



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

HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO

RELEVANCIA DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO COMO HERRAMIENTA DIAGNÓSTICA Y PRONÓSTICA EN
PACIENTES ADULTOS CON LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA

TESIS
PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN
HEMATOLOGÍA

PRESENTA:
JACQUELINE CALDERÓN GARCÍA

TUTORES
DR. CHRISTIAN OMAR RAMOS PEÑAFIEL
DR. ADOLFO MARTÍNEZ TOVAR

CIUDAD DE MÉXICO, DICIEMBRE 2016



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.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres y a mis hermanos que sin todo el apoyo que me han dado durante toda mi carrera y mi vida no hubiera logrado llegar a éste momento, que me han impulsado y han estado siempre junto a mi para superar todos los obstáculos que me he puesto, porque sin su apoyo simplemente esto no estaría pasando.

Dedico este trabajo y le agradezco infinitamente al Dr. Christian Ramos que ha sido mi maestro y mi tutor durante la elaboración de este trabajo, gracias Dr. Christian por enseñarme y por tenerme tanta paciencia, gracias por todas las clases que nos ha dado y por gastar tanto tiempo y preocuparse tanto por que nosotros nos formemos como unos buenos hematólogos y gracias también por ser mi amigo, escucharme, regañarme y darme consejos no solo dentro de lo profesional si no también de otros aspectos de la vida. Agradezco al Dr. Collazo por haberme permitido formar parte del equipo de Hematología del Hospital General.

También agradezco al Dr. Efreeen Montaña, Dr. Carlos Murillo, Dr. Humberto Sinco, Dra. Guadalupe León, al Dr. Kassack que han sido mis maestros durante mi formación como especialista. Al Dr. Adolfo y la Dra. Irma que me han enseñado un poco de investigación y estadística y me ayudaron con el proyecto de la tesis. Gracias a Gou por explicarme citometría de flujo y a la jefa Emma por permitirme trabajar en la Unidad 204.

Por ultimo agradezco a mis compañeros de generación, Lineth, Rouse y George, que han sido muy importantes para mi durante esta etapa de mi vida, son unas grandes personas, gracias por todos esos momentos que vivimos juntos, por todos esos buenos y tambien malos momentos, por que cada persona que vas conociendo durante la carrera es especial pero los compañeros de generación siempre son más especiales, ustedes han sido mis amigos, compañeros de trabajo, me han hecho enojar y he reido mucho con ustedes también, he aprendido mucho de ustedes y me han hecho ver mis errores, porque, aunque hemos tenido diferencias (con unos más que con otros) y nos hemos gritado y llegado a odiar siempre hemos estado juntos para apoyarnos, creo que fuimos un buen equipo, los quiero chicos.

Indice General

Indice General	3
1. Resumen estructurado	
1.1 Estudio 1	5
1.2 Estudio 2	6
2. Introducción	
2.1 Antecedentes	7
2.2 Epidemiología	7
2.3 Pronóstico general y estrategias de tratamiento	7
2.4 Pronóstico posterior a una recaída	8
3. Aplicación de Citometría de Flujo en Leucemia Linfoblástica Aguda	
3.1 Introducción	9
3.2 Diagnóstico por Inmunofenotipo	11
3.3 Clasificación Inmunofenotípica de Leucemia Linfoblástica Agua en el adulto	14
3.3.1 Clasificación inmunofenotípica de LAL-B	15
3.3.2 Clasificación inmunofenotípica de LAL-T	16
3.4 Útilidad pronóstica del inmunofenotipo	16
3.5 Enfermedad Mínima Residual	17
4 Planteamiento del problema	20
5 Justificación	21
6 Hipótesis	22
7 Metodología	23
7.1 Material y Métodos	23
7.2 Metodología para la determinación de Inmunofenotipo y Enfermedad Mínima Residual	23
7.2.1 Fundamento	23
7.2.2 Muestra primaria	23
7.2.3 Contenedor y Aditivos	23
7.2.4 Instrumentos	23
7.2.5 Reactivos	24
7.2.6 Procedimiento	24
8 Estudio No. 1 Citometria de flujo como herramienta diagnóstica en los pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda	
8.1 Objetivos	26
8.2 Diseño del estudio	26
8.3 Criterios de Inclusión	26
8.4 Criterios de Exclusión	26
8.5 Criterios de Eliminación	26

8.6	Variables	26
8.7	Análisis Estadístico	27
8.8	Consideraciones Éticas	28
8.9	Resultados	28
8.9.1	Características generales de los pacientes	28
8.9.2	Características de las muestras	28
8.9.3	Clasificación de la FAB (Referencia de la FAB)	29
8.9.4	Asociación entre la Clasificación de la FAB y el Inmunofenotipo	29
8.9.5	Resultado del inmunofenotipo	31
8.9.6	Asociación entre el Inmunofenotipo y la edad	32
8.9.7	Expresión de los Marcadores de citometría de Flujo	34
8.10	Discusión	39
9	Estudio 2. Enfermedad Mínima Residual como herramienta pronóstica en los pacientes adultos con Leucemia Linfoblástica Aguda	
9.1	Objetivos	41
9.2	Diseño del estudio	41
9.3	Criterios de Inclusión	41
9.4	Criterios de Exclusión	41
9.5	Criterios de Eliminación	41
9.6	Variables	41
9.7	Análisis Estadístico	42
9.8	Resultados	43
9.8.1	Características generales de los pacientes	43
9.8.2	Factores pronósticos asociados a la supervivencia	44
9.8.3	Factores pronósticos identificados en la cohorte HGMLAL13/MEGATRON	45
9.8.4	Resultados en el grupo de la AYA (16 a 39 años)	46
9.9	Recaídas	48
9.10	Discusión	48
10	Bibliografía	51

1 RESUMEN ESTRUCTURADO

ESTUDIO 1 CITOMETRÍA DE FLUJO COMO HERRAMIENTA DIAGNÓSTICA EN LOS PACIENTES CON LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA

Introducción: La citometría de flujo es una herramienta diagnóstica aplicada en la mayoría de las enfermedades hematológicas, su utilidad se basa en un análisis cuantitativo tanto de estructuras celulares, compartimientos o la funcionalidad celular (3). En leucemias se utilizan diversos anticuerpos monoclonales unidos a fluorocromos que en un corto tiempo pueden dar información sobre la coexpresión de diversos antígenos en las membranas celulares (4,5). Para el diagnóstico de las leucemias se necesita un panel que permita distinguir la estirpe mieloide y linfoide (MPO, CD3, CD79a) para posteriormente adicionar marcadores que permitan conocer el estadio de maduración (6,7). Para el diagnóstico de LAL-B se requiere de la coexpresión de al menos 2 de los antígenos más tempranos de línea B (CD19, CD22 y CD79a) y se clasifican de acuerdo al estadio madurativo de las células neoplásicas en 4 subgrupos diferentes: a) LAL pro B o BI, b) LAL común o BII, c) LAL pre B o BIII, d) LAL madura o BIV (tabla 1) (8,9). La variedad B común es el fenotipo más frecuente tanto en niños como en adultos representando cerca del 70% de los casos (10,11)

Material y Métodos: Se trata de un estudio retrospectivo, observacional, descriptivo, transversal y analítico. El objetivo primario fue establecer la frecuencia de expresión de los marcadores de superficie de los blastos linfoides en sus diferentes etapas de diferenciación en el momento del diagnóstico de los pacientes con leucemia linfoblástica aguda de novo. Se utilizó el software estadístico SPSS versión 20.0. El análisis inicial fue la descripción de medias de los diferentes marcadores, la diferencia de medias se realizó mediante la prueba T-student considerándose significativo un valor de $p < 0.05$ (95%IC). Posteriormente la diferencia de las medias de expresión entre los grupos se realizó por una ANOVA de una vía.

Resultados: El subtipo FAB más frecuente fue la variedad L2 (81.3%, $n= 169$). Dentro de la estratificación por edad, la variedad L2 fue la más frecuente dentro de todos los grupos de edad. Tanto para la variante B como T la principal variedad morfológica fue el subtipo L2 (82.1% para B y 17.9% para la variedad T). En cuanto al Inmunofenotipo la variante más frecuente es la variedad B común (CALLA+) con un 80.8% ($n= 168$). Se identificó que la variante B común se mantuvo constante desde la edad pediátrica hasta la edad de adulto mayor (0-10: 72.7%, 11-20: 82.2%, 21-30: 81%, 30-60: 81.6%, > 60 años: 77.8%). La media de expresión del marcador de superficie CD22 fue de alrededor de un 62.8% (rango 0 – 99.8%), La frecuencia de positividad de este marcador fue de 89.9% ($n=176$). La media de expresión del marcador de superficie CD19 fue de alrededor de un 76.1% (rango 0 – 99.9%), La frecuencia de positividad excluyendo a las leucemias T fue de 91.3% ($n=179$).

Conclusión: La expresión de los marcadores de superficie de las células leucémicas en la actualidad no solo es una herramienta diagnóstica, el conocimiento de la frecuencia de expresión de gran importancia en la actualidad ya que existen nuevas estrategias terapéuticas cuyo fundamento es la expresión de los diferentes marcadores de superficie.

ESTUDIO 2. ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL COMO HERRAMIENTA PRONÓSTICA EN LOS PACIENTES ADULTOS CON LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

Introducción: El tratamiento moderno de la Leucemia Linfoblástica Aguda incluye la combinación de diferentes secuencias de drogas citotóxicas las cuales en conjunto con esteroides, inmunoterapia o blancos moleculares han mejorado el pronóstico en especial en pacientes pediátricos (1,2). En los adultos el pronóstico aun continúa siendo desfavorable, debido a esto los esquemas se basan en terapias de alta intensidad como Hyper-CVAD o esquemas basados en regímenes pediátricos en el caso de los adolescentes (3,4). La edad mayor a 35 años continúa como uno de los principales factores de riesgo de recaída, identificado tanto en grandes estudios cooperativos como el MRC/UKALLECOG E2993 como en series más pequeñas (5-7). Otro de los factores que han contribuido con la mejoría del pronóstico es la detección de la enfermedad mínima residual (EMR) realizada en su mayoría por citometría de flujo (17,18). El momento de detección es variable tanto para los niños como adultos pero la mayoría de los autores coincide que su positividad al final de la inducción como previo al trasplante de progenitores hematopoyéticos (19-20).

Material y Métodos: Se trata de un estudio retrospectivo observacional en pacientes portadores de Leucemia Linfoblástica Aguda de novo atendidos en el Hospital General de México los cuales integraron remisión completa (<5%) posterior a las primeras 4 semanas de tratamiento durante el periodo del 2007 al 2016. El objetivo primario fue establecer la relación que existe entre la enfermedad mínima residual positiva y el porcentaje de recaída durante el seguimiento de los pacientes con leucemia linfoblástica aguda de reciente diagnóstico en el servicio de Hematología del Hospital General de México. Se plantea como hipótesis que si un paciente durante su seguimiento presenta expresión de clonas leucémicas mayor de 0.01%, entonces presentará recaída a médula ósea, sistema nervioso central o algún otro sitio extramedular de manera más temprana en comparación con aquellos que presenten enfermedad mínima residual considerada como negativa. Se utilizó el software estadístico SPSS versión 20.0. La diferencia de medias entre edad y cuenta de leucocitos se estimó mediante la prueba T student. Para la prueba de contraste de hipótesis se utilizó el test Ji-Cuadrado considerándose significativo a un valor de $p < 0.05$ (95% IC). El análisis de supervivencia se realizó mediante el test Kaplan-Meyer, para la comparación de grupos en cuanto la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad se utilizó el test log-rank². Para la estimación del riesgo de recaída para los dos grupos de tratamiento como la utilidad de la EMR se utilizó el cálculo del Odds Ratio.

Resultados: Se registró una diferencia significativa en cuanto a la supervivencia entre los dos protocolos ($p= 0.046, 95\%$ IC). Se registró también una diferencia entre la supervivencia libre de enfermedad entre los dos grupos ($p=0.015, 95\%$ IC). El tipo de tratamiento impacto directamente con el pronóstico siendo favorable para el protocolo HGMLAL13/MEGATRON ($p=0.004, 95\%$ IC). La edad >35 años se asoció con la recaída temprana ($p=0.008, 95\%$ IC) pero la positividad de la EMR de la semana 36 nos confiere 4.6 veces mayor riesgo de recaída que las presentadas en la semana 12 o 24.

Conclusión: La LLA del adulto continua siendo un reto terapéutico el cual requiere una monitorización estrecha por lo que la detección de la EMR se ha vuelto una herramienta fundamental para el pronóstico.

RELEVANCIA DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO COMO HERRAMIENTA DIAGNÓSTICA Y PRONÓSTICA EN PACIENTES ADULTOS CON LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA

2.0 INTRODUCCIÓN

2.1 Antecedentes.

La Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) es una neoplasia la cual acorde a la Organización Mundial de la Salud (OMS) se encuentra englobada dentro de las neoplasias de precursores linfoides (1). Su diagnóstico de forma general se basa en los hallazgos morfológicos en conjunto con los marcadores detectados por citometría de flujo. El pronóstico de los pacientes ha mejorado drásticamente gracias a los avances en el entendimiento de la biología molecular y la detección de diversos blancos moleculares principalmente inhibidores de kinasa de tirosina, los cuales han modificado la supervivencia libre de enfermedad (2). El tratamiento de la Leucemia Linfoblástica Aguda consiste actualmente en la combinación de múltiples agentes de quimioterapia, inmunoterapia, inhibidores de kinasa de tirosina y en caso de contar con un donador HLA-compatibles ser sometidos a un trasplante de progenitores hematopoyéticos (3,4).

2.2 Epidemiología.

La incidencia acumulada ajustada a la edad en los Estados Unidos es de 1 por cada 100,000 personas con picos entre los 2 a 5 años y un segundo pico por encima de los 50 años (5). En un estudio reciente publicado por Dores y colaboradores basándose en los registros desde el 2001-2007 en los Estados Unidos estimaron una incidencia de LLA en población hispana era mayor que en la población no latina (IR=10.2) (6). En México, acorde al registro mundial de Cáncer (Globocan, 2008) la incidencia acumulada de leucemia es de 6.3 casos por 100,000 personas, con una tasa de mortalidad de 4.8/100,000 personas (7). Acorde al Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas, en el 2002 se registraron 1720 casos de LLA encontrándose por encima de la Leucemia Mieloide Aguda con 944 nuevos casos, siendo la LLA más frecuente a diferencia de en otras regiones del mundo (8). En el Hospital General de México, un centro de referencia para la atención de Leucemias Agudas establecido en el Distrito Federal se evaluaron la frecuencia de leucemias agudas en dos periodos de tiempo con 16 años de diferencia, siendo la LLA la variante más frecuente (62% versus 38%) (9).

2.3 Pronóstico general y Estrategias de tratamiento.

La mortalidad asociada a leucemia ha disminuido. Esto es debido al uso de diversas combinaciones de quimioterapia, la adición de nuevos agentes (inmunoterapia, inhibidores de cinasa de tirosina) o la modificación química de medicamentos ya existentes (pegilación) (10). La mortalidad por leucemia ha disminuido en la mayor parte de Latino-

América especialmente en población pediátrica y en menor medida en adolescentes (11). A pesar de los avances del tratamiento el pronóstico en población adulta continua siendo desfavorable. El porcentaje de remisiones completas en adultos es entre un 85 – 90% con una supervivencia a 5 años por debajo del 50% en la mayor parte de los protocolos de tratamiento. Alrededor del 75% de los pacientes presentan marcadores de mal pronóstico y cuentan con una supervivencia libre de enfermedad de solo un 25% (12). En nuestro país Arteaga y colaboradores en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición Salvador Zubirán presentaron los resultados de una cohorte de pacientes (n=40) entre 2003 -2007. El porcentaje de remisiones completas fue de 78% para los pacientes tratados con el protocolo institucional 0195 y 85% para aquellos tratados con el protocolo Hyper-CVAD. La mediana de la supervivencia libre de enfermedad fue de 11.6 meses y una supervivencia global de 15 meses (13). En el Hospital General de Mexico Ramos y colaboradores presentaron los resultados de 2 cohortes de estudio entre el 2007-09, el porcentaje de Remisiones completas fue del 61 y 51% respectivamente con una supervivencia global y supervivencia libre de evento de 32 y 30% (14). La estrategia general de tratamiento consiste en una etapa de inducción a la remisión, una etapa de post-inducción, una etapa de intensificación o consolidación en la que se incluye la profilaxis a Sistema Nervioso Central y una etapa de prolongada de mantenimiento (15). Los fármacos utilizados de forma más frecuente en la etapa de inducción a la remisión incluyen esteroides (prednisona, prednisolona, dexametasona), vincristina, antraciclinas (en su mayoría daunorrubicina) y L-asparaginasa en especial en pacientes pediátricos y adolescentes. Fármacos como la ciclofosfamida, citarabina y mercaptopurina se utilizan generalmente en la etapa de post-inducción. La etapa de post-inducción consiste principalmente en la rotación de bloques de fármacos, ciclos de dosis altas de quimioterapia e inclusive el trasplante de progenitores hematopoyéticos (16). Posterior al tratamiento estándar de 2 a 3 años se realiza la suspensión electiva de tratamiento. Aquellos que permanecen en remisión completa por encima de los 4 a 5 años se consideran curados (17). Algunos grupos multidisciplinarios han establecido estrategias semejantes a protocolos de población pediátrica como el protocolo italiano GIMEMA ALL0288 el cual incorpora un esquema de pre-tratamiento con esteroides en conjunto a un régimen de inducción de 4 fármacos. A pesar de dicha estrategia el porcentaje de recaídas fue del 60% (18)

2.4 Pronóstico posterior a una recaída.

Cerca de un 25% de los pacientes serán refractarios al primer esquema de tratamiento y el resto contarán con una supervivencia libre de enfermedad por debajo del 40% (19-22). Alrededor del 50% de los pacientes presentarán una recaída dentro de los primeros 5 años de tratamiento encontrándose relacionado directamente con anomalías citogenéticas de mal pronóstico o por el tipo de riesgo (23,24). Fielding y colaboradores reportaron en 2007 la experiencia de un estudio prospectivo en pacientes con recaída a médula ósea del protocolo MRCUKALL12/ECOG 2993, la supervivencia global posterior a la recaída fue 7% a 5 años (95% IC = 4 – 9%), siendo la edad al momento de la recaída al igual que la duración de la primera remisión completa los principales factores para una buena respuesta para el tratamiento de rescate (25). Semejante a esto Oriol y colaboradores del grupo PETHEMA en su ensayo prospectivo, longitudinal evaluaron la supervivencia de 263 adultos posterior a la primera recaída medular. La supervivencia global registrada posterior a la recaída fue de 4.5 meses (95% IC, 4 -5 meses) con una supervivencia global a 5 años de 10% (95%IC, 8-12%). Coincidiendo con Fielding los principales factores de buen pronóstico posterior a la recaída fueron la edad

menor de 30 años y una mayor duración de la primera remisión completa (26). En nuestro país existen pocos registros de los resultados de los diferentes protocolos de recaída. En el Hospital General de México, en un estudio retrospectivo evaluamos los resultados de los diferentes protocolos de recaída (IDA-FLAG, Hyper-CVAD, protocolo institucional 2,3,5) registrándose un total de 15% de Segundas Remisiones Completas (2RC) y una supervivencia promedio de 113 días (27).

