

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”

División de Estudios de Posgrado



MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA SALUD

Determinación de enfermedad residual en pacientes pediátricos
con leucemia linfoblástica aguda de linaje B.

TESIS

Para obtener el grado de
Maestro en Ciencias de la Salud

Presenta

Eloy Pérez Rivera

Director de Tesis

D en C Sergio Gutiérrez Castellanos

AGOSTO DEL 2013

**DETERMINACION DE ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL EN PACIENTES
PEDIATRICOS CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA DE LINAJE B**

Comité Tutorial:

DC Sergio Gutiérrez Castellanos

DC. Martha Eva Viveros Sandoval

DC. Graciela Letechipía Vallejo

MC. Laura Rabelo Carrasco

Dr. Primo Cruz Borja

DETERMINACION DE ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL EN PACIENTES PEDIATRICOS CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA DE LINAJE B

DEDICATORIA

A los niños y sus padres que han confiado en mi trabajo, otorgándome la libertad de buscar el mejor de los tratamientos para sus enfermedades con la esperanza de que pronto en México el cáncer pediátrico sea totalmente curable.

AGRADECIMIENTOS

A ti, mi esposa que me acompañaste en este arduo camino y por compartir sueños e ilusiones, pero sobre todo por el tiempo que cediste a este sueño personal.

A mis padres que al formarme con buenos sentimientos, hábitos y valores me han ayudado a salir adelante en momentos difíciles. Gracias por creer en mí.

Al Doctor Sergio, director de tesis, por su valiosa guía y asesoramiento a la realización de la misma. Nunca olvidare el trato digno que recibí y las formas de trabajo que aprendí en estos dos años. Siempre un maestro, un jefe de departamento y un responsable padre de familia.

Al creador de todas las cosas, el que me ha dado fortaleza para continuar cuando he estado a punto de caer; por ello, con toda humildad le dedico este esfuerzo a Dios.

DETERMINACION DE ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL EN PACIENTES PEDIATRICOS CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA DE LINAJE B

INDICE

1. Introducción	8
2. Marco teórico	10
2.1 Definición	10
2.2 Epidemiología	10
2.3 Etiopatogenia	10
2.4 Factores predisponentes	11
2.5 Clasificación	11
2.5.1 Clasificación morfológica	12
2.5.2 Clasificación inmunológica	12
2.5.3 Clasificación citogenética	13
2.6 Cuadro clínico	13
2.7 Características de laboratorio	15
2.8 Diagnostico	15
2.9 Tratamiento	15
2.10 Factores pronostico y definición de riesgo	17
2.11 Enfermedad mínima residual	17
2.11.1 Definición	17
2.11.2 Citometría de flujo y su papel en la leucemia linfoblástica aguda	18
3. Pregunta de investigación	22
4. Hipótesis	23
5. Justificación	24
6. Objetivo	25
6.1 Objetivo general	25
6.2 Objetivo especifico	25
7. Material y métodos	26
7.1 Sitio del estudio	26
7.2 Muestra	26
7.3 Diseño experimental	26
7.4 Criterio de inclusión	26

DETERMINACION DE ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL EN PACIENTES PEDIATRICOS CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA DE LINAJE B

7.5 Criterios de exclusión	27
7.6 Criterios de eliminación	27
7.7 Descripción de variables	27
7.7.1 Variable independiente	
7.7.2 Variable dependiente	
7.8 Procedimientos	27
7.8.1 Aspirado de medula ósea	28
7.8.2 Estudios de laboratorio generales	29
7.8.3 Estudios de gabinete	29
7.8.4 Inmunofenotipificación mediante citometría de flujo	30
7.8.5 Estudio de enfermedad mínima residual mediante la citometría de flujo	31
7.8.6 Estabilización y prevención de complicaciones oncológicas asociadas	31
7.9 Análisis estadístico	33
7.10 Consideraciones éticas	33
7.11 Recursos físicos y materiales	34
8. Resultados	35
9. Discusión	47
10. Conclusiones	52
11. Anexo 1	53
12. Anexo 2	54
13. Referencias	58

DETERMINACION DE ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL EN PACIENTES PEDIATRICOS CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA DE LINAJE B

ABREVIACIONES

LLA	Leucemia Aguda Linfoblástica
ERM	Enfermedad residual mínima
OMS	Organización Mundial de la Salud
IgM	Inmunoglobulina M
CD	Cumulo de diferenciación
TdT	Deoxinucleotidil transferasa terminal
SNC	Sistema nervioso central
LCR	Líquido cefalorraquídeo
Hb	Hemoglobina
g/dl	Gramo por decilitro
mm ³	Milímetro cubico
vs	Versus
IR	Inducción a la remisión
t	Traslocación
HIM	Hospital Infantil de Morelia
AMO	Aspirado de medula ósea
UMSNH	Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
FITC	Isotiocianato de Fluoresceina

DETERMINACION DE ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL EN PACIENTES PEDIATRICOS CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA DE LINAJE B

PE	Ficoeritrina
μL	microlitro
rpm	revoluciones por minuto
meq	miliequivalentes
ml	mililitros
m^2sc	metro cuadrado de superficie corporal
mg	miligramo
hr	hora
do	dosis
Kg	kilogramo

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, en México se observa un aumento en la incidencia de casos nuevos de cáncer en pediatría, el cual representa 5% de todos los padecimientos malignos de la población general. En algunos estados de la República Mexicana se presentan tasas superiores a la de los países industrializados.¹ La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es el cáncer más frecuente en niños y representa del 23% al 30% de los casos en menores de 15 años con una tasa anual de 30 a 40 casos por millón de habitantes.^{1, 2} La incidencia en niños hispanos parece ser de las más altas (43 por millón en menores de 15 años)^{2,3} y en México la LLA representa más del 40% de las neoplasias en pediatría. En la actualidad, la tasa de supervivencia a 5 años ha aumentado de 60 a 90% en niños menores de 15 años.⁴

La enfermedad residual mínima (ERM) es la cantidad de células leucémicas que permanecen al término de las distintas fases del tratamiento. La ERM es un marcador pronóstico del resultado final del tratamiento.^{5,6,7,8} Los pacientes con índices superiores a 0.01% de ERM al final de la inducción tienen un pronóstico más pobre que aquellos con índices más bajos o indetectables.¹⁹ Actualmente los principales grupos internacionales utilizan la ERM al final de la inducción como factor determinante de la intensidad del tratamiento de posinducción: los pacientes con índices más altos se asignan a terapias más intensas y aquellos con buena

DETERMINACION DE ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL EN PACIENTES PEDIATRICOS CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA DE LINAJE B

respuesta, a terapia de menor intensidad. Los índices tempranos de ERM (días +8 y +15 de la inducción) y posteriores (semana 12) también predicen el resultado del tratamiento.^{5,6,7,8} En México es muy poca la información de la ERM por lo que la asociación entre el nivel de ERM y la respuesta al tratamiento, generará conocimiento para la toma de decisiones en el tratamiento de la leucemia.

2. MARCO TEORICO

2.1 Definición.

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) constituye un grupo de neoplasias malignas caracterizadas por la proliferación y expansión clonal de células linfoides inmaduras o linfoblastos, ocasionada por alteraciones genómicas. La Organización Mundial de Salud (OMS) la define como la presencia de >20% de blastos en un aspirado de medula ósea como criterio diagnóstico.⁹

2.2 Epidemiología

La neoplasia más común en México y el resto del mundo es la leucemia linfoblástica aguda que ocurre del 35 al 52% de los casos, seguida de linfomas y tumores de sistema nervioso central.⁹ La LLA es más frecuente en niños que en niñas (1.3:1.0) y más común en países industrializados.¹⁻³ La edad de presentación es variable; la LLA puede aparecer desde el nacimiento, hasta los 18 años de edad, con un pico de presentación es entre los 2 y los 5 años de edad.¹⁰

2.3 Etiopatogenia

El análisis molecular de las alteraciones genéticas presentes en las células leucémicas ha contribuido al entendimiento de la patogénesis de la LLA. El mecanismo general incluye la expresión de oncogenes creados principalmente por la fusión de genes que codifican cinasas y alteran factores de transcripción. Estas

DETERMINACION DE ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL EN PACIENTES PEDIATRICOS CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA DE LINAJE B

alteraciones contribuyen a la transformación leucémica de la célula madre hematopoyética o de sus progenitores por medio del cambio de las funciones celulares como regulación del ciclo celular, proliferación, diferenciación y apoptosis. En la LLA infantil hay evidencia de que en precursores linfoides comprometidos existen alteraciones en etapas tempranas de la diferenciación celular lo que favorece la proliferación celular no controlada, alterándose finalmente la apoptosis.¹¹

2.4 Factores predisponentes

Se reconocen como factores predisponentes a factores genéticos tales como el Síndrome de Down, Ataxia telangiectasia y el Síndrome Bloom; factores químicos como la exposición al benceno; factores físicos como la radiación ionizante y factores biológicos como son las infecciones virales, principalmente el Epstein Barr virus.¹²

2.5 Clasificación

La clasificación actual de las leucemias incluye criterios morfológicos, citogenéticos e inmunofenotípicos, los cuales tiene el propósito de definir categorías con características clínicas y biológicas comunes. En términos generales, las leucemias se clasifican en agudas y crónicas, y de acuerdo al linaje en linfoides y mieloides. En niños, las leucemias agudas son las más frecuentes y representan 97-99%, mientras que las crónicas ocurren sólo en 1 a 3% de los casos, dentro de las leucemias agudas, las linfoblásticas son cuatro veces más

DETERMINACION DE ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL EN PACIENTES PEDIATRICOS CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA DE LINAJE B

comunes que las de estirpe mieloide (80% vs 20%).¹³

2.5.1 Clasificación morfológica

Está basada en la clasificación Franco-Americano-Británico (FAB), que fue consensada a finales de la década de los 70's, se basa en hallazgos morfológicos y citoquímicos. Las leucemias las linfoides las clasifíco en L1, L2 y L3, las leucemias mieloides las clasifíco de la M0 a M7.¹⁴

