

# Enfermedad Mínima Residual por Citometría de Flujo en niños con Leucemia Linfoblástica Aguda

Soria Marcela<sup>1</sup>, Gailliard María<sup>2</sup>, Gutiérrez Marcela<sup>1</sup>,  
Morán Lorena<sup>1</sup>, Rivas Pereira Fernanda<sup>1</sup>,  
Prada Silvina<sup>1</sup>, Aversa Luis<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Hematología. <sup>2</sup>Servicio de Inmunología.  
Hospital de Niños "R. Gutiérrez". CABA. Argentina.

mail: megutierrezster@gmail.com



PEDIATRÍA

HEMATOLOGIA, Vol. 16 N° 1: 42-46  
Enero-Abril, 2012

## RESUMEN

La enfermedad mínima residual (EMR) es el método utilizado para la detección de blastos en pacientes morfológicamente en remisión completa. En pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), se considera un factor de riesgo independiente asociado con baja sobrevida libre de eventos (SLE). Desde enero de 2006 a diciembre de 2009 se evaluaron 84 pacientes pediátricos con diagnóstico de novo de LLA, tratados de acuerdo al protocolo ALLIC-BFM-GATLA 2002. El punto de corte utilizado para definir EMR positiva fue 0.01 %. Se encontró EMR positiva al día 15 en el 57.5 % de los pacientes correlacionándose la misma con alto recuento de glóbulos blancos al diagnóstico, alto riesgo, recaída y baja SLE y SG (Sobrevida Global). La EMR fue positiva al día 33 en el 13.3 % de los pacientes. Se correlacionó significativamente con alto recuento de glóbulos blancos al diagnóstico, fenotipo T, pobre respuesta al día 8, alto riesgo, recaída y baja SLE y SG. La EMR positiva en MO en los días 15 y 33 del tratamiento es una variable pronóstica independiente y significativa en la predicción de recaída en LLA pediátrica.

**Palabras clave:** Enfermedad mínima Residual (EMR), Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), Pediatría

## INTRODUCCIÓN

En las últimas 4 décadas se profundizó el conocimiento en la cinética de la respuesta temprana al tratamiento en pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) para predecir riesgo de recaída<sup>1</sup>. Sin embargo, 20-25% de los pacientes que inicialmente responden al tratamiento y morfológicamente no presentan blastos en médula ósea, recidivan durante el tratamiento o luego de finalizar del mismo<sup>1,2</sup>.

La presencia de enfermedad mínima residual (EMR) en LLA es un marcador pronóstico signifi-

cado para la detección temprana de recaídas<sup>2,3,4</sup>. La determinación de EMR se realiza por reacción de cadena de polimerasa (PCR) mediante la detección de rearrreglos de genes de receptor T y/o de inmunoglobulinas<sup>5,6</sup> y por citometría de flujo (CF)<sup>7</sup>. El principio de la CF está basado en que las células leucémicas expresan características inmunofenotípicas distintivas que permiten distinguirlas de las células hematopoyéticas normales<sup>11</sup>.

El inmunofenotipo asociado a leucemia se define al diagnóstico en más de un 95% de los pacientes con LLA y sirve para detectar EMR durante el tratamiento con una sensibilidad de 0.01% o de 1 blasto en 10.000 células normales<sup>12</sup>.

La identificación de factores clínicos y biológicos asociados a pronóstico establece el concepto de estrategia ajustada al riesgo<sup>8</sup>. El análisis cuantitativo de EMR en niños con LLA es el factor pronóstico más importante para determinar la posibilidad de recaída. Permite intensificar el tratamiento en niños con respuesta inadecuada a la quimioterapia y potencialmente permitiría disminuir la toxicidad del mismo asociada en pacientes de bajo riesgo. La detección de EMR en la fase de inducción (días 15 y 33 del tratamiento) permite intensificar el mismo y eventualmente disminuir el riesgo de recaídas<sup>9,10</sup>.

Los objetivos del estudio son evaluar EMR por citometría flujo en MO (días 15 y 33 de la inducción) en niños con LLA.

Determinar la asociación de EMR con variables demográficas y hematológicas.