3 APLICACIÓN DE CITOMETRIA DE FLUJO EN LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

3.1 Introducción

La citometría de flujo (CMF) permite realizar análisis multiparamétricos del componente celular en suspensión de una manera individual a través de sus características físicas y químicas así como también permite identificar la expresión de proteínas celulares (28). La citometría de flujo emplea anticuerpos monoclonales unidos a fluorocromos y de ésta manera permite analizar un elevado número de partículas en suspensión en un corto periodo de tiempo así como también ofrece información simultánea de varios parámetros celulares, identifica paralelamente antígenos de superficie y citoplasmáticos y emplea múltiples marcajes para detectar la coexpresión de antígenos aberrantes sobre el blasto. (29,30) En la CM vamos a observar una distribución celular según el tamaño y complejidad interna; estas características dependen del grado y de la magnitud de la dispersión de luz del láser al interactuar con los componentes celulares, que se obtiene a través del análisis de la muestra que contiene solamente sangre total, la cual funciona como un control negativo (31). Cuando la luz difractada incide en el mismo eje de la luz incidente, se evalúa el tamaño celular a través del forward scatter (FSC). Por otro lado, cuando la luz difractada y reflejada es detectada a 90° de la dirección del láser, se evalúa la complejidad interna celular a través del side scatter (SC) (31,32) En la figura 1 se muestra un diagrama de puntos (dot plot) donde se ubican los linfocitos, monocitos y granulocitos, según su tamaño y complejidad (33).

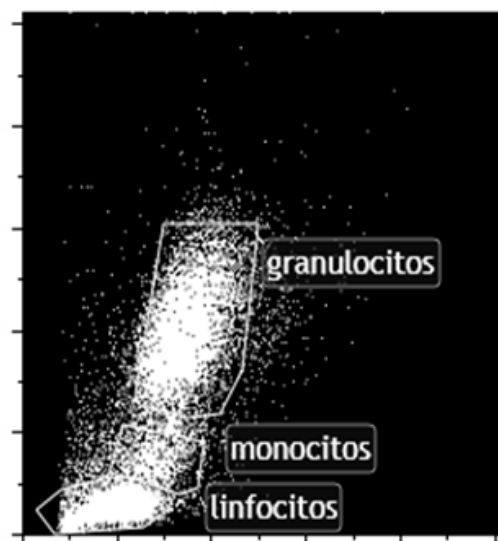


Fig.1. Disposición de linfocitos, monocitos y granulocitos según tamaño y complejidad interna.

Para el estudio del inmunofenotipo en leucemias agudas se debe de incluir un panel de anticuerpos dirigidos contra los principales antígenos de diferenciación celular, expresados en la membrana, el citoplasma y el núcleo de los precursores hematopoyéticos. La CMF permite discriminar entre células blásticas y el componente celular normal presentes de manera concomitante en la muestra y excluir este último del análisis fenotípico; de ésta forma se erradican los fenómenos de contaminación y clasificación celular errónea (34). A través del marcador CD45 se puede evidenciar una expresión heterogénea de este antígeno sobre las diferentes poblaciones celulares y diferenciar de manera eficaz a los diferentes linajes celulares existentes en una matriz compleja (35).

El antígeno pan leucocitario CD45 es una proteína expresada de manera constitutiva en todas las células hematopoyéticas, que incrementa su densidad de expresión en los estadios finales de la hematopoyesis, en los diferentes linajes celulares leucocitarios y permanece de manera estable en las células maduras; sin embargo, las células eritroides y las plaquetas pierden la expresión de ésta proteína a lo largo de su diferenciación. El CD45 pertenece a una familia compleja de glicoproteínas de alto peso molecular y está compuesto por cinco isoformas, posee actividad tirosin fosfatasa y realiza una función importante en la regulación de la diferenciación celular (35, 36). La determinación del grado de expresión del antígeno CD45 es de particular importancia ya que permite:

1. Discriminar entre las células blásticas inmaduras normales y maduras
2. Definir el linaje celular
3. Inferir el estadio de maduración

En la figura 2 se muestra cómo con el uso de CD45 marcado/SC se disponen de manera diferente las distintas poblaciones celulares: blastos y linfocitos maduros reactivos en la médula ósea (33)

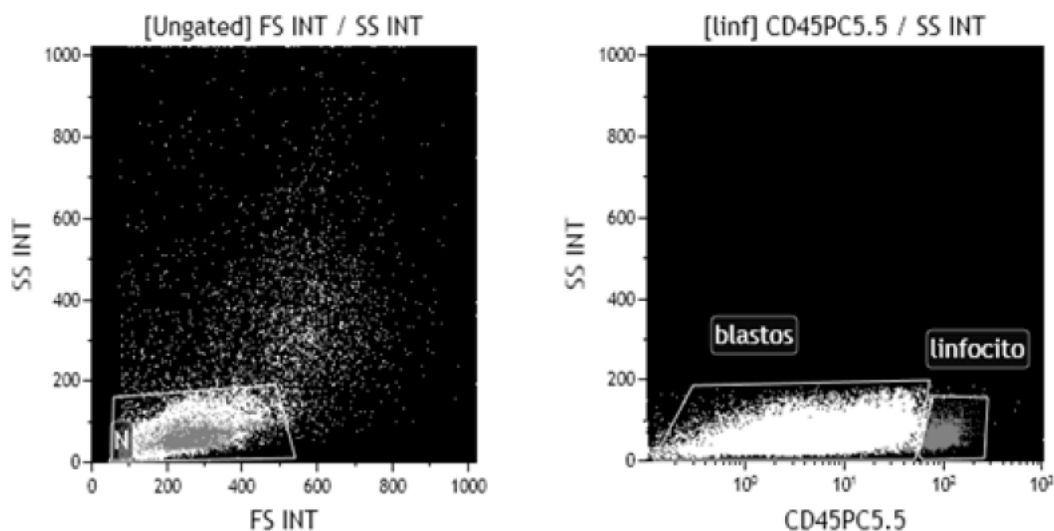


Fig. 2. Distribución de los blastos y linfocitos maduros con el uso de CD45/Side Scatter

3.2 Diagnóstico por Inmunofenotipo

Para el diagnóstico inmunológico de las leucemias agudas por CMF se deben emplear diferentes paneles de anticuerpos: obligatorios, recomendados y opcionales (36, 37, 38). Los paneles obligatorios son aquellos que permiten determinar los criterios de identificación, cuantificación y clasificación de la enfermedad; los recomendados incluyen marcadores que no son esenciales para el diagnóstico pero que son importantes para la sub clasificación de las leucemias agudas y los opcionales contienen aquellos anticuerpos necesarios para el diagnóstico de la enfermedad mínima residual (EMR), la detección de subtipos raros de leucemias y determinados marcadores antigénicos que puedan sugerir anomalías citogenéticas y moleculares, implicados en el pronóstico de la enfermedad (36).

Para la caracterización inmunofenotípica de las leucemias agudas, los grupos de expertos en CMF para el diagnóstico de enfermedades hematológicas, sugieren el empleo de un panel de anticuerpos monoclonales dirigidos contra los antígenos intracitoplasmáticos como son: mieloperoxidasa (MPO), CD3 y CD79a, el cual permitirá determinar el linaje celular leucémico: mieloide, T y B respectivamente. Basados en la información que se obtenga a partir de éste panel, se le adicionará el resto de los marcadores específicos de linaje y los relacionados con el estadio de maduración celular (CD34, CD45, CD117) (36,39).

Todas las células expresan marcadores que revelan su estirpe linfóide, ya sea B o T dependiendo de estadio de maduración en el cual se encuentren. En casos de las leucemias agudas linfoblásticas de estirpe T, la expresión de marcadores característicos de los precursores de células T son generalmente suficientes para identificar las células leucémicas. En blastos de estirpe T la enfermedad mínima residual puede monitorizar, en la mayoría de los casos, buscando la expresión de dioxinucleotidiltransferasa terminal (TdT) o, menos común, la expresión de CD34 en combinación con otros antígenos de células T tales como CD3 y/o CD5; estos inmunofenotipos no se expresan en sangre periférica, en médula ósea ni en todos los pacientes con LAL de estirpe T o en individuos sanos (40). Para una mejor discriminación entre blastos y células normales se pueden buscar otros marcadores de células T que no se expresen en leucemias como es CD19 y CD33 o bien hacer búsqueda del antígeno CD99 el cual se expresa comúnmente en precursores linfoides T normales (40)

Las células B derivan de un progenitor linfóide común el cual se diferencia en la médula ósea. Existen tres estados de maduración de CD19 los cuales se expresan en los precursores de células B (BCP) los cuales se conocen como hematogonias tipo 1, tipo 2 y tipo 3 (pre-B-I, pre-B-II y células B inmaduras/transicionales) (41, 42). Los precursores de células B difieren en su fenotipo dependiendo de su estado de maduración, la más inmadura con las células pro-B las cuales son CD19-, CD10-, CD34+, TdT+ y CD22+ (43)

En la figura 3 se muestra una gráfica de puntos en la cual observamos la expresión de los marcadores de superficie dependiendo del estado de maduración de la célula B (44).

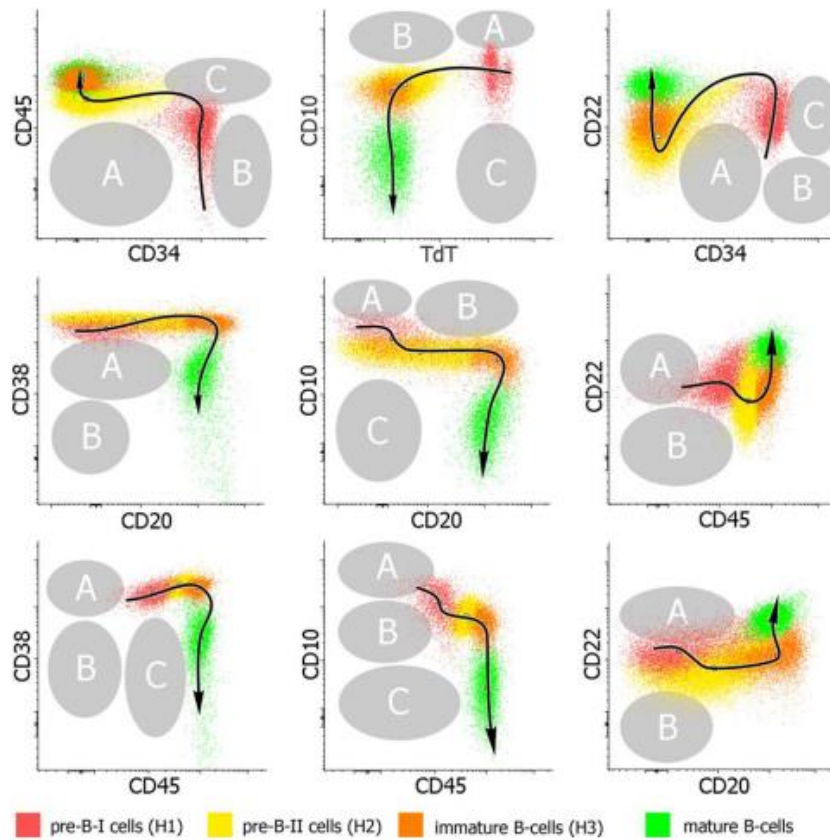


FIG. 3. Inmunofenotipo según estadio de maduración

La clasificación inmunológica de la leucemia linfoblástica aguda está basada en las características inmunofenotípicas de los blastos y se reconocen 4 subtipos. Los antígenos principales que se usan para el diagnóstico son: dioxinucleotidiltransferasa terminal (TdT), CD79a citoplasmático, CD19 de superficie y CD22, mientras que los antígenos CD10, CD20 y la inmunoglobulina M citoplasmática/superficie (IgM Sm/Cy) nos dará la diferencia entre los cuatro subtipos de BCP: pro-B, común, pre-B y pre-B transicional (45, 46)

Aunque sigue existiendo controversia acerca de los fenotipos de los $-B$ CD19-/CD34+, en la actualidad se acepta que éstos podrían expresar como marcador más temprano la enzima nuclear desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT). En una etapa inmediatamente posterior, el precursor B coexpresaría CD22 y CD10 de membrana e incrementaría de forma progresiva su reactividad para CD79a en el ámbito citoplasmático y de ésta manera adquiriría un fenotipo CD22+/CD10+/CyCD79a+/CD34+/TdT+ y CD19 negativo. A éste nivel puede observarse una expresión débil para los marcadores CD13 y CD33, asociados habitualmente a la línea mieloide; no obstante se trata de estadios maduros escasamente representados en la médula ósea normal por lo que la adquisición posterior de CD19 confiere el signo fenotípico inequívoco de diferenciación a célula B; esto se debe a que la positividad para CD19 se mantiene estable, junto a la de CyCD79a, durante la maduración a linfocito B. Por todo ello, asociado al hecho de que la mayoría de las LAL del

adulto son CD19+, para la definición de línea B, habitualmente en las LAL se requiere de la coexpresión de CD19 y CyCD79a en las células leucémicas.

Los blastos difieren fenotípicamente de las hematogonias normales, esto significa que el inmunofenotipo de los blastos es aberrante y no corresponde completamente a ningún estadio de maduración de las hematogonias normales. Los BCP, especialmente en altas proporciones, pueden causar confusión en el diagnóstico ya que es difícil distinguirlas de los blastos en estadios muy tempranos y en la cuantificación de enfermedad mínima residual durante el transcurso del tratamiento (49). Se ha reportado que en ciertas condiciones el número y porcentaje de BCP en médula ósea es elevado y constituye entre el 5% y 50% de todas las células en médula ósea. Esto puede suceder, sobretodo, después de trasplante de células hematopoyéticas, después de quimioterapia, en hemorragia aguda significativa así como también cuando hay presencia de otras enfermedades como patología autoinmunes o infección por VIH (49-51). Los blastos leucémicos no están únicamente privados de la maduración normal si no que también muestran diferentes patrones de expresión antigénica cuando son comparados con su contraparte; esto se manifiesta en la sobre expresión, subexpresión o expresión asincrónica de antígenos particulares. Los antígenos que están presentes tanto en blastos como en BCP normales son: CD10, TdT, CD34, CD45, CD38, CD20 y CD22. Sin embargo la expresión de CD34 pero con TdT negativo (marcadores de inmadurez) se expresan únicamente en células H1 (pre-B-1) en la médula ósea normal (44). La expresión de éstos y de otros antígenos presentes en las BCP, van cambiando gradualmente durante la maduración de las células B. En diferentes estudios se ha demostrado que la expresión de TdT es sostenida en los blastos de células leucémicas (a diferencia de la baja regulación durante la maduración de los precursores de las células B normales) la cual es positiva en el 97.6% de los casos que presentan CD10- y CD10+, sin embargo esta expresión es significativamente baja en las células H1 (44). Estos resultados fueron confirmados en el estudio de citometría de flujo de Seegmiller et al (49) y en estudios de microscopia por inmunofluorescencia (52). Porcentajes similares de blastos con CD34 positivos fueron reportados en esos estudios así como la expresión de CD45, CD10, CD38, CD20 y CD22. Sin embargo se encontró una ligera diferencia en el porcentaje de casos que presentaban blastos positivos para CD22 los cuales fueron reportados en el 78.8% de los casos de los pacientes con LAL común y pre-B (CD10 positivos) y en un 71.4% de los pacientes con LAL pro-B (CD10 negativo) (44)

Se reconoce que, desde los precursores B CD19+ más inmaduros, la diferenciación a linfocito B está asociada a cambios bruscos o graduales en la expresión de diferentes antígenos de membrana e intracelulares que en su conjunto permiten la identificación de 3 etapas bien definidas (53):

1. Expresión de antígenos panB como CD19, CD22 y CyCD79a, junto con marcadores de inmadurez como CD34, TdT y CD10 así como expresión elevada de CD38, en ausencia de reactividad para Ag asociados a células B maduras como son Cylg y CD20 (54, 55, 56)
2. En su maduración posterior, éstas células pierden la expresión de CD34 y TdT así como también disminuyen su reactividad para CD10, a la vez que muestran una expresión heterogénea y progresivamente mayor de CD45 y CD20; en ésta etapa los precursores B producen cadenas pesadas mu que se acumulan en el citoplasma hasta

que se sintetizan las cadenas ligeras y se producen moléculas IgM completas que se expresan en la superficie de los linfocitos B funcionalmente inmaduros (57).

3. Posteriormente los precursores B dejan de expresar CD10 y disminuyen progresivamente la expresión de CD38 así como también incrementan los valores de positividad para CD45 hasta alcanzar una expresión similar a la de los linfocitos maduros; de forma transitoria pueden expresar CD5 (55, 56). De forma paralela, el precursor T tímico (CD34+, CD7+ y CyCD3+) presenta un proceso de maduración caracterizado por la adquisición de expresión para otros marcadores panT como CD2 y CD5, seguido de coexpresión de CD4, CD8 y CD1a (58, 59); en las últimas etapas de la maduración tímica, el precursor T adquiere reactividad para CD3 en su membrana junto a expresión de CD4 o CD8 (56, 57, 58).

