

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN  
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

REVISIÓN SISTEMÁTICA DE LA UTILIDAD DIAGNÓSTICA DE CITOMETRIA  
DE FLUJO, RT-PCR Y REORDENAMIENTO CLONAL DE IG Y TCR EN EL  
DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL EN LEUCEMIA  
LINFOBLÁSTICA AGUDA INFANTIL

TESIS  
QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE  
ESPECIALISTA EN  
**HEMATOLOGÍA PEDIÁTRICA**  
PRESENTA  
**ADRIANA LÓPEZ CABRERA**

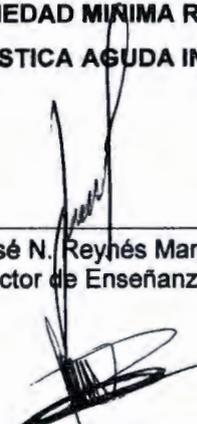
TUTORES  
DR. ROGELIO A. PAREDES AGUILERA  
M EN C IGNACIO MORA MAGAÑA

MÉXICO, D.F.

2008

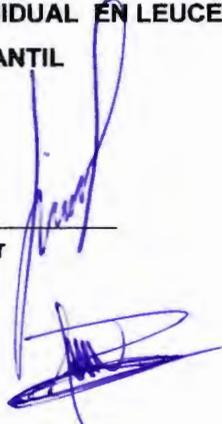


**REVISIÓN SISTEMÁTICA DE LA UTILIDAD DIAGNÓSTICA DE CITOMETRIA  
DE FLUJO, RT-PCR Y REORDENAMIENTO CLONAL DE IG y TCR EN EL  
DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL EN LEUCEMIA  
LINFoblástica AGUDA INFANTIL**



---

**Dr. José N. Reynés Manzur**  
Director de Enseñanza



---

**Dra. Mirella Vázquez Rivera**  
Jefe del Departamento de Pre y Posgrado



---

**Dr. Rogelio A. Paredes Aguilera**  
Profesor Titular del Curso



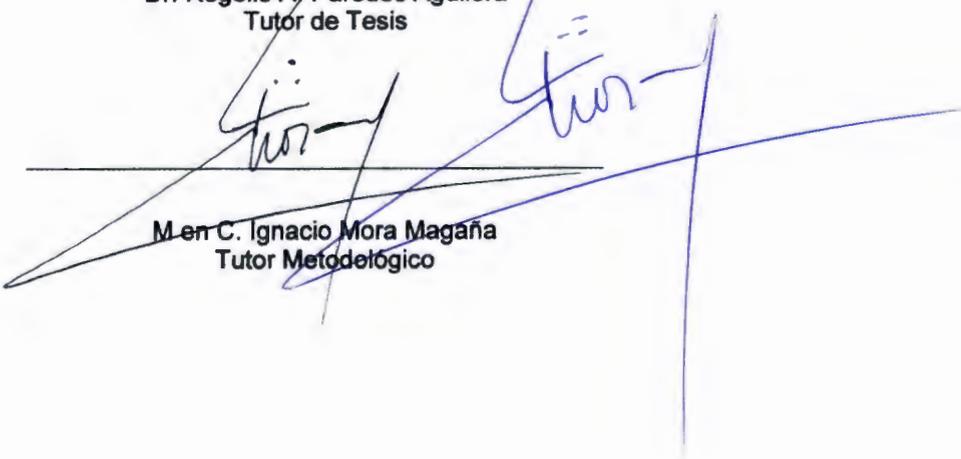
---

**Dr. Rogelio A. Paredes Aguilera**  
Tutor de Tesis



---

**M en C. Ignacio Mora Magaña**  
Tutor Metodológico



## DEDICATORIAS

A **Dios**, porque gracias a él estoy aquí.

A **mis padres**, por su apoyo en todo momento y su confianza.

A **mis hermanos Pepe y Laura** por su carrilla y consejos sobre moda.

A **toda mi familia** (abuelitas, tías, tíos, primas, primos) por su apoyo, consejos y buenos deseos.

A mi amiga **Susana (Místico)** que gracias a ella estos 2 años fueron divertidos y por su amistad incondicional.

Al **Dr Rogelio Paredes Aguilera**, por ser mi guía en el conocimiento de la hematología.

Al M en C. **Dr Ignacio Mora Magaña**, por su asesoría en todo momento para realización de este trabajo, gracias.

A **los niños de este hospital** por brindarnos la fuente inagotable de conocimientos.

## CONTENIDO

| INDICE  | PÁGINA |
|---|--------|
| I. Abreviaturas utilizadas  | 4      |
| II. Resumen   | 5      |
| III. Antecedentes   | 7      |
| IV. Objetivo  | 16     |
| V. Material y Métodos   |        |
| a. Tipos de estudios  | 16     |
| b. Tipos de participantes   | 16     |
| c. Tipos de pruebas diagnósticas  | 16     |
| d. Tipos de medidas de resultado primarias                                    | 16     |
| V. Estrategia de búsqueda   | 17     |
| VI. Métodos de la revisión  | 17     |
| VII. Resultados   | 17     |
| VIII. Discusión   | 29     |
| IX. Conclusiones  | 41     |
| X. Bibliografía   |        |
| XI. Referencias bibliográficas de los artículos<br>incluidos en esta revisión | 44     |
| VIII.3 Referencias bibliográficas   | 46     |
| XII. Anexos   | 53     |

## ABREVIATURAS UTILIZADAS

|               |   |
|---------------|---|
| ADN           | ácido desoxirribonucleico                       |
| ARN           | ácido ribonucleico                              |
| CT            | citometría de flujo                             |
| EMR           | enfermedad mínima residual                      |
| Ig            | inmunoglobulinas                                |
| IGH/ IgH      | inmunoglobulinas de cadenas pesadas             |
| IGK/ IgK      | inmunoglobulinas de cadenas ligeras             |
| LAL           | leucemia aguda linfoblástica                    |
| LAM           | leucemia aguda mieloblástica                    |
| LR            | razón de verosimilitud                          |
| MO            | médula ósea                                     |
| PCR           | reacción en cadena de polimerasa                |
| RQ-PCR/RT-PCR | reacción en cadena de polimerasa en tiempo real |
| SP            | sangre periférica                               |
| TCR           | receptor de células T                           |
| TCHP          | transplante de células hematopoyéticas          |
| VPP           | valor predictivo positivo                       |
| VPN           | valor predictivo negativo                       |

# REVISIÓN SISTEMÁTICA DE LA UTILIDAD DIAGNÓSTICA DE CITOMETRIA DE FLUJO, RT-PCR Y REORDENAMIENTO CLONAL DE IG y TCR EN EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL EN LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA INFANTIL

Dra Adriana López Cabrera \*, Dr. Rogelio A. Paredes Aguilera\*\*, Dr Ignacio Mora Magaña\*\*\*. \*Medico Residente de quinto año de Hematología Pediátrica INP (Tesisista). \*\* Profesor titular del curso de Hematología Pediátrica INP (Tutor de tesis). \*\*\* Jefe Departamento de Metodología de Investigación INP (Asesor de metodología).

## RESUMEN

**Antecedentes.** Las leucemias son las formas más comunes de cáncer en la población pediátrica. El tratamiento de LAL ha condicionado un incremento tanto en la supervivencia, como el porcentaje de pacientes en remisión completa continua. La EMR consiste en la persistencia de un clon anormal, aún en niveles bajos, durante o tras finalizar el tratamiento, tiene significado pronóstico ya que predice la recaída de la enfermedad y su presencia nos ayuda a plantear estrategias terapéuticas. Las técnicas utilizadas son: a) citometría de flujo, b) RQ-PCR basada en la cuantificación de enfermedad mínima residual asociado fusión de los genes y translocaciones cromosómicas c) Análisis de los reordenamientos clonales de los genes de Ig y TCR como marcadores moleculares.

**Objetivo.** Determinar la utilidad diagnóstica de las técnicas para la detección de EMR en LAL en pacientes pediátricos.

**Resultados.** Se identificaron diez estudios a partir de la búsqueda, con un total de 1727 niños (0-18 años). Los años de publicación incluyen del año 1999 al 2005. Con un total de muestras tomadas de 3544, a las cuales se realizó CF a 3233, RQ-PCR para la detección de traslocaciones más comunes en pediatría (t (1:19)/E2A-PBX1, t (12:21)/TEL-AML1, t (9:22)/BCR-ABL, t (4:11)/MLL-AF4) a 1016 y RQ-PCR para análisis de reordenamientos clonales de Ig y TCR a 2052. Así

como utilizando 2 métodos CF y RQ-PCR para detección de translocaciones a 1016; CF y RQ-PCR para análisis de reordenamientos clonales de Ig y TCR a 1775. El método por RQ-PCR para análisis de reordenamientos clonales fue más sensible y específico con razón de verosimilitudes positivos mayores a 10, encontrándose con valores moderadas a la CF.

**Discusión.** Las tres principales técnicas proporcionan información de EMR aparentemente con niveles idénticos. Un 70-80% de las mediciones de EMR muestra niveles de  $10^{-3}$  ambas técnicas parecen dar resultados comparables. Sin embargo, en las muestras con los niveles de EMR  $\leq 10^{-3}$ , se han encontrado muchas discrepancias entre las técnicas, lo que dificulta el reconocimiento de los pacientes de bajo riesgo. Por consiguiente, el uso de diferentes técnicas para la medición de EMR en un paciente dentro de un mismo protocolo de tratamiento debe evitarse.

**Conclusiones.** La detección EMR deberá incluirse en todos protocolos de tratamiento de LAL, ya que la EMR proporciona datos hasta el momento que la mayoría presentan *in vivo* de la respuesta al tratamiento, que da al clínico un mejor conocimiento y control en los distintos pacientes.

La introducción de nuevos métodos, orientados a crear tratamientos específicos así como aplicaciones adicionales en la monitorización de EMR junto con los estudios de colaboración internacional son necesarios para garantizar que todos los laboratorios de diagnóstico para EMR hablen el mismo idioma.

# **REVISIÓN SISTEMÁTICA DE LA UTILIDAD DIAGNÓSTICA DE CITOMETRIA DE FLUJO, RT-PCR Y REORDENAMIENTO CLONAL DE IG y TCR EN EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL EN LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA INFANTIL**

Dra Adriana López Cabrera \*, Dr. Rogelio A. Paredes Aguilera\*\*, Dr Ignacio Mora Magaña\*\*\*. \*Medico Residente de quinto año de Hematología Pediátrica INP (Tesisista).\*\* Profesor titular del curso de Hematología Pediátrica INP (Tutor de tesis). \*\*\* Jefe Departamento de Metodología de Investigación INP (Asesor de metodología).

## **ANTECEDENTES**

### **IMPACTO EPIDEMIOLOGICO**

Con exclusión del periodo neonatal, el cáncer de la infancia es la causa de muerte más común en personas menores de 15 años de edad en Estados Unidos. Anualmente se diagnostican unos 6000 a 7000 casos nuevos de cáncer de la infancia en este país para dar una incidencia general de 126 casos por millón de niños menores de 15 años de edad. En la perspectiva individual, aproximadamente en uno de cada 600 niños se elaborará diagnóstico de alguna forma de cáncer antes de los 15 años de edad <sup>(1)</sup>.

Las leucemias agudas son neoplasias hematológicas que se caracterizan por la proliferación y el crecimiento incontrolado de células linfoides o mieloides inmaduras. Las leucemias son las formas más comunes de cáncer en la población pediátrica, en donde constituyen entre 30 a 34% de todos los casos nuevos diagnosticados, o sea aproximadamente 2000 casos nuevos cada año, de los cuales 80% corresponde a leucemia linfoblástica y 20% restante a la leucemia aguda mieloide. La incidencia anual (por millón de habitantes) para la LAL es de

30.9 y de 5.6 para las LAM. La LAL muestra una mayor incidencia entre los dos y seis años de edad y afecta con más frecuencia el género masculino que al femenino <sup>(2)</sup>.

En la República Mexicana la tasa de mortalidad para todas las neoplasias malignas, aumentó significativamente de 28.1 x 100,000 habitantes en 1955 a 52.6 x 100,000 habitantes en 1995, pese a un descenso en la tasa de mortalidad total de 1319.2 x 100,000 habitantes en 1955 a 472 x 100,000 habitantes en 1995. Para 1996 la tasa de mortalidad por cáncer se había incrementado a 53.6 x 100,000 habitantes, lo que representaba un incremento del 3 % en comparación con 1995. La tasa de mortalidad por cáncer en niños menores de 15 años de edad en la República Mexicana varió de 46.8 por 1000,000 de niños en 1980 a 56.3 x 1000,000 de niños en 1995 lo que representó un incremento de 20.3 %, no obstante un descenso en la tasa de mortalidad en niños menores de 15 años de edad del 30 % <sup>(1,2,5)</sup>.

En un estudio multicéntrico de hospitales de la Ciudad de México en donde se analizaron 4956 casos de neoplasias malignas registradas en el período de 1980 a 1991, se documentó que las neoplasias más frecuentes fueron las leucemias con 1706 casos (34.4 %), siendo la LAL la forma más usual con 1421 casos (83.3 %), seguida de la LAM con 271 casos (15.9 %) y otras variedades de presentación poco frecuentes (0.8 %). Las leucemias y los linfomas son los tipos de cáncer y de muerte más frecuentes en niños menores de 15 años de edad <sup>(6)</sup>. En un informe reciente se reportó un incremento en la incidencia anual de LAL de 7.75 en 1982 a 22.19 en 1991. <sup>(7)</sup>

En el Instituto Nacional de Pediatría se registraron 179,480 nuevos pacientes pediátricos en el período comprendido entre 1980-1995, de los cuales 4,076 (2.2 %) correspondían a niños con cáncer y entre los cánceres durante la infancia las leucemias constituyeron el grupo más frecuente con 1,427 casos (57.7 %). En el

grupo de las leucemias, las leucemias agudas fueron las más frecuentes, registrándose 1,169 casos (81.9 %) con LAL y 258 (18 %) con LAM <sup>(1,2)</sup>.

Estos datos son similares a los observados en el Servicio de Hematología en el período comprendido entre 1987-1997 en donde evaluamos 863 casos de leucemia aguda de reciente diagnóstico, de los cuales 704 fueron registrados como LAL (81.6 %) y los restantes 159 (18.4 %) como LAM <sup>(1,2)</sup>.

Durante las dos últimas décadas se han experimentado constantes modificaciones en el tratamiento de la LAL en la niñez, lo que ha condicionado un incremento tanto en la supervivencia, como en el porcentaje de pacientes que continúan evolucionando en remisión completa continua, más de 5 años después de la elaboración del diagnóstico inicial. <sup>(6,7)</sup>

A pesar de estos notables progresos, los resultados no han sido igual de espectaculares en todos los niños, ya que entre el 5-10 % de los pacientes no respondieron o respondieron muy pobremente al tratamiento de inducción, nunca entraron en remisión y fallecieron rápidamente y entre 20-30 % recayeron eventualmente de su proceso y fallecieron también.

