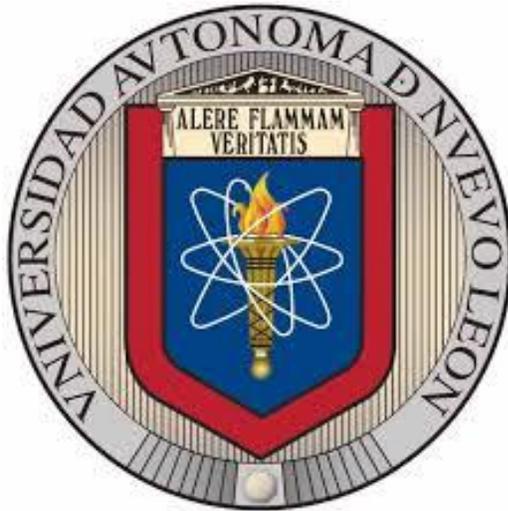


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



DETERMINACION DE LA FRECUENCIA DE CD66/CD123 Y CD73/CD304 EN EL
MONITOREO DE LA ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL EN PACIENTES CON
LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA B EN RECAIDA.

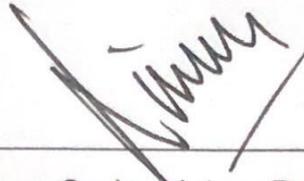
Presenta:

L.Q.C Maviel Antonio Reyes Trujillo

Para obtener el grado de Maestría en Laboratorio de Hematología

Junio 2022

**“DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA DE CD66/CD123 Y CD73/CD304
EN EL MONITOREO DE LA ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL EN
PACIENTES CON LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA B EN RECAÍDA”**



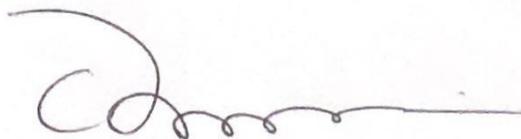
Dr. med. Jose Carlos Jaime Perez
Director de Tesis



Dr. Luis Javier Marfil Rivera
Miembro de la Comisión de Tesis



Dr. David Gómez Almaguer
Codirector de Tesis



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis padres por su amor incondicional, por su apoyo a lo largo de mi vida y por ser un ejemplo de fortaleza.

A mi hermano por apoyarme en todo momento y estar siempre presente.

A mi mejor amiga por escucharme cuando lo necesitaba y alentarme a siempre seguir adelante.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mi director de tesis el Dr. med. Jose Carlos Jaime Pérez quien con sus conocimientos y apoyo me guio a través de cada una de las etapas de este proyecto para alcanzar los resultados que se buscaba.

A la QCBEH. Nereida Méndez Ramírez por brindarme su tiempo y apoyo de sus conocimientos en todo momento.

Al MLH. Eli de Jesús Fuentes Chávez por tener la disponibilidad y ejercer un criterio de opinión.

También quiero agradecer al Centro Universitario Contra el Cáncer, Servicio de hematología, dirigido por el Dr. David Gómez Almaguer por brindarme todos los recursos y herramientas que fueron necesarios para llevar a cabo el proceso de investigación.

Por último, quiero agradecer a mi compañera de maestría Casandra Robles Valverde por apoyarme aun cuando mis ánimos decaían. En especial, quiero hacer mención a mis padres, que siempre estuvieron ahí para darme palabras de apoyo y un abrazo reconfortante para renovar energías e impulsarme a seguir adelante cuando más lo necesitaba.

RESUMEN

Dado que la leucemia linfocítica aguda B es más común en pacientes juveniles y adultos en la actualidad, los tratamientos han ido evolucionando para combatir esta patología ocasionando más difícil su diagnóstico por citometría de flujo por el bloqueo de los anticuerpos monoclonales de los tratamientos de quimioterapia, el trabajo realizado se dirigió a determinar la frecuencia de los marcadores leucémicos con los que se interpreta la EMR en pacientes con LLA-B y así determinar el menos frecuente para un futuro modificar este marcador. Se obtuvieron los resultados de EMR de los pacientes de mayo del 2017 a enero 2021; todos estos estudios fueron realizados en base al protocolo ya establecido por Euroflow de EMR de alta sensibilidad que consta de dos tubos con los siguientes marcadores. Tubo 1: CD20 (V450), CD45 (V500c), CD81 (FITC), CD66c (PE), CD123 (PE), CD34 (PerCPCy5.5), CD19 (PeCy7), CD10 (APC), CD38 (APC-H7). Tubo 2: CD20 (V450), CD45 (V500c), CD81 (FITC), CD73 (PE), CD304 (PE), CD34 (PerCPCy5.5), CD19 (PeCy7), CD10 (APC), CD38 (APC-H7).

Se demostró que el marcador CD73/CD304 tiene la mayor frecuencia (87.7 %) en la detección de EMR en la LLA-B en nuestra población; así concluyendo a un futuro poder sustituir o adicionar un nuevo marcador en vez del CD66/CD123.

INDICE

Capítulo	Página
I.INTRODUCCION	9
1.1 FISIOPATOLOGIA	9
1.2 ANALISIS INMUNOTIPIFICO DE CELULAS PRECURSORAS LINFOIDES B	10
1.3 ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL	10
1.4 INMUNOTIPIFICACION DE ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL DE LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA B	12
1.5 QUIMIOTERAPIAS	14
HIPOTESIS	17
OBJETIVOS	17
II.JUSTIFICACION	17
III.MATERIALES Y METODOS	18
IV.RESULTADOS	21
V.DISCUSION	24
CONCLUSION	25
PERSPECTIVAS	25
VI.REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	26

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
FIGURA 1.- ESTRUCTURA DEL BLINATUMOMAB	15
FIGURA 2.- MECANISMO DE ACCION DEL BLINATUMOMAB	16
FIGURA 3.- VARIABLES	18
FIGURA 4.- CANTIDAD DE CASOS DE ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL DE LLA-B	21
FIGURA 5.- DISTRIBUCION DE PACIENTES POR GENERO	22
FIGURA 6.- DISTRIBUCION DE EDAD	22
FIGURA 7.- DISTRIBUCION DE OBTENCION DE CELULAS ADQUIRIDAS	23
FIGURA 8.- DISTRIBUCION DE POSITIVIDAD EN EMR	24