En la figura 4 se representa la secuencia de expresión antigénica que se observa durante la maduración de precursores B de médula ósea normal a un linfocito B maduro.

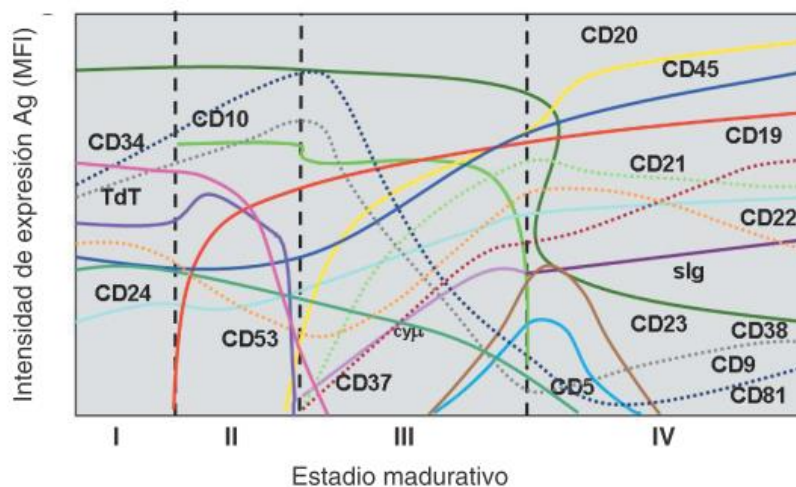


FIG. 4. Secuencia de expresión antigénica en la maduración de precursores B

3.3 Clasificación inmunofenotípica de Leucemia Linfoblástica Aguda en el adulto

Actualmente la LAL del adulto se clasifica de acuerdo a la línea de blastos leucémicos en LAL-B y LAL-T, según expresen marcadores asociados de forma estrecha a la diferenciación B y T; la expresión de estos fenotipos precede incluso al reordenamiento de los genes de las inmunoglobulinas y del receptor de la célula T (TCR), lo que contribuye a conferir a los estudios inmunofenotípicos una mayor utilidad en la subclasificación de línea de las LAL respecto a los análisis moleculares.

3.3.1 Clasificación inmunofenotípica de la LAL-B

Para el diagnóstico de LAL-B se requiere de la coexpresión de al menos 2 de los antígenos más tempranos de línea B (CD19, CD22 y CyCD79a) y se clasifican de acuerdo al estadio madurativo de las células neoplásicas en 4 subgrupos diferentes: a) LAL pro B o BI, b) LAL común o BII, c) LAL pre B o BIII, d) LAL madura o BIV (tabla 1) (53, 60)

TABLA 1

Clasificación inmunofenotípica de las leucemias agudas linfoblásticas (LLA) de precursores B (LLA-B) y T (LLA-T) según el grupo EGIL (European Group for the Immunological Classification of Acute Leukemias)

Línea	Subtipo	Características fenotípicas
LLA-B	Pro B (BI)	CD19+, CyCD79a+ y/o CD22+; CD10-, Cylgμ-, slgM-
	Común (BII) Pre B (BIII) B (BIV)	CD10+, Cylgμ-, slgM- Cylgμ+, slgM- slgM+
LLA-T	Pro T (TI) Pre T (TII)	CD7+, CyCD3+ CD7+, CyCD3+; CD2+ y/o CD5+ y/o CD8+
	T cortical (TIII)	CD7+, CyCD3+, CD1a+
	T medular (TIV)	CD3+ y CD1a-; CD7+

La LAL Pro B se caracteriza por expresar Ag de línea B en ausencia de reactividad para CD10 e Ig; en la mayoría de los casos se observa coexpresión del marcador de inmadurez CD34. En conjunto la LAL pro B representa alrededor de un 10% de las LAL-B del adulto (53, 61). La naturaleza aberrante de este fenotipo pro-B podría contribuir a explicar la mayor frecuencia de leucemias con alteraciones 11q23 (gen MLL) observada entre este subgrupo de LAL pro-B y su peor pronóstico (53, 62, 63)

La LAL-B común es el grupo fenotípico de LAL más frecuente, tanto en niños como en adultos, donde representa alrededor de un 70% de los casos (53, 64). A diferencia de lo que ocurre en los niños, en el adulto, este fenotipo se asocia a mal pronóstico debido a que en éste subgrupo se incluyen, junto a la LAL hiperdiploides, aquéllas con t(9;22), siendo rara la t(12;21) (53, 65). Fenotípicamente los blastos de éste subgrupo de LAL-B se caracterizan por expresar antígenos pan B junto a CD10, en ausencia de Cylg y slg. Además la mayoría de los casos son CD24+, CD34+ y TdT+ (66).

La LAL pre B se define por la presencia de cadenas pesadas mu de las Ig a nivel citoplasmático en ausencia de Ig en la superficie de los blastos, independiente de la expresión de CD10 (53); en este sentido la mayoría de los casos de LAL pre B muestra fenotipo CD10+, HLADR* y CD34- asociado a expresión variable de otros marcadores como CD20 y TdT (53, 67). En alrededor de una cuarta parte de los adultos clasificados en este subgrupo se detecta la presencia de t(1;19) y en menor medida de t(8;14) (q11.2;q32) con reordenamiento del locus IGH en ausencia de alteraciones en el gen c-MYC (53).

La LAL-B madura representa el subgrupo menos frecuente (<5%) y en adultos se asocia a una tasa proliferativa elevada y mal pronóstico (53, 68); además estos pacientes presentan reordenamientos del gen c-MYC en los que el cromosoma 8 está implicado en distintas translocaciones que afectan a los genes de las inmunoglobulina como sería la t(8;14) (q24.1;q32)

(53). Desde el punto de vista fenotípico las células leucémicas muestran expresión de IgM en la superficie o cadenas ligeras kappa o lambda en el citoplasma celular; suelen expresar CD19, CD20, CD22 y CD24 junto a expresión débil de BCL-2 en ausencia o no de CD10 (53, 69)

3.3.2 Clasificación inmunofenotípica de LAL-T

Las LAL-T se definen por presentar expresión de superficie o citoplasmática de CD3 junto a otros marcadores pan-T como CD7 y en menor medida CD2 y CD5; aunque ninguno de éstos 3 últimos marcadores es suficiente para asignar las células blásticas a la línea T, la demostración de su expresión junto a CD3 resulta imprescindible para éste fin, siendo la gran mayoría de las LAL-T CD7+ (53, 70). La coexpresión de Ag asociados a línea mieloide, como CD13 y CD33, y en menor medida CD15 y CD65, es un hallazgo relativamente frecuente entre las LAL-T del adulto; éste tipo de leucemias con frecuencia marcan baja reactividad para CD34 y HLADR, y ambos marcadores se han relacionado con pronóstico adverso en los adultos (53, 71)

De acuerdo con el patrón de diferenciación tímica las LAL-T se subclasifican en 4 subgrupos: a) LAL pro T, b) LAL pre T, c) LAL-T o cortical y d) LAL-T madura (Tabla 1) (53)

En la LAL pro T las células muestran coexpresión de CyCD3 y CD7 de elevada intensidad en ausencia de otros marcadores T de membrana como CD3, CD2, CD5, CD4 y CD8, asociados a expresión variable de CD34, CD38, CD29, CD96, CD16, CD57 y HLADR; con frecuencia se detecta coexpresión de TdT y CD6. Algunos autores han asociado este fenotipo a un peor pronóstico (53)

La LAL pre T se caracteriza por presentar, junto a expresión de TdT, CyCD3 y CD7, habitualmente en ausencia de CD3 de superficie, otros Ag de células T como serían CD5 y CD8 (53).

La LAL-T cortical se define por la expresión del Ag CD1a junto a positividad citoplasmática y/o de membrana para CD3; además es característica la expresión de los maracdores pan T (CD7, CD2 y CD5) junto con expresión de CD4, CD8 y TdT. Hallazgos recientes indican que éste subtipo de leucemia T podría asociarse a un mejor pronóstico debido a su mayor suceptibilidad a la apoptosis inducida por el tratamiento. Desde el punto de vista citogenético, el fenotipo cortical se ha asociado con alteraciones del gen HOX11L2, como la t(5;14) (q35;q32) (53, 72)

La LAL-T madura se caracteriza por la expresión de CD3 de membrana junto al receptor T para Ag (TCR) de tipo aB, o menos frecuente a TCRgamma/delta, y expresión débil o negativa de TdT. En éstos pacientes la enfermedad se presenta en la forma de linfoma linfoblástico más que como una variante leucémica pura (72)

3.4 Utilidad Pronostica del Inmunofenotipo

Dentro de la LAL-B los fenotipos pro-B y B común se han asociado a un peor pronóstico debido fundamentalmente a la inclusión dentro de este subgrupo de pacientes de una importante proporción de casos con alteraciones citogenéticas en 11q23 y t(9;22) respectivamente (53, 72). Tanto la expresión de marcadores mieloides (CD13 y CD33) como de CD34 se han asociado a una respuesta peor a tratamiento estándar; no obstante hay bibliografías contradictorias a ésta aseveración

en las cuales se menciona que la expresión de Ag mieloides nos llevan a un pronóstico favorable; éstos resultados aparentemente contradictorios podrían deberse al hecho de que las LAL con alteraciones 11q23, 19p13 y t(9;22), relacionadas con un pronóstico particularmente adverso, muestran a su vez expresión de marcadores mieloides. De forma similar, el pronóstico desfavorable asociado a la expresión de CD34 pierde su significado cuando se consideran por separado los distintos subgrupos genéticos de LAL-B al asociarse la expresión de CD34 con t(9;22) (53, 71, 72)

La positividad para MDR1, CD10 y CD2 se relaciona con una mayor probabilidad de alcanzar remisión completa a las 4 semanas y un pronóstico favorable. El estudio GMALL del grupo alemán en el que el subtipo inmunológico de LAL-T constituye el factor pronóstico más relevante a la hora de predecir la supervivencia libre de enfermedad (SLE) de estos pacientes, en los que la LAL-T cortical mostraba un pronóstico favorable respecto a las LAL-T temprana y madura (53, 72, 73)

3.5 Enfermedad Mínima Residual

De los diferentes métodos ensayados para investigar la persistencia de EMR, el inmunofenotipo multiparamétrico por citometría de flujo es una de las estrategias más eficaces por su rapidez y sencillez (53, 74)

Para monitorizar la enfermedad mínima residual en leucemias agudas linfoblásticas de estirpe B buscar los antígenos presentes en células B inmaduras no es suficiente debido a que los progenitores de células B se encuentran normalmente en médula ósea, como ya se había comentado anteriormente; por lo que es necesario determinar la expresión de marcadores aberrantes o asociados a leucemia los cuales se pueden identificar en el 95% de los casos de LAL de estirpe B; el descubrimiento de dichos marcadores se hizo al comparar el inmunofenotipo de blastos de estirpe linfóide B con el inmunofenotipo de los progenitores linfoides normales (74). Un enfoque alternativo es utilizar matrices de expresión génica para la detección de diferencias en todo el genoma entre las células normales y los blastos y después validar los resultados utilizando anticuerpos específicos. Esta estrategia identificó a CD58 como un marcador útil en el estudio de enfermedad mínima residual en leucemias agudas linfoblásticas de estirpe B. por otro lado es importante mencionar que la interpretación de enfermedad mínima residual se puede ver afectada en el tratamiento de inducción a la remisión, sobre todo durante la 2° y 3° semana de tratamiento, cuando los progenitores normales de células B están ausentes debido a su extrema sensibilidad a la quimioterapia; por lo tanto se tiene la hipótesis de que la expresión de CD19 en células que también expresan CD10 y/o CD34 en el día +19 de inducción a la remisión son sugestivos de enfermedad mínima residual positiva (75, 76)

Una estrategia alternativa para la investigación de EMR por métodos inmunofenotípicos en la LAL-B se centra en la investigación de los patrones madurativos de las células B de la MO tras el tratamiento con quimioterapia. Entre otros parámetros se ha indicado que un incremento en la proporción de células B CD19+/CD34+ y/o CD19+/CD20- del total de células CD19+ en médula ósea se asocia con una mayor probabilidad de persistencia de EMR y recaída en LAL-B. Esto se debe a que en muestras de MO normal y/o de adultos con LAL-T en remisión completa morfológica y fenotípica, la proporción de células B inmaduras (CD34+ y CD20-) no supera el 14% en las células B totales y que un incremento por

encima de estas cifras en la MO e pacientes con LAL-B se relaciona con una mayor probabilidad de recaída significativamente mayor (75). No obstante, debe recalcar que éste tipo de estrategia solo puede aplicarse en MO regeneradas tras la administración de quimioterapia, ya que en la fase de regeneración de la línea B pueden observarse incrementos significativos de las formas más inmaduras (CD19+/CD10+/CD34+) sin que esto se traduzca en persistencia de EMR (75)

TABLA 3

Leucemias linfoblásticas agudas (LLA) del adulto: resumen de los resultados más relevantes de las series publicadas en las que se investiga la posible utilidad clínica de los estudios de enfermedad residual mínima

Publicación	Casos	Objetivo	Tipo de muestra	Punto de estudio y punto de corte	Conclusión
Campana et al ¹⁶³ (Blood 1990)*	3 LLA-B, 12 LLA-T (niños y adultos)	Predecir recaída	MO	Positivo/negativo	Factor pronóstico
Griesinger et al ⁶³ (B J Haematol, 1999)	70 LLA (52 LLA-B y 18 LLA-T) (niños y adultos)	Predecir recaída	MO	Día 14 final de inducción (LAIP+) y cualquier punto (>1% LAIP+) y secuencial	Factor pronóstico
Ciudad et al ¹¹³ (J Clin Oncol, 1998)	53 (37 LLA-B y 16 LLA-T) (24 niños, 29 adultos)	Predecir recaída	MO	Secuencial	Factor pronóstico
Malec et al ¹⁶⁴ (Leukemia, 2001)*	30 (28 niños y 2 adultos)	Predecir recaída	MO	Final de inducción (10^{-3} - 10^{-5})	Factor pronóstico
Sanchez et al ¹¹⁷ (B J Haematol, 2002)*	40 (niños y adultos)	Predecir recaída tras trasplante alogénico	MO	Días 30, 60, 90 y cada 2-3 meses	Factor pronóstico
Vidriales et al ¹¹ (Blood, 2003)	102 (73 LLA-B y 29 LLA-T) (adultos)	Predecir recaída	MO	Día 14 y final de inducción (10^{-3} - 10^{-4}) Día 19 (10^{-4})	Factor pronóstico
Krampera et al ¹⁶⁶ (B J Haematol, 2003)	53 LLA-T (adultos)	Predecir recaída	MO	Primer año de tratamiento	Factor pronóstico
Krampera et al ¹²¹ (Haematologica, 2006)	14 LLA-B (adultos)	Predecir recaída	MO	Varios puntos (10^{-3} - 10^{-4})	Factor pronóstico
Liu et al ¹⁶⁵ (Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi 2006)	98 LLA prec. B (niños y adultos)	Predecir recaída	MO	Final de inducción y a las 12 semanas (10^{-4})	Factor pronóstico

LLA-B: LLA de células precursoras B; LLA-T: LLA de células precursoras T; MO: médula ósea.
*Sin análisis separado de niños y adultos.

A diferencia de lo que ocurre en los niños, en la actualidad el número de series de pacientes con LAL del adulto, en los que se ha analizado la posible utilidad clínica de los estudios de EMR mediante técnicas inmunofenotípicas, es limitado (tabla 3). En gran parte de éstos trabajos se incluyen series mixtas con una proporción importante de población infantil, mientras que en otros trabajos se incluyen únicamente resultados preliminares en un número reducido de casos o tras el empleo de estrategias terapéuticas concretas, como el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (76)

En estudios realizados por el departamento de Medicina y Centro de Investigación del Cáncer en la Universidad de Salamanca se ha demostrado que tanto el incremento en los valores de ERM entre 2 estudios consecutivos, como el hallazgo de ERM > 0.1% se asociaban con mayor frecuencia a recidivas de la enfermedad a una SLE significativamente más breve; se han confirmado estos resultados de forma prospectiva en la serie más amplia de adultos referida hasta la fecha en la misma bibliografía y se ha constatado que la evaluación inmunofenotípica de ERM durante el tratamiento de inducción (días +14 a +35) permite la definición de diferentes categorías de riesgo en la LAL del adulto. El punto de corte más informativo al día +35 se situó en valores de EMR de 0.05% siendo éste parámetro el factor pronóstico individual más relevante a la hora de predecir recaídas seguido de la edad y de la cifra leucocitaria al momento del diagnóstico. En éste mismo estudio se demostró que los pacientes que presentaban valores de EMR en MO inferiores a 0.03% al día +14 del

tratamiento de inducción tenían un pronóstico favorable con una incidencia de recidivas significativamente inferior a los demás individuos (76).

Estudios recientes indican que la determinación de EMR por inmunofenotipo en diferentes puntos de seguimiento, durante el primer año de tratamiento, es un importante factor pronóstico a la hora de predecir recaídas eventuales en los pacientes. En éste sentido, en la actualidad se considera que el mejor momento para investigar persistencia de EMR es al inicio del tratamiento tras la primera fase de inducción a la remisión. Además, en los pacientes que serán sometidos a trasplante de células progenitoras hematopoyéticas de tipo alogénico es pertinente, a la hora de predecir una eventual recaída, la constatación de la remisión inmunológica de forma previa al trasplante. No debe de olvidarse que el hecho de realizar cuantificación de EMR en diferentes momentos del tratamiento nos ayuda a identificar pacientes con mayor riesgo de recaída (76).