Fue esta discrepancia en el comportamiento, no obstante la utilización de los mismos o similares esquemas terapéuticos, el factor determinante que permitió en la década de 1970 la caracterización y posterior sistematización de algunas propiedades demográficas clínicas y hematológicas de cada grupo en particular. Aquellas propiedades que se encontraron asociadas con mayor frecuencia al grupo de pacientes con buena respuesta al tratamiento, se consideraron que ejercían una influencia pronóstica favorable y sirvieron como patrón o marco de referencia para caracterizar los rasgos distintivos asociados al grupo de pacientes con mala respuesta al tratamiento (factores considerados como de influencia pronóstica desfavorable). <sup>(3,8)</sup>

En la actualidad, la mayoría de los centros especializados emplean los factores de riesgo generalmente aceptados, como base para estratificar a los pacientes en grupos de riesgo diferente y utilizan protocolos terapéuticos diferentes y “adaptan” el tratamiento según los distintos grupos de riesgo. Los pacientes del grupo de “riesgo alto” suelen recibir un tratamiento más intensivo, mientras que los pacientes del grupo de “riesgo habitual o bajo”, suelen recibir una quimioterapia “atenuada” de la misma eficacia, es decir, sin disminución del potencial curativo pero con mínima toxicidad, en un intento por disminuir la morbilidad aguda y retardada asociada con los tratamientos más enérgicos. (3,8,9)

Cuadro 1. Factores pronósticos de LAL.

|   | Favorable  | Desfavorable   |
|---|--|--|
| 1.Edad  | 1 – 10 años  | < 1, > 10 años   |
| 2.Género                                      | Femenino   | Masculino  |
| 3.Magnitud y distribución de la carga tumoral |  |  |
| •1 Leucocitos                                 | < 10 X 10 <sup>9</sup> /L  | 50 X 10 <sup>9</sup> /L  |
| •2 Visceromegalias “masivas”                  | Ausente  | Presente   |
| •3 Tumor mediastinal                          | Ausente  | Presente   |
| •4 Infiltración testicular                    | Ausente  | Presente   |
| •5 Infiltración renal                         | Ausente  | Presente   |
| •6 Infiltración SNC                           | Ausente  | Presente   |
| 4.Clasificación citomorfológica               | FAB L1   | FAB L2, L3   |
| 5.Clasificación inmunológica                  | LAL “común”  | LAL Tipo “T”, “B”  |
| 6.Clasificación citogenética                  | Alteraciones numéricas:<br>Hiperdiploidia >50<br>Alteraciones estructurales:<br>t(12;21) | Alteraciones numéricas:<br>Hipodiploidia < 46<br>Alteraciones estructurales:<br>t(9;22), t(4;11)<br>t(1;19), t(8;14)<br>t(11;14) |
| 7.Respuesta al tratamiento de inducción       | MO = M1 (<5% blastos en el día 14)   | MO = M3 (>25%blastos en el día 14)   |
| 8.Estado nutricional al diagnóstico           | Normal   | Deficiente   |

La proporción de pacientes que permanecen en remisión completa ininterrumpida después del cese electivo de la quimioterapia, es tal vez el mejor indicador de la eficacia del tratamiento antileucémico utilizado.

El sitio mas frecuente de recidiva de la LAL es la médula ósea. En la mayor parte de los casos es posible lograr una segunda remisión, sin embargo la mayoría de los pacientes sufren una recidiva subsiguiente y acaban por morir eventualmente de la enfermedad. Los niños que después de terminar un tratamiento completo recaen en algún momento mientras ya no reciben quimioterapia, tienen mayores probabilidades de lograr una segunda remisión completa que si su recaída hubiera ocurrido mientras estaban sometidos a quimioterapia. <sup>(3,4)</sup>

El mejor pronóstico en general suele observarse en pacientes cuya primera recidiva ocurre en un plazo mayor de 12 meses después del cese electivo de la quimioterapia. Sin embargo los enfermos cuya recaída aparece en un plazo mayor de 6 meses después del cese electivo del tratamiento inicial, también tienen mejor pronóstico que los que recaen estando en tratamiento o poco después de su interrupción. <sup>(1,8,9)</sup>

Con cada recaída medular siguiente, las probabilidades de lograr una remisión completa así como la duración de la remisión irán disminuyendo.

En este sentido, la detección de enfermedad mínima residual (EMR) constituye un procedimiento de gran interés con objeto de adecuar los requerimientos terapéuticos y además en algunos casos puede tener una clara trascendencia pronóstica <sup>1,2</sup>.

La EMR consiste en la persistencia de un clon anormal, aún en niveles bajos, durante o tras finalizar el tratamiento. La EMR tiene significado pronóstico ya que puede predecir la recaída de la enfermedad y por este motivo, conocer su presencia nos puede ayudar a plantear estrategias terapéuticas para prevenirla <sup>6-</sup>

11

### **Detección de la EMR en las leucemias agudas infantiles**

La definición convencional de remisión completa morfológica en la leucemia aguda infantil implica la presencia de blastos inferior al 5% en una médula ósea normocelular y la recuperación hematológica completa en sangre periférica. Este procedimiento clásico, si bien muy útil y en plena vigencia, es poco sensible para detectar enfermedad residual.

Mediante el empleo de las actuales técnicas para determinar EMR, que tienen una sensibilidad 100 veces superior a la citomorfología, es posible identificarla en numerosos pacientes en remisión. La introducción de estas técnicas ha conducido a una nueva definición de remisión en las leucemias según la cual podría considerarse remisión hematológica cuando no se detecta EMR con un umbral de  $1 \times 10^{-4}$  (0,01% de células leucémicas del total de células nucleadas de la médula ósea)<sup>10, 12, 15, 17, 18</sup>.

### **Técnicas de detección de la enfermedad mínima residual**

Las técnicas de estudio para detectar EMR deben cumplir unos requisitos previos para poder ser considerados útiles. Dichos requisitos incluyen una elevada sensibilidad, especificidad, reproducibilidad y aplicabilidad de la técnica.

Las técnicas más comúnmente utilizadas dependiendo de cada caso son:

#### **• Citometría de flujo**

Tecnología utilizada para analizar y definir el perfil inmunofenotípico de las células neoplásicas y establecer así la presencia de fenotipos aberrantes. Posee una sensibilidad superior a  $1 \times 10^{-4}$ , es decir, es capaz de detectar una célula tumoral entre 10.000 células normales<sup>9, 13-15</sup>.

La cuantificación precisa es una característica inherente de la citometría de flujo. Hasta ahora, la realización de los inmunofenotipos se basa en el uso de fluorocromos usualmente con 3 a 4.

• ***RT-PCR (Transcripción inversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa)***

La PCR es una técnica molecular que permite amplificar secuencias específicas de ADN o ARN expresadas en las células tumorales, multiplicando por 100 el número de copias que podemos obtener de un determinado fragmento de ADN. Con la RT-PCR, se puede analizar el ARN de transcripción expresado en dichas células. Esto nos permite el estudio de los genes alterados por translocaciones primarias y de otros genes característicos asociados a determinados tipos de tumor. Posee una sensibilidad que se sitúa entre  $1 \times 10^{-4}$  y  $1 \times 10^{-6}$  <sup>6, 8, 16</sup>.

Después de numerosos estudios de un solo centro, y la unificación de los primers y protocolos para la transcripción reversa (RT)-PCR para la identificación de las más frecuentes transcripciones de fusión LAL: t(1,19) (q23;p13) con la fusión del gen E2A-PBX1, t(4,11)(q21;q23) con la fusión del gen MLL-AF4, los dos tipos principales de t(9, 22)(q34;q11) con la fusión del gen BCR-ABL, t(12, 21) (p13; q22) con la fusión del gen TEL-AML1 y la microdelección intracromosomal en 1p32 con la fusión del gen SIL-TAL1. <sup>26-28</sup>

Sin embargo, estos marcadores específicos de leucemia se pueden identificar en no más de la mitad de todos los pacientes, lo que limita su aplicación como marcadores en los pacientes con LAL.

***Análisis de los reordenamientos clonales de los genes de las inmunoglobulinas (Ig) y del receptor de célula T(TCR) como marcadores moleculares***

Actualmente se sabe que el diagnóstico molecular de leucemia linfoblástica aguda se basa en el hecho de que todas las células tienen en común un origen clonal y en esas formas de cáncer más del 98% de las células tienen re-arreglos clonales de los genes de inmunoglobulinas Ig y TCR(receptor de células T). <sup>(37,38,40)</sup>

En principio todas las células de una enfermedad linfóide se originan a partir de una clona y tienen por lo tanto una secuencia idéntica con los genes re-arreglados IgH (inmunoglobulinas de cadena pesada) y/o TCR (receptor de células T). Como consecuencia, la región de unión de los genes re-arreglados puede ser considerada como la huella génica de las células malignas, esta característica es vital ya que permite utilizarla como la secuencia blanco para detectar por PCR la EMR en cerca del 90% de los casos con LAL y cerca de 80% en los pacientes con linfomas. Los rangos cuantitativos suelen ser hasta  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ , dependiendo del tipo de rearrreglos de los genes y del tamaño del sitio de regiones de unión.

**Cuadro 2. Comparación de técnicas de análisis de EMR.**

| TÉCNICA  | DE APLICABLE | VENTAJAS                     | DESVENTAJAS                                  |
|--|--------------|------------------------------|--|
| <b>ANÁLISIS</b>                                |              |                              |  |
| Amplificación fusiones PCR                     | de 40%       | Alta sensibilidad<br>rapidez | Uso RNA<br>Contaminación                     |
| Amplificación de genes Ig y TCR por PCR        | 90%          | Alta sensibilidad            | Reactivos para cada paciente<br>Tiempo/costo |
| Detección por CF de inmunofenotipos aberrantes | de 95%       | Rapidez                      | Cambios de inmunofenotipo (falsos/negativos) |

### Valor pronóstico de Enfermedad Mínima Residual

En estudios de Consenso sobre el pronóstico de la EMR, Van Dongen et al., analizaron factores de riesgo asociados como el tratamiento, edad, sexo, inmunofenotipo, cuenta leucocitaria al diagnóstico, sin incluir aberraciones cromosómicas, encontrando que la EMR es un factor independiente del pronóstico con una ( $p$  menor 0.001). La negatividad de la EMR durante y después del tratamiento fue asociada con baja recaída en un intervalo de 3 a 15% a 3 años y EMR positiva con altas tasas de recaída con un 39-86% a 3 años.<sup>6,30,31</sup>

Los grados de EMR positiva tienen también valor pronóstico, en los primeros 2 seguimientos en el tiempo realizados, los índices de recaída en pacientes con alto

grado de EMR fueron 3 veces más altas que en pacientes con bajo grado EMR, y la positividad después del tratamiento fue rara pero asociada a tasas altas de recaída.

Análisis multivariados de cada uno de los 5 factores de riesgo a seguir anteriormente mencionados con más de 10% de positividad de EMR mostraron información como factores pronósticos. El impacto de alto grado de EMR fue independiente de el grupo de tratamiento incluyendo la respuesta a la prednisona.

La EMR baja en el grupo de bajo riesgo con una recaída de 2% a 3 años no se encontró en los pacientes en el grupo de alto riesgo y la presencia de alto grado de EMR con un índice de recaída de 75% a 3 años se encontró en los grupos de medio y riesgo alto. En los pacientes con riesgo intermedio con una recaída de 10% a 3 años se encontró una positividad de EMR en un 67%.<sup>6,28,33</sup>

La predicción de un mal pronóstico antes de la respuesta al tratamiento probablemente da mayores posibilidades para una rápida intervención en el mismo y la detección de una recaída inminente.

## **OBJETIVO**

El objetivo de esta revisión fue determinar la utilidad diagnóstica de las técnicas para la detección de enfermedad mínima residual en leucemia linfoblástica aguda en pacientes pediátricos.

## **CRITERIOS PARA LA VALORACIÓN DE LOS ESTUDIOS DE ESTA REVISIÓN**

### **Tipos de estudios**

Se revisaron estudios del tipo cohorte, sin limitación de tiempo o idioma. No se encontraron estudios tipo revisión sistemática, casos y controles, ensayo clínico y prueba diagnóstica como se tenía previsto en el protocolo.

### **Tipos de participantes**

Pacientes pediátricos (0-18 años) con LAL.

### **Tipos de Prueba Diagnóstica**

Se les realizó a las muestras de los pacientes en médula ósea y/o sangre periférica medición de EMR por lo menos por uno de los siguientes métodos: análisis de reordenamientos clonales de Ig y TCR, citometría de flujo y/o RT-PCR.

### **Tipos de medidas de resultado primarias**

Diagnóstico de EMR a través de las pruebas diagnósticas mencionadas, con los datos de: aplicabilidad de cada técnica, ventajas y desventajas, sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y razón de verosimilitudes positiva y negativa.

### **Criterios de Inclusión de los Artículos:**

Se incluyeron todos los artículos que cumplieron los criterios de inclusión señalados en este documento sobre utilidad diagnóstica en la medición de

enfermedad mínima residual por citometría de flujo, análisis de reordenamientos clonales de Ig y TCR, y/o RT-PCR (RQ-PCR).

Artículos incluidos:

Neale GAM(), Brisco MJ(), Dworzak MN(), van der Velden(), Szczepanski T(), Borowitz MJ(), Malec M(), Neale GAM(), Kerst G(), Robillard N().

Artículos excluidos:

Se excluyeron aquellos artículos que eran reportes publicados en adultos, que incluían leucemias mieloides agudas y que utilizaban otras técnicas diagnósticas para enfermedad mínima residual no incluidas en este documento. Artículos excluidos: Constan-Smith E (13)(19), Van der Velden VHJ(16), Szczepanski T (40)(43), Malec M (47), Van Dogen JJM (8 ), Björklund E (49), Brisco MJ (44), Campana D (21).

## **ESTRATEGIA DE BÚSQUEDA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LOS ESTUDIOS**

Se identificaron estudios pertinentes del registro leucemias linfoblásticas en pediatría utilizando las palabras claves: minimal residual disease (MRD), acute lymphoblastic leucemia, limitado a solo niños (0 a 18 años). El registro está compuesto por búsquedas electrónicas en Internet en MEDLINE, ProQuest Medical Library, Pubmed, Lilacs, Scielo, Artemisa, Cochrane, EBSCO, EMANASE y Ovid.

## **MÉTODOS DE LA REVISIÓN**

Tres revisores (ALC, RPA y IMM) aplicaron de forma independiente los criterios de inclusión, evaluaron la calidad metodológica y extrajeron los datos. Se realizó cribaje del título y resumen de cada cita identificada con la estrategia de

búsqueda, para valorar si era elegible. Se obtuvo el texto completo de cada estudio posiblemente elegible y se tradujeron los estudios cuando fue necesario.

## **DESCRIPCIÓN DE LOS ESTUDIOS Y RESULTADOS**

Se identificaron diez estudios a partir de la búsqueda; los mismos reunían los requisitos para la inclusión, con un total de 1727 niños (0-18 años).

