



ARTÍCULO ORIGINAL

Determinación cuantitativa de la enfermedad mínima residual por citometría de flujo en pacientes con leucemia aguda linfoblástica

Homero Rendón-García^{a,*}, Gerardo Álvarez-Hernández^b, Gilberto Covarrubias-Espinoza^a, Alfonso Ramos-Salazar^c y María Guadalupe Burboa-Zazueta^d

^a Oncología Pediátrica, Hospital Infantil de Sonora, Hermosillo, Son., México

^b Departamento de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Sonora, Hermosillo, Son., México

^c Laboratorio Ramos, Hermosillo, Son., México

^d Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad de Sonora, Hermosillo, Son., México

PALABRAS CLAVE

Leucemia linfoblástica aguda; Enfermedad mínima residual; Citometría de flujo; México.

Resumen

Introducción: La leucemia aguda linfoblástica (LAL) es el cáncer infantil más frecuente. La prueba de citometría de flujo (CF) identifica linfoblastos residuales conocidos como enfermedad mínima residual (EMR).

Objetivo: Identificar tempranamente la EMR en la semana 5, en niños con diagnóstico de LAL por CF.

Material y métodos: Incluimos 35 niños con LAL, clasificados por factores pronósticos, se evaluó la remisión clínica y presencia de linfoblastos residuales en la semana 5 de quimioterapia de inducción, por CF con 4 fluorocromos. Se consideró EMR positiva > 0.01% células mononucleares (CMN) y EMR negativa < 0.01% CMN. Se analizó por prueba *t* de Student y *ji cuadrada*; un valor de *p* < 0.05 fue significativo en el programa NCSS[®] versión 7.

Resultados: Reportamos 35 niños con LAL evaluados por CF, de los cuales 5 se consideraron con EMR positiva en la semana 5 de tratamiento, con una media de edad de 9.95 ± 6.04 años, el conteo de leucocitos de diagnóstico fue $\mu=135.226 \text{ mm}^3$, la mayor proporción (91%) correspondió a LAL de linaje B, con cariotipo normal en 3 de 4 niños, un 70% de pacientes presentaron índice de DNA ≤ 1 . La prueba de EMR por CF fue positiva en 14.3% de niños, en aparente remisión clínica y citomorfológica de sus médulas óseas.

Conclusión: La CF permite un monitoreo más preciso de la remisión inmunológica de LAL en niños.

* Autor para correspondencia: Reforma N° 355 Norte, Colonia Ley 57, C.P. 83100, Hermosillo, Son., México. Teléfono: (66) 2289 0600. Celular: (66) 2124 0038. Fax: (66) 2289 0606. Correo electrónico: homero_rendon@yahoo.com.mx (Homero Rendón-García).

KEYWORDS

Acute lymphoblastic leukemia; Minimal residual disease; Flow cytometry; Mexico.

Quantitative determination of minimal residual disease by flow cytometry in patients with acute lymphoblastic leukemia

Abstract

Introduction: Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most commonly diagnosed cancer in children. The flow cytometry test (FC) identifies the amount of residual malignant cells; this determines the minimal residual disease (MRD).

Objective: Early identification of EMR in 5 weeks in children with ALL by FC.

Material and methods: The sample included 35 children with ALL, classified by prognostic factors; clinical remission and residual lymphoblast were evaluated in the 5 weeks of induction chemotherapy with 4 fluorochromes by FC. MRD was considered positive when $> 0.01\%$ mononuclear cell (MNC) and negative MRD $< 0.01\%$ (MNC). Differences were compared by Student's t test and Chi-square, $p < 0.05$ was significant in the program NCSS® version 7.

Results: We assessed 35 children with ALL by FC. Five children were considered positive, with a mean age of 9.95 ± 6.04 years, the mean of leukocyte were $\mu = 135.226 \text{ mm}^3$ at diagnosis. The most proportion about 91% corresponds to B leukemia, only 2 children had normal karyotype and 70% of patients had index of DNA ≤ 1 . The MRD test was positive in 14.3% of children in apparent clinical remission and cytomorphology of their bone marrow samples.

Conclusion: CF allows more accurate monitoring of remission in children with ALL in children.

1665-9201 © 2014 Gaceta Mexicana de Oncología. Publicado por Masson Doyma México S.A. Todos los derechos reservados.

Introducción

La leucemia aguda linfoblástica (LAL) representa el cáncer infantil más frecuente, constituye aproximadamente 40% de los casos nuevos, con una incidencia anual de 4 casos por cada 100,000 habitantes.