4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La leucemia Linfoblástica Aguda es una neoplasia linfoproliferativa caracterizada por proliferación descontrolada de precursores linfoides B o T, cuyo tratamiento requiere dosis secuenciales de quimioterapia, inmunoterapia, anticuerpos monoclonales y trasplante de progenitores hematopoyéticos (1). En adultos, a pesar de que las tasas de remisiones completas son en general por encima del 85%, la supervivencia global aun continua siendo alrededor del 30-40% (2). La citometría de flujo es una herramienta que brinda una gran cantidad de información no solo al diagnóstico sino que en la actualidad permite realizar un seguimiento de la mayoría de las enfermedades hemato-oncológicas (3). Desde hace más de 15 años la citometría de flujo ha permitido clasificar las diferentes neoplasias hematológicas, logrando inicialmente diferenciar entre una neoplasia mielóide de una linfóide mediante marcadores básicos hasta contar en la actualidad con paneles extensos que permiten la identificación de los diferentes estados de madurez (4). En 2008, la Organización Mundial de la Salud actualizó su clasificación resaltando el papel de los diferentes métodos diagnósticos como la inmunohistoquímica, citogenética, la citometría de flujo y la biología molecular con la finalidad de identificar nuevas entidades (5). El fundamento de la citometría de flujo es poder identificar aquellas poblaciones clonales dentro de un nicho hematopoyético normal, debido a esto se han diseñado diversos paneles para identificación de aquellos leucocitos normales, reactivos o malignos. Uno de los paneles más utilizados es el EuroFlow (6). La estrategia inicial se basa en la identificación de una población específica inmadura (acute leukemia orientation tube: ALOT) y posteriormente la identificación de poblaciones específicas mediante paneles complementarios. Los marcadores CD45, CD34 y CD19 se utilizan inicialmente y posteriormente se combinan tanto con paneles de células B como de células T (7). En LLA la variante más frecuente es la LLA-estirpe B. Recientemente Naeem y colaboradores reportaron la expresión de los diferentes marcadores en 50 casos de LLA. Tanto el CD10 como el CD7 fueron los marcadores más sensibles para la estirpe B y T respectivamente (8). Gracias a los avances en el tratamiento de la LLA la identificación de marcadores como CD20 y CD19 se han vuelto prioritarios para buscar nuevas opciones terapéuticas (9). El objetivo principal de este estudio es la identificación de los diferentes patrones expresión de las células leucémicas en pacientes portadores de Leucemia Linfoblástica de novo atendidos en el Hospital General de México.

5 JUSTIFICACIÓN

La citometría de flujo ha encontrado amplia utilidad en áreas como la oncología, hematología, inmunología y biología celular. Es una técnica que permite realizar un análisis celular multiparamétrico de forma rápida, sensible, específica y es capaz de proporcionar información cuantitativa sobre cada célula en particular. La determinación del inmunofenotipo de las células leucémicas permite identificar, en primera estancia, la línea celular afectada (mieloide o linfoide), estirpe T o B y constituye, junto con las alteraciones citogenéticas, los principales criterios predictores de respuesta a tratamiento. La citometría de flujo es una herramienta diagnóstica aplicada en la mayoría de las enfermedades hematológicas, su utilidad se basa en un análisis cuantitativo tanto de estructuras celulares, compartimientos o la funcionalidad celular. En leucemias se utilizan diversos anticuerpos monoclonales unidos a fluorocromos que en un corto tiempo pueden dar información sobre la coexpresión de diversos antígenos en las membranas celulares. El inmunofenotipo representa una herramienta útil al momento del diagnóstico debido a que nos permite la detección de antígenos presentes en las distintas etapas de maduración del blasto linfoide (pro-B, B común, pre-B y B madura), de ésta manera podemos conocer cuáles son los marcadores antigénicos más frecuentes y así utilizar terapias blanco contra dichos antígenos (Rituximab, Blinatumomab, Muromonab). La evaluación de la EMR ofrece la posibilidad de identificar tempranamente a los pacientes en riesgo de sufrir recaídas y se considera un factor de riesgo independiente asociado a baja supervivencia libre de enfermedad. Las técnicas de detección de EMR se caracterizan por tener alta especificidad, alta sensibilidad (identifica una célula anormal por cada 10 000 células normales) y tiene aplicabilidad para la mayoría de los pacientes en estudio así como también se considera una prueba sencilla y de ella obtenemos resultados de manera rápida para la aplicación clínica y tratamiento del paciente. La detección de la EMR es de alto valor pronóstico en enfermedades hematológicas malignas como la leucemia linfoblástica aguda debido a que se correlaciona de manera significativa con la evolución del paciente y se considera un indicador directo de la respuesta al tratamiento y en consecuencia un factor de predictor de recaída, la información que provee contribuye a la identificación de grupos en riesgo de sufrir recaída lo cual permite que el médico tome decisiones sobre la terapéutica a seguir.

6 HIPOTESIS

Actualmente el inmunofenotipo no sólo se ha incorporado como una importante herramienta diagnóstica si no que también se ha incorporado como herramienta pronóstica debido a que la detección de pequeñas clonas de células leucémicas durante el tratamiento impacta con el seguimiento del paciente. Debido a que el primer análisis es de tipo descriptivo no cuenta con hipótesis por lo que ésta se realiza para el estudio número 2:

- Si un paciente durante su seguimiento presenta expresión de clonas leucémicas mayor de 0.01%, entonces presentará recaída a médula ósea, sistema nervioso central o algún otro sitio extramedular de manera más temprana en comparación con aquellos que presenten enfermedad mínima residual considerada como negativa.

7 METODOLOGÍA

7.1 Material y Métodos

Diseño del estudio. Se realizó un estudio retrospectivo observacional basándose en los registros de inmunofenotipos de pacientes portadores de Leucemia Linfoblástica de Novo desde marzo del 2010 hasta mayo del 2015

7.2 Metodología para la determinación del Inmunofenotipo y Enfermedad Mínima Residual

7.2.1 Fundamento

La citometría de flujo es un análisis multiparamétrico que nos permite el análisis de grandes cantidades de células marcadas por un fluorocromo cuando se hacen pasar individualmente por un fluido isotónico a través de una columna ante la incidencia de un rayo láser, lo cual origina una dispersión de luz y emisión de fluorescencia, misma que son recolectadas y transformadas en valores digitales.

7.2.2 Muestra Primaria

- Médula ósea: 3 ml
- Sangre periférica: 3 ml
- Las muestras deben de mantenerse a una temperatura de 18 a 22 °C, no refrigerar, se puede mantener la muestra hasta por 12 horas a temperatura ambiente

Muestras que no se pueden procesar:

- Volumen inferior al indicado
- Muestras coaguladas
- Muestras viscosas
- Muestras con tiempo de toma mayor a 24 horas
- Muestras hemodiluidas
- Muestras con formación de fibrina
- Muestras no identificadas o sin solicitud

7.2.3 Contenedor y aditivos

- Jeringa de plástico de 5 ml con 0.5ml de heparina
- Tubo color lavanda de 3 ml con EDTA

7.2.4 Instrumentos

- Citómetro de flujo con equipo de cómputo e impresora
- Preparador de muestras
- Agitador vortex
- Pipeta automática de 100 a 10 000 ml
- Pipeta automática de 10 a 100 ml
- Pipeta automática de 5 a 50 ml

7.2.5 Reactivos

- Anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromos
- Controles de isotipo
- Cyto-comp
- Flow-check
- Flow-set
- Inmunoprep
- Intraprep
- Solución salina isotónica
- Solución de PBS

7.2.6 Procedimiento

- Para antígenos de superficie:
 1. Hacer recuento total de leucocitos, lo mínimo que se requiere para su análisis son 2 000 leucocitos, además de un porcentaje de blastos por arriba de 20%
 2. Identificar los tubos de acuerdo al panel establecido
 3. Colocar el volumen del marcador utilizado en cada tubo
 4. Adicionar a cada tubo 100 microlitros de la muestra bien homogenizada
 5. Agitar en vortex aproximadamente 10 segundos
 6. Dejar reposar por 15 minutos en cámara oscura
 7. Pasar cada tubo por el preparador de muestras programado (ciclo de 35 segundos)
 8. Las muestras están listas para ser analizadas por el Citómetro de flujo

- Para antígenos intracelulares:
 1. Seguir los pasos 1 al 5 para marcar antígenos de superficie
 2. Adicionar 100 microlitros de reactivo 1 Intraprep (formaldehído) a cada tubo
 3. Agitar en vortex por 10 segundos

4. Dejar reposar por 15 minutos en cámara oscura
5. Lavar con 4 ml de pbs o solución salina a 2000 rpm por 5 minutos
6. Decantar sobrenadante y re suspender el botón
7. Adicionar por las paredes del tubo el reactivo 2 Intrapep (saponina)
8. Mezclar suavemente
9. Dejar reposar por 5 minutos en cámara oscuro
10. Adicionar los anticuerpos intracelulares, el volumen de acuerdo a la etiqueta
11. Mezclar en vortex por 10 segundos
12. Dejar reposar por 15 minutos en cámara oscura
13. Lavar con 4 ml de pbs o solución salina a 2000 rpm por 5 minutos
14. Decantar sobrenadante y adicionar 500 microlitros de solución salina conteniendo 0.5% de formaldehido
15. Las muestras están listas para ser analizadas en el Citómetro de flujo

8 ESTUDIO NO. 1 CITOMETRÍA DE FLUJO COMO HERRAMIENTA DIAGNÓSTICA EN LOS PACIENTES CON LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA

8.1 Objetivos

1. Establecer la frecuencia de expresión de los marcadores de superficie de los blastos linfoides en sus diferentes etapas de diferenciación en el momento del diagnóstico de los pacientes con leucemia linfoblástica aguda de novo en el Servicio de Hematología del Hospital General de México en un periodo de tiempo comprendido de marzo del 2010 a mayo del 2015.

8.2 Diseño del estudio

- Estudio retrospectivo, observacional, descriptivo, transversal y analítico

8.3 Criterios de Inclusión

1. Pacientes con diagnóstico reciente de Leucemia Linfoblástica Aguda de novo
2. Pacientes diagnosticados mediante los criterios de la FAB (French-American-British)
3. Pacientes que cuenten con inmunofenotipo al momento del diagnóstico (médula ósea o sangre periférica)

8.4 Criterios de Exclusión

1. Pacientes con Leucemia Aguda Mieloide o Bifenotípica
2. Pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda de recaída

8.5 Criterios de Eliminación

1. Pacientes quienes no cuenten con registro clínico completo
2. Pacientes quienes hayan abandonado tratamiento

8.6 Variables

Variable Dependiente		
Nombre de la variable	Tipo de variable	Medición
Etapas de diferenciación de blastos	Cualitativa ordinal	Pro B, B Común, Pre B, B Madura

linfoides		Pro T y Pre T
Operacionalización de la variable: Se define como la clasificación de las leucemias linfoblásticas agudas según el inmunofenotipo (marcadores nucleares y citoplasmáticos)		
Nombre de la variable	Tipo de variable	Medición
Presencia de CD19	Cualitativa dicotómica	1)Si 2)No
Nombre de la variable	Tipo de variable	Medición
Presencia de CD20	Cualitativa dicotómica	1)Si 2)No
Nombre de la variable	Tipo de variable	Medición
Presencia de CD22	Cualitativa dicotómica	1)Si 2)No

Variable Independiente		
Nombre de la variable	Tipo de variable	Medición
Edad	Cualitativa ordinal	0 – 10 años 11 – 20 años 21 – 30 años 31 – 60 años mayores de 60 años
Operacionalización de la variable: Se define como la edad cumplida en años		
Nombre de la variable	Tipo de variable	Medición
Género	Cualitativa dicotómica	Masculino Femenino
Operacionalización de la variable: Se define como el fenotipo asociado a caracteres sexuales primarios y secundarios		
Nombre de la variable	Tipo de variable	Medición
Material de estudio	Cualitativa dicotómica	Sangre periférica Médula ósea
Operacionalización de la variable: Se define como el lugar de obtención de la muestra que se estudia		

8.7 Análisis Estadístico

Se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 20.0, (IBM Chicago IL), posteriormente se realizó estadística descriptiva para establecer frecuencias y medias de expresión de los diferentes marcadores por inmunofluorescencia. Posteriormente se estratificaron los pacientes basándose en la media de edad y subgrupos, en cada uno se analizó frecuencias, medias y medianas. En la parte final del primer análisis se realizó un análisis factorial para identificar subgrupos de expresión de los diferentes clusters. El análisis No. 2 el cual se basó en el seguimiento de pacientes utilizamos la prueba de contraste de hipótesis mediante el estadístico chi-cuadrado considerándose una p significativa menor o igual a 0.05%

(95% IC), el contraste se realizó sobre la frecuencia de recaídas. Para el análisis de supervivencia se realizó una curva de Kaplan Meier y la significancia mediante un test log rank ($p = 0.05$, 95% IC).

8.8 Consideraciones Éticas

Se trata de un estudio que se compone de dos fases, primero un estudio retrospectivo, observacional y descriptivo seguido de una cohorte retrospectiva observacional en el cual se tomaron en cuenta pacientes con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda quienes fueron sometidos a tratamiento con quimioterapia de alta intensidad, dicho tratamiento se realizó bajo el consentimiento de cada paciente. Este protocolo se realizó de acuerdo a las normas establecidas por el Tratado de Helsinki y de Ginebra. Así como también será evaluado por el Comité de Ética del Hospital General de México. El protocolo de investigación se someterá a la aprobación del área de investigación para el trámite del mismo. Debido a que se trata de un estudio basándose en los registros clínicos activos no requiere de consentimiento informado.

8.9 Resultados

8.9.1 Características generales de los pacientes

Se estudiaron 208 casos con diagnóstico de Leucemia Linfoblástica Aguda de novo en base de los criterios morfológicos de la asociación Franco-Américo-Británica (FAB) y confirmado mediante citometría de flujo. Las muestras fueron colectadas tanto de médula ósea como de sangre periférica en aquellos casos los cuales la presencia de blastos fuera mayor del 20%.

Del total de las muestras, el 51.4% ($n= 107$) correspondieron al género masculino y un 48.6% ($n=101$) al género femenino. La media de edad fue de 32 años (rango de 2 a 88 años), siendo ligeramente mayor para el género femenino (36 años [rango 4 -88]) en comparación con el género masculino (29 años [rango 2-70]). Al realizar la diferencia de la media de edad entre los géneros, si se demostró una diferencia estadísticamente significativa ($p= 0.005$, 95% IC).

Al estratificar los pacientes acorde a la edad, la mayor frecuencia de pacientes se identificó en el grupo entre 30-60 años (36.5%), seguido del grupo entre 21-30 años (27.9%), 11-20 años (21.6%) y en menor frecuencia los mayores de 60 años (8.7%) y menores de 10 años (5.3%).

Excluyendo a los casos menores de 18 años, se reportaron en el grupo de > de 30 años un total de 94 casos (45.2%) y en el grupo de 18 -30 años un total de 86 casos (41.3%)

8.9.2 Características de las muestras

Alrededor de dos tercios de las muestras analizadas fueron de médula ósea (67.8%, $n= 141$) y un tercio correspondieron a sangre periférica (32.2%, $n=67$). El motivo de la decisión de la toma ya sea sangre periférica o de médula ósea dependió

principalmente del médico especialista, siendo los principales motivos; muestreo difícil o presencia de más de un 20% de Blastos en sangre periférica.

Cuenta de leucocitos al diagnóstico y diferencial de Blastos.

La media de Leucocitos al momento de la toma de muestra ya sea de sangre periférica o médula ósea fue 47.8 x 10³/mcl (rango de 0.1 – 900 x 10³/mcl). La media de leucocitos fue de 61 x 10³/mcl (0.1-900 x 10³/mcl) para aquellas muestras que se analizaron de sangre periférica y de 41.47 x 10³/mcl (0.1-423x 10³/mcl) para aquellas muestras analizadas de médula ósea, sin mostrarse diferencias significativas entre cada uno de ellos ($p=0.998$, 95% IC).

Blastos en Sangre Periférica- De las 67 muestras de sangre periférica, la media de blastos identificada en el frotis fue de 14% (0 – 98%), semejante a lo identificado en la sangre periférica de las muestras de médula ósea cuyo porcentaje de blastos fue de 15.9% (rango 0 -98%), sin tampoco identificarse diferencias significativas entre estos valores ($p=0.320$, 95% IC).

Blastos en Médula ósea: La media de blastos de las muestras de médula ósea entre los dos grupos no mostraron diferencias significativas: el conteo medio fue de 79.4% (rango 24-100%) para las muestras de sangre periférica y de 79.2% (21-100%) para las muestras analizadas de sangre obtenida de médula ósea ($p=0.986$, 95% IC).

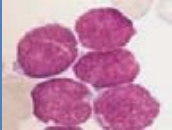
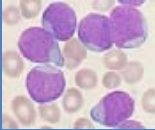
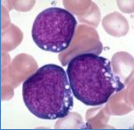
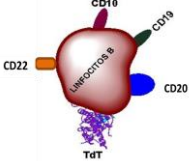
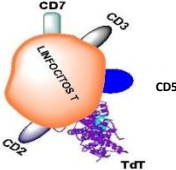
8.9.3 Clasificación de la FAB (referencia de la FAB).

El diagnóstico de Leucemia Aguda Linfoblástica se realizó a través del barrido de médula obtenida por punción o a través de la impronta de hueso en el caso de las médulas óseas de difícil toma, independientemente si la muestra de Inmunofenotipo fue analizada a través de médula ósea o sangre periférica. El subtipo FAB más frecuente fue la variedad L2 (81.3%, n= 169), seguido de la variante L3 o Burkitt like (5.3%, n=11) y L1 (2.4%, n=5). Del total de la muestra 23 solo contaron con el diagnóstico de LLA, sin identificarse algún subtipo específico de la FAB. Entre las principales diferencias identificadas entre los grupos de Inmunofenotipo de SP y MO fueron que la mayor parte de las variedades L1 se encontraron en el grupo de muestra de MO (80% vs 20%) y un mayor número de muestras no clasificables en el grupo de médula ósea (6.7% vs 4.3%). La frecuencia de la variante Burkitt like no mostró diferencias entre los grupos de muestras de médula ósea o sangre periférica (2.9% vs 2.4%).