2.5.2 Clasificación Inmunológica

La hematopoyesis es un proceso complejo en el que las células sanguíneas expresan de manera coordinada antígenos nucleares, citoplásmicos y de superficie que les confieren características y funciones que son determinantes para la diferenciación y maduración. La clasificación inmunológica se establece en base a la expresión de marcadores antigénicos asociados a linaje. Las células B presentan cuatro etapas de maduración: pre-B temprana, pre-B, pre-B transicional y B madura. Los marcadores para células pre-B tempranas incluyen CD19, CD22, CD10, IgM (inmunoglobulina M) y deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT). Las células pre-B representan cerca del 25% de los casos de LLA y se define por la expresión de cadenas pesadas de inmunoglobulinas en el citoplasma, pero no en la superficie. Estas células expresan además CD 19, CD 22 y CD 79a. Más del 95% de las células pre-B expresan CD10 y TdT, pero solamente dos terceras partes expresan CD34. La célula pre-B transicionales expresan cadenas pesadas citoplasmáticas y de superficie sin cadenas ligeras κ ó λ . Los blastos expresan

DETERMINACION DE ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL EN PACIENTES PEDIATRICOS CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA DE LINAJE B

CD10, usualmente TdT y algunas veces CD34. Las leucemias de células B madura representan 2 al 4% de los casos y los blastos expresan cadenas pesadas y ligeras κ ó λ de inmunoglobulinas de superficie. Este inmunofenotipo se correlaciona en la mayoría de los casos con el subtipo morfológico L3. La célula expresa CD19, CD22, CD20 y frecuentemente CD10 y CD23.¹⁵

2.5.3 Clasificación Citogenética

De acuerdo al contenido de sus cromosomas, se dividen en alteraciones numéricas y estructurales, se presentan en el 40% de los casos y confieren importancia pronóstica.¹³ Las alteraciones numéricas incluyen la hiperdiploidia (mayor de 47 cromosomas) presente en 20 a 25% de los casos de LLA de precursores B. La hipodiploidia (menos de 46 cromosomas) se presenta en menos del 1% de los niños con LLA.¹⁰ Las alteraciones estructurales más comunes incluyen la t (12:21) (p12;q22) presente en el 20 al 25% de los casos, la t (9:22) (q34;q11) o Cromosoma Filadelfia presente en el 3%, la t (4:11) (q21;q23) presente en el 5% y la t (1:19) (q23;p13) presente en el 5% de los pacientes.¹³

2.6 Cuadro Clínico

La presentación clínica de los pacientes con LLA es el reflejo de la proliferación de los blastos leucémicos en la médula ósea y de la infiltración a órganos extramedulares. En la médula ósea la proliferación de las células leucémicas interfiere con la hematopoyesis normal y las citopenias son la principal causa de la sintomatología característica de esta entidad. La anemia causa fatiga, astenia y

DETERMINACION DE ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL EN PACIENTES PEDIATRICOS CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA DE LINAJE B

adinamia y cuando es severa puede ocasionar letargia y disnea. La trombocitopenia es la principal causa de sangrado, que generalmente se presenta en piel y mucosas y cuando es severa puede poner en peligro la vida, como en el caso de la hemorragia intracraneal. La neutropenia predispone a infecciones de repetición y si es profunda puede condicionar infecciones severas. Es posible que se presente fiebre relacionada a citosinas pirógenas liberadas por los blastos leucémicos, como la interleucina 1, interleucina 6 y el factor de necrosis tumoral, o bien como consecuencia de infecciones relacionadas con neutropenia.¹³ El dolor óseo es debido a la infiltración del periostio por células leucémicas y puede acompañarse de aumento de volumen en las articulaciones, por lo que en ocasiones se confunde con enfermedades reumáticas como artritis reumatoide juvenil, lo que puede retrasar el diagnóstico de la LLA.¹¹ Los blastos leucémicos pueden infiltrar órganos extramedulares, con mayor frecuencia hígado, bazo, timo y ganglios linfáticos. El examen físico de los pacientes con leucemia puede revelar palidez, petequias, hemorragia de mucosas, gingivorragia, epistaxis, adenopatías y hepatoesplenomegalia.¹³ La infiltración al sistema nervioso central (SNC) ocurre hasta en 5% de los pacientes con LLA al diagnóstico, la forma más frecuente es la infiltración meníngea, pero puede presentarse en parénquima o pares craneales. El estado del SNC se ha clasificado en SNC 1, 2 y 3 con base en los hallazgos citoquímicos y por citocentrifugación del LCR además de la afección de pares craneales.¹²

2.7 Características de Laboratorio

La mayor parte de los pacientes presentan una cifra de hemoglobina (Hb) en el límite de 7 a 11 g/dL (45%) y con menor frecuencia la hemoglobina es normal.¹² Es frecuente encontrar una cifra de leucocitos menor a 10,000 mm³ (53%) y la cuenta de plaquetas usualmente se encuentra con menos de 100,000 mm³ (75%).¹³ Es posible encontrar diferentes alteraciones de la homeostasis como el síndrome de lisis tumoral, alteraciones hematológicas, síndromes compresivos, infecciones y otras alteraciones metabólicas que ponen en peligro la vida del paciente.¹³

2.8 Diagnostico

Se realiza mediante un aspirado de medula ósea el cual deberá presentar más de 20% de blastos de aspecto linfoide, basado en la clasificación FAB, con técnicas de inmunohistoquímica e inmunofenotipo. Como parte de la valoración inicial de un paciente con sospecha de LLA es necesario tomar estudios que identifiquen posibles complicaciones que ponen en riesgo la vida del paciente, entre otros; perfil hematológico, pruebas de función renal, pruebas de función hepática, electrolitos séricos y perfil de coagulación. Estudios de gabinete como radiografía de tórax para realizar diagnósticos diferenciales. Otros estudios de mayor complejidad se reservan para casos clínicos especiales.¹³

2.9 Tratamiento

El paciente con LLA al inicio cuenta con una carga leucémica aproximada de

DETERMINACION DE ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL EN PACIENTES PEDIATRICOS CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA DE LINAJE B

1×10^{12} células, la meta quimioterapéutica al término de la inducción a la remisión (IR) es que disminuya a 1×10^9 . El tratamiento incluye quimioterapia administrada durante 3 años y radioterapia en casos de alto riesgo seleccionados.¹³ El esquema de quimioterapia se divide de la forma siguiente:

- Inducción a la remisión que inicia posterior al diagnóstico.

- Terapia de posinducción (después de lograr la remisión completa) que consta de:

- Terapia de consolidación o intensificación.

- Terapia de mantenimiento o continuación.

El tratamiento de IR es la fase más importante del manejo de la LLA y es similar en todos los protocolos de los grandes grupos internacionales. Consta de vincristina, antraciclina, L-asparaginasa y esteroide. Aproximadamente 1 a 3% de los pacientes con este esquema mueren durante la terapia de inducción a consecuencia de la enfermedad y otro 1 a 3% muere durante inducción por complicaciones relacionadas con el tratamiento. La fase de consolidación consiste en la administración de metotrexate en altas dosis (mayor de 2 g por metro cuadrado) que tiene la finalidad de penetrar en los sitios donde los agentes quimioterapéuticos difunden con dificultad como el SNC.

Finalmente, se continúa con la fase de mantenimiento que se basa en la rotación de medicamentos con mecanismo de acción diferentes aplicados en pares semanalmente por espacio de 120 semanas. Esta parte del tratamiento puede

DETERMINACION DE ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL EN PACIENTES PEDIATRICOS CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA DE LINAJE B

variar de acuerdo al protocolo que utilice el grupo médico tratante.¹³ Actualmente el tratamiento se basa en el riesgo que tiene el paciente en recaer de la enfermedad. Este enfoque permite que se trate a los niños que tradicionalmente tienen un desenlace muy bueno con un tratamiento menos intenso y se evite un tratamiento más intenso y tóxico. Al mismo tiempo, permite que los niños que tienen una probabilidad más baja de sobrevivir a largo plazo reciban un tratamiento más intenso que potencialmente aumente su probabilidad de curación.

2.10 Factores Pronósticos y Definición de Riesgo

A pesar del tratamiento actual, 20 a 25% de los pacientes presentarán recaída en algún momento de la evolución. Se han descrito factores de riesgo para recaída, la mayoría de los cuales se establecen al diagnóstico e incluyen variables del huésped, de la leucemia y de la respuesta al tratamiento. Los factores de alto riesgo para recaída son: edad mayor de 10 años y menores de 1 años, sexo masculino, cifra de leucocitos mayor a 50,000 mm³ al diagnóstico, inmunofenotipo T, la presencia de enfermedad en SNC, infiltración testicular, traslocaciones como la t (4:11), t (9:22), t (1:19), la hipodiploidia y la mala respuesta al tratamiento.¹⁴

2.11 Enfermedad Residual Mínima (ERM)

2.11.1 Definición

Es la cantidad de células leucémicas que permanecen al término de las distintas fases del tratamiento, su análisis permite evaluar la eficacia del tratamiento y, actualmente, se acepta que dependiendo del nivel de expresión, se estratifique al

DETERMINACION DE ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL EN PACIENTES PEDIATRICOS CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA DE LINAJE B

paciente en buen o mal respondedor al tratamiento. El estudio de la ERM mediante citometría de flujo, requiere definir al diagnóstico el fenotipo asociado a la leucemia, el cual servirá para evaluar la cantidad de células residuales que permanecen al final de cada fase del tratamiento. Posee una sensibilidad superior a 1×10^{-4} , es decir es capaz de detectar una célula tumoral entre 10,000 células normales. Tradicionalmente se consideraba en remisión con menos de 5% blastos en el estudio morfológico de médula ósea, lo que equivale a la persistencia de 10^{10} células o EMR del 1%. Sin embargo, el estudio de EMR puede detectar 1 célula maligna en 10,000 células normales o más, lo que cuantitativamente es 100 veces más sensible que técnicas morfológicas.^{15,16} En general, se acepta que la citometría de flujo detecta perfiles inmunofenotípicos anormales usando marcadores que no son usuales en los linajes de médula ósea y sangre. Así, más del 90% de los casos de LLA pueden ser estudiados mediante citometría de flujo. Otra ventaja de la citometría de flujo sobre las técnicas moleculares, es que la primera analiza células vivas, eliminando células muertas o detritus de ácidos nucleicos, los cuales pueden dar positivos con los métodos moleculares.^{15,16}

2.11.2 Citometría de flujo y su papel en leucemia linfoblástica aguda

Campana demostró que la detección de ERM $>0,01\%$ en médula ósea en la remisión posinducción se correlaciona con altas tasas de recurrencia, y si dicha ERM es $>1\%$ el pronóstico es especialmente pobre. Igual hallazgo se observó con niveles de ERM $>0,1\%$ en la semana 14 de terapia continua. La ERM fue detectada con mayor frecuencia al final de la primera inducción (68%) que a la