La citometría de flujo (CF) es una técnica de análisis celular que mide las características inmunofenotípicas que poseen las células al pasar a través de un rayo de luz. Cuando se diagnostica LAL, el número logarítmico de células leucémicas se acerca a 1×10^{12} . Estando en remisión clínica, es decir, sin datos evidentes de la enfermedad, puede existir hasta 1×10^{10} células malignas microscópicamente en el paciente, esta cantidad residual de células malignas no detectable por técnicas de rutina se define como enfermedad mínima residual (EMR)¹.

La CF y la biología molecular son las técnicas más empleadas para cuantificar la EMR en LAL; en particular, la CF ha demostrado una sensibilidad de detección $\leq 10^{-4}$ células linfoblásticas, mostradas por inmunofenotipos aberrantes², su elevada sensibilidad determina importancia pronóstica cuando la EMR registra valores $< 1\%$, estudios clínicos han demostrado que resultados de EMR $> 1\%$ al final del tratamiento de inducción predicen recaída en un 70% a 100%, por el contrario cuando esta prueba es negativa se asocia con un 2%-10% de recaída^{3,4}. Es así que la técnica de CF es utilizada de rutina para identificar leucemia residual, su resultado define con más precisión la remisión y respuesta al tratamiento inicial.

Presentamos los resultados de un estudio cuyo propósito central es cuantificar la EMR, mediante inmunofenotipificación por CF, en pacientes pediátricos con LAL que recibieron quimioterapia de inducción a la remisión.

Material y métodos

Pacientes

Se realizó un estudio durante 18 meses, en pacientes de 0 a 18 años de edad con LAL. Se utilizó para diagnóstico el criterio de más de 25% de células blásticas en médula ósea, clasificadas como L₁, L₂ y L₃ de acuerdo a los criterios de la Federación Franco-Americana-Británica (FAB)⁵. Los pacientes se clasificaron de acuerdo a los factores pronósticos internacionales de la LAL. Se incluyeron niños con: inmunofenotipo, índice de DNA, citogenética, estudio de médula ósea en remisión en la semana 5 de tratamiento (células malignas $< 5\%$ en médula ósea = M1); y hematopoyesis eficaz. Se excluyeron pacientes con régimen de quimioterapia previo, LAL en recaída o condición refractaria, reporte inadecuado de EMR y tratamiento de quimioterapia de inducción incompleto. Se solicitó consentimiento informado, los cuales fueron autorizados por el tutor. El proyecto fue avalado por el Comité de Ética de la Institución.

Protocolo de tratamiento y criterio de respuesta

Todos los niños recibieron el protocolo de quimioterapia de inducción, el cual consistió en prednisona a 40 mg/m²SC por 5 semanas y una dosis de quimioterapia intratecal. En el día 8, la fase de inducción con quimioterapia se llevó a cabo bajo el siguiente esquema: vincristina 2 mg/m²SC intravenosa (IV) semanal por 4 dosis, L-asparaginasa 6,000 UI/m²SC intramuscular (IM) por 6 dosis y doxorubicina 30 mg/m²SC IV en la semana 4. El estudio de aspirado de médula ósea fue analizado para determinar EMR en la semana 5 posterior a la inducción, basado en el reporte de inmunofenotipo inicial, se contaron mínimo 100,000 células mononucleares (CMN), buscando inmunofenotipos aberrantes persistentes, con 4

fluorocromos isotiocianato de fluoresceína (FITC): Anti-CD13, CD33, CD10, TdT (Dako Cytomation, Copenhagen, Dinamarca); Anti-CD38, CD58, CD21, CD66c (Beckman Coulter, Fullerton, Ca, EUA); Anti-CD22, CD45, CD15 (Beckton Dickinson, BD, San José, Ca, EUA); Ficoeritrina (PE): Anti-CD10 (Dako Cytomation); Anti-CD56 (BeckmanCoulter); Anti-NG2 (Beckman Coulter); proteína clorofila peridina (PerCP): Anti-CD34; Aloficocianina (APC): Anti-CD19 (Beckton). Procesados de acuerdo a estándares de CF y analizados mediante el citómetro BD FACSCalibur™, con análisis celular basado en el *software* Cell Quest®.

Se consideró EMR negativa cuando se detectó una cantidad < 0.01% y EMR positiva con una cantidad > 0.01% de CMN, con expresión de antígenos aberrantes.