No existió desacuerdo con la inclusión/exclusión de los artículos, la evaluación de la calidad o la extracción de los datos. Los datos disponibles se agruparon y analizaron como se presenta a continuación.

Los años de publicación incluyen del año 1999 al 2005.

Con un total de muestras tomadas de 3544, a las cuales se les realizó citometría de flujo (CF) a 3233, RQ-PCR para la detección de translocaciones más comunes en pediatría (t (1:19)/E2A-PBX1, t (12:21)/TEL-AML1, t (9:22)/BCR-ABL, t (4:11)/MLL-AF4) a 1016 y RQ-PCR para análisis de reordenamientos clonales de Ig y TCR a 2052. Así como utilizando 2 métodos CF y RQ-PCR para detección de translocaciones a 1016; CF y RQ-PCR para análisis de reordenamientos clonales de Ig y TCR a 1775.

En el estudio de Neale GAM et al. 1999 se comparó la medición de enfermedad mínima residual (EMR) por 2 métodos por citometría de flujo (CF) con 4 fluorocromos y amplificación de PCR de genes receptores de antígenos, utilizando rearrreglos de genes IgH (inmunoglobulinas de cadenas pesadas) así como rearrreglos de receptor de células T (TCR) de los genes gamma y delta, utilizando primers consensados de la región V FR-1C o FR-2B.

Esto se realizó en 52 pacientes con leucemia aguda linfoblástica (LAL), de los cuales 13 con linaje T y 39 con linaje B, con un total de 62 muestras de médula ósea (MO), las mediciones se realizaron al final de la inducción. CF fue valorada en 13 casos de los pacientes con linaje T y en 29 de los 39 de linaje B. Los restantes 10 no expresaron inmunofenotipos valorables para EMR.

PCR se utilizó en 35 de los 39 pacientes con linaje B y no en los de linaje T. Los 52 pacientes se valoraron al menos por 1 método, ya fueran tomadas al diagnóstico o al final de la inducción a la remisión, en la semana 6 y 10 de seguimiento. Teniendo como resultados que la ausencia de LAL por criterios morfológicos, 12 de 62 muestras contenían  $\geq 1$  célula leucémica.

La proporción de células leucémicas en estos casos vario de 0.01% a 19% de células mononucleares por CF y de 0.023% a 23% por PCR. El resto de las 50 muestras, 48 habían tenido al menos 1 en  $10^{-4}$  células leucémicas o no detectables para leucemia por ambas técnicas. En solo 2 muestras los resultados fueron discordantes: 2 en  $10^{-4}$  y 5 en  $10^{-4}$  células leucémicas por PCR y  $< 1$  en  $10^{-4}$  por CF.

La sensibilidad que se mostró por ambas técnicas fue de 1 en  $10^{-4}$  obteniendo como conclusión que ambas técnicas CF y la amplificación por PCR de rearrreglos de genes de IgH y TCR pueden utilizarse como monitoreo de EMR en niños con LAL con la posibilidad en ambos métodos de resultados falsos-negativos ya sean causados por cambios en el inmunofenotipo o por cambios en los receptores de antígeno de los rearrreglos de genes, en este estudio solo encontró discordancia en 2 muestras de 62.

Posteriormente estos mismos autores Neale GAM et al. 2004 publicaron otro estudio con una serie más grande de paciente 227 niños con el diagnóstico de LAL de linaje B únicamente con un total de 1375 muestras de seguimiento de las cuales 736 de MO y 639 de sangre periférica (SP). Se les realizó a estas muestras

CF con 4 fluorocromos y se identificaron rearrreglos de genes de IgH usando primers de consenso región-V, FR-1, FR-2B en conjunto con el primer universal J<sub>H</sub> y con el uso de sondas Taqman en 319 muestras.

A las 1375 muestras se les realizó por igual CF y PCR, para valorar la sensibilidad de EMR la detección de al menos 0.01% células por CF y 0.001% por PCR. De las 1375 muestras, 129 de 61 pacientes fueron positivas para MRD y 1200 de 216 pacientes fueron negativas. De las 129 positivas ( $\geq 0.01\%$ ) con rangos de 0.01 a 19% por CF y 0.023 a 51% por PCR. En otras 28 muestras de 23 pacientes, EMR fue  $\geq 0.01\%$  por CF pero  $< 0.01\%$  por PCR. En 18 muestras de 14 pacientes, EMR fue  $\geq 0.01\%$  acorde a PCR pero  $< 0.01\%$  por CF.

Los resultados fueron concordantes con MRD positiva o negativa en 1329 de 1375 muestras (96.7%). La concordancia también fue evidente cuando se analizó MO o SP con muestras de 708 de 736 (96.2%) de MO y 621 de 639 (97.2%) de SP. Al igual que en la realización de la misma durante el tratamiento, 178 de 199 (89.4%) tomadas durante la inducción a la remisión, 394 de 410 (96.1%) al final de la IR, y 757 de 766 (98.8%) posremisión fueron concordantes.

De las 37 muestras discordantes en resultados de EMR (usando de parámetro 0.01%), por ambos métodos con una sensibilidad de al menos 0.001% en 34 de los 37 y en 19 muestras se estimó una diferencia menor de 1 log. Encontrándose la detección de EMR en desacuerdo solo 46 muestras de 1375 (3.3%) con un nivel para positividad de 0.01%. en este estudio para los parámetros de sensibilidad de las pruebas fue para la CF de  $10^{-3}$  y PCR  $10^{-4}$ , al igual del estudio realizado por los mismos autores en 1999 se concluyó que se pueden obtener falsos negativos por CF por cambios en el inmunofenotipo durante el tratamiento y en la PCR por la evolución clonal durante el curso de la enfermedad.

En otro estudio de Brisco MJ et al. 2001, se valoraron 38 niños con el diagnóstico de LAL de linaje B realizándose detección de monoclonalidad con rearrreglos de IgH y TCR por PCR para la medición de EMR al día 14 y al día 35. De los 38 pacientes, 16 recaídas, 11 de estas recaídas a MO, 3 a testículo y 2 a SNC únicamente. La monoclonalidad de IgH y/o rearrreglos de TCR fueron detectados en 34 de los 38 pacientes (89%). La medición del porcentaje de blastos al día 14 o detección de monoclonalidad no tuvo utilidad diagnóstica. Al día 35, 5 de los 27 pacientes con EMR positiva ( $>10^{-3}$ ), 4 presentaron recaída a MO y 22 con EMR ( $<10^{-3}$ ), presentaron 8 recaída (36%), 4 a MO, 2 a SNC y 2 a testículo. Las recaídas a MO, la diferencia entre EMR  $>10^{-3}$  y  $<10^{-3}$  fue significativa ( $P=0.010$ ).

Valorándose aquí además pronóstico observándose que una medición positiva al final de la inducción (día 35) tiene alto valor pronóstico y encontrándose que parte de la realización de PCR depende de la calidad de extracción del DNA, la sensibilidad diagnóstica PCR fue  $>10^{-3}$  con un valor predictivo positivo de 67% con una sensibilidad de 40%.

Dworzak MN et al. 2002, en este estudio se valoró la detección de EMR por un único método CF de 4 fluorocromos en 139 niños con LAL en tratamiento con el protocolo BFM 95. 108 de estos pacientes al diagnóstico y durante el seguimiento se realizaron tomas de muestras al día 15, 33, semana 12, semanas 22 a 24. De 101 pacientes con LAL de linaje B, 5 pro-B, 67 común, y 28 pre-B y 8 pacientes con LAL células T (7.4%). La media de observación de tiempo fue de 40 meses. La proporción de muestras con EMR positiva fue más alta en el día 15 (89.1%) y disminuye a 40.9% al día 33, 13.7% a la semana 12 y 4.3% a las semanas 22 a 24. 33 de los 108 presentaron recaída durante el seguimiento.

La presencia de EMR al día 33 fue asociado a una alta probabilidad de recaída ( $P=0.24$ ) al igual que a la semana 12 y semana 22 a 24 ( $P<.001$  para ambas correlaciones), pero no al día 15. La medición absoluta de EMR por CF tuvo

variaciones dependiendo de la cuenta de células nucleadas entre las muestras, la regeneración de las células B inmaduras después de periodos de reposo en el tratamiento limitan la sensibilidad de la prueba por CF por lo que se concluyó que este método es un fuerte e independiente indicador de resultados de EMR para niños con LAL.

Van der Velden VHJ et al 2002, publicaron un estudio para la cuantificación de EMR por RQ-PCR usando sondas Taqman con la detección de rearrregios del gen TCR y combinación de primers usando alelos específicos con regiones V gamma y J gamma en 32 niños, 17 con LAL linaje B y 15 con linaje T con una sensibilidad  $10^{-4}$  la cual fue obtenida en solo 4 de 19 pacientes (21%) de rearrregios del gen en precursor de células B y en 10 de 15 (67%) en pacientes con LAL células T .

La máxima sensibilidad de  $\leq 10^{-4}$  fue obtenida en 42% de los rearrregios de precursores de células B. Con RQ-PCR:  $\leq 10^{-4}$  en 18 de 34 rearrregios TCRG (53%) y  $\leq 10^{-3}$  en 30 de los 34 casos (88%) y en 9 casos (26%) con una máxima sensibilidad de  $10^{-5}$ . Este estudio concluyo que el análisis del rearrreglo de los genes por RQ-PCR es aplicable en la mayoría de los pacientes con LAL de cel T y en casi la mitad de los pacientes con LAL de linaje B .

Szczepanski T, et al 2002, con una muestra de 96 niños con el diagnóstico LAL de linaje B, de estos precursor de células B: 6 (6%) pro-B, 59 (61.6%) LAL común y 31 (32%) con pre B. Se realizó al diagnóstico inicial y a la recaída (91 pacientes) y 5 pacientes con leucemia mieloide secundaria (posterior a la recaída). En este estudio de midió PCR por 2 métodos. Se realizo PCR por southern blot para configuración de IGH (inmunoglobulinas de cadena pesada) e IGK (inmunoglobulinas kappa de cadenas ligeras) y TCRG y TCRD (receptor de células T G y D) al diagnóstico y a la recaída en 89 pacientes y además se realizo la secuencia de rearrregios de gen es IgH y TCR.

Las bandas clonales IgH y TCR para detección de EMR se identificaron en 94 pacientes con un 71% de estos a la recaída. La mejor estabilidad fue encontrada en el rearrreglo IGK-K (90%) seguido por TCRG (75%) y IGH (64%) con un rearrreglo incompleto TCRD (63%). La combinación de ambos métodos Southern blot y PCR para IGH, IGK y TCRD mostró diferencias significativas en la recaída entre los rearrreglos monoclonales y oligoclonales: 59% versus 40% respectivamente. En 38% de los pacientes con EMR por PCR positiva se preservaron en la recaída y en 22% (10 casos) no se presentaron los mismos rearrreglos. Concluyendo que usando el método por PCR para rearrreglos del gen Ig/TCR utilizando bandas clonales siendo efectivo en 97% a 98% para la detección, teniendo menor efectividad por el método de southern blot.

Borowitz MJ et al 2003, utilizando la muestra más grande de todos los estudios con 1016 niños con el diagnóstico LAL precursor células B, dentro del protocolo de Childrens Oncology Group. (POG 9900), en este estudio de compararon 2 métodos: CF, por 4 fluorocromos y RQ-PCR para las translocaciones más comunes en pediatría t (1:19)/E2A-PBX1, t (12:21)/TEL-AML1, t (9:22)/BCR-ABL, t (4:11)/MLL-AF4). Se encontró en 225 de los 1016 (22.1%) con MO con EMR >0.01% al final de la inducción. Un total de 129 de 1016 (12.7%) con niveles mayores de 0.1%.

De las translocaciones encontradas 18 pacientes con cromosoma Philadelphia positivo, 16 (89%) positivos con niveles mayores 0.1%, 5 de 38 pacientes (13.2%) con E2A-PBX1 con EMR y 4 de los 5 con niveles mayores 0.1%. Solo 8.2% de los pacientes con TEL-AML1 tuvieron EMR positiva mayor de 0.01% comparado con 20.3% de los pacientes con trisomías del cromosoma 4 o 10. Por lo que se concluye que el método de RQ-PCR para la detección de translocaciones más comunes es un método muy limitado ya que sólo se encontraron en 225 de los 1016 pacientes, por lo que no es un método aplicable para todos los pacientes en comparación con la citometría de flujo la cual si se aplicó a todos los pacientes.

En el estudio de Malec M et al 2004, con una muestra de 22 niños con diagnóstico de LAL. 2 pacientes con LAL de células T y 20 LAL precursor-B. De estos 11 tratados de acuerdo al protocolo NOPHO-92 y 11 con el NOPHO 2000. Un total de 93 médulas óseas (22 obtenidas al diagnóstico y 71 durante el seguimiento) .Se analizó enfermedad mimica residual (EMR) usando CF ( de acuerdo a consenso BIOMED-1) usando 3 y 4 fluorocromos y RQ-PCR usando TCRD, TCRG, IGH (inmunoglobulinas de cadena pesada) e IGK (inmunoglobulinas kappa de cadenas ligeras) como marcadores moleculares con sondas Taq-man y primers consensados.

Al diagnóstico, 48 rearrreglos de genes IG/TCR fueron encontrados en los 22 pacientes con LAL: 19 IGH, 12 IGk-kde 11 TCRG y 6 TCRD. De estos 17 pacientes con 2 más mediciones y 5 con una medición. Se comparo la determinación de EMR por CF y análisis RQ-PCR de 71 muestras de MO como seguimiento, 34 de las 71 (47%) tomadas durante los primeros 3 meses de tratamiento.

Se encontró inmunofenotipo aberrante por CF en 24 pacientes (34%) con niveles de EMR 0.006-30% y por RQ-PCR la detección en 38 (54%), 13 de estas 38 los niveles fuera de rangos cuantitativos y en las restantes 25 con niveles de 0.0024-68%. 19 muestras de 6 pacientes se les realizó doblemente medición de RQ-PCR, los resultados fueron concordantes en 16 de las 19 (84%) y 3 discordantes con niveles de EMR 0.001-0.02% (cuantitativo  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ ). La concordancia entre citometría de flujo y RQ-PCR fue dependiente del corte de la toma de la muestra y el tiempo de tratamiento.

En un nivel de corte de 0.1%, 94% de las muestras con resultados concordantes, con un nivel de corte de 0.01%, 89% y solo 72% con un nivel de corte de 0.001%. No se detecto EMR usando ambos métodos en 30 muestras (42%). Se encontraron diferencias significativas entre los 2 métodos (Cohen's kappa test

k:0.449,  $P < 0.001$ ). En 19 muestras fueron cuantificadas positivamente por ambos métodos con coeficiente de correlación de Pearson:  $r = 0.793$   $P < 0.01$ . Los niveles de EMR por CF fueron considerablemente más altos que por análisis de RQ-PCR (0.04 vs 0.0024% y 0.8 vs 0.02%). CF cuantifica las células viables que expresan inmunofenotipos aberrantes, con una sensibilidad  $10^{-4}$  depende del número de células analizadas y del tipo de inmunofenotipo aberrante. Para una sensibilidad de 0.01% al menos 200,000- 500,000 células deben ser analizadas.

RQ-PCR cuantifica el rearreglo de los genes IG/TCR y generalmente con una sensibilidad de  $10^{-5}$  con un rango cuantitativo de  $10^{-4}$ .

La sensibilidad de RQ-PCR es mayor que CF. La concordancia por ambos métodos en nuestro estudio fue dependiente del nivel de corte de las mediciones. Concluyeron que la aplicación de múltiples combinaciones de anticuerpos y la aplicación de 6 fluorocromos en CF puede reducir los falsos-negativos. Para reducir el riesgo de falsos-negativos por RQ-PCR preferiblemente deben de usarse 2 rearreglos de genes IG/TCR, por la probable existencia de evolución clonal, la cual se ha demostrado en 30% de los pacientes entre el diagnóstico y la recaída.

Kerst G. et al 2005, con una muestra de 45 niños con el diagnóstico de LAL, 37 de linaje B y 8 con linaje T, estudiándose 267 muestras de seguimiento. Se compararon 2 métodos: CF con 4 fluorocromos con detección de al menos una célula leucémica en 10,000 y por RQ-PCR de regiones de IgH, cadenas kappa (IGV $\lambda$ -IV-Kde), receptor de células T gamma (TCRV $\gamma$ -IV-Jc), receptor de células T delta (TCRV $\delta$ ). 105 de 30 pacientes se analizaron por CF y PCR simultáneamente y el resto 162 solo se analizaron por un método, 51 por CF y 111 por PCR. De las 267 muestras, 144 se obtuvieron durante la primera línea de tratamiento y 36 en recaída con tratamiento y 87 posterior a TCHP (transplante de células hematopoyéticas).

Los oligonucleótidos alelo-específicos se usaron una combinación de sondas Taqman y una línea reversa germinal. 33 de los 37 (89%) con LAL de linaje B con al menos un fenotipo anormal y 30 (81%) tuvieron 2 o más. En 36 pacientes se encontraron 2 o más (no más de 4) rearrreglos monoclonales. La EMR fue cuantificable  $\geq 0.01\%$  en 97 muestras,  $\geq 0.1\%$  en 8 muestras consideradas positivas y por debajo de estos niveles o indetectable consideradas negativas. En 102 muestras (97.1%) ambos métodos fueron concordantes en sus resultados, medidos con la Kappa de Cohen: 0.94.

Cuando el análisis se restringió a 87 muestras con valores por debajo de una detección microscópica de 5%, fueron concordantes con CF y PCR con una kappa de Cohen: 0.92. Solo 3 resultados fueron no concordantes.

La correlación de EMR estimada por ambas técnicas en 43 muestras fue positiva con una  $r^2 = 0.889$  por análisis de regresión. El panel de anticuerpos usados para EMR por CF para seguimiento fue de 90% para linaje B y 100% para linaje T. RQ-PCR fue aplicable para 80% de los pacientes y la detección de los rearrreglos fue restringida por el panel de primers utilizados. La sensibilidad diagnóstica por CF fue de 0.01% al igual que por PCR.

Los estudios por CF pueden presentar falsos negativos por cambios en el inmunofenotipo durante el tratamiento y en la PCR por la evolución clonal durante el curso de la enfermedad.

En otro estudio de Robillard N et al 2005, en donde se compararon 2 métodos al igual se determinó CF con 4 fluorocromos y PCR con identificación de rearrreglos de IGK y combinaciones de IgH, TCR delta y TCR gamma, con amplificación de los mismos. Se determinaron por ambos métodos PCR y CF 123 muestras con una concordancia de 119 de los 123 (97%).

Se estudiaron un total de 91 niños y un total de 140 muestras. 136 MO en remisión de 88 pacientes con el diagnóstico de LAL, 76 LAL linaje B (incluidos 2 con CD10 negativo y 5 con t (4:11)) y 12 de linaje T. 4 muestras adicionales de 3 pacientes con LAL cel T de otro centro hospitalario todos en tratamiento con el protocolo BFM. Con mediciones al final de la inducción (día 35+-5), y durante la consolidación (día 85+-25) en 85 y 55 pacientes respectivamente.

Se observaron 4 resultados no concordantes entre PCR y CF. Con valores menores por CF pero por PCR solo en 1 de los casos. En 12 de 13 muestras de 9 pacientes con LAL linaje B CD10 y/o t (4:11) y niños con LAL células T inmadura, EMR pudo ser determinada por CF pero no por PCR. Controversialmente, CF no fue apta para valorar a 3 niños incluyendo 2 de células T y si fueron valorables con PCR. La presencia de falsos negativos por PCR o CF es muy baja. Y concluyendo que la CF es una prueba competitiva para PCR.

A las pruebas diagnósticas referidas en los artículos se les realizó medición de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN) y razón de verosimilitudes (LR) positiva y negativa, los resultados se encuentran en la Tabla 1.

TABLA 1. RESULTADOS DE PRUEBAS DIAGNOSTICAS.xls

| Autor                 | Características de la población | TM   | MB   | Instrumento de Medición | Sensibilidad % |            | Especificidad % |            | VPP % |            | VPN % |            | LR+  |            | LR-  |            |
|-----------------------|---------------------------------|------|------|-------------------------|----------------|------------|-----------------|------------|-------|------------|-------|------------|------|------------|------|------------|
|                       |                                 |      |      |                         | CF             | PCR/RQ-PCR | CF              | PCR/RQ-PCR | CF    | PCR/RQ-PCR | CF    | PCR/RQ-PCR | CF   | PCR/RQ-PCR | CF   | PCR/RQ-PCR |
| Neale GAM, 1999.      | 13 T y 39 B                     | 52   | 62   | CF y PCR                | 96             | 97         | 90              | 96         | 91    | 97         | 90    | 96         | 9.6  | 24.2       | 0.04 | 0.03       |
| Brisco MJ, 2001.      | B.                              | 38   | 38   | PCR                     | 40-            |            | 71-             |            | 67-   |            | 50-   |            | 1.37 |            | 0.84 |            |
| Dworzak MN, 2002.     | B.                              | 108  | 329  | CF                      | 84             |            | 89-             |            | 86-   |            | 78-   |            | 7.6  |            | 0.17 |            |
| Van der Velden, 2002. | 17 B y 15 T                     | 32   | 32   | RQ-PCR                  |                | 88-        |                 | 74-        |       | 84-        |       | 77-        |      | 3.38       |      | 0.16       |
| Szczepanski T, 2002.  | B                               | 96   | 192  | PCR                     |                | 62-        |                 | 98-        |       | 86-        |       | 67-        |      | 31         |      | 0.38       |
| Borowitz MJ 2003.     | B                               | 1016 | 1016 | CF y RQ-PCR             | 88             | 89         | 84              | 94         | 86    | 94         | 86    | 90         | 5.5  | 14.8       | 0.13 | 0.11       |
| Malec M, 2004.        | 20 B y 2 T.                     | 22   | 93   | CF y RQ-PCR             | 60             | 84         | 65              | 93         | 64    | 84         | 84    | 90         | 1.71 | 12         | 0.61 | 0.17       |
| Neale GAM, 2004.      | B.                              | 227  | 1375 | CF y PCR                | 91             | 96         | 90              | 97         | 91    | 96         | 86    | 94         | 9.1  | 32         | 0.1  | 0.04       |
| Kerst G, 2005.        | 37 B y 8 T.                     | 45   | 267  | CF y RQ-PCR             | 92             | 94         | 88              | 97         | 89    | 92         | 88    | 92         | 7.6  | 31.3       | 0.09 | 0.06       |
| Robillard N, 2005.    | 76 B y 16 T                     | 91   | 140  | CF y PCR                | 97             | 98         | 92              | 96         | 91    | 94         | 90    | 93         | 12.1 | 24.5       | 0.03 | 0.02       |

1727 3544

CF: citometria de flujo  
 PCR-PCR: reacción en cadena de polimerasa en tiempo real  
 PCR: reacción en cadena de polimerasa  
 LAL: leucemia aguda linfoblástica.  
 MO: médula ósea  
 SP: sangre periférica  
 T: linaje T  
 B: linaje B

CF: 3233  
 RQ-PCR para traslocaciones: 1016  
 RQ-PCR análisis de reordenamientos clonales de Ig y TCR: 2052  
 CF y PCR para traslocaciones: 1016  
 CF y RQ-PCR análisis de reordenamientos clonales de Ig y TCR: 1775

LR: razón de verosimilitud  
 VPP: valor predictivo positivo  
 VPN: valor predictivo negativo  
 TM: tamaño de la muestra  
 MB: muestreo biológico

## DISCUSIÓN

Diversos estudios han demostrado que la monitorización de la enfermedad mínima residual (EMR) en niños con leucemia aguda linfoblástica (LAL) se correlaciona significativamente con la clínica. La detección de EMR es particularmente útil para la evaluación de la respuesta al tratamiento temprano y, en consecuencia, para mejora en la estratificación en los tratamientos de primera línea.

La EMR nos da una importante información para los niños que serán sometidos a trasplante alogénico de células hematopoyéticas y con los que presentan recaída.

Actualmente, existen tres métodos muy específicos y sensibles para la detección de EMR los cuales se valoran y comparan en este estudio y que se encuentran disponibles: citometría de flujo (CF), tiempo real de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (RQ-PCR) basada en la detección de la fusión de la transcripciones de genes o de interrupción, y el RQ-PCR basada en la detección clonal de inmunoglobulinas (Ig) y del gen receptor de células T (TCR).

En esta revisión se revisaron las características de cada una de las pruebas diagnósticas, su aplicabilidad, ventajas y desventajas, sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo, así como razón de verosimilitudes para medir cuanto más probable es un resultado concreto (positivo o negativo) según la presencia o ausencia de enfermedad mínima residual.

El especial énfasis en que exista una estandarización entre laboratorios en vista de los resultados obtenidos en el Consenso Europeo BIOMED-1, BIOMED-2, y en los proyectos Europa contra el Cáncer y por la evolución reciente de estudios del

grupo europeo para la detección de EMR en LAL y el Consorcio Europeo EuroFlow para la estandarización de los métodos para CF. Para la normalización de las técnicas forman la base de la estadificación de los pacientes en los grupos de riesgo en los nuevos protocolos de tratamiento en LAL. Sólo los resultados de esos estudios pueden responder a la pregunta de si la detección de EMR y el tratamiento basado en la intervención se asocia con un mejor resultado.

### **La justificación de la detección de EMR en LAL**

El concepto de la detección de enfermedad mínima residual (EMR) en LAL se encuentra intrínsecamente asociado a los avances en el tratamiento, 80% de los niños y el 35% de todos los pacientes adultos pueden curarse complementado con la quimioterapia y con trasplante de células hematopoyéticas (TCHP) en pacientes de alto riesgo (revisado por Hoelzer et al.<sup>5</sup>).

Sin embargo, un número importante de pacientes con LAL y recaída con la predicción de la misma por métodos convencionales como los factores pronósticos: la edad, cuenta al momento del diagnóstico, inmunofenotipo, la presencia de aberraciones cromosómicas, la respuesta a los esteroides. La asignación de grupo de riesgo está lejos de ser óptima.

Las células leucémicas durante primeras fases de tratamiento proporcionan información pronóstica superior a todos los clásicos factores pronósticos.

Varios estudios prospectivos de LAL en la infancia han demostrado que la información más relevante procede de la detección de EMR en la médula ósea en las primeras fases de tratamiento, sobre todo al final de la inducción a la remisión esto revisado en los artículos de Szczepan'ski et al.<sup>6</sup> y Cazzaniga y Biondi<sup>7</sup>.

Los niños con EMR indetectable al final de la inducción han mostrado un excelente pronóstico y son buenos candidatos para el tratamiento de la intensificación habitual, al menos, no debería ser objeto de más intensificación de tratamiento, en particular a no realizar TCHP.<sup>5-9</sup>

En la LAL en la infancia, un grupo de respondedores ultrarápidos podrían identificarse con éxito con la realización de EMR en la médula ósea, incluso dentro de las 2 primeras semanas de la inducción.<sup>10, 11</sup>

Por el contrario, los niños con altos niveles de EMR al final del tratamiento de inducción sería necesario un nuevo tratamiento o incluso la intensificación del mismo. En particular cuando se presentan altos niveles EMR puede variar la fase consolidación en el tratamiento.<sup>5-9</sup>

Los niños con LAL de alto riesgo y LAL con recaída previstos para TCHP alogénico también pueden beneficiarse de monitorización de EMR.<sup>12</sup> La detección de EMR<sup>17</sup> ahora es generalmente aceptada como uno de los requisitos previos para el éxito de TCHP alogénico en donde debe existir la máxima reducción de EMR antes del inicio del trasplante. Los pacientes con EMR alta pretrasplante se encuentran en muy alto riesgo de presentar recaída de LAL.<sup>12, 14, 15</sup>

En la actualidad, los recientes estudios tienen por objeto la evaluación de los posibles enfoques pretrasplante en relación a la EMR con niveles más bajos asociados a la presencia de injerto contra huésped e inmunosupresión para mejorar los resultados después del TCHP.

En conclusión, sobre la base de lo anteriormente mencionado los resultados significativos de varios protocolos de tratamiento, principalmente en LAL infancia se han iniciado con la monitorización de EMR incluida en la base del tratamiento de la intervención como una parte esencial. Sólo los resultados de estos estudios

que pueden responder a la pregunta de si la monitorización de EMR para cambios en el tratamiento se asocia a un mejor resultado.

Los métodos para la cuantificación de EMR en LAL deben caracterizarse óptimamente por presentar especificidad, con una sensibilidad satisfactoria (por lo menos  $10^{-4}$ , es decir, una célula maligna entre 10 000 células normales), la aplicabilidad de la gran mayoría de los paciente, viabilidad (de fácil y rápida normalización de la toma de las muestras y de los resultados para la aplicación clínica), así como reproducibilidad entre los laboratorios. Otro requisito previo para la confiabilidad en la técnica para la detección de EMR es la precisa cuantificación de los niveles.

Los estrictos criterios descritos anteriormente son, en su mayor parte reunidos por los 3 métodos que se valoraron en este estudio y mencionados anteriormente.

### **Citometría de Flujo**

La cuantificación precisa es una característica inherente de la citometría de flujo. Hasta ahora, la realización de los inmunofenotipos para la detección de EMR se basa en el uso de fluorocromos. Esta metodología se basa en la localización específica de los inmunofenotipos de la leucemia, los antígenos que se presentan para la determinación del linaje, la madurez y expresión de los antígenos y asincronía de los mismos así como sobreexpresión de antígenos, la falta de expresión del antígeno, antígenos de expresión ectópicos., y diversas combinaciones de los mismos creando diferenciación entre los blastos de LAL dentro de espacios vacíos entre la diferenciación linfocítica normal. (que se resumen por Campana<sup>21</sup> y Szczepanski et al.<sup>22</sup>)

El límite de detección de esta técnica no es inferior a  $10^{-3}$ - $10^{-4}$ , que, sin embargo, debería ser suficiente para la identificación de todos los pacientes de alto riesgo.

Otra dificultad de la citometría de flujo es la modulación de antígeno de expresión que ocurren durante el tratamiento, que puede cambiar el inmunofenotipo específico de la leucemia en un fenotipo que asemeje a las células precursoras linfocíticas normales esto mostrado en los estudios de Neale GAM 1999 y 2004, Dworzak MN 2002, Malec M 2004 y Kerst G 2005.

Por otra parte los cambios en el inmunofenotipo podrían ocurrir entre el diagnóstico y la recaída.<sup>24</sup> Por lo tanto, después de al menos dos inmunofenotipos específicos para leucemia por paciente es recomendado realizar para evitar resultados falsos negativos.

Es sorprendente que los estudios más importantes sobre la detección de EMR por citometría de flujo se basa en un único laboratorio experto.<sup>10, 11</sup>

Esto plantea la cuestión de la normalización entre laboratorios en los reactivos para la realización de las citometrías de flujo y los procedimientos, que es esencial para la realización de protocolos de tratamiento.

Con la llegada de un citómetro de flujo con 6 fluorocromos, tiene una mayor sensibilidad para la detección de EMR, pero con el aumento de la complejidad en la técnica existiendo la necesidad de normalización entre laboratorios. Por lo que la Comisión de la Unión Europea a través del Consorcio Europeo EuroFlow se encuentra destinada a la normalización de "Citometría de flujo para el diagnóstico rápido y sensible y el seguimiento de las neoplasias malignas hematológicas".<sup>27</sup>

#### **RQ-PCR basada en la cuantificación de enfermedad mínima residual asociado fusión de los genes y translocaciones cromosómicas.**

La cuantificación de EMR en la leucemia se encuentra asociada a los genes resultantes de la fusión cromosómica y translocaciones y están directamente

vinculadas, representando la estabilización de la enfermedad y de marcadores específicos. Después de numerosos estudios de un solo centro específico, y la unificación de los primers y protocolos, para RQ-PCR se identificaron las más frecuentes transcripciones de fusión LAL: t(1,19) (q23;p13) con la fusión del gen E2A-PBX1, t(4,11)(q21;q23) con la fusión del gen MLL-AF4, los dos tipos principales de t(9, 22)(q34;q11) con la fusión del gen BCR-ABL, t(12, 21) (p13; q22) con la fusión del gen TEL-AML1 y la microdelección intracromosomal en 1p32 con la fusión del gen SIL-TAL1, fueron normalizados dentro del Consenso Europeo BIOMED-1 y la Asociación de Europa contra el cáncer.<sup>28-30</sup>

Sin embargo, estos marcadores específicos de leucemia se pueden identificar en no más de la mitad de todos los pacientes, lo que limita su aplicación para la detección de EMR como marcadores de cohortes general los pacientes con LAL. Sin embargo, varias translocaciones son significativas para identificar marcadores 'Homogéneos' en los subgrupos de LAL. Tanto en la infancia y los adultos con LAL, la translocación t(9, 22) con la fusión del gen BCR-ABL se encuentra asociado con un pronóstico malo, aunque en raros casos con una muy buena sensibilidad a la quimioterapia, también siendo identificado un subgrupo de LAL quimioresistente<sup>31</sup>.

Con la adición de tratamientos como el imatinib mesilato a los protocolos de quimioterapia a quienes presentan la fusión del gen BCR-ABL, RT-PCR se ha convertido en la primera opción como marcador y vigilancia de EMR.<sup>30, 31</sup>

En cambio, la fusión de genes TEL-AML1 que ocurren en aproximadamente 25% de los niños con LLA identifica a un subgrupo con un muy buen pronóstico para el que la vigilancia de EMR aun no se encuentra plenamente demostrado.

Los protocolos para la detección y cuantificación de la fusión de genes en base a las transcripciones RQ-RT-PCR empleando la tecnología TaqMan se han desarrollado gracias al EAC (Europe Against Cancer).<sup>29</sup>

Las determinaciones de EMR se caracterizan por la alta sensibilidad y reproducen 10 moléculas de un plásmido o  $10^{-4}$  moléculas de ARN linear celular para la dilución en la mayoría de los objetivos. El estudio de EAC selecciona apropiadamente genes de referencia para corregir las variaciones en la calidad del ARN y para calcular la especificidad y la sensibilidad de cada medición.<sup>28</sup>

Estos genes controlados se caracterizan por una expresión altamente estable en la sangre periférica y médula ósea. Debido a la alta sensibilidad de las técnicas de PCR, la contaminación cruzada de la técnica por RT-PCR de los productos entre las muestras de paciente es un problema importante para la detección de EMR, por lo que se puede encontrar hasta un 20% de resultados falsos positivos, como en los estudios de Neale GAM 1999 y 2004, Dworzak MN 2002, Malec M 2004 y Kerst G 2005.

La contaminación cruzada la cual es difícil de reconocer, como transcripciones de fusión de genes, aunque específicos de leucemia, pero no son marcadores específicos para el paciente. También los niveles de transcripción de genes de fusión puede variar significativamente entre los pacientes. Esto es en contraste con los productos obtenidos de puntos de corte de fusión por PCR, que se pueden identificar por el uso de sondas de oligonucleótidos específicas para cada paciente por RQ-PCR.<sup>32</sup>

Lamentablemente, la mayoría de translocaciones que ocurren en LAL son ampliadas sobre múltiples secuencias y su identificación precisa es bastante compleja. No obstante, el Grupo de Marschalek fue capaz de desarrollar un único normalizado enfoque para identificar la inmensa mayoría de las fusiones de corte en la diversidad de la participación de las translocaciones de cromosomas del gen MLL en el cromosoma 11q23. El ADN de interrupción de la fusión del gen MLL mostró ser muy específico y sensible por RQ-PCR para detección de EMR así como los marcadores de los rearrreglos MLL tanto en LAL infantil y de adultos.<sup>33, 34</sup>

Tales enfoques basados en puntos de corte de ADN precisos para la identificación de EMR y su vigilancia debe estar desarrollado idealmente para subgrupos específicos de LAL con translocaciones específicas de los cromosomas.

### **Cuantificación de RQ-PCR de regiones de unión de Ig y rearrreglos del gen TCR**

La detección y cuantificación por RQ-PCR de regiones de unión clonales de inmunoglobulinas Ig y rearrreglos del gen TCR esta lejos, de ser el método más ampliamente empleado como estrategia para la detección de EMR en la vigilancia en LAL.

La detección de EMR por este método es más laborioso, costoso y consume más tiempo, es el más reproducible no sólo en un mismo laboratorio, sino también entre los diferentes laboratorios.

Las regiones de unión de Ig y los rearrreglos del gen TCR son secuencias como huellas digitales de cada célula linfocítica maligna y pueden ser identificados en la vasta mayoría de los pacientes con LAL usando sets de primers estandarizados establecidos por los Consensos Europeos con el BIOMED-1 y BIOMED-2.<sup>35-37</sup>

Los estudios inmunológicos han identificado y han presentado oligoclonalmente la evolución clonal de rearrreglos de los genes de Ig/TCR entre el diagnóstico y la recaída.<sup>38-42</sup> Por lo tanto, es ampliamente aceptado preferentemente por lo menos dos mediciones de rearrreglos del gen Ig/TCR por paciente.

Aunque inicialmente los estudios empleados para la detección semicuantitativa de EMR revelaron importantes resultados,<sup>5,8,43</sup> la introducción de RQ-PCR fue un gran paso hacia la más amplia difusión de este método.<sup>21, 44</sup>

Van der Velden et al.<sup>46</sup> presenta la interpretación de RQ-PCR y la vigilancia por rearreglos de los genes de Ig / TCR para la detección de EMR basados en la experiencia de 30 laboratorios que forman el Grupo de Estudio Europeo sobre la detección de EMR en LAL (ESG-MDR-ALL).

Esta iniciativa internacional se ha traducido en la mejora significativa de los niveles, las definiciones y directrices para la detección por RQ-PCR de EMR a través de rearreglos de genes de Ig / TCR. Sobre la base de una amplia experimentación, este estudio claramente estableció las definiciones de positividad para EMR y rangos cuantitativos para EMR, en el que los niveles de EMR puede expresarse en una forma reproducible.

Como se muestra en informes anteriores, el intervalo cuantitativo suele ser hasta  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ , dependiendo del tipo de rearreglos de los genes y del tamaño del sitio de regiones de unión.

Otra directriz importante concierne a las guías de discriminación entre baja positividad de EMR fuera del rango cuantitativo con resultados falsos positivos de la amplificación inespecífica de fondo. Evidentemente, algunos rearreglos de unión de los genes de Ig / TCR (en particular de TCRG), aunque único para un paciente en particular, son tan similares a reordenamientos en el repertorio normal Ig / TCR con amplificación inespecífica que pudiera producirse en linfocitos no leucémicos a bajo o incluso niveles moderados. Por lo tanto, la sensibilidad de EMR de este método no es fácil de seguir mejorando. Consciente de esto, los estudios que demuestran frecuente positividad para EMR en la remisión de las muestras de los niños con LLA con niveles de  $10^{-7}$  deben interpretarse con extrema precaución.

Por último, dentro del análisis de estos estudios contiene nuevos criterios para la interpretación RQ-PCR, que se tienen que tener en cuenta si el protocolo clínico tiene como objetivo la intensificación de tratamiento o reducción del mismo.

Como conclusión las directrices de ESG-MDR-LAL para la interpretación de EMR por RQ-PCR permitirá una interpretación uniforme entre los diferentes laboratorios plenamente justificada.<sup>46</sup>

### **Elección de la técnica para la detección de EMR**

Las tres principales técnicas para la detección de EMR proporcionan información de EMR aparentemente con niveles idénticos. Sin embargo, mientras que la citometría de flujo se basa en la expresión de la proteína, la fusión de los genes generalmente detecta los niveles de ARN mensajero, y los rearrreglos de Ig / TCR por RQ-PCR se muestran a nivel del DNA.

Como se resume en la Tabla 2, las tres metodologías también difieren en su sensibilidad y aplicabilidad. Por lo tanto, los datos obtenidos en la detección de EMR con diferentes técnicas son casi intercambiables. Un solo centro estudios afirmó que los resultados de detección de EMR por citometría de flujo y PCR por rearrreglos específicos de los genes de Ig / TCR son comparables en gran medida.<sup>46,47</sup>

De hecho, en un 70-80% de las mediciones de EMR muestra niveles de  $10^{-3}$  ambas técnicas parecen dar resultados comparables ( $\leq 3$  de diferencia). Sin embargo, en las muestras con los niveles de EMR  $\leq 10^{-3}$ , se han encontrado muchas discrepancias entre las dos técnicas, lo que dificulta el reconocimiento de los pacientes de bajo riesgo. Por consiguiente, el uso de diferentes técnicas para la medición de EMR en un paciente dentro de un mismo protocolo de tratamiento debe evitarse.<sup>48,49,50</sup>

TABLA 2

|   | CITOMETRIA DE FLUJO INMUNOFENOTIPOS ABERRANTES  | ANALISIS DE ABERRACIONES CROMOSOMICAS POR PCR  | PCR análisis de Ig / genes (representan una región específica)  |
|---|---|--|---|
| DETECCIÓN                               | $10^3 - 10^4$   | $10^4 - 10^6$  | $10^1 - 10^5$   |
| APLICABILIDAD                           |   |  |   |
| Precursor B-ALL                         | >95%  | 40-45%   | 90-95%  |
| T-ALL                                   | >95%  | 15-35%   | 90-95%  |
| VENTAJAS                                | Aplicable en más pacientes<br>Relativamente barato<br>Rápido: 1-2 días  | Relativamente fácil y barato.<br><br>Sensible y específico de leucemia<br><br>Objetivo estable durante el curso de la enfermedad.<br><br>Rápido: 2 a 3 días.<br><br>Adecuado para la vigilancia de un grupo uniforme de pacientes (ej. BCR-ABL + LAL) <sup>a,b</sup>   | Aplicable para casi todos los pacientes.<br>IGH, IGK y reordenamiento del gen TCR son utilizados como objetivos.<br><br>Sensible y específica del paciente.<br><br>Rápida durante el seguimiento: 2-3 días.<br>(Si la región de unión es identificada y si se utiliza RQ-PCR)   |
| DESVENTAJAS                             | Limitada capacidad de detección.<br>Necesidad de preferencia de dos inmunofenotipos aberrantes por paciente, debido a la posibilidad de virar del inmunofenotipo<br><br>Los fármacos inducen la modulación del Inmunofenotipo que pueden influir en los niveles de expresión antigénica | Útil en sólo una minoría de los pacientes<br>No paciente-específicos puede haber contaminación de los productos de la PCR dando lugar a falsos positivos (incluso al diagnóstico)<br>Las diferencias en la transcripción de fusión y los niveles de expresión entre los pacientes y la estabilidad de la fusión de la transcripción de genes disminuye con el tiempo | Tiempo en el momento del diagnóstico:<br>Identificación de las regiones y las pruebas de sensibilidad<br><br>Relativamente caro<br><br>Es necesario de preferencia dos tomas de PCR por paciente, debido a la posibilidad de evolución clonal<br>Dos objetivos sensibles $\leq 10^4$ disponible en cerca del 80% de los pacientes |
| DESARROLLOS RECIENTES Y ESTANDARIZACION | $\geq 6$ fluorocromos en la citometría promete un aumento de la sensibilidad y especificidad; actualmente con el desarrollo del Consenso Europeo EuroFlow   | En gran medida gracias a la normalización de la colaboración europea de BIOMED-1 (detección de la transcripción de genes de fusión) y el proyecto EAC (RQ-PCR).<br>Métodos de identificación de la interrupción de los genes de fusión en el DNA proporciona al paciente los objetivos concretos.  | El objetivo de estandarizar la identificación dentro de las redes de la Unión Europea con BIOMED-1 y BIOMED-2 para la detección de MRD por RQ-PCR estandarizadas por el Estudio Europeo del Grupo de la detección de EMR en LAL (ESG-MDR-ALL).  |

a. En leucemia infantil particularmente a t(12;21) (TEL-AML1) y en adultos particularmente t(9;22)(BCR-ABL)

b. Esto concierne a la delección del(1)(p32 p32) con la fusión del gen SIL-TAL1 y con expresión aberrante HOX11L2, ocurriendo juntas en 25 a 35% de los niños con LAL de cel T y de 15 a 20% de los adultos con LAL.

Además de valorarse sensibilidad, especificidad de los tres métodos para obtener un resultado más concreto (positivo o negativo) según la presencia o ausencia de EMR se midió razón de verosimilitudes (LR) ofreciendo la ventaja que relaciona sensibilidades y especificidad de una prueba en un solo índice permitiendo utilizarlo como índice de comparación entre las diferentes pruebas.

Encontrándose así que los valores de LR + para la prueba de detección de EMR por rreareglos de Ig y TCR por RQ-PCR fueron mayores a 10 en todos los estudios excepto en Brisco et al 2001, considerándose que esta prueba es capaz de generar cambios importantes y concluyentes. En Brisco et al 2001, con LR+ de 1.37.

En la detección de EMR asociado a la fusión de genes y translocaciones cromosómicas por PCR con LR+: 3.38 y LR-: 0.16, considerándose con cambios pequeños y pocas veces importantes referido por Van del Velden VHJ 2002.

En el método por citometría de flujo para la detección de EMR LR+: 1.7 a 12.1 siendo el valor más alto medido en Robillard et al 2005, encontrándose que este método genera cambios moderados entre las probabilidades antes y después de la realización de la prueba.

## CONCLUSIONES

### ¿Cuál sería el futuro de los estudios de EMR en LAL?

La historia de la detección de EMR es uno de los ejemplos más interesantes de investigación internacional, en donde se complica la investigación básica que es transferida a la alta tecnología del diagnóstico por laboratorios.

Es sin duda que la detección EMR deberá incluirse en todos protocolos de tratamiento de LAL, ya que la EMR proporciona datos hasta el momento que la mayoría presentan *in vivo* de la respuesta al tratamiento, que da al clínico un mejor conocimiento y control en los distintos pacientes.

No esta lejos de asumir que como la medicina individualizada finalmente se traduce en mejores resultados para los pacientes. Esto ya es evidente en el caso en los pacientes con LAL de alto riesgo, y en particular los que se someten a TCHP alogénico siendo demostrado en las cohortes de pacientes.

La introducción de nuevos métodos, orientados a crear tratamientos específicos así como aplicaciones adicionales en la monitorización de EMR junto con los esfuerzos de colaboración internacional que son necesarios para garantizar que todos los laboratorios de diagnóstico para EMR hablen el mismo idioma.

Por lo anterior y en base a esta revisión sistemática se puede concluir que:

1. El método más sensible y específico para la determinación de enfermedad mínima residual es el reordenamiento clonal de Ig y TCR por RQ-PCR.
2. Es necesario realizar dos tomas por paciente para la determinación de enfermedad mínima residual por el método de reordenamiento clonal de Ig y TCR por RQ-PCR debido a la posibilidad de evolución clonal.

3. El método que se encuentra limitado a una cantidad menor de pacientes por su aplicabilidad es RQ-PCR asociada a la fusión de genes y translocaciones cromosómicas.
4. El método con mayor aplicabilidad, rápido y de menor costo es la detección de inmunofenotipos aberrantes por citometría de flujo.
5. El método de detección de inmunofenotipos aberrantes por citometría de flujo es más sensible y específico si se realiza con 6 fluorocromos y estandarizado con las técnicas del Consenso Europeo EuroFlow.
6. Se debe estandarizar la prueba de detección de enfermedad mínima residual por reordenamiento clonal de Ig y TCR por RQ-PCR por medio del Consenso de la Unión Europea con BIOMED-1 y BIOMED-2 y por el Estudio Europeo del Grupo de la detección de MRD en LAL (ESG-MDR-ALL).

## **POTENCIAL CONFLICTO DE INTERÉS**

Los autores de los artículos revisados no declaran potencial conflicto de interés. Los autores de la presente revisión declaran que no tienen ningún patrocinio por parte de los laboratorios y tampoco ninguno de los autores es autor de algún estudio aquí incluido.

## **FUENTES DE FINANCIACIÓN**

### **Recursos externos**

- Ninguno

### **Recursos internos**

- Ninguno

## BIBLIOGRAFIA

### ARTICULOS INCLUIDOS

- I. Neale GAM, Coustan-Smith E, Pan Q, Chen X, Gruhn B, Stow P, FG Behm FG, Pui C-H and Campana D. Tandem application of flow cytometry and polymerase chain reaction for comprehensive detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1999; 13, 1221–1226.
- II. Brisco MJ, Sykes PJ, Hughes E, Neoh S-H, Snell LE, Dolman G, Peng L-M, Toogood IRG, Cheney K, Rice MS, Story CJ and Morley AA. Comparison of methods for assessment of minimal residual disease in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2001; 15, 385–390.
- III. Dworzak MN, Fröschl G, Printz D, Mann G, Pötschger U, Mühlegger N, Fritsch G, and Gadner H, for the Austrian Berlin-Frankfurt-Münster Study Group. Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002; 99: 1952-58.
- IV. Van der Velden VHJ, Wijkhuijs JM, Jacobs DCH, Van Wering ER, Van Drogen JJM. T cell receptor gamma gene rearrangements as targets for detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia by real-time quantitative PCR analysis. *Leukemia* 2002; 16: 1372-1380.
- V. Szczepanski T, Willemsse MJ, Brinkhof B, Van Wering ER, Van der Burg M, and Van Dongen JJM. Comparative analysis of Ig and TCR gene rearrangements at diagnosis and at relapse of childhood precursor-B-ALL provides improved strategies for selection of stable PCR targets for monitoring of minimal residual disease. *Blood*. 2002;99:2315-2323.
- VI. Borowitz MJ, Pullen DJ, Shuster JJ, Viswanatha D, Montgomery K, Willman CL and Camitta B. Minimal residual disease detection in childhood precursor-B-cell acute lymphoblastic leukemia: relation to

- other risk factors. A Children's Oncology Group study. *Leukemia* 2003; 17, 1566–1572.
- VII. Malec M, Van der Velden VHJ, Bjorklund E, Wijkhuijs JM, Soderha S, Mazur J, Bjorkholm M and Porwit-MacDonald A. 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.
- VIII. Neale GAM, Coustan-Smith E, Stow P, Pan Q, Chen X, Pui C-H and Campana D. Comparative analysis of flow cytometry and polymerase chain reaction for the detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2004; 18: 934–938.
- IX. Kerst G, Kreyenberg H, Roth C, Well C, Dietz K, EConstan-Smith E, Campana D, Koscielniak E, Niemeyer Ch, Schlegel PG, Müller I, Niethammer D, and Bader P. Concurrent detection of minimal residual disease (MRD) in childhood acute lymphoblastic leukemia by flow cytometry and real-time PCR. *British Journal of Haematology*, 2005: 128, 774–782.
- X. Robillard N, Cavé H, Méchinaud F, Guidal C, Garnache-Ottou F, Rohrlich PS, Avet-Loiseau H, Garand R. Four-color flow cytometry bypasses limitations of IG/TCR polymerase chain reaction for minimal residual disease detection in certain subsets of children with acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2005; 90:1516-1523.

## BIBLIOGRAFIA

1. Rivera-Luna et al. Epidemiología del cáncer pediátrico en una institución. *Bol Med del Hosp Inf de Mex.* 1996, 53;(12);598-605
2. Fajardo-Gutierrez A, Mendoza-Sánchez, H, Valdez-Martínez E, Mejía Arangure M, Yamamoto-Kimura K, Mejía-Domínguez AM. Frecuencia de neoplasias malignas en niños atendidos en hospitales del Distrito Federal. Estudio Multicéntrico. *Bol Med Hosp Inf Mex.* 1996;53;57-66
3. Miller RW, Young JL, Novakovic B. Childhood Cancer. *Cancer*, 1995;75:395-405.
4. Szczepanski T, Orfao A, van der Velden VHJ, San Miguel JF, van Dongen JJM. Minimal residual disease in leukemia patients. *Lancet Oncol* 2001; 2: 409–417.
5. Hoelzer D, Gokbuget N, Ottmann O, Pui CH, Relling MVA, Appelbaum FR et al. Acute lymphoblastic leukemia. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2002, 162–192.
6. Szczepanski T, Flohr T, van der Velden VHJ, Bartram CR, van Dongen JJM. Molecular monitoring of residual disease using antigen receptor genes in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2002; 15: 37–57.
7. Cazzaniga G, Biondi A. Molecular monitoring of childhood acute lymphoblastic leukemia using antigen receptor gene rearrangements and quantitative polymerase chain reaction technology. *Haematologica* 2005; 90: 382–390.
8. Van Dongen JJM, Seriu T, Panzer-Grumayer ER, Biondi A, Pongers-Willemse MJ, Corral L et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet* 1998; 352: 1731–1738.
9. Cave H, van der Werff ten Bosch J, Suciú S, Guidal C, Waterkeyn C, Otten J et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 1998; 339: 591–598.

10. Coustan-Smith E, Behm FG, Sanchez J, Boyett JM, Hancock ML, Raimondi SC et al. Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 1998; 351: 550–554.
11. Nyvold C, Madsen HO, Ryder LP, Seyfarth J, Svejgaard A, Clausen N et al. Precise quantification of minimal residual disease at day 29 allows identification of children with acute lymphoblastic leukemia and an excellent outcome. *Blood* 2002; 99: 1253–1258.
12. Panzer-Grumayer ER, Schneider M, Panzer S, Fasching K, Gardner H. Rapid molecular response during early induction chemotherapy predicts a good outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000; 95: 790–794.
13. Coustan-Smith E, Sancho J, Behm FG, Hancock ML, Razzouk BI, Ribeiro RC et al. Prognostic importance of measuring early clearance of leukemic cells by flow cytometry in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002; 100: 52–58.
14. Knechtli CJ, Goulden NJ, Hancock JP, Grandage VL, Harris EL, Garland RJ et al. Minimal residual disease status before allogeneic bone marrow transplantation is an important determinant of successful outcome for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1998; 92: 4072–4079.
15. Eckert C, Biondi A, Seeger K, Cazzaniga G, Hartmann R, Proba J et al. Prognostic value of minimal residual disease in relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 2001; 358: 1239–1241.
16. Van der Velden VHJ, Joosten SA, Willemse MJ, van Wering ER, Lankester A, van Dongen JJM et al. Real-time quantitative PCR for detection of minimal residual disease before allogeneic stem cell transplantation predicts outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2001; 15: 1485–1487.
17. Bader P, Hancock J, Kreyenberg H, Goulden NJ, Niethammer D, Oakhill A et al. Minimal residual disease (MRD) status prior to allogeneic stem cell

- transplantation is a powerful predictor for post transplant outcome in children with ALL. *Leukemia* 2002; 16: 1668–1672.
18. Krejci O, van der Velden VHJ, Bader P, Kreyenberg H, Goulden N, Hancock J et al. Level of minimal residual disease prior to haematopoietic stem cell transplantation predicts prognosis in paediatric patients with acute lymphoblastic leukaemia: a report of the Pre-BMT MRD Study Group. *Bone Marrow Transplant* 2003;32: 849–851.
  19. Coustan-Smith E, Gajjar A, Hijjiya N, Razzouk BI, Ribeiro RC, Rivera GK et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia after first relapse. *Leukemia* 2004; 18: 499–504.
  20. Bruggemann M, Raff T, Flohr T, Gokbuget N, Nakao M, Droese J et al. Clinical significance of minimal residual disease quantification in adult patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2006; 107: 1116–1123.
  21. Campana D. Determination of minimal residual disease in leukemia patients. *Br J Haematol* 2003; 121: 823–838.
  22. Szczepanski T, van der Velden VH, van Dongen JJM. Flowcytometric immunophenotyping of normal and malignant lymphocytes. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44: 775–796.
  23. Van der Velden VHJ, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepan'ski T, Gabert J, Van Dongen JJM. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* 2003; 17: 1013–1034.
  24. Gaipa G, Basso G, Maglia O, Leoni V, Faini A, Cazzaniga G et al. Drug-induced immunophenotypic modulation in childhood ALL: implications for minimal residual disease detection. *Leucemia* 2005; 19: 49–56.
  25. Van der Sluijs-Gelling AJ, van der Velden VHJ, Roeffen ETJM, Veerman AJP, van Wering ER. Immunophenotypic modulation in childhood precursor-B-ALL can be mimicked in vitro and is related to the induction of cell death. *Leukemia* 2005; 19: 1845–1847.

26. Van Wering ER, Beishuizen A, Roeffen ET, van der Linden- Schrever BE, Verhoeven MA, Hahlen K et al. Immunophenotypic changes between diagnosis and relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1995; 9: 1523–1533.
27. Orfao A, López A, Flores J, Almeida J, Vidriales B, Perez J et al. Diagnosis of hematological malignancies: new applications for flow cytometry. *Hematology (EHA Educ Program)* 2006; 2: 6–13.
28. Van Dongen JJM, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999; 13: 1901–1928.
29. Gabert J, Beillard E, Van der Velden VHJ, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – a Europe Against Cancer program. *Leukemia* 2003; 17:2318–2357.
30. Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VH, Bi W, Dee R, van der Schoot E et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'realtime' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) – a Europe against cancer program. *Leukemia* 2003; 17: 2474–2486.
31. Arico M, Valsecchi MG, Camitta B, Schrappe M, Chessells J, Baruchel A et al. Outcome of treatment in children with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2000; 342: 998–1006.
32. Scheuring UJ, Pfeifer H, Wassmann B, Bruck P, Gehrke B, Petershofen EK et al. Serial minimal residual disease (MRD) analysis as a predictor of response duration in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph+ALL) during imatinib treatment. *Leukemia* 2003; 17: 1700–1706.

33. Wassmann B, Pfeifer H, Stadler M, Bornhauser M, Bug G, Scheuring UJ et al. Early molecular response to posttransplantation imatinib determines outcome in MRD+ Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph+ ALL). *Blood* 2005; 106: 458–463.
34. Gleissner B, Rieder H, Thiel E, Fonatsch C, Janssen LA, Heinze B et al. Prospective BCR-ABL analysis by polymerase chain reaction (RT-PCR) in adult acute B-lineage lymphoblastic leukemia: reliability of RT-nested-PCR and comparison to cytogenetic data. *Leukemia* 2001; 15: 1834–1840.
35. Meyer C, Schneider B, Jakob S, Strehl S, Attarbaschi A, Schnittger S et al. The MLL recombinome of acute leukemias. *Leukemia* 2006; 20: 777–784.
36. Burmeister T, Marschalek R, Schneider B, Meyer C, Gokbuget N, Schwartz S et al. Monitoring minimal residual disease by quantification of genomic chromosomal breakpoint sequences in acute leukemias with MLL aberrations. *Leukemia* 2006; 20: 451–457.
37. Pongers-Willems MJ, Seriu T, Stolz F, d'Aniello E, Gameiro P, Pisa P et al. Primers and protocols for standardized MRD detection in ALL using immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and TAL1 deletions as PCR targets. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999; 13: 110–118.
38. Van Dongen JJM, Langerak AW, Bruggemann M, Evans PAS, Hummel M, Lavender FL et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98- 3936. *Leukemia* 2003; 17: 2257–2317.
39. Szczepanski T, Van der Velden VHJ, Hoogeveen PG, de Bie M, Jacobs DC, van Wering ER et al. Vdelta2-Jalpha rearrangements are frequent in precursor-B-acute lymphoblastic leukemia but rare in normal lymphoid cells. *Blood* 2004; 103: 3798–3804.

40. Szczepanski T, Willemse MJ, van Wering ER, Weerden JF, Kamps WA, van Dongen JJM. Precursor-B-ALL with DH-JH gene rearrangements have an immature immunogenotype with a high frequency of oligoclonality and hyperdiploidy of chromosome 14. *Leukemia* 2001; 15: 1415–1423.
41. De Haas V, Verhagen OJ, von dem Borne AE, Kroes W, van den Berg H, van der Schoot CE. Quantification of minimal residual disease in children with oligoclonal B-precursor acute lymphoblastic leukemia indicates that the clones that grow out during relapse already have the slowest rate of reduction during induction therapy. *Leukemia* 2001; 15: 134–140.
42. Germano G, del Giudice L, Palatron S, Giarin E, Cazzaniga G, Biondi A et al. Clonality profile in relapsed precursor-B-ALL children by GeneScan and sequencing analyses. Consequences on minimal residual disease monitoring. *Leukemia* 2003; 17: 1573–1582.
43. Szczepanski T, Van der Velden VHJ, Raff T, Jacobs DC, van Wering ER, Bruggemann M et al. Comparative analysis of T-cell receptor gene rearrangements at diagnosis and relapse of T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) shows high stability of clonal markers for monitoring of minimal residual disease and reveals the occurrence of second T-ALL. *Leukemia* 2003; 17: 2149–2156.
44. Brisco MJ, Condon J, Hughes E, Neoh SH, Sykes PJ, Seshadri R et al. Outcome prediction in childhood acute lymphoblastic leukaemia by molecular quantification of residual disease at the end of induction. *Lancet* 1994; 343: 196–200.
45. Pongers-Willemse MJ, Verhagen OJHM, Tibbe GJM, Wijkhuijs JM, De Haas V, Roovers E et al. Real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using junctional regions specific TaqMan probes. *Leukemia* 1998; 12: 2006–2014.
46. Van der Velden VHJ, Cazzaniga G, Schrauder A, Hancock J, Bader P, Panzer-Grumayer R et al. Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR

- gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia* 2007; 21, (in press).
47. Malec M, Björklund E, Söderhall S, Mazur J, Sjogren AM, Pisa P et al. Flow cytometry and allele-specific oligonucleotide PCR are equally effective in detection of minimal residual disease in ALL. *Leukemia* 2001; 15: 716–727.
  48. Graux C, Cools J, Michaux L, Vandenberghe P, Hagemeijer A. Cytogenetics and molecular genetics of T-cell acute lymphoblastic leukemia: from thymocyte to lymphoblast. *Leukemia* 2006; 20: 1496–1510.
  49. Björklund, Manssur J, Söderhall S, Porwit-MacDonald A. Flow cytometric follow-up minimal residual disease in bone marrow gives prognostic information in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2003; 17:138-148.
  50. Szczepanski T. Why and how to quantify minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia? *Leukemia* 2007; 21:622-626.
  51. Van der Velden VHJ, Panzer-Grümayer ER, Cazzaniga G, Flohr T et al. Optimization of PCR- based minimal residual disease diagnostics for childhood acute lymphoblastic leukemia in a multi-center setting. *Leukemia* 2007; 21: 706-713.

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| DATOS DEL ESTUDIO             | Autor (y cols): Neale GAM , Coustan-Smith E, Pan Q, Chen X, Gruhn B, Stow P, Behm FG, Pui C-H and Campana D.<br>Artículo: Tandem application of flow cytometry and polymerase chain reaction for comprehensive detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia<br>Journal: Leukemia 1999; 13, 1221–1226.  |
| DISEÑO DEL ESTUDIO            | Cohorte.  |
| PARTICIPANTES                 | 52 pacientes recién diagnóstico LAL (13 linaje T y 39 de linaje B) con remisión morfológica la final de la inducción. CF fue valorada en 13 casos de linaje T y en 29 de los 39 de linaje B. Los restantes 10 no expresaron inmunofenotipos valorables para EMR. PCR se uso en 35 de los 39 pacientes con linaje B, no en los de linaje T. Los 52 pacientes se valoraron al menos por 1 métodos. MO tomadas al diagnostico, al final de la inducción a la remisión, en la semana 6 y 10 de seguimiento.             |
| TAMAÑO DE LA MUESTRA          | 52 niños con 62 MO.   |
| INTERVENCIONES                | Se analizo por CF con Cell Quest software y medición de rearrreglos de genes por amplificación de PCR presentes al diagnóstico usando los primers de consenso región-V primers FR-1C o FR-2B en conjunto con el primer universal JH, además de TCR (receptor de célula T) y los genes $\gamma$ y $\delta$ . Ambas con diluciones seriadas con células KOPN-57bi mezcladas para valorar sensibilidad de ambos métodos.   |
| RESULTADOS                    | Ausencia de LAL por criterios morfológicos, 12 de 62 muestras contenian $\geq 1$ célula leucémica. La proporción de células leucémicas en estos casos vario de 0.01% a 19% de células mononucleares por CF y de 0.023% a 23% por PCR. El resto de las 50 muestras, 48 habian tenido al menos 1 en $10^4$ células leucémicas o no detectables para leucemia por ambas técnicas. En solo 2 muestras los resultados fueron discordantes: 2 en $10^4$ y 5 en $10^4$ células leucémicas por PCR y $<1$ en $10^4$ por CF. |
| NOTAS                         | Detección de 1 en $10^4$<br>FC: $r^2$ : 0.999<br>PCR: $r^2$ 0.960<br>Con una concordante de $r^2$ : 0.962.<br>La correlación entre ambos métodos $r^2$ : 0.978.<br>CONCLUSION: CF y PCR son técnicas que pueden utilizarse como monitoreo universal de EMR en niños con LAL.  |
| NIVEL DE GRADIENTE CIENTIFICO | B   |

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| DATOS DEL ESTUDIO             | <p>Autor (y cols) : Brisco MJ, Sykes PJ, Hughes E, Neoh S-H, Snell LE, Dolman G, Peng L-M, Toogood IRG, Cheney K, Rice MS, Story CJ and Morley AA.</p> <p>Artículo: Comparison of methods for assessment of minimal residual disease in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia<br/>Journal: Leukemia 2001: 15, 385-390</p>  |
| DISEÑO DEL ESTUDIO            | Cohorte   |
| PARTICIPANTES                 | 38 niños con el diagnóstico de LAL de linaje B con cromosoma philadelphia negativo, 1 a 15 años de edad, tratados y en seguimiento hasta la recaída o por un periodo mínimo de 5 años.  |
| TAMAÑO DE LA MUESTRA          | 38 niños con LAL linaje B.  |
| INTERVENCIONES                | <p>Medida del porcentaje de blastos en MO al diagnóstico, al día 14 y día 35, por expertos morfológicos.</p> <p>Detección de monoclonalidad con rearreglos de inmunoglobulinas de cadenas pesadas y el receptor de células T (TCRgamma) por PCR para medir EMR al día 14 y 35.</p>  |
| RESULTADOS                    | <p>De los 38 pacientes, 16 recaídas, 11 de estas recaídas a MO, 3 a testículo y 2 a SNC únicamente.</p> <p>La monoclonalidad de IgH y/o rearreglos de TCR fueron detectados en 34 de los 38 pacientes (89%).</p> <p>La medición del porcentaje de blastos al día 14 o detección de monoclonalidad no tuvo utilidad diagnóstica., y al día 35, 5 de los 27 pacientes con EMR positiva (<math>&gt;10^{-3}</math>), 4 presentaron recaída a MO y 22 con EMR (<math>&lt;10^{-3}</math>), presentaron 8 recaída (36%), 4 a MO, 2 a SNC y 2 a testículo. Las recaídas a MO, la diferencia entre EMR <math>&gt;10^{-3}</math> y <math>&lt;10^{-3}</math> fue significativa (<math>P=0.010</math>).</p> <p>Un valor positivo al final de la inducción (día 35) tiene un alto valor pronóstico.</p> <p>Parte de la realización de PCR depende de la calidad de extracción del DNA.</p> |
| NOTAS                         | <p>Detección de PCR: <math>&gt;10^{-3}</math></p> <p>Valor PP: 67% con una sensibilidad de 40%.</p>   |
| NIVEL DE GRADIENTE CIENTIFICO | B   |

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| DATOS DEL ESTUDIO             | Autor (y cols) : Dworzak MN, Fröschl G, Printz D, Mann G, Potschger U, Mühlegger N, Fritsch G, and Gadner H, for the Austrian Berlin-Frankfurt-Münster Study Group.<br>Artículo: Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia.<br>Journal: Blood 2002; 99: 1952-58.   |
| DISEÑO DEL ESTUDIO            | Cohorte   |
| PARTICIPANTES                 | 139 niños con ALL en Tx con BFM 95. 108 de estos pacientes al diagnóstico y durante el seguimiento se realizaron tomas de muestras al día 15, 33, semana 12, semanas 22 a 24. Edad (0.08-17.08 años) . 101 pacientes con LAL de linaje B, 5 pro-B, 67 común, y 28 pre-B y 8 pacientes con LAL células T (7.4%). La media de observación de tiempo fue de 40 meses.  |
| TAMAÑO DE LA MUESTRA          | 108 niños con LAL. (MO: 329 muestras)   |
| INTERVENCIONES                | Se les realizó CF con FACSCalibur (al día 15, 33, semana 12 y semana de la 22 -24).   |
| RESULTADOS                    | La proporción de muestras con EMR positiva fue más alta en el día 15 (89.1%) y disminuye a 40.9% al día 33, 13.7% a la semana 12 y 4.3% a las semanas 22 a 24.<br>33 de los 108 con recaída durante el seguimiento.<br>La presencia de EMR al día 33 fue asociado a una alta probabilidad de recaída ( $P=0.24$ ) al igual que a la semana 12 y semana 22 a 24 ( $P<.001$ para ambas correlaciones), pero no al día 15. |
| NOTAS                         | La medición absoluta de EMR por CF tuvo variaciones dependiendo de la cuenta de células nucleadas entre las muestras, la regeneración de las células B inmaduras después de periodos de reposo en el tratamiento limitan la sensibilidad de la prueba por CF. Es un fuerte e independiente indicador de resultados de EMR.  |
| NIVEL DE GRADIENTE CIENTIFICO | B   |

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| DATOS DEL ESTUDIO             | Autor ( y cols) : Van der Velden VHJ, Wijkhuijs JM, Jacobs DCH, Van Wering ER, Van Dogen JJM.<br>Articulo: T cell receptor gamma gene rearrangements as targets for detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia by real-time quantitative PCR analysis.<br>Journal: Leukemia 2002; 16: 1372-1380.   |
| DISEÑO DEL ESTUDIO            | Cohorte.  |
| PARTICIPANTES                 | 17 niños con LAL precursor de cel B y 15 niños con LAL cel T. 12 de los 32 niños se obtuvieron muestras durante el seguimiento.   |
| TAMAÑO DE LA MUESTRA          | 32 niños, 17 niños con LAL precursor de cel B y 15 niños con LAL cel T.   |
| INTERVENCIONES                | Se determino identificación de EMR con rearrreglos del gen TCRG por RQ-PCR, todos usando sondas Taqman asi como combinación de primers usando alelos específicos con primer reversa V gamma y J gamma sondas taqman con una sensibilidad $10^{-4}$ .  |
| RESULTADOS                    | Se determino identificación de rearrreglos del gen TCRG por RQ-PCR, todos usando sondas Taqman asi como combinación de primers usando alelos específicos con primer reversa J gamma y J gamma sondas taqman con una sensibilidad $10^{-4}$ la cual fue obtenida en solo 4 de 19 pacientes (21%) de rearrreglos del gen en precursor de cel B y en 10 de 15 (67%) en pacientes con LAL cel T. La máxima sensibilidad de $\leq 10^{-4}$ fue obtenida en 42% de los rearrreglos de precursores de cel B. |
| NOTAS                         | Detección de RQ-PCR: $\leq 10^{-4}$ de 18 de 34 rearrreglos TCRG (53%) y fue $\leq 10^{-3}$ en 30 de los 34 casos (88%) y en 9 casos (26%) con una máxima sensibilidad de $10^{-5}$<br>El análisis del rearrreglo de los genes por RQ-PCR es aplicable en la mayoría de los pacientes con LAL de cel T y en casi la mitad de los pacientes con LAL de linaje B.   |
| NIVEL DE GRADIENTE CIENTIFICO | B   |

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| DATOS DEL ESTUDIO             | Autor (y cols) : Szczepanski T, Willemse MJ, Brinkhof B, Van Wering ER, Van der Burg M, and Van Dongen JJM.<br>Artículo: Comparative analysis of Ig and TCR gene rearrangements at diagnosis and at relapse of childhood precursor-B-ALL provides improved strategies for selection of stable PCR targets for monitoring of minimal residual disease<br>Journal: Blood. 2002;99:2315-2323.  |
| DISEÑO DEL ESTUDIO            | Cohorte.  |
| PARTICIPANTES                 | 96 niños con el diagnóstico de precursor de células B, con el diagnóstico inicial y a la recaída (91 pacientes) y 5 pacientes con leucemia mieloide secundaria (posterior a la recaída). (1m a 183meses edad)<br>Precursor de cel B: 6 (6%) pro-B, 59 (61.6%) LAL común y 31 (32%) con pre B.   |
| TAMAÑO DE LA MUESTRA          | 96 niños con el diagnóstico de precursor de cel B, con el diagnóstico inicial y a la recaída (91 pacientes) y 5 pacientes con leucemia mieloide secundaria (posterior a la recaída). Total: 192.  |
| INTERVENCIONES                | Se realizo tomo de PCR por southern blot para configuración de IGH, IGK y TCRD al diagnóstico y a la recaída en 89 pacientes y además se realizo la secuencia de rearreglos de gen es Ig y TCR  |
| RESULTADOS                    | Las bandas clonales Ig y TCR para detección de EMR se identificaron en 94 pacientes con un 71% de estos a la recaída. La mejor estabilidad fue encontrada en el rearreglo IGK-K (90%) seguido por TCRG (75%) y IGH (64%) con un rearreglo incompleto TCRD (63%). La combinación de ambos métodos Southern blot y PCR para IGH, IGK.Kde y TCRD mostró diferencias significativas en la recaída entre los rearreglos monoclonales y oligoclonales: 59% versus 40% respectivamente. En 38% de los pacientes con EMR por PCR positiva se preservaron en la recaída y en 22% (10 casos) no se presentaron los mismos rearreglos. |
| NOTAS                         | Estrategias para monitorizar EMR durante el tratamiento y recaída. Usando el método por PCR para rearreglos del gen Ig/TCR siendo efectivo en 97% a 98% para la detección, teniendo menor efectividad por el método de southern blot.   |
| NIVEL DE GRADIENTE CIENTIFICO | B   |

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| DATOS DEL ESTUDIO             | Autor (y cols) : Borowitz MJ, Pullen DJ, Shuster JJ, Viswanatha D, Montgomery K, Willman CL and Camitta B.<br>Artículo: Minimal residual disease detection in childhood precursor-B-cell acute lymphoblastic leukemia: relation to other risk factors. A Children's Oncology Group study<br>Journal: Leukemia 2003; 17, 1566-1572.  |
| DISEÑO DEL ESTUDIO            | Cohorte   |
| PARTICIPANTES                 | 1016 niños con el diagnóstico LAL precursor cel B, dentro del protocolo de Childrens Oncology Group. (POG 9900)   |
| TAMAÑO DE LA MUESTRA          | 1016 niños  |
| INTERVENCIONES                | Citometría de flujo, por 4 fluorocromos FACSCalibur, y RQ-PCR para las traslocaciones más comunes en pediatría t (1:19)/E2A-PBX1, t(12:21)/TEL-AML1, t(9:22)/BCR-ABL, t(4:11)/MLL-AF4).   |
| RESULTADOS                    | 225 de los 1016 (22.1%) con MO con EMR >0.01% al final de la inducción. Un total de 129 de 1016 (12.7%) pacientes tenían niveles mayores de 0.1%.<br>18 pacientes con Ph+ALL, 16 (89%) positivos con niveles mayores 0.1%, 5 de 38 pacientes (13.2%) con E2A-PBX1 con EMR y 4 de los 5 con niveles mayores 0.1%.<br>Solo 8.2% de los pacientes con TEL-AML1 tuvieron EMR positiva mayor de 0.01% comparado con 20.3% de los pacientes con trisomías del cromosoma 4 o 10. |
| NOTAS                         |   |
| NIVEL DE GRADIENTE CIENTIFICO | B   |

|                      |  |
|----------------------|--|
| DATOS DEL ESTUDIO    | <p>Autor (y cols): Malec M, Van der Velden VJH, Bjorklund E, Wijkhuijs JM, Soderha S, Mazur J, Bjorkholm M and Porwit-MacDonald A.<br/> Artículo: 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.<br/> Journal: Leukemia 2004; 18: 1630-1636.</p>   |
| DISEÑO DEL ESTUDIO   | Cohorte  |
| PARTICIPANTES        | 22 niños (6m a 13*) con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda con los criterios morfológicos acorde a la clasificación de WHO y los criterios de EGIL. 2 pacientes con LAL-T y 20 LAL precursor-B. De estos 11 tratados de acuerdo al protocolo NOPHO-92 y 11 con el protocolo NOPHO-2000.   |
| TAMAÑO DE LA MUESTRA | Total de 93 médulas óseas (22 obtenidas al diagnóstico y 71 durante el seguimiento) de 22 niños con leucemia linfoblástica aguda.  |
| INTERVENCIONES       | Se analizó EMR usando inmunofenotipo por CF ( de acuerdo a consenso BIOMED-1) usando 3 y 4 fluorocromos y RQ-PCR usando TCRD, TCRG, IGH e IGK como marcadores moleculares con sondas Taq-man y primers consensados.  |
| RESULTADOS           | <p>Al diagnóstico, 48 rearrreglos de genes IG/TCR fueron encontrados en los 22 pacientes con LAL: 19 IGH, 12 IGK-kde, 11 TCRG y 6 TCRD. De estos 17 pacientes con 2 más mediciones y 5 con una medición.</p> <p>Se comparo la determinación de EMR por CF y análisis RQ-PCR de 71 muestras de MO como seguimiento, 34 de las 71 (47%) tomadas durante los primeros 3 meses de tratamiento.</p> <p>Se encontró aberrante fenotipo por CF en 24 pacientes (34%) con niveles de EMR 0.006-30% y por RQ-PCR la detección en 38 (54%). 13 de estas 38 los niveles fuera de rangos cuantitativos y en las restantes 25 con niveles de 0.0024-68%. 19 muestras de 6 pacientes se les realizó doblemente medición de RQ-PCR, los resultados fueron concordantes en 16 de las 19 (84%) y 3 discordantes con niveles de EMR 0.001-0.02% (cuantitativo <math>10^{-4}</math> y <math>10^{-5}</math>).</p> <p>La concordancia entre CF y RQ-PCR fue dependiente del corte de la toma de la muestra y el tiempo de tratamiento.</p> <p>En un nivel de corte de 0.1%, 94% de las muestras con resultados concordantes, con un nivel de corte de 0.01%, 89% y solo 72% con un nivel de corte de 0.001%.</p> <p>No se detecto EMR usando ambos métodos en 30 muestras (42%).</p> <p>Se encontraron diferencias significativas entre los 2 métodos (Cohen's kappa test <math>k:0.449</math>, <math>P&lt;0.001</math>). En 19 muestras fueron cuantificadas positivamente por ambos métodos con coeficiente de correlación de Pearson: <math>r=0.793</math> <math>P&lt;0.01</math>. Los niveles de EMR por CF fueron considerablemente más altos que por análisis de RQ-PCR (0.04 vs 0.0024% y 0.8 vs 0.02%).</p> |
| NOTAS                | <p>Detección de IG/TCR por RQ-PCR: <math>10^{-4}</math><br/> Detección por CF: al menos <math>10^{-4}</math></p> <p>CF cuantifica las células viables que expresan inmunofenotipos aberrantes, con una sensibilidad <math>10^{-4}</math> depende del número de células analizadas y del tipo de inmunofenotipo aberrante. Para una sesibilidad de 0.01% al menos 200,000- 500,000 células deben ser analizadas.</p> <p>RQ-PCR cuantifica el rearrreglo de los genes IG/TCR y generalmente</p>  |

|                                      |  |
|--------------------------------------|--|
|                                      | <p>con una sensibilidad de <math>10^{-3}</math> con un rango cuantitativo de <math>10^{-4}</math>.<br/>         La sensibilidad de RQ-PCR es mayor que CF.<br/>         La concordancia por ambos métodos en nuestro estudio fue dependiente del nivel de corte de las mediciones.<br/>         La aplicación de múltiples combinaciones de ac y la aplicación de 6 fluorocromos en CF puede reducir los falsos-negativos.<br/>         Para reducir el riesgo de falsos-negativos por RQ-PCR preferiblemente deben de usarse 2 rearrreglos de genes IG/TCR, por la probable existencia clona diferente (evolución clonal) la cual se ha demostrado en 30% de los pacientes entre el diagnóstico y la recaída.</p> |
| <p>NIVEL DE GRADIENTE CIENTIFICO</p> | <p>B</p>   |

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| DATOS DEL ESTUDIO             | Autor (y cols): Neale GAM, Coustan-Smith E, Stow P, Pan Q, X Chen, Pui C-H and Campana D.<br>Artículo: Comparative analysis of flow cytometry and polymerase chain reaction for the detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia.<br>Journal: Leukemia 2004; 18: 934-938.   |
| DISEÑO DEL ESTUDIO            | Cohorte.   |
| PARTICIPANTES                 | 227 niños de edades <1 año a 18 años, con el diagnóstico de LAL de linaje B enrolados en St Jude estudios XIII, XIV y XV, con 1375 muestras de seguimiento (736 de MO y 639 de SP).  |
| TAMAÑO DE LA MUESTRA          | 227 niños con LAL linaje B, 1375 muestras de seguimiento (736 de MO y 639 de SP).  |
| INTERVENCIONES                | Se les realizó a las muestras análisis de EMR por CF con 4 combinación de fluorocromos y se identificaron rearrreglos de genes IgH usando el consenso primers región-V, FR-1C o FR-2B en conjunto con el primer universal J <sub>H</sub> . El uso de sondas Taqman se uso en 319 muestras.   |
| RESULTADOS                    | Se tomaron 1375 muestras de 227 pacientes con el diagnóstico de LAL de linaje B y a ambas muestras se les realizó por igual CF y PCR.<br>Para valorar la sensibilidad de EMR la detección de al menos 0.01% células por CF y 0.001% por PCR.<br>De las 1375 muestras, 129 de 61 pacientes fueron positivas para EMR y 1200 de 216 pacientes fueron negativas.<br>De las 129 positivas (≥0.01%) con rangos de 0.01 a 19% por CF y 0.023 a 51% por PCR.<br>En otras 28 muestras de 23 pacientes, EMR fue ≥0.01% por CF pero <0.01% por PCR. En 18 muestras de 14 pacientes, EMR fue ≥0.01% acorde a PCR pero <0.01% por CF. Los resultados fueron concordantes con EMR positiva o negativa en 1329 de 1375 muestras (96.7%).<br>La concordancia también fue evidente cuando se analizada MO o SP con muestras de 708 de 736 (96.2%) de MO y 621 de 639 (97.2%) de SP. Al igual que en la realización de la misma durante el tratamiento, 178 de 199 (89.4%) tomadas durante la inducción a la remisión, 394 de 410 (96.1%) al final de la IR, y 757 de 766 (98.8%) posremisión fueron concordantes.<br>De las 37 muestras discordantes en resultados de EMR (usando de parámetro 0.01%), por ambos métodos con una sensibilidad de al menos 0.001% en 34 de los 37 y en 19 muestras se estimó una diferencia menor de 1 log. |
| NOTAS                         | EMR en desacuerdo en solo 46 muestras de 1375 (3.3%) con un nivel para positividad de 0.01%.<br>CF: detección de 0.01%<br>PCR: detección de 0.001%.<br>Se pueden obtener falsos negativos por CF por cambios en el inmunofenotipo durante el tratamiento y en la PCR por la evolución clonal durante el curso de la enfermedad.  |
| NIVEL DE GRADIENTE CIENTIFICO | B  |

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| DATOS DEL ESTUDIO             | Autor ( y cols) : Kerst G, Kreyenberg H, Roth C, Well C, Dietz K, Constan-Smith D, Campana D, Koscielniak E, Niemeyer Ch, P G. Schlegel, I Müller, Niethammer D, and Bader P.<br>Artículo: Concurrent detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia by flow cytometry and real-time PCR<br>Journal: British Journal of Haematology, 2005; 128, 774–782.   |
| DISEÑO DEL ESTUDIO            | Cohorte.  |
| PARTICIPANTES                 | 45 niños (edades de 0.1 a 17.7a) con el diagnóstico de LAL , 37 de linaje B y 8 con linaje T. De los 45 pacientes se estudiaron 267 muestras de seguimiento.<br>105 de 30 pacientes se analizaron por CF y PCR simultáneamente y el resto 162 solo se analizaron por un método, 51 por CF y 111 por PCR.<br>De las 267 muestras, 144 se obtuvieron durante la primera línea de tratamiento y 36 en recaída con tratamiento y 87 posterior a TCHP.   |
| TAMAÑO DE LA MUESTRA          | 45 niños con el diagnóstico de LAL , 37 de linaje B y 8 con linaje T.   |
| INTERVENCIONES                | Se realizó CF con 4 fluorocromos con detección de al menos una célula leucémica en 10,000, con citocromo FACSCalibur.<br>RQ-PCR de regiones de Ig de cadenas pesadas [IGVH(1-5)-JH], cadenas kappa (IGVj-IV-Kde), receptor de cel T gamma (TCRVcl-IV-Jc), receptor de cel T delta [TCRVd(1-3)-Jd1; Vd2-Dd3; Dd2-Dd3; Dd2-Jd1] Los oligonucleótidos alelo-especificos se usaron una combinación de sondas Taqman y una línea reversa germinal.   |
| RESULTADOS                    | 33 de los 37 (89%) con LAL de linaje B con al menos un fenotipo anormal y 30 (81%) tuvieron 2 o más.<br>En 36 pacientes se entraron 2 o más (no mas de 4) arreglos monoclonales.<br>EMR fue cuantificable $\geq 0.01\%$ en 97 muestras, $\geq 0.1\%$ en 8 muestras consideradas positivas y por debajo de estos niveles o indetectable consideradas negativas. En 102 muestras (97.1%) ambos métodos fueron concordantes en sus resultados, medidos con la Kappa de Cohen: 0.94. Cuando el análisis se restringió a 87 muestras con valores por debajo de una detección microscópica de 5%, fueron concordantes con CF y PCR con una kappa de Cohen: 0.92. Solo 3 resultados fueron no concordantes.<br>La correlación de EMR estimada por ambas técnicas en 43 muestras fue positiva con una $r^2 = 0.889$ por análisis de regresión.<br>El panel de ac usados para EMR por CF para seguimiento fue de 90% para linaje B y 100% para linaje T. RQ-PCR fue aplicable a para 80% de los pacientes la detección de los rearreglos fue restringida por el panel de primers utilizados. |
| NOTAS                         | CF: detección de 0.01%<br>PCR: detección de 0.01%<br>Los estudios por CF pueden presentar falsos negativos por cambios en el inmunofenotipo durante el tratamiento y en la PCR por la evolución clonal durante el curso de la enfermedad.   |
| NIVEL DE GRADIENTE CIENTIFICO | B   |

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| DATOS DEL ESTUDIO             | Autor (y cols) : Robillard N, Cavé H, Méchinaud F, Guidal C, Garnache-Ottou F, Simon PR, Avet-Loiseau H, Garand R.<br>Artículo: Four-color flow cytometry bypasses limitations of IG/TCR polymerase chain reaction for minimal residual disease detection in certain subsets of children with acute lymphoblastic leukemia.<br>Journal: Haematologica 2005; 90:1516-1523.  |
| DISEÑO DEL ESTUDIO            | Cohorte.   |
| PARTICIPANTES                 | Se estudiaron 136 MO en remisión de 88 pacientes (7 menores de de 12 meses) con el diagnóstico de LAL , 76 LAL linaje B (incluidos 2 con CD10 negativo y 5 con t (4:11) ) y 12 de linaje T. 4 muestras adicionales de 3 pacientes con LAL cel T de otro centro hospitalario todos en tratamiento con el protocolo BFM. Con mediciones al final de la inducción (día 35+-5), y durante la consolidación (día 85+-25) en 85 y 55 pacientes respectivamente.  |
| TAMAÑO DE LA MUESTRA          | 91 pacientes, 140 muestras MO.   |
| INTERVENCIONES                | Se determino CF con 4 fluorocromos, con FASCalibur con el software Cell Quest Pro, y por PCR identificación de rearrreglos de IGK y combinaciones de Ig de cadenas pesadas, TCR delta y TCR gamma, con amplificación de los mismos.  |
| RESULTADOS                    | Se determinaron por ambos métodos PCR y CF 123 muestras con una concordancia de 119 de los 123 (97%).<br>Se observaron 4 resultados no concordantes entre PCR y CF. Con valores menores por CF pero por PCR solo en 1 de los casos. En 12 de 13 muestras de 9 pacientes con LAL linaje B CD10 y/o t (4:11) y niños con LAL cel T inmadura, EMR pudo ser determinada por CF pero no por PCR. Controversialmente, CF no fue apropiada para valorar a 3 niños incluyendo 2 de células T y si fueron valorables con PCR. |
| NOTAS                         | La presencia de falsos negativos por PCR o CF es muy baja. Y la CF es una prueba competitiva para PCR.   |
| NIVEL DE GRADIENTE CIENTIFICO | B  |