

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS

Validación de CD10 como indicador de riesgo y de CD66/CD123, /CD73/CD304 como marcadores de enfermedad residual medible en una cohorte con leucemia linfoblástica aguda del noreste de México.

Presenta:

L.Q.C. Ricardo Mota Pablo

Para obtener el grado de Maestría en Laboratorio de Hematología

Julio 2024

Validación de CD10 como indicador de riesgo y de CD66/CD123, /CD73/CD304 como  
marcadores de enfermedad residual medible en una cohorte con leucemia  
linfoblástica aguda del noreste de México.



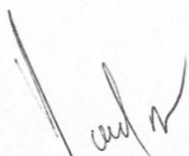
---

Dr. med. José Carlos Jaime Pérez  
**Director de Tesis**



---

Dr. med. Óscar González-Llano  
**Codirector de la comisión de Tesis**



---

Dr. David Gómez Almaguer  
**Miembro de la comisión 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 mis hermanas por apoyarme en todo momento y estar siempre presente.

A mis amigos por escucharme cuando lo necesitaba y alentarme a siempre seguir adelante y a todas aquellas personas que sumaron algo importante en mi vida.

## **AGRADECIMIENTOS**

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

A la QCBEH. Nereida Méndez Ramírez por brindarme su tiempo y 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 la QCBEH. Rosario Salazar Riojas, Químicas y Químicos del Laboratorio de Hematología que con paciencia y respeto compartieron sus conocimientos para formarme profesionalmente.

## Resumen

La Leucemia Linfoblástica Aguda es el tipo de cáncer más frecuente durante la infancia y pubertad siendo una de las principales causas de muerte en México y Latinoamérica.

En la década de los 80s la expresión del marcador CD10 (CALLA) al diagnóstico era de muy mal pronóstico debido a que se asociaba a recaídas tempranas y un desenlace fatal para el paciente, a medida que se fueron descubriendo marcadores específicos se implementó la evaluación de la Enfermedad Medible Residual (EMR) la cual proporciona un factor de riesgo predictivo e independiente para anticipar la recaída siendo una herramienta útil en el manejo clínico de la leucemia linfoblástica aguda (LLA). Actualmente los marcadores utilizados en la EMR tienen mayor especificidad alcanzando una sensibilidad muy alta para detectar células leucémicas.

El trabajo realizado fue un análisis bidireccional en una población pediátrica con Leucemia Linfoblástica Aguda B para poder establecer si existe correlación entre la expresión de CD10 y de CD66c/CD123 y CD73/CD304 como indicador de riesgo de recaída.

Los datos analizados indican que no existe una correlación lineal entre la ausencia de CD10 al diagnóstico de LLA con la expresión de los marcadores de EMR. Los datos clínicos en el grupo CD10- no tienen correlación, no podemos concluir si existe o no mayor riesgo de recaída si no está expresado este marcador.

La investigación demostró que un antígeno CD10 negativo al diagnóstico de LLA no fue un factor pronóstico para mortalidad en los pacientes de esta cohorte, con un OR de 3.519 (IC 95% 0.548 - 22.574),  $p = 0.185$  en el análisis de regresión logística, y una R cuadrada de 0.017,  $p=0.163$  en el análisis de regresión lineal.

# INDICE

<i>Introducción</i> .....	7
<b>Ontogenia de linfocitos B</b> .....	9
<b>Maduración linfoide normal</b> .....	11
<b>Maduración linfoide B</b> .....	11
<b>Fisiopatología</b> .....	14
<b>Epidemiología</b> .....	16
<b>Clasificación</b> .....	17
<b>Enfermedad residual medible</b> .....	19
<b>Resistencia farmacológica</b> .....	22
<b>Inmunofenotipo de la LLA-B</b> .....	22
<b>Inmunofenotipos en la enfermedad medible residual</b> .....	23
<b>Marcadores específicos en enfermedad residual medible</b> .....	23
CD10 .....	24
CD73 .....	24
CD304 .....	25
CD66c .....	25
CD123 .....	25
<b>Principio de la citometría de flujo</b> .....	26
<b>Método de citometría de flujo</b> .....	26
<b>Muestras y reactivos en citometría de flujo</b> .....	28
<b>Análisis de citometría de flujo</b> .....	28
<b>Análisis de datos</b> .....	29
<i>Justificación</i> .....	29
<i>Pregunta de Investigación</i> .....	30
<i>Hipótesis</i> .....	30
<i>Objetivo general</i> .....	30
<i>Objetivos específicos</i> .....	30
<i>Materiales y Métodos</i> .....	31
<b>Criterios de inclusión:</b> .....	31

<b>Criterios de exclusión .....</b>	<b>31</b>
<b>Variables del estudio .....</b>	<b>31</b>
<b>Criterios éticos .....</b>	<b>32</b>
<b>Categoría de riesgo.....</b>	<b>32</b>
<i>Análisis estadístico .....</i>	<i>32</i>
<i>Resultados.....</i>	<i>33</i>
<i>Discusión .....</i>	<i>50</i>
<i>Conclusiones .....</i>	<i>53</i>

## Introducción

La evaluación de la Enfermedad Medible Residual (EMR) proporciona un peligro predictivo e individual para predecir recaída utilizándose como herramienta en el manejo clínico de leucemia linfoblástica aguda (LLA).<sup>(1) (2)</sup> Es un potente predictor en la respuesta general en la quimioterapia de la LLA.<sup>(3)</sup>

