DETERMINACION DE ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL EN LEUCEMIAS AGUDAS

Dres. E. Sajaroff, P. Rubio, A. Medina, M. Sanz, C. Alonso, A. Bernasconi, P. Zubizarreta, M. S. Felice, J. Rossi

INTRODUCCION

Según lo reportado en el Registro Oncopediátrico Hospitalario Argentino (ROHA) las leucemias agudas representan el 37% de las enfermedades neoplásicas pediátricas[1]. En la actualidad, en Europa y Estados Unidos, aproximadamente el 80% de los niños con leucemia linfoblástica aguda (LLA) logran curarse con la administración de un tratamiento adecuado. En nuestro Hospital, la probabilidad de sobrevida libre de eventos (pSLE) alcanzada en el último estudio se encuentra en valores similares.

La remisión completa (RC) se define como la presencia de menos de 5% de blastos o células leucémicas a la observación morfológica por microscopía óptica, sin otra evidencia de compromiso por la enfermedad. El 97% de los pacientes con LLA alcanzan la RC luego de la fase de inducción. Sin embargo, en aproximadamente un 20% de los casos, el tratamiento fracasa. La principal causa de fracaso del tratamiento es la recaída de la enfermedad, que se define como la reaparición de la misma luego de alcanzada la RC y que ocurre debido a la persistencia y expansión de mínimas cantidades de células leucémicas residuales, indetectables por observación en la microscopía óptica, conocidas como enfermedad mínima residual (EMR). La importancia clínica de la cuantificación de la EMR ha sido ampliamente documentada en la literatura científica internacional demostrando una correlación significativa entre la persistencia de EMR y el riesgo de recaída[2,3,4].

Los protocolos basados en la estrategia del grupo BFM (Berlín-Frankfurt-Münster), que se aplican en nuestro medio, estratifican las LLA pediátricas al momento del diagnóstico de la enfermedad y de acuerdo a la respuesta que presentan al tratamiento, en tres grupos de riesgo: estándar, intermedio y alto. Estos grupos de riesgo se determinan de acuerdo a la probabilidad de presentar una recaída o reaparición de la enfermedad y se basan en factores biológicos como la edad del paciente, recuento de leucocitos en sangre periférica y la presencia de ciertas alteraciones citogenéticas y/o moleculares de los blastos. También se basan en la respuesta temprana al tratamiento considerando el recuento absoluto de células leucémicas en sangre periférica en el día 8 de la terapia por observación morfológica, lo que se conoce como respuesta a la prednisona. En la década del ´90, distintos centros comenzaron a evaluar la respuesta al tratamiento con métodos de mayor sensibilidad y especificidad estudiando la EMR por técnicas de biología molecular. Estos estudios revelaron que la presencia de niveles mínimos de células leucémicas remanentes en etapas específicas del tratamiento provee información pronóstica muy importante. En 1998 los grupos AIEOP (Asociación Italiana de Hemato-oncología Pediátrica) y BFM desarrollaron un protocolo de tratamiento de LLA pediátrica en el cual definieron los grupos de riesgo teniendo en cuenta la respuesta a la prednisona y los niveles

Servicios de Inmunología y Reumatología, Hematología y Oncología. Hospital de Pediatría Juan P. Garrahan

de EMR (determinada por biología molecular) en la semana 5 y 12 del tratamiento (final de la fase de inducción y previamente a la fase de consolidación respectivamente).

El grupo de tratamiento para LLA, ALLIC (Acute Lymphoblastic Leukemia Intercontinental), diseñó el protocolo ALLIC-02 basándose en la estrategia del grupo BFM (Ver Figura 1).

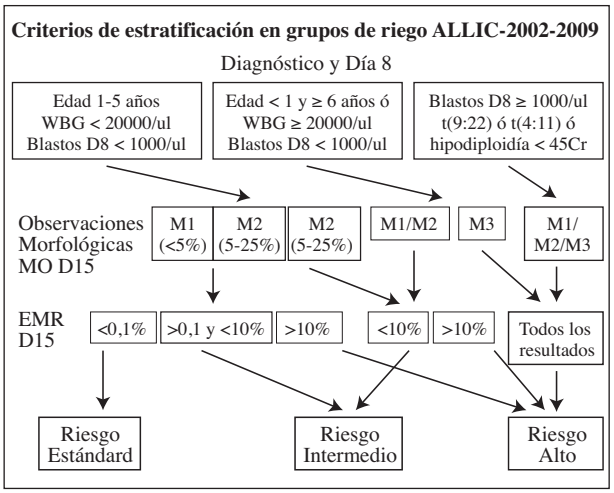

Figura 1: Esquema para la asignación de grupos de riesgo en los pacientes con leucemia linfoblástica aguda pediátrica del protocolo ALLIC (Acute Lymphoblastic Leukemia Intercontinental) 2002 y 2009.
ALL IC 2009 no considera la evaluación morfológica de la médula ósea al día15 pero sí la enfermedad mínima residual por citometría de flujo (azul), lo que permite la definición de rangos más acotados para la reasignación de grupos de riesgo.
MO: médula ósea; WBC: recuento de leucocitos en sangre periférica; D8: día 8; EMR: enfermedad mínima residual.

Este protocolo definía que los pacientes que presentaban una mala respuesta a la prednisona (>1000 blastos/µl en sangre periférica) y/o alteraciones genéticas de mal pronóstico como las t(9;22)/BCR-ABL1 ó t(4;11)/MLL-AFF1, eran asignados al grupo de riesgo alto (RA). Los pacientes que no presentaban ninguna de estas características eran asignados a los grupos de riesgo estándar (RE) o intermedio (RI) en base a la edad y al recuento inicial de leucocitos: entre 1 y 5 años de edad y con un recuento de leucocitos <20.000/µl se asignaban a RE, mientras que si uno de estos dos requisitos no se cumplía los pacientes eran definidos como de RI.