DETERMINACION DE ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL EN PACIENTES PEDIATRICOS CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA DE LINAJE B

semana 14 (7%), pero la persistencia de ERM en la semana 32 se correlacionó con pobre pronóstico.¹⁷ En estudio previo el mismo autor había demostrado que los resultados obtenidos el día 19 son más fidedignos, puesto que la detección de ERM se correlacionaba con recurrencia en el 28.4% a 3 años, mientras que en ausencia de ERM en este punto la recurrencia era del orden de 1.9%.¹⁸ Campana también demostró que la presencia de células tumorales residuales al final de la inducción (6 semanas) en 23% de los casos, iba disminuyendo con el paso de las semanas alcanzando 17% en la semana 14, 5% en la 32, 4% en la 52 y ninguna al final de la terapia en la semana 120. A su vez, la detección de enfermedad residual se correlacionó con desarrollo de recurrencia en el 32.5% vs 7.5% en el grupo negativo al final de la inducción y en la semana 14 de 42.2% contra 6.6%.¹⁹ Estudios subsecuentes de Campana mostraron que encontrar ERM en el día 19 de la terapia de inducción, al final de la misma y en las semanas 14, 32 y 56, se correlacionaba con tasas más altas de recurrencia, teniendo pobre pronóstico los niveles de ERM $\geq 1\%$ al final de la inducción y $\geq 0.1\%$ en la semana 14.¹⁸ Campana logró concluir que los pacientes con negativización de ERM en la semana 14 tenían igual riesgo de recurrencia que los que nunca tuvieron EMR después de completar la terapia de inducción, mientras que los que persistían con ERM durante la terapia de continuación incrementaba el riesgo de recurrencia a medida que pasaba del tiempo; de ahí, que algunos investigadores consideren que los pacientes con ERM al final de la inducción se benefician de la medición periódica de ERM.²⁰

DETERMINACION DE ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL EN PACIENTES PEDIATRICOS CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA DE LINAJE B

Mandrell concuerda en afirmar que ERM >1% al final de la inducción es indicador de mal pronóstico. Presenta un estudio del Hospital de San Judas donde se hace medición de ERM al fin de la terapia de inducción y en 3 momentos durante la terapia de mantenimiento; en éste se encontró correlación entre ERM con altas tasas de recurrencia; la persistencia de ERM al final de la inducción predecía recurrencia en el 43% de los casos contra 10% en los niños sin ERM; el riesgo de recurrencia se incrementaba al 68% si persistía ERM en la semana 14 contra el 7% de los negativos. A la semana 32 ERM fue altamente predictiva. Se estableció 1% como el punto de corte de ERM al final de la inducción. El mismo estudio permitió reconocer que ERM se asocia frecuentemente a edad desfavorable, cromosoma Filadelfia positivo y sensibilidad del blasto a la quimioterapia.¹⁵ La identificación de estos factores de alto riesgo ha facilitado la estratificación de los pacientes y ha permitido ajustar la intensidad del tratamiento al grupo de riesgo. La finalidad es establecer un tratamiento de acuerdo al riesgo de presentar recaída y así reducir el número de fármacos y en algunos casos las dosis de los agentes quimioterapéuticos con lo cual se podrían disminuir las muertes por toxicidad y las secuelas relacionadas con el tratamiento. De igual manera, la intensificación del tratamiento en casos de pobre pronóstico, reduce las fallas debidas al desarrollo de resistencia a fármacos antineoplásicos.¹³ Existen características clínicas y de laboratorio que no determinan riesgo de falla al tratamiento, pero que contribuyen a la morbi-mortalidad temprana y que impactan directa o indirectamente en las tasas de supervivencia. Estas características incluyen la presencia de alteraciones metabólicas como el síndrome de lisis tumoral y la hipercalcemia, alteraciones en la coagulación, procesos infecciosos y alteraciones en el estado nutricional, particularmente desnutrición.

DETERMINACION DE ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL EN PACIENTES PEDIATRICOS CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA DE LINAJE B

En el Hospital Infantil de Morelia, los recursos diagnósticos para la estratificación de los pacientes se han incrementado en las últimas dos décadas. Actualmente, no contamos con infraestructura para la evaluación diagnóstica inicial y la clasificación inmunológica, citogenética y molecular. Estudios como el que se presenta permitirían la estratificación de nuestros pacientes e incrementar potencialmente las tasas de supervivencia.

3. PREGUNTA DE INVESTIGACION

¿La presencia de menos del 0.01% de células leucémicas al término de la inducción a la remisión en pacientes pediátricos tratados en el Hospital Infantil de Morelia con leucemia linfoblástica aguda es un marcador de buen pronóstico?

4. HIPOTESIS

La negatividad de la enfermedad residual mínima en los días +15 y +35 posquimioterapia en niños con LLA se asocia a buena respuesta clínica y factores pronostico importantes.

5. JUSTIFICACIÓN

La leucemia linfoblástica aguda es el cáncer más frecuente en pediatría, enfermedad que se encuentra como la segunda causa de muerte en niños. A pesar de que la leucemia potencialmente puede alcanzar tasas de curación de hasta el 90%, en el Hospital Infantil de Morelia (HIM), el resultado es menor al 50%. Esto se debe probablemente a falla del tratamiento y efectos tóxicos colaterales. Uno de los parámetros determinantes para identificar pacientes con buen pronóstico, es la cuantificación de células leucémicas residuales (ERM) que permanecen durante y al término de inducción a la remisión. En nuestro país aún es poca la información de la ERM y no ha sido establecido el porcentaje de respuesta a la ERM, por lo que no es posible identificar pacientes con buen pronóstico (pacientes con índices menores al 0.01% de células leucémicas) y que potencialmente se pueden beneficiar de una terapia menos intensa y con menos efectos adversos. Además, tampoco es posible identificar los pacientes que potencialmente se benefician con aumentar la intensidad de la terapia, cuando presentan índices mayores al 0.01% de células leucémicas.

En el presente trabajo se pretenden establecer las condiciones para la cuantificación de la ERM por citometría de flujo y su asociación al tratamiento quimioterapéutico.

6. OBJETIVO

6.1 Objetivo general:

1. Cuantificar la enfermedad mínima residual en los días +15 y +35 posquimioterapia de inducción a la remisión y su asociación clínica y diferentes factores pronóstico.

6.2 Objetivos específico

1. Clasificar el subtipo de LLA de linaje B y establecer el inmunofenotipo asociado a leucemia.
2. Correlacionar la cantidad de enfermedad residual mínima con el estado clínico.
3. Correlacionar los principales factores pronostico con la enfermedad residual mínima

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Sitio de estudio

Departamento de Hemato-Oncología del Hospital Infantil de Morelia “Eva Sámano de López Mateos”, Laboratorio Citopatología Molecular de la División de estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr Ignacio Chávez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

7.2 Muestra

Se incluyeron 51 pacientes que departamento de Hemato-Oncología Pediátrica durante el período del 1 de septiembre de 2011 al 30 de noviembre de 2012 en los cuales se corroboró el diagnóstico de Leucemia Linfoblástica Aguda.

7.3 Diseño experimental

Es un estudio clínico, longitudinal, prospectivo y observacional en un grupo de pacientes con leucemia linfoblástica aguda de estirpe “B”.

7.4 Criterios de inclusión

7.4.1 Diagnóstico de Leucemia Linfoblástica Aguda ratificado con análisis morfológico e inmunofenotípico de las células de médula ósea.

7.4.2 Sin tratamiento antineoplásico previo

7.4.3 Pacientes menores de 18 años.

DETERMINACION DE ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL EN PACIENTES PEDIATRICOS CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA DE LINAJE B

7.5 Criterios de exclusión

- 7.5.1 Pacientes cuyo tutor no desee ingresar al protocolo
- 7.5.2 Pacientes que no reciban el tratamiento de inducción a la remisión completo
- 7.5.3 Leucemia mieloblástica aguda, leucemia linfoblástica aguda de estirpe "T" o leucemia aguda bifenotípica
- 7.5.4 Abandono anticipado del tratamiento

7.6 Criterios de eliminación

- 7.6.1 Pacientes que no sea posible obtener las muestras de medula ósea para cuantificación de ERM en los días +15 y +35.
- 7.6.2 Pacientes que fallezcan en la inducción a la remisión.

7.7 Descripción de variables

- 7.7.1 **Variable independiente.** Porcentaje de enfermedad residual (ERM) al día +15 y +35 de la terapia de inducción a la remisión.
- 7.7.2 **Variable dependiente.** Estado clínico del paciente, factores pronóstico, análisis morfológico de la medula ósea.

7.8 Procedimientos

Al sospecharse LLA se hospitaliza al paciente y se realiza la siguiente secuencia de estudios.

DETERMINACION DE ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL EN PACIENTES PEDIATRICOS CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA DE LINAJE B



7.8.1 *Aspirado de medula ósea.*

Como parte del diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda, se realizó el aspirado de médula ósea puncionando la espina iliaca postero-superior del lado derecho, empleando la aguja de Hamshidi; bajo anestesia general inhalada con halotano aplicada por médico anestesiólogo y acompañado por una enfermera del servicio en sala de procedimientos ambulatorios. La toma se realizó en dos partes; primero

DETERMINACION DE ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL EN PACIENTES PEDIATRICOS CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA DE LINAJE B

se obtuvieron 0.5 mL de muestra y se realizaron frotis en 5 laminillas, se tiñeron con el colorante de Wright, se contaron 500 células en el microscopio óptico y se determinó leucemia aguda al encontrar al menos 25% de linfoblastos. Posteriormente se tomaron 3 mL con anticoagulante EDTA (1/10 parte) para realizar posteriormente el análisis inmunofenotípico.

7.8.2 Estudios de laboratorio generales

Se tomó a los pacientes una muestra de sangre periférica para estudios hemáticos y serológicos para valoración inicial y sospecha de leucemia, los cuales se realizaron en el laboratorio clínico del Hospital Infantil de Morelia consistentes en citometría hemática completa, pruebas de función renal (creatinina, nitrógeno ureico en sangre), electrolitos séricos (potasio, sodio, cloro, fosforo y calcio), ácido úrico, deshidrogenasa Láctica. Se realizó además frotis de sangre periférica con tinción de Wright y se analizaron las características de las células periféricas con la búsqueda intencionada de blastos.

7.8.3 Estudios de gabinete

Se realizó radiografía de Tórax postero anterior y lateral en caso de presencia de masa mediastinal, tomografía de cráneo en caso de sospecha de sangrado intracraneal y resonancia magnética de cráneo en casos de sospecha de infiltración leucémica al sistema nervioso central.