Dentro de la estratificación por edad y contrario a lo esperado, la variedad L1 fue la menos frecuente en el grupo de 0-10 años (18.2%) siendo la más frecuente la variedad L2 dentro de todos los grupos de edad, solo se mostró un incremento en la variedad L3 en los casos de 0-10 años (27.3%) pero asociado posiblemente a la distribución de los casos (11 casos en total: 2 casos de LAL1, 6 casos de LAL2, 3 casos de LAL3).

8.9.4 Asociación entre la clasificación de la FAB y el Inmunofenotipo

La principal variante morfológica fue el subtipo L2, esta se presentó de manera constante en todas las etapas de diferenciación a excepción de los casos no clasificables por Inmunofenotipo, los cuales en su mayoría fueron subtipo LAL L3 (66.7%). Tanto para la variante B como T la principal variedad morfológica fue el subtipo L2 (82.1% para B y 75% para la variedad T), al igual que en los casos no clasificables por Inmunofenotipo la variedad LAL L3 fue más frecuente en la variante B que en la variante T en la que se describió un solo caso de Leucemia T vacuolar. La descripción de la división morfológica y su asociación con el Inmunofenotipo se describe en la Tabla 1.


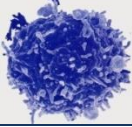
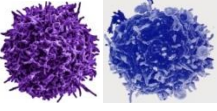
	LAL L1	LAL L2	LAL L3	NO CLASIFICABLE	TOTAL	
						
	Recuento T vs B (%) FAB (%) Total (%)	5 2.6% 100.0% 2.4%	160 82.1% 94.7% 77.3%	9 4.6% 90.0% 4.3%	21 10.8% 91.3% 10.1%	195 100.0% 94.2% 94.2%
	Recuento T vs B (%) FAB (%) Total (%)	0 0.0% 0.0% 0.0%	9 75.0% 5.3% 4.3%	1 8.3% 10.0% 0.5%	2 16.7% 8.7% 1.0%	12 100.0% 5.8% 5.8%

TOTAL	Recuento	5	169	10	23	207
	T vs B (%)	2.4%	81.6%	4.8%	11.1%	100.0%
	FAB (%)	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
	Total (%)	2.4%	81.6%	4.8%	11.1%	100.0%

Tabla 1. Tabla de contingencia TvB * FAB

En cuanto a la asociación entre la EGIL y la clasificación de la FAB, la principal variante morfológica identificada en el grupo de monfenotipo fue el subtipo L2 (82.1%, n=165) a diferencia de las bifenotípicas que se identificó en el 57.1% (n=4). La asociación entre los hallazgos morfológicos y el fenotipo se describen la Tabla 2.

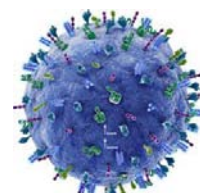
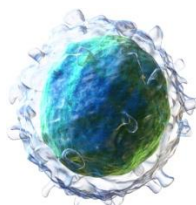
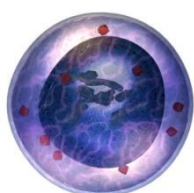
Tabla 2. Tabla de contingencia EGIL * FAB

		FAB				TOTAL	
		NO CLASIFICABLE	LAL L1	LAL L2	LAL L3		
EGIL	Monofenotipo 	Recuento	22	5	165	9	201
		EGIL (%)	10.9%	2.5%	82.1%	4.5%	100.0%
		FAB (%)	95.7%	100.0%	97.6%	81.8%	96.6%
		Total (%)	10.6%	2.4%	79.3%	4.3%	96.6%
	Bifenotipo 	Recuento	1	0	4	2	7
		EGIL (%)	14.3%	0.0%	57.1%	28.6%	100.0%
		FAB (%)	4.3%	0.0%	2.4%	18.2%	3.4%
		Total (%)	0.5%	0.0%	1.9%	1.0%	3.4%
		Recuento	23	5	169	11	208
		EGIL (%)	11.1%	2.4%	81.2%	5.3%	100.0%
		FAB (%)	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
		Total (%)	11.1%	2.4%	81.2%	5.3%	100.0%

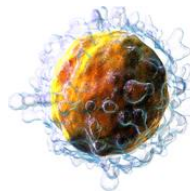
8.9.5 Resultado de Inmunofenotipo

Se contaron con 208 muestras viables de estas la variante más frecuente es la variedad B común (CALLA+) con un 80.8% (n= 168), seguida de la variedad B-madura (CD20+/CD10-IgMs+) con un 5.8% (n=12). La clasificación general de Inmunofenotipo se describe en la Tabla 3.

Tabla 3. Clasificación general de Inmunofenotipo



	PRO-B TdT CD19 CD79 CD22	B COMÚN TdT CD10 CD19 CD79 CD22	PRE-B CD19 CD79 CD22	B MADURA CD20 CD19 CD22 CD79
FRECUENCIA	10	168	3	12
PORCENTAJE	4.8	80.8	1.4	5.8
PORCENTAJE VÁLIDO	4.8	80.8	1.4	5.8
PORCENTAJE ACUMULADO	99	80.8	89.4	86.5



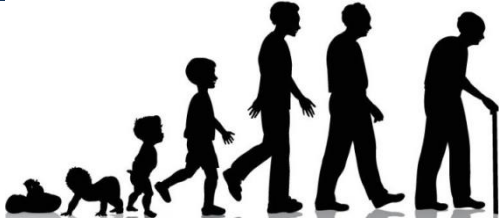
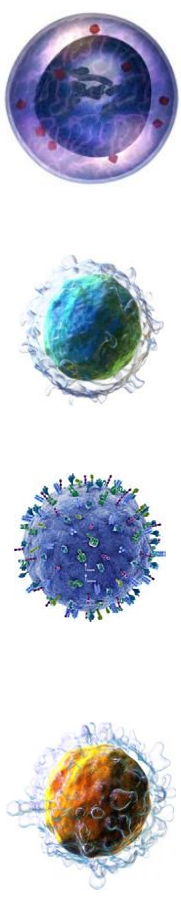
	PRE-T CD3 CD7 CD5	T-MADURA CD3 CD7
FRECUENCIA	10	2
PORCENTAJE	4.8	1.0
PORCENTAJE VÁLIDO	4.8	1.0
PORCENTAJE ACUMULADO	94.2	100.0

	FRECUENCIA	PORCENTAJE	PORCENTAJE VÁLIDO	PORCENTAJE ACUMULADO
*NO CLASIFICABLE	3	1.4	1.4	88
TOTAL	208	100.0	100.0	

8.9.6 Asociación entre el Inmunofenotipo y la edad

Al realizar un análisis entre las diferentes variedades fenotípicas de la leucemia en comparación con la edad, se identificó que la variante B común se mantuvo constante desde la edad pediátrica hasta la edad de adulto mayor (0-10: 72.7%, 11-20: 82.2%, 21-30: 81%, 30-60: 81.6%, > 60 años: 77.8%). Los resultados de la variedad T en su mayoría pueden ser influenciados por el número reducido de muestras en comparación con la variante B, la variante T fue más frecuente en los grupos entre 11-30 años. La distribución de las variantes de fenotipo leucémico (T v B) se describen en la Tabla 4.

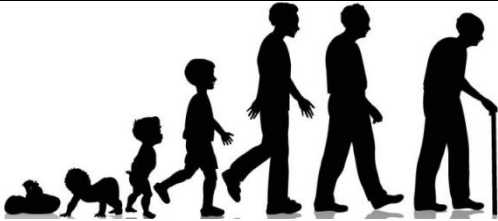

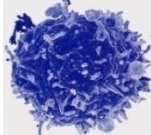

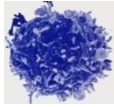
Tabla 4. Tabla de contingencia CLASIFICACIÓN * RANGO DE EDAD

							TOTAL	
		0-10	11-20	21-30	30-60	MAS DE 60		
	PRO B	Recuento	0	2	2	5	1	10
		Clasificación (%)	0.0%	20.0%	20.0%	50.0%	10.0%	100.0%
		Rango de edad (%)	0.0%	4.4%	3.4%	6.6%	5.6%	4.8%
		Total (%)	0.0%	1.0%	1.0%	2.4%	0.5%	4.8%
	B COMUN	Recuento	8	37	47	62	14	168
		Clasificación (%)	4.8%	22.0%	28.0%	36.9%	8.3%	100.0%
		Rango de edad (%)	72.7%	82.2%	81.0%	81.6%	77.8%	80.8%
	PRE B	Total (%)	3.8%	17.8%	22.6%	29.8%	6.7%	80.8%
		Recuento	0	0	1	2	0	3
		Clasificación (%)	0.0%	0.0%	33.3%	66.7%	0.0%	100.0%
	B MADURA	Rango de edad (%)	0.0%	0.0%	1.7%	2.6%	0.0%	1.4%
		Total (%)	0.0%	0.0%	0.5%	1.0%	0.0%	1.4%
		Recuento	0	3	4	4	1	12
	PRE T	Clasificación (%)	0.0%	25.0%	33.3%	33.3%	8.3%	100.0%
		Rango de edad (%)	0.0%	6.7%	6.9%	5.3%	5.6%	5.8%
		Total (%)	0.0%	1.4%	1.9%	1.9%	0.5%	5.8%
	T MADURA	Recuento	1	3	2	3	1	10
		Clasificación (%)	10.0%	30.0%	20.0%	30.0%	10.0%	100.0%
		Rango de edad (%)	9.1%	6.7%	3.4%	3.9%	5.6%	4.8%
	TOTAL	Total (%)	0.5%	1.4%	1.0%	1.4%	0.5%	4.8%
Recuento		0	2	2	5	1	10	
Clasificación (%)		0.0%	20.0%	20.0%	50.0%	10.0%	100.0%	
TOTAL	Rango de edad (%)	0.0%	4.4%	3.4%	6.6%	5.6%	4.8%	
	Total (%)	0.0%	1.0%	1.0%	2.4%	0.5%	4.8%	
	Recuento	11	45	58	76	18	208	
TOTAL	Clasificación (%)	5.3%	21.6%	27.9%	36.5%	8.7%	100.0%	
	Rango de edad (%)	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	
	Total (%)	5.3%	21.6%	27.9%	36.5%	8.7%	100.0%	

La distribución de la leucemia bifenotípica presentó un pico principalmente en el grupo de los 21 – 30 años (42.9%, n = 3) y posteriormente manteniéndose constante hasta la etapa de adulto mayor.

La distribución de las variantes fenotípicas acorde a los criterios de EGIL en comparación con la edad se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Tabla de contingencia EGIL * RANGO DE EDAD


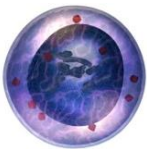
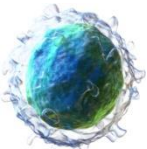
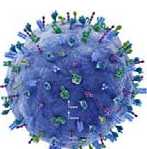
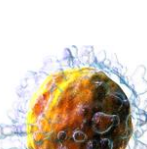


								TOTAL
			0-10	11-20	21-30	30-60	MAS DE 60	
EGIL	MONOFENOTIPO	Recuento	9	45	55	75	17	201
		EGIL (%)	4.5%	22.4%	27.4%	37.3%	8.5%	100.0%
		Rango de edad (%)	81.8%	100.0%	94.8%	98.7%	94.4%	96.6%
		Total (%)	4.3%	21.6%	26.4%	36.1%	8.2%	96.6%
	BIFENOTIPO	Recuento	2	0	3	1	1	7
		EGIL (%)	28.6%	0.0%	42.9%	14.3%	14.3%	100.0%
		Rango de edad (%)	18.2%	0.0%	5.2%	1.3%	5.6%	3.4%
	Total (%)	1.0%	0.0%	1.4%	0.5%	0.5%	3.4%	
		Recuento	11	45	58	76	18	208
		EGIL (%)	5.3%	21.6%	27.9%	36.5%	8.7%	100.0%
		Rango de edad (%)	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
		Total (%)	5.3%	21.6%	27.9%	36.5%	8.7%	100.0%

8.9.7 Expresión de los marcadores de citometría de flujo.

CD22.

La media de expresión del marcador de superficie CD22 fue de alrededor de un 62.8% (rango 0 – 99.8%), La frecuencia de positividad de este marcador fue de 86.1% (n=179). Siendo más frecuente en la variedad B común (92.9%). Dentro de las variantes T, solo 3 casos (30%) mostraron un mayor incremento en la expresión de CD22. La positividad acorde a cada uno de los estadios de diferenciación se describe en la Tabla 6.

Tabla 6. Tabla de contingencia CLASIFICACION * CD22

		 CD22		TOTAL	
		NEGATIVO	POSITIVO		
     	PROB	Recuento	5	5	10
		Clasificación (%)	50.0%	50.0%	100.0%
		CD22 (%)	17.2%	2.8%	4.8%
		Total (%)	2.4%	2.4%	4.8%
	B COMUN	Recuento	12	156	168
		Clasificación (%)	7.1%	92.9%	100.0%
		CD22 (%)	41.4%	87.2%	80.8%
		Total (%)	5.8%	75.0%	80.8%
	PREB	Recuento	0	3	3
		Clasificación (%)	0.0%	100.0%	100.0%
		CD22 (%)	0.0%	1.7%	1.4%
		Total (%)	0.0%	1.4%	1.4%
	B MADURA	Recuento	1	11	12
		Clasificación (%)	8.3%	91.7%	100.0%
		CD22 (%)	3.4%	6.1%	5.8%
		Total (%)	0.5%	5.3%	5.8%
	T MADURA	Recuento	7	3	10
		Clasificación (%)	70.0%	30.0%	100.0%
		CD22 (%)	24.1%	1.7%	4.8%
		Total (%)	3.4%	1.4%	4.8%
NO CLASIFICABLE	Recuento	2	1	3	
	Clasificación (%)	66.7%	33.3%	100.0%	
	CD22 (%)	6.9%	0.6%	1.4%	
	Total (%)	1.0%	0.5%	1.4%	
TOTAL	Recuento	29	179	208	
	Clasificación (%)	13.9%	86.1%	100.0%	
	CD22 (%)	100.0%	100.0%	100.0%	
	Total (%)	13.9%	86.1%	100.0%	

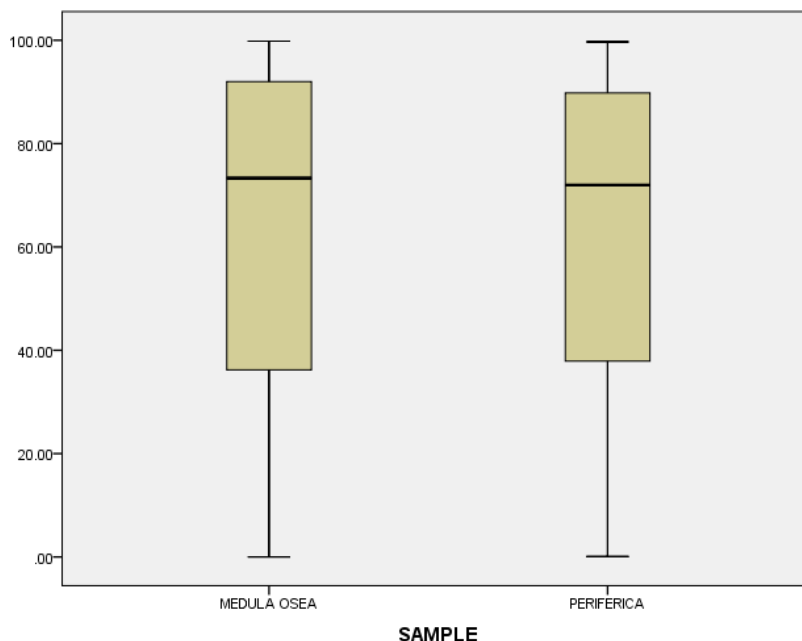
Edad: La media de expresión de CD22+ se mantuvo constante durante las diferentes edades, sin mostrar una diferencia significativa entre los grupos. Al realizar la diferencia de medias mediante el análisis de ANOVA para un factor inter grupos e intragrupos no se encontró una diferencia significativa entre la expresión de CD22+ en todos los grupos de edad ($p=0.859$, $F=0.032$, 95% IC)

Diferencias en la expresión de CD22 entre Inmunofenotipo de Sangre periférica y Médula ósea.

Se realizó una diferencia de medias mediante la prueba T-student entre la expresión CD22+ entre los inmunofenotipos de SP y MO, sin encontrarse tampoco diferencias significativas entre estos (62.30% versus 63.1%, $p=0.858$, $F=0.344$).

Las diferencias de expresión entre las muestras se pueden observar en la Gráfica 1.0.


Gráfica1. Diferencias entre expresión de CD22 MEDULA OSEA * PERIFERICA

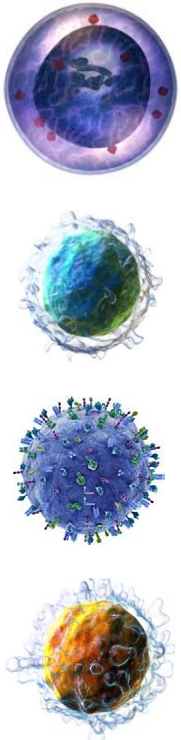


CD19.

La media de expresión del marcador de superficie CD19 fue de alrededor de un 76.1% (rango 0 – 99.9%), La frecuencia de positividad de este marcador fue de 87.5% (n=182). Siendo más frecuente en la variedad B común (96.4%). Dentro de las variantes T, solo 3 casos (30%) mostraron un mayor incremento en la expresión de CD19. La positividad acorde a cada uno de los estadios de diferenciación se describe en la Tabla 7.