Análisis estadístico

Se analizaron las diferencias clínicas y biológicas entre EMR positiva y negativa, por prueba *t* de Student y *ji cuadrada*. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativos. Se utilizó para análisis el programa NCSS® versión 7.

Resultados

Se incluyeron 35 niños, de éstos 65.4% fueron hombres y 34.6% mujeres ($p=0.063$). La edad estuvo entre uno y 9 años (68.6%), un 31.4% tenía más de 10 años. La edad promedio de los casos EMR positiva fue de 9.95 ± 6.04 años, mientras la de los niños con EMR negativa fue de 8.49 ± 4.65 años ($p=0.0208$). Al clasificar a los pacientes de acuerdo al reporte de la EMR, se observó que 5 pacientes (14.3%) fueron EMR positiva y 29 (82.8%) reportaron EMR negativa. Uno de los

pacientes no pudo ser clasificado por muestra inadecuada. En la tabla 1 se resume los hallazgos clínicos más significativos de los niños que tuvieron EMR positiva.

Se obtuvieron resultados de EMR positiva en un 51.7%, éstos cumplían criterios de bajo riesgo clínico, seguidos por 34.5% con clasificación de alto riesgo. La evaluación de las características clínicas considerando el resultado de la EMR, no determinó diferencias en cuanto al inmunofenotipo ni la morfología, pero si en el cariotipo ($p=0.0071$) y en el índice de DNA ($p=0.002$). En el caso del cariotipo hubo una mayor proporción (60% vs. 10%) de lesiones estructurales en los individuos con EMR positiva, así un mayor porcentaje (60%) de pacientes EMR positiva tuvieron índice < 1 (tabla 2).

La tabla 3 describe el criterio de respuesta terapéutica de todos los pacientes. Se observó que 34 niños (97%) tuvieron una respuesta medular en el día 14, adecuada para el tratamiento de inducción; además, en la semana 5 por citomorfología del aspirado de médula ósea en 100% de los niños no se detectó actividad leucémica. A pesar de una remisión citomorfológica de las médulas óseas, únicamente 83% de los pacientes estaba libre de actividad leucémica cuando fueron evaluados por CF a la semana 5 de tratamiento. De esta forma se demostró una prueba de EMR positiva en 5 pacientes (14.3%), realizada por el análisis de CF con 4 fluorocromos con una $p \leq 0.000$.

Discusión

Los hallazgos de este estudio corroboran que la CF es una prueba útil para identificar EMR en niños con LAL al término de la terapia de inducción, tal como ha sido demostrado en

Tabla 1 Características clínico-biológicas de los pacientes con leucemia aguda linfoblástica con EMR positiva (2009-2010)

Características	Sujetos				
	1	2	3	4	5
Sexo	M	M	F	M	F
Edad	5.25	4	14.2	7.3	18.3
Grupo de riesgo clínico	MAR	MAR	AR	BR	AR
Leucocitos mm ³ $\mu=135,226 \pm 228,151$	540,000	78,410	40,810	15,010	57,000
Riesgo BFM*	2.6	1.48	1.31	1.25	0.65
Respuesta a la inducción día 14	M2	M2	M2	M1	M1
Morfología	L2	L2	L2	L1	L2
Inmunofenotipo	Pre-B	T	Pre-B	Pre-B Temprana	Pre B
Cariotipo	46XY;t(9;22)	47XY+22 t(8;11)	Normal	46XY;t(6;14)	Normal
Índice de DNA	1	1	1.09	1	Sin registro
EMR % Células	4.58	2	1.2	2	6
Estado actual	Muerto	Referido	Remisión	Remisión	Abandono

M: masculino; F: femenino; MAR: muy alto riesgo; AR: alto riesgo; BR: bajo riesgo; EMR: enfermedad mínima residual; M1: médula ósea normal; M2: médula ósea sin blastos no recuperada.

* Determinado por la fórmula: Volumen tumoral=0.2 x log (blastos/mL+1)+ 0.6 x hepatomegalia en cm + 0.04 x esplenomegalia en cm.

Tabla 2 Características inmunomoleculares de niños con leucemia aguda linfoblástica con EMR (2009-2010)

Variable	EMR		p*
	Positiva N (%)	Negativa N (%)	
	N=5	N=29	
Inmunofenotipo			
Células B	4 (80.0)	27 (93.1)	0.3894
Pre-B	2 (40.0)	6 (20.7)	
Pre-B temprana	1 (20.0)	20 (68.9)	
Pre-B con expresión CD7	0 (0.0)	0 (0.0)	
Pre-B temprana con expresión CD33	1 (20.0)	1 (3.4)	
Células T	1 (20.0)	2 (6.9)	
Morfología			
L1	1 (20.0)	13 (44.8)	0.2975
L2	4 (80.0)	16 (55.2)	
Cariotipo			
Lesión estructural	3 (60.0)	3 (10.3)	0.0071
Normal (46XX, 46XY)	2 (40.0)	23 (79.3)	
Sin reporte		3 (10.3)	
Índice de DNA			
Índice de DNA ≤ 1	3 (60.0)	2 (6.9)	0.002
Índice de DNA = 1		11 (37.9)	
Índice de DNA ≥ 1	1 (20.0)	13 (44.8)	
Sin reporte	1 (20.0)	3 (10.3)	

EMR: enfermedad mínima residual.

* Basada en una ji cuadrada para diferencia de proporciones.

otros países⁶⁻⁹, esto sugieren la conveniencia de su uso sistemático en hospitales similares al del estudio, donde la CF no es empleada rutinariamente como prueba pronóstica.

El valor de la CF para detectar EMR ha sido ya demostrado independientemente de la técnica con que se realice la prueba, el resultado de la CF complementa adecuadamente a los factores pronóstico clínicos como los que fueron empleados en este estudio, las mejoras en su validez, confiabilidad, simplicidad y costo-beneficio han incrementado su capacidad como predictor independiente de recaída clínica² y como instrumento discriminatorio para ajustar los protocolos de manejo terapéutico¹⁰.

La variabilidad de los criterios clínicos pronósticos en pacientes con LAL son usados en conjunto para pronosticar recaídas, sin embargo, ninguno de ellos de forma individual posee la suficiente validez para pronosticar recaídas clínicas. En este contexto, observamos que la CF nos ayudó a identificar 5 pacientes con EMR positiva, que tenían elevada cantidad de células leucémicas residuales, que estaban en remisión clínica completa después de la terapia de inducción. Lo que muestra que los factores pronóstico clínicos aunque buenos, no son suficientes para predecir en forma temprana res-

Tabla 3 Criterio de respuesta al tratamiento de inducción en leucemia aguda linfoblástica

Variable	Porcentaje		p*
	N=35	(%)	
Respuesta medular día 14**			
Negativa	34	97.1	0.000
Positiva	1	2.9	
Respuesta medular semana 5			
Negativa	34	100	0.000
Positiva	0	0	
EMR***			
EMR positiva	5	14.3	0.000
EMR negativa	29	82.8	
Sin reporte	1	2.9	

EMR: enfermedad mínima residual.

* Basada en una ji cuadrada para diferencia de proporciones.

** Se consideró positiva si la cuenta de linfoblastos era > 0.05%, y negativo cuando la cuenta era <0.05%. *** EMR positiva si la cuenta de inmunofenotipos aberrantes era > 0.01%, y negativa si la cuenta era < 0.01%. Esta clasificación se realizó en la semana 5 del tratamiento de inducción.

puesta al tratamiento o posibles recaídas en pacientes con LAL. Esto indicaría que la determinación de EMR mediante CF apoya positivamente al terapeuta en la decisión de elegir el esquema de tratamiento o reforzar los seleccionados.

Los niños con estudio de EMR positiva tuvieron una edad promedio (9.95 años) mayor a los niños con EMR negativa, en general los pacientes con criterio de alto riesgo por edad pueden favorecer resultados de EMR positiva¹¹. Tres niños tuvieron EMR positiva con cuentas leucocitarias < 50,000 mm³, lo que sugeriría un pronóstico favorable al tratamiento de inducción¹¹. La prueba de CF detectó EMR positiva en 4 de 5 niños, los cuales tenían presencia de índices de DNA menores de 1.16 por CF. A este respecto se ha reportado que un índice de DNA < 1.16 tiene peor pronóstico, que los niños con índices entre 1.16 a 1.6^{12,13}.

Por otro lado, parece que la detección de EMR al final de la inducción es un factor pronóstico independiente para predecir recaída clínica de LAL, y su capacidad predictiva es excelente cuando se encuentran valores negativos, pues se han identificado recaídas entre el 70% a 100% de los pacientes con EMR positiva, mientras que EMR negativa ha reportado 2% a 10% de recaídas^{3,4}.

Los procedimientos técnicos para detectar EMR en pacientes con leucemia aguda han avanzado considerablemente y se han convertido en una herramienta confiable para correlacionar la situación clínica y la respuesta al tratamiento. La técnica permite diferenciar leucemia residual, lo cual permite inferir la probabilidad de recaída en pacientes con EMR detectable, esto justifica decisiones clínicas para intensificar o modificar los esquemas de tratamiento^{8,14,15}. Los criterios de riesgo y el estudio de médula ósea en la actualidad tienen

limitada sensibilidad al término del tratamiento de inducción, pero son la forma tradicional para diagnosticar recaída en hospitales donde no hay evaluación por citometría¹⁴.

Conclusiones

La CF es una técnica útil y necesaria para evaluar con más precisión la remisión clínica en la LAL mediante la detección de EMR, la cual favorece decisiones terapéuticas.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Financiamiento

Los autores no recibieron patrocinio para llevar a cabo este artículo.

Agradecimiento

Nuestro especial agradecimiento a la Agrupación para Niños Leucémicos y Afectados de Cáncer A.C. (ANLAC), por su apoyo y colaboración financiera para la realización de prueba del estudio de la enfermedad mínima residual (EMR) que requirió este estudio.

Referencias

1. Campana D, Coustan-Smith E. Minimal Residual Disease Studies by Flow Cytometry in Acute Leukemia. *Acta Haematol* 2004;112:8-15.
2. Dworzak MN, Fröschl G, Printz D, et al. Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;99:1952-1958.
3. Jacques JM, Van Dongen, Vincent HJ, et al. Detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. In: Agarwal B, Claminus G, Diller L, et al (eds). *Educational Book 2010. International Society of Pediatric Oncology. 42nd Congress of the international Society of Paediatric Oncology. Boston, USA October 2010*, 21-24.
4. Van Dongen JJM, Seriu T, Panzer-Grümayer RE, et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia in childhood. *Lancet* 1998;352:1731-1738.
5. Chin-Hon P. *Childhood Leukemia*. USA: Cambridge University Press, St Jude Children's Research Hospital Memphis, Tennessee; 2004.
6. Björklund E, Mazur JS, Söderhäll S, et al. Flow cytometric follow-up of minimal residual disease in bone marrow gives prognostic information in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2003;17:138-148.
7. Vidriales MB, Perez JJ, López-Berges MC, et al. Minimal residual disease in adolescent (older than 14 years) and adult acute lymphoblastic leukemias: early immunophenotypic evaluation has high clinical value. *Clinical Observations, interventions and therapeutic trials*. *Blood* 2003;101:4695-4701.
8. Borowitz MJ, Pullen DJ, Shuster JJ, et al. Minimal residual disease in childhood precursor- B- Cell acute lymphoblastic leukemia: Relation to other risk factors. A children's Oncology Group Study. *Leukemia* 2003;17:1566-1572.
9. 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;111:5477-5485.
10. Attarbaschi A, Mann G, Panzer-Grümayer R, et al. Minimal residual disease values discriminate between low and high relapse risk in children with B-Cell precursor acute lymphoblastic leukemia and an intrachromosomal amplification of chromosome 21: The Austrian and German acute lymphoblastic leukemia Berlin-Frankfurt-Münster (ALL-BFM) Trials. *J Clin Oncol* 2008;26:3046-3050.
11. Margolin JF, Steuber CP, Poplack DG. *Leukemia Lymphoblastic Acute*. In: Pizzo AP, Poplack DG (eds). *Principles and practice of Pediatric Oncology*. 6th Edition. USA: Editorial Lippincott; 2004. p. 518-565.
12. Al-Harbi G, El-Solh H, Al-Nasser A, et al. DNA Index in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Correlation with Other Prognostic Factor. *Prc Am Soc Clin Oncol* 2000;19:2322.
13. Nygaard U, Larsen J, Kristensen TD, et al. Flowcytometric DNA index, G-band karyotyping, and comparative genomic hybridization in detection of high hyperdiploidy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Peadiat Hematol Oncol* 2006;28:134-140.
14. Coustan-Smith E, Ribeiro RC, Stow P, et al. A simplified flow cytometric assay identifies children with acute lymphoblastic leukemia who have a superior clinical outcome. *Blood* 2006;108:97-102.
15. Gouldaine N, Oakhill A, Steward C. Annotationpractical application of minimal residual disease assessment in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Br J Haematology* 2001;112:275-281.
16. Hunger SP, Voss SD. Borowitz M. Detection of minimal residual disease in childhood cancer. Perry MC Editor. *American Society of Clinical Oncology. Educational Book. 41st Annual Meeting: spring* 2005;771-783.