7.8.4 Inmunotipificación mediante Citometría de Flujo.

La muestra de sangre periférica o médula ósea se filtró y se realizó una dilución 1:5 con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) y posteriormente se contaron los leucocitos empleando un contador automatizado. Se colocaron doscientos cincuenta mil leucocitos en cada tubo (la cantidad de tubos fue de acuerdo al grupo de anticuerpos que se emplearon dependiendo del subtipo de leucemia y posteriormente se adicionaron los anticuerpos específicos conjugados a Isotiocianato de Fluoresceína (FITC): CD3, CD5, CD10, CD34, CD20, IgM citoplasmático, TdT, y Ficoeritrina (PE): CD2, CD7, CD22, CD13, CD33, CD79a, CD58 PerCP, con el anti-CD45PerCP como seleccionador de los blastos en cada tubo. Para identificar los antígenos intracelulares, las células se incubaron con solución fijadora (50 μ L) durante 15 min a 4°C, luego se adicionaron el anticuerpo y 50 μ L de solución permeabilizadora. Se incubó durante 20 min en refrigeración y después se agregó 1 mL de solución de lisis incubando 15 min en refrigeración. Enseguida se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min, se desechó el sobrenadante y se agregaron 500 μ L de PBS centrifugando a 1500 rpm por 5 min. Finalmente, se resuspendieron las células con 350 μ L de PBS, se adquirieron en el citómetro de flujo y se analizaron empleando el programa Expo32 (Beckman Coulter, Inc. Miami Florida, USA).

7.8.5 Estudio de la Enfermedad Residual Mínima mediante Citometría de Flujo

Se tomaron de 3 a 5 mL de médula ósea en los días 15 (+15) y 35 (+35) del inicio del tratamiento de inducción a la remisión. Se contaron los leucocitos en analizador automatizado de hematología. Se colocaron un millón de leucocitos en dos tubos y se tiñeron con los anticuerpos a) CD34-FITC/CD22-PE/CD19-PerCP/CD45-ECD y b) CD19-FITC/CD34-PE/CD58PerCP/CD45-ECD durante 20 min a temperatura ambiente y oscuridad. Luego, se lisaron los eritrocitos adicionando 2 mL de cloruro de amonio (NH₄CL) durante 15 min a 4°C y oscuridad. Se centrifugaron los tubos a 1500 rpm durante 5 min, se desechó el sobrenadante y la pastilla celular se lavó con 1 mL de PBS dos veces, empleando el tiempo y rpm antes descritas. Al final, las células se resuspendieron en 500 µL de PBS y se adicionaron 50 µL de formaldehído al 1% en PBS. Se adquirieron y analizaron de 250 a 500 mil células en el citómetro de flujo Altra con el programa Expo32 (Beckman Coulter, Inc., Miami Florida, USA)

7.8.6 Estabilización y prevención de complicaciones oncológicas asociadas

Se iniciaron soluciones hiperhidratación calculado a 3000 mlm²scdia más alcalinización con bicarbonato de sodio a 50 meqm²sc buscando mantener el pH urinario entre 7 y 7.5, el gasto urinario >100 mlm²schr. En presencia de síndrome de lisis tumoral y falla terapéutica se indica tratamiento dialítico. Se utilizaron hemoderivados a dosis de 15mlkgdo de concentrado eritrocitario y concentrado plaquetario a dosis de 4 m²scdo para mantener niveles hematológicos mínimos de

DETERMINACION DE ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL EN PACIENTES PEDIATRICOS CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA DE LINAJE B

hemoglobina de 10 gr y plaquetas >20 mil. En presencia de cor anémico se transfunde a 5 ml/kg/hr o transfusión por recambio. En pacientes con masa mediastinal, hiperleucocitosis, síndrome de vena cava superior, síndrome de vena cava inferior o síndrome de mediastino anterior se indicó dexametazona 1 mg/m²do intravenoso cada 6 horas, dosis máxima 16 mg en 24 horas, o prednisona 60mg/m²sc dividido en 3 dosis.

Se inició de ventana esteroidea con prednisona a dosis de 60mg/m²sc dividido en 3 dosis por 7 días. Al termino toma de frotis de sangre periférica con tinción de Wright y cuenta de blastos en sangre periférica en mínimo de 100 células analizadas considerándose buena respuesta a esteroide cuando se encuentran <1000 blastos y mala respuesta a esteroide cuando se encuentran >1000 blastos.

Inicio de inducción a la remisión con vincristina a 2 mg/m²scdo, intravenoso, en bolo cada semana por 4 dosis totales. Daunorrubicina a 30 mg/m²scdo, intravenoso en infusión de 1 hora, cada semana por 4 dosis totales. L-asparaginasa a 10,000 U/m²scdo intramuscular profundo cada 3 días, nueve dosis y prednisona a 60mg/m²sc dividido en 3 dosis por 28 días, con dosis de reducción de un 25% cada 3 días hasta terminar. Se aplicó quimioterapia triple intratecal con hidrocortisona, arabinosido de citosina y metotrexate, una dosis semanal, 4 totales. Se realizaron revisiones al paciente al menos dos veces durante la aplicación del esquema de inducción a la remisión con toma de los

DETERMINACION DE ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL EN PACIENTES PEDIATRICOS CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA DE LINAJE B

estudios comentados en el punto 2, aunado a la toma de glucosa sérica y pruebas de función hepática (Transaminasa glutámico oxalacetica, Transaminasa glutámico pirúvica, bilirrubina total, bilirrubina indirecta y bilirrubina directa)

7.9 *Análisis estadístico*

Se realizó estadística descriptiva inicialmente y para analizar la asociación entre los parámetros clínicos y la EMR, se realizó ANOVA. Para la evaluación de la supervivencia en relación a la EMR, se emplearon las curvas de Kaplan y Meier y para comparación de estas las curvas el test de Log Rank.

7.10 *Consideraciones éticas.*

Los pacientes fueron incluidos sólo bajo el consentimiento de su padre o tutor. El médico a cargo les explico en que consistio el proyecto y que se requirió para el estudio de la EMR, para lo cual firmaron la carta de consentimiento en la que estuvieron de acuerdo en participar en el proyecto. Al paciente se le explico claramente que las muestras requeridas son las que normalmente se toman para el diagnóstico de la enfermedad y para realizar su vigilancia clínica, sin que se requirieran muestras adicionales. Los aspirados de médula ósea lo realizaron los médicos de base adscritos al servicio, bajo anestesia con las medidas necesarias para prevenir cualquier complicación. Se contó con evaluaciones por el servicio de Psicología del paciente y familia así como valoración por el servicio de Trabajo Social.

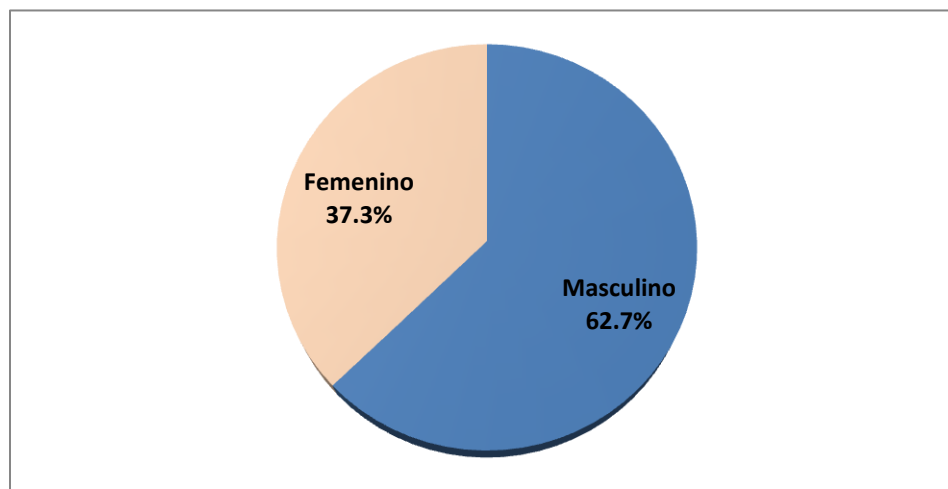
7.11 Recursos Físicos y Materiales

El laboratorio de Citopatología Molecular de la División de Estudios de Posgrado de la UMSNH se compone de un área física con las condiciones y equipamiento adecuados para el desarrollo de protocolo. Cuenta principalmente con Citómetro de flujo FACS Altra (Beckman-Coulter, Inc. Florida, USA), campana de flujo laminar, congeladores y ultracongeladores, centrifugas clínicas y microcentrifugas. Contamos con toda la infraestructura y reactivos para realizar las metodologías descritas en este proyecto. No se generó ningún gasto para los pacientes o familiares.

8. RESULTADOS

Se incluyeron 51 pacientes; 32 (62.7%) del sexo masculino y 19 (37.3%) del sexo femenino (grafica 1) con un rango de 4 meses a 17 años. La relación hombre-mujer fue 1.6:1 observándose un mayor grupo de pacientes del grupo masculino en la muestra estudiada.

Grafica 1. Distribución por sexo

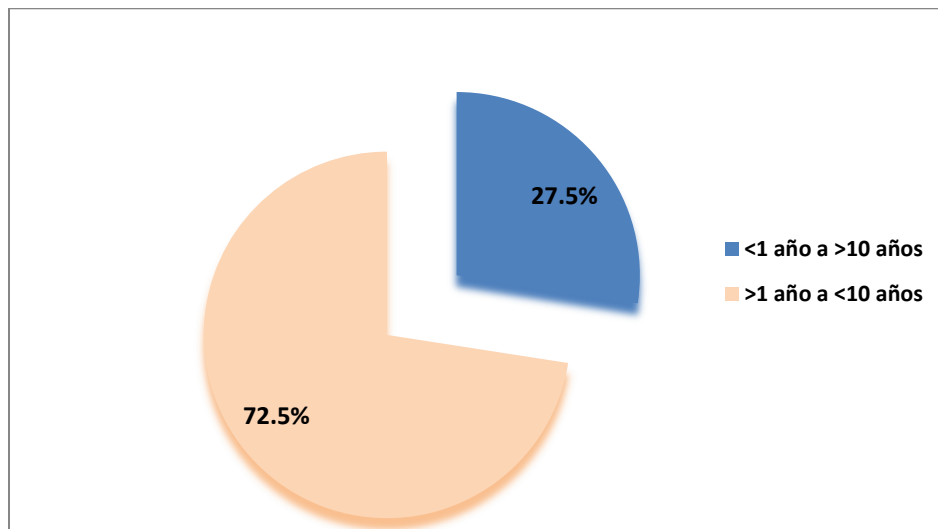


Al agruparse los pacientes de acuerdo grupos etarios de importancia pronostica se encontró que el grupo de menores de 1 año a mayores de 10 años fueron 14 (27.5%) y los mayores de 1 año a menores 10 años fueron 37 (72.5%) (Grafica 2). El grupo de mal pronóstico presenta una mayor incidencia, principalmente a expensas de pacientes mayores de 10 años (13/92.8%) ya que solo se observó un paciente menor de 1 año (1/7.2%) resultando que el grupo de pacientes en estudio