Tabla 7. Tabla de contingencia CLASIFICACION * CD19

	 NEGATIVO POSITIVO	TOTAL

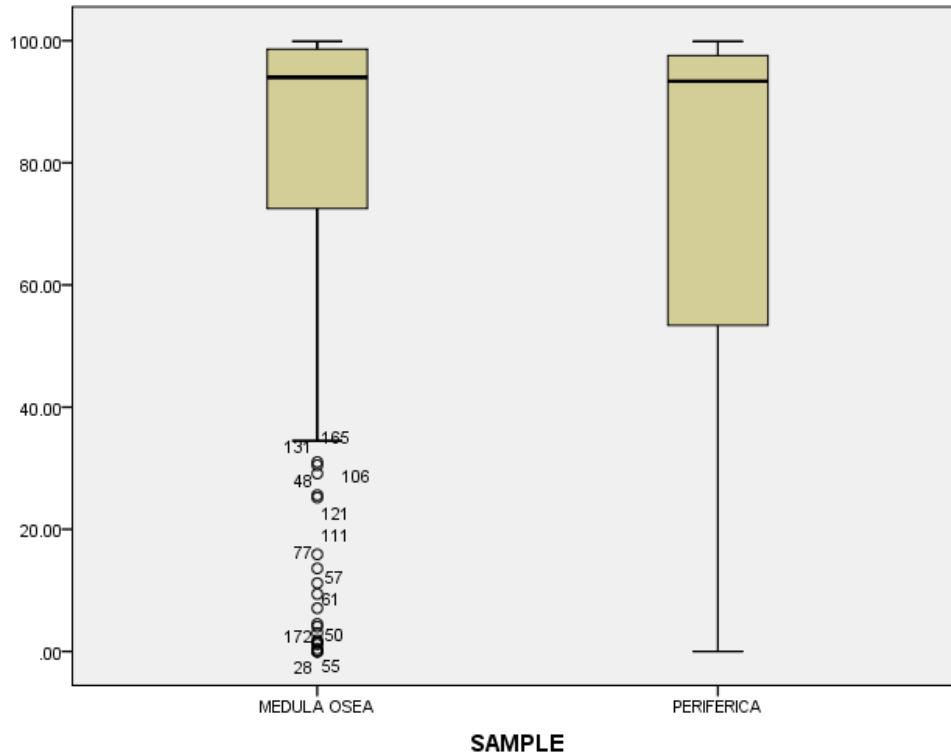
		Recuento	6	4	10
	PROB	Clasificación (%)	60.0%	40.0%	100.0%
		CD19 (%)	23.1%	2.2%	4.8%
		Total (%)	2.9%	1.9%	4.8%
		Recuento	6	162	168
	B COMUN	Clasificación (%)	3.6%	96.4%	100.0%
		CD19 (%)	23.1%	89.0%	80.8%
		Total (%)	2.9%	77.9%	80.8%
	PREB	Recuento	2	1	3
		Clasificación (%)	66.7%	33.3%	100.0%
		CD19 (%)	7.7%	0.5%	1.4%
		Total (%)	1.0%	0.5%	1.4%
	B MADURA	Recuento	1	11	12
		Clasificación (%)	8.3%	91.7%	100.0%
		CD19 (%)	3.8%	6.0%	5.8%
		Total (%)	0.5%	5.3%	5.8%
T MADURA	Recuento	7	3	10	
	Clasificación (%)	70.0%	30.0%	100.0%	
	CD19 (%)	26.9%	1.6%	4.8%	
	Total (%)	3.4%	1.4%	4.8%	
NO CLASIFICABLE	Recuento	2	1	3	
	Clasificación (%)	66.7%	33.3%	100.0%	
	CD19 (%)	7.7%	0.5%	1.4%	
	Total (%)	1.0%	0.5%	1.4%	
TOTAL	Recuento	26	182	208	
	Clasificación (%)	12.5%	87.5%	100.0%	
	CD19 (%)	100.0%	100.0%	100.0%	
	Total (%)	12.5%	87.5%	100.0%	

Edad: La media de expresión de CD19+ se mantuvo constante durante las diferentes edades, sin mostrar una diferencia significativa entre los grupos. Al realizar la diferencia de medias mediante el análisis de ANOVA para un factor inter grupos e intragrupos no se encontró una diferencia significativa entre la expresión de CD19+ en todos los grupos de edad ($p=0.689$, $F 0.169$, 95% IC).

Diferencias en la expresión de CD19 entre Inmunofenotipo de Sangre periférica y Médula ósea.

Se realizó una diferencia de medias mediante la prueba T-student entre la expresión CD22+ entre los inmunofenotipos de SP y MO, sin encontrarse tampoco diferencias significativas entre estos (74.8% versus 76.8%, $p = 0.682$, $F=1.199$). Los resultados se pueden observar en la gráfica 2.

Gráfica 2. Diferencias entre expresión de CD19 MEDULA OSEA * PERIFERICA

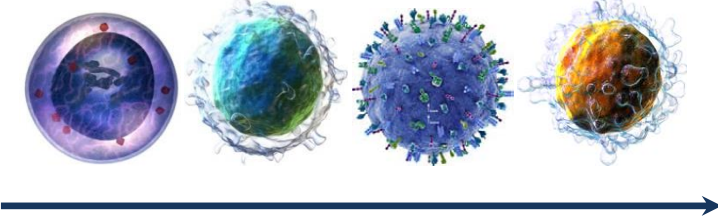



CD20

La media de expresión del marcador de superficie CD20 fue de alrededor de un 13.1% (rango 0 – 97.2%). La frecuencia de positividad de este marcador fue de 21.6% (n=45). Siendo más frecuente la expresión en el grupo que expresaba CD10 positivo (66.7%).

La positividad acorde a cada uno de los estadios de diferenciación se describe en la Tabla 9.



Tabla 8. Tabla de contingencia CD20 * CLASIFICACION



		PRO B	B COMUN	PRE B	B MADURA	T MADURA	NO CLASIF	TOTAL	
	NEG	Recuento	10	138	3	0	7	3	163
		CD20 (%)	6.1%	84.7%	1.8%	0.0%	4.3%	1.8%	100.0%
		Clasificación (%)	100.0%	82.1%	100.0%	0.0%	70.0%	100.0%	78.4%
		Total (%)	4.8%	66.3%	1.4%	0.0%	3.4%	1.4%	78.4%
	POS	Recuento	0	30	0	12	3	0	45
		CD20 (%)	0.0%	66.7%	0.0%	26.7%	6.7%	0.0%	100.0%
		Clasificación (%)	0.0%	17.9%	0.0%	100.0%	30.0%	0.0%	21.6%
		Total (%)	0.0%	14.4%	0.0%	5.8%	1.4%	0.0%	21.6%
TOTAL		Recuento	10	168	3	12	10	3	208
		CD20 (%)	4.8%	80.8%	1.4%	5.8%	4.8%	1.4%	100.0%
		Clasificación (%)	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
		Total (%)	4.8%	80.8%	1.4%	5.8%	4.8%	1.4%	100.0%

La positividad de CD20% también se asoció con la edad, mostrando una expresión pobre en los pacientes por debajo de los 10 años (2.2%, n=1), aumentando su expresión con relación a la edad siendo en mayor medida en aquellos mayores de 30 años (42.2%). La frecuencia acorde a las diferentes edades se presenta en la Tabla 10.

Tabla 10. Tabla de contingencia CD20 * RANGO DE EDAD

							TOTAL	
		0-10	11-20	21-30	30-60	MAS DE 60		
	NEGATIVO	Recuento	10	33	49	57	14	163
		CD20 (%)	6.1%	20.2%	30.1%	35.0%	8.6%	100.0%
		Rango de edad (%)	90.9%	73.3%	84.5%	75.0%	77.8%	78.4%
		Total (%)	4.8%	15.9%	23.6%	27.4%	6.7%	78.4%
	POSITIVO	Recuento	1	12	9	19	4	45
		CD20 (%)	2.2%	26.7%	20.0%	42.2%	8.9%	100.0%
		Rango de edad (%)	9.1%	26.7%	15.5%	25.0%	22.2%	21.6%
		Total (%)	0.5%	5.8%	4.3%	9.1%	1.9%	21.6%
TOTAL		Recuento	11	45	58	76	18	208
		CD20 (%)	5.3%	21.6%	27.9%	36.5%	8.7%	100.0%
		Rango de edad (%)	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
		Total (%)	5.3%	21.6%	27.9%	36.5%	8.7%	100.0%

8.10 DISCUSIÓN

El objetivo principal del estudio fue establecer la frecuencia de expresión de los marcadores de superficie para los que se han desarrollado nuevas estrategias terapéuticas mediante anticuerpos bi-específicos, Blinatumomab para CD19 y Eptaruzumab e Inotuzumab para CD22 (16,17). Dentro del primer análisis fue la identificación de la expresión en dos tipos de muestras la obtenida en Sangre Periférica y la médula ósea. A pesar de no existir diferencias significativas entre los dos marcadores el grupo de CD19 mostró una mayor cantidad de pacientes fuera de rango a diferencia de CD22. Estos datos concuerdan con la serie de Weinkauff y colaboradores en donde la presencia de más del 30% de Blastos circulantes brindan la misma información que las muestras realizadas de médula ósea (18). En otro reporte Rezaei y colaboradores identificaron en 13 pacientes con leucemia Linfoblástica identificaron también una correlación de los diferentes marcadores de superficie (CD3, CD5, CD7, CD19, CD22, CD20, CD10) (19). En el segundo análisis el objetivo principal se basó en la identificación de la etapa de maduración más frecuente. Semejante a otros ensayos la variedad más frecuente en nuestra serie fue la variedad BII (CD10 positivo) (80.8%). A pesar de ser la variante más frecuente la frecuencia de expresión no es constante en las diferentes poblaciones. Otros marcadores que se expresan con menor frecuencia como CD20(5.8% en nuestra serie) también muestran una distribución heterogénea alrededor del mundo.. El último análisis se basó en la identificación si la edad fue un factor que influyó en la expresión de los dos marcadores de superficie (CD19, CD22). Al analizar por estratos no se identificó una diferencia significativa en cuanto a la expresión de los dos marcadores pero los tres marcadores de superficie (CD19, CD20, CD22) mostraron un nivel de expresión menor en la población menor de 10 años en comparación con la de más de 60. Esto es esperado ya que la expresión de LLA-B (CD20+) es más

frecuente en adolescentes y adultos en comparación con pacientes pediátricos. La frecuencia de expresión de los marcadores de superficie en las diferentes series al igual que la expresión acorde a la edad se describen en la Tabla 3.0 (20-30). Finalmente la citometría de flujo se ha vuelto una herramienta indispensable ya no solo para el diagnóstico sino para el monitoreo de la Leucemia Linfoblástica. El conocimiento de estos marcadores de superficie ha permitido incorporar nuevas estrategias terapéuticas como la inmunoterapia. Desde su autorización por la FDA el anti-CD20 (Rituximab) se ha incorporado al tratamiento de los Linfomas como de las Leucemias Agudas (33). Este se encuentra en conjunto con otros anticuerpos monoclonales no conjugados (ofatumumab, alemtuzumab, epratuzumab), anticuerpos monoclonales combinados con agentes citotóxicos (inotuzumab ozogamycin y el SAR 3419) y anticuerpos biespecíficos (blinatumomab) (34). Inicialmente Thomas y colaboradores en el MD Anderson adiciono Rituximab al esquema Hyper-CVAD en pacientes con LLA-B (CD20+) Ph (-) mejorando la duración de la Remisión completa en especial en población joven (95% a 3 años) (35). Recientemente Maury y colaboradores evaluaron el efecto de Rituximab en un ensayo randomizado demostrando que su uso impacta sobre la supervivencia global (Hazard ratio,0.66; 95% IC) (36). Acerca de CD22, Kantarjian y colaboradores evaluaron el efecto del anti-CD22 (inotuzumab-Ozogamicin) en pacientes refractarios o en recaída identificando que tanto la tasa de remisiones completas fue mucho mayor en el grupo del anti-CD22 en comparación con el grupo control (80.7% v 29.4%) como la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad (37). El segundo anti-CD22 disponible es el epratuzumab, este se ha utilizado tanto en Linfomas como en Leucemias. Raetz et al evaluaron su eficacia en un estudio fase II en población pediátrica con leucemia refractaria en donde su combinación con la quimioterapia a dosis de 360mg/m2 semanalmente por 4 semanas y posteriormente dos veces por semana durante otras 4 dosis no mostró ventaja sobre la tasa de remisiones completas o reducción de la enfermedad mínima residual en comparación con los registros históricos (38). Similar a esto Chevallier et al lo incorporaron a un régimen de tratamiento en pacientes ancianos refractarios o en recaída sin mostrar resultados significativos (39). Pero tal vez el avance más significativo en la terapia biológica es el anticuerpo bi-específico Blinatumomab. Desde los estudios fase II en pacientes refractarios la terapia con Blinatumomab mostró ventaja en este tipo de población. Topp y colaboradores registraron una tasa de RC del 69% y de estos un 88% alcanzó una respuesta en la EMR (40). Gökbuget N et al evaluaron también el efecto de Blinatumomab en la mayor parte de los ensayos comparándolos con los registros históricos identificando que tanto la tasa de RC (43% v 24%) como la supervivencia (6.1 v 3.3 meses) fue el doble en el grupo de Blinatumomab en comparación con la corte histórica sugiriendo que es una de las mejores estrategias en pacientes refractarios o en recaída Ph (-) (41). Recientemente en un subanálisis se identificó su eficacia pero en adultos mayores (>65 años) alcanzando una semejante tasa de RC pero con una mayor incidencia de eventos adversos neurológicos (19%) (42).

En conclusión la expresión de los marcadores de superficie de las células leucémicas en la actualidad no solo es una herramienta diagnóstica, el conocimiento de la frecuencia de expresión de gran importancia en la actualidad ya que existen nuevas estrategias terapéuticas cuyo fundamento es la expresión de los diferentes marcadores de superficie.

9. ESTUDIO 2. ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL COMO HERRAMIENTA PRONÓSTICA EN LOS PACIENTES ADULTOS CON LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

9.1 Objetivos

1. Establecer la relación que existe entre la enfermedad mínima residual positiva y el porcentaje de recaída durante el seguimiento de los pacientes con leucemia linfoblástica aguda de reciente diagnóstico en el servicio de Hematología del Hospital General de México.

9.2 Diseño del Estudio

- Estudio retrospectivo, longitudinal, observacional anidado en una cohorte

9.3 Criterios de Inclusión

1. Pacientes mayores de 18 años con diagnóstico de Leucemia Linfoblástica Aguda
2. Pacientes quienes hayan recibido quimioterapia intensiva del protocolo institucional
3. Pacientes quienes cuenten con determinación seriada de enfermedad mínima residual a lo largo del tratamiento

9.4 Criterios de Exclusión

1. Pacientes con Leucemia Aguda Mieloide o Bifenotípica
2. Pacientes con alguna otra comorbilidad (Diabetes mellitus, Hipertensión arterial sistémica, etc)

9.5 Criterios de Eliminación

1. Pacientes quienes no cuenten con registro clínico completo
2. Pacientes quienes hayan abandonado tratamiento
3. Pacientes quienes no cuenten con determinación de enfermedad mínima residual seriada

9.6 Variables

Variable Dependiente		
Nombre de la variable	Tipo de variable	Medición
Recaída	Cualitativa nominal	1)Si 2)No
Operacionalización de la variable: Se define como la presencia >5% de blastos en médula ósea, EMR positiva, presencia de blastos en LCR o datos de infiltración leucémica extramedular		
Nombre de la variable	Tipo de variable	Medición
Sobrevida	Cualitativa nominal	1)Vivo 2)Muerto
Operacionalización de la variable: Se define como el estado actual en el cual se encuentra el paciente		

Variable Independiente		
Nombre de la variable	Tipo de variable	Medición
Edad	Cualitativa ordinal	0 – 10 años 11 – 20 años 21 – 30 años 31 – 60 años mayores de 60 años
Operacionalización de la variable: Se define como la edad cumplida en años		
Nombre de la variable	Tipo de variable	Medición
Estirpe	Cualitativa dicotómica	1)Estirpe B 2)Estirpe T
Operacionalización de la variable: Presencia de marcadores B o T en		
Nombre de la variable	Tipo de variable	Medición
Tipo de riesgo	Cualitativa dicotómica	Riesgo habitual Riesgo alto
Operacionalización de la variable: Riesgo Alto: > 35 años, > 30,000 leucocitos /mL, Infiltración a Sistema nervioso central al diagnóstico, expresión del oncogén BCR-ABL1, ausencia de respuesta a las 4 semanas de tratamiento.		
Nombre de la variable	Tipo de variable	Medición
Inmunofenotipo	Cualitativa ordinal	Pro B, B Común, Pre B, B Madura Pro T y Pre T
Operacionalización de la variable: Se define como la clasificación de las leucemias linfoblásticas agudas según marcadores nucleares y citoplasmáticos		
Nombre de la variable	Tipo de variable	Medición
Enfermedad mínima residual	Cualitativa dicotómica	1)Positiva 2)Negativa
Operacionalización de la variable: Se define como la presencia de blastos presentes detectados por citometría de flujo siendo positiva cuando es mayor o igual a 0.01%		

9.7 Análisis Estadístico

Se utilizó el software estadístico SPSS versión 20.0. La diferencia de medias entre edad y cuenta de leucocitos se estimó mediante la prueba T student. Para la prueba de contraste de hipótesis se utilizó el test Ji-Cuadrado considerándose significativo a un valor de $p < 0.05$ (95% IC). El análisis de supervivencia se realizó mediante el test Kaplan-Meyer, para la comparación de grupos en cuanto la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad se utilizó el test log-rank². Para la estimación del riesgo de recaída para los dos grupos de tratamiento como la utilidad de la EMR se utilizó el cálculo del Odds Ratio.

9.8 Resultados

9.8.1 Características generales de los pacientes

Se estudiaron 241 casos con diagnóstico de Leucemia Linfoblástica Aguda de diagnosticados bajo los criterios morfológicos de la asociación Franco-Américo-Británica (FAB) y confirmado mediante citometría de flujo. Se incluyeron solo a los casos que integraron remisión completa posterior a las 4 semanas de tratamiento (<5% blastos en médula ósea con cuenta de leucocitos y plaquetas normales). La profilaxis al Sistema Nervioso central se realizó mediante punciones lumbares al término de la inducción y posteriormente cada 2 meses hasta la etapa de mantenimiento.