Después de la reacción en cadena de polimerasa cuantitativa (qPCR), la citometría de flujo (CMF) es el segundo método para evaluación la EMR debido a que es más rápida y rentable, actualmente la citometría de flujo utiliza dos enfoques: el inmunofenotipo asociado a la leucemia y el de las células normales.<sup>4</sup> La LLA es la consecuencia de la transformación maligna de una célula progenitora linfoide inmadura que tiene la capacidad de expandirse y formar un clon de células progenitoras idénticas bloqueadas en su maduración, estos eventos se producen durante el desarrollo de la estirpe linfoide.<sup>(5)</sup> Los precursores linfoides tienen una alta tasa de proliferación y de reordenamientos genéticos que favorecen la aparición de mutaciones espontaneas y otras alteraciones genéticas que facilitan la transformación maligna, la terapia inicial elimina estas clonas predominantes que son más proliferativas dejando subclonas que guardan o adquieren aberraciones que confiere resistencia a agentes quimioterapéuticos específicos, con menos frecuencia los clones de recaída no comparten alteraciones genéticas con los clones de diagnóstico.<sup>(5,6)</sup> Las leucemias se caracterizan por ser un grupo heterogéneo de enfermedades con infiltración a la médula ósea, sangre periférica y otros tejidos por células leucémicas, provocadas por mutaciones somáticas de las células progenitoras, de acuerdo con el estirpe celular perjudicado ya sea mieloides o linfoides; su evolución clínica varía desde las que evolucionan rápidamente a la muerte hasta las que avanzan con lentitud, agudas o crónicas, respectivamente.<sup>(7)</sup> La característica distintiva de la leucemia Linfoblástica aguda son las alteraciones cromosómicas y genéticas involucradas en la hematopoyesis (diferenciación y proliferación) de los precursores linfoides.<sup>(8)</sup>

Para realizar el diagnóstico de la leucemia primero se observa la morfología de la médula ósea, después se identifica el linaje y estadio afectado, por ejemplo, linaje T, Pro-B, Pre-B y Pro/Pre-B, el análisis cromosómico por medio de estudios de citogenética cumple un importante papel en el abordaje de la enfermedad debido a que el cariotipo es un patrón de referencia, como también lo son los factores clínicos y biológicos aceptados.<sup>(7)</sup>

Otros factores relevantes son la determinación del índice de DNA, el cariotipo y la presencia o ausencia del antígeno común de la leucemia linfoblástica aguda (CALLA) que corresponde al antígeno CD10 determinado por citometría de flujo.<sup>(9)</sup> Cuando se analizan estos factores se observa que el riesgo de mortalidad es 2.15 veces mayor con índices de DNA <1.16 y 1.91 junto con la presencia del cromosoma Philadelphia (Ph+) lo que indica la necesidad de intensificación de la quimioterapia.<sup>(10)</sup>

Las leucemias linfoblásticas están divididas en dos grandes variantes, en primer lugar están las células linfocíticas de tipo B con una frecuencia del 76% y la segunda corresponde a las de tipo T en un 20%, en México se ha reportado una frecuencia de LLA-T en pacientes pediátricos del 6%.<sup>(10)</sup>

La LLA carece de hallazgos morfológicos y citoquímicos característicos por lo que es primordial llevar a cabo la determinación del inmunofenotipo por citometría de flujo que reconoce antígenos en la membrana o citoplasma, alguno de estos específicos para poblaciones celulares leucémicas.<sup>(7)</sup>

Los antígenos representados por los cluster of differentiation (CD) se encuentran en la superficie o citoplasma de los leucocitos y en los blastos malignos y son reconocidos por un anticuerpo monoclonal marcado con una molécula fluorescente; se estudian en el laboratorio por medio de un citómetro de flujo para determinar con precisión el origen de las células leucémicas ya sea linfóide o mielóide. En su mayoría los antígenos en las células leucémicas de la LLA no son específicos por lo tanto se requiere de un panel de anticuerpos para establecer el diagnóstico y diferenciar las subclases inmunológicas.<sup>(7)</sup>

Las leucemias linfoblásticas en su mayoría corresponden al linaje de tipo B y otra parte son linfomas no hodgkin. Las células de la leucemia linfoblástica aguda de tipo B en su mayoría expresan CD19, CD10 y 50% expresan CD20. La frecuencia de este tipo de leucemia de tipo B es muy alta en el noroeste de México en un 94% y de células T es alrededor del 6%. Las células T expresan antígenos CD2, CD5, CD7 estos dos últimos hacen más agresiva la enfermedad y cuando no expresan CD4 y CD8 tienen un pronóstico menos favorable.<sup>(11)</sup>

Los precursores de células B reconocidos morfológicamente representan una célula normal en médula ósea comportamiento que forma una vía de maduración continua que consta de tres etapas principales de maduración.<sup>(12)</sup> En las últimas décadas se ha demostrado diferencias inmunofenotípicas asociadas con precursores de células B normales y leucémicos a pesar de



que expresan antígenos específicos se alteran con frecuencia en un grado variable, estas variaciones inmunofenotípicas se pueden presentar en el 98% de la población con LLA-B a pesar de tener una frecuencia alta, estas diferencias pueden ser sutiles o estar moduladas para inducir una regulación alta o baja de los marcadores inestables como el CD10, CD20, CD34. <sup>(12)</sup> La administración de diferentes tipos de quimioterapia también podrían inducir cambios significativos y variables en la proporción de células precursoras B normales lo que puede dificultar diferenciar de las células leucémicas persistentes en la EMR. <sup>(12,13)</sup> Estudios de investigación demuestran que el marcador CD73 se expresa con mayor frecuencia de lo normal en un 66% al diagnóstico en LLA-B, mientras tanto el CD304 en un 59%, su expresión se detectó en porcentajes similares para LLA común y LLA-pre B mientras que se encuentra en frecuencias significativamente más bajas en LLA-pro B, también se encuentra una asociación con el gen de fusión ETV-RUNX1. <sup>(12)</sup> En cuanto al porcentaje de expresión de CD73 y CD304 en el día +15 después de la terapia son estables o más altos que al momento del diagnóstico. <sup>(7)</sup>

### **Ontogenia de linfocitos B**

Las células hematopoyéticas dan lugar a los linfocitos B mediante un proceso altamente regulado y continuo en el que se pierden paulatinamente los potenciales de diferenciación múltiple y se adquieren funciones especializadas de linaje. Los conocimientos en cuanto a la cinéticas de proliferación y el descubrimiento de los mecanismos moleculares de expresión de sus receptores de antígeno (BCR) fueron piedras angulares para comprender toda la ontogenia de células B. <sup>(14)</sup> La célula de linaje B más precoz en médula es el linfocito pro-B estos no tienen inmunoglobulina de superficie aun que inician el reordenamiento (rearreglo DH-JH) del ADN del gen de la cadena pesada  $\mu$  gracias a que en este estadio se expresan por primera vez las proteínas RAG. <sup>(15)</sup> La enzima recombinasa RAG1 marca el inicio del programa de diferenciación linfoide junto con la recombinación somática, así como las cascadas de señalización implicadas en la activación linfocitaria. <sup>(14)</sup> La célula hematopoyética troncal se caracteriza por sus propiedades biológicas que definen a esta célula, autorrenovación y potencial de diferenciación múltiple.