DETERMINACION DE ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL EN PACIENTES PEDIATRICOS CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA DE LINAJE B

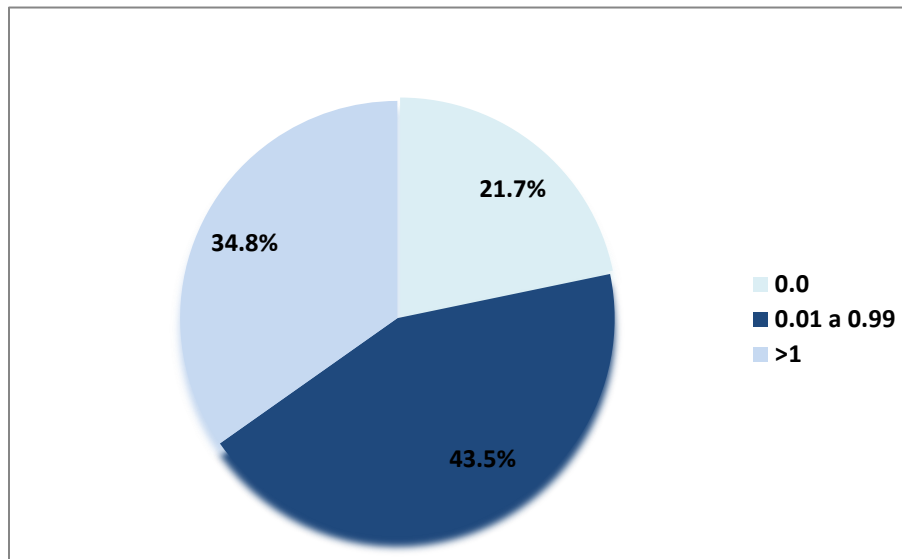
presenta un gran número de pacientes adolescentes que se asocia con mal pronóstico. El porcentaje aquí reportado es mayor a lo que se ha publicado por diferentes autores esperándose una incidencia de adolescentes del 20% y en este estudio el porcentaje total de adolescentes es del 25.4%. También llama la atención que hay diferencias en los pacientes menores de 1 año ya que lo esperado en este caso era al menos un 3% y en este estudio fue de 1.9%.

Grafica 2. Distribución por edad



La enfermedad residual mínima al día +15 resultó; menor que 0.01% en 5 (21.7%), de 0.01 a 0.99% 10 (43.5%) y mayor a 1% en 8 (34.8%) (Grafica 3). La negatividad resulta ser menor a la esperada aunque al considerarse como punto de corte de buen pronóstico 1% para el día +15 como sugieren grupos internacionales se cuenta con 15 (65.2%) que es en un porcentaje similar a los resultados publicados por los grupos cooperativos más importantes del mundo.

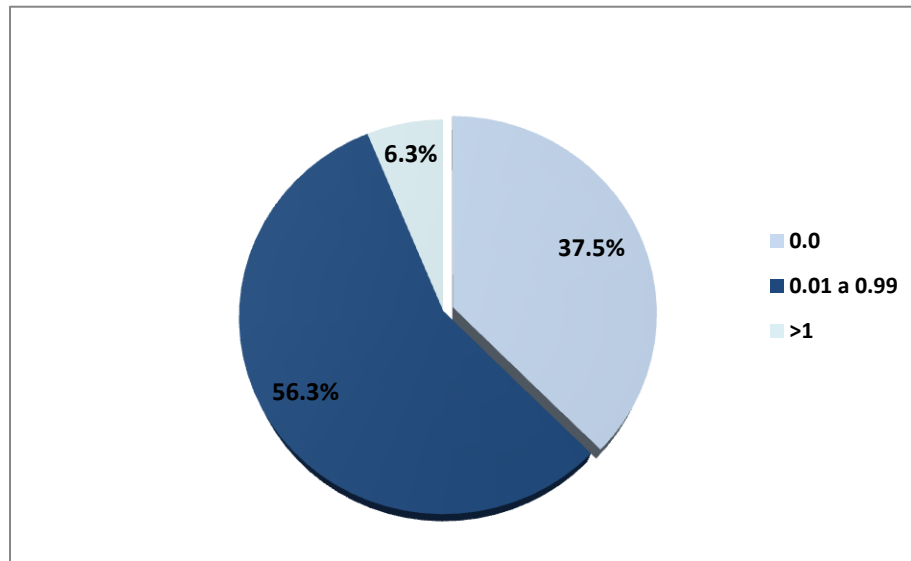
Grafica 3. Enfermedad Mínima Residual al día +15



La Enfermedad Residual Mínima del día +35 resulto; menor de 0.01% en 12 (37.5%), de 0.01 a 0.99% en 18 (56.3%) y mayor de 1% en 2 (6.3%) (Grafica 4). La negatividad de la enfermedad mínima residual resulta francamente menor considerando el punto de corte al día +35 menor de 0.01% ya que se espera un 85% en este nivel de ERM diferente al 37.5% de la muestra estudiada.

DETERMINACION DE ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL EN PACIENTES PEDIATRICOS CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA DE LINAJE B

Grafica 4. Enfermedad Mínima Residual al día +35



El atraso en la quimioterapia de menos de 7 días se encontró en 12 (37.5%) pacientes, mientras que un retraso mayor a 8 días se observó en 20 (62.5%) (Tabla 1). En los pacientes con retraso de quimioterapia menor a 7 días y ERM <0.01, se encontraron 10 (31.2%) y con atraso de más de 8 días 2 (6.2%). La ERM >0.01 en pacientes con retraso menor a 7 días se observó en 2 (6.2%), mientras que en pacientes con retraso mayor a 8 días fueron 18 (56.2%).

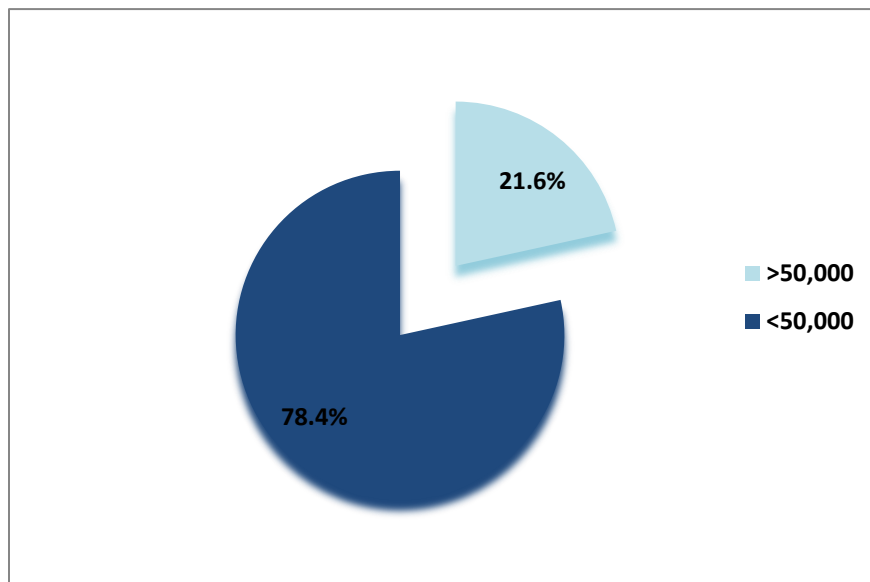
Tabla 1. Retraso en la quimioterapia de inducción a la remisión

Variable	n (%)	<0.01	>0.01	p
Retraso <7 DIAS	12 (37.5%)	10 (31.2%)	2 (6.2%)	0.005
>8 DIAS	20 (62.5%)	2 (6.2%)	18 (56.2%)	

DETERMINACION DE ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL EN PACIENTES PEDIATRICOS CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA DE LINAJE B

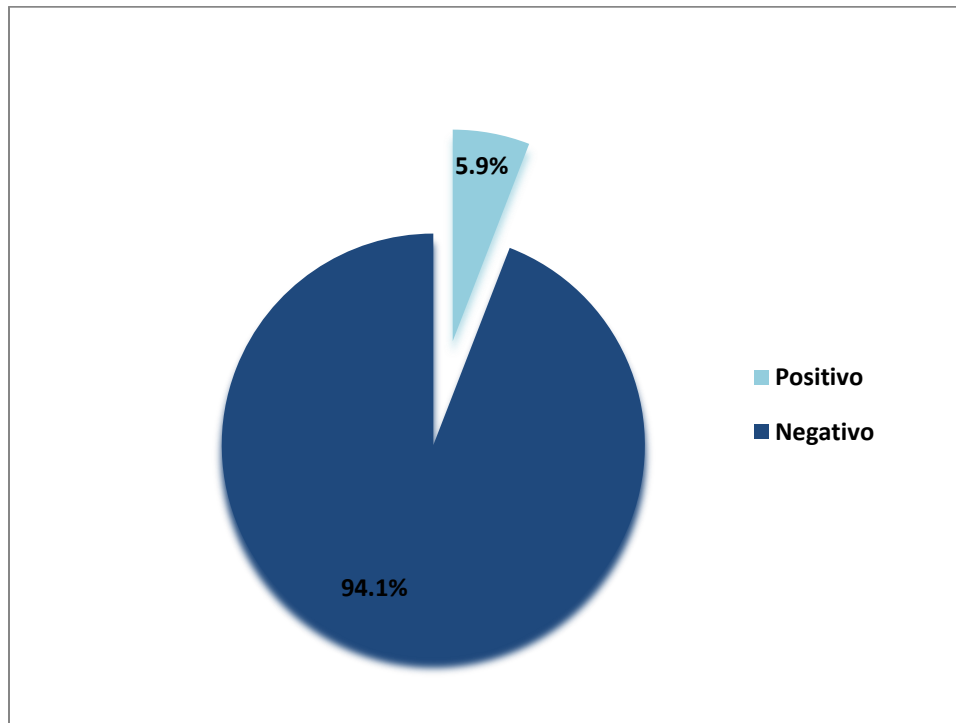
Los leucocitos al diagnóstico encontrados; mayor a 50,000, en 11 (21.6%) y menor a 50,000 en 40 (78.4%) (Grafica 5). No existe diferencia al porcentaje esperado de mal pronóstico.