Este protocolo indicaba una re-evaluación del grupo de riesgo asignado inicialmente en base al porcentaje de blastos en médula ósea (MO) en la observación morfológica por microscopía óptica al día 15 del tratamiento. En caso de observarse más del 25% de blastos en MO (M3) se reasignaba a un grupo de mayor riesgo y si era menor (M1: 0-5%, M2: 5-25%) permanecía en el mismo grupo (Ver Figura 1).

Dada la baja sensibilidad y la subjetividad de la observación morfológica, esta metodología presentaba muchas limitaciones para poder discriminar los casos con mayor riesgo de presentar recaída, por lo que surgió la necesidad de la identificación y cuantificación de los blastos residuales por técnicas de mayor sensibilidad y especificidad, ya sea en base a su inmunofenotipo o a características moleculares específicas.

La identificación de factores pronósticos tanto biológicos como clínicos es muy importante, sin embargo no son totalmente sensibles para predecir el riesgo de recaída. La capacidad citoreductora de la quimioterapia depende no sólo de la sensibilidad de la célula leucémica a las drogas utilizadas sino también de variables farmacocinéticas y farmacogenéticas propias de cada paciente. La medición in vivo de la disminución de blastos en ciertas etapas del tratamiento tiene por ello un alto valor pronóstico por reflejar la resultante del efecto de la terapia utilizada en el paciente en forma individualizada[2]. La EMR es una medida objetiva y directa de la respuesta del paciente al tratamiento, y es una herramienta indispensable para adecuar la intensidad del tratamiento necesaria para aumentar la probabilidad de cura del paciente[4,5].

Debido a la mayor disponibilidad de la citometría de flujo multiparamétrica (CF) para determinar EMR en nuestro medio y en otros grupos participantes, el protocolo ALLIC-2009 ha incorporado la determinación de EMR por este método para la revaloración del grupo de riesgo en el día 15 del tratamiento. La alta sensibilidad y especificidad de esta metodología permiten definir con mayor precisión la estratificación en grupos de riesgo que la observación morfológica clásica (ver Figura 1).

Los factores biológicos como la edad, recuento inicial de leucocitos y la presencia de alteraciones citogenéticas-moleculares siguen siendo considerados como factores pronósticos de gran importancia y se utilizan en el actual protocolo ALLIC-2009 para una determinación inicial de los grupos de riesgo. No obstante, todo paciente de RE permanece en el mismo sólo si presenta EMR menor a 0,1% en el día 15 (a diferencia del 25% por observación morfológica definido en ALLIC-2002). En caso de presentar valores entre 0,1 y 10% es re-asignado a RI y si la EMR es mayor a 10% se lo considera como RA. Si la asignación inicial es de RI, permanece en el mismo sólo si presenta EMR menor a 10% y si es mayor se reasigna a RA, mientras que los pacientes de RA permanecen en dicho grupo durante todo el tratamiento independientemente de la EMR.

Métodos para la detección de Enfermedad Mínima Residual

La determinación de EMR requiere que la técnica empleada cumpla con los siguientes requisitos[5,6]:

- Discriminar entre células hematopoyéticas normales y patológicas.
- Tener una sensibilidad de al menos 10-3, es decir la sensibilidad suficiente para diferenciar al menos una célula leucémica entre 1000 normales, inclusive preferentemente de 10-4 a 10-6.
- Los marcadores específicos de la célula leucémica, tanto moleculares como inmunofenotípicos en los que se base la técnica deben ser estables, con el objetivo de evitar falsos negativos en caso que los mismos se modifiquen durante el transcurso de la enfermedad.
- Permitir la cuantificación de la EMR.
- Poseer alta reproducibilidad intra e interlaboratorio.
- Ser de fácil estandarización.
- Obtener el resultado en un lapso adecuado según la necesidad clínica.

La determinación de EMR para LLA en nuestro hospital se realiza actualmente por citometría de flujo y por biología molecular por PCR cuantitativa para Ig/TCR y BCR-ABL1.

1. EMR por citometría de flujo (CF)

Esta metodología se basa en el uso de anticuerpos monoclonales que reconocen y se unen específicamente a proteínas o antígenos expresados en células que se encuentren en suspensión. Los anticuerpos están conjugados a fluorocromos, moléculas que al ser excitadas por el láser del citómetro emiten en una longitud de onda propia del mismo que es detectada por el sistema óptico del citómetro. Según el diseño, el instrumento puede detectar simultáneamente distinto número de fluorocromos (o colores como se denominan habitualmente) por célula.

El análisis de EMR con equipos de cuatro o más colores brinda información precisa y sensible para la determinación de EMR y permite un uso eficiente de las células al reducir el número de tubos a procesar por paciente[7].

El citómetro brinda también información sobre tamaño y granularidad celular, y permite diferenciar las distintas poblaciones leucocitarias así como discriminar entre células viables y "restos celulares" o debris. Es decir, en un instrumento de cuatro colores se analizan seis parámetros: tamaño, granularidad, y la potencial expresión de cuatro marcadores (antígenos de superficie o citoplasmáticos).

El análisis de toda la información multiparamétrica registrada por el citómetro para cientos, miles o millones de células, da como resultado la caracterización de la expresión antigénica de una determinada población celular y es lo que se conoce con el nombre de inmunofenotipo de dicha población.

El uso de la CF para la detección y cuantificación de células leucémicas se basa en que las mismas suelen expresar un inmunofenotipo "aberrante" o diferente al de los precursores hematopoyéticos normales (inmunofenotipo asociado a leucemia). Para su correcta identificación es de suma importancia la correcta elección y combinación de los anticuerpos monoclonales a utilizar.