La ontogenia en los linfocitos inicia con célula troncal que se diferencia de manera gradual y continua en los progenitores que restringen su compromiso de linaje.

En primera fase de la ontogenia de linfocitos B las células primitivas tienen capacidad de reconstruir a largo plazo el sistema hematopoyético, el antígeno CD34 es un marcador característico de las células troncales hematopoyéticas de los progenitores multi y oligopotenciales. Solo el 0.5-5% de las células humanas expresan CD34 también expresan antígenos como CD90, CD117, CD133 y VEGFR2 que las caracteriza de otras células en estadios más avanzados. En la segunda fase de maduración están los progenitores multipotenciales son los más heterogéneo del sistema y estos han perdido la capacidad de autorrenovación y reconstitución a largo plazo, después de esta fase aparecen los progenitores oligopotenciales que han aumentado su capacidad de proliferación, pero disminuido su potencial de diferenciación que se restringen a dos o tres tipos celulares. Los precursores unipotenciales son altamente proliferativos y reconocibles por su morfología esta fase comprende del 90% de las células hematopoyéticas residentes en la cavidad de la médula ósea, por ultimo las células diferenciadas y en vías de maduración son morfológica, fenotípica y funcionalmente distintas que se dividen en dos grandes grupos mieloides y linfoides. <sup>(14)</sup>

En términos generales en la Médula ósea (MO) están presentes dos poblaciones principales de células CD34+. La población mayoritaria está constituida por células Stem y precursores hematopoyéticos CD34+ que carecen de expresión de CD73, mientras que la población minoritaria incluye las células endoteliales CD34+, CD10-, CD73hi y CD81hi. <sup>(16)</sup>

Los precursores hematopoyéticos CD34+ representa una proporción minoritaria alrededor del 1% de células nucleadas en la médula ósea y menos del 0.1% de precursores CD34+ en su mayoría no comprometidos circulan en sangre periférica (SP) cuya función es rellenar los nichos medulares a distancia para mantener los niveles constantes de hematopoyesis en todo el organismo. Algunos precursores CD34+ en SP muestran un fenotipo inmaduro típico de célula Stem no comprometida y una pequeña proporción de ellas presenta compromiso madurativo a línea de mastocito (CD45int, CD34+, CD117hi, HLA-DR-/int, CD203c+), neutrófilo (CD45lo/int, CD34+, CD117+, HLA-DRint, CyMPO+, NuTdT-, CD19-). Mientras que en MO normal los precursores CD34+ no comprometidos apenas representan < 10% de todos los precursores CD34+, mostrando un fenotipo CD34hi, CD38lo, CD71lo, HLADR+, CD117+, CD133hi, CD33+, y CD13+, en ausencia de otros marcadores asociados a línea linfóide (p. ej., CD19 -, CD7-, CD56 -,NuTdT-) y mielóide (p. ej., CyMPO- CyEPO-

CD11b- CD15 - CD16- CD35- CD36- CD41 - CD42a- CD61 - CD64- CD71lo CD105- CD123lo CD203c-).(14,16)

En términos globales, cerca del 90% de los precursores CD34+ fenotípicamente muestran compromiso madurativo a las distintas líneas hematopoyéticas, definiéndose como línea de granulocito o de neutrófilo (CD34+CyMPO+), linfoide B (CD34+NuTdT+) y eritroide (CD34+ CD105+ CD36+) los más abundantes: alrededor del 33%, 23% y 35% de todas las células hematopoyéticas CD34+ de MO, respectivamente.<sup>(16)</sup>

### **Maduración linfoide normal**

En la médula ósea normal del total de los precursores CD34+ solo el 25-30% corresponde a los precursores linfoides. Se ha descrito la existencia de un precursor linfoide común CD34+ CD10+ CD45RA+, en MO humana, los precursores linfoides característicamente incluyen precursores T/NK CD34+ CD7+, y por otra parte precursores CD34+ NuTdT+ comprometidos a línea B. En contraposición con los precursores B que maduran a linfocitos B inmunocompetentes con expresión de inmunoglobulinas (Ig) de superficie (sIg+) en la MO.

Los precursores no comprometidos y los precursores CD34+ CD7+ migrarán desde la MO a la SP, y desde esta algunos alcanzarán el timo donde determinarán su diferenciación y maduración a distintas subpoblaciones funcionales de linfocitos T.

### **Maduración linfoide B**

La diferenciación de los precursores a linfocitos B inmunocompetente ocurre por completo en la MO. Durante la maduración de los linfocitos B existen cuatro estadios principales, el primero célula pro-B I que expresa los siguientes marcadores: NuTdT, CyCD79a, CD22, HLADR, CD34, CD38, sin expresión de CD10, CD19; el segundo son células Pre-BI con expresión de marcadores; NuTdT, CyCD79a, CD22, HLADR, CD34, CD38, CD10, CD19; el tercero corresponde a células pre-BII grande con expresión de CyCD79a, CD22, HLADR, CD38, CD10, CD19 y CD20 sin expresión de CD34, NuTdT y Cylgu sIg ; y por último el cuarto estadio de células pre-B II pequeña con expresión CyCD79a, CD22, HLADR, CD38, Cylgu, CD10, CD19, sin expresión de NuTdT, CD34, CD20 y smIg.. Posteriormente, el precursor pre-B II daría lugar a los linfocitos B inmaduros (o transicionales) que pierden

expresión de CD38lo y CD10lo, adquieren positividad para CD20hi, CD5+ y smigM+ junto a expresión progresivamente mayor de smigD-/+ hasta adquirir el fenotipo típico de los linfocitos B maduros naïve con expresión de CyCD79a, CD22, HLADR, CD19, CD20, smIgM+D+ y ausencia de NuTdT, CD34, CD38/lo, CD10, CD5. Estudios recientes muestran la posible existencia de distintas vías paralelas de diferenciación B lo cual explicaría algunas aparentes inconsistencias en los patrones de expresión de algunos antígenos a lo largo de la vía clásica principal de maduración B y que afectan sobre todo a la expresión de CD34, NuTdT, CD20 y CyIg. Lo que sugiere la existencia de múltiples vías paralelas de diferenciación B fenotípicamente diferentes.<sup>(16)</sup>