Grafica 5. Cuenta de leucocitos al diagnostico



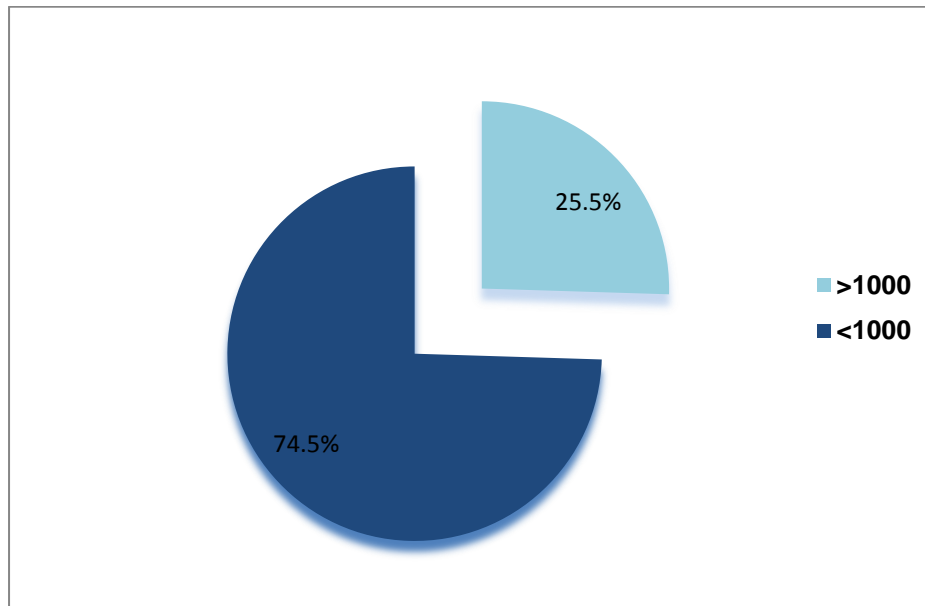
Al revisar las principales variables con valor pronóstico en el tratamiento de la LLA encontramos que la infiltración primaria al Sistema Nervios Central se presentó en 3 (5.9%) y fue negativo en 48 (9.1%) que resulta similar a lo esperado (Grafica 6). En este factor pronóstico no existen diferencias con lo reportado a nivel internacional.

Grafica 6. Infiltración del Sistema Nervioso Central



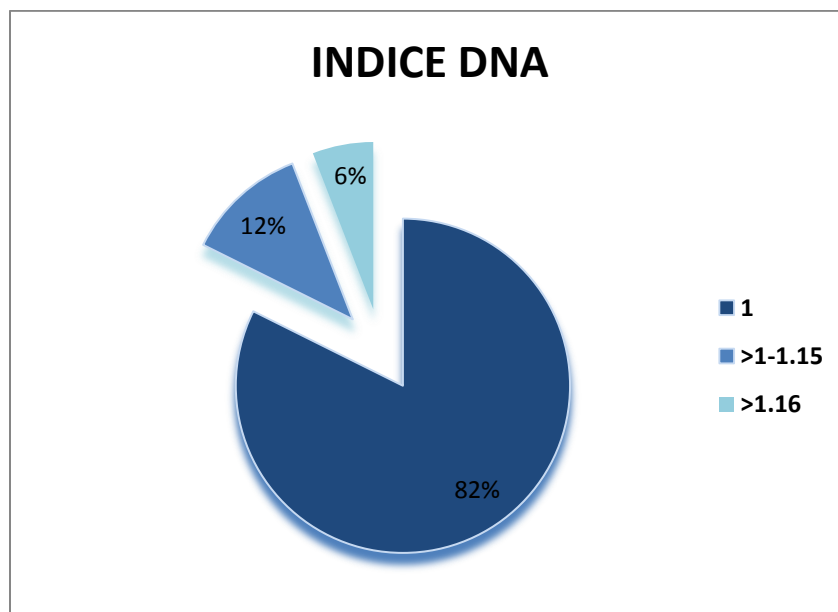
La respuesta a esteroide medida en frotis de sangre periférica por microscopia de luz encontramos buena respuesta en 38 (74.5%) y mala respuesta en 13 (25.5%). Nuestro grupo encontró una respuesta pobre a la prefase con esteroide mayor a la esperada (10%) (Grafica 7). Tradicionalmente se ha considerado que la respuesta a esteroide es una prueba de quimio sensibilidad in vivo, similar a la enfermedad residual mínima y llama la atención que la respuesta no es adecuada encontrando células leucémicas residuales, en este caso en mayor cantidad a la esperada posterior a la aplicación del esteroide.

Grafica 7. Respuesta a esteroide



El índice de DNA encontrado fue de 1 en 42 (82%), mayor de 1 a 1.15; 6 (7.7%) y mayor de 1.16; 3 (5.9%) (Grafica 8). Menor a 1 no se encontraron casos. El índice de DNA de buen pronóstico fue menor al esperado (20-25%).

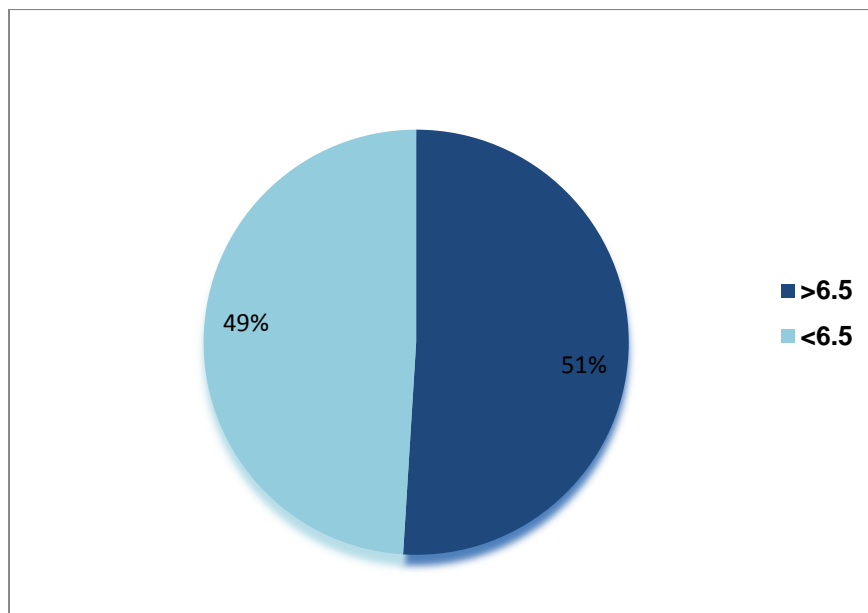
Grafica 8. Índice de DNA



DETERMINACION DE ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL EN PACIENTES PEDIATRICOS CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA DE LINAJE B

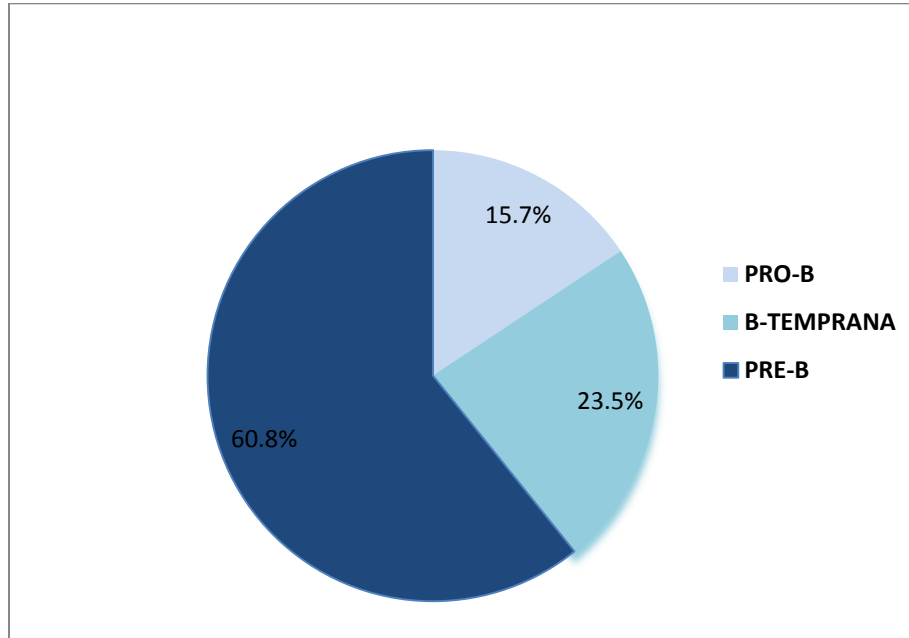
La fase S del ciclo celular <6.5 encontrada fue de 25 (49%) y >6.5 fueron 26 (51%) (Grafica 9). El resultado en nuestro estudio es similar en relación al punto de corte considerado factor pronóstico, pero diferente a lo publicado por otros investigadores.

Grafica 9. Fase S del ciclo celular



El inmunofenotipo más frecuente fue el pre-b con 31 (60.8%), seguido de B-temprana con 12 (23.5%) y de pro-B con 8 (15.7%) (Grafica 10). El inmunofenotipo de buen pronóstico encontrado fue el esperado inicialmente.

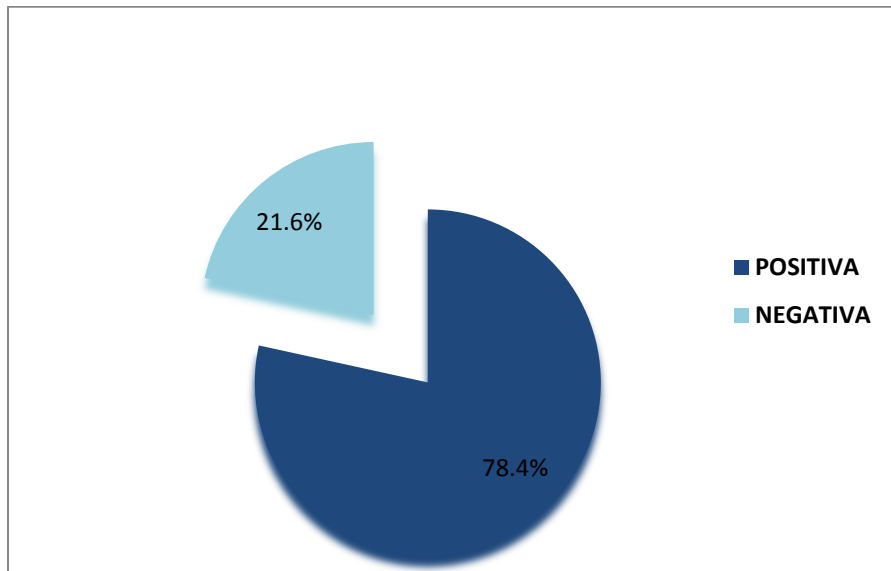
Grafica 10. Inmunofenotipo al diagnostico



La coexpresion de CD33 se presentó en 6 (11.8%) pacientes. Y de 5 (9.8%) en la coexpresion de CD 13.