Determinar la sobrevida global (SG) y sobrevida libre de eventos (SLE) en este grupo de pacientes.

## MATERIAL Y METODOS

Se realizó un estudio descriptivo retrospectivo en el período comprendido entre enero de 2006 y diciembre de 2009. Se incluyeron 84 pacientes con diagnóstico LLA entre 1 y 18 años de edad tratados según protocolo ALLIC/BFM/GATLA 2002. Se realizó detección de EMR en MO por citometría de flujo de 4 colores con citómetro FACSCalibur utilizando un amplio panel de anticuerpos que incluye marcadores B FITC / PE / PCP / APC: 20/10/34/19, 58/10/34/19, 10/123/34/19, 10/38/34/19, marcadores T 99/7/5/3, 4/8/45/3/45, Tdt/7/3cit/3. Según el fenotipo asociado a leucemia evaluado al diagnóstico se utilizaron paneles específicos adecuados a cada paciente para la búsqueda de EMR. La adquisición de los datos se realizó con CellQuest (software BD Biosciences). El análisis de los datos fue realizado con Paint-a-gate software (BD Biosciences). El punto de corte para EMR positiva fue 0.01% o  $1 \times 10^{-4}$ .

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS 15.0. El análisis univariado se realizó con T-test para variables continuas y con  $\chi^2$  o test de Fisher para variables categóricas. El análisis de supervivencia se estimó según el método de Kaplan Meier. El análisis multivariado se realizó por regresión múltiple. Se consideró estadísticamente significativa a valores de  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS

Se evaluaron 84 pacientes con LLA. La media de seguimiento fue 33.9 meses (r:1-66m), la media de edad al diagnóstico 7.7 años (r:2.1-18 años).

Sexo femenino 32 pacientes (38%), masculino 52 pacientes (62%). El fenotipo más frecuente según clasificación EGIL II fue de estirpe B (94%), de los cuales fueron B común 87% (73 pac.), pro B 5% (4 pac.) y preB 2% (2 pac.). Precursor T el 6% (5 pac.).

El 92% (77 pac.) presentaron buena respuesta al día 8 de tratamiento con prednisona (8% mala respuesta). En cuanto a la determinación de grupos de riesgo; 28% (24 pac.) estándar, 55% (46 pac.) intermedio y 17% (14 pac.) alto riesgo. La EMR al día 15 fue evaluable en el 78% de los pacientes (66 pac.), siendo positiva en 38 pacientes (57%) y negativa en 28 (43%). Al día 33 fue evaluable en el 89% de los pacientes (71 pac.), siendo positiva en 10 pacientes (13%) y negativa en 65 (87%). (Tabla 1).

La SG a 36 meses fue 75% y la SLE 71.4%

### Asociación de variables hematológicas y demográficas con EMR al día 15 (n=66).

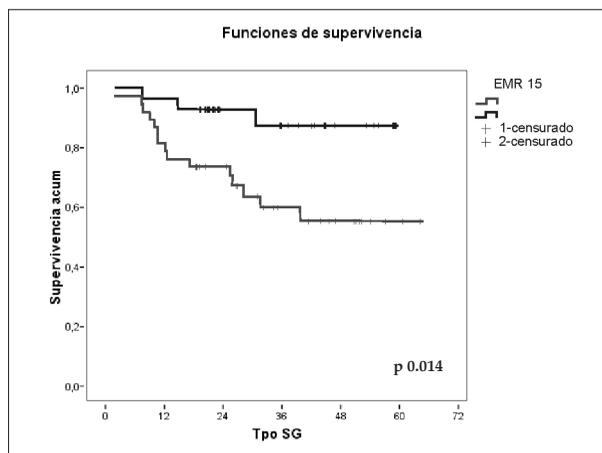
No se observó diferencia estadísticamente significativa cuando se asoció EMR al día 15 con sexo ( $p=0.219$ ), edad al diagnóstico ( $p=0.25$ ), fenotipo pro B ( $p=0.077$ ), B común ( $p=0.388$ ), preB ( $p=0.82$ ) ni T ( $p=0.75$ ).