Se realizó una comparación entre dos grupos, casos que habían recibido esquema de quimioterapia HGMLAL07 (211 casos) vs aquellos que se encontraban bajo tratamiento con esquema HGMLAL13/MEGATRON (30 casos). Dentro del grupo del esquema HGMLAL07 el 53.1% de los pacientes eran del género masculino (n=112) y 46.9% del género femenino (n=99), la media de edad fue de 31 años (rango de 16 a 66 años), en cuanto a la estratificación del riesgo, el 40.3% se catalogaron de riesgo estándar (n=85) y 59.7% de riesgo alto (n=126); solo en un paciente se reportó infiltración sistema nervioso central (0.5%) y el 3.8% con gen BCRABL1 positivo (n=8); la media de leucocitos reportados al momento del diagnóstico fue de $46.49 \times 10^3/\text{mcl}$ (rango $0.1-850 \times 10^3/\text{mcl}$). En el grupo de HGMLAL13/MEGATRON la media de edad fue de 25 años (rango 18.68 años) con mayor proporción de casos del género masculino 76.7% (n=23); el 43.3% de los casos se catalogaron como riesgo estándar (n=13) y riesgo alto el 56.7% (n=17). Ningún paciente con infiltración a sistema nervioso central ni con presencia del gen BCRABL1. Las características generales se describen en la tabla 11.

Tabla 11. Características generales de los pacientes

	HGMLAL07 n = 211	MEGATRON n = 30	Valor de P
Edad (años)	31 (16 -66)	25 (18-68)	0.067
Género			
Hombre (%)	112 (53.1)	23 (76.7)	
Mujer (%)	99 (46.9)	07 (23.3)	
Riesgo			
Estándar (%)	85 (40.3)	13 (43.3)	
Alto (%)	126 (59.7)	17 (56.7)	
WBC (x 10 ³ /mcl)	46.49 (0.1-850)	31.14 (0-151)	0.366
Infiltración SNC (%)	1 (0.5)	0	
BCRABL1 positivo (%)	8 (3.8)	0	
Recaídas (%)	104 (49.3)	6 (20)	
Recaída a médula ósea (%)	99 (95.2)	5 (83.3)	
Recaída a SNC (%)	5 (4.8)	1 (16.7)	

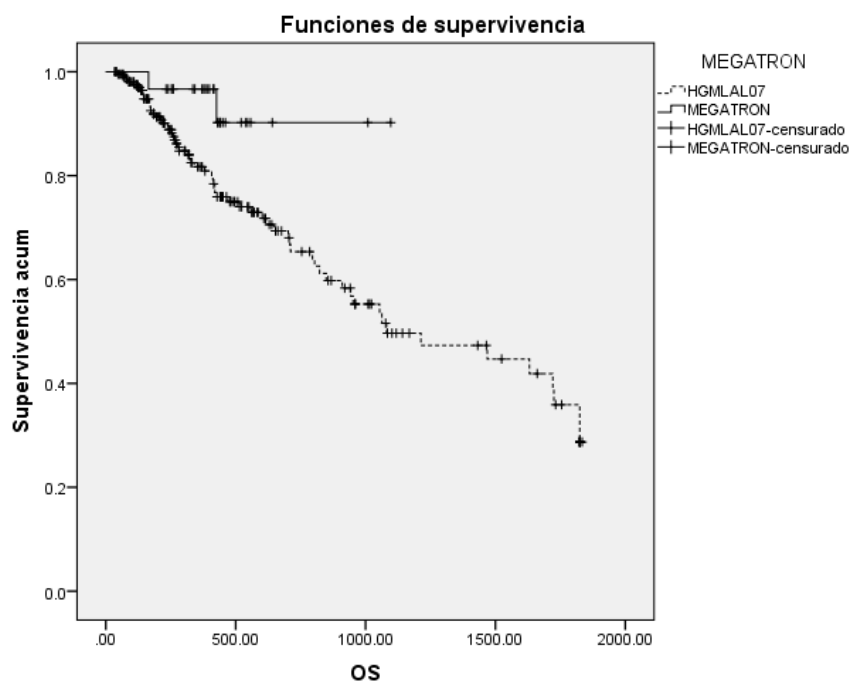
9.8.2 Factores pronósticos asociados a la supervivencia

La media de supervivencia global (OS) fue de 526 días (rango 33-1834 días) para el protocolo HGMLAL07 a diferencia de 443 días para el protocolo HGMLAL13/MEGATRON (rango 164- 1097 días). A 1000 días de seguimiento la supervivencia fue 52% para el HGMLAL07 y 91% para el HGMLAL13/MEGATRON. Se registró una diferencia significativa en cuanto a la supervivencia entre los dos protocolos ($p= 0.046, 95\%$ IC). Se registró también una diferencia entre la supervivencia libre de enfermedad entre los dos grupos ($p=0.015, 95\%$ IC). La curva de supervivencia global se describe en la Figura 2.0. El tipo de tratamiento fue la única variable que impacto directamente con el pronóstico siendo favorable para el protocolo HGMLAL13/MEGATRON ($p=0.004, 95\%$ IC) lo cual traduce que el tipo de tratamiento nos confiere un factor protector para recaída. Los valores de Odds Ratio de las diferentes variables se describen en la Tabla 12

Tabla 12 Impacto de las variables en recaída

Variabes clínicas	OR (95% IC)	P value (95% IC)
WBC > 30 x 10 ³ /mcl	1.1640 (0.6811-1.9893)	0.578
Edad >35 años	0.9527 (0.5407-1.6785)	0.866
Riesgo alto	0.8545 (0.5102-1.4313)	0.550
Tipo de tratamiento	0.2572 (0.1010-0.6548)	0.004

Figura 2.0 Supervivencia de acuerdo al tipo de tratamiento



9.8.3 Factores pronósticos identificados en la cohorte HGMLAL13/MEGATRON

De los 30 pacientes tratados con el protocolo HGMLAL13/MEGATRON la mayoría correspondió a un riesgo elevado al diagnóstico (56.7%). Un 13.3% (n=4) contaba con más de 35 años al diagnóstico y un 40% (n=12) con más de 30 x 10³/mcl leucocitos. La EMR a la semana 12 de tratamiento se encontró positiva en un 73.3% de los casos (n=22), siendo positiva en todos los casos de más de 35 años (n=4). En el grupo de > 30 x 10³/mcl leucocitos la frecuencia de EMR positiva fue del 66.7% (n=8). De los 30 casos, 27 contaron con la detección de EMR a la semana 24. La frecuencia de EMR positiva disminuyó a un 33.3% (n=10) y se mantuvo con esta frecuencia (33.3%) hasta la etapa previa al mantenimiento (EMR semana 36). Al analizar los valores pronósticos para esta cohorte la edad >35 años se asoció con la recaída temprana (p=0.008, 95% IC) pero la positividad de la EMR tanto a la semana 12 como a la 24 se asociaron a la recaída. De los tres puntos de seguimiento en la EMR el de mayor riesgo fue a la semana 36 posterior al mantenimiento el cual se asocia con un 4.6 veces mayor riesgo de recaída. Los Odds Ratio de los factores pronósticos como de los puntos de corte de la EMR se presentan en la Tabla 13.

Tabla 13 Puntos de cohorte de la EMR

VARIABLES CLÍNICAS	OR (95% IC)	Valor de P (95% IC)
WBC > 30 x 10 ³ /mcl	1.6667 (0.2752-10.094)	0.578
Edad >35 años	0.0169 (0.0008-0.3573)	0.008
Alto riesgo	1.6923 (0.2588-11.065)	0.582
EMR semana12	2.0588 (0.2022-0.9603)	0.610
EMR semana24	2.0000 (0.3177-12.5885)	0.460
EMR semana36	5.6667 (0.8177-39.2689)	0.079

9.8.4 Resultados en el grupo de la AYA (16-39 años)

Se realizó un sub-análisis para identificar el beneficio dentro del denominado grupo de la AYA (16-39 años) entre las dos cohortes de pacientes. Se analizaron a 190 pacientes, 163 dentro de la cohorte del HGMLAL07 y 27 para la cohorte HGMLAL13/MEGATRON. La media de seguimiento fue de 1202 días. A pesar de no ser significativa (log Rank: 0.082) la supervivencia a 1000 días de seguimiento fue mejor en el grupo HGMLAL13/ MEGATRON (86% v 61%). Al analizar la supervivencia libre de enfermedad esta mostró una diferencia significativa entre los grupos a favor del esquema intensivo (p=0.046,95% IC). La supervivencia global como la supervivencia libre de enfermedad se describe en la Figura 4.

Figura 4 Sobrevida Libre de Enfermedad en el grupo de AYA

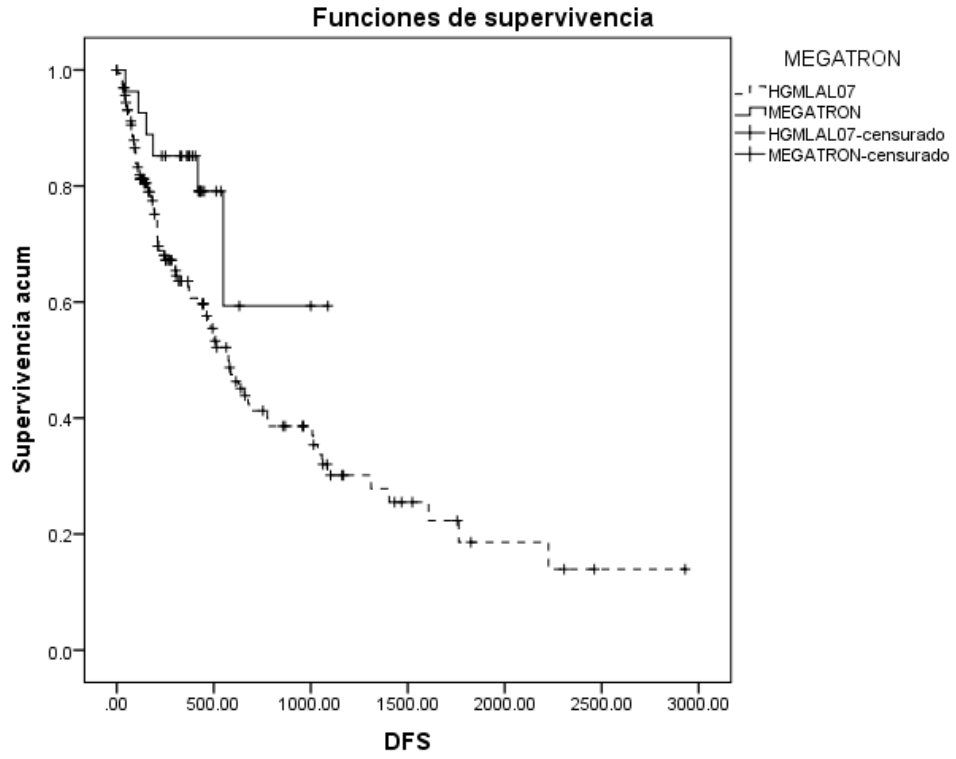
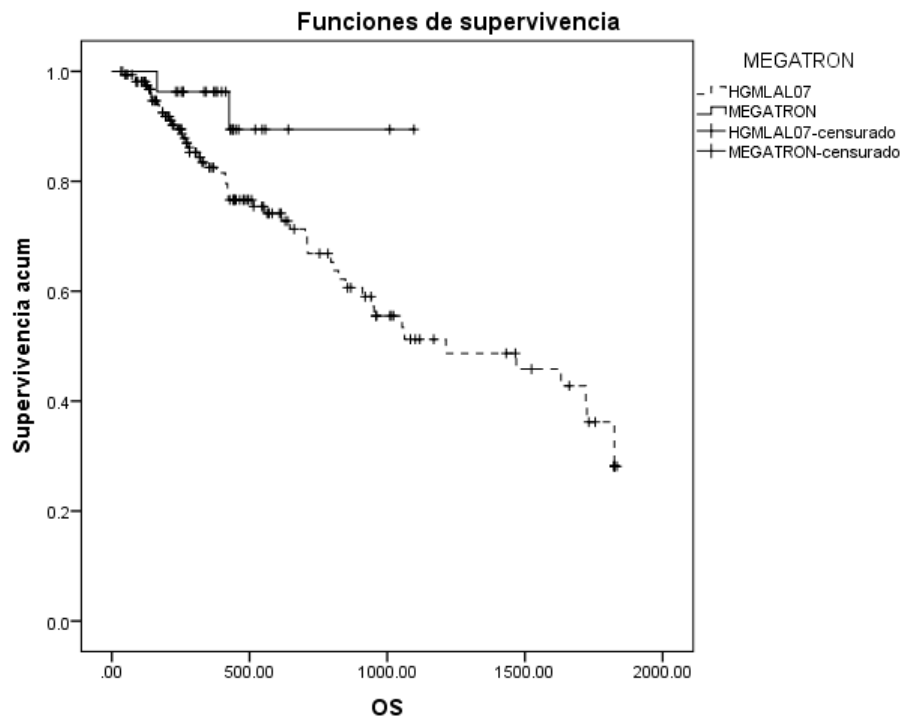


Figure 4. Sobrevida global en el grupo de la AYA



9.9.5 Recaídas

Del total de los pacientes, el 45.6% (n=130) presentó recaída, siendo el principal sitio la médula ósea, seguido de la infiltración al sistema nervioso central. En cuanto a la frecuencia de recaída entre los grupos de tratamiento, esta se presentó en menor frecuencia en el grupo del HGMLAL13/MEGATRON (n=6, 20%) en comparación con el protocolo HGMLAL07 (n=104, 49.3%). La recaída aislada a sistema nervioso central se registró en un caso del protocolo HGMLAL13/MEGATRON y en 5 del protocolo HGMLAL07 (4.8%). En un segundo caso del protocolo HGMLAL13/MEGATRON la recaída al sistema nervioso central se presentó posterior a la recaída en médula ósea. En la tabla 14 se presenta la frecuencia de recaídas.

Tabla 14 Frecuencia de recaídas

	HGMLAL07	MEGATRON
Recaídas (%)	104 (49.3)	6 (20)
Recaída a médula ósea (%)	99 (95.2)	5 (83.3)
Recaída a SNC (%)	5 (4.8)	1 (16.7)

9.10 Discusión

En la parte inicial de este estudio presenta la comparación del esquema institucional HGMLAL13/MEGATRON con el protocolo HGMLAL07. El objetivo principal fue la reducción de las recaídas principalmente durante el primer año de tratamiento seguido de la incorporación de la EMR como herramienta de monitoreo. Al tratarse de un protocolo inspirado en un régimen pediátrico la primera barrera fue la frecuencia de la dosis la cual es la variable de mayor relevancia de un protocolo pediátrico y que limita en gran medida que los especialistas de adultos implementen los esquemas pediátricos (24,25). Los adultos a diferencia de los pacientes pediátricos muestran una tasa de recuperación hematológica más lenta situación que se comprueba durante la movilización de progenitores hematopoyéticos ya que la combinación tanto de la edad como de dosis altas de quimioterapias con los principales factores asociados a una respuesta más lenta a los estimulantes (26,27). Esta situación se logró mejorar mediante la administración de los estimulantes a intervalos constantes durante la mayoría de los días de tratamiento (una o dos veces al día) e independientemente de la cifra de neutrófilos. La segunda modificación fue el uso de 6-MP, Metotrexate entre cada uno de los bloques de quimioterapias con la finalidad de mantener a los pacientes bajo una dosis constante de tratamiento semejante a la etapa de mantenimiento de la mayoría de los protocolos pediátricos.(28,29). Finalmente la última modificación fue en la etapa de mantenimiento, en donde se adicionó bloques secuenciales de quimioterapia con la finalidad de compensar la pobre adherencia asociada a los fármacos orales como la 6-MP en especial en la población hispana (30,31). Entre las diferencias con otros esquemas implementados previamente se encuentran principalmente la reducción en el número de recaídas tempranas a médula ósea lo que permite acceder a otras opciones como el trasplante de progenitores hematopoyéticos, pero tal vez la diferencia más importante fue la reducción de la mortalidad en pacientes bajo remisión. En un reporte previo se evaluó la eficacia del esquema Hyper-CVAD como esquema de primera línea siendo el principal limitante la mortalidad en pacientes en remisión asociados a la toxicidad hematológica (33), Semejante a nuestro reporte, diversas series alrededor del mundo también realizan esta consideración que compromete los resultados de este régimen intensivo (34-37). Dentro del segundo objetivo y al en su mayoría de pacientes dentro del grupo de la AYA fue establecer si la detección de la EMR secuencial tiene un valor significativo para el seguimiento. A pesar de que la estandarización de la detección de la EMR por citometría de flujo aun es una limitante para comparar a las diferentes series, su persistencia se asocia finalmente con una mayor tasa de recaídas y finalmente puede comprometer el éxito del trasplante de progenitores hematopoyéticos (38,39). En nuestra serie se realizaron tres puntos de corte principales (semana 12,24 y previo a mantenimiento). La persistencia de una EMR positiva (>0.01 %) en cualquiera de estas etapas se asoció con un mayor riesgo siendo mayor en la última etapa previo al mantenimiento. Otra de las consideraciones realizadas en nuestro régimen es que la intensidad del esquema se modificó acorde a el nivel de la EMR (semana 12 y semana 24) lo que tal vez redujo la posibilidad de recaídas durante la etapa de consolidación pero no así en el mantenimiento. Esto nos sugiere a que semejante al modelo pronóstico basado en el riesgo clínico (40), la EMR más que una herramienta de estratificación debería de considerarse como un indicador para la modificación del tratamiento en especial si se encuentra positiva en etapas tardías como el mantenimiento (41). Acorde a estos resultados consideramos que la monitorización de la EMR es de gran utilidad y brinda más información pronostica que otras variables como la cifra de leucocitos o inclusive la edad. Coincidimos con otros autores

de que el principal punto de corte pronóstico continuara siendo al final de la inducción, pero tanto a la semana 24 como previo al mantenimiento brinda información muy útil para la modificación del riesgo de los pacientes.