En la Tabla 1 se indica el panel de anticuerpos monoclonales definidos para la determinación de EMR en el protocolo ALLIC-2009.

TABLA 1: PANEL DE ANTICUERPOS A UTILIZAR PARA LA DETECCION DE EMR SEGUN ALLIC-09.

LLA-B	FITC	PE	PerCP-PerCPcy5.5	APC
TUBO 1	SYTO	CD10	CD45	CD19
TUBO 2	CD20	CD10	CD34	CD19
TUBO 3	CD58	CD10	CD45	CD19
TUBO 4*	CD20+CD10	CD38	CD45	CD19

LLA-T	FITC	PE	PerCP-PerCPcy5.5	APC
TUBO 1	SYTO	CD7	CD45	CD3
TUBO 2	CD99	CD7	CD5	CD3
TUBO 3	TdT	CD7	CD3citoplasmático	CD3
TUBO 4**	CD4	CD8	CD45	CD3

FITC: Isotiocianato de fluoresceína; PE: Ficoeritrina; PerCP: Proteína Peridynin Clorophyl; PerCPcy5.5: Proteína Peridynin Clorophyl Cianina 5.5; APC: Aloficocianina.
* Se recomienda sólo en el caso de las LLA-B-CD10 negativo (Pro-B).
**Se recomienda sólo en el caso de las LLA-T maduras.

Según las especificaciones del protocolo, deben analizarse al menos 300.000 células nucleadas por tubo y la población identificada como EMR debe contener al menos 30 células o eventos, de manera de alcanzar una sensibilidad de 10-4 (una célula patológica en 10.000 normales). Otro requisito es que en la muestra analizada se detecten al menos 2% de eritroblastos, ya que la presencia de un porcentaje menor sugiere la contaminación de la médula ósea con sangre periférica (hemodilución de los blastos).

Aproximadamente en el 95% de las LLA los blastos presentan por lo menos una alteración fenotípica con respecto a las células normales (fenotipo "aberrante"), por ejemplo la expresión de antígenos de otro linaje, asincronismo madurativo, sub o sobreexpresión antigénica o ausencia de expresión de un marcador dado.

La sensibilidad de la CF se basa fundamentalmente en dos variables: en primer lugar el grado de diferencia fenotípica y morfológica entre los blastos y los precursores hematopoyéticos normales y en segundo lugar en el número de células analizadas[2,7].

En la Figura 2 podemos observar el patrón de expresión antigénica en las células B CD19+ en médula ósea normal. En condiciones normales la médula ósea está poblada de precursores linfoi-

des y mieloides en distintos estadíos madurativos, cada uno caracterizado por un nivel de expresión antigénica constante que se refleja en la intensidad de fluorescencia. En conjunto se define un perfil madurativo normal de expresión antigénica. Los gráficos de la Figura 2 A-B-C reflejan el inmunofenotipo normal de precursores hematopoyéticos de linaje B, y los de la Figura 2 D-E-F y 2 G-H-I corresponden al de los blastos B CD19+ de dos pacientes con LLA-B.

Para detectar alteraciones fenotípicas es fundamental conocer el perfil de expresión antigénica en células hematopoyéticas normales[8], así como el inmunofenotipo de precursores normales de médulas en regeneración. Dado que en condiciones normales los precursores linfoides T sólo se encuentran en timo, en el caso de las LLA precursor T (LLA-T), el hallazgo de células con inmunofenotipo T inmaduro en médula ósea o en sangre periférica permite definir estas células como blastos[9]. Considerando que los precursores linfoides B normales en distintos estadíos de maduración o hematogonias se encuentran en la MO, el hallazgo de células con inmunofenotipo B inmaduro no indica necesariamente la presencia de EMR, por lo tanto, es fundamental identificar rasgos aberrantes en el inmunofenotipo para poder definirlas con certeza como blastos[9]. Es importante tener presente que, de acuerdo a lo descripto por Campana y colaboradores, las hematogonias son extremadamente sensibles a los corticoides y otras drogas utilizadas en la fase de inducción del tratamiento. Por ello, el mero hallazgo de células B inmaduras (CD19+CD10+ y/ó CD34+) en médula ósea de pacientes con LLA-B en el día 15 del tratamiento permitiría identificarlas como blastos[10].

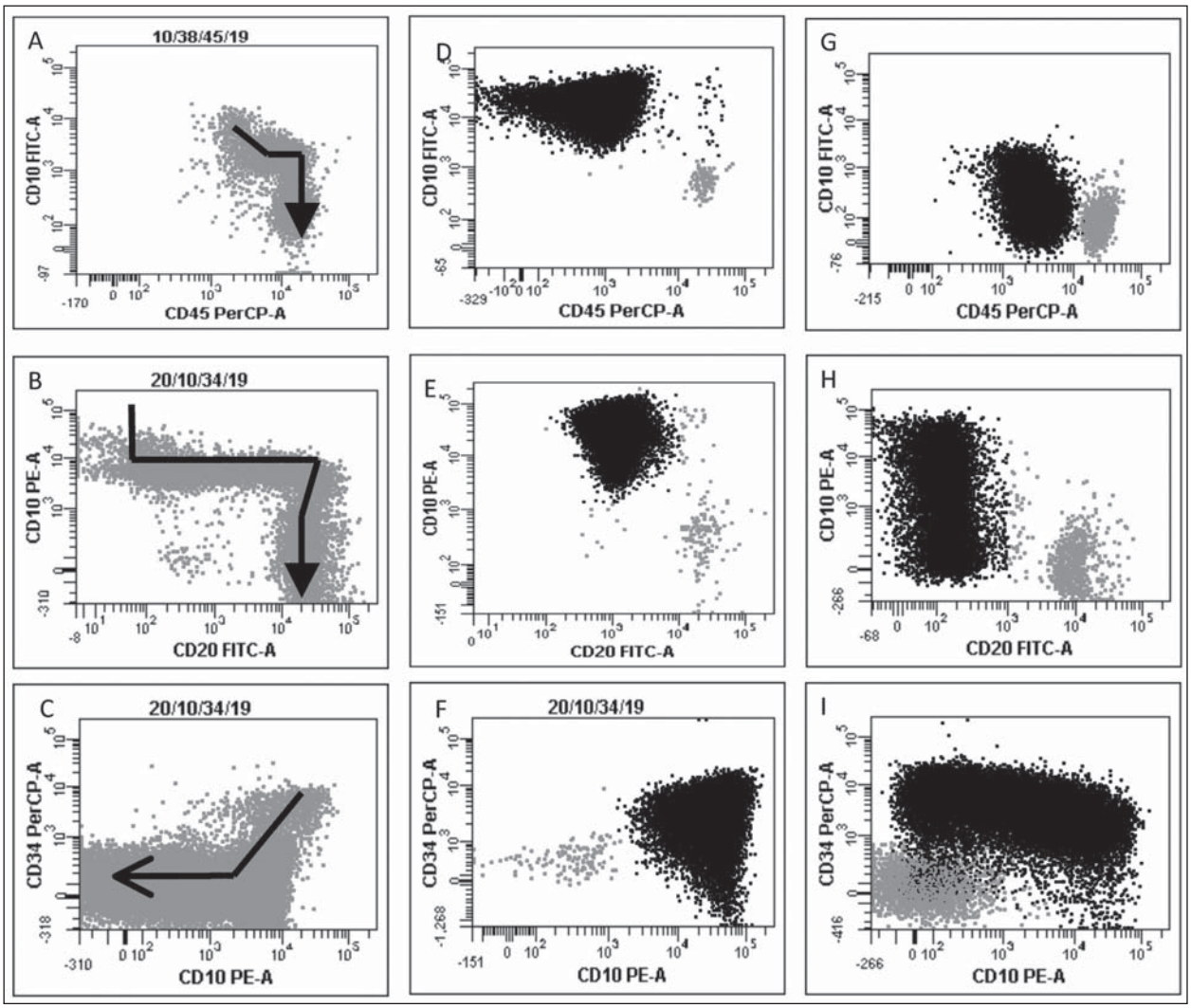

Figura 2: Perfil madurativo normal de células hematopoyéticas en médula ósea. Comparación con el inmunofenotipo de células patológicas en leucemia linfoblástica aguda precursor B.
Inmunofenotipo de células B de médula ósea (CD19+): Gráficos A, B y C corresponden a precursores hematopoyéticos normales. Las flechas indican el camino normal de maduración. Gráficos D-I corresponden a células leucémicas de linaje linfoide B (marcadas en negro) que se identifican por su fenotipo aberrante y se observan linfocitos B normales (marcados en gris).

Gaipa y colaboradores demostraron que durante las fases tempranas de los protocolos de tratamiento del BFM se produce una modulación en la expresión antigénica de los blastos. Sin embargo, los autores destacan que siguiendo las pautas de análisis adecuadas la precisión para la detección de EMR no se ve afectada[11].

Ventajas de la CF

- Permite la cuantificación directa de las células leucémicas sobre el total de células nucleadas viables, a través del uso de colorantes que se unen específicamente al ADN íntegro (por ejemplo syto-16). De esta manera se restringe la evaluación al total de células nucleadas (excluyéndose los eritrocitos y células en etapas tardías de apoptosis). Adicionalmente, en base al tamaño y granularidad celular se pueden excluir del análisis las células no viables y debris. La importancia de esta diferenciación radica en que las células irreversiblemente dañadas por la quimioterapia no proliferan, por lo tanto no implican un riesgo potencial de recaída, si bien generan señal tanto en CF como en técnicas basadas en biología molecular. El uso del colorante syto-16 también permite calcular el porcentaje de eritroblastos, que aparecen como syto-16 (+) y CD45 (-).
- Permite la evaluación de la celularidad global de la MO.
- En más del 95% de las LLA el inmunofenotipo aberrante de los blastos permite la detección de EMR por CF con una sensibilidad de 10-4.
- Los resultados se obtienen en 24-48 hs de extraída la muestra.
- Es un método más económico y de mayor disponibilidad que la biología molecular.
- Es un método sensible, estandarizable y reproducible.

Desventajas de la CF

- Frecuentemente las leucemias agudas pueden presentar cambios en el inmunofenotipo durante el transcurso de la enfermedad[11]. Por esta razón, el análisis debe basarse en varios marcadores inmunofenotípicos "aberrantes" para evitar un resultado falsamente negativo.
- Su sensibilidad es limitada con respecto a la biología molecular, aunque es suficiente para la determinación de EMR, especialmente en etapas tempranas del tratamiento.

2. EMR por biología molecular (BM)

Durante la ontogenia o desarrollo normal del linaje linfoide B (en médula ósea) y T (en el timo), se producen cambios específicos en la estructura de diversos genes. El primer cambio es la recombinación somática de fragmentos de los genes variables (V), de diversidad (D) y de unión (J) de las inmunoglobulinas (Ig) del receptor B y de las cadenas del receptor T (TCR). En este proceso cada linfocito adquiere una combinación única y específica de genes V-(D)-J la cual codifica para la zona variable de las Ig o del TCR.

La disponibilidad de múltiples segmentos génicos V, (D) y J para cada una de las cadenas de los receptores, junto con la deleción e inserción aleatoria de nucleótidos en los sitios de recombinación, tienen como consecuencia una diversidad casi ilimitada de posibles combinaciones entre ellos, originando secuencias nucleotídicas únicas para cada clon leucémico.

Ambos procesos determinan que dichas zonas de unión sean secuencias "tipo huella dactilar" o secuencias específicas de cada linfocito y por lo tanto en el caso de las LLA, específicas de los blastos de cada paciente.

Por otro lado, en las LLA también ocurren ciertas translocaciones o aberraciones cromosómicas. Una translocación se produce cuando dos fragmentos génicos que normalmente se encuentran en distintos cromosomas se fusionan, dando lugar a un gen quimera, constituido por dos fragmentos, uno proveniente de cada cromosoma. En caso de que este gen sea codificante, se genera un producto de fusión (tanto a nivel del ARN mensajero como proteico) que no está presente en las células normales. Como parte del proceso leucemogénico, también pueden ocurrir inversiones entre fragmentos génicos de un mismo cromosoma o deleciones intracromosómicas que resultan en la fusión de genes que en condiciones normales se encuentran alejados. Un ejemplo claro de este tipo de blanco para LLA es la detección de BCR-ABL1. Estos productos de fusión pueden ser usados para detectar y cuantificar las células leucémicas por PCR ya que los mismos no se encuentran generalmente en las células normales. A diferencia de la detección y cuantificación de los rearreglos de genes de las Ig o del TCR que son marcadores o targets (blancos) específicos de paciente, los productos de fusión son targets específicos de leucemia[6].

Por lo tanto, distintos blancos de PCR pueden ser utilizados para la determinación de EMR en LLA. Los tres principales son los rearreglos de los genes de Ig/TCR, los transcriptos de fusión y/o las regiones de ruptura y fusión génicas y finalmente los genes aberrantes o aberrantemente expresados. En la Tabla 2 se encuentran resumidas las ventajas y desventajas del uso de los distintos blancos para la detección de EMR por BM. Esta determinación se realiza en células mononucleares de médula ósea al final de las fases de inducción y de consolidación del tratamiento.

La detección de los sitios de fusión a nivel genómico es factible pero requiere de técnicas muy

TABLA 2: VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA DETECCION DE ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL POR TECNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR BASADA EN DISTINTOS BLANCOS.

Blanco	Ventajas	Desventajas
Transcriptos de fusión (ARNm)	Identificables con pocos primers o cebadores. Relacionados con leucemogénesis. Sin células normales que puedan dar señal.	No específico de paciente. Mayor riesgo de contaminación. Inestabilidad del ARN. Nivel de expresión puede verse afectado por la terapia.
Ig/TCR (ADN)	Específico de paciente. Bajo riesgo de contaminación. Estabilidad del ADN. Concentración constante de ADN por célula.	Identificación laboriosa. Pérdida por evolución clonal. Inestabilidad del ARN. Señal espuria de células normales dependiente del tipo de muestra y momento del seguimiento.
Genes de fusión (ADN)	Idem ventajas de Ig/TCR. Relacionado a leucemogénesis. Blanco estable. Sin señal espuria en células normales.	Identificación laboriosa excepto para algunas translocaciones.

laboriosas. Por esta razón, la EMR que detecta productos de fusión utiliza como blanco los transcriptos de fusión y cuantifica el ARN mensajero de los mismos luego de transformarlo a ADN copia por medio de la reacción de transcripción reversa.

En cuanto a los genes aberrantes o aberrantemente expresados, algunos ejemplos claros serían la cuantificación de FLT3-ITD (duplicaciones internas en tándem de la región de yuxtamenbrana del receptor FLT3), de la sobreexpresión del gen WT1 (gen del tumor de Wilms), o de la expresión del gen HOX11L2 en LLA-T[12].

Detección de rearreglos de los genes de las Ig/TCR

La identificación de los rearreglos génicos de Ig/TCR ha sido estandarizada por grupos europeos en estudios colaborativos BIOMED-1 y BIOMED-2[3,5], en los cuales se establecieron los primers o iniciadores y las condiciones de PCR óptimas para su detección.

Del mismo modo, el grupo de estudio europeo para la detección de EMR en LLA (ESG-MRD-ALL) ha organizado programas de control de calidad y ha desarrollado guías para la interpretación de los resultados de EMR mediante PCR en tiempo real. Estas guías contienen consideraciones de aplicación práctica como la puesta a punto de la técnica, la definición de rango cuantitativo y sensibilidad, la definición de EMR positiva y EMR negativa y la cuantificación del nivel de EMR en las muestras de seguimiento. La aplicación de estas guías permite que los resultados de EMR puedan ser comparables entre distintos laboratorios[13].

Ventajas de la BM

- La sensibilidad es de una célula leucémica entre 10.000 a 100.000 células normales (10-4 a 10-5) y depende del tamaño y complejidad de la región de unión y del tipo de rearreglo.
- La detección de EMR en LLA mediante rearreglos de Ig/TCR es aplicable en aproximadamente el 95 % de los casos, mientras que la cuantificación de los transcriptos de fusión lo es en el 40-50 % de los pacientes[12].
- En los casos en que se utiliza ADN como blanco, el hecho que exista una copia del rearreglo estudiado por célula refleja fielmente el número de células patológicas en la muestra.
- Es un método sensible, estandarizable y reproducible.

Desventajas de la BM

- Debido a que estos genes pueden sufrir modificaciones durante el transcurso de la enfermedad pueden presentar resultados falsos negativos, y por ello es necesario, seleccionar al menos dos rearreglos distintos para evitar falsos negativos.
- La caracterización de la secuencia de los rearreglos, el diseño de los oligonucleótidos (primers) específicos del paciente y la evaluación de su sensibilidad y rango cuantitativo se realiza por técnicas muy laboriosas, que limitan su aplicación en laboratorios de menor infraestructura.
- Los tiempos necesarios para su puesta a punto impiden su aplicación para las fases muy tempranas del tratamiento (día 15).

Es importante destacar que la determinación de EMR por CF es ideal en las fases tempranas del tratamiento donde hay ausencia o escasa presencia de precursores hematopoyéticos normales. Cuando los blastos presentan un inmunofenotipo similar al de los precursores normales o pierden sus rasgos aberrantes, la sensibilidad de su detección por CF se vería comprometida. En etapas posteriores del tratamiento la detección por biología molecular es

más sensible, ya que la presencia de precursores normales no altera la capacidad de detección de los blastos[15].

3. Aplicaciones clínicas de la EMR: Valor pronóstico de EMR en LLA

El algoritmo para la estratificación en grupos de riesgo del protocolo AIEOP-BFM-ALL 2000 se basó fundamentalmente en parámetros clínicos, (edad, RGB, respuesta a la prednisona, presencia de ciertas alteraciones citogenéticas y/o moleculares) y la evaluación morfológica de la MO. Este protocolo introdujo por primera vez la EMR por BM basada en la identificación y cuantificación de al menos dos rearreglos de los genes de las Ig/TCR al fin de la inducción (día 33) y previamente a la fase de consolidación (día 78). En base al análisis de los datos surgidos de dicho protocolo, la determinación de EMR basada en la evaluación de al menos dos rearreglos de los genes de Ig/TCR con una sensibilidad de al menos 10-4 en los días mencionados, según lo reportado por Conter[15], es estadísticamente mejor predictor de pronóstico que los factores clásicos de riesgo. En estas condiciones la EMR por BM permite definir tres grupos de riesgo: estándar (RE), intermedio (RI) y alto (RA) que difieren significativamente en su sobrevida libre de eventos (pSLE) y en la incidencia acumulada de recaídas a 5 años.

Ratei y colaboradores[16] evaluaron por CF los blastos al diagnóstico y la EMR por CF en muestras de MO y sangre periférica en distintos momentos de la fase de inducción del tratamiento (día 8 y 15), en los pacientes enrolados en el protocolo AEIOP 2000. Su objetivo fue determinar qué parámetros (blastos en el momento del diagnóstico y EMR por CF al día 8 y 15 en sangre periférica y médula ósea en valor porcentual y absoluto) poseen mejor poder predictivo del estado de remisión al día 33. Su conclusión fue que el predictor más robusto fue el valor absoluto de blastos en MO por CF al día 15.

Basso et al[17] también publicó los resultados obtenidos sobre el mismo protocolo analizando la EMR por CF en médula ósea al día 15, con el objetivo de evaluar el impacto pronóstico de la EMR por CF en ese momento del tratamiento. La conclusión es que el valor de la EMR por CF al día 15 también permite definir tres grupos de riesgo (estándar, intermedio y alto), en base a la pSLE y a la incidencia acumulada de recaídas a 5 años. En el análisis multivarianza, un valor de EMR por CF al día 15 ≥10% resultó ser un factor de riesgo de recaída independiente aún en los pacientes que habían sido estratificados en base a la EMR por BM al día 33 y 78.

Comparando los resultados obtenidos por Conter y Basso (ver Tabla 3) se puede observar que los grupos de riesgo definidos por ambas metodologías en distintas fases del tratamiento definen poblaciones de grupos de riesgo similares en los pacientes enrolados en el mismo protocolo.

Basso y colaboradores[17] refieren también las ventajas que tendría el uso combinado de ambas metodologías, dado que la CF en las fases bien tempranas (día 15) brinda información sobre la rapidez de la respuesta al tratamiento y la EMR por BM proporciona información sobre la calidad de la remisión más tardíamente.

El grupo ALLIC incorpora en su último protocolo (ALLIC-2009) la EMR por CF al día 15 como parámetro para la revaloración del grupo de riesgo asignado inicialmente y con los valores de corte mencionados.

Es fundamental la estandarización correcta y estricta de los protocolos para la realización de EMR como demostraron Dworzak y colaboradores con los resultados de la evaluación comparativa de la determinación de EMR por CF en cuatro centros[18].

TABLA 3: CUADRO COMPARATIVO DE LOS GRUPOS DE RIESGO DEFINIDOS EN BASE AL NIVEL DE ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL EN MEDULA OSEA POR CITOMETRIA DE FLUJO AL DIA 15 Y POR RQ-PCR AL DIA 33 Y 78 DEL TRATAMIENTO DEL PROTOCOLO AIEOP-BFM-2000.

	Grupo riesgo	Día 15	Día 33	Día 78	pSLE 5a (%)	Proporción (%)	IAR 5a (%)
	RE	- -	Negativo	Negativo	92,3±0,9	42	6,0±0,8
BM	RI	- -	Uno o ambos EMR positiva <10-3		77,6±1,3	52	21,0±1,2
	RA	- -	Cualquier valor	>10-3	50,1±4,1	6	34,9±3,8
	RE	<0,1%	- -	- -	89,9±1,7	42	7,5±1,5
CF	RI	≥0,1 <10%	- -	- -	79,3±2,3	47	17,5±2,1
	RA	≥10%	- -	- -	46,1±5,9	11	47,2±5,9

BM: Biología Molecular; CF: Citometría de Flujo; pSLE 5a: Probabilidad de sobrevida libre de eventos a 5 años;
IAR 5a: Incidencia acumulada de recaídas a 5 años.

La estandarización propuesta incluía el mantenimiento y calibración óptima del equipamiento, el monitoreo de calidad, el entrenamiento del personal, protocolo de marcación y procesamiento de las muestras. La mayor discrepancia se observó en muestras con niveles bajos de EMR (<0,1%). El estudio incluyó muestras en los días 15, 33 y 78 del tratamiento, en MO y sangre periférica. La concordancia en muestras que resultaron negativas por biología molecular fue mayor que en las positivas con niveles muy bajos, lo que significa que la especificidad no parecería ser un punto tan complejo como la sensibilidad.

La aplicabilidad de la EMR no sólo se limita a los algoritmos de clasificación de grupos de riesgo en los pacientes con LLA de primera línea. Su hallazgo también permite detectar recaídas en etapas previas a su manifestación clínica. Asimismo tiene impacto pronóstico en los pacientes que sufrieron una recaída y están en tratamiento de la misma, así como en las etapas pre y post trasplante de células hematopoyéticas[4,7].

EMR: La experiencia en nuestro hospital

En Febrero de 2009 se incorporó en el Laboratorio de Inmunología Celular del Servicio de Inmunología y Reumatología un nuevo citómetro de flujo que permite la marcación con 6 colores. Con el objetivo de poner a punto la determinación de EMR por CF, entre noviembre de 2009 y julio de 2011 se realizó un protocolo piloto para tratamiento de las LLA basado en el esquema de tratamiento quimioterápico del ALLIC-2002 pero incorporando la EMR por CF al día 15 para la reasignación de grupos de riesgo. A partir de agosto de 2011 se activó el actual protocolo ALLIC-2009, el cual utiliza dicha determinación para la asignación de grupos de riesgo.

Desde noviembre del 2009 hasta abril del 2012, 208 pacientes fueron diagnosticados con LLA (176 del hospital Garrahan y 32 provenientes de otros centros públicos de Tucumán, Catamarca, Corrientes y Buenos Aires en el marco del Programa de Referencia y Contrareferencia que desarrolla nuestro hospital). De este grupo de pacientes, 39 no fueron elegibles para el protocolo en curso (ALLIC 2002 piloto hasta julio 2011 y a continuación ALLIC-2009). Las principales causas de no elegibilidad fueron: tratamiento previo, edad menor a un año (ya que estos pacientes reciben un tratamiento específico para este tipo de LLA) o presentar síndrome de Down.

En todos los pacientes se evaluaron por CF las muestras de médula ósea del diagnóstico y día 15 y por BM las muestras del diagnóstico, día 33 y 78. En los casos en los cuales la celularidad de la muestra era suficiente, también se procesaron por CF las muestras del día 33 y 78 con el objetivo de evaluar la concordancia entre ambos métodos.

Nuestros resultados de EMR al día 15 demostraron que el 29% de los pacientes presentaron EMR <0,1%, 56% entre 0,1 y 10% de blastos en médula ósea y 12% de los casos EMR ≥10%. En el 3% de los casos la muestra fue no evaluable debido a la escasa celularidad o a la hemodilución masiva.

En cuanto a la asignación de grupos de riesgo, el 13% de los pacientes fue asignado a RE, el 66% a RI y 21% de los casos a RA. La incorporación de la EMR al día 15 por CF determinó la reasignación de GR en 30 casos (18% de los pacientes): 20 pacientes de RE a RI, 2 de RE a RA y 8 de RI a RA. Esta reasignación de grupos de riesgo implicó una adecuación de la intensidad del tratamiento en base a la respuesta individual al mismo con el objetivo de disminuir la probabilidad de recaída.

Este hallazgo confirma la importancia de la incorporación de la EMR en el tratamiento de LLA pediátrica, ya que sin la misma casi un 20% de los pacientes habría recibido un tratamiento de menor intensidad que el realmente necesario para aumentar la probabilidad de alcanzar la cura de su enfermedad.

Con respecto a los resultados de EMR por CF en las tres etapas del tratamiento estudiadas, observamos que durante el transcurso del tratamiento disminuye el porcentaje de pacientes con EMR positiva, lo cual indica una respuesta favorable al mismo (ver Figura 3).

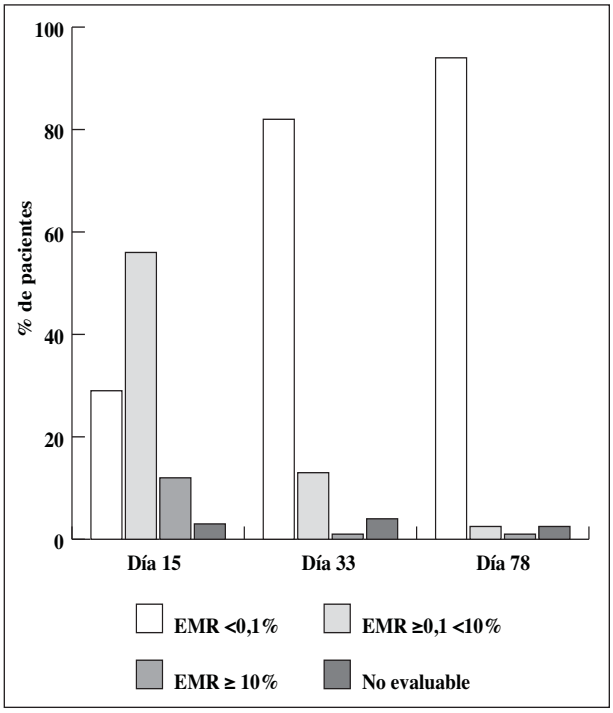

Figura 3: Nivel de enfermedad mínima residual por citometría de flujo (% del total de células nucleadas viables) en las distintas etapas del tratamiento estudiadas.

Como mencionamos anteriormente, el Hospital Garrahan cuenta con la metodología para realizar la EMR tanto por CF como por BM. Como uno de los objetivos del protocolo piloto mencionado fue también comparar ambos métodos en muestras del día 33 y día 78, en los casos que hubo suficiente material, las muestras fueron procesadas en paralelo y bajo la modalidad de doble ciego.

Se evaluaron 152 muestras por ambos métodos y considerando un valor de corte de 0,01% para definir EMR positiva o negativa, la concordancia fue del 84% mientras que tomando al tomar el valor de corte en 0,1% de blastos, la concordancia fue del 95%.

La concordancia observada en nuestra población coincide con los datos publicados en la literatura[19-22]. El análisis más detallado sobre la comparación entre ambos métodos excede el propósito de esta publicación.

Perspectivas futuras

Como mencionamos actualmente en nuestro hospital estamos aplicando la determinación de EMR para la estratificación en grupos de riesgo del tratamiento de las LLA, pero esta estrategia podrá también aplicarse en el futuro al seguimiento de leucemias mieloblásticas agudas, linfomas, leucemias linfoblásticas en recaídas, etc.

CONCLUSIONES

Para la correcta realización e interpretación de estudios de EMR es indispensable contar con instrumentos adecuados, personal entrenado así como cumplir con las pautas establecidas de control de calidad interno y externo.

Como observamos, en nuestra población un 20% de los pacientes fueron reasignados a un grupo de mayor riesgo sólo por el valor de EMR por CF al día 15, permitiendo así que los mismos reciban un tratamiento adecuado a su respuesta individual.

En resumen, la incorporación de la EMR a los protocolos de tratamiento actuales es un requisito indispensable para la administración de tratamientos cada vez más personalizados, considerando la respuesta individual de cada paciente a la terapia instaurada.

REFERENCIAS

1. Moreno F. Registro Oncopediátrico Hospitalario Argentino (ROHA). Resultados 2000-2008. Tercera Edición 2011 (www.roha.org.ar). Editado por Fundación Kaleidos.
2. Campana D. Advances in the immunological monitoring of childhood acute lymphoblastic leukaemia. Best Practice and Research Clinical Haematology 2002; 15: 1-19.
3. Szczepanski T. Why and how to quantify minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia? Leukemia, 2007; 21: 622-626.
4. Campana D. Should minimal residual disease monitoring in acute lymphoblastic leukemia be standard of care? Curr Hematol Malig Resp 2012; 7: 170-177.
5. Szczepanski T, Orfao A, van Dongen JJM. Minimal residual disease in leukaemia patients. Lancet Oncology 2001; 2: 409-417.
6. Campana D. Progress of minimal residual disease studies in childhood acute leukemia. Curr Hematol Malig Rep 2010; 5: 169-176.
7. Campana D, Coustain-Smith E. Minimal residual disease studies cytometry in acute leukemia. Am J Clin Pathol 2004; 122(1): 547-557.
8. Van Lochem E.G, van der Velden VHJ, Van Dongen JJM, et al. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoyiesis in human bone marrow: reference patterns for age related changes and disease-induced shifts. Cytometry part B (Clinical Citometry) 2004, 60B: 1-13.
9. van der Velden V, Jacobs D, Wijkhuijs A, Comans-Bitter WM, et al. Minimal residual disease levels in bone marrow and peripheral blood are comparable in children with T cell acute lymphoblastic leukemia but not in precursor B-acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 2002; 16: 1432-1436.
10. Coustan Smith E, Ribeiro R, Campana D et al. A simplified flow cytometric assay identifies children with acute lymphoblastic leukemia who have a superior clinical outcome. Blood 2006; 108: 97-107.
11. Gaipa G, Basso G, Maglia O, et al, on behalf of the I-BFM-ALL-FCM-MRD-Study Group. Drug induced immunophenotypic modulation in childhood ALL: implications for minimal residual disease detection. Leukemia 2005; 19: 49-56.
12. van der Velden VHJ, Hochhaus A, Cazzaniga G, et al. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. Leukemia 2003; 17: 1013-1034.
13. van der Velden VHJ, Cazzaniga G, Schrauder A, et al, on behalf of the European Study Group on MRD detection in ALL (ESG-MRD-ALL). Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. Leukemia 2007; 21: 604-611.
14. Dworzak M, Froschl G, Gadner H et al. Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 2002; 99: 1952-1958.
15. Conter V, Bartram C, Valsecchi MG, et al. Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study. Blood 2010; 115: 3206-3214.
16. Ratei R, Basso G, Dworzak M, et al. Monitoring treatment response of childhood precursor B-cell lymphoblastic leukemia in the AIEOP-BFM-ALL 2000 protocol with multiparameter flow cytometry: predictive impact of early blast reduction on the remission status after induction. Leukemia 2009; 23: 528.
17. Baso G, Veltroni M, Valsecchi MG, et al. Risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia is predicted by flow cytometric measurement of residual disease on day 15 bone marrow. J Clin. Oncol. 2009; 27: 5168-5174.
18. Dworzak M, Gaipa G, Basso G et al. Standarization of flow cytometric minimal residual disease evaluation in acute lymphoblastic leukemia: multicentri assessment is feasible. Cytometry Part B 2008, 74B: 331-340.
19. Kerst G, Kreyenberg H, Roth C, et al. Concurrent detection of minimal residual disease (MRD) in childhood acute lymphoblastic leukaemia by flow cytometry and real time PCR. Br. J. Haematol 2005; 128: 774-782.
20. Malec M. van der Velden VHJ, Bjorklund B, et al. Analysis of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia: comparison between RQ-PCR analysis of Ig/TcR gene rearrangements and multicolor flow cytometric immunophenotyping. Leukemia 2004; 18: 1630-1636.
21. Gaipa G, Cazzaniga G, Valsecchi G, et al. Time point dependent concordance of flow cytometry and RQ-PCR in minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. Hematologica 2012; 97,10: 1582-1593.
22. Thorn I, Forestier E, Botling J, et al. Minimal residual disease assessment in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a Swedish multi-centre study comparing real-time polymerase chain reaction and multicolour flow cytometry. Br J Haematol 2011; 152: 743-753.