NOMENCLATURA

HG	HEMATOGONIAS
FAB	CLASIFICACION FRANCO-ESTADOUNIDENSE-BRITANICA
IL3	INTERLUCINA-3
LLA	LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA
LLOQ	LIMITE INFERIOR DE CUANTIFICACION
LOD	LIMITE DE DETECCION
M.O	MEDULA OSEA
NK	NATURAL KILLER
PCR	REACCION EN CADENA DE POLIMERASA
Ph	CROMOSOMA FILADELFIA
TCMH	TRASPLANTE DE CELULAS MADRE HEMATOPOYETICAS
VIH	VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA

I.INTRODUCCION

Las hematogonias (HG) son células jóvenes normales de linaje linfoide B que están presentes en pequeñas cantidades en la medula ósea. Las HG tienen un papel en la regulación de la producción de células sanguíneas, participando en la ontogenia temprana de las células B, la intensa proliferación de estas células permite la restauración o regeneración de la medula ósea (M.O.).^{1,2,3}

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es una neoplasia caracterizada por el desarrollo alterado y proliferación de las células progenitoras linfoides en la medula ósea, sangre y sitios extra medulares (que se diferencian en subtipos B y T) seguido de un bloqueo de maduración. La primera clasificación de LLA se basó en los criterios morfológicos de la clasificación franco-estadounidense-británica (FAB), que incluye la relación núcleo/citoplasma, nucléolos, tamaño de célula, vacuolas y el hecho de que la medula ósea debe contener al menos un 20% de células blásticas; después de la introducción de la citometría de flujo en el diagnóstico clínico, se han utilizado ampliamente los marcadores de linaje para clasificar la leucemia como origen de células B u origen de células T.^{1,2,3}

1.1 FISIOPATOLOGIA

La patogenia de la LLA implica la proliferación y diferenciación anormales de una población clonal de células linfoides, se han identificado algunos síndromes genéticos que predisponen a una minoría de los casos de LLA como el síndrome de Down y la anemia de Fanconi entre otros padecimientos. Otros factores predisponentes incluyen la exposición a radiaciones ionizantes, pesticidas, ciertos disolventes o virus, como el virus del Epstein-Barr y el VIH. Existe una distribución bimodal con un pico en la niñez, donde representa la neoplasia maligna pediátrica más común y un segundo pico alrededor de los 50 años.²

Las aberraciones cromosómicas son el sello distintivo de la LLA, pero no son suficientes para generar leucemia, las translocaciones características incluyen la 12:21 (ETV6-RUNX1), 1:19 (TCF3-PBX1), 9:22 (BCR-ABL1).² La presentación de la LLA puede ser inespecífica, con una combinación de síntomas constitucionales y signos de insuficiencia de la medula ósea (anemia, trombocitopenia, leucopenia).²

Los síntomas comunes son: fiebre, pérdida de peso, sudores nocturnos, sangrado fácil o hematomas, fatiga, disnea e infección. La afectación de sitios extra medulares ocurre comúnmente ocasionando linfadenopatía, esplenomegalia o hepatomegalia.²

1.2 ANALISIS INMUNOTIPIFICO DE CELULAS PRECURSORAS LINFOIDES B

Los precursores linfoides B normales y malignos revelan similitudes morfológicas cuando se observan al microscopio óptico, poseen moléculas con diferentes funciones, estas pueden ser identificadas por sus antígenos de membrana o intranucleares con ayuda de anticuerpos monoclonales. La citometría flujo permite estudios inmunofenotípicos mediante tinción múltiple de las células en análisis mediante marcaje fluorescente, tecnología láser y métodos de separación celular.³

El análisis inmunofenotípico permite identificar el tipo de linaje celular (B o T) y sus diferentes etapas de maduración, además de permitir distinguir entre HG y linfoblasto B, es ampliamente utilizada para la evaluación pos-tratamiento para la detección y monitoreo de enfermedad mínima residual (EMR).³

Los protocolos de tratamiento más actuales para la leucemia linfoblástica aguda (LLA) de precursores B incluyen mediciones de enfermedad mínima residual basadas generalmente en la PCR (reacción en cadena de polimerasa), tiempo atrás la citometría de flujo se utilizaba también para la detección de EMR, pero la especificidad y sensibilidad eran menor.⁴

Recientemente se ha comprobado que el uso de 6 o 7 inmunotinciones en combinación con los nuevos marcadores de población aumenta la especificidad, junto con la discriminación más objetiva, eficiente y procedimientos mejorados de preparación de muestras para adquisición de mayor cantidad de células para mejorar la sensibilidad.⁴

1.3 ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL

El término enfermedad mínima residual (EMR) se refiere a la presencia de células neoplásicas residuales por debajo del umbral de detección por morfología convencional, se basa en técnicas sensibles como citometría de flujo y métodos genéticos (moleculares).⁵

Uno de los métodos más utilizados para evaluación de EMR es la citometría de flujo, esto debido a que la mayoría de las células leucémicas se pueden distinguir su inmunofenotipo y de forma cuantitativa a un límite de detección de 1 en 10,000 células (0.01%).

Este método de análisis utiliza paneles personalizados de anticuerpos dirigidos a la leucemia en específico.⁵

La detección de EMR no solo es útil para la evaluación de la respuesta al tratamiento inicial y la definición posterior de los grupos de riesgo, sino también para monitorear la carga de la enfermedad en el contexto del trasplante de células madre, para reconocimiento temprano de recaída inminente y como potencial punto final en los ensayos clínicos; así mismo se utiliza para orientar las decisiones clínicas en los protocolos de tratamiento actuales.⁶

El método de cuantificación de la EMR se basa en la discriminación de las células de LLA de sus homólogos fisiológicos normales y la identificación del inmunofenotipo asociado a leucemia por citometría de flujo o mediante técnicas moleculares alcanzando una sensibilidad $\times 10^{-4}$ a $\times 10^{-5}$ (1 célula leucémica en 10,000 a 100 000 células sanas).⁶ La detección por citometría de flujo es menos laboriosa y más rápida, esto permite informar rápidamente los resultados, lo que es particularmente útil para tomar decisiones terapéuticas; se pueden identificar en más del 90% de los pacientes con leucemia linfoblástica aguda.⁶