En general la incorporación de este tipo de régimen mostró resultados favorables y mejoró el pronóstico semejante a los resultados publicados hace más de 10 años de la cohorte francesa (FRALLE-93 v LALA-94), en donde la adición de una mayor dosis de esteroides (cinco veces), alcaloides de la vinca (tres veces) y Asparaginasa (20 veces) modificó la supervivencia (CR 94% vs. 83%, and EFS of 67% vs. 41% at 5 years respectivamente) (42), similar a esto el Dutch study reportó resultados semejantes entre su esquema intensivo pediátrico (DCOG) y su esquema de adultos (5-yr EFS of 69% v 34%) (43). Esto nos hace pensar que la intensidad al igual que la frecuencia de quimioterapia son los principales factores que mejoran el pronóstico en estos pacientes.

Finalmente otro punto para reflexionar fue lo descrito recientemente por Gzauskasy colaboradores al comparar el esquema Hyper-CVAD vs un esquema pediátrico, en donde a pesar de que el esquema pediátrico incremento la supervivencia redujo la QALY en especial en las etapas de inducción e intensificación, pero compensándose en etapas más tardías (44). Esto adaptándolo a nuestra población es un punto muy importante a pesar de no existir diferencias considerativas en cuanto el pronóstico si existieron en cuanto a los puntajes de calidad de vida ya que estos regimenes intensivos pediátricos requieren un mayor número de visitas o inclusive mayor tiempo de estancia hospitalaria situación que limita la calidad de vida de la mayoría de los individuos.

En conclusión, la LLA del adulto continua siendo un reto terapéutico el cual requiere una monitorización estrecha por lo que la detección de la EMR se ha vuelto una herramienta fundamental para el pronóstico, a su vez protocolos como este pueden utilizarse por médicos que no cuentan con experiencia en esquemas pediátricos ya que su monitoreo y administración es común para la mayoría del personal médico y de enfermería.

10 BIBLIOGRAFIA

1. Campo E, Swerdlow S, Harris N, Pileri S, Stein H, Jaffe E. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*.2011; 117: 5019-32
2. Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukemia. *Lancet*.2013;381 (9881): 1943-1935
3. Vasekar M, Allen JE, Joudeh J, Claxton D. Emerging molecular therapies for the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Ad Exp Med Biol*.2013;779:341-358
4. McGregor S, McNeer J, Gurbuxani S. Beyond the 2008 World Health Organization classification: the role of the hematopathology laboratory in the diagnosis and Management of acute lymphoblastic leukemia. *Semin Diagn Pathol*.2012; 29(1): 2-11
5. **Faderl S, O'Brien S, Pui CH, Stock W, Wetzler M, Hoelzer D , et al.** Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer*.2010;116 (5): 1165-76
6. Dores GM, Devesa SS, Curtis RE, Linet MS, Morton LM. Acute leukemia incidence and patient survival among children and adults in the United States, 2001-2007. *Blood*.2012;119 (1): 34 – 43
7. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Matehrs C, Parkin DM. Estimates of Worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*.2010;127 (12) : 2893-917
8. Tirado-Gómez L, Mohar-Netancourt A. Epidemiología de las Neoplasias Hemato-Oncológicas. *Cancerología*.2007;2: 109-20. Artículo en Español
9. González-Salas WM, Olarte-Carrillo I, Gutiérrez-Romero M, Montaña-Figueroa EH, Martínez-Murillo C, Ramos-Peñafiel CO. Acute leukemia frequency observed in a reference hospital. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*.2013; 50(2): 167-171
10. Jeha S. New therapeutic strategies in Acute lymphoblastic Leukemia. *Seminars in Hematology*.2009: 46 (1): 76 -88

11. Curado MP, Pontes T, Guerra-YI ME, Cancela Mide C. Leukemia mortality among children, adolescents, and young adults in Latin America. *Rev Panam Salud Publica*. 2011; 29 (2): 96 -102
12. Onciu M. Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematol Oncol Clin N Am*.2009; 23: 655-674
13. Arteaga-Ortiz L, Buitrón-Santiago N, Rosas-López A, Rosas-Arzate G, Armengolt-Jiménez A, Aguayo A, et al. Acute lymphoblastic leukemia: experience in adult patients treated with hyperCVAD and 0195 Protocol, at the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Cohort 2003-2007. *Rev Invest Clin*. 2008; 60 (8): 450-69
14. Ramos C, Rozen E, León M, Martínez T A, Olarte I, Castellanos et al. Results of treatment of acute lymphoblastic leukemia in two cohorts of Mexican patients. *Rev Med Chil*.2011; 139 (9): 1135 – 42
15. Rabin KR, Poplack DG. Management strategies in acute lymphoblastic leukemia. *Oncology*.2011; 25 (4): 328-35
16. Hoelzer D, Gökbuget N, Ottmann O, Pui CH, Relling MV, Appelbaum FR, et al. Acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*.2002:162-92
17. Fielding AK. Current therapeutic strategies in adult acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am*.2011; 25 (6): 1255 -79
18. Annino L, Vegna ML, Camera A, Specchia G, Visani G, Fioritoni G, Ferrara F,et al. Treatment of adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): long-term follow-up of the GIMEMA ALL 0288 randomized study. *Blood*. 2002;99(3):863-871
19. Rowe JM, Buck G, Burnett AK, et al. Induction therapy for adults with acute lymphoblastic leukemia: results of more than 1500 patients from the International ALL trial: MRC UKALL XII/ECOG E2993. *Blood*.2006;106: 3760-67
20. **Kantarjian H, Thomas D, O'Brien S**, et al. Long term follow-up results of hyperfractionated cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin, and dexamethasone (Hyper-CVAD), a dose-intensive regimen. In adult acute lymphocytic leukemia. *Cancer*. 2004;101:2788-2801
21. Gokbuget N, Hoelzer D, Arnold R, et al. Treatment of adult ALL according to protocols of the German Multicenter Study Group for Adult ALL (GMALL). *Hematol Oncol Clin North Am*.2000;14:1307-25
22. Larson RA, Dodge RK, Burns CP, et al. A five-drug remission induction regimen with intensive consolidation for adults with acute lymphoblastic leukemia. Cancer and leukemia grupo B study 8811. *Blood*.1995;85: 2025- 37
23. Faderl S, Jeha S, Kantarjian HM. The biology and therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*.2003;98(7): 1337-54
24. Mancini M, Scappaticci D, Comino G, et al. A comprehensive genetic classification of adult lymphoblastic leukemia (ALL): analysis of the GIMEMA 0496 protocol. *Blood*.2005; 105 (9): 3434-41
25. Fielding AK, Richards SM, Chopra R, Lazarus HM, Litzow MR, Buck G, et al. Outcome of 609 adults after relapse of acute lymphoblastic leukemia (ALL); an MRC UKALL12/ECOG 2993 study. *Blood*.2007;109 (3): 944-50
26. Oriol A, Vives S, Hernández-Rivas JM, Tormo M, Heras I, Rivas C, et al. Outcome after relapse of acute lymphoblastic leukemia in adult patients included in four consecutive risk-adapted trials by the PETHEMA Study Group. *Haematologica*.2010;95 (4): 589-96
27. Ramos-Peñafiel CO, Martínez-Tovar A, Olarte- Carrillo I, Castellanos-Sinco H, Martínez-Murillo C, León-González G, et al. Experiencia del tratamiento de la leucemia linfocitoide aguda en recaída en el Hospital General de México. *Rev Med Hosp Gen Mex*.2010; 73:263-7. Artículo en español
28. Hedley B, Keeney M. Technical issues: flow cytometry and rare event analysis. *Int J Lab Hem*. 2013;35:344-50
29. Van Dongen JJ, Lhermitte L, Bottcher S, Ameida J, van der Velden VH, Flores-Montero J, et al. Euro Flow antibodies panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leucocytes. *Leukemia* 2012;26:1908-75.

30. Donnenberg AD, Donnenberg VS. Rare event analysis in flow cytometry. *Clin Lab Med.* 2007;27:627-52.
31. Vogt RF Jr, Whitfield WE, Henderson LO, Hannon WH. Fluorescence intensity calibration for immunophenotyping by flow cytometry. *Methods.* 2000 Jul;21(3):289-96.
32. Dongen JJ. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry B Clin Cytom.* 2004;60:1-13.
33. Marsan V, Del Valle Pérez L, et col. Metodología y aplicaciones de la citometría de flujo para el inmunofenotipaje de las leucemias agudas. *Rev Cubana de Hematol, inmunol y Hemoter.* 2015; 31 (3): 242-253.
34. Gerardo CJ, Rodríguez C, Sastre D, Heller V, Fernández E. Utilización estratégica de CD45 en la identificación de células blásticas por citometría de flujo. *Acta Bioquím Clín Latinoam.* 2006;40(2):173-8
35. Orfao A, Ramudo L, López A, Rivas R, González M, Flores J, et al. Inmunofenotipaje de hemopatías malignas: de la investigación básica a la práctica asistencial. *Haematologica.* 2008;93(Extra 1):79-93
36. Marsán V, del Valle BB, Sánchez M, Macías C, Mazorra Z, Lam RM. Validación del ultramicrométodo inmunocitoquímico (UMICIO) para el inmunofenotipaje de la leucemia linfocítica aguda pediátrica. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter.* 2012;28(3):282-8.
37. Ruiz-Arguelles A, Rivadeneyra-Espinoza L, Duque RE, Orfao A. Report on the second Latin American consensus conference for flow cytometric immunophenotyping of hematological malignancies. *Cytometry B Clin Cytom.* 2006;70:39-44.
38. Ahmadi A, Poorphatollad A, Aghaiipour M, Rezaei M, Nikoo-ghofar M, Gharib A. Diagnostic value of CD117 in differential diagnosis of acute leukemia. *Tumor Biol.* 2014;35:6763-8.
39. Bene MC, Nebe T, Bettelheim P, Buldini B, Bumbea H, Kern W. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: A consensus proposal of the European Leukemia Net Work Package 10. *Leukemia.* 2011;25:567-74.
40. Van Lochem EG, van der Velden VH, Wind HK, te Marvelde JG, Westerdal NA, van Dongen JJ. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: Reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry B Clin Cytom* 2004;60:1–13.
41. Sevilla DW, Emmons FN, Bai X, Colovai A, Bhagat G, Alobeid B. The pattern of cytoplasmic IgM expression in the context of the three currently recognised maturational stages of hematogones. *Leuk Lymphoma* 2009;50:642–644.
42. Rathinam C, Flavell RA. The hematopoiesis paradigm: Clarity or ambiguity? *Blood* 2008;112:3534–3535.
43. Onciu M. Acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol Clin N Am* 2009;23:655–674.
44. Sedek L, Balsa J, Sonsala A, et al. The Immunophenotypes of blast cells in B-cell precursor Acute Lymphoblastic Leukemia: How different are they from their normal counterparts?. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 86B:329-339 (2014).
45. Orfao A, Ortuno F, de Santiago M, Lopez A, San Miguel JF. Immuno- ~ phenotyping of acute leukemias and myelodysplastic syndromes. *Cytometry Part A* 2004;58A:62–71
46. Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphomas: Implications for clinical practice and translational research. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2009;523–531.
47. Seegmiller AC, Kroft SH, Karandikar NJ, McKenna RW. Characterization of immunophenotypic aberrancies in 200 cases of B acute lymphoblastic leukemia. *Am J Clin Pathol* 2009;132:940–949.
48. McKenna RW, Asplund SL, Kroft SH. Immunophenotypic analysis of hematogones (B-lymphocyte precursors) and neoplastic lymphoblasts by 4-color flow cytometry. *Leuk Lymphoma* 2004;45:277–285.

49. Van Lochem EG, Wiegers YM, van den Beemd R, Hahlen K, van Dongen JJ, Hooijkaas H. Regeneration pattern of precursor-B-cells in bone marrow of acute lymphoblastic leukemia patients depends on the type of preceding chemotherapy. *Leukemia* 2000;14:688–695.
50. Hurford MT, Altman AJ, DiGiuseppe JA, Sherburne BJ, Rezuke WN. Unique pattern of nuclear TdT immunofluorescence distinguishes normal precursor B cells (hematogones) from lymphoblasts of precursor B-lymphoblastic leukemia. *Am J Clin Pathol* 2008;129:700– 705.
51. Ciudad J, Orfao A. Utilidad del inmunofenotipo en el diagnóstico y el seguimiento de la leucemia linfoblástica aguda del adulto. *Med Clin Monogr (Barc)* 2007; 129 (Supl 1): 3-14
52. Van Lochem EG, Van der Velden VHJ, Wind HK, Te Marvelde JG, Westerdaal NAC, Van Dongen JM. Immunophenotypic differentiation patterns of normal Hematopoiesis in human bone marrow: Reference patterns for age-related changes and disease
53. Bikoue A, George F, Poncelet P, Mutin M, Janossy G, Sampol J. Quantitative analysis of leukocyte membrane antigen expression: Normal adult values. *Cytometry*. 1996;26:137-47
54. Taberero MD, Bortoluci AM, Alaejos I, Lopez-Berges MC, Rasillo A, Garcia-Sanz R, et al. Adult precursor B-ALL with BCR/ABL gene rearrangements displays a unique immunophenotype based on the pattern of CD10, CD34, CD13 and CD38 expression. *Leukemia*. 2001;15:406-14.
55. Szczepanski T, Van der Velden VHJ, Van Dongen JJM. Flow-cytometric immunophenotyping of normal and malignant lymphocytes. *Clin Chem Lab Med*. 2006;44:775-96
56. Ezine S, Weissman IL, Rouse RV. Bone-Marrow Cells Give Rise to Distinct Cell Clones Within the Thymus. *Nature*. 1984;309:629-31.
57. Terstappen LWMM, Huang S, Picker LJ. Flow Cytometric Assessment of Human T-Cell Differentiation in Thymus and Bone-Marrow. *Blood*. 1992;79:666-77
58. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, et al. Proposals for the Immunological Classification of Acute Leukemias. *Leukemia*. 1995;9:1783-6
59. Czuczman MS, Dodge RK, Stewart CC, Frankel SR, Davey FR, Powell BL, et al. Value of immunophenotype in intensively treated adult acute lymphoblastic leukemia: Cancer and Leukemia Group B study 8364. *Blood*. 1999;93:3931-9
60. Ishizawa S, Slovak ML, Popplewell L, Bedell V, Wrede JE, Carter NH, et al. High frequency of pro-B acute lymphoblastic leukemia in adults with secondary leukemia with 11q23 abnormalities. *Leukemia*. 2003;17:1091-5
61. Gleissner B, Goekbuget N, Rieder H, Arnold R, Schwartz S, Diedrich H, et al. CD10(-) pre-B acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a distinct high-risk subgroup of adult ALL associated with a high frequency of MLL aberrations: results of the German Multicenter Trials for Adult ALL (GMALL). *Blood*. 2005;106:4054-6
62. Ratei R, Sperling C, Karawajew L, Schott G, Schrappe M, Harbott J, et al. Immunophenotype and clinical characteristics of CD45-negative and CD45-positive childhood acute lymphoblastic leukemia. *Ann Hematol*. 1998;77:107-14.
63. Khalidi HS, Chang KL, Medeiros LJ, Brynes RK, Slovak ML, Murata-Collins L, et al. Acute lymphoblastic leukemia - Survey of immunophenotype, French-American-British classification, frequency of myeloid antigen expression, and karyotypic abnormalities in 210 pediatric and adult cases. *Am J Clin Pathol*. 1999;111:467-76
64. Bene MC, Bernier M, Castoldi G, Faure GC, Knapp W, Ludwig WD, et al. Impact of immunophenotyping on management of acute leukemias. *Haematologica*. 1999;84:1024-34

65. Kansal R, Deeb G, Barcos M, Wetzler M, Brecher ML, Block AW, et al. Precursor B lymphoblastic leukemia with surface light chain immunoglobulin restriction - A report of 15 patients. *Am J Clin Pathol.* 2004;121:512-25.
66. Menendez P, Vargas A, Bueno C, Barrena S, Almeida J, De Santiago M, et al. Quantitative analysis of bcl-2 expression in normal and leukemic human B-cell differentiation. *Leukemia.* 2004;18:491-8.
67. Cave H, Suci S, Preudhomme C, Poppe B, Robert A, Uyttebroeck A, et al. Clinical significance of HOX11L2 expression linked to t(5;14)(q35;q32), of HOX11 expression, and of SIL-TAL fusion in childhood T-cell malignancies: results of EORTC studies 58881 and 58951. *Blood.* 2004;103:442-50.
68. Beri A, Young J, Yi QL, Chang H. Prognostic significance of immunophenotype in 225 adults with acute lymphoblastic leukemia. *Mod Pathol.* 2006;19:217A.
69. Thomas X, Archimbaud E, Charrin C, Magaud JP, Fiere D. CD34 Expression Is Associated with Major Adverse Prognostic Factors in Adult Acute Lymphoblastic-Leukemia. *Leukemia.* 1995;9:249-53
70. Cave H, Suci S, Preudhomme C, Poppe B, Robert A, Uyttebroeck A, et al. Clinical significance of HOX11L2 expression linked to t(5;14)(q35;q32), of HOX11 expression, and of SIL-TAL fusion in childhood T-cell malignancies: results of EORTC studies 58881 and 58951. *Blood.* 2004;103:442-50.
71. Hoelzer D, Arnold R, Bartram CR, Böhme A, Freund M, Ganser A, et al. Acute lymphatic leukemia in adult. Diagnosis, risk groups and therapy. *Internist.* 2002;43:1212-6;1219-22;1224-7.
72. Dworzak MN, Panzer-Grumayer ER. Flow cytometric detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Leuk & Lymphoma.* 2003;44:1445-55.
73. Sanchez J, Serrano J, Gomez P, Martinez F, Martin C, Madero L, et al. Clinical value of immunological monitoring of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia after allogeneic transplantation. *Br J Haematol.* 2002;116:686-94.
74. Krampera M, Perbellini O, Vincenzi C, Zampieri F, Pasini A, Scupoli M, et al. Methodological approach to minimal residual disease detection by flow cytometry in adult B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica-the Hematology J.* 2006;91:1109-12
75. Jacques J. M. van Dongen, Vincent H. J. van der Velden, Monika Brüggemann, Alberto Orfao. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies. *Blood* 2015 125:3996-4009; doi:10.1182/blood-2015-03-580027
76. Campana D. Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematology* 2010. ASH Education Book. December 4, 2010. Vol 2010; 1: 7-12