La expresion de CD10 fue positiva en 40 (78.4%) y negativa en 11 (21.6%) (Grafica 11). Se esperaba un 90% de positividad por lo que el resultado es diferente a lo publicado.

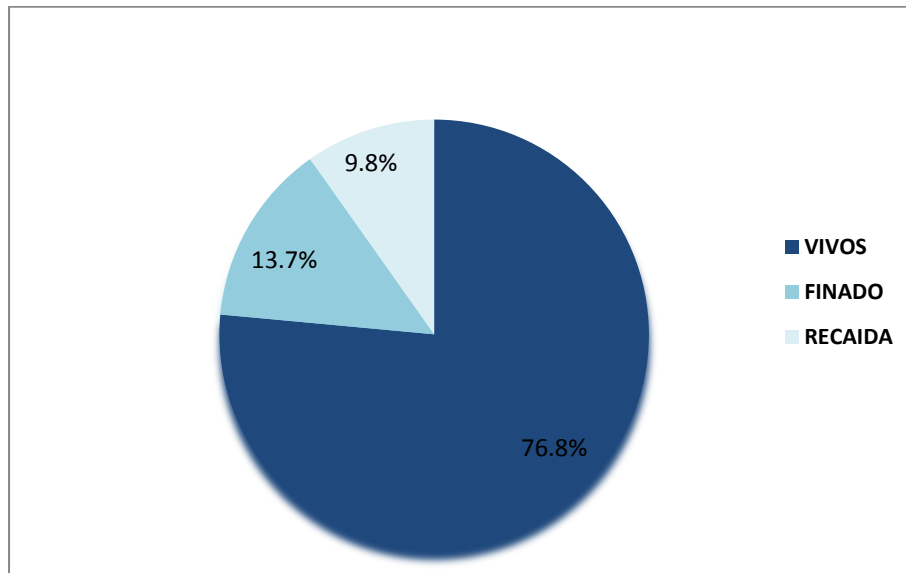
Grafica 11. Presentación de CD 10



Al final del estudio el estado actual documentado fue; pacientes vivos y libres de enfermedad fue de 39 (76.8%), en recaída 5 (9.8%) y 7 (13.7%) fallecieron (Grafica 12). Este resultado es satisfactorio ya que previamente se contaba con vivos y libres de enfermedad del 50%

DETERMINACION DE ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL EN PACIENTES PEDIATRICOS CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA DE LINAJE B

Grafica 12. Estado actual



Al realizar el análisis de correlación de las variables consideradas como de buen pronóstico, encontramos significancia estadística en la cuenta de leucocitos y la negatividad de la ERM al día +15 lo cual confirma el buen pronóstico de contar con baja carga tumoral al diagnóstico. La positividad de CD33 resulto correlacionarse con la positividad de la ERM al día +35, previamente considerada factor de mal pronóstico debido a resistencia a la quimioterapia en el trabajo documentamos que su presencia explica la mala respuesta en nuestros pacientes (Tabla 2).

**DETERMINACION DE ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL EN PACIENTES
PEDIATRICOS CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA DE LINAJE B**

Tabla 2. Factores pronostico

VARIABLE	n (%)	Día 15	Día 35
SEXO		0.596	0.937
Masculino	32 (62.7%)		
Femenino	19 (37.3%)		
EDAD		0.635	0.736
<1 a >10 años	14 (27.5%)		
>1 y <10	37 (72.5%)		
SNC		0.259	0.651
Positivo	3 (5.9%)		
Negativo	48 (94.1%)		
ESTEROIDE		0.262	0.309
Buena respuesta	38 (74.5%)		
Mala respuesta	13 (25.5%)		
INDICE DNA		0.371	0.906
< 1	1 (1.9%)		
1	42 (82.4%)		
1 - 1.15	6 (7.7%)		
> 1.16	3 (5.9%)		
LEUCOCITOS		0.008	0.400
Menor de 50 mil	40 (78.4%)		
Mayor de 50 mil	11 (21.6%)		
CD 10		0.070	0.926
Positivo	40 (78.4%)		
Negativo	11 (21.6%)		
CD 13		0.630	0.826
Positivo	5 (9.8%)		
Negativo	46 (90.2%)		
CD 33		0.714	0.040
Positivo	6 (11.8%)		
Negativo	45 (90.2%)		

9. DISCUSION

La negatividad de la ERM resulta ser menor a la esperada al día +15 aunque al considerarse como punto de corte 1% para el día +15 como sugieren grupos internacionales se cuenta con 15 (65.2%) que resulta en un porcentaje similar a los resultados publicados por los grupos cooperativos más importantes del mundo.

La negatividad de la enfermedad mínima residual al día +35 resulta francamente menor considerando el punto crítico menor a 0.01% ya que se esperaba un 85% en este nivel de ERM, diferente al 37.5% de la muestra estudiada.

El retraso en la quimioterapia de inducción en el día +35 se identificó que 8 días de retraso impacto en el resultado de la ERM. Este retraso corresponde a una semana en el tratamiento de la quimioterapia de inducción la remisión y se presentó en el 62.5% (20) de casos analizados comparado con 37.5% (12) en los cuales el retraso fue menor de 7 días. Esta diferencia resulto estadísticamente significativa al comparar los casos de ERM >0.01% con 8 días de retraso, al observarse en 18 (56.2%) y solo 2 (6.2%) en aquellos con menos de 7 días de retraso, con una $p < 0.005$. Este hallazgo puede explicar las diferencias de respuesta, en nuestro trabajo hay más casos de ERM positiva en el día +35 respecto a los publicado por grupos internacionales con una mayor respuesta medida por ERM. Hasta nuestro conocimiento no hay reportes en la literatura que menciones este resultado, probablemente esta en relación a que la ERM es un estudio que

DETERMINACION DE ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL EN PACIENTES PEDIATRICOS CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA DE LINAJE B

frecuentemente no se realiza en países como el nuestro donde el retraso en la quimioterapia es frecuente.

La relación hombre-mujer fue 1.6:1 observándose un mayor grupo de pacientes del grupo masculino en la muestra estudiada el cual en estudios previos se consideró de mal pronóstico. En el análisis correlación no se observó significancia estadística en cuanto al sexo y la respuesta a ERM en días +15 (p 0.596) y +35 (0.937).

Al revisar las principales variables con valor pronóstico en el tratamiento de la LLA encontramos que el grupo etario de mal pronóstico presenta una mayor incidencia, principalmente a expensas de pacientes mayores de 10 años (13/25.4%) ya que solo se observó un paciente menor de 1 año (1/7.2%). En el grupo de pacientes en estudio existió un número elevado de pacientes adolescentes, lo cual que se asocia con mal pronóstico. El porcentaje aquí reportado es mayor a lo que se ha publicado por diferentes autores esperándose una incidencia de adolescentes del 20% y en este estudio el porcentaje total de adolescentes es del 25.4%. Sin embargo en el análisis de correlación no existió diferencias entre la edad y la ERM en los días +15 (p 0.635) y +35 (0.736). Llamo la atención que hay diferencias en los pacientes menores de 1 año ya que lo esperado en este caso es al menos un 3% y en este estudio fue de 1.9%.

La infiltración primaria al Sistema Nervioso Central resulto similar a lo esperado. Este factor pronóstico al estar asociado con fracaso del tratamiento y corresponder al segundo sitio más frecuente de recaída parece no tener lugar en la explicación de los resultados bajos de respuesta de la ERM al día +15 (0.249) +35 (0.651) como podría presuponerse inicialmente.

DETERMINACION DE ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL EN PACIENTES PEDIATRICOS CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA DE LINAJE B

En la cuenta de leucocitos encontrados al diagnóstico que se considera una variable asociada a carga tumoral, y que se considera como básica para la decisión terapéutica ya que se asocia con la respuesta al tratamiento no existió diferencia en cuanto al porcentaje esperado de mal pronóstico, sin embargo en el análisis de correlación, el día +15 mostro una significancia de 0.08 con la cuenta menor de 50,000 leucocitos. En el día +35 (0.400) no se observó diferencia correlación.

Nuestro grupo encontró que la respuesta pobre a la prefase con esteroide fue mayor (25.5%) a la esperada (10%). Tradicionalmente se ha considerado que la respuesta a esteroide es una prueba de quimio sensibilidad in vivo, esto es, similar a la Enfermedad Residual Mínima y la correlación no mostro significancia estadística (Día +15, p 0.262 y día +35, p 0.309).El índice de DNA de buen pronóstico fue menor al esperado (20-25%). El porcentaje de pacientes en fase S resulto muy similar en ambos grupos sin observar correlación entre con la ERM, por lo que es necesario continuar con estos estudios ya que los fármacos quimioterapéuticos tienen blancos distintos en la interfase del ciclo celular y el conocimiento de las características de la leucemia en nuestros pacientes podría ofrecer una ventana terapéutica interesante.

El inmunofenotipo, la expresión de CD10 y la coexpresion mieloide CD13 y CD33 no observo diferencias significativas con la ERM en el día 15. Pero mostro significancia la coexpresion mieloide CD33 con la respuesta en el día +35.

El resultado del tratamiento hasta la última evaluación no mostro correlación con la ERM en ninguna de las tomas, sin embargo y a pesar de que la ERM es el principal factor

DETERMINACION DE ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL EN PACIENTES PEDIATRICOS CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA DE LINAJE B

pronostico asociado a recaída habrá que considerar en el tiempo de seguimiento aun es breve.

Al analizar el retraso en la quimioterapia se encontró que un tiempo mayor a 8 días el cual corresponde a una semana de la quimioterapia de inducción o al 25% de tiempo de la intensidad de dosis presenta correlación con la positividad de la enfermedad mínima residual. Este hallazgo no ha sido reportado en otros trabajos, probablemente debido a que el retraso en la quimioterapia se presenta en países en vías de desarrollo principalmente, con dificultades en el tratamiento de soporte. El mejoramiento de las condiciones de tratamiento de estos pacientes potencialmente mejoraría la intensidad de dosis aplicada y aumentaría el efecto anti leucémico de los fármacos que se pierde durante el retraso.