### Diferenciación de linfocitos B normal

La diferenciación del linfocito inmaduro hasta el estadio de linfocito B maduro virgen o naïve tiene lugar en la médula ósea y se produce a lo largo de toda la vida del individuo. Clásicamente es posible describir al menos cinco etapas globales de diferenciación : células Pro-B, células Pre-BI, células Pre-BII, células B inmaduras y células B maduras vírgenes.

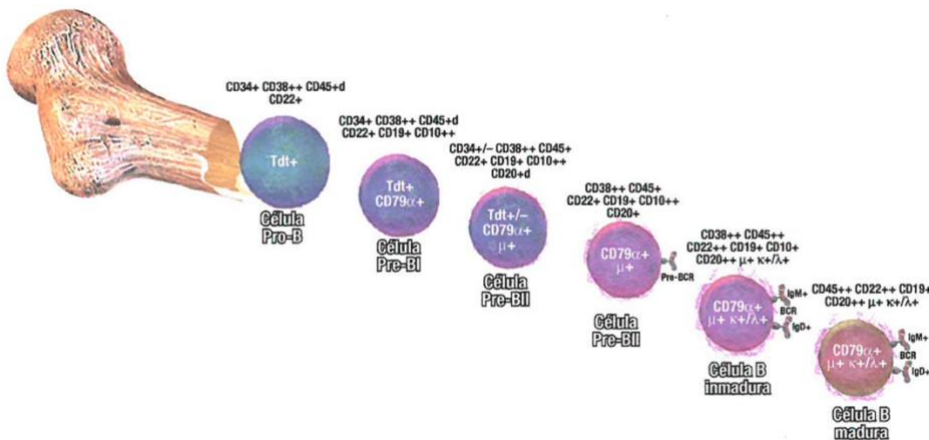


Fig.1. Principales etapas de diferenciación de linfocitos B.

Las células Pro-B son escasas habitualmente y poco representadas en adquisiciones de baja sensibilidad. Aunque comprometidas con linaje B carecen todavía de CD19 en este estadio expresaran CD22 junto con marcadores de inmadurez como CD45 débil, CD34, CD38 intenso y la enzima nuclear desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT).<sup>(16)</sup> Cuando el

reordenamiento es prolífico se expresa la cadena pesada de la inmunoglobulina  $\mu$  en el citoplasma de linfocito como resultado de un reordenamiento VH-DH-JH productivo, denominándose linfocitos pre-B.<sup>(15)</sup> En las células Pre-BI existe todavía TdT son las primeras células que expresan CD19+ (superficie) y CD79+ (citoplasmático), presentan elevada intensidad de CD10 y pérdida de CD34.<sup>(15,16)</sup>

En el estadio Pre-BII las células pierden marcadores de inmadurez y adquieren CD20. Los complejos formados por  $\mu$  y las cadenas intermedias denominados receptores de linfocitos pre-B (pre-BCR) se expresan en baja cantidad en la superficie.<sup>(17)</sup> Los pre-BCR productivos inhiben de forma irreversible el reordenamiento del locus de la cadena pesada del otro cromosoma. Si el primer reordenamiento no es productivo debido a las deleciones o cambios del marco de lectura los genes del segundo cromosoma alélico pueden reordenarse asegurando que un linfocito B solo posea un reordenamiento productivo (exclusión alélica)<sup>(17,18)</sup>. Si ninguno de los dos reordenamientos es productivo el linfocito B muere por apoptosis. Los receptores pre-BCR se asocian a otras proteínas conocidas como  $Ig\alpha$  e  $Ig\beta$  que actúan en la transducción de señales del receptor del linfocito B.<sup>(17,19)</sup> Las señales transmitidas por el pre-BCR estimulan el reordenamiento de las cadenas ligeras.<sup>(15,17,19)</sup> Las enzimas RAG reordenan (rearreglo VL-JL) inicialmente los genes de cadenas ligeras  $\kappa$  si no son productivos ninguno de los dos alelos se inicia el reordenamiento de las cadenas ligera  $\lambda$ . En el humano la proporción  $\kappa/\lambda$  en la inmunoglobulina de superficie de los linfocitos B maduros es 1.5:1<sup>(17,19)</sup>. Cuando se produce un rearreglo productivo y se produce la cadena ligera ésta se asocia con la cadena pesada  $\mu$  sintetizada previamente para formar el receptor  $IgM$ .<sup>(15-17,19)</sup>

Lo más característico de esta etapa es la aparición de la cadena pesada ( $\mu$ ) que durante el desarrollo en la médula ósea la síntesis de inmunoglobulina se restringe al isotipo  $IgM$  detectándose en el citoplasma ( $\mu c$ ). Cuando la célula puede ensamblar la cadena ligera, Kappa o lambda se expresa la  $IgM$  en la superficie junto con el heterodímero de señalización  $CD79\alpha/CD79\beta$ , constituyendo el receptor de linfocito, que está presente desde el estadio de linfocito inmaduro.