La inmunotipificación por citometría de flujo ha evolucionado significativamente gracias a la implementación de nuevas técnicas de evaluación de células, el desarrollo de nuevos anticuerpos y fluorocromos, que han llegado a mejorar la sensibilidad y especificidad de la EMR, convirtiéndola en una herramienta clave para el diagnóstico, clasificación, estadificación y el seguimiento de la respuesta al tratamiento de los trastornos hematológicos e inmunológicos; El consorcio Euroflow que se centra en el desarrollo, estandarización y evaluación y rediseño; se seleccionaron dos tubos de anticuerpos de 8 colores que permite su evaluación certera del 99%, estos tubos constaban de los siguientes marcadores: CD20,CD45,CD81,CD66c/CD123, CD34,CD19,CD10 y CD28, el segundo tubo constaba CD20,CD45,CD81,CD73/CD304,CD34,CD19,CD10 y CD28, además para optimizar el análisis se decidió incorporar una lisis masiva de eritrocitos a la muestra para obtener una mejor celularidad.⁷

La citometría de próxima generación de EMR es más rápida, reproducible y tiene mayor aplicabilidad (>95%) en comparación con la detección de EMR de base molecular, además que los costos son menores y pueden alcanzar hasta una sensibilidad de 10^{-6} ;

la mayor sensibilidad se debe al uso de protocolos estandarizados del consorcio Euroflow, sin embargo, se necesita la adquisición de una gran cantidad de células para alcanzar la sensibilidad requerida.⁸

La enfermedad mínima residual, denominada actualmente enfermedad mínima medible, tiene dos enfoques para su evaluación, estos incluyen:

1. Aberrante asociado a leucemia: enfoque de inmunofenotipo en el que las aberraciones fenotípicas se detectan y registran en el momento del diagnóstico y evaluación de EMR.
2. Diferencia desde el enfoque normal: se basa en la desviación observada de blastos leucémicos de la maduración normal de células linfoides.

El marcador aberrante asociado a leucemia refiere a la expresión anormal de antígenos como: linaje cruzado expresión asincrónica y sobre expresión de antígenos en comparación con niveles normales.⁹

Los números de eventos adquiridos dependerá del ruido de fondo, calidad de la muestra y la distribución de células anormales, para la EMR de LLA-B el umbral actual recomendado para decisiones clínicas es 0.01% de detección de células anormales.¹⁰

Para garantizar la sensibilidad, exactitud, precisión y reproductibilidad analítica, se debe establecer y verificar el límite de detección (LOD) y el límite inferior de cuantificación (LLOQ) en la medición de EMR. El LOD se define como el nivel para distinguir de manera confiable del ruido/fondo y el LLOQ es la concentración más baja que se puede detectar fácilmente con una exactitud y precisión aceptable, la falta de detección de la EMR no es sinónimo de ausencia de enfermedad residual.¹⁰

Es importante mencionar que las terapias anti CD20 y anti CD22 pueden ser un obstáculo para la detección de EMR, al saturar los sitios antigénicos correspondientes.¹⁰

1.4 INMUNOTIPIFICACION DE ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL DE LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA B

Algunos protocolos definen el valor pronóstico de EMR en el día 15, 28 o 33, pero el verdadero desafío radica en encontrar clonas residuales con alteraciones en el patrón de maduración normal o la presencia de marcadores aberrantes. Otro desafío importante para la inmunotipificación de EMR de LLA-B son los marcadores por la estabilidad que

presentan durante el tratamiento, ya que algunos desaparecen o se inducen después de rondas de quimioterapia.¹¹

Dentro de los marcadores utilizados para EMR de LLA-B está el CD73 que es marcador bimodal que se usa en conjunto con otro marcador, CD123; en condiciones fisiológicas se expresa en la superficie de algunas células B maduras y subpoblaciones de T y NK, este marcador se expresa de manera aberrante en blastos de linaje B en comparación con su contraparte normal, esto se mantiene estable durante los primeros 15 días de tratamiento, tiene tendencia a aumentar significativamente después del tratamiento.¹¹

El CD304, también llamado neuropilina 1, funciona como correceptor del factor de crecimiento endotelial vascular y semaforina, este marcador es expresado en niveles discretos en poblaciones de células pre-B; los blastos leucémicos LLA-B sobre expresan significativamente este marcador. Estos dos marcadores CD73/CD304 se encuentran en correlación positiva, por lo que su combinación resulta una poderosa estrategia para identificar clonas residuales de LLA-B.¹¹

La expresión de CD304 es débil/parcial en hematogonias y disminuye con la maduración, desapareciendo en las células B maduras, sin embargo, está presente en blastos leucémicos B con una fuerte sobre expresión y es usado para distinguir hematogonias de EMR.¹¹

El CD66c es una glicoproteína que participa en la adhesión celular y se expresa en la superficie de las células de origen mieloide en condiciones normales, en la LLA-B esta molécula se expresa de forma aberrante en la superficie de los blastos, especialmente en los casos de la translocación t(9,22) que origina la proteína de fusión BCR-ABL-1.¹¹

El CD123, también conocido como receptor de cadena alfa de IL-3, es una proteína de la superficie celular que se expresa ampliamente en varios subtipos de leucemia aguda, se expresa en gran medida en blastos leucémicos de LLA-B, LLA-T y LMA. Los mieloblastos y monocitos normalmente suelen expresar niveles muy bajos, en la mayoría de los casos de LMA, aproximadamente un 93%, expresan CD123 en diferentes intensidades, y se expresa en el 90% de los casos de LLA-B.^{11,12}

La expresión de CD123 por blastos leucémicos parece variar según el subtipo genético de LLA de células B: la expresión de este marcador es más prevalente entre los casos positivos de cromosoma filadelfia (Ph+) en comparación de los casos Ph negativos.¹²

CD22 se expresa durante las primeras etapas de la ontogenia de las células B en la medula ósea (M.O.) y el bazo. La molécula está regulada positivamente en la superficie celular de los linfocitos B activados y se encuentra en el citoplasma de las células B precursoras (pro-B y pre-B); este marcador se expresa en la mayoría de los blastos (60-90%) de las células B.¹³

1.5 QUIMIOTERAPIA

A pesar de la quimioterapia intensiva con tasas de remisión completa hematológica del 80-90%, existe un porcentaje de esto que sigue presentando la EMR detectable que nos indica resistencia a la quimioterapia estándar y es el factor de riesgo más importante de recaída hematológica en la LLA de células B y T.^{14,15}

Hasta la actualidad no se ha definido una terapia estándar para LLA con EMR detectable durante o después de la quimioterapia intensiva con múltiples fármacos, las guías de expertos recomiendan el trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH).^{14,15}

La leucemia linfoblástica aguda presenta un verdadero desafío en los pacientes mayores por diversas razones, dado que conlleva a menudo alteraciones genéticas de alto riesgo que confieren resistencia a la quimioterapia convencional.¹⁶

Los agentes dirigidos con mecanismos de acción alternativos pueden reducir EMR y retrasar o prevenir la recaída hematológica como por ejemplo la terapia dirigida con blinatumomab que ha demostrado una efectividad significativa en el tratamiento de LLA-B.^{11,12}

El blinatumomab es una proteína de fusión que consta de dos fragmentos variables monocatenarios expresados de forma recombinante (anti CD19 murino y anti CD3) unidos por un enlazador flexible de glicina-serina. El CD19 es un antígeno de superficie celular que se expresa específicamente en las células B precursoras y ha sido implicado en la capacidad de auto-renovación de las células leucémicas.¹⁷

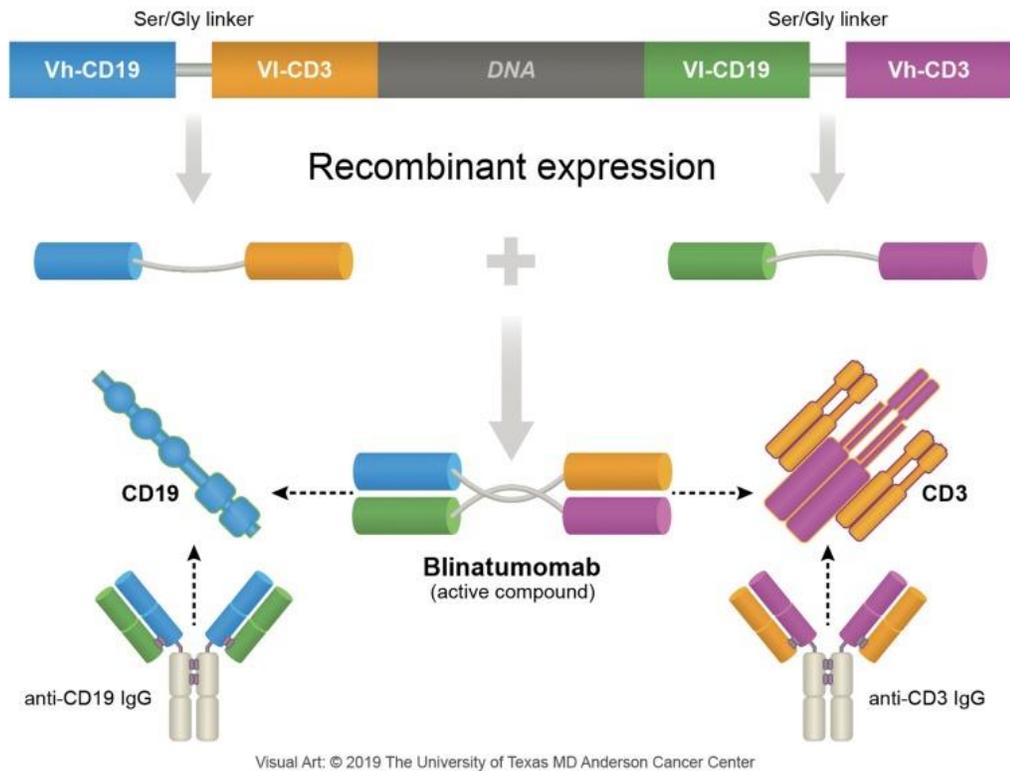


Figura 1. Estructura de blinatumomab. Las regiones variables de anti CD19 y anti CD3 unidas por un enlazador de serina-glicina.

El blinatumomab es un conjugado de anticuerpos dirigido contra el antígeno CD19 de las células B que dirige a los linfocitos T hacia estas células, lo que lleva a la liberación de gránulos citotóxicos que contienen granzima y perforina, en última instancia a la inducción de la apoptosis de las células B malignas, dando como resultado la eliminación de blastos CD19 positivo. El antígeno CD19 se expresa en los linfoblastos del 95% de los casos de LLA de células precursoras B.¹⁷

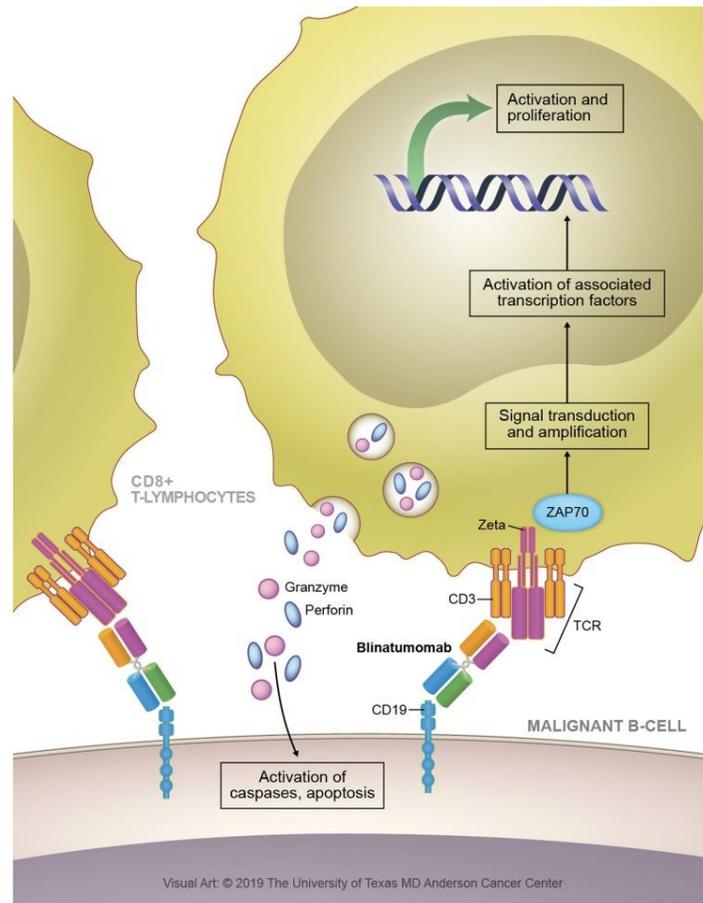


Figura 2. Mecanismo de acción del blinatumomab.

La lisis inducida de las células B portadoras de CD19 se logra mediante la formación de una sinapsis citotóxica con los linfocitos T citotóxicos. La región variable anti CD19 del blinatumomab se une al antígeno CD19 de las células B malignas mientras que la región variable anti CD3 se une a los linfocitos T citotóxicos causando una cascada de señalización celular que dará origen a la producción y liberación de gránulos citotóxicos que contienen granzima y perforina, esta última formando un poro en la membrana de la célula diana que permitirá a la granzima entrar al citosol para activar la vía de las caspasas e inducir apoptosis.¹⁷

HIPOTESIS

H0: El inmunofenotipo CD66/CD123 tiene mayor frecuencia que CD73/CD304 para la detección de blastos leucémicos en pacientes con LLA-B en recaída.

H1: El CD66/CD123 tiene menor frecuencia que CD73/CD304 para la detección de blastos leucémicos en pacientes con de LLA-B en recaída.

OBETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la frecuencia de los marcadores CD66/CD123 y CD73/CD304 en la detección temprana de EMR de LLA-B.

OBJETIVOS PARTICULARES

1.- Seleccionar la combinación de CDs de mayor frecuencia para el diagnóstico oportuno de recaída de LLA-B.

2.- Determinar cuál CD es prescindible en la estrategia del monitoreo inmunofenotípico de la EMR de LLA-B.

3.- A futuro, evaluar la implementación de CD22 como marcador alternativo específico de células B en el monitoreo de EMR en pacientes que reciban blinatumomab.

II.JUSTIFICACION

En la actualidad los diferentes tratamientos monoclonales han ido evolucionando, esto hace que el seguimiento de esta patología por medio de la citometría de flujo sea más complejo por la interferencia que estos tratamientos ocasionan con el marcaje y la interpretación.

Por lo anterior se han tenido que implementar modificaciones de los paneles de anticuerpos ya estandarizados para establecer una estrategia que permita la detección en EMR de pacientes con LLA-B, resultando más laborioso y costoso el estudio, al incorporar otros anticuerpos; es necesario tener en cuenta ciertas limitantes importantes, como el volumen de muestra obtenido, al no ser de fácil acceso, así como la celularidad presente en ella.

Al conocer el marcador de menor frecuencia para la detección EMR, se evaluaría sustituirlo por otro marcador que facilite la detección de las células B malignas, evitando la interferencia que el blinatumomab pudiera ocasionar al unirse a CD19 y así omitir la incorporación de un tercer tubo en el panel estandarizado en la rutina.

Esta estrategia ayudaría a conservar la sensibilidad y especificidad del estudio para tener un seguimiento óptimo del paciente, manteniendo el tiempo de proceso de la muestra, además de economizar gastos para el paciente.

III.MATERIALES Y METODOS

Se realizó un estudio observacional y retrospectivo de todos los pacientes con diagnóstico de enfermedad mínima residual de LLA-B en el periodo de mayo del 2017 a enero del 2021 que acudieron al Servicio de Hematología “Dr. José Eleuterio González” de la Facultad de Medicina del Hospital Universitario de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Los datos de los pacientes (edad y sexo) y la información del análisis del EMR LLA-B (CD66/CD123, CD73/CD304) se obtuvieron del expediente clínico y de la base de datos electrónica del laboratorio del Servicio de Hematología. Se integraron en una base de datos del programa Excel, posteriormente se analizaron en el programa SPSS.

Los criterios de inclusión son los siguientes:

- Edad entre 0 y 99+ años
- resultado positivo de EMR LLA B
- Que cuenten con su expediente clínico completo
- Sexo indistinto

Criterios de exclusión:

- resultado negativo de EMR LLA B
- Pacientes que no cuenten con expediente clínico completo

VARIABLES

Cualitativas	Cuantitativas
Sexo (dicotómico)	Edad (continuo)
Procedencia (dicotómico)	
Resultado (dicotómico)	

Figura 3. Variables

ASPECTOS ETICOS

En este estudio se respetaron los principios fundamentales sobre la confidencialidad de datos personales y las normas éticas:

Código de Núremberg, Declaración de Helsinki, Enmiendas de Tokio, las guías éticas internacionales para la investigación biomédica (CIOMS), las guías para las buenas prácticas clínicas de la conferencia internacional de Armonización (ICH, E6-R1) y las guías operacionales para comité de ética que evalúan investigación biomédica (OMSS).

El responsable procuro que los datos personales contenidos en la base de datos sean pertinentes, correctos y actualizados para los fines para los cuales fueron recabados.

El protocolo se aprobó por el comité de ética en investigación del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”

ANALISIS ESTADISTICO

En la estadística descriptiva se reportaron frecuencias y porcentajes para variables categóricas. Para las variables cuantitativas se reportaron medidas de tendencia central y dispersión (media/mediana; desviación estándar/rango intercuartil), previa valoración de la distribución de las variables por medio de la prueba de Kolmogórov-Smirnov. Todos los análisis estadísticos se realizaron en el paquete estadístico SPSS versión 25 (IBM, Armonk, NY, USA).

CALCULO DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA

Se realizó un cálculo de tamaño de muestra por medio de una fórmula de estimación de una proporción en una población infinita, considerando una prevalencia de 81.4% en la expresión de biomarcadores para enfermedad mínima residual, un poder de 97.5% y un nivel de significancia a dos colas de 0.5, se requieren al menos 233 pacientes en total en el estudio. Los parámetros fueron establecidos en base la literatura.¹⁸

ESTIMACIÓN DE UNA PROPORCIÓN EN UNA POBLACIÓN INFINITA

$$N = \frac{(Z\alpha)^2(p)(q)}{\delta^2}$$

		al cuadrado			
valor Z	1.96	3.8416		3.8416	
valor p	0.81400		0.05	n=	232.653443
valor q	0.1860		0.95		
valor δ	0.05	0.0025	0.05	0.0025	

p= Proporción de sujetos portadores del fenómeno en estudio.

q= 1-p (complementario, sujetos que no tienen la variable de estudio)

δ = Precisión o magnitud del error que estamos dispuestos a aceptar.

Z α = Distancia de la media del valor de significación propuesto.

Poder (1- β) %	Valor Z	Nivel de significación (α)	
		Una cola	Dos colas
99.0	2.33	0.01	0.02
97.5	1.96	0.025	0.05
95.0	1.64	0.05	0.1
90.0	1.28	0.1	0.2
85.0	1.04	0.15	0.3
80.0	0.84	0.2	0.4
75.0	0.67	0.25	0.5
70.0	0.52	0.3	0.6
60.0	0.25	0.4	0.8

CONFIDENCIALIDAD

Se cuenta en la Institución con los protocolos de protección del expediente clínico, con acceso a la información solamente por el personal autorizado de acuerdo al programa ISO/IS27002. Los sujetos de estudio fueron identificados numéricamente, sin datos personales de identificación.

IV.RESULTADOS

En el periodo de estudio se analizaron un total de 1253 resultados de enfermedad mínima residual, obteniendo un total de 990 resultados negativos y 263 resultados positivos para los marcadores asociados a leucemia; tomando únicamente de interés los casos positivos.

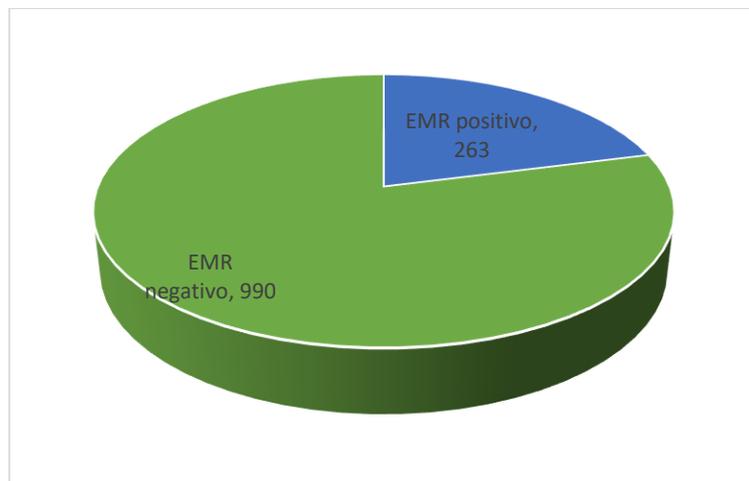


Figura 4. Cantidad de casos de enfermedad mínima residual de LLA-B. Dentro de esta población de interés se observa una frecuencia de género masculino del 55.1% en comparación del género femenino del 44.9%.

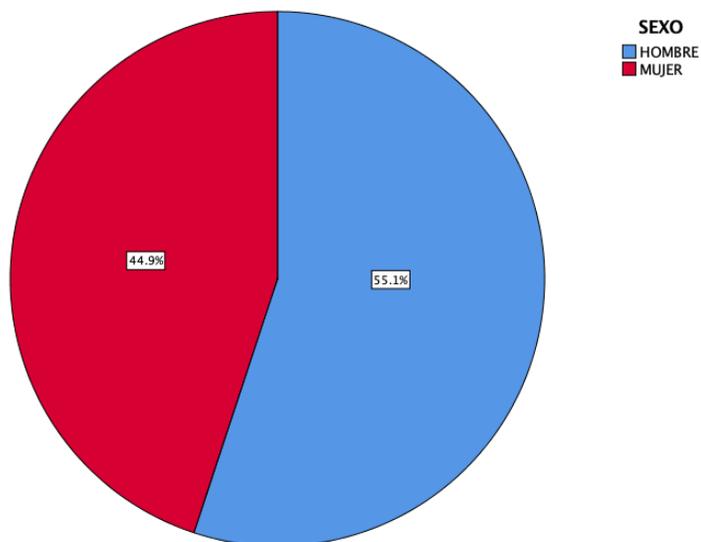


Figura 5. Distribución de pacientes por género, hombres 55.1% y mujeres 44.9%

Se observa una tendencia mayor de casos positivos a EMR en adultos con relación a jóvenes con una media de 19.9 (rango: 2-74).

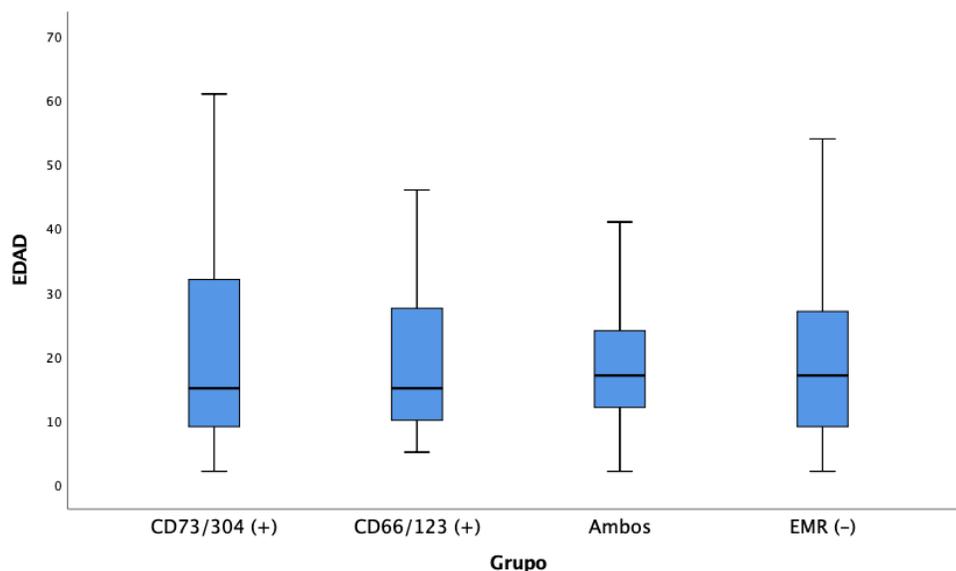


Figura 6. Distribución de edad por marcador positivo, doble positivo y negativos de EMR.

El análisis de EMR para LLA-B positivo se realizaron en base al protocolo de Euroflow para alcanzar una sensibilidad y especificidad alta requerida en base a la adquisición de cantidad celular obteniendo una mediana de 8.8 millones para todos los estudios realizados.

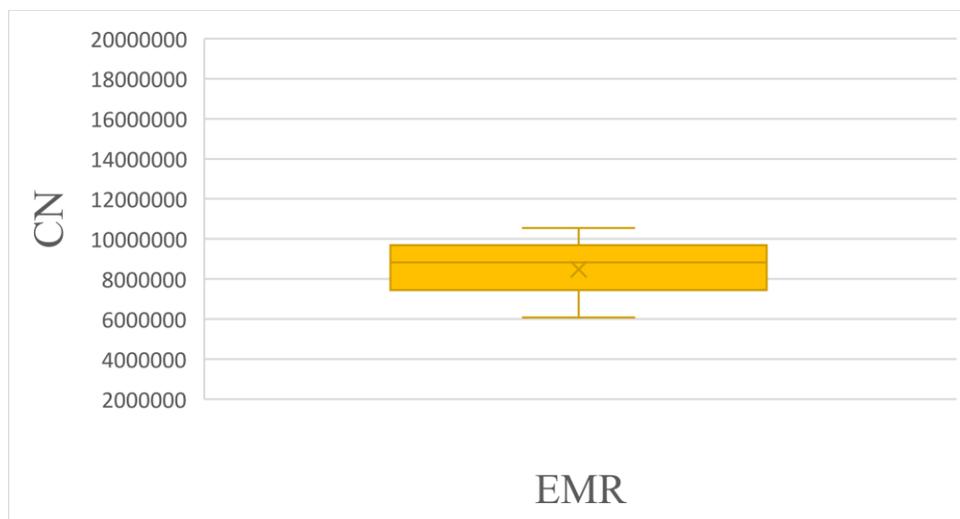


Figura 7. Distribución de la obtención de cantidad de las células adquiridas en todos los estudios de EMR realizados (1253).

En la distribución de los datos obtenidos de enfermedad mínima residual positiva (263) se observó positividad para el marcador CD73/CD304 un total de 231 casos positivos (87.8%) de EMR de los cuales 150 casos son dobles positivos (57%) y un 30.8% (81) casos simples positivos teniendo un 12.2% (32) solo para CD66c/CD123. Para el marcador CD66c/CD123 se encuentra un total de 182 casos positivos (69.2%) de EMR de los cuales 150 casos son dobles positivos (57%) y un 12.2% (32) casos simples positivos.

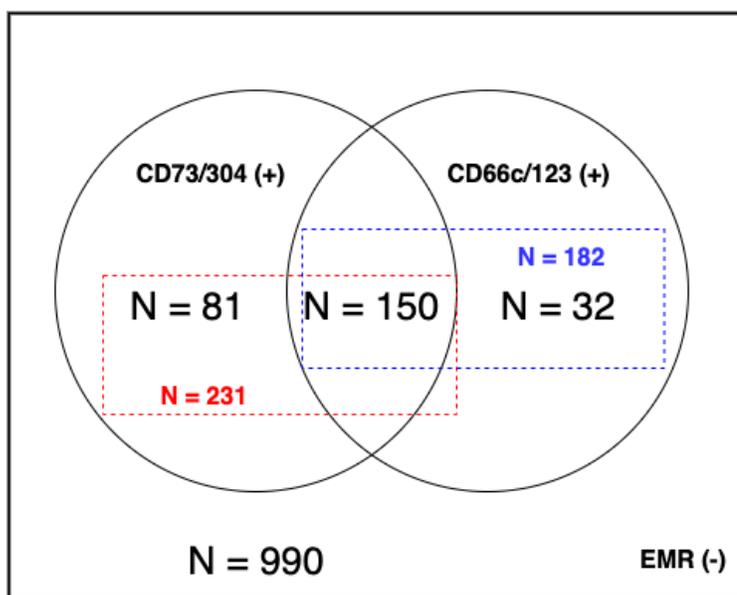


Figura 8. Distribución de casos dobles positivos (CD73/CD304 Y CD66c/CD123) con un total de 150. En simples positivos de CD73/CD304 teniendo 81 casos positivos obteniendo un total 231(150+81) casos positivos para CD73/CD304 y 32 restantes únicamente para CD66c/CD123 sumando un total de 263 (231+32) casos positivos para EMR. En simples positivos para CD66c/CD123 teniendo 32 casos positivos obteniendo 182 (150+32) casos positivos para CD66c/CD123.

V.DISCUSIÓN

La evaluación de EMR por citometría de flujo se ha convertido en una herramienta muy útil, sensible y específica, comparable con técnicas moleculares, por medio de anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromos, siguiendo las guías y recomendaciones estandarizadas por Euroflow.⁷

En la actualidad las inmunoterapias dirigidas a este tipo de leucemias han evolucionado, tal es el caso de la terapia monoclonal Anti-CD19 (blinatumomab) para LLA-B, donde se han realizado estudios evaluando la sobrevivencia y eficiencia a comparación de otras quimioterapias convencionales.¹⁹

La terapia monoclonal es cada vez más utilizada en pacientes con LLA-B por su eficacia, aunque en la actualidad el costo de este tratamiento es elevado, eventualmente será accesible para pacientes de bajos ingresos.

Parte de la estrategia de análisis para la búsqueda de células B malignas se basa en la selección de las células CD19+ y su comportamiento fenotípico. La inmunoterapia dirigida contra este marcador causa interferencia para la detección de CD19 con el anticuerpo monoclonal utilizado en la citometría de flujo, al ser bloqueado el epítipo de esta molécula en la célula maligna podría ocultarse la población leucémica de interés.²⁰

Para tratar de resolver este inconveniente se propone añadir un marcador específico de células B, como CD22, que se expresa en la superficie de la mayoría de leucemias y linfomas de células B.²¹

Para lo anterior sería necesario agregar un tercer tubo que incluyera anti-CD22 al protocolo ya estandarizado, o bien la sustitución de uno de los marcadores asociados a leucemia por CD22. Si se optara por la implementación de un tercer tubo implicaría aumento del costo de la prueba tanto para el laboratorio como para el paciente, por lo cual la opción más conveniente sería la sustitución de un marcador por otro, siempre y cuando

se pruebe en un estudio prospectivo que con dicha sustitución se mantienen la sensibilidad y especificidad actuales de la citometría de flujo para el diagnóstico oportuno de EMR. Por ello, en el presente trabajo se determinó cuál es el marcador asociado a leucemia menos frecuente en la detección de EMR, para posteriormente sustituirlo en un futuro, previos estudios de validación de dicha estrategia.

CONCLUSION

Se demostró que el marcador CD73/CD304 tiene la mayor frecuencia (87.7 %) en la detección de EMR en la LLA-B en nuestra población, mientras que el marcador CD66c/CD123 tiene una menor representación (69.2 %).

PERSPECTIVAS

A futuro es necesario considerar las siguientes perspectivas para determinar la estrategia óptima para el diagnóstico oportuno de EMR en pacientes con LLA-B:

- 1.-Analizar simultáneamente los marcadores monoclonales CD73/CD304, CD66c/CD123, y CD22.
- 2.-Comparar de manera prospectiva la sensibilidad y especificidad de detección de EMR por medio de CD22 y CD66c/CD123.
- 3.-Evaluar los costos de sustitución o adición de los diferentes anticuerpos monoclonales empleados en el estudio de EMR por citometría de flujo.

VI.REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.-Cuellas Mendoza M, Chavez Sanchez F, Dorantes Acosta E, et al. Aberrant immunophenotypes in acute lymphoblastic leukemia. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* 2020; 77:287-292. <http://doi.org/10.24875/BMHIM.20000171>
- 2.- Terwilliger T, Abdul M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J.* 2017; 7:577. <https://doi.org/10.1038/bcj.2017.53>
- 3.-Wohlfahrt AB, Hannel L, Oliveira LZ, et al. The importance of immunophenotyping by flow cytometry in distinction between hematogones and B lymphoblasts. *J Bras Patol Med Lab.*2017;1:7–12. <http://doi.org/10.5935/1676-2444.20150002>
- 4.- Theunissen P, Mejstrikova E, Sedek L, et al. Standardized flow cytometry for highly sensitive MRD measurements in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Am Soc Hematol, Blood.*2017;129:347–357. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-07-726307>
- 5.- Keegan A, Charest K, Schmidt R, et al. Flow cytometric minimal residual disease assessment of peripheral blood in acute lymphoblastic leukaemia patients has potential for early detection of relapsed extramedullary disease. *J Clin Pathol.* 2018; 71:653-658. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2017-204828>
- 6.- Brüggemann M, Kotrova M. Minimal residual diseases in adult ALL: technical aspects and implications for correct clinical interpretation. *Blood Adv.*2017; 1:2456–2466. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2017009845>.
- 7.- Glier H, Heijnen I, Hauwel M, et al. Standardization of 8-color flow cytometry across different flow cytometer instruments: A feasibility study in clinical laboratories in Switzerland. *J Immunol Methods.*2019;475:112348. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2017.07.013>
- 8.- In Suk K. Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia: technical aspects and implications for clinical interpretation. *Korean J Hematol.*2020; 55:19–26. <https://doi.org/10.5045/br.2020.S004>.
- 9.- Das N, Gupta R, Gupta SK, et al. Critical evaluation of the utility of pre- and post-therapy immunophenotypes in assessment of measurable residual disease in B-ALL. *Ann Hematol.*2021; 100:2487–2500. <http://doi.org/10.1007/s00277-021-04580-2>.

- 10.- Correia RP, Bento LC, Sousa FA, et al. How I investigate minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Int J Lab Hematol.*2021;43:354–363. <https://doi.org/10.1111/ijlh.13463>
- 11.- Juárez Avendaño G, Méndez Ramírez N, Gómez Almaguer D, et al. Molecular and cellular markers for measurable residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Bol Med Hosp Infant Mex.*2021; 78:3. <https://doi.org/10.24875/bmhim.20000155>
- 12.- Aldoss I, Clark M, Song JY, et al. Targeting the alpha subunit of IL-3 receptor (CD123) in patients with acute leukemia. *Hum Vaccin Immunother.*2020; 10:2341–2348. <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1788299>.
- 13.- Lanza F, Maffini E, Rondoni M, et al. CD22 expression in B-cell acute lymphoblastic leukemia: Biological significance and implications for inotuzumab therapy in adults. *Cancers (Basel).*2021;12:303. <https://doi.org/10.3390/cancers12020303>.
- 14.- Gökbüget N, Dombret H, Bonifacio M, et al. Blinatumomab for minimal residual disease in adults with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood.*2018;131:1522–1531. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-08-798322>
- 15.- Salvaris R, Fedele PL. Targeted therapy in acute lymphoblastic leukaemia. *J Pers Med.*2021; 11:715. <https://doi.org/10.3390/jpm11080715>.
- 16.- Aldoss I, Forman SJ, Pullarkat V, Acute lymphoblastic leukemia in the older adult. *J Oncol Pract.*2019;15:67–75. <https://doi.org/10.1200/JOP.18.00271>.
- 17.- Franquiz MJ, Short NJ. Blinatumomab for the treatment of adult B-cell acute lymphoblastic leukemia: Toward a New Era of targeted immunotherapy. *Biologics: targets and therapy.*2021;14:23-34. <https://doi.org/10.2147/BTT.S202746>.
- 18.- Coustan Smith E, Song G, Clark C, et al. New markers for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Blood, Am. J. Hematol.*2011;117:6267-6276. <http://doi:10.1182/blood-2010-12-324004>
- 19.- Kantarjian H, Stein A, Gokbuget N, et al. Blinatumomab versus Chemotherapy for Advanced Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med.*2017; 376:836–847. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1609783>
- 20.- Fuentes Chávez E, Méndez Ramírez, Jaime-Pérez J, et al. A Method for the Elution of Anti-CD20 with an EDTA/Glycine Acid Solution for Accurate

Immunophenotyping of B Lymphocytes Sensitized with Rituximab, *Am J Clin Pathol.*2022;157:685–690. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqab176>

21.- Clark EA, Giltiy NV. CD22: A Regulator of Innate and Adaptive B Cell Responses and Autoimmunity. *Front Immunol.*2018;9:2235. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02235>