Finalmente, debemos considerar que este trabajo comparado con lo que grupos internacionales reportan, es claro que hay diferencias. Esta situación, sugerimos, debe ser investigada, desde nuestro punto de vista con más estudios y potencialmente un mayor número de pacientes, preferentemente en países como México en vías de desarrollo, en un universo de pacientes en las condiciones económicas, geográficas y probablemente de raza similares a la nuestra, ya que los países donde la ERM se encuentra mejor desarrollada las condiciones donde viven y son tratados estos pacientes son sustancialmente diferentes a los nuestros.

La investigación en México en una patología como es la LLA resulta mandatoria, tanto por las implicaciones de incidencia, como por la potencial tasa curación que estos pacientes presentan. Recordando que en estos pacientes el tratamiento oncológico es

DETERMINACION DE ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL EN PACIENTES PEDIATRICOS CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA DE LINAJE B

completamente gratis y en general se cuentan con los medicamentos completos, es necesario identificar ,las posibles causas de las diferencias en los resultados de tratamiento y con el tiempo e investigación clínica efectiva mejorarlos.

10. CONCLUSIONES

La enfermedad mínima residual requiere de mayor investigación en el país, nuestro grupo encontró que la cuenta menor a 50 mil leucocitos al diagnóstico, la coexpresión de CD33 tiene correlación con la respuesta a la quimioterapia y la enfermedad residual mínima y el retraso en la quimioterapia juega un crítico importante en el fracaso en el tratamiento de la leucemia

11. ANEXO 1

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo _____, identificado con _____
_____ En representación legal de _____
_____ manifiesto haber sido informado sobre el objetivo de la recolección de una muestra de sangre o de medula ósea (tomada durante los procedimientos de medula ósea (MO) programados dentro del protocolo) para evaluar probables marcadores de enfermedad residual no evidente con los exámenes usuales como las biopsias y citologías de medula ósea y hemogramas realizados durante el tratamiento. Las muestras tienen como fin ser evaluadas para unos marcadores que buscan evaluar si hay enfermedad leucémica residual no evidente con los estudios que se hacen a la fecha. Dado que de los resultados de esta búsqueda aún no sabemos su real utilidad y lo que pretendemos es aclarar si los hallazgos tienen o no relación con el comportamiento futuro de la enfermedad, por ahora estos resultados no serán tenidos en cuenta sino que se verificaran al final del tratamiento buscando si se asociaron a eventos como buena respuesta al tratamiento, recaída o persistencia de enfermedad. Seré informado de los resultados en el momento en que yo lo solicite, también podré solicitar información adicional de la evolución del conocimiento y su impacto en estos resultados, podré rehusarme a autorizar que se lleven a cabo los estudios en las muestras posteriores, estos procedimientos no representarán riesgo adicional dado que se realizarán en el mismo tiempo anestésico de la quimioterapia intratecal programada dentro de su protocolo de tratamiento. No se tomaran biopsias de médula ósea ni estudios adicionales con miras a realizar única y exclusivamente estos marcadores. Podré retirar mi consentimiento para continuar con esta evaluación en el momento que lo considere pertinente. Los resultados de esta evaluación no tendrán por ahora ningún impacto sobre el tratamiento propuesto a mi hijo. No habrá perjuicio para el paciente en caso de retirar mi consentimiento para continuar con esta evaluación. En constancia de lo anterior y sin dudas o aclaraciones adicionales firmo:

DR ELOY PEREZ RIVERA
En calidad de testigo

DR PRIMO CRUZ BORJA
En calidad de testigo

**DETERMINACION DE ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL EN PACIENTES
PEDIATRICOS CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA DE LINAJE B**

12. ANEXO 2

Hoja de recolección de datos en pacientes con leucemia linfoblástica aguda

1) Al diagnóstico

Fecha de ingreso			No. de registro	
Nombre				Afiliación
Sexo		Edad		Observaciones:

Antecedentes:

AHF.- Neoplasias hematológicas					
No hematológicas					
APNP.- Originario				Residente	
Ocupación			Nivel socioeconómico		
Urbano/rural			Escolaridad		
Mielotóxicos	benceno		solventes		pesticidas
electromagnéticos		radiaciones		Quimioterapia	
Otros:					
APP.- Crónicos degenerativos:	DM		HAS		Cardiológicos
Nefropatías		Hepatopatías		Hepatopatía	
Neuropatía			OTROS		

**DETERMINACION DE ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL EN PACIENTES
PEDIATRICOS CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA DE LINAJE B**

PERINATALES			
Peso		Talla	
SDG		Patologías del producto	
Patologías de la madre		Patologías del padre	
Madre toxicomanías		Padre toxicomanías	

Síntomas al diagnóstico:

Tiempo de evolución del padecimiento:							
Astenia		Adinamia		Pérdida de peso		Hiporexia	
Cefalea		Mialgias		Artralgias		Dolor óseo	
Disnea		Infecciones		Sangrados			
Otros							

**DETERMINACION DE ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL EN PACIENTES
PEDIATRICOS CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA DE LINAJE B**

Examen físico al diagnóstico:

Adenopatías		Palidez		Sangrados		Púrpura	
Hepatomegalia		cm	Esplenomegalia		cm	Dolor óseo	
Fiebre		Infecciones					
Infiltración extramedular							
Peso					Karnofsky		
Otros:							

**(Al diagnóstico)
Enfermedad Residual**

2. En cada toma de muestra para evaluar

BH		Q.S		Serología	
Hb		Gluc.		VH B	
Hto		Urea		VH C	
VCM		Creat.		VIH	
HCM					
Leuc					
Neutr					
Linf		Alb: PT			
Basof		BT			
Eos		BD			

Médula ósea		Inmunofenotipo						Cariotipo	
Morf.	%	Ac.	%	IMF	Ac.	%	IMF		No. copias
Eritro		CD2			CD79				
Prom		CD3			TdT				
Mielo		CD5			MPO				
Metami		CD7			Glif A				
Bandas		CD10			HLA				
Seg		CD11			Ig M				
Eos		CD13			C. kap				
Bas		CD14			C. Lam				

**DETERMINACION DE ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL EN PACIENTES
PEDIATRICOS CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA DE LINAJE B**

Mono		Bl			
Blastos		DHL			
Coagulación		K			
Plaq		Ca			
		P			
		AC.Urico			
		LCR			

Linf		CD15			Indice DNA				
Mono		CD19							Reacciones Citoquim
Plasm		CD20							%
Blastos		CD21							Perox
Megas		CD22							PAS
Celular		CD33				Cariotipo			Sudan negro
Infil		CD34							Esterasa
Clasif. FAB		CD38							NaF
		CD41							
		CD71							

ESTUDIOS DE IMAGEN										
Rx tórax										
Otros										
ASPIRADO DE MEDULA OSEA										
Cantidad de blastos	Día +15							Día +35		
ESQUEMA DE QUIMIOTERAPIA										
Vincristina	D+7		D+14			D+21		D+28		
Daunorrubicina	D+7		D +14							
Asparaginasa	D+8	D+10	D+12	D+15	D+17	D+19	D+22	D+24	D+26	
Esteroides	Inicio							Termino		
COMPLICACIONES										
Fecha	Eventualidad									

13. REFERENCIAS

1. Abdullaev F, et al Pattern in Childhood Cancer Mortality in Mexico, Archives Medical Research, 31: 526-531, 2000.
2. Chessells JM. Recent advances in management of acute leukemia. Archives of Disease Childhood 2000, 82; 438-442.
3. Pui CH, John SD, Pullen J. Childhood Leukemias. New England Journal of Medicine 1995; 332: 1618-1630.
4. Jan van Eys, Pullen J, The French American British Classification of Leukemia, The Pediatric Oncology Group Experiencie with Lymphocytic Leukemia, Cancer, 1986, 57; 1046-1051
5. Borowitz MJ, Devidas M, Hunger SP, et al.: Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study. Blood 2008, 111 (12): 5477-85.
6. van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grumayer ER, et al: Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. Lancet 1998, 352:1731-1738.
7. Cave´ H, van der Werff ten Bosch J, Suciú S, et al: Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia: European Organisation for Research and Treatment of Cancer–Childhood Leukemia Cooperative Group. N Engl J Med 1998 339:591-598.
8. Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, et al: Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 2000, 96: 2691-2696.
9. Kramer S, Meadows AT, Jarret P, Evans AE. Incidence of childhood cancer: experience of a decade in a population-based registry. J natl Cancer Inst 1983;70:49.

DETERMINACION DE ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL EN PACIENTES PEDIATRICOS CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA DE LINAJE B

10. Pui CH, Carroll AJ, Raimondi SC, et al: Clinical presentation, karyotypic characterization, and treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia with near-haploid or hypodiploid less than 45 line. *Blood*, 1990; 75:1170-1177.
11. Sinigaglia R, Gigante C, Bisinella G, et al: Musculoskeletal manifestations in Pediatric Acute Leukemia, *Journal of Pediatric Orthopedics* 2008;28:20-28.
12. Smith M, Arthur D, Camitta B, et al. Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. *Journal of clinical Oncology* 1996; 14:18-24.
13. Pizzo PA, Poplack DG, et al. Principles and Practice of Pediatric Oncology, 5th Ed. Ch 19.
14. Lilleyman JS, Hann IM, FAB morphological classification of childhood lymphoblastic leukemia and its clinical importance, *J Clin Pathol* 1986; 39: 998-1000.
15. Mandrell BN, Pritchard M. Understanding the Clinical Implications of Minimal Residual Disease in Childhood Anemia. *J Pediatr Oncol Nurs*; 23: 3844
16. Pui CH. (2000) Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *Curr Opin Oncol*; 2006, 12: 3-12.
17. Campana D, Coustan-Smith E. Advances in the Immunological monitoring of Childhood Acute Lymphoblastic Leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*; 2000, 15: 1-19.
18. Campana D, Coustan-Smith E. Minimal Residual Disease Studies by Flow Cytometry in Acute Leukemia. *Acta Haematol*; 2004, 112: 8-15.
19. Campana D, Coustan-Smith E. Detection of Minimal Residual Disease in Acute Leukemia by Flow Cytometry. *Cytometry (Comm Clin Cytometry)*; 1999, 38:139-52.
20. Campana D, Neale GAM, Coustan-Smith E, Pui CH. Detection of Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia: the St Jude Experience. *Leukemia*; 2001, 15: 278-9.