Durante esta etapa la expresión de los antígenos CD45, CD22 y CD20 representan la característica de un linfocito B totalmente maduro, aunque con expresión débilmente de CD10 y CD38. Estas células B se pueden presentar en la sangre periférica denominadas

células B transicionales y expresan receptor de células B funcional con inmunoglobulinas de tipo M y D. En la fase final de la diferenciación pierden totalmente el CD10 y CD38 teniendo un inmunofenotipo de linfocitos B maduro virgen que expresa CD19, CD20, IgM, IgD CD45 y ausencia de CD27.<sup>(15,16,20)</sup>

## **Fisiopatología**

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es una alteración maligna de las células progenitoras hematopoyéticas en la médula ósea, la sangre periférica y otros sitios extramedulares.<sup>(21)</sup> se origina a partir de una célula madre linfoide con daño genético originando una transformación maligna y una proliferación descontrolada.<sup>(7)</sup> Estas alteraciones se forman durante el desarrollo de la estirpe linfoide. Su elevada capacidad de proliferación y reordenamiento favorece la aparición de mutaciones y otras alteraciones citogenéticas que conllevan a una transformación maligna.<sup>(20)</sup>

La LLA atraviesa diferentes estadios leucémicos y la transformación de un protooncogén no produce células tumorales, necesita múltiples genes alterados para producir una célula leucémica. En los infantes diagnosticados con LLA-B se observa re-arreglos alterados de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (IgH) en el 95% de los casos y re-arreglos adicionales en el gen del receptor de células T (TCR) V $\delta$ 2-D $\delta$ 3.<sup>(22)</sup> Los pacientes que experimentan re-arreglos adicionales en periodos tan cortos como cuatro meses tienen un diagnóstico menos favorable, se ha demostrado que los infantes con leucemia linfoblástica aguda en etapas intrauterinas desarrollaron mutaciones en su genoma las cuales no fueron suficientes para el desarrollo de la leucemia, pero que junto con otros cambios adicionales desarrollaron la enfermedad a los cuatro años de edad. Algunos agentes teratogénicos están relacionados con estas alteraciones genómicas entre los cuales están la exposición a radiaciones, sustancias químicas y virus asociados a infecciones intrauterinas como los polimavirus humanos JC y BK. Algunas de las alteraciones que se dan en la etapa intrauterina se encuentran la traslocación MLL-AF4 [t(12;21)], t(12;21), cuando comienzan el rearreglo de los genes IgH y las aberraciones cromosómicas numéricas; mientras que mutaciones como E2A-PBX1 [t(1;19)] ocurren principalmente en etapas extrauterinas, el periodo de aparición

de estas mutaciones intrauterinas puede llegar a presentarse hasta los 12 años. Solo el 2% de blastos expresan Ig en su superficie y el 80% se origina en las células B.<sup>(23)</sup>

Los blastos no dejan de expresar sus antígenos, pero si disminuye su expresión, incluso algunos pacientes presentan anticuerpos contra sus mismos epítopes presentando una mejor respuesta a los tratamientos. El 3° % de los pacientes con leucemia linfoblástica expresan antígenos de línea mieloides como el CD13 y CD33, que actualmente no son marcadores de mal pronóstico. Entre el 75-80% de los pacientes tienen alteraciones de tipo numéricas o estructurales en los cromosomas. Las hiperdiploidias (>50 cromosomas) son frecuentes en la infancia y los pacientes muestran características clínicas favorables, mientras que la pseudo diploidía es más frecuente en el adulto y está relacionado a un mal pronóstico, por otra parte, las traslocaciones esta relacionadas a un pronóstico desfavorable. En cuanto a la LLA-T a diferencia de la LLA-B rara vez presenta aberraciones cromosómicas visibles.<sup>(4)</sup>

La traslocación más frecuente es la del cromosoma filadelphia  $t(9;22)(q34;q11)$  observada en el 30% de los adultos y el 5% de niños. El punto de ruptura en el cromosoma 22 está dentro de la región del gen bcr (break clúster region), mientras que el cromosoma 9 se transloca por la region de protooncogén C-Abl. Los productos proteicos de este gen C-Abl posee actividad tiroquinasa necesaria para la transformación celular. Aunque el punto de ruptura puede varia de paciente en paciente la traslocación crea un gen híbrido con un producto proteico leucemiogénico. El extremo N-terminal de C-Abl es importante para su regulación, la proteína quimérica Bcr-Abl no puede ser regulada y expresa una actividad tirosinaquinasa constitutiva que ejerce su efecto a través de la ruta Ras actuando sobre los componentes Grb2 y Shc. La activación inadecuada de Ras es oncogénica. Por otra parte, la  $t(12;21)(p12;q22)$  es la anormalidad más común observada en las leucemia linfoblástica de la infancia apareciendo hasta en el 25 % de los casos. El producto de fusión de la proteína quimérica TEL/AML1 son factores de transcripción indispensables en la hematopoyesis, la competencia de TEL/AML1 por los promotores de AML1 favorece una expresión aberrante de genes como el receptor de interluquina-3, el receptor del factor estimulante de colonias de macrófagos y el TCR, lo que estimula una división celular desregulada.<sup>(24)</sup>Otras traslocaciones importantes observadas en la LLA son  $t(8;14)(q24;q32)$ ;  $t(1;19)(q23;p13)$  y  $t(4;11)(q21;q23)$ . Esta última, así como la aparición del cromosoma de Filadelfia, se asocian con una resistencia multi farmacológica y un desenlace fatal.

La presencia de factores de transcripción defectuosos favorece la aparición de células neoplásicas, por ejemplo, el NF-Kappa-B está relacionado en las respuestas celulares como las anti apoptóticas, inflamatorias, e inmunitarias. Este factor de transcripción puede verse afectado por genes ambientales, entre los que se encuentran el virus humano de la leucemia tipo 1 (HTLV-1). El genoma de los virus codifica una proteína llamada Tax que induce la expresión constitutiva de NF-Kappa-B obteniéndose una transcripción maligna de múltiples genes. <sup>(25)</sup>

## **Epidemiología**

La Leucemia linfoblástica aguda es el principal tipo de cáncer en la población pediátrica teniendo una incidencia del 75-80% con 41 casos por cada millón de habitantes en el mundo.<sup>(5)</sup> Un estudio epidemiológico realizado por el Centro Médico Nacional Siglo XXI encontró que este tipo de leucemia representa el 50% de los casos de cáncer en la infancia, mientras que en Estados Unidos es menor al 40%.<sup>(26)</sup> La edad con mayor incidencia esta entre los dos y cinco años de edad con un predominio en varones durante la edad puberal. (5) La población latina es más susceptible al desarrollo de LLA el St. Jude Children's Research Hospital en Estados Unidos, reporta que la incidencia de leucemias en ese país es mayor en niños hispanos en comparación con pacientes descendientes de poblaciones africanas, caucásicas y asiáticas. <sup>(10)</sup>