Tampoco se observó diferencia estadísticamente significativa cuando se asoció con respuesta al día 8 ( $p=0.181$ ). No fue estadísticamente significativa la asociación de EMR al día 15 y riesgo estándar ( $p=0.06$ ) ni intermedio ( $p=0.513$ ). Fue significativo cuando se asoció EMR al día 15 con alto riesgo ( $p=0.005$ ), con pacientes recaídos ( $p=0.046$ ) y recuento de leucocitos al diagnóstico ( $p=0.000$ ).

La SG a 36 meses en pacientes con EMR (+) al día 15 fue 60.15% y en pacientes con EMR (-) 89.3% ( $p=0.014$ ). (Tabla 2)

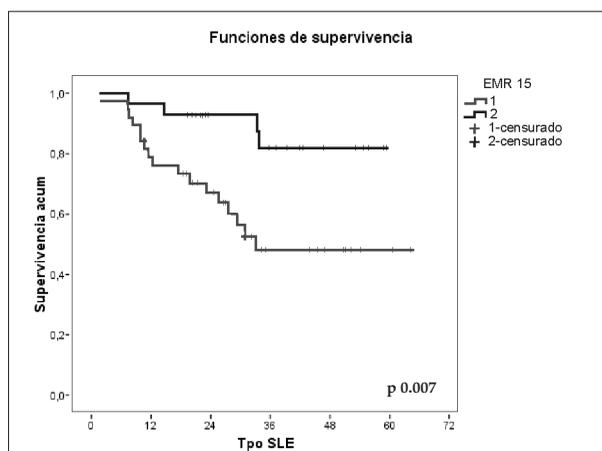
La SLE, considerando evento a la muerte y/o recaída, fue 55.3% en pacientes con EMR (+) y 85.7% en pacientes con EMR (-) al día 15 ( $p=0.007$ ).

Sobrevida global en meses. Kaplan Meier según EMR al día 15



EMR día 15 y SG a 36 meses. EMR - en verde y EMR+ en azul.

Sobrevida libre de evento I en meses. Kaplan Meier según EMR al día 15



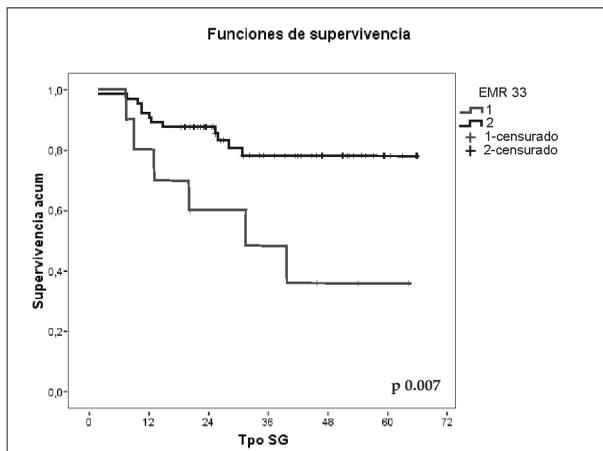
EMR día 15 y SLE a 36 meses. EMR - en verde y EMR+ en azul.

### Asociación de variables hematológicas y demográficas con EMR al día 33 (n=75)

No se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando se asoció EMR al día 33 con edad al diagnóstico ( $p=0.2$ ), sexo ( $p=0.73$ ), fenotipos pro B ( $p=0.48$ ), B común ( $p=0.09$ ) ni preB ( $p=0.57$ ). Se encontró diferencia estadísticamente significativa cuando se asoció EMR al día 33 y fenotipo T ( $p=0.027$ ).

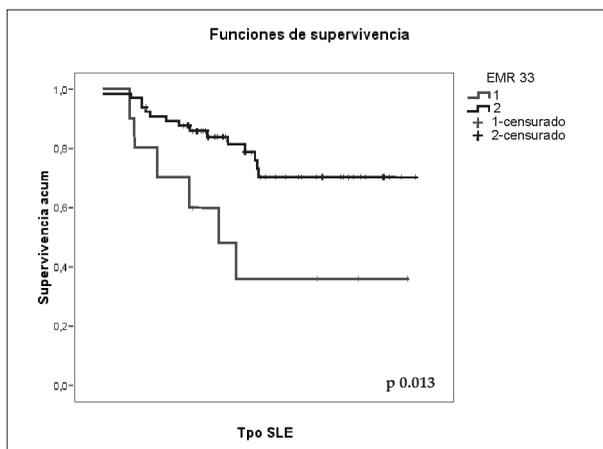
También se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando se asoció con respuesta al tratamiento al día 8 ( $p=0.006$ ). No fue estadísticamente significativa la asociación de EMR al día 33 y riesgo intermedio ( $p=0.06$ ). Fue significativa la

Sobrevida global en meses. Kaplan Meier según EMR al día 33



EMR día 33 y SG a 36 meses. EMR - en verde y EMR+ en azul.

Sobrevida libre de eventos en meses. Kaplan Meier según EMR al día 33



EMR día 15 y SLE a 36 meses. EMR - en verde y EMR+ en azul.

TABLA 1.- Características hematológicas de la población (n=84)

	n (%)
<b>Inmunofenotipo</b>	
Pro B	4 (5)
B común	73 (87)
Pre B	2 (2)
T	5 (6)
<b>Respuesta día 8</b>	
Buena	77 (92)
Mala	7 (8)
<b>Riesgo</b>	
Estándar	24 (28)
Intermedio	46 (55)
Alto	14 (17)
<b>EMR evaluable día 15</b>	
+	66 (78)
-	38 (57)
<b>EMR evaluable día 33</b>	
+	75 (89)
-	10 (13)
<b>EMR evaluable día 72</b>	
+	60 (71)
-	1 (2)
-	59 (98)

asociación de EMR con riesgo estándar ( $p=0.0285$ ) y alto riesgo ( $p=0.003$ ).

Se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando se relacionó EMR (+) día 33 y pacientes recaídos ( $p=0.042$ ) y recuento de leucocitos al diagnóstico ( $p=0.000$ ).

La SG a 36 meses en pacientes con EMR (+) al día 33 fue 40% y en pacientes con EMR (-) 81.5% ( $p=0.007$ ). (Tabla 2)

La SLE fue 40% en pacientes con EMR (+) al día 33 y 76.9% en pacientes con EMR (-) al día 15 ( $p=0.013$ ).

En el análisis multivariado la EMR positiva es una variable independiente para predecir recaída ( $p=0.047$ ).

## DISCUSIÓN

La definición de remisión completa en pacientes con leucemias agudas se realiza por citomorfología y EMR<sup>13</sup>. El conocimiento del inmunofenotipo de células normales es fundamental para poder identificar células patológicas y así establecer los fenotipos asociados a leucemias agudas. Es importante también conocer las modulaciones producidas por la quimioterapia en células blásticas para cuantificar correctamente la EMR.

El punto de corte utilizado en LLA para definir EMR positiva es 0.01%. Este valor está asociado al límite de detección de la citometría de flujo<sup>14-15</sup>. El riesgo de recaída es directamente proporcional al nivel de EMR determinada en diferentes puntos del

TABLA 2: Relación de EMR con variables demográficas y hematológicas

Variable	EMR 15 +	EMR15 -	p	EMR 33 +	EMR 33 -	p
Sexo						
Femenino	12	13	0.219	3	23	0.73
Masculino	26	15		7	42	
Immunofenotipo						
Pro B	4	0	0.077	1	3	0.48
Common B	31	25	0.388	7	58	0.09
Pre B	1	1	0.82	0	2	0.57
T	2	2	0.75	2	2	0.027
Respuesta a laprednisona						
Buena	33	27	0.181	7	62	0.006
Mala	5	1		3	3	
Grupo riesgo						
Estandar	6	10	0.06	0	23	0.02
Intermedio	20	17	0.513	5	34	0.89
Alto	21	1	0.005	5	8	0.003
Recaída						
Si	12	3	0.046	6	54	0.08
No	26	25		4	11	
Media edad (años)	7.37	7.42	0.2	9.18	6.9	0.2
GB al diagnóstico						
Media	28418	25523	0.000	85000	15550	0.00
Mediana	11300	7100				
	EMR + 15	EMR - 15	p	EMR + 33	EMR- 33	p
SG (66m.)	60.15%	89.3%	0.014	40%	81.5%	0.007
SLE(66m.)	55.3%	85.7%	0.007	40%	76.9%	0.013

tratamiento. La medición de EMR a las 2 o 3 semanas de iniciado el tratamiento brinda importante información que permite intensificar el tratamiento en pacientes con mayor riesgo de recaída<sup>17-18</sup>.

Actualmente no está demostrado por estudios randomizados que los pacientes con EMR negativa se beneficien con la disminución en la intensidad de tratamiento. Los excelentes resultados de supervivencia en este grupo de pacientes se han logrado con el tratamiento estándar.

En concordancia con lo publicado, la EMR positiva al día 15 en el 57.5% de los pacientes se correlacionó con mayor recuento de leucocitos al diagnóstico, riesgo alto, mayor porcentaje recaída y menor SLE y SG. No se asoció la EMR al día 15 con respuesta al tratamiento al día 8 de prednisona probablemente por el número de pacientes estudiados. La EMR positiva al día 33 en el 13.3% de los pacientes se correlacionó en forma significativa con mayor recuento de leucocitos al diagnóstico, fenotipo T, mala respuesta al día 8, riesgo alto y riesgo estándar, mayor porcentaje de recaída y menor SLE y SG.

Numerosos estudios han demostrado que la detección de EMR al final de la inducción y al inicio

de la consolidación constituye un factor pronóstico importante para predecir recaídas. Actualmente se ha demostrado la importancia de evaluar EMR a las dos semanas del inicio del tratamiento de inducción.

En trabajos publicados por el Hospital St Jude en el año 2002, se demostró que EMR al día 19 en MO constituye un factor pronóstico independiente<sup>20</sup>. Recientemente demostró que pacientes con altos niveles de EMR por citometría de flujo al final de la inducción tuvieron menor SLE a 5 años que aquellos con EMR entre 0.1% a 1% (30%  $\pm$  8 vs 49%  $\pm$  6). Los pacientes con EMR 0.01% a 0.1% tuvieron menor SLE que pacientes con EMR negativa (59%  $\pm$  5 vs 88%  $\pm$  1). Por lo tanto 0.01% sería un punto de corte importante para detectar pacientes con riesgo elevado de recaída<sup>21</sup>.

El grupo BFM evaluó la cinética de reducción de blastos en sangre periférica al día 8 y en médula ósea al día 15, demostrando su relación con EMR positiva al día 33 y riesgo de recaída<sup>18</sup>.

En nuestro estudio se demuestra que la EMR positiva en MO en los días 15 y 33 del tratamiento es una variable pronóstica independiente y significativa en la predicción de recaída en LLA pediátrica.

## ABSTRACT

**Minimal residual disease (MRD) allows detection of blasts in patients with morphologically complete remission. In patients with ALL (Acute Lymphoblastic Leukemia), is an independent risk factor associated with lower event free survival (EFS). From January 2006 to December 2009, 84 pediatric patients with newly diagnosed ALL were treated according to ALLIC-BFM-GATLA 2002 protocol. The cutoff used to define MRD positive in ALL was 0.01%. Positive MRD at day 15 were found in 57.5% of patients and was correlated with higher leukocyte count at diagnosis, high risk, relapse and lower EFS and OS (Overall Survival). Positive MRD at day 33 was found in 13.3% of patients and was significantly correlated with higher blood cell count at diagnosis, T phenotype, poor response at day 8, high risk, relapse and lower EFS and OS. MRD at day 15 and 33 of treatment is an important prognostic factors to predict relapse in pediatric ALL.**

**Key words:** Minimal Residual Disease (MRD), Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL), Pediatrics

## BIBLIOGRAFÍA

- Jacquillat C, Weil M, Gemon MF, et al.: Combination therapy in 130 patients with acute lymphoblastic leukemia (protocol 06 LA 66-Paris). *Cancer Res* 1973; 33: 3278-3284.
- Pui CH, Boyett JM, Rivera GK, Hancock ML, Sandlund JT, Ribeiro RC et al. Long-term results of total therapy studies 11, 12 and 13<sup>a</sup> for childhood acute lymphoblastic leukemia at St Jude Children's Research Hospital. *Leukemia* 2000; 14: 2286-2294.
- Schrapppe M, Reiter A, Zimmermann M, Harbott J, Ludwig WD, Henze G et al. Long-term results of four consecutive trials in childhood ALL performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 1995. Berlin-Frankfurt-Munster. *Leukemia* 2000; 14: 2205-2222.
- Riehm H, Reiter A, Schrapppe M, Berthold F, Dopfer R, Gerein V et al. [Corticosteroid-dependent reduction of leukocyte count in blood as a prognostic factor in acute lymphoblastic leukemia in childhood (therapy study ALL-BFM 83)]. *Klin Padiatr* 1987; 199: 151-160.
- Szczepanski T, Willemsse MJ, Brinkhof B, et al. 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.
- Campana D, Coustan-Smith E. The use of flow cytometry to detect minimal residual disease in acute leukemia. [Review]. *Eur J Histochem*. 1996; 40: 39-42.
- Borowitz MJ, Devidas M, Hunger SP, et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors. a Children's Oncology Group study. *Blood*. 2008.
- Sandlund JT, Harrison PL, Rivera G, et al. Persistence of lymphoblasts in bone marrow on day 15 and days 22 to 25 of remission induction predicts a dismal treatment outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2002; 100: 43-47.
- Panzer-Grumayer ER, Schneider M, Panzer S, Fasching K, Gadner H. Rapid molecular response during early induction chemotherapy predicts a good outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2000; 95: 790-794.
- Zhou J, Goldwasser MA, Li A, Dahlberg SE, Neuberg D, Wang H, Dalton V, McBride KD, Sallan SE, Silverman LB, Gribben JG. Quantitative analysis of minimal residual disease predicts relapse in children with B-lineage acute lymphoblastic leukemia in DFCI ALL Consortium Protocol 95-01. *Blood* 2007 Sep 1; 110(5): 1607-11.
- Bradstock KF, Janossy G, Tidman N, et al. Immunological monitoring of residual disease in treated thymic acute lymphoblastic leukaemia. *Leuk Res* 1981; 5(45): 301-309.
- Ciudad J, San Miguel JF, Lopez-Berges MC, et al. Prognostic value of immunophenotypic detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 1998; 16(12): 3774-3781.
- Campana D. Progress of minimal residual disease studies in childhood acute leukemia. *Curr Hematol Malig Rep*. 2010 Jul; 5(3): 169-76.
- Coustan-Smith E, Behm FG, Sanchez J, et al.: Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 1998, 351: 550-554.
- Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, et al.: Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000, 96: 2691-2696.
- Panzer-Grumayer ER, Schneider M, Panzer S, et al.: Rapid molecular response during early induction chemotherapy predicts a good outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000, 95: 790-794.
- Coustan-Smith E, Ribeiro RC, Stow P, et al.: A simplified flow cytometric assay identifies children with acute lymphoblastic leukemia who have a superior clinical outcome. *Blood* 2006, 108: 97-102.
- Ratei R, Basso G, Dworzak M, Gaipa G, Veltroni M, Rhein P, Biondi A, Schrapppe M, Ludwig WD, Karawajew L. Monitoring treatment response of childhood precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia in the AIEOP-BFM-ALL 2000 protocol with multiparameter flow cytometry: predictive impact of early blast reduction on the remission status after induction. *Leukemia*. 2009 Mar; 23(3): 528-34.
- Bhojwani D, Kang H, Moskowitz NP, et al. Biologic pathways associated with relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *Blood*. 2006; 108: 711-717.
- Ratei R, Sperling C, Karawajew L, et al. Immunophenotype and clinical characteristics of CD45-negative and CD45-positive childhood acute lymphoblastic leukemia. *Ann Hematol* 1998; 77: 107-114.
- Dworzak MN, Fritsch G, Fleischer C, et al. Comparative phenotype mapping of normal vs. malignant pediatric B-lymphopoiesis unveils leukemia-associated aberrations. *Exp Hematol* 1998; 26: 305-313.