagnósticas. La Habilidad de identificar anomalías moleculares y genéticas junto con las nuevas técnicas diagnósticas, han permitido mejorar el entendimiento de los procesos patológicos.

Hace pocos años se ha introducido en nuestro país la detección de la enfermedad mínima residual que consiste en la detección molecular de blastos por métodos como citometría de flujo o PCR , que no son detectados por aspirado de médula ósea. A pesar de los esfuerzos en estudiar e investigar sobre neoplasias infantiles, sólo hasta los últimos años, en los cuales el análisis a nivel molecular de las enfermedades ha logrado un sitio importante, su conocimiento era bastante escaso; sin embargo, ya se conocen genes relacionados con gran cantidad de neoplasias y los factores que desencadenan los cambios celulares necesarios para el desarrollo de un gran número de enfermedades.

En general, el estudio del cáncer en niños es un área de interés creciente y sobre el cual queda aún mucho por decir. En lo particular de las neoplasias hematolinfoides, se ha avanzado mucho con el conocimiento del proceso de maduración en múltiples pasos y se ha comprendido mejor las alteraciones que ocurren para el desarrollo de leucemias. Específicamente, el desarrollo de técnicas moleculares y el estudio de inmunofenotipo ha cambiado por completo los enfoques diagnóstico, terapéutico y pronóstico de las leucemias, y se ha incrementado el interés por establecer los niveles de enfermedad mínima residual.

Sin embargo, nuestro conocimiento sobre enfermedad mínima residual es escaso, y nuestro medio carece de estudios propios en los cuales se haya demostrado la real utilidad de estas técnicas en lo concerniente a rendimiento operativo y correlación clínica. Esta coyuntura abre un espacio para la investigación clínica con orientación básica como la que se quiere desarrollar con el presente estudio.

Con el presente trabajo se propone evaluar la EMR en los pacientes diagnosticados con leucemia aguda linfoblástica atendidos en el hospital infantil del estado de Sonora en el periodo tiempo comprendido enero 2009 a abril 2013, así como algunas características propias de los individuos, su relación con la recaída y sobrevida de los mismos.

Se espera que los resultados del presente trabajo permitan a nuestra comunidad médica mejorar los estándares de tratamiento y establecer nuestra definición de riesgo, aplicable a los pacientes, para orientar la terapéutica con base en éste y dar cabida a nuevas investigaciones futuras para ampliar el tema y así probablemente contar con nuestras propias herramientas de trabajo para EMR en nuestro hospital.

Resumen

Título: “Validez de la enfermedad mínima residual por citometría de flujo en la predicción de recaída en pacientes con leucemia linfoblástica aguda en HIES”

Introducción: Leucemia linfoblástica aguda es la primera causa de cáncer en el niño, aun en la actualidad la recaída se presenta 20-25% de los pacientes, actualmente diversas técnicas moleculares tienen como propósito predecir recaída y ajustar tratamiento, se analiza en este estudio la validez de esta prueba realizada por citometría de flujo, el valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de la enfermedad mínima residual (EMR) por citometría de flujo.

Metodología de la investigación: Estudio observacional descriptivo tipo transversal, del 1° de Enero de 2009 al 30 de abril de 2013. En pacientes de 0 a 18 años diagnosticados y tratados en el Hospital Infantil del Estado de Sonora con leucemia aguda linfoblástica mediante aspirado de médula ósea y a los que se les realizó enfermedad mínima residual, se analizaron recaída de estos pacientes y variables clínicas y bioquímicas.

Resultados: 54 pacientes fueron el total de casos analizados de estos a 6 pacientes con EMR positiva con un porcentaje de 11.11% y 88.89% con EMR negativa 48 pacientes. De estos pacientes presentaron recaída 20, 37.03% y 34, 62.9 % permanecieron en remisión completa. El valor predictivo positivo de esta prueba fue del 50%. Valor predictivo negativo fue del 64%. Falsos positivos de este estudio 8.8%. Falsos negativos 85%. Con precisión de este estudio del 62%. En cuanto al tiempo de recaída se tomó el corte ya descrito, de las 20 recaídas 10 fueron muy tempranas siendo 50%, 8 tempranas 40% y 2 tardías 10%.

Discusión: Analizando los resultados se podría inferir que para obtener una mayor sensibilidad y especificidad de la enfermedad mínima residual, se necesita mayor conteo de leucocitos, así como estandarizar el tiempo en el que se procesa la muestra para evitar destrucción celular. el tamaño de muestra del estudio no es el más adecuado para obtener datos estadísticos significativos, por tal motivo se necesitan más estudios en nuestro medio con más pacientes.

Conclusiones: La enfermedad mínima residual por citometría de flujo tiene poca sensibilidad y especificidad en nuestro hospital seguramente por las características relacionadas con la movilización de la muestra y la forma de interpretación, por lo que se concluye que para este medio no es del todo totalmente válida.

Palabras Clave: *Enfermedad Mínima Residual.*

Planteamiento del problema.

En nuestro hospital la detección de la enfermedad mínima residual por citometría de flujo se ha venido realizando hace pocos años a partir del 2009, se necesita experiencia del operador para su realización y en la interpretación de los resultados. Se considera necesario la realización de esta investigación para determinar la sensibilidad y especificidad de la prueba (valor predictivo) evaluando el progreso de los pacientes a quienes se les ha realizado esta herramienta diagnóstica y así poder analizar nuestras bases de datos y nuestra propia estadística de acuerdo a la prueba. Se busca poder además analizar nuestros pacientes con sus características, el resultado de la EMR individualizada, y que influencia ejerce su valor en la recaída de nuestros niños.

Las técnicas que se utilizan para el análisis de EMR deben de ser cuantitativas, sensibles y específicas. En la actualidad, dos técnicas cumplen con estos requisitos, las técnicas moleculares y la citometría de flujo(2).

El estudio de inmunofenotipo por citometría de flujo ha sido reconocido de gran utilidad por sus altas sensibilidad, especificidad y reproducibilidad, incluso superando la morfología, que ha permitido el reconocimiento de características diagnósticas y pronósticas que se escapaban anteriormente por estudios morfológicos solos. Con base en esta apreciación, actualmente se recomienda la combinación de múltiples técnicas diagnósticas (morfología, inmunofenotipo y biología molecular), más que el uso separado de alguno (36).

Medición molecular de la leucemia que es capaz de detectar células anormales más allá de la capacidad del estudio morfológico se le llama enfermedad mínima residual (EMR). Se considera que el paciente al momento del diagnóstico puede llegar a tener 10^{12} células malignas. Se considera en remisión con <5% blastos en el estudio morfológico de médula ósea, lo que equivale a 10^{10} células no detectables o EMR del 1%. Sin embargo, el estudio de EMR puede detectar 1 célula maligna en 10000 células normales o más, lo que cuantitativamente es 100 veces más sensible que técnicas usuales. **(33,43)**

La citometría de flujo es una técnica cuantitativa, específica, con una sensibilidad de 10^{-4} , aplicable a más del 90% de los pacientes con neoplasias hematológicas, otorgando resultados rápidos útil en la toma de decisiones terapéuticas. Por eso se considera indispensable en el diagnóstico, clasificación y monitorización de la LLA **(3,8)**

Se introduce esta técnica con los primeros pacientes 2008, posteriormente se estandariza la prueba en nuestro hospital, los resultados obtenidos de este estudio muestran que si únicamente se usa citomorfología como método para detectar remisión clínica en pacientes con LAL, es probable que se pierda hasta 14.3% de pacientes que aún tienen células leucémicas **(51)**. Se conoce que la leucemia linfoblástica aguda es el cáncer infantil más frecuente ocupando el 41% de todas las neoplasias, y de estos pacientes existe aún una tasa de recaída del 15-20% **(41)**. En nuestro hospital la cifra es cercana, la interrogante que se pretende responder es si esta prueba aplicada bajo las características en nuestro medio es similar y en base a esto poder reestadificar a nuestros pacientes con el fin de intensificar el tratamiento para aquellos que lo requieran y poder mejorar las tasas de curación y recaída en base a esta prueba.

Al conocer sensibilidad y especificidad de esta prueba podemos valorar las técnicas utilizadas en nuestro hospital para su toma y procesamiento, ya que está bien descrita la alta sensibilidad y especificidad de la misma. Como todos los procesos en el laboratorio clínico, el estudio de una muestra hematológica por citometría de flujo se compone de fases pre-analítica (toma y manejo de la muestra), analítica (corrida en el instrumento) y post-analítica (análisis de datos y entrega de resultado). Si bien, mantener los instrumentos de medición en condiciones óptimas a través de sistemas de aseguramiento de calidad es de importancia capital, se hace fundamental el manejo adecuado de las muestras desde su toma hasta que son analizados por los equipos. La toma de la muestra, su adecuada manipulación, transporte y disposición, generan las condiciones necesarias para garantizar obtener resultados óptimos en los análisis. Se hace indispensable que los responsables de los laboratorios de citometría de flujo generen protocolos de manejo de muestra que sean distribuidos a los sitios donde se originan las muestras (37).

La relevancia de esta investigación es hacer un análisis sobre los resultados obtenidos y así mejorar procesamiento y resultados para una mejor atención del paciente. Y por lo tanto conocer comportamiento clínico predecir recaídas y ajustar tratamiento.

Pregunta de investigación.

- ¿Cuál es la validez y concordancia para la predicción de la recaída leucémica en la prueba de EMR por citometría de flujo?

MARCO TEÓRICO.

Comprender la enfermedad, cómo afecta a la población y cuáles son los puntos básicos en los cuales se presentan las alteraciones que desencadenan el desarrollo de la neoplasia, con una revisión de los conceptos actuales de terapia y pronóstico para clasificar los grupos de riesgo es fundamental para el inicio de estudio.

Las neoplasias hematolinfoides han sido consideradas históricamente como un gran grupo de enfermedades que comparten entre sí el compromiso de médula ósea, y otros órganos, por la expansión clonal y desordenada de una, o varias, líneas celulares originadas de una célula alterada. Desde las clasificaciones más antiguas, pasando por FAB y REAL, y la actual clasificación de OMS, se ha demostrado la dificultad que plantean estas neoplasias en su comprensión y el incremento en la información disponible para su diagnóstico, pronóstico y tratamiento.

Algunos de los avances más significativos en la terapia de leucemias en los últimos veinte años han ocurrido con las leucemias linfoblásticas agudas B y T. La “tasa de cura”, o períodos libres de enfermedad a cinco años, supera para algunas leucemias B el 85%. (Pizzo, 2010) Sin embargo, algunos tipos están relacionados con bajas tasas de remisión y altas tasas de recurrencia, aquellos que debutan leucocitos arriba de 100000, expresión de cromosoma philadelphia. Los perfiles citogenéticos, el genotipo y el inmunofenotipo de las células malignas han tenido considerable impacto en el reconocimiento de la estratificación de riesgo con el reconocimiento de grupos de bajo y alto riesgos. Esta estratificación ha permitido el desarrollo de regímenes terapéuticos más específicos, logrando tasas de remisión más altas en

grupos de alto riesgo, y reduciendo la toxicidad en los grupos de bajo riesgo. (Brunning 2001, Campana 2004, Pui 2000) 2,3,41

La Leucemia Linfoblástica de precursores B (LLA-B), así como el linfoma linfoblástico, es una neoplasia que compromete el linaje de células B, compuesto de células blásticas de tamaño pequeño a mediano, con escaso citoplasma, cromatinas dispersas y no condensada con nucléolos mínimos o escasos, que involucra la médula ósea y pueden estar en sangre periférica. Similar descripción se aplica a las neoplasias de precursores **(2)**.

La leucemia linfoblástica aguda es la forma más frecuente de neoplasia en niños y jóvenes, representando el 33% de las neoplasias en menores de 15 años y 26% en menores de 20 años. (Ravindranath 2003) 49. El pico de incidencia ocurre entre los 2 y 5 años de edad y es más común en varones blancos, situación que se ha incrementado en las últimas 2 décadas **(3)**. El riesgo de leucemia es más alto en países industrializados como se observa en EEUU, Italia, Australia, Suiza y Japón, y más bajo en África y Asia **(50)**.

La leucemia representa cerca de la tercera parte de las neoplasias en niños, correspondiendo hasta el 80% a leucemia linfoblástica B, 17% a leucemia mieloide aguda, y el porcentaje restante a leucemias agudas y crónicas poco frecuentes **(67)**.

La leucemia linfoblástica (LLA) es una enfermedad principalmente de niños y adolescentes, sin embargo un segundo pico más pequeño se observa en mayores de 70 años. (Redaelli 2005)50. Se estima una incidencia anual en EEUU de 3200 casos nuevos, de los cuales el 80-85% corresponde a precursores de fenotipo B, y sólo 15% de precursores T. **(2)**, 49. Ajustado por edad el riesgo de desarrollo de leucemia en EEUU para el 2000 es de 1.4 por 100 000 habitantes en población general, y se eleva a 3 por 100 000 en menores de 19 años **(50)**. Por el

contrario, las LLA de precursores T se presentan con mayor frecuencia en adolescentes y niños mayores, con predominio de género masculino **(2)**. En relación con la raza, la LLA es más frecuente en población blanca que negra con razón 10:6, y en los EEUU se observa con mayor frecuencia entre los latinos de Los Ángeles **(50)**. Reportes de la década pasada muestran datos epidemiológicos en nuestro país de hasta en 63.7 casos por millón, y manteniendo tendencia similar en otros países. Se ha documentado que su incidencia es de tres casos nuevos en menores de 15 años por cada 100.000 habitantes por año **(48)**. En el Hospital Infantil del Estado de Sonora la frecuencia de las leucemias es de 42% igual que la reportada en la literatura y permanece como la neoplasia maligna más frecuente **(32)**.

Las leucemias linfoblásticas presentan tasas de curación de hasta el 80%, mientras que su contraparte mieloide alcanza escasamente el 40-50% de éxito. (Ravindranath 2003)⁴⁹. La mortalidad ha sido calculada en 0.5 por 100 000 habitantes ajustado por edad, con ligero incremento en el género masculino con 0.6 por 100 000. La tendencia de incidencia se mantiene para la mortalidad en lo concerniente a raza **(50)**.

La etiología de las leucemias linfoblásticas es aún poco conocida, pero se ha postulado que las regulaciones a la baja de genes supresores de tumor y a la alta de oncogenes sumado a un desencadenante medioambiental generan el cambio neoplásico en las células **(50)**. Hay evidencia que sugiere un factor genético en algunos casos **(2)**, y otras que están relacionadas con enfermedades específicas como el síndrome de Down o la anemia de Fanconi, pero ellos cuentan sólo para la minoría de casos **(15,67)**. Se ha establecido que el uso por la gestante de ciertas sustancias como marihuana, antihistamínicos, anfetaminas, entre otras, pueden incrementar el riesgo en el hijo de presentar leucemia en la niñez, mientras que el uso sistemático de folato durante el embarazo ha reducido hasta en 60% los casos de neoplasia.

(Ziegler 2005)⁶⁷. No se ha podido establecer el papel de factores medioambientales tales como campos electromagnéticos o exposición a radón, en el desarrollo de la enfermedad. (Chan 2002)¹⁵. Otros factores posiblemente implicados incluyen exposición nuclear residencial u ocupacional en los niños o los padres, radiaciones no ionizantes, pesticidas, benceno, inhibidores de la topoisomerasa II naturales y manufacturados, nitratos de la dieta y el consumo de agua contaminada con tricloroetileno **(50)**.

El estudio por técnicas de citogenética de sangre de cordón ha demostrado translocaciones específicas de leucemia t(12;21) ó la fusión TEL-AML1 hasta en el 1% de los recién nacidos. Se ha reportado similar presentación de lesiones premalignas del neuroblastoma y tumor de Wilms, con lo que se sugiere que la mayoría de las neoplasias infantiles se origina in-utero, pero tienen baja penetrancia (<1%). Acorde a la tasa de presentación de casos, se requiere que el 1% de los niños con dichas alteraciones sufran un segundo golpe durante su infancia para que se desarrolle en ellos leucemia. Este segundo golpe se puede presentar en cualquier momento luego del parto, sin que exista un período de latencia establecido pero que puede llegar a ser hasta de 15 años **(50,52)**.

Entre los posibles factores que pueden producir el segundo golpe se estudian químicos (pesticidas) e infecciones. El análisis del segundo golpe se suscitó a partir del reconocimiento de niños con síndrome de Down que padecían de desorden mieloproliferativo transitorio (presente hasta en el 10% de ellos) y desarrollaron leucemia megacarioblástica aguda, en los cuales se encontró mutación del gen GATA1, esencial para el desarrollo de líneas eritroide y megacarioblástica. Sin embargo, otro golpe debe de ocurrir para permitir la progresión. **(67)**

La enfermedad compromete principalmente médula ósea y sangre. El compromiso extramedular es frecuente con predilección particular por el sistema nervioso central, ganglios

linfáticos, bazo, hígado y gónadas. Por el contrario, la leucemia de células T puede cursar con masa mediastinal en un gran número de los casos de los casos, pero compromete también ganglios linfáticos, piel, hígado, bazo, anillo de Waldeyer, sistema nervioso central y gónadas.

(2)

La mayoría de los pacientes se presentan con falla medular: trombocitopenia, anemia y/o neutropenia. El conteo de leucocitos puede estar disminuido, normal o marcadamente elevado, pero sólo el 50% de los pacientes tienen conteos de blancos mayores de 10000/ μ l **(15)**. Son frecuentes las linfadenopatías y hepato-esplenomegalia. Los dolores óseos y las artralgas pueden ser síntomas cardinales. **(2)**

Leucemia Linfoblástica, típicamente se presenta con altos conteos de leucocitos y, frecuentemente, con masa mediastinal o en otros tejidos. Para un conteo de leucocitos y un compromiso tumoral dado, la hematopoyesis puede estar respetada comparada con su contraparte B. **(2)**

Las consideraciones diagnósticas más relevantes son enunciadas a continuación. Se mantiene la separación del tipo celular de linaje B y T. Tener en cuenta que se presentan alteraciones en los paraclínicos que son comunes a ambos linajes que incluyen leucocitosis con neutropenia, anemia y trombocitopenia variables, elevaciones de LDH, ácido úrico, creatinina, calcio y fosfato, con disminución del nivel de inmunoglobulinas circulantes. **(50)**

Durante los años anteriores se empleaba la clasificación de la cooperación Franco Americano Británica (FAB), que separaba en 3 grupos pronósticos basados en morfología celular (L1 a L3), donde L2 tenía el peor pronóstico antes de intensificar las terapias, fue remplazada por la clasificación de OMS, que incluye otros parámetros que se exponen en los siguientes apartes **(15)**. La clasificación de FAB se puede resumir con la siguiente tabla.

Tabla 1 Clasificación franco-américa-británica.

	L1	L2	L3
Frecuencia	80%	17%	3%
Características	Linfoblastos pequeños con escaso citoplasma, sin nucléolos ni vacuolas prominentes.	Células más grandes, heterogéneas, con más citoplasma y nucléolos, sin vacuolas.	Blastos grandes homogéneos con cromatinas finas, nucléolos prominentes, citosol basofílico con vacuolas.
Inmunofenotipo asociado	Precursor B ó T	Precursor B ó T	Células B maduras (Burkitt)

Tomado de Redaelli 2005.

Se consideran cuatro apartados diagnósticos principales (morfología, citoquímica, inmunofenotipo y genética).

Citoquímica: Los linfoblastos son negativos para mieloperoxidasa y carecen de reactividad tipo mieloides con Sudán Negro B (SBB). Los gránulos linfoblásticos pueden teñir gris claro con la tinción SBB pero menos intenso que los mieloblastos. Los linfoblastos pueden mostrar positividad PAS, siendo en algunos casos el núcleo parcialmente rodeado por un anillo de reactividad PAS. Los linfoblastos pueden reaccionar con esterasa inespecífica con puntado multifocal o patrón de aparato de Golgi con inhibición variable con fluoruro de sodio. (2)

Inmunofenotipo: Los linfoblastos son deoxinucleotidiltransferasa terminal (TdT) positivos, HLA-DR positivos, y casi siempre positivos para CD19, CD79a citoplásmica y CD38. Son positivos para CD10 y CD24 en la mayoría de casos; en casos t(4;11)(q21;q23) son usualmente CD10 negativos y frecuentemente CD24negativos. Hay expresión variable de CD20 y CD22. CD45 puede estar ausente. La expresión citoplásmica de CD22 es considerada específica de linaje. Los antígenos mieloides CD13 y CD33 pueden ser de expresión

aberrante. El grado de diferenciación de los linfoblastos del linaje B tiene correlación clínica y genética. En el estado más temprano -precursor temprano-, los blastos expresan CD19, CD79a y CD22 citoplásmicos, y TdT nuclear, y en el estado intermedio -común-, los blastos expresan CD10. Estos dos estados representan la mayoría de casos de leucemia (50-70%). Entre 20-30% de los casos corresponden con el estado de diferenciación más maduro -preB-, los blastos expresan cadenas mu citoplásmica. Es característica la ausencia de inmunoglobulina de superficie, pero su presencia no excluye el diagnóstico de LLA-B, puesto que entre el 2-3% de estas neoplasias presentan esta característica y son CD20+. **(2,15)**

Genética: Las alteraciones genéticas son marcadores pronósticos importantes, detectándose hasta en el 75% de las leucemias linfoblásticas **(52)**. Las alteraciones citogenéticas en neoplasias de precursores B se consideran en varios grupos: hipoploidías, hipodiploidías <50, hiperdiploidías >50, translocaciones y pseudodiploidías. **(2,15)**

Estos hallazgos son de importancia pronóstica y son usados para modificar tratamientos en enfermedad pediátrica. Con los tratamientos actuales, los grupos de buen pronóstico son: hiperploidía entre 51 y 65 cromosomas, correspondiente a DI (contenido de DNA) por citometría de flujo de 1.16 a 1.6; y t(12;21)(p12;q22), la cual es resultado de la fusión del gene TEL en 12p13 con el gen del factor codificante de transcripción AML1 en 21q22. Los hallazgos relacionados con pobre pronóstico son: 1) t(9;22), la cual resulta de la fusión de BCR en 22q11.2 y el gen de tirosina quinasa citoplásmica ABL en 9q34, y produce una proteína de fusión en niños p190kd BCR/ABL. 2) LLA de precursores B en estados tempranos de diferenciación pueden tener t(4;11) con fusión del gen MLL en 11q23 que codifica una proteína putativa que liga DNA y AF4 en 4q21; otra translocación en 11q23 resulta de la fusión del locus MLL con otras parejas de genes. LLA con anomalías 11q23

pueden surgir también relacionadas a la terapia de leucemia secundaria a etopósido. 3) t(1;19), encontrada en el 25% de las LLA-B de niños con expresión citoplásmica de mu, fusiona el gen que codifica el factor de transcripción E2A en 19p13.3 con PBX en 1q23, asociado con pobre pronóstico. 4) Hipodiploidía está asociada con pobre pronóstico. Otras anormalidades (del(6q), del(9p), del(12p), hiperploidías <51, triploidía cercana y tetraploidía cercana) se asocian con pronóstico intermedio. (2)

Algunas entidades genéticamente definidas tienen inmunofenotipos característicos. Leucemias con rearrreglos de MLL son característicamente CD10-, y frecuentemente CD24- y CD15+. LLA-B t(1;19) es CD10+, CD34-, y CD20- o débil y usualmente mu citoplásmica positivas; este fenotipo se relaciona con alta tasa de recurrencia con protocolos basados en edad y conteo de blancos, pero con intensificación de terapia se ha logrado mejorar el panorama (Chan 2002). LLA-B t(12;21) muestra alta densidad de expresión de CD10 y HLA-DR.

El compromiso ganglionar se manifiesta por completo borramiento de la arquitectura habitual, comprometiendo la cápsula. Se puede observar compromiso parcial en localización paracortical con respeto de centros germinales. En algunos casos la población predominante de blastos tiene núcleo convoluto; se pueden observar abundantes figuras mitóticas. (2)

Un pequeño número de pacientes con LLA-T, eosinofilia e hiperplasia mieloide han sido descritos. En algunos casos se han asociado anormalidades genéticas en células de médula ósea t(8;13)(p11.2;q11.22). Varios de esos casos desarrollaron neoplasias mieloides tanto leucemias mieloides agudas como síndromes mielodisplásicos o sarcoma mieloide, siendo más frecuentes en varones. (2)

Citoquímica: Los linfoblastos T muestran actividad focal de fosfatasa ácida en frotis y extendidos. **(2)**

Inmunofenotipo: Los linfoblastos en LLA-T expresan TdT y niveles variables de CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7 y CD8. De éstos, CD7 y CD3 citoplásmico son más frecuentemente positivas, y sólo CD3 es considerado específico de linaje. CD4 y CD8 son frecuentemente co-expresados en blastos, y CD10 puede ser positivo. Se ha observado expresión en algunos casos de CD79a. Es frecuente encontrar expresión aberrante de antígenos mieloides CD13 y/o CD33, y en raras ocasiones CD117 (c-kit), sin que su presencia excluya el diagnóstico. Los linfoblastos T pueden mostrar rearrreglos del gen del receptor T (TCR), pero esto no es específico de linaje. **(2)**

Hasta en un tercio de las neoplasias se han detectado translocaciones en locus del receptor T delta y alfa en 14q11.2, locus beta en 7q35, y locus gamma en 7p14.15, con una variedad de genes emparentados. Los genes incluyen los factores de transcripción MYC (8q24.1), TAL1 (1p32), RBTN1 (11p15), RBTN2 (11p13) y HOX11 (10q24) y la tirosina quinasa citoplásmica LCK (1p34.3). En la mayoría de casos esas translocaciones conducen a una desregulación de la transcripción de los genes emparentados con la región reguladora del locus del receptor de células T. En cerca del 25% de casos de LLA-T el locus TAL1 es desregulado por una delección en su región 5' más que por translocación. La delección 9p, resultante en la pérdida del gen supresor tumoral CDKN2A (inhibidor de la CDK4), ocurre con más frecuencia en LLA-T. **(2)**

Estratificación de riesgo y establecimiento de pronóstico.

La estratificación de riesgo se basa en características clínicas, inmunológicas y citogenéticas para predecir el desenlace de la enfermedad y brindar una terapia óptima. Para tal fin se han definido tres estratos de riesgo: estándar, medio y alto, denominados por algunos como bajo, estándar y alto, aunque la mayoría de centros sólo emplea los dos últimos, e

incluyen un estrato de muy alto riesgo. En general, los de bajo riesgo tienen mejor desenlace, requieren terapia menos intensiva y tienen menos probabilidad de recurrencia. Anteriormente, se consideraban los criterios clínicos y morfológicos de máxima importancia, pero actualmente han sido complementados por factores genéticos e inmunológicos. **(50,52)**

El grupo BFM popularizó la respuesta a 1 semana de prednisona con metotrexate intratecal como determinante del riesgo asociado a parámetros como edad y conteo de blancos, mientras que el grupo de oncología pediátrica estableció el cariotipo como un indicador básico para establecer el resultado en LLA preB. Los blastos de niños con LLA menores de 1.5 años fueron resistente a prednisona, asparaginasa, y tenopósido, pero más sensible a citarabina. Las LLA CD10- son más resistentes a glucocorticoides, asparaginasa, tiopurinas, antraciclinas e ifosfamida pero más sensible a citarabina comparado a LLA preB. Células de niños mayores de 10 años fueron más resistentes a prednisona, dexametasona, asparaginasa, idarubicina y 6-mercaptopurina. LLA-T con fuerte resistencia a prednisona, asparaginasa, y vincristina excepto tiopurina y tenipósido. El pronóstico favorable de la hiperploidía se relaciona con susceptibilidad mayor a antimetabolitos como metotrexate, 6-mercaptopurina, y asparaginasa. Se sugiere que la terapia se debe individualizar acorde a la resistencia: usar citarabina en niños pequeños, asparaginasa en TEL-AML1. TEL-AML1 es un factor pronóstico favorable relacionado con la terapia intensiva con asparaginasa y la aparición de nuevas líneas tumorales diferentes. Los niños menores de 1 año tienen pésimo pronóstico, relacionado con 11q23 o rearrreglo del gen de leucemia de linaje mixto (MLL), fenotipo preB con DR+ CD10-, con marcador mielóide, tiene sensibilidad por citarabina. Se ha asociado polimorfismo NQO1 con rearrreglo MLL t(4;11). Los rearrreglos MLL se asocian con pobre pronóstico a cualquier edad. En niños mayores de 1 año son de pobre pronóstico t(4;11) y t(9;11) más que 11q23. **(49)**

En los últimos años la terapéutica ha mejorado alcanzando tasas de supervivencia a 5 años sin recurrencia de hasta 70% **(52)**. Sin embargo, pese a los esfuerzos, hasta el 20% de los niños recurren y fallecen, y los sobrevivientes presentan serios problemas de salud por los efectos adversos del tratamiento **(67)**. Varios trabajos se han publicado al respecto encontrando remisión completa en grupos de riesgo del 99% en bajo, intermedio 98-99% y alto 88-97%. Las tasas de supervivencia a 5 años libres de enfermedad se encuentran en 68%, 63% y 62%, respectivamente. **(50)**.

Leucemia Linfoblástica de precursores B son generalmente leucemias de buen pronóstico. En el grupo pediátrico la tasa de remisión completa es del 95%, y en adultos entre 60-85%. La tasa de supervivencia libre de eventos es del 70% en niños; aproximadamente, el 80% de los niños aparentan curación. **(2)**

Los grupos de riesgos pediátricos de LLA-B se basan en perfiles citogenéticos, edad, conteo de leucocitos, sexo y respuesta a la terapia inicial. Hay una alta asociación en niños con traslocaciones que involucran el gen *MLL* en 11q23 con pobre pronóstico independiente de la edad. En edad pediátrica, más del 50% de los pacientes tienen buen pronóstico relacionado con cariotipos de hiperploidías o cambios genéticos t(12;21) con supervivencia a largo plazo del 85-90%.

Las características genéticas son importantes pero resultan heterogéneas si se tienen en cuenta otros factores. Es conocido que el cromosoma Philadelphia es de pobre pronóstico; sin embargo, la mayoría de niños entre 1-9 años, Ph+, son curados con quimioterapia sola. La t(4;11) es de pobre pronóstico en niños menores de 1 año, no así en mayores de esta edad. **(52)**

Factores predictivos para remisión durable y supervivencia prolongada son edad entre 4 y 10 años, hiperploidías (54-62 cromosomas) con trisomías 4, 10 y/o 17, t(12;21)(p13;q22) y

conteo normal o bajo de leucocitos al diagnóstico (2,52). Factores adversos incluyen edad <1 año, t(9;22)(q34;q11.2) y t(4;11)(q21;q23). (2)

Las hipoploidías presentan relación directamente proporcional con el pronóstico: a menor número de cromosomas, menor supervivencia. (Rubnitz 2003)52. Clásicamente se ha considerado como factores pronósticos los que se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 2 Caracterización de Pronóstico de LLA acorde a variables clínicas

	Favorable	Desfavorable
Edad	1-9 años	<1 y >10 años
Conteo de blancos	<50000/ μ L	>50000/ μ L*
Sexo	Femenino	Masculino
Raza	Blanco	Negro, hispano
Enfermedad "sólida"	Ausente	Presente
Leucemia extramedular	Ausente	Presente
Morfología (FAB)	L1	L2, L3
Inmunofenotipo	Precursor B	B y T
Citogenética	t(12;21) Hiperdiploidía (54-68 cromosomas)	Hipodiploidia (<45 cromosomas) Cromosoma Philadelphia 11q23*
Respuesta temprana a tratamiento (7 a 14 días)	Rápido	Lento*

* Modificable por el tratamiento.
Tomado de Chan 2002.

Leucemia Linfoblástica T en protocolos pediátricos de LLA-T, se trata como enfermedad de alto riesgo, y en adultos el manejo es similar a otros tipos de LLA. Previo al advenimiento de los actuales protocolos terapéuticos el pronóstico fue desfavorable, pero con los actuales es comparable con LLA-B. (2)

Se han establecido 4 alteraciones citogenéticas de importancia pronóstica, siendo favorable el gen de fusión MLL-ENL y la expresión de HOX11, mientras que la activación de TAL1 y LYL1 confieren mal pronóstico, así como la expresión de HOX11L2. **(52)**

Establecido el grupo de riesgo al que pertenece el paciente se diseña la terapia. En el grupo de bajo riesgo se emplean antimetabolitos estándar. El tratamiento de intensificación es útil en pacientes con riesgo estándar y alto riesgo empleando medicamentos más fuertes evitando la aparición de resistencias. 51% son pacientes de riesgo estándar que requieren poliquimioterapia de intensificación. Los pacientes de más alto riesgo (9%) pueden ser candidatos a trasplante de células madre luego de la primera remisión. **(50)**

Determinado el riesgo, se establece el tratamiento buscando inducir la remisión, prevenir la infiltración leucémica al sistema nervioso central, y ofrecer terapia de mantenimiento prolongada (30 meses). Estos conceptos han permanecido sin cambios durante más de 30 años, con pequeñas modificaciones que han significado ligeras mejorías en el manejo. Actualmente se ha incrementado el interés en la intensificación de la terapia en el estado posterior a la remisión temprana buscando reducir la tasa de resistencia de las células leucémicas. **(15)** El pronóstico se ve modificado por el tipo de terapia instaurado, siendo mejor el resultado con inducción con L-asparaginasa. Los niños mayores presentan menor respuesta a prednisona y L-asparaginasa, pero responden mejor a citarabina; las células hiperploides T responden mejor al metotrexate a dosis más altas. **(52)**

A pesar de los adelantos logrados en aras a mejorar los índices de riesgo, los indicadores actuales fallan en establecer el riesgo plenamente puesto que un número significativo de pacientes en bajo riesgo pueden llegar a recurrir (10-30%), así como muchos pacientes son sometidos a terapias altamente tóxicas sin ser del todo necesarias. **(4,33,60)**

Por último, se ha asociado que las recurrencias se correlacionan con dosis inadecuadas más que resistencia tumoral, por lo que la individualización de la terapia ha generado mejores resultados. Sin embargo, la resistencia es un problema en ciertos casos. La resistencia de novo puede ser analizada in vitro por ensayo de citotoxicidad con metil-tiozol-tetrazolio, in vivo por el tiempo a la depuración de blastos, y la medición de EMR determina la emergencia de nuevas resistencias. **(49)**

Inducción: Casi la totalidad de niños tratados con glucocorticoides, vincristina y L-asparaginasa con o sin daunorrubicina u otra antraciclina, alcanzan remisión morfológica a las 4 semanas, que se define como la presencia de <5% de blastos en médula ósea (Redaelli 2005)⁵⁰. La determinación de blastos circulantes en sangre periférica o en médula ósea, tiene mejor predicción en las primeras 2 semanas que al final de la inducción. Un estudio de Schrappe mostró que los pacientes con blastos mayores de 1000/mL a la semana de inducción con prednisona solamente presentaron supervivencia libre de enfermedad 43% menos que la de los respondedores tempranos; igualmente, presencia de blastos >25% en médula ósea se relaciona con sobrevida a 5 años de sólo 42%. Estos estudios indicaron la necesidad de modificar las terapias acorde a la respuesta temprana. **(15,52)**

Terapia preventiva del Sistema Nervioso Central: El tratamiento dirigido contra las células neoplásicas presente en SNC inmediatamente después de la remisión ha mejorado la sobrevida. La irradiación preventiva temprana del SNC es efectiva pero produce efectos adversos al neurodesarrollo y secuelas endocrinas. La reducción de la dosis de radiación no redujo los efectos adversos, como si lo logró la quimioterapia intratecal, con igual respuesta terapéutica. También se demostró que la respuesta se relaciona con los niveles de quimioterapia sistémica que alcanza el SNC, situación que se demostró con el uso de

dexametasona en lugar de prednisona, la cual penetra mejor a SNC y tiene vida media más larga logrando mejor protección contra la recurrencia en SNC. La irradiación sólo quedó para casos seleccionados de pacientes con compromiso del SNC al momento del diagnóstico u otros factores de alto riesgo (hiperleucocitosis extrema, cromosoma Ph+, respuesta lenta a terapia inicial); actualmente, la recurrencia de SNC es menor a 5%. La definición de compromiso del SNC se determina con más de 5 células/ μ L de LCR con presencia de blastos. La combinación de terapia sistémica y radiación dejó al compromiso inicial de SNC fuera de los factores adversos de riesgo. **(15,50,52,67)**

Estudios previos han demostrado que dar uno o más cursos de quimioterapia rotacional multiagente que puede incluir metotrexate y 6-mercaptopurina, L-asparaginasa, dexametasona, vincristina, doxorrubicina, tioguanina y ciclofosfamida, y una epipodofilotoxina y citarabina (Redaelli 2005), durante los primeros 6 a 8 meses del diagnóstico reduce significativamente el riesgo de recurrencia. Algunos protocolos la incluyen inmediatamente posterior a la inducción (consolidación), mientras que otros la proponen luego de un período de profilaxis del SNC y terapia de mantenimiento oral (intensificación tardía), sin embargo, no hay evidencia que uno sea superior al otro. Un enfoque adicional con tratamiento intensivo luego de 9 a 10 meses ha sido empleado para pacientes de alto riesgo como adolescentes y respondedores lentos a la terapia inicial. **(15,52)**

Terapia de continuación: Se ha definido que las terapias deben ser mantenidas por más de 24 meses hasta 30 meses. Los esfuerzos por reducir los períodos de terapia han sido infructuosos, así como es inútil la aplicación de terapias por más de 3 años. **(50)** Los medicamentos empleados son los Antimetabolitos a bajas dosis. La terapia efectiva se determina con subrogados como el conteo de neutrófilos entre 750 y 1500/ μ L, debido a que la

biodisponibilidad de los medicamentos orales es errática. El uso de una dosis de vincristina adicional y el de 5 días de esteroides mensuales mejora los resultados, situación que no se produce con 6-mercaptopurina o metotrexate. **(15,52)**

Tratamiento de la recurrencia. Actualmente el número de recurrencias es alrededor del 20%, por lo que sigue siendo un problema en oncología pediátrica. Debido a que los quimioterapéuticos más efectivos son administrados durante el primer tratamiento, estos no pueden ser empleados en la recurrencia. Los predictores de duración de la segunda recurrencia incluyen la duración de la primera remisión, la intensidad de la terapia original y el sitio de recurrencia. La recurrencia en médula ósea es indicativa de falla terapéutica, así como la presencia de enfermedad 18 meses después del diagnóstico, y las que se presentan en los 3 primeros años alcanzan sobrevida a 5 años libre de recurrencias menor al 30%. Las recurrencias medulares y extramedulares combinadas presentan un panorama menos sombrío. Las recurrencias extramedulares (SNC, testículo y ojo) presentes hasta el 30% de los pacientes, poseen un mejor pronóstico, pero algunos pueden ser seguidos de enfermedad sistémica, y el pronóstico empeora si se presenta en los primeros 18 meses. La recurrencia testicular es la de mejor pronóstico con supervivencias de hasta 65% a 5 años. **(15,52)**

Trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas.

El trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas es fundamentado en 3 objetivos básicos que incluyen el reacondicionamiento medular luego de terapia citotóxica intensiva, la provisión de una fuente limpia de células madre no contaminada con blastos leucémicos, y la capacidad de algunas células donantes de generar respuesta injerto contra huésped y eliminar los blastos residuales. **(23)** El trasplante no es recomendado en pacientes durante la primera remisión, excepto en los grupos ya mencionados como muy alto riesgo,

recaída medulares tempranas o medulares tardías con respuesta no favorable. Si la recurrencia se presenta, el pronóstico cambia radicalmente con la utilización de quimioradioterapia a altas dosis seguido de trasplante debido a que reduce la probabilidad de recurrencia. La respuesta es mejor en pacientes que reciben trasplantes de hermanos, pero su utilidad se reduce cuando la recurrencia se presenta luego de 6 meses de discontinuación de la terapia; para estos pacientes, sólo se indica el trasplante si la respuesta a la quimioterapia es muy lenta. Los riesgos del trasplante de médula ósea se relacionan con la toxicidad del régimen terapéutico de preparación y la enfermedad de injerto contra huésped. Otra estrategia es la utilización de células madre hematopoyéticas del paciente durante la remisión con purga de la recolección con agentes quimioterapéuticos o anticuerpos contra antígenos relacionados con leucemia para reducir la contaminación con células tumorales, reduciendo la morbimortalidad. Sin embargo, la evidencia no ha podido demostrar aún la eficacia del procedimiento. **(15,67)**

Complicaciones del tratamiento: Las complicaciones pueden ser agudas o de inicio tardío. El manejo de soporte ha mejorado significativamente la morbimortalidad, incluyendo el uso de concentrados de plaquetas y eritrocitos irradiados, para reducir el riesgo de enfermedad injerto contra huésped, mientras que otras intervenciones como la administración de factor estimulante de colonias de granulocitos no ha demostrado mayor utilidad. **(15)**

Las infecciones son la principal causa de muerte en niños en remisión y se puede presentar durante las fases de inducción e intensificación. La administración temprana de antibióticos es esencial en el manejo de pacientes con neutropenia febril grado IV ($<500/\mu\text{L}$). Durante la fase de consolidación el riesgo de neumonía por *pneumocystis jiroveci* puede ser limitado por el uso profiláctico de trimetoprim-sulfametoxazol durante 3 días secuenciales por semana. La varicela diseminada puede ser evitada con la administración de

inmunoglobulina zóster entre las 72-96 horas después de la exposición, y el uso de aciclovir en caso que se instaure la infección. **(15)**

La aparición de segundas neoplasias en niños sobrevivientes a LLA se ha establecido en 1.6% a 15 años, asociado a predisposición y los fármacos usados para tratar la primera neoplasia. **(67)** Estas neoplasias comprenden dos grupos: segundas leucemias y tumores sólidos, teniendo en general las primeras latencias cortas y las segundas largas. **(27)** Un grupo de pacientes sometidos a irradiación de SNC desarrollarán tumores cerebrales con latencia de 9 años para glioma de alto grado y 19 años para meningioma. Se puede desarrollar LMA secundaria al uso de inhibidores de topoisomerasa II (epipodofilotoxina) o agentes alquilantes, relacionado a la programación de la terapéutica y el uso concomitante de otros fármacos; el pronóstico de estas leucemias es muy pobre y sólo parecen responder a trasplante. **(15,27)** Otras neoplasias de riesgo incrementado en pacientes sobrevivientes a LLA son tumores parotídeos, tiroideos, sarcomas de tejidos blandos, linfomas no Hodgkin y su incidencia se incrementa entre 7 y 14 veces respecto al grupo control en varias series publicadas con más de 15 mil pacientes en total. **(27)**

El desarrollo neurocognitivo es inferior en estos pacientes especialmente en pacientes irradiados antes de los 5 años, existiendo una relación inversa entre dosis de radiación y coeficiente intelectual. Al contrario, no se ha demostrado deterioro en pacientes con altas dosis de metotrexate sistémico e intratecal. Del mismo modo, se ha descrito un síndrome de disfunción pituitaria en pacientes irradiados caracterizado por estatura corta, obesidad y pubertad precoz predominante en mujeres. **(15,67)**

Aunque la mayoría de pacientes no muestran deterioro gonadal, algunos sufren cierto daño relacionado con dosis escaladas de ciclofosfamida.

Citometría de flujo y Enfermedad mínima residual

El uso del citómetro de cuatro colores, los anticuerpos monoclonales, y la comprensión de la expresión de los antígenos en las diversas líneas y estados de maduración normal y anómala ha permitido profundizar el estudio de la médula ósea. Van Lochem y colaboradores desarrollaron un trabajo para definir la maduración de las líneas que tienen lugar en médula ósea; se excluyen células T y NK debido a que estas maduran fuera de la médula. **(30)**

La selección de los paneles se basa en las propiedades de anticuerpos, antígenos y fluorocromos. Varios clones del mismo CD reconocen diferentes epítopes o el mismo epítope con diferente afinidad (CD15 reconoce sialilado y no sialilado) y CD34 (I, II y III reconocen diferentes epítopes con sensibilidad variable por la enzima). El background generado por ligandos específicos del receptor Fc se puede minimizar seleccionando anticuerpos monoclonales específico de subclase de inmunoglobulina. La mayoría de anticuerpos son accesibles con diferentes fluorocromos y su selección depende de la expresión del antígeno.

Los avances en terapéutica dirigida contra riesgo han mejorado las perspectivas de manejo de la enfermedad. Sin embargo, como ya se mencionó, es fundamental identificar el comportamiento de la enfermedad a lo largo del tratamiento y reconocer tempranamente la persistencia de enfermedad residual y modificar eficazmente el protocolo terapéutica buscando prevenir la recurrencia. Datos previos han demostrado que los niveles de EMR por debajo de 10^{-5} no parecen tener utilidad clínica al no predecir recurrencia, pero los niveles superiores si tienen riesgo incrementado con la presencia de recurrencia, correlacionándose niveles de 10^3 con riesgo de recurrencia a 3 años de 56% y 10^{-2} con 78%. **(13)** Las técnicas de citometría de flujo (que enumera las células con antígenos relacionados a leucemia) y de reacción en cadena

de la polimerasa (que determina los rearrreglos genéticos específicos del receptor de células T e inmunoglobulinas) han sido empleadas para este fin, pues logran detectar una célula entre 10^4 - 10^5 células, siendo significativamente inferior a los límites de remisión.

Definición

Actualmente se consideran curables la mayoría de enfermedades hematológicas proliferativas con las estrategias terapéuticas, considerando curación sinónimo de remisión morfológica. Sin embargo, en muchas de ellas persiste cierto número de células neoplásicas a lo que se ha denominado enfermedad residual, y esta condición predispone a la presencia de recurrencias. Muchas veces el nivel de células es indetectable por métodos morfológicos y citoquímicos convencionales, situación conocida como enfermedad mínima residual (EMR). **(38)**. Este marcador se ha constituido en un factor de riesgo independiente. **(24,67)**

La EMR es definida como medición molecular de la leucemia que es capaz de detectar células anormales más allá de la capacidad del estudio morfológico. Se considera que el paciente al momento del diagnóstico puede llegar a tener 10^{12} células malignas. Hablamos de remisión al contar con <5% blastos en el estudio morfológico de médula ósea, lo que equivale a 10^{10} células no detectables o EMR del 1%. Sin embargo, el estudio de EMR puede detectar 1 célula maligna en 10 000 células normales o más, lo que cuantitativamente es 100 veces más sensible que técnicas usuales. **(33,44)**

Como principal objetivo se tiene erradicar las células leucemias residuales, así los pacientes son sometidos a consolidación, mantenimiento, y/o protocolos de trasplante de médula ósea con base en la estratificación de riesgo para reducir el sobre o sub-tratamiento. La determinación del riesgo y de la respuesta al tratamiento requiere de métodos de detección muy sensibles que permitan reconocer la menor cantidad de células persistentes. Este último

punto es también útil para el diagnóstico temprano de pacientes con cáncer hematológico, la evaluación del compromiso de leucemia en órganos específicos (sangre periférica o médula ósea comprometida en linfomas no Hodgkin) y el control de la efectividad de la quimioterapia in-vivo o in-vitro para ser usada después de trasplante autólogo. (38)

Los puntos fundamentales del estudio que lo hacen de alta utilidad son, entre otros: (24)

1. La definición de riesgo por EMR es más preciso que por clínica.
2. Mayor sensibilidad en el establecimiento de grupo de alto riesgo, llegando al punto que la terapia de intensificación se justificaba en estos niños.
3. La depuración rápida de EMR definió una cohorte más grande de bajo riesgo que el definido por los métodos previos.
4. El sistema EMR es muy seguro.

Técnicas de medición.

Cualquiera que sea la metodología para detectar Enfermedad Mínima Residual debe cumplir con algunos criterios mínimos: (28)

1. Capacidad de discriminar entre células normales y malignas; y esto es importante dado que la leucemia se origina de una alteración puntual del desarrollo de las células normales, de ahí su similitud.
2. Sensibilidad mayor que las técnicas morfológicas microscópicas, es decir sensibilidad superior a 1 en 10^3 , pero preferible entre 10^4 - 10^6 .
3. Cuantificación clara y precisa de EMR.
4. Persistencia de los antígenos tumorales en las células; sin embargo, dada la inestabilidad de las células tumorales, muchos de los antígenos presentes al momento del

diagnóstico se pierden durante la evolución de la enfermedad, de ahí que buscar un marcador que se haya perdido puede resultar en falsos negativos.

5. Reproducibilidad de la técnica en el mismo laboratorio y entre laboratorios que permitan la realización de grandes estudios multicéntricos.

6. Rapidez en la ejecución de la técnica que permita entregar resultados rápidos para tomar decisiones terapéuticas oportunas.

7. Costo-efectividad.

Se ha desarrollado un número importante de técnicas útiles en la detección de enfermedad mínima residual, cada una de ellas con ventajas y desventajas, pero todas claramente útiles en la determinación de la clonalidad de las células que generan el proceso morbido, así como la definición del riesgo de recurrencia con base en los hallazgos de la técnica. Las estrategias actuales de determinación de enfermedad mínima residual se basan en el establecimiento de características fenotípicas al diagnóstico que puedan ser útiles para la posterior identificación de éstas en una población mayor de células normales que no pueden ser discriminadas por técnicas morfológicas solas. **(28)**

Con base en las características de la célula explorada, las técnicas de la enfermedad mínima residual son clasificadas en varios grupos entre los que sobresalen:

1. Métodos basados en morfología.
2. Técnicas de cultivos celulares.
3. Aproximaciones citogenéticas basadas en cariotipo convencional, técnicas moleculares, o análisis de cromosomas por citometría de flujo.
4. Análisis de citometría de flujo del contenido total de DNA de la célula.

5. Técnicas de biología molecular.

6. Inmunofenotipo empleando múltiples tinciones analizadas por citometría de flujo y/o microscopía de fluorescencia.

Tabla 3 Metodologías útiles en detección de Enfermedad Mínima Residual.

	Especificidad	Sensibilidad	Simpleza	Reproducibilidad	Velocidad
Morfología	Intermedia	Baja	Alta	Baja	Baja
Cultivo celular	Alta	Baja	Baja	¿?	Baja
<i>Estudios citogenéticos</i>					
Cariotipo convencional	Alta	Baja	Baja	Intermedia	Baja
Cariotipo por flujo	¿?	¿?	Baja	¿?	Baja
FISH	Alta	Baja	Intermedia	Alta	Baja
Contenido de DNA por CF *	Alta	Alta**	Alta	Alta	Alta
Inmunofenotipo	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta
<i>Técnicas moleculares</i>					
Southern/Northern	Alta	Baja	Baja	Alta	Baja
PCR	Alta	Alta	Alta	Alta	Baja

PCR, Reacción en cadena de polimerasa; FISH, Hibridación In Situ Fluorescente; CF, Citometría de flujo.

Tomado de Orfao 2000.

De la tabla anterior se deduce que el uso de PCR para la detección de secuencias específicas de DNA que corresponden a los genes de receptores B ó T y regiones de fusión de translocaciones cromosómicas y la identificación de fenotipos asociados a leucemia basados en el uso combinado de múltiples tinciones y citometría de flujo han emergido como las más atractivas. (38)

Otros autores consideran valores de utilidad diferentes para las técnicas. Moppett compara la citometría de flujo de 3 y 4 colores, con el estudio con sondas específicas de alelos y el rastreo fluorescente de genes asignándole un logaritmo mayor a la capacidad de detección a la técnica PCR frente al inmunofenotipo con 4 colores y 2 logaritmos con el de 3 colores, y le confiere un índice de aplicabilidad mayor al 98% a la técnica molecular mientras que a la

técnica inmunológica sólo le da índice mayor al 90%; aunque en precio las técnicas inmunológicas no alcanza a ser la mitad del valor del estudio molecular. (Moppett 2003)³⁵ Sin embargo, cada una de las técnicas tiene sus promotores y contradictores.

La Citometría de Flujo detecta perfiles inmunofenotípicos anormales usando marcadores que no son usuales en los linajes de médula ósea y sangre y pueden detectar células anormales 1 en 10 000. Este nivel de sensibilidad se obtiene en el 90% de las LLA. Por su lado, PCR detecta EMR con amplificación del receptor de antígenos o de la fusión detranscritos. El análisis se debe realizar con la muestra al momento del diagnóstico y establecer las mutaciones del receptor o las modificaciones de las cadenas IgH y con base en dichas alteraciones hacer los análisis en las muestras de seguimiento, buscando la misma alteración. Sólo el 40% de LLA tiene rearrreglos conocidos. Hay correlación entre las dos técnicas y son de utilidad marcada en combinación detectando la casi totalidad de los casos. **(5,33)** Otra ventaja aparente de la citometría de flujo sobre las técnicas moleculares, es que la primera puede determinar la viabilidad de las células, eliminando células muertas o detritus de ácidos nucleicos que pueden dar positivos con las segundas. Sin embargo, esta característica se pierde si las células sufren artefactos por la conservación y el transporte y se pueden eliminar células que son viables in-vivo y no así in-vitro. Además, el análisis PCR usualmente es dicotómico mientras que el análisis con citometría de flujo requiere mayor elaboración y experiencia del analista. **(7)**

Periodicidad de la medición: Demostrada la utilidad del estudio de enfermedad residual en el seguimiento de pacientes con leucemia linfoblástica, resta por determinar los puntos clave en los cuales resulta más útil hacer las mediciones.

Campana nos ofrece una primera aproximación de la utilidad del estudio de Enfermedad Mínima Residual en el manejo de la leucemia aguda.

Algunas observaciones han establecido que los análisis de sangre periférica en la primer semana y de médula entre la 3-5 semana de tratamiento son indicadores fieles de pronóstico. Cualquier blasto en la tercera semana en Medula Ósea es de mal pronóstico. La mayoría de los autores concuerdan en afirmar que el punto de corte para considerar una muestra de médula ósea positiva para enfermedad mínima residual es de 1 célula en 10 000 ó 100 000. Sin embargo, persiste aún controversia sobre el momento preciso de mayor costo-efectividad en la predicción de la EMR.

Van Wering hizo su estudio para determinar EMR en pacientes con LLA, realizando medición de la presencia de blastos en médula ósea para las semanas 5, 14, 24, 34, 46, 59, 72, 84, 94, 102, 116, 130, 143, 157, 168, 181, 195 y 207, con lo que logró observar disminución de células CD34/TdT frente al incremento de células CD10/CD19, definiendo las primeras como blastos leucémicos residuales y los últimos como hematogonias de médula en regeneración. (67)

Kwan realizó su estudio midiendo la presencia de EMR el día 35 del tratamiento, al final de la inducción, logrando establecer en un pequeño número de pacientes la presencia de blastos leucémicos y su cuantificación por técnicas de PCR en tiempo real. Sin embargo, su estudio careció de análisis pronóstico pues no se hizo seguimiento de dichos pacientes. (29)

Pui correlacionó la detección de niveles de EMR $<10^{-4}$ en la semana 7 postremisión con mejor pronóstico que la detección de EMR en niveles más altos. Además, más de la mitad de los pacientes no tuvieron niveles detectables de EMR en la segunda semana de inducción, y

fue detectada en el 25% de los pacientes (semana 6) y en 13% durante la semana 14 del tratamiento de continuación y sólo el 4% en la semana 32.

Goulden plantea en su trabajo que es de alta utilidad el análisis de muestras de médula ósea de pacientes en tratamiento para definir enfermedad residual precisando como puntos de corte a los 7 días del inicio de la terapia, al mes y a los 3 meses, o en cualquier momento durante los primeros 6 meses garantizando 2 mediciones.

Campana en un estudio previo demostró presencia de células tumorales residuales al final de la inducción (6 semanas) en 23%, número que iba cayendo con el paso de las semanas alcanzando 17% en la 14, 5% en la 32, 4% en la 52, y ninguna al final de la terapia en la semana 120. A su vez, la detección de enfermedad mínima residual se correlacionó con desarrollo de recurrencia en el 32.5% contra 7.5% en el grupo negativo al final de la inducción, y en la semana 14 de 42.2% Vs. 6.6%. (7)

Estudios subsecuentes de Campana mostraron que encontrar Enfermedad Mínima Residual en el día 19 de la terapia de inducción, al final de la misma, y en las semanas 14, 32 y 56, se correlacionaba con tasas más altas de recurrencia, teniendo pobre pronóstico los niveles de EMR $\geq 1\%$ al final de la inducción y $\geq 0.1\%$ en la semana 14. (Campana 2004)⁷ Igualmente, logró concluir que los pacientes con negativización de EMR en la semana 14 tenían igual riesgo de recurrencia que los que nunca tuvieron EMR después de completar la terapia de inducción, mientras que los que persistían con EMR durante la terapia de continuación incrementaba el riesgo de recurrencia a medida que pasaba del tiempo; de ahí, que considere que los pacientes con EMR al final de la inducción se benefician de la medición periódica de EMR. (7)

Tzortzatou publicó en 2001 un informe del resultado de su investigación donde plantea de alta utilidad realizar la medición de EMR en el día 22 y cada 2 meses luego de la remisión usando técnicas de PCR para detectar rearrreglos de IgH alcanzando niveles de detección de hasta 10^4 . **(60)**

Moppett presenta en su revisión la utilidad del análisis del día 29 (final de la inducción), momento en el cual detectar EMR $>0,01\%$ significaba riesgo de recurrencia en 7 años del 52%. El estudio en la semana 14 mostraba que niveles de EMR $>0,01\%$ implicaba riesgo de recurrencia en 3 años de 42,1% frente al 6,6% de los pacientes sin EMR, en un primer reporte, y en un segundo reporte los valores se incrementaron a 68% de recurrencia en grupo EMR positivo, y en 10% en el grupo negativo. También anota que detectar niveles absolutos de >10 blastos/ μl en el día 33 y >1 blasto/ μl en la semana 12 se asoció con recurrencia del 100% comparado con el 6% en pacientes con estudio negativo. En relación con el trasplante de células madre señala que la detección de EMR $>10^{-3}$ se correlaciona con recurrencia general, mientras que EMR entre 10^{-3} - 10^{-5} se relaciona con recurrencia de 27%. Igualmente, anota que gran parte de las controversias surgidas entre los autores radican en las diferencias propias de las técnicas y el momento de la realización del estudio; cuando el estudio es realizado al final de la inducción, diferencias sutiles en la sensibilidad de la prueba (v.g. 10^{-4} Vs. $10^{-4.3}$) pueden significar diferencias porcentuales de detección de pacientes del 40 al 60%. **(35)**

Sandlund estudió la utilidad del análisis de EMR en médula ósea en los días 15 y 22-25 de la terapia. Encontró que la persistencia de $>1\%$ de linfoblastos en el día 15 tenían menos remisión completa al día 43 (89%) que los pacientes sin esa condición (99%), y que la presencia del mismo nivel de linfoblastos entre los días 22-25, la remisión completa era del

59%. La supervivencia sin eventos a 5 años en pacientes con y sin $EMR > 1\%$ al día 15 fue de 40% y 78%, respectivamente, y en los días 22-25 fue de 4% y 76%, respectivamente. En conclusión, el riesgo de recurrencia se consideró entre 3 y 10 veces superior en presencia de EMR a los días 15 y 22-25, respectivamente. **(54)**

Seeger trató de identificar la utilidad del estudio de EMR por técnicas moleculares en pacientes de alto riesgo quienes presentan el producto de fusión génica TEL-AML1. Estudió para tal fin muestras de médula ósea al momento del diagnóstico, durante la inducción (días 15 y 33) y antes de la reintensificación (día 148). El estudio se negativizó en el 35% de los pacientes el día 15, en el 78% después de la inducción (día 33); sólo el 6% de los pacientes siguieron siendo positivos luego de la consolidación. Los pacientes que fueron negativos siguieron siendo negativos por el resto del seguimiento. El papel pronóstico del estudio de EMR en pacientes de alto riesgo no es tan fundamental como en pacientes de riesgo bajo, puesto que en los primeros los otros factores que les imprimen alto riesgo son más ominosos que la misma detección de EMR. **(59)**

Pui y Campana han tratado de establecer el concepto de remisión a partir de EMR, sin embargo, es difícil debido a que no a todos los niños se les realiza el estudio durante la terapia y que falta por establecer un nivel estándar de EMR. Antes se había descrito que niños con $> 1\%$ al final de la inducción ó $> 0,1\%$ posteriormente, tenían altísimo riesgo de recurrencia. Otro estudio encontró que $EMR > 0,01\%$ al día 19, al final de la inducción, y a las semanas 14, 32 y 56 tenían alto riesgo de recurrencia, así como niveles $> 1\%$ postinducción ó $> 0,1\%$ a la semana 14 como de pobre resultado. Además, se demostró que en las primeras 2 semanas el 50% de los estudios son EMR negativos, así como el 75% al final de la inducción; de igual modo, los resultados para las semanas 14 y 32 donde seguían positivos 13 y 4%,

respectivamente. Todos los EMR a la semana 32 recurrieron. Se podría intuir que niveles de EMR $<10^{-4}$ al completar la inducción son favorables, mientras que EMR $>10^{-2}$ tienen alto riesgo de recurrir. **(33)**

La detección de Enfermedad Mínima Residual es también de importancia en la monitorización del trasplante autólogo. Goulden estudió la utilidad del análisis a los 1, 3, 6, 12, 18 y 24 meses luego del trasplante, pero encontró limitaciones pues la enfermedad fue detectada en el nivel más bajo. En caso de recurrencia, también se analizó la utilidad del estudio en los primeros 2 meses donde se encontró que todas las recurrencias habían sido precedidos por al menos un estudio de EMR positivo. **(23)**

PAPEL DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO EN EL ESTUDIO DE ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL

La citometría de flujo es una herramienta útil para el estudio de Enfermedad Mínima Residual pues permite identificar las células neoplásicas entre poblaciones grandes de médulas óseas en regeneración o postrasplante. En condiciones óptimas, los niveles de detección son similares a las técnicas moleculares, sin embargo, en términos reales dichos niveles no son alcanzables puesto que los volúmenes de células obtenidos por punción de médula ósea son del orden de 10^6 , y se requieren entre 10 y 20 eventos para que la técnica de citometría tenga capacidad de diferenciar los grupos de eventos adecuadamente, por lo que la sensibilidad alcanzable es del orden cercano a 10^5 en los mejores escenarios. Sin embargo, debido a los cambios sufridos por la población celular por el efecto de la terapéutica, los niveles de EMR detectables por citometría de flujo se consideran ligeramente superiores a 10^4 . **(7)**

Las ventajas principales del uso del inmunofenotipo para la detección de enfermedad mínima residual se resumen en: **(28)**

1. Adecuada sensibilidad de la técnica (detección de 1 célula en 10^4).
2. El análisis se realiza con equipos que ya están siendo usados rutinariamente para tipificar leucemias.
3. Capacidad de distinción entre células muertas y vivas.
4. Método rápido y relativamente barato.

Algunas de las desventajas anotadas a la técnica incluyen: **(28)**

1. El análisis es complejo y depende de la experticia del operador.
2. Es difícil distinguir entre precursores de médula ósea en regeneración de blastos leucémicos pre-B (el tipo más común de leucemia).
3. El análisis debe ser realizado sobre muestras frescas por lo que se requiere cercanía entre el centro de tratamiento y el centro de estudio de las muestras.
4. Inestabilidad en la expresión de antígenos en células leucémicas (cambio de linaje, pérdida de antígenos) durante o posterior al tratamiento.

Sin embargo, ya existen algunas luces para resolver algunas de dichas desventajas. Para el ítem 2, van Wering en su estudio presenta los resultados del análisis de múltiples muestras que detectadas por inmunofenotipo y comparadas con los resultados de estudios moleculares logra identificar las células tumorales residuales por su expresión aumentada de CD34 y TdT, frente a la expresión baja de estos antígenos en precursores normales, los cuales son predominantemente CD10 y CD19. **(63)**

Descripción de la técnica: La citometría de flujo es una técnica descrita hace más de 30 años que permite realizar una evaluación cuantitativa de las propiedades celulares basada en sus propiedades de dispersión de la luz y características fenotípicas que pueden ser determinadas usando marcadores fluorescentes. Inicialmente, la técnica fue desarrollada con

finés de investigación y los primeros instrumentos eran muy grandes, costosos y requerían alta especialización por parte de sus operarios.

Diez años después, hacia el inicio de la década del 80, se introdujo en el laboratorio clínico la técnica gracias al desarrollo de anticuerpos monoclonales más baratos, instrumentos más pequeños, asequibles y operables.

La técnica se basa en la determinación del inmunofenotipo celular por medio del uso de anticuerpos conjugados con fluorocromos específicos para proteínas expresadas por las células. Para comprender mejor la técnica es útil recordar los conceptos de antígeno, anticuerpo y su interacción.

Anticuerpos. Los anticuerpos pertenecen a la clase de proteínas globulares conocidas como inmunoglobulinas (Ig). Su estructura básica se compone por dos cadenas pesadas (55kD) atadas entre sí por puentes disulfuro; a su vez, cada una de estas cadenas está atada a una cadena ligera (25kD) por medio de puentes disulfuro. En el humano se han identificado 5 isotipos de Ig (G, M, A, D, E) acorde a su respectiva cadena pesada (gamma, mu, alpha, delta y épsilon), y pueden ser individualizadas por análisis electroforético. A su vez, se han identificado 4 subclases de IgG, dos de IgA, y de las restantes uno, que tiene importancia en investigación, y recientemente su interés se ha incrementado en el estudio de desórdenes de la respuesta inmune. Las cadenas livianas, denominadas kappa y lambda, nunca se presentan simultáneamente en la misma inmunoglobulina, pero sí tienen normalmente expresión policlonal, es decir, se identifican las dos en moléculas distintas del mismo isotipo de Ig. (59)

Antígenos: Los anticuerpos en los mamíferos se forman cuando una sustancia que entra al organismo y cumple con poseer una estructura química reconocida como extraña al sistema inmune, que dicha estructura sea compleja o diversa y mayor a 100kD. Estas

sustancias son conocidas como inmunógenos. Las estructuras químicas contra las cuales se generan los anticuerpos son los antígenos; todos los inmunógenos son antígenos, pero no todos los antígenos son inmunógenos. **(59)**

Las pequeñas áreas o estructuras de bajo peso molecular contra las cuales se dirigen los anticuerpos se denominan epítopes, que en sí mismos son incapaces de desencadenar la producción de anticuerpos, pero cuando forma parte de grandes moléculas con múltiples epítopes, si se establece la respuesta inmune. Existen otras moléculas menos complejas con suficiente tamaño y heterogeneidad estructural que pueden desencadenar reacciones inmunes que se denominan haptenos. **(59)**

Reacción antígeno-anticuerpo: Al inmunizar a un animal con un inmunógeno se producen anticuerpos para cada epítipo específicos de clones de células B que maduran en células plasmáticas con diversa afinidad y capacidad de producción de múltiples isotipos de Ig y cadenas ligeras variadas, con lo que se establece una respuesta policlonal. Cada uno de los clones celulares en expansión responde a un solo isotipo de Ig y una sola cadena ligera (respuesta monoclonal), y la suma de todas ellas constituye la respuesta policlonal. Estas células plasmáticas se pueden fusionar con células de mieloma murino generando híbridos inmortales monoclonales (hibridoma). **(59)**

Dada la heterogeneidad interespecie e intraespecie de las proteínas, los epítopes son diferentes y pueden desencadenar respuesta inmune. **(59)**

Se ha establecido y normalizado un sistema de denominación de los principales antígenos y anticuerpos de importancia médica que se conoce como CD (cluster of differentiation) ó grupo de diferenciación. Cada grupo es identificado por un número que describe el anticuerpo dirigido a un antígeno celular, y no a un epítipo en el antígeno. Por

ejemplo, CD11a se refiere a todos los anticuerpos que ligan a cualquiera de los epítopes en la cadena alfa de LFA1. El antígeno es explícitamente nombrado, y el anticuerpo contra esa proteína es dado el número CD. La nomenclatura describe el antígeno más que el epítope, puesto que cada investigador produce su propio anticuerpo contra diferentes epítopes del mismo antígeno. **(59)**

Inmunofenotipificación: Para el estudio de inmunofenotipo existen marcadores buenos y malos, y la dificultad radica en escoger los buenos, y saber cómo interpretar los resultados de los malos cuando no hay otros disponibles. Los buenos anticuerpos se caracterizan por tener altas especificidad y afinidad de ligado por sus epítopes. En general, los anticuerpos monoclonales poseen menor afinidad que los policlonales por su proceso de selección en producción masiva. Para la producción de anticuerpos policlonales de alta especificidad se requiere del uso de animales con largos períodos de inmunización y reinmunizados para lograr la mayor afinidad. **(59)**

Las células hematopoyéticas exhiben un repertorio único de receptores Fc, que permite su diferenciación. Al combinar estas características con la capacidad de dispersión de luz (side scatter), se logran diferenciar todos los elementos de la sangre. La siguiente tabla muestra una aproximación a este enfoque.

Los anticuerpos monoclonales son seleccionados por su reacción con el antígeno (receptor) y no se analiza la capacidad de unión inespecífica a las proteínas de la superficie celular y del ambiente intracelular. Muchos anticuerpos resultan “malos” para inmunofenotipificación por esta razón. Sin embargo, los fabricantes han incrementado su interés por establecer la unión inespecífica y mejorar la afinidad de los anticuerpos. **(59)**

El desarrollo de mejores fluorocromos, equipos de medición y software analítico, y en general, con una mayor comprensión del papel del inmunofenotipo en la maduración hematológica, se ha popularizado el uso de esta técnica en estudios variados para distinguir condiciones neoplásicas de condiciones benignas, diagnóstico y clasificación de linfomas y leucemias, evaluación de otros desórdenes neoplásicos y pre-neoplásicos tales como las discrasias de células plasmáticas y síndromes mielodisplásicos y detección de enfermedad mínima residual en pacientes con leucemias aguda y crónica. **(30)**

La metodología usual de análisis de poblaciones por citometría de flujo busca establecer el porcentaje de células positivas que expresan de determinado antígeno. Para tal fin, se seleccionan las células por dispersión de luz y se analizan los patrones de fluorescencia por histogramas de uno o múltiples parámetros (fluorocromos); en el histograma se ubica el cursor para seleccionar las células que presenten positividad superior al límite del control, establecido por medición de fluorescencia de un fluorocromo irrelevante, y se reportan los resultados como positividad de células para cada fluorocromo. Este análisis numérico puede ser empleado como índice para definir razones poblacionales (v.g. CD4/CD8). **(59)**

A pesar de la utilidad del análisis numérico de positividad de antígenos, en ciertas ocasiones es difícil determinar el punto de corte en la mayoría de células puesto que todas tienen diferentes niveles de expresión de antígenos, y resulta más útil determinar sólo la presencia del antígeno, sin expresarlo numéricamente, puesto que esa cuantificación puede resultar ambigua. Por tanto, la definición multiparamétrica (varios fluorocromos) de una población y su cuantificación es más útil que generar porcentajes de cada antígeno. **(30)**

Otras aplicaciones de la citometría de flujo diferente a su utilidad diagnóstica, es la utilidad pronóstica en detección de enfermedad mínima residual. Ya se determinó su

capacidad de establecer ploidía por medición de DNA en fase S en LLA, siendo este índice de alto valor pronóstico. Así mismo, de la mano con las técnicas moleculares con PCR, constituyen dos estrategias no excluyentes que permiten lograr niveles de detección de hasta 1 célula anormal en 10⁴-10⁵ células normales. **(30)**

Sensibilidad del inmunofenotipo por citometría para la detección de Enfermedad Mínima Residual: Ya se reconoce la utilidad en investigación de la citometría de flujo para la detección de EMR, pero se requiere definir su utilidad clínica donde los niveles de células anormales son inferiores al orden de 10⁻³, entre poblaciones de células normales. Ya la citometría había demostrado su utilidad en detectar poblaciones minoritarias en estudios de precursores CD34 pre-trasplante en médula ósea y sangre periférica, así como detectando células minoritarias como mastocitos y células dendríticas. Los resultados de discriminación en detección de EMR han sido obtenidos de estudios dilucionales, donde se demostró sensibilidades de detección de niveles hasta 10⁻⁶ células. Sin embargo, se estableció que los niveles de detección dependen de las aberrancias y los fluorocromos empleados en el estudio, y se determinó un rango de detección entre 10⁻³ y 10⁻⁶. **(38)**

Valor clínico del inmunofenotipo en la investigación de Enfermedad Mínima Residual: A la fecha se han realizado variados estudios para determinar el valor clínico de la determinación de Enfermedad Mínima Residual principalmente para LLA y LMA. Los estudios iniciales usando microscopía de fluorescencia con dos marcaciones fueron útiles para demostrar la presencia del incremento en la expresión de fenotipos aberrantes como predictores de recurrencia, y que su ausencia indicaban la persistencia en remisión morfológica. Los estudios con citometría de flujo han sido útiles para demostrar las mismas características.

Objetivo General

- Conocer la validez de la prueba de enfermedad mínima residual en la predicción de recaída de LAL, en el Enero de 2009 al 3 de abril del 2013.

Objetivos Específicos

- 1. Determinar el valor predictivo positivo y negativo para recaída de leucemia linfoblástica aguda en pacientes con EMR al final de la inducción.
- 2. Evaluar características clínicas y biológicas de los pacientes en recaída.
- 3. Clasificar recaídas por sitio y tiempo de los pacientes con LLA.
- 4.-Identificar sitios de recaída y factores asociados relacionándose con los resultados de EMR de cada paciente.
- 5.-Realizar un análisis descriptivo básico y bivariado de los resultados, además de asociación de los factores clínicos y la enfermedad mínima residual.

Hipótesis

- LA PRUEBA de EMR POR CITOMETRÍA DE FLUJO no tiene validez y concordancia en la predicción de la recaída.

Justificación

La citometría de flujo es un excelente método inmunofenotípico para detectar EMR, además permite establecer otros parámetros como tamaño, granularidad e intensidad de expresión, esta técnica aplicada al tratamiento y evolución es una herramienta importante, se tiene poca experiencia en su aplicación clínica. (Orfao 2000)³⁸

Sin embargo, a pesar de la difusión e importancia de esta técnica en nuestro medio, se carece por la ausencia de estudios propios que permitan definir si los criterios de riesgo ya establecidos en otras instituciones son igualmente válidos para nuestros pacientes

Se han realizado variados estudios para determinar el valor clínico de la determinación de Enfermedad Mínima Residual principalmente para LLA y LMA, usando el inmunofenotipo para establecer la predicción de recurrencia. Los estudios iniciales usando microscopía de fluorescencia con dos marcaciones fueron útiles para demostrar la presencia del incremento en la expresión de fenotipos aberrantes como predictores de recurrencia, y que su ausencia indicaban la persistencia en remisión morfológica. Los estudios con citometría de flujo han sido útiles para demostrar las mismas características, inicialmente los niveles de 0.2% se correlacionaron con recurrencia en LMA, y se demostró también su utilidad en LLA tanto en niños como en adultos (Campana, 1999)³. Igualmente, se ha correlacionado la probabilidad de recurrencia con los niveles de células con fenotipo aberrante a determinados puntos de la terapia de la enfermedad como el final de la inducción, mantenimiento y al salir del tratamiento. En ese sentido, algunos estudios han demostrado una mayor incidencia de recurrencia con niveles mayores a 0,1% de células anormales al final de la inducción y mayor de 0,2% después de la intensificación; la persistencia de niveles de enfermedad mínima

residual se considera factor pronóstico independiente para período libre de enfermedad y recurrencia (Campana, 2001)3.

Los estudios realizados a finales de los noventa, permitieron establecer que niveles de células neoplásicas residuales mayores de 0,1% eran predictoras de recurrencia. Si bien, la técnica es útil para seguimiento requiere de personal altamente entrenado en la determinación de los fenotipos aberrantes, uso de amplios paneles de anticuerpos monoclonales, además de contar con una muestra al momento del diagnóstico.

Debido a todo esto es imprescindible hacer una evaluación de esta técnica en nuestro hospital, nos señala la posibilidad de generar hallazgos importantes e imprescindibles para individualizar el tratamiento de los pacientes para intentar mejorar su pronóstico. Considero que este trabajo puede ser un punto de partida para futuras investigaciones, en próximos tiempos con el fin de tratar de avanzar en la tecnología y en el tratamiento de los niños sonorenses atendidos en este hospital, y por qué no contar en la institución con un aparato que facilite y mejore los costos del tratamiento.

METODOLOGÍA

Se realizó estudio observacional descriptivo tipo transversal, del 1° de Enero de 2009 al 30 de abril de 2012. En pacientes de 0 a 18 años diagnosticados y tratados en el Hospital Infantil del Estado de Sonora con diagnóstico de leucemia aguda linfoblástica mediante aspirado de médula ósea (AMO).

A los pacientes se les realiza aspirado de médula ósea al diagnóstico y toma de inmunofenotipo, cariotipo e índice de DNA, considerando positivo para el diagnóstico más del 25% de blastos en médula ósea, posteriormente con el inmunofenotipo inicial obtenido se envía enfermedad mínima residual al finalizar inducción a la remisión.

La toma de la muestra, su adecuada manipulación, transporte y disposición, generan las condiciones necesarias para garantizar obtener resultados óptimos en los análisis. Se hace indispensable que los responsables de los laboratorios de citometría de flujo generen protocolos de manejos de muestra que sean distribuidos a los sitios donde se originan las muestras.

Se tomó aspirado de Médula ósea a la semana 5 posterior al inicio de la terapia de inducción a la remisión, así como muestra para envío de enfermedad mínima residual, Se consideró EMR negativa cuando se detectó una cantidad menor a 0.01% de células mononucleares con técnica de citometría de flujo, fue considerada como EMR positiva si se detectó una cantidad mayor a 0.01% de células mononucleares en aspirado de médula ósea.

Análisis de Datos fue mediante el programa NCSS 2007, la captura de datos fue mediante hojas de Excel, el procesamiento y los resultados obtenidos se realizó mediante la prueba de Mantel y Hanzel.

ANALISIS ESTADISTICO.

Sensibilidad: Porcentaje de pacientes con LLA en recaída que tienen EMR positiva.

Especificidad: Porcentaje de pacientes con LLA sin recaída que tienen EMR negativo.

Valor predictivo positivo: La probabilidad que un paciente con LLA presente recaída dado que su EMR sea positiva.

Valor predictivo negativo: La probabilidad que un paciente con LLA no presente recaída dado que su EMR sea negativa.

Falsos positivos: Porcentaje de los pacientes con LLA con recaída que tienen una EMR positiva dividida entre el total de los pacientes.

Falsos negativos: Porcentaje de pacientes con LLA en recaída con EMR negativa, dividida entre el total de los pacientes.

Precisión: porcentaje de pacientes correctamente clasificadas como pacientes con LLA en recaídas o sin recaída.

MÉTODOS DIAGNÓSTICOS Y DEFINICION DE CONCEPTOS.

Se dispone del equipo necesario para toma de muestras. Para estudios de médula ósea se requiere de trocar óseo con diámetro interno promedio de 1-2 mm y se selecciona el área de la punción. El sitio más común es la espina iliaca posterosuperior, pero puede usarse la espinas iliacas anteriores, u otra área que se considere adecuada por la persona que realiza el procedimiento. Posteriormente se clasifica morfológicamente las células y si presenta más del 25% se considera leucemia linfoblástica aguda.

Recaída a médula ósea: Presencia de más del 25% de blastos en médula ósea posterior a una remisión, durante el tratamiento o al finalizar el mismo.

Recaída a Sistema nervioso central: más de 5 células con blastos en LCR SNC-3, sin punción traumática. Parálisis de nervios craneanos no relacionada con otra etiología diferente a la LLA aún con evidencia de un LCR sin blastos o evidencia en las imágenes (TAC o RM) de una lesión no circunscrita ocupando espacio.

Recaída a testículo u a otro sitio extramedular: infiltración de células leucémicas en testículo, piel, hueso, orbita, mediastino o glándulas documentadas por patología.

Recaída aislada: Presencia de blastos o infiltración leucémica en un solo sitio.

Recaída mixta: más de dos sitios con presencia de blastos o infiltración leucémica, en un mismo periodo de tiempo. O la presencia de >5% de blastos en médula ósea más otro sitio extramedular.

Sensibilidad enfermedad mínima residual: probabilidad de que un paciente con enfermedad mínima residual positiva, tenga recaída.

Especificidad de la enfermedad mínima residual: la probabilidad de que un paciente con enfermedad mínima residual negativa no tenga recaída.

Enfermedad mínima residual positiva: Leucemia residual detectada por estudio inmunológico medida por citometría de flujo, al final de la inducción mayor al 0.01% de células detectadas como blastos.

Muestra

Niños con Leucemia Linfoblástica Aguda atendidos en el Hospital Infantil del Estado de Sonora entre el periodo de tiempo 2009 a abril 2013 con inmunofenotipo por citometría de flujo y enfermedad mínima residual realizada al final de la inducción.

Criterios de Inclusión

- Pacientes de 0 a 18 años de edad que fueron atendidos en el (HIES) con diagnóstico de LLA mediante aspirado de médula ósea (AMO).
- Tener por lo menos 12 meses de tratamiento.
- Contar con estudio de inmunofenotipo, genético y enfermedad mínima residual.
- Tener recaída documentada por AMO, LCR o biopsia de afección extramedular.

Criterios de exclusión.

- Haber recibido tratamiento previo en otra institución.
- No tener inmunofenotipo, cariotipo y enfermedad mínima residual.
- Aquellos que no hayan completado un año de tratamiento.
- Pacientes fallecieron durante el tratamiento y no se documentó recaída.

Criterios de eliminación.

- Pacientes en abandono de tratamiento y expedientes incompletos.

Tabla 4 Definición de Variables.

Variable	Concepto	Medición	Escala	Fuente
Dependiente				
Recaída	Presencia de más del 25% de blastos en médula ósea posterior a una remisión, durante el tratamiento o al finalizar el mismo, Así como su presencia en LCR, testículo u otro órgano.	Porcentaje de células morfología de blastos en médula ósea. Cuantificación de más de 5 células en líquido cefalorraquídeo y presencia de blastos, o infiltración de células neoplásicas a un órgano documentado por patología.	Dicotómica: Recaída. Sin recaída.	Expediente Clínico.
Independiente				
Enfermedad mínima residual	Medición por citometría de flujo del conteo mínimo de 100000 células monoclonales	Porcentaje de blastos en la médula ósea a la semana 5 del tratamiento. Medida por citometría de flujo.	Dicotómica: Positiva. Negativa	Archivos, cuestionario
Edad	Medición del tiempo de vida de un sujeto desde su nacimiento hasta el momento de inclusión del estudio	Años cumplidos de vida	continua	cuestionario
Cuenta de leucocitos al diagnóstico	Número de glóbulos blancos en la primera biometría hemática al diagnóstico	Cantidad de leucocitos medidos en sangre periférica por mm ³ en niños de LLA de RI	Continua 0= \leq 10.000 1= 11.000 – 25.000 2= 26.000 – 49.000	Reporte de laboratorio clínico
Fenotipo LLA	Tipo de linaje T ó B en proliferación	Detección de anticuerpos monoclonales de superficie T ó B por citometría de flujo	Cualitativa nominal dicotómica 0= desconoce 1= B 2= T	Reporte de laboratorio
Índice BFM (volumen tumoral)	Cantidad de células leucémicas calculada en 1×10^{12} que reduce el riesgo de los pacientes	$FR=0.2 \times \log(\text{número de blastos en sangre} / \mu\text{l} + 1) + 0.06 \times \text{tamaño del hígado} + 0.04 \times \text{tamaño del bazo}$	Continua y agrupa a los individuos Bajo riesgo= <0.8 Riesgo intermedio= $0.8 - 1.69$ Alto riesgo> >1.7	Reporte de laboratorio y la historia clínica. archivos
Sitio de recaída	Órgano con presencia de blastos, después de documentarse Remisión	Documentar la presencia de blastos en médula ósea mayor al 25%, o presencia de blastos en SNC con mas de 5 células, biopsia de cualquier órgano afectado con blastos.	Cualitativa nominal 0-Sin recaída 1-Recaída aislada a médula ósea. 2-Recaída aislada a SNC. 3-Recaída aislada a testículo. 4-Recaída Mixta. 5-Otros sitios..	Archivo clínico
Tiempo de recaída	Medición en meses posteriores a la remisión que se documenta recaída.	Recaída muy temprana-menos de 18 meses de documentarse remisión. Recaída temprana- 18 a 36 meses de remisión. Recaída tardía- Mas de 36 meses después de la remisión.	Cualitativa nominal 1.-Recaída muy temprana 2.-Recaída temprana. 3.-Recaída Tardía.	Archivo clínico

RESULTADOS

Se analizan 54 pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión donde se observó sus características bioquímicas y clínicas, resumidas en la tabla 5.

Tabla 5. Características Clínicas de los Sujetos Evaluados por EMR.HIES 2013			
	Positiva. N (%)	p^{1/}	Negativa. N (%)
SEXO		0.41	0.1489
Masculino	2 (33.3%)		19(39.5%)
Femenino	4 (66.6%)		29(60.42)
GRUPO DE RIESGO		0.6065	0.0387
Bajo	3 (50%)		24(50%)
Alto	1(16.6%)		14(29.17%)
Muy alto	2 (33.3%)		10(48%)
Hepatomegalia		0.41	0.1489
Mayor de 10 cm	4 (66.6%)		19(39.5%)
Menor de 10 cm	2(33.3%)		29(60.42)
Esplenomegalia		0.1024	<0.0001
Mayor de 10 cm	5 (83.3%)		3(6.38)
Menor de 10 cm	1 (16.6%)		44 (93.6)
Leucocitos		0.2231	<0.0001
menos de 50.000	4(66.6%)		42(87.5%)
50.000 - 100.000	1(16.6%)		1(2%)
mayor de 100.000	1(16.6%)		5(10.4%)
Índice de BFM		0.6065	<0.0001
Bajo	2 (33.3%)		31(64.5%)
Medio	3 (50%)		13(27.08%)
Alto	1 (16.6%)		4(8.33%)
Morfología		0.4142	0.3864
L1	5 (83.3%)		27(56.2%)
L2	1 (16.6%)		21(43%)
Inmunofenotipo		0.4142	<0.0001
Células B	5 (83.3%)		43(91%)
Células T	1 (16.6%)		5(8.4%)

Análisis de proporciones por Chi²

EMR: Enfermedad Mínima Residual por citometría de flujo. Positiva > 0.01%, Negativa < 0.01%

Del número total de los 54, tuvieron una media de 8.11, con una desviación estándar de 5.13 años, pacientes los dividimos en pacientes con enfermedad mínima residual positiva que correspondieron a 6 pacientes con un porcentaje de 11.11%. De este porcentaje se distribuyeron en 2 masculinos 33.3% y 4 femeninos 66.6% con una P 0.41. se dividieron además los pacientes de acuerdo a sus características, por grupos de riesgo como se hace en los demás grupos internacionales, obteniéndose 3 de bajo riesgo 50%, uno de alto riesgo 16.6% y 2 de riesgo intermedio 33.3%. En cuanto al tamaño del hígado y bazo se agruparon en aquellos con mayor y menor de 10 centímetros, se presento hepatomegalia masiva 4 casos 66.6% y esplenomegalia masiva en 5 pacientes 83.66%, la media de crecimiento hepático fue de 3.57 ± 3.14 para el bazo la media de crecimiento fue 2.40 ± 3.15 en cm. De acuerdo a la carga tumoral esta se midió por el conteo de leucocitos y agrupando visceromegalias junto con el número de blastos lo que corresponde al índice de BFM de bajo 2 casos 33.3%, medio 3 casos 50% y un caso de alto riesgo 16.6%. Morfológicamente nuestros pacientes se clasificaron de acuerdo a la FAB en L1 en 5 casos 81% y L2 en un caso 16.6% así mismo de acuerdo al inmunofenotipo se agruparon en dos tipos de forma general, de acuerdo a la estirpe afectada en precursores B 5 casos 81% y células T 1 en 16.6%.

Por otro lado nuestro grupo de pacientes con enfermedad mínima residual negativa correspondieron a un total de 48 sujetos, son del sexo masculino 19 casos 39.5% y 29 mujeres 60.42%.

El grupo de riesgo se era bajo 24 casos 50%, alto riesgo 14 casos 29.17% y muy alto 10 casos 38%. Dentro de los pacientes que presentaron visceromegalias masivas fueron mayores de 10 cm correspondieron a hepatomegalia masiva en 19 casos 39.5% y

esplenomegalia masiva en 3 casos 6.4%. No fue posible evaluar un caso de esplenomegalia ya que no se documento en el expediente clínico.

La carga tumoral al diagnóstico también fue valorada por la cantidad de leucocitos dividiéndose en <50 000 en 42 casos 87.5%, 50 000-100 000 en un caso 2%, y > 50 000 en 10.4%.

El análisis de las características bioquímicas se encuentran analizados en la siguiente tabla 6. Donde se describen los datos bioquímicos más importantes. La media de hemoglobina al diagnóstico fue del 6.9 g/dl. Leucocitos en sangre periférica como importante valor pronóstico media fue $36\ 694.55 \pm 9235.7$ con una p 0.000.

Otro parámetro bioquímico analizado fue el valor de DHL al diagnóstico donde la media fue de 1487. Los niveles de ácido úrico al diagnóstico presentan una media de 5.9. Estos datos se presentan en la tabla 6, así como otro parámetro importante fue el numero de plaquetas al diagnóstico con una media de 58 788. Dentro de los demás parámetros clínicos analizados fue la media de visceromegalias, donde principalmente se midió la hepatomegalia en centímetros con 3.5 centímetros y esplenomegalia de 2.4 centímetros, no se observo afección hepática al momento del diagnostico ya que los valores de TGO y TGP no tuvieron alteración evidente.

Tabla 6. Características bioquímicas pacientes con Leucemia linfoblástica aguda en HIES evaluados por EMR				
Variabes	Casos	Media± SD		P
% de blastos MO*	54	75.92	±19.25051	1.000
Blastos en SP**	53	20.81	±31.47041	0.000
Hemoglobina	54	6.90	±2.603392	1.000
Leucocitos SP**	54	36.69	±9235.7	0.000
Neutrófilos	54	2486.0	±6369.493	1.000
Plaquetas	54	58788.6	±57631.49	1.000
TGO	54	65.70	±115.8953	0.999
TGP	54	46.56	±109.7995	0.509
DHL	52	1487.90	±2229.214	1.000
Fosfatasa alcalina	53	148.13	±122.3579	1.000
Glucosa	54	105.93	±22.4106	0.362
Urea	54	29.68	±10.38084	0.506
Creatinina	54	0.54	±0.303447	0.000
Ácido úrico	54	5.90	±2.52158	1.000

*Médula ósea, **Sangre periférica

Análisis estadístico.

Sensibilidad obtenida en esta prueba fue del 15% y la especificidad del 91%.

El valor predictivo positivo de esta prueba, que son el porcentaje de pacientes con EMR positiva y que presentan recaída fue del 50%. Valor predictivo negativo que son aquellos pacientes que no presentaron enfermedad y EMR negativa fue del 64%.

Falsos positivos de este estudio fueron el porcentaje de pacientes sin recaída con una EMR positiva entre el total de pacientes fue del 8.8%. Falsos negativos porcentaje de pacientes con recaída con EMR negativa entre el total de enfermos fue del 85%.

Precisión de este estudio fue el porcentaje de personas correctamente clasificadas con recaída y sin recaída de acuerdo a la mínima residual que fue del 62%.

En lo que concierne a las recaídas punto Importante para nuestro estudio del total de los 54 pacientes se obtuvieron 20 recaídas lo que corresponde al 37.1%, se dividieron igualmente los pacientes entre aquellos que presentaron EMR positiva y EMR negativa y EMR positiva en 3 casos 15% de los 20 en total. Tabla 7. De estos pacientes con EMR positiva se obtuvieron el 50% de recaídas dado por una cantidad de 3 pacientes del total de 6, que resultaron positivos y los sitios de recaída en mayor número frecuencia fueron extramedulares con un total del 66.6%, repartidos entre sistema nervioso central y testículo.

Tabla 7. Distribución de casos por Recaída y enfermedad mínima residual			
Enfermedad Mínima residual	Con Recaída. No. casos	Sin Recaída. porcentaje	Total
Positiva	3	3	6 (11.11%)
Negativa	17	31	48 (88.89%)
Total	20 (37.03%)	34 (62.9 %)	54 (100%)

De acuerdo al tiempo de recaída se tomó el corte ya descrito, para un total de 20 recaídas 35.4%, y de este total 10 fueron muy tempranas en el 50%, tempranas 8 casos 40% y tardías 2 casos 10%. No se encontró relevancia en cuanto a la enfermedad mínima residual positiva con el tiempo de recaída.

Realizando análisis de la recaída de acuerdo a la enfermedad mínima residual, no se obtuvo diferencia estadística .tabla 8. Ya que se obtuvo la misma cantidad de pacientes con EMR positiva, con recaída y sin recaída, presentándose una P de 0.60, valor que estadísticamente no es significativo.

Tabla 8. Análisis de sitios de Recaídas en Pacientes con enfermedad mínima residual positiva en HIES			
Sitio de recaída	No. De casos	Porcentaje	P
Sin recaída	3	50 %	0.6065
Recaída aislada a médula ósea	3	50 %	
Recaída extramedular*	0	0 %	

*Recaída a sistema nervioso central, testículo y otros órganos extramedulares.

Desglosando las recaídas por sitio de nuestros 54 pacientes, presentaron recaída a médula ósea 5 casos 10.4%, mientras que las recaídas extramedulares fueron superiores en cantidad en 10 casos 20.8%. Una cantidad pequeña de dos pacientes que corresponde al 4.17% presentaron una recaída mixta considerándose esta más de un sitio afectado.

Tabla 9. Análisis de sitios de Recaídas en Pacientes con enfermedad mínima residual negativa en HIES			
Sitio de recaída	No. De casos	Porcentaje	P
Sin recaída	31	64.58 %	0.00000
Recaída aislada a médula ósea	5	10.42%	
Recaída aislada a SNC*	6	12.5 %	
Recaída testículo	3	6.25 %	
Recaída mixta	2	4.17 %	
Recaída a otros sitios	1	2.08 %	

*Recaída médula ósea, sistema nervioso central y testículo

Tabla 10. Características de la recaída de los sujetos evaluados por enfermedad mínima residual. HIES 2013				
Variable	Positiva. N (%)	EMR		p^{1/}
		p^{1/}	Negativa. N (%)	
Recaídas		1.000		0.4300
Si	3(50%)		17(35%)	
No	3(50%)		31(64.5%)	
Tipo de recaída		0.6065		<0.0001
Aislada a MO	1 (16.6%)		7(14.5%)	
SNC	2 (33.3%)		6(12.5%)	
Testículo	0		3(6.25%)	
Tiempo de Recaída				
Temprana	3 (50%)	0.6	15 (31.2%)	<0.0001
Tardia	0		2 (4.17%)	

Análisis de proporciones por Chi2

MO: Medula ósea

EMR: Enfermedad Mínima Residual por citometría de flujo. Positiva > 0.01%, Negativa < 0.01%

En nuestra tabla número 10 se muestran las características de las recaídas relacionadas con la EMR positiva y negativa, como son, el sitio de recaída y el tiempo de las mismas, observándose que los pacientes con EMR positivas que presentaron recaídas en su totalidad fueron tempranas con un tiempo mínimo de 210 días que equivalen a 7 meses de tratamiento.

La tabla 11 explica la predicción de recaídas de la EMR cuando fue evaluada por citometría de flujo, la razón de momios cruda determino un riesgo de recaída con valores significativos para la recaída aislada a medula ósea y recaída extramedular con una RM de 0.14 (0.02-0.88) y 9.8 (0.44-40.99), valores no significativos fueron encontrados cuando se evaluaron todas las recaídas.

Tabla 11. Razón de momios en Pacientes con enfermedad mínima residual positiva en HIES			
EMR	Razón de momios	Intervalo de Confianza	P
Recaídas*	0.56	0.103-0.02	0.49
Recaída aislada a médula ósea	0.14	0.02-0.88	0.021
Recaída extramedular	9.8	0.44-40.99	0.006

*Recaída médula ósea, sistema nervioso central y testículo

DISCUSIÓN

La medición de la enfermedad mínima residual mediante citometría de flujo, es una técnica cuantitativa, específica, con una sensibilidad de 10^{-4} , Este tipo de técnica se puede aplicar en más del 90% de los pacientes con neoplasias hematológicas malignas, proporciona un resultado rápido, siendo útil en la toma de decisiones terapéuticas, se considera indispensable en el diagnóstico, clasificación y monitorización, técnica actualmente aplicada en la mayoría de centros oncológicos. **(4,13)**

Al realizar el análisis de esta técnica en nuestro hospital obtenemos una sensibilidad del 15% y una especificidad del 91%, en pacientes con valores mayores al 0.01% de blastos detectados en médula ósea al final de la inducción, que hayan completado 1 año de tratamiento. La citometría de flujo es una técnica cuantitativa, específica, con una sensibilidad del 95%, que se traduce en 10^{-4} células, con una aplicabilidad en más del 90%, en cuanto a la concordancia de esta técnica con diversas técnicas moleculares más sensibles, en diversos estudios van desde el 85% al 95%. **(32,36,51,60)**

Evaluando lo reportado en la literatura con nuestros resultados es notable una gran diferencia en cuanto a la sensibilidad obtenida, observándose si específica pero muy poco sensible, lo que significa que el porcentaje de pacientes con leucemia aguda linfoblástica que presentaron recaída con enfermedad mínima residual es bajo, no siendo así con la especificidad que traduce el porcentaje de pacientes con LLA que no presentaron recaída y que presentan enfermedad mínima residual negativa.

Rubnitz presenta en su trabajo que detectar EMR a la semana 14 predecía recurrencia en el 70% de los casos, mientras que la negatividad del estudio en el día 19 se correlacionaba con recurrencia del 6%. Estos hallazgos fueron determinados con el uso de citometría de flujo y reacción en cadena de la polimerasa, mostrando lo sensible y específica que es la prueba para predecir recaída. **(52)**

La no detección de enfermedad mínima residual durante estos lapsos es altamente predictivo de no recurrencia. Igualmente, precisa que la detección de EMR antes de trasplante de médula ósea obliga a intensificar la terapia para minimizar el riesgo de recurrencia después del trasplante. **(23)**

En realidad la validez y concordancia para la predicción de la recaída leucémica en la prueba de EMR por citometría de flujo en nuestro estudio estima un riesgo de 0.41 haciéndose muy poco sensible pero si más específica para la detección.

El valor pronóstico del grado de EMR en LLA, tanto infantil como en adultos ha sido evaluada en múltiples estudios. Todos establecen que la detección de la EMR tiene mayor valor pronóstico en las fases iniciales del tratamiento, especialmente después de la inducción **(1,7,51,54)**

Debido a estos hallazgos en contrastante con la literatura se discute los diferentes aspectos de esta prueba para obtener estos resultados.

Existen dos factores principales que determinan la sensibilidad de la citometría de flujo: el número de células blanco detectadas y el número de total de células analizadas.

La mayoría de los autores consideran que se deben de detectar al menos entre 10 y 20 células de 100 000 para considerarse positiva la EMR, en base a este valor se estandarizó que menos de 0.01% de células se considera negativa **(8,9,29,30,59)**

Para llegar a esta cantidad de células mínimas y viables se realiza análisis de al menos 200 000 a 300 000 células **(4,12,59)** y otros centros y autores mencionan cantidades mayores a 500 000 a 1 000 000 células analizadas para mayor sensibilidad y especificidad **(16)** esto para aumentar la sensibilidad y especificidad de la prueba y llegar a 100 células analizadas en un 1 000 000 y mantener el 0.01%, posterior a la cifra de un millón la sensibilidad permanece igual, así es que una forma importante de incrementar la sensibilidad de la citometría de flujo, en el análisis de la EMR es el incremento significativo del número de leucocitos totales analizados.

El reporte de nuestro laboratorio analiza en promedio 178 780 células valores oscilan desde 100 000 a la más alta 900 000, se destaca el hecho que solo hubo dos analizadas con más de 500 000 células, esas dos pruebas resultaron positivas. Lo que implica obtener una adecuada cantidad de células al momento de la muestra.

Nosotros en nuestro estudio no pudimos realizar división por grupos de riesgo como se ha descrito en la literatura probablemente esto ya que en algunos reportes realizados por el citometrista no venían clasificados de acuerdo a porcentaje, solo con la cantidad de células contadas sin especificar porcentaje. Coustan describe los grupos de acuerdo al porcentaje de blastos y el riesgo de recaída; Primer grupo de 0.01%-0.1% con un riesgo de recaer del 10% $\pm 3\%$, siguiente grupo 0.01%-0.1% riesgo relativo 23% $\pm 11\%$, tercer grupo 0.1% a 1% 43% $\pm 2\%$ y el último grupo de mayor riesgo >1% con un riesgo acumulativo de recaída del 72%. **(14)**

Otro punto a discutir es la influencia de latencia en el procesamiento de la muestra sobre los resultados de la citometría de flujo, esta descrito que las células linfocitarias son frágiles y se ven afectadas con el retraso del procesamiento. En diversos estudios se comenta

que un atraso en más de 12 horas en el procesamiento de la muestra afecta el resultado, esto principalmente para células plasmáticas en mieloma múltiple, pero también se puede llegar a presentar este efecto en linfocitos. **(13)** En nuestro hospital la muestra se envía a Guadalajara con más de 24 hrs desde su toma hasta su procesamiento, además el traslado podría ser un factor para disminuir la cuenta de leucocitos analizados.

Sin embargo en la práctica la mayoría de autores cuantifica utilizando tamaños inferiores de muestra tumoral **(51,64)**, pero no hay un estudio concluyente donde se analicen las mismas muestras con diferente carga células viables, y así poder predecir el error de acuerdo al número de células analizadas, hasta ahora lo mejor descrito es el hecho que entre más células analizadas más específico y sensible.

En cuanto a la recaída siguen siendo la causa más frecuente de falla en el tratamiento, el mayor número de recaídas ocurre durante el tratamiento, la mayor cantidad de recaídas ocurre a médula ósea, posteriormente al sistema nervioso central y/o testículo, mucho menos frecuente otros sitios extramedulares. **(44)**

Nosotros observamos en nuestro estudio que se presentaron mayor numero de recaídas extramedulares 20.83%, esto no concuerda con la literatura donde principales recaídas son a medula ósea, lo que implicaría tener en cuenta de nuestra parte como clínicos considerar un mayor tratamiento intensificado durante la consolidación o y así mismo en el tratamiento de inducción, aun así nuestra especificidad y sensibilidad de esta prueba es baja, por lo que se necesita estandarizar para poder realizar cambios confiables al tratamiento. No obstante estos resultados podrían tener un sesgo dada la cantidad de muestra pequeña para los EMR positivos requiriéndose probablemente un estudio multicéntricos que nos muestra datos estadísticamente más confiables.

También llama la atención el porcentaje de recaídas que nosotros obtenemos en nuestros resultándose, sobrepasando los reportados en la literatura, por lo tanto nuestro objetivo en base a este estudio al analizar la validez de la prueba era también valorar nuestros resultados y como comentamos anteriormente realizar cambios en nuestros manejos, sin olvidarnos de los demás parámetros obtenidos al momento del diagnóstico.

Analizando los resultados se podría inferir que para obtener una mayor sensibilidad y especificidad de la enfermedad mínima residual, se necesita mayor conteo de leucocitos, así como estandarizar el tiempo en el que se procesa la muestra para evitar destrucción celular.

Campana demostró en su trabajo que la detección de EMR $>0,01\%$ en médula ósea en la remisión post-inducción se correlaciona con altas tasas de recurrencia, y si dicha EMR es $>1\%$ el pronóstico es especialmente pobre. Igual hallazgo se observó con niveles de EMR $>0,1\%$ en la semana 14 de terapia continua. La EMR fue detectada con más facilidad al final de la primera inducción 68% que a la semana 14 casos 7%, pero la persistencia de EMR hasta la semana 32 se correlacionó con pobre pronóstico. (3) Un estudio previo del mismo autor había demostrado que los resultados obtenidos el día 19 son más fidedignos, puesto que la detección de EMR se correlacionaba con recurrencia en el 28.4% a 3 años, mientras que en ausencia de EMR en este punto la recurrencia era del orden de 1.9%. (4)

Mandrell en su revisión sobre el tema presenta el resultado de algunos estudios sobre la utilidad del estudio de EMR. Concuerta en afirmar que EMR $>1\%$ al final de la inducción es indicador de mal pronóstico. Presenta un estudio del Hospital de St. Jude donde se hace medición de EMR al fin de la terapia de inducción y en 3 momentos durante la terapia de mantenimiento; en éste se encontró correlación entre EMR con altas tasas de recurrencia; la

persistencia de EMR al final de la inducción predecía recurrencia en el 43% de los casos contra 10% en los niños sin EMR; el riesgo de recurrencia se incrementaba al 68% si persistía EMR en la semana 14 contra el 7% de los negativos. A la semana 32 EMR fue altamente predictiva. Se estableció 1% como el punto de corte de EMR al final de la inducción. El mismo estudio permitió reconocer que EMR se asocia frecuentemente a edad desfavorable, cromosoma Ph+, y sensibilidad del blasto a la quimioterapia. **(33)** Estos estudios demuestran la utilidad y sensibilidad de la prueba.

Por otra parte en diversos estudios el significado pronóstico de la EMR en LLA se ha establecido bien y es usado como criterio importante para el tratamiento y evento libre de enfermedad, al tener EMR negativa el porcentaje libre de enfermedad de estos pacientes es del $88\pm 1\%$ **(1)**, en nuestro estudio aquellos pacientes con EMR negativa que fueron 48 pacientes, el evento libre de enfermedad fue del 64.5%. en contraste con los pacientes con EMR positiva al final de la inducción mayor al 0.01%, fueron 3 pacientes 50% no presentaron recaída, en diversos estudios estos pacientes presentan 59% de presentar recaída a 5 años.

CONCLUSIONES

- ❖ Nuestra especificidad y sensibilidad son menores a lo reportado en la literatura.
- ❖ La enfermedad mínima residual por citometría de flujo tiene poca sensibilidad y especificidad en nuestro hospital seguramente por las características relacionadas con la movilización de la muestra y la forma de interpretación, por lo que se concluye que para este medio no es del todo totalmente válida.
- ❖ Es necesario estandarizar la prueba en nuestro hospital y de ser posible contar con un clitómetro en la unidad.
- ❖ Realizar estudios multicéntricos y con mayor muestra para obtener datos estadísticamente significativos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Borowitz MJ, Guenther KL, Shults KE, Stelzer GT. Immunophenotyping of acute leukemia by flow cytometric analysis. Use of CD45 and right-angle light scatter to gate on leukemic blasts in three-color analysis. *Am J Clin Pathol.* 1993;100: 534-40.
2. Brunning RD, Borowitz M, Matutes E, Head D, Flandrin G, Swerdlow SH, Bennett JM. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Precursor B-Cell and T-Cell Neoplasms. 2001:109-17.
3. Campana D, Coustan-Smith E. Minimal Residual Disease Studies by FlowCytometry in Acute Leukemia. *Acta Haematol.* 2004; 112: 8-15.
4. Campana D, Coustan-Smith E. Advances in the Immunological monitoring of Childhood Acute Lymphoblastic Leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2002; 15: 1-19.
5. Campana D, Neale GAM, Coustan-Smith E, Pui CH. Detection of Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia: the St Jude Experience. *Leukemia.* 2001; 15: 278-9.
6. Campana D, Coustan-Smith E. Detection of Minimal Residual Disease in Acute Leukemia by Flow Cytometry. *Cytometry Comm Clin Cytometry.* 1999; 38: 139-52.

7. Campana D, Pui CH. Detection of Minimal Residual Disease in Acute Leukemia: Methodologic Advances and Clinical Significance. *Blood*. 1995; 85: 1416-34.
8. Cavé H, van der Werff ten Bosch J, Suciú S, Guidal C, Waterkeyn C, Otten J, Bakkus M, Thielemans K, Grandchamp B, Vilmer E. Clinical Significance of Minimal Residual Disease in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 1998; 339: 591-8.
9. Cazzaniga G, Bondi A. Molecular Monitoring of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia using Antigen Receptor Gene Rearrangements and Quantitative Polymerase Chain Reaction Technology. *Haematologica*. 2005; 90: 382-90.
10. Cazzaniga G, d'Aniello E, Corral L, Biondi A. Results of Minimal Residual Disease (MRD) Evaluation and MRD-based Treatment Stratification in Childhood ALL. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2003; 15: 623-38.
11. Cazzaniga G, Rossi V, Bondi A. Monitoring Minimal Residual Disease using Chromosomal Translocations in Childhood ALL. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2002; 15: 21-35.
12. Coustan-Smith E, Ribeiro RC, Stow P, Zhou Y, Pui CH, Rivera GK, Pedrosa F, Campana D. A simplified flow cytometric assay identifies children with acute lymphoblastic leukemia who have superior clinical outcome. *Blood*. 2006; 108: 97-102.
13. Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, Razzouk BI, Ribeiro RC, Rivera GK, Rubnitz JE, Sandlund JT, Pui CH, Campana D. Use of Peripheral Blood instead of Bone Marrow to Monitor Residual Disease in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood*. 2002; 100: 2399-402.

14. Coustan-Smith E, Behm FG, Sánchez J, Boyett JM, Hancock ML, Raimondi SC, Rubnitz JE, Rivera GK, Sandlund JT, Pui CH, Campana D. Immunological Detection of Minimal Residual Disease in Children with Acute Lymphoblastic Leukaemia. *Lancet*. 1998; 351: 550-4.
15. Chan KW. Acute Lymphoblastic Leukemia. *Curr Probl Pediat* 2002 r; 32: 40-9.
16. Chen JS, Coustan-Smith E, Suzuki T, Neale GA, Mihara K, Pui CH, Campana D. Identification of Novel Markers for Monitoring Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood*. 2005 ; 97: 2115-20.
17. Davis BH, Holden JT, Bene MC, Borowitz MJ, Braylan RC, Cornfield D, Gorczyca W, Lee R, Maiese R, Orfao A, Wells D, Wood BL, Stetler-Stevenson M. Bethesda International Consensus Recommendations on the Flow cytometric Immunophenotypic Analysis of Hematolymphoid Neoplasia: Medical Indications. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)*. 2007; 72B: S5-S13.
18. Estrov Z, Freedman MH. Detection of Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia of Childhood. *Leuk Lymphoma* 1999; 33: 47-52.
19. Evaluation of early marrow response in childhood aneuploid Acute Lymphoblastic Leukemia: Flow Cytometric DNA analysis versus standard morphology. *Pediatr Dev Pathol*.2004; 7: 39-47.
20. Foroni L, Harrison CJ, Hoffbrand AV, Potter MN. Investigation of Minimal Residual Disease in Childhood and Adult Acute Lymphoblastic Leukaemia by Molecular Analysis. *Br J Haematol*. 1999; 105: 7-24.
21. Gaynon PS. Childhood Acute Lymphoblastic Leukaemia and Relapse. *Br J Haematol*. 2005; 131: 579-87.

22. Gaynon PS, Desai AA, Bostrom BC, Hutchinson RJ, Lange BJ, Nachman JB, Reaman GH, Sather HN, Steinherz PG, Trigg ME, Tubergen DG, Uckun FM. Early Response to Therapy and Outcome in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer*. 1997; 80: 1717-26.
23. Goulden N, Oakhill A, Steward C. Practical Application of Minimal Residual Disease assessment in Childhood Acute Lymphoblastic Leukaemia. *Br J Haematol*. 2001; 112: 275-281.
24. Goulden N. Clinical Relevance of MRD in Children undergoing Allogenic Stem Cell Transplantation for ALL. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2002; 15: 59-70.
25. Greig B, Oldaker T, Warzynski M, Wood B. Bethesda International Consensus Recommendations on the Immunophenotypic Analysis of Hematolymphoid Neoplasia by Flow Cytometry: Recommendations for Training and Education to Perform Clinical Flow Cytometry. *Cytometry Part B Clinical Cytometry*. 2007; 72B: S23-S33.
26. Hahn T, Wall D, Camitta B, Davies S, Dillon H, Gaynon P, Larson RA, Parsons S, Seidenfeld J, Weisdorf D, McCarthy PL Jr. The Role of Cytotoxic Therapy with Hematopoietic Stem Cell Transplantation in the Therapy of Acute Lymphoblastic Leukemia in Children: An Evidence-Based Review. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005; 11: 823-61.
27. Hoelzer D, Gökbuget N, Ottmann O, Pui CH, Relling MV, Appelbaum FR, van Dongen JJM, Szczepański T. Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2002: 162-92.

28. Izraeli S, Waldman D. Minimal Residual Disease in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Current Status and Challenges. *Acta Haematol* g.2004; 112: 34-9.
29. Kwan E, Norris MD, Zhu L, Ferrara D, Marshall GM, Haber M. Simultaneous Detection and Quantification of Minimal Residual Disease in Childhood Acute Lymphoblastic Leukaemia using Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Br J Haematol*. 2000; 109: 430-4.
30. Lúcio P, Gaipa G, van Lochem EG, van Wering ER, Porwit-MacDonald A, Faria T, Björklund E, Biondi A, van den Beemd MWM, Baars E, Vidriales B, Parreira A, van Dongen JJM, San Miguel JF, Orfao A. BIOMED-I Concerted Action Report: Flow Cytometry Immunophenotyping of Precursor B-ALL with Standardized Triple-Stainings. *Leukemia*. 2001; 15: 1185-92.
31. Lúcio P, Parreira A, van den Beemd MWM, van Lochem EG, van Wering ER, Baars E, Porwit-MacDonald A, Björklund E, Gaipa G, Biondi A, Orfao A, Janossy G, van Dongen JJM, San Miguel JF. Flow Cytometric Analysis of Normal B cell Differentiation: A Frame of Reference for the Detection of Minimal Residual Disease in Precursor B-ALL. *Leukemia*. 1999; 13: 419-27.
32. Macedo A, Orfao A, Ciudad J, González M, Vidriales B, López-Berges MC, Martínez A, Landolfi C, Cañizo C, San Miguel JF. Phenotypic análisis of CD34 Subpopulations in Normal Human Bone Marrow and its Application for the Detection of Minimal residual Disease. *Leukemia*. 1995; 9: 1896-901.
33. Mandrell BN, Pritchard M. Understanding the Clinical Implications of Minimal Residual Disease in Childhood Anemia. *J Pediatr Oncol Nurs*. 2006; 23: 38-44.

34. Moore MAS. The Hematopoietic System and Hematopoiesis. En Knowles DM, Neoplastic Hematopathology, 2nd edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 2001:1-42.
35. Moppett J, Burke GAA, Steward CG, Oakhill A, Goulden NJ. The Clinical Relevance of Detection of Minimal Residual Disease in Childhood Acute Lymphoblastic Leukaemia. *J Clin Pathol.* 2003; 56: 249-53.
36. Nachman JB, Sather HN, Sensel MG, Trigg ME, Cherlow JM, Lukens JN, Wolff L, Uckun FM, Gaynon PS. Augmented Post-Induction Therapy for Children with High-Risk Acute Lymphoblastic Leukemia and a Slow Response to Initial Therapy. *N Engl J Med.* 1998; 338: 1663-71.
37. Nagler A. Detection of Minimal Residual Disease (MRD) after Bone Marrow Transplantation (BMT) by Multi-Parameter Flow Cytometry (MPFC). *Med Oncol* , Condiotti R, Rabinowitz R, Schlesinger M, Nguyen M, Terstappen LWMM. 1999; 16: 177-87.
38. Orfao A, Ciudad J, Almeida J, San Miguel JF. Chapter 10: Residual Disease Detection of Leukemia. En Stewart CC, Nicholson JKA (Eds): *Immunophenotyping.* Willey-Liss Inc., New York. 2000:239-59.
39. Pérez-Vera P, Frias S, Carnevale A, Betancourt M, Mujica M, Rivera-Luna R, Ortíz R. A strategy to detect chromosomal abnormalities in children with Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2004; 26: 294-300.
40. Porwit-MacDonald A, Björklund E, Lucio P, van Lochem EG, Mazur I, Parreira A, van den Beemd MWM, van Wering ER, Baars E, Gaipa G, Biondi A, Ciudad J, van Dongen JJM, San Miguel JF, Orfao A. BIOMED-I Concerted Action Report:

- Flow Cytometric Characterization of CD7+ cell subsets in Normal Bone Marrow as a Basis for the Diagnosis and Follow-up of T cell Acute Lymphoblastic Leukemia (T-ALL). *Leukemia*. 2000; 14: 816-25.
41. Pui CH, Robinson LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2008; 371: 1030-43.
 42. Pui CH, Relling MV, Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2004; 350: 1535-48.
 43. Pui CH, Schrappe M, Ribeiro RC, Niemeyer CM. Childhood and Adolescent Lymphoid and Myeloid Leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2004: 118-45.
 44. Pui CH, Campana D, Evans WE. Childhood Acute Lymphoblastic Leukaemia – Current Status and Future Perspectives. *Lancet Oncol*. 2001; 2: 597-607.
 45. Pui CH. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *Curr Opin Oncol*. 2000; 12: 3-12.
 46. Pui CH, Campana D. New Definition of Remission in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Leukemia*. 2000; 14: 783-5.
 47. Pui CH, Hancock ML, Head DR, Rivera GK, Look AT, Sandlund JT, Behm FG. Clinical significance of CD34 expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1993; 82: 889-94.
 48. Pui CH, Behm FG, Singh B, Rivera GK, Schell MJ, Roberts WM, Crist WM, Mirro J Jr. *Blood* 1990; 75: 198-202.
 49. Ravindranath Y. Recent Advances in Pediatric acute Lymphoblastic and Myeloid Leukemia. *Curr Opin Oncol*. 2003; 15: 23-35.

50. Redaelli A, Laskin BL, Stephens JM, Botteman MF, Pashos CL. A systematic Literature Review of the Clinical and Epidemiological Burden of Acute lymphoblastic Leukaemia. *Eur J Cancer Care*. 2005; 14: 53-62.
51. Roberts WM, Estrov Z, Ouspenskaia MV, Johnston DA, McClain KL, Zipf TF. Measurement of Residual Leukemia during Remission in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med* 1997; 336: 317-23.
52. Rubnitz JE, Pui CH. Recent Advances in the Treatment and Understanding of Childhood Acute Lymphoblastic Leukaemia. *Cancer Treat Rev*. 2003; 29: 31-44.
53. Sandlund JT, Harrison PL, Rivera G, Behm FG, Head D, Boyett J, Rubnitz JE, Gajjar A, Raimondi S, Ribeiro R, Hudson M, Relling M, Evans W, Pui CH. Persistence of Lymphoblasts in Bone Marrow on day 15 and days 22 to 25 of Remission Induction Predicts a Dismal Treatment Outcome in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood*. 2002; 100: 43-7.
54. Schrappe M, Beier R, Bürger B. New Treatment Strategies in Childhood Acute Lymphoblastic Leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2003; 15: 729-40.
55. Seeger K, Viehmann S, Buchwald D, Harbott J, Schrappe M, Stary J, Henze G, Trka J. Treatment Response and Residual-Disease Monitoring in Initial and Relapsed TEL-AML1 Positive Childhood ALL. *Leukemia*. 2001; 15: 280-2.
56. Sievers EL, Radich JP. Detection of Minimal Residual Disease in Acute Leukemia. *Curr Opin Hematol*. 2000; 7: 212-6.
57. Silverman LB, Sallan SE. Newly Diagnosed Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: update on Prognostic Factors and Treatment. *Curr Opin Hematol*. 2003; 10: 290-6.

58. Tzortzatou-Stathopoulou F, Papadopoulou AL, Moschovi M, Botsonis A, Tsangaris GT. Low Relapse Rate in Children With Acute Lymphoblastic Leukemia After Risk-Directed Therapy. *J Pediatr Hemat Oncol*. 2001; 23: 591-7.
59. Van Dongen JJM, Seriu T, Panzer-Grümayer ER, Biondi A, Pongers-Willems MJ, Corral L, Stolz F, Schrappe M, Masera G, Kamps WA, Gadner H, van Wering ER, Ludwig WD, Basso G, de Bruijn MAC, Cazzaniga G, Hettinger K, van der Does-van den Berg A, Hop WCJ, Riehm H, Bartram CR. Prognostic Value of Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukaemia in Childhood. *Lancet*. 1998; 352: 1731-38.
60. Van Lochem EG, van der Velden VHJ, Wind HJ, te Marvelde JG, Westerdaal NAC, van Dongen JJM. Immunophenotypic Differentiation Patterns of Normal Hematopoiesis in Human Bone Marrow: Referent Patterns for Age-Related Changes and Disease-Induced Shifts. *Cytometry Part B Clinical Cytometry*. 2004; 60B: 1–13.
61. Van Wering ER, van der Linden-Schrevel BEM, Szczepański T, Williemse MJ, Baars EA, van Wijngaarde-Schmitz HM, Kamps WA, van Dongen JJM. Regenerating normal B-cell Precursors during and after Treatment of Acute Lymphoblastic Leukaemia: Implications for Monitoring of Minimal Residual Disease. *Br J Haematol*. 2000; 110: 139-46
62. Wickramasinghe SN. Chapter 31: Bone Marrow. En: Sternberg SS (Ed.): *Histology for Pathologists* 2nd edition. Lippincott-Raven Publishers 1997; 707-42.

63. Weir EG, Cowan K, LeBeau P, Borowitz MJ. A Limited Antibody Panel can distinguish B-Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia from Normal B Precursors with Four Color Flow Cytometry: Implications for Residual Disease Detection. *Leukemia*. 1999; 13: 558-67.
64. Wood BL, Arroz M, Barnett D, DiGiuseppe J, Greig B, Kussick SJ, Oldaker T, Shenkin M, Stone E, Wallace P. Bethesda International Consensus Recommendations of the Immunophenotypic Analysis of Hematolymphoid Neoplasia by Flow Cytometry: Optimal Reagents and Reporting for the Flow Cytometric Diagnosis of Hematopoietic Neoplasia. *Cytometry Part B Clinical Cytometry*. 2006; 72B: S14-S22.
65. Ziegler DS, Dalla Pozza L, Waters KD, Marshall GM. Advances in Childhood Leukaemia: Successful Clinical-trials Research leads to individualized therapy. *Med J Aust*. 2005; 182: 78-81.
66. Zur Stadt U, Harms DO, Schlüter S, Schrappe M, Goebel U, Spaar H, Janka G, Kabisch H. MRD at the end of Induction Therapy in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Outcome Prediction strongly depends on the Therapeutic Regimen. *Leukemia*. 2001; 15: 283-85.
67. Zwick D, Cooley L, Hetherington M. Minimal Residual Disease testing of Acute Leukemia by Flow Cytometry Immunophenotyping: a retrospective comparison of detection rates with Flow Cytometry DNA ploidy or FISH-based methods. *Lab Hematol*. 2006; 12: 75-81.