Las tasas de curación reportadas en los países pobres y medianos oscila entre el 51% y el 76% muy por detrás de las naciones de altos ingresos.<sup>(27)</sup>

El 80% de LLA se presenta en niños pero cuando se presenta en los adultos es una enfermedad devastadora, en Estados Unidos la incidencia es de 30 casos por millón de personas menores de 20 años, y se presenta mayormente entre los 3 y 5 años, su frecuencia varia significativamente según la raza y grupo étnico; 14,8 casos por millón de afrodescendientes, 35,6 por millón de blancos y 40,9 por millón de hispanos, se desarrolla con mayor frecuencia en niños que en niñas (relación hombre: mujer de 55% a 45%)<sup>(28)</sup>

Los factores genéticos tienen un papel importante en la etiología de las leucemias agudas y algunas traslocaciones cromosómicas, algunas enfermedades genéticas cursan con mayor incidencia de LLA (síndrome de Down, Klinefelter, neurofibromatosis, Schwachman, Bloom, Fanconi). La mayoría de los pacientes no tienen elementos hereditarios reconocidos,



hay otros factores ambientales como la exposición a las radiaciones ionizantes, el 1% de las leucemias en el adulto son secundarias las pruebas radiológicas realizadas durante su vida incrementan el riesgo de leucemia, la exposición a productos químicos como el benceno se asoció a LMA en el adulto, la leucemia en niños no está asociada a factores ambientales. Los virus cumplen un papel importante en el estudio de la etiología de las leucemias. Los estudios de asociación de todo el genoma han identificado variantes polimórficas en diversos genes (incluidos ARID5B, CEBPE, GATA3 e IKZF1) que están ligados con un mayor riesgo de LLA o subtipos específicos de LLA ).<sup>(28)</sup> Aunque en la mayoría de los casos aparece como una neoplasia maligna de *novo* en individuos previamente sanos, uno de los sellos distintivos de la LLA son las aberraciones cromosómicas pero no suficientes para generar leucemia.<sup>(28)</sup>

### **Clasificación**

Las leucemias agudas se clasifican según al tipo de célula progenitora que la origina en linfoblásticas y mieloblásticas, siendo más frecuentes las linfoblásticas, y dentro de estas, el fenotipo de las células precursoras B que representa el 80%-85% de los casos de LLA infantil.<sup>(11)</sup> Históricamente la LLA-B se ha clasificado basándose en criterios morfológicos franco-estadunidenses-británicos (FAB), en función del tamaño celular, el citoplasma, la vacuolización de los nucléolos y la basofilia, clasificando tres subtipos : L1, L2 y L3. La L1 presenta blastos homogéneos, núcleo regular, cromatina homogénea, nucleolos pequeños o inexistentes, basófila leve., en el tipo L2 el núcleo es irregular, cromatina heterogénea y nucléolos grandes., la L3 se caracteriza por presentar grandes blastos, nucléolos prominentes, abundante citoplasma, vacuolización que cubre el núcleo.

El fenotipo celular es la expresión de antígenos en la superficie o intracelulares que clasifican estirpes o linajes específicos, para poder ser determinados se utiliza la citometría de flujo basada en la reacción antígeno anticuerpo que se unen a fluorocromos interactuando con las proteínas de las células las cuales pasan a través de un haz de luz y por medio de un sistema informático se calcula el porcentaje de células que expresan esos antígenos.<sup>(11)</sup> Todo esto permite conocer el inmunofenotipo celular con fines diagnósticos y pronósticos en la LLA.

Para la clasificación de leucemia linfoblástica se incluyen anticuerpos para antígenos de células T(CD3, CD5,CD7, CD2 y/o CD4) y antígenos de células B (CD10, CD19, CD20, CD22 y CD79a) pueden ser inmunoglobulinas citoplasmáticas o superficiales. Algunas leucemias presentan dos linajes celulares la expresión de estos antígenos se denominan

anomalías aberrantes. En el caso de las leucemias de progenitores de células B, no define un antígeno único o específico, pero se recomienda que expresen fuertemente CD19 junto con otro antígeno de células B, la OMS reconoce 2 categorías distintas de MPAL; aquellas que presentan t(9;22)(q34;q11)/ BCR-ABL1 y las MPAL con t(v;11q23)/MLL. (11)

Las leucemias agudas bifenotípicas (BAL) presentan 2 linajes en una misma población de blastos, mientras que las leucemias bilineales se caracterizan de 2 linajes en distintas poblaciones de blastos de un mismo paciente. Otro sistema de clasificación es por el Grupo Europeo de Clasificación Inmunológica de Leucemias (EGIL), basado en un programa de puntajes que da grados de especificidad en los linajes hematopoyéticos linfóide y mielóide, expresados en las células leucémicas.<sup>(11)</sup> Los antígenos seleccionados por EGIL para el linaje B- linfóide: el CD79a que es la proteína transmembrana unida a inmunoglobulina que forma parte del receptor de reconocimiento de linfocitos B junto con el CD22, en el linaje T- linfóide el CD3 que se une al receptor de células T y que se expresa en el citoplasma en el desarrollo temprano del linaje T. En la línea mielóide la mieloperoxidasa (MPO) es detectada por inmunocitoquímica o anticuerpos monoclonales contra la cadena  $\alpha$  de MPO en forma de proenzima.

En 2008 la OMS propuso una clasificación basada en características citogenéticas e inmunofenotípicas de manera combinada que actualizó en 2016, esta clasificación se utiliza en el diagnóstico inicial previo al estudio citogenético, clasificando las LLA-B en cuatro subgrupos según la expresión de CD10,  $\mu$ C y CL. Tabla 1.<sup>(16)</sup>

**Tabla 1. LLA-B: adaptación de la clasificación inmunológica de la EGIL y alteraciones citogenéticas más frecuentes asociadas.**

Nomenclatura	Inmunofenotipo				Alteraciones citogenéticas o moleculares más frecuentes	Marcadores aberrantes
	CD10	$\mu$ C	$\mu$ S	CL		
<b>LLA-Pro-B (BI)</b>	Neg	Neg	Neg	Neg	t(v;11q23): reordenamiento MLL	NG2(Clon7,1), CD15, CD65
<b>LLA-B común (BII)</b>	Pos	Neg	Neg	Neg	t(9;22) BCR- ABL;t(12:21)TEL-AML	CD13, CD33
<b>LLA-Pre-B (BIII)</b>	Neg/ Pos	Pos	Neg	Neg	t(1;19) TCF3(E2A)-PBX1	CD66, CD304
<b>LLA-B tradicional</b>	Neg/ Pos	Pos	Pos	Neg		

$\mu$ C: cadena pesada  $\mu$  citoplasmática; CL: cadena ligera; Neg: negativo; Pos: positivo;  $\mu$ S cadena pesada  $\mu$  en superficie.

La LLA-Pro-B o -BI expresaría marcadores de inmadurez como CD34, CD38, y TdT, a excepción de CD10, que es negativo, junto con marcadores ya comprometidos con el linaje B aunque pareciera que se encuentra en una fase Pro-B, este perfil no corresponde con dichas fases madurativas, ya que no hay positividad para CD19 en las células Pro-B normales.

La LLA común o BII es la LLA más frecuente, independientemente de la edad, y se caracteriza por expresar CD10 en ausencia de cadena pesada  $\mu$ C y de CL. La LLA-Pre-B o BIII expresaría  $\mu$ C en ausencia de CL. La LLA madura o BIV expresaría CL ya sea como inmunoglobulina completa en superficie o solo en citoplasma. Este estadio equivale a la presentación leucémica del linfoma de Burkitt y no se considera en las clasificaciones actuales como una neoplasia de células B precursoras. Se han reconocido e incorporado a la clasificación dos nuevas condiciones provisionales importantes con anomalías genéticas recurrentes. Una de ellas es la LLA-B Philadelphia-like con translocaciones que involucran genes de tirosina cinasas o receptores de citocinas diferentes de BCR-ABL, como CRLF2 o EPOR. La translocación de CRLF2 da a lugar a una sobreexpresión de dicha cinasa en la membrana de la célula leucémica que puede detectarse por CMF. Las leucemias linfoblásticas agudas con amplificación intracromosómica del cromosoma 21 (B-ALL con iAMP21) se asocian a niños de mayor edad, recuentos leucocitarios más bajos y peor pronóstico, aunque esta mejora con las terapias de alto riesgo. El fenotipo es de precursores B, aunque un tercio de los pacientes pueden expresar marcadores mieloides (CD13, CD33 o CD117) o incluso linfoides T(CD4 o CD7).<sup>(16)</sup>

### **Enfermedad residual medible**

La Enfermedad Mínima Residual hace referencia a la persistencia después de la remisión completa de marcadores no detectables por citología convencional.<sup>(16)</sup> La EMR un factor pronóstico esencial en la LLA en niños y en adultos.<sup>(29)</sup> El seguimiento de la EMR en distintos momentos evolutivos de la quimioterapia tienen un valor pronóstico independiente que permite identificar grupos de riesgo en pacientes que recibieron el primer ciclo de inducción y después de la consolidación, proponiendo tratamientos diferentes según el grupo de riesgo, es importante mencionar que el valor pronóstico de la EMR depende del momento de su determinación.<sup>(16)</sup>

En las últimas décadas se ha perfeccionado los métodos para detectar enfermedad mínima medible para detectar leucemia residual en pacientes que han alcanzado remisión clínica. La

enfermedad mínima residual se define como la detección de al menos 0.01% de blastos leucémicos por células mononucleares o nucleadas totales.<sup>(11)</sup>

Las técnicas para la detección de enfermedad mínima residual (EMR) se caracterizan por tener alta especificidad y sensibilidad ( una célula anormal por cada 10,000 células anormales) además debe de tener aplicabilidad para la mayoría de los pacientes en estudio y factibilidad en la obtención rápida de resultados para la aplicación clínica y su cuantificación precisa de los niveles de enfermedad.<sup>(30)</sup>

La detección de la EMR se puede realizar por los siguientes métodos; inmunofenotipificación por citometría de flujo multiparamétrica (CFM), la detección de transcritos de genes fusionados mediante PCR en tiempo real cuantitativa (PCR-TR) y la detección clonal de rearreglo en los genes de inmunoglobulinas (Ig) o del receptor de células T (TCR) utilizando la PCR en tiempo real cuantitativa. La aplicabilidad de la CFM en pacientes con LLA-B y T es superior al 95%; para la PCR-TR de genes fusionados en LLA-B es hasta del 40% y para LLA-T del 15% dependiendo de la frecuencia de las translocaciones en la población estudiada. La CFM y la búsqueda de fusiones génicas por PCR-TR son métodos relativamente rápidos y de menor costo respecto al análisis de Ig/TCR por PCR-TR, que requiere un proceso largo, minucioso y costoso ya que se deben localizar dos blancos útiles para hacer la determinación de EMR.<sup>(30)</sup>

La detección de EMR por citometría de flujo multiparamétrica es posible a las características inmunofenotípicas; como la infidelidad de línea es decir las células neoplásicas expresan marcadores de otras líneas celulares, el asincronismo madurativo, como antígenos específicos de linaje lo que significa que pueden aparecer marcadores de mayor o menor intensidad o expresarse en una etapa madurativa diferente a la que le corresponde o de antígenos no específicos de línea que expresa el linfocito B a lo largo de su maduración cuyos cambios en la expresión en la población leucémica frente a los precursores fisiológicos (tabla 2).<sup>(16,31)</sup>

**Tabla 2. Marcadores de LLA-B útiles en el diagnóstico y en la búsqueda de enfermedad mínima residual.**

<b>Marcador</b>	<b>Expresión en línea B</b>	<b>Expresión en otras células</b>	<b>LLA-B más frecuente</b>
CD9	LB pre-BI y pre-BII Células plasmáticas	Plaquetas, eosinófilos, basófilos	LLA-B III ( $\mu$ C+)

CD24	LB pre-BI y pre-BII LB maduros (débil)	Neutrófilos y eosinófilos	LLA-BI-III
CD58	LB-pre-BI LB maduros (débil)	CDp, monocitos, linfocitos T de memoria/efectores	LLA-BI-III
CD73	LB maduros	Linfocitos T, CDf, célula epitelial, endotelio	LLA-BI-III
CD81	LB pro-B y pre-B LB maduros (débiles)	Linfocitos T, NK, monocitos, endotelio	LLA-BI-III
CD99	LB pro-B y pre-B	Linfocitos T, tumor de Ewing	LLA-BI-II
CD304	No se Expresa	Endotelio, CDp, neoplasias	LLA-B TEL-AML1+
NG2 (CSGP4)	No se Expresa	Células mesodermo, células epiteliales, neoplasias	LLA-B MLL+
CRLF2	LB pro-B y pre-B	Linfocitos T (débil), células dendríticas, monocitos, basófilos, células epiteliales	LLA-B BCR-ABL-like (activación de la vía JAK-STAT)

μC: cadena pesada μ citoplasmática; CDf: células dendríticas foliculares; CDp: células dendríticas plasmocitoides; LB: linfocito B; NK: linfocito natural killer; CRLF2: cytokine receptor-like factor 2 o thymic stromal lymphopoietin receptor.

En cuanto a la sensibilidad la CMF para la detección de la EMR existe correlación entre el número de marcadores empleados simultáneamente (cuatro, seis y ocho colores), o la cantidad de células analizadas (entre  $10^3$  y  $10^6$ ), y la sensibilidad alcanzada. Los estudios tradicionales con cuatro o seis colores alcanzan una sensibilidad de  $10^{-3}$  a  $10^{-4}$  llegando a detectar EMR en más del 90% de las LLA-B y LLA-T aunque dependiendo del fenotipo aberrantes y del nivel de regeneración medular la sensibilidad no se alcanza en la mayoría de los estudios, y existe un alto número de recaídas en pacientes con enfermedad mínima medible negativa por citometría de flujo.<sup>(16,32)</sup> El concepto de EMR se inclina hacia sensibilidades más altas incorporando el término “EMR de bajo riesgo de recaída” en aquellos pacientes con  $EMR < 10^{-4}$ , en los que algunos grupos comienzan a considerar incluso una reducción en la terapia.<sup>(16)(33)</sup>

Recientemente se han incluido el análisis con un panel de anticuerpos estandarizado en dos tubos combinados de ocho colores para LLA-B permitiendo analizar más células ( $2.5-5 \times 10^6$ ) y aumentar la sensibilidad, el panel está compuesto por los siguientes anticuerpos (Tabla 3).

**Tabla. 3. Panel de anticuerpos utilizados para EMR en LLA-B.**

Anticuerpo	Fluorocromo
CD20	V450
CD45	V500c
CD19	PeCy7
CD81	FITC

CD10	APC
CD34	PerCPCY5.5
CD38	APC-H7
CD66c + CD123	PE
CD73 + CD304	PE

---

## Resistencia farmacológica

Las células leucémicas en los adultos carecen de una baja expresión de la enzima folipolilglutamato sintetasa que se encarga de agregar grupos glutamil al metotrexato fármaco utilizado en el tratamiento de LLA, en los niños las células tienen un mejor respuesta en cuanto al metabolismo de dicha reacción lo que se traduce en un mejoramiento y aceptación al tratamiento con metotrexato.<sup>(34)</sup>

Uno de los mecanismos más importantes de la resistencia multifarmacológica es la sobreexpresión del gen de resistencia a multidroga 1 (MDR-1). Este gen codifica la glicoproteína P-gp la cual es un transportador de tipo ABC involucrado en la traslocación unidireccional de sustratos a través de la membrana P-gp bombea drogas terapéuticas como alcaloides de la *Vinca*, antraciclinas y epipodofilotoxinas. Algunas drogas como el Imatinib y Nilotinib (inhibidores de la acción tirosinquinasa de Bcr-Abl, se une al sitio de unión del ATP manteniendo la proteína en su conformación cerrada e inactiva) pueden no sufrir efectos sobre las células leucémicas, estas pueden acumular mutaciones en el gen Bcr-Abl, de forma tal que en el sitio de acción de las drogas cambia.<sup>(35) (25)</sup>

Las mutaciones relacionadas Bcr-Abl se asocian a resistencia farmacológica aun que otras líneas celulares no sufren mutaciones en Bcr-Abl tienen una alta resistencia al tratamiento con Imatinib y Nilotinib debido a una sobreexpresión de la enzima Lintirosinquinasa, la cual fosforila Bcr-Abl y Bcr2, aumentando su acción y los efectos despreciables de las drogas. En algunos otros casos la sobre activación causada por NF-Kappa B silencia los efectos apoptóticos de drogas como la bortezomib.<sup>(25,36)</sup>

## Inmunofenotipo de la LLA-B

Se necesita al menos coexpresión de dos marcadores fuertemente asociados a linfocitos B: CD19, CD79 $\alpha$  o CD22 para asignar las células leucémicas a la línea linfocítica. Estos

marcadores pueden aparecer de forma aberrante en otras leucemias: CD19 LMA, CD79 $\alpha$  en LMA/ LLA-T y CD22 en leucemias de precursores de basófilos o de células dendríticas plasmocitoides (CDp). Para poder clasificar la LLA-B se necesitan marcadores relacionados con la maduración, así como el estudio intracelular y en superficie de la cadena pesada  $\mu$  y de las CL.

### **Inmunofenotipos en la enfermedad medible residual**

Debemos de definir que el proceso de génesis en la leucemia produce cambios a nivel molecular y celular que permite diferenciar células malignas de las benignas.<sup>(30)</sup> Los blastos expresan marcadores celulares aberrantes que pueden detectarse por citometría de flujo expresando inmunofenotipos diferentes que facilitan su detección entre células no leucémicas con una sensibilidad de  $1 \times 10^{-4}$ .<sup>(30)</sup> Los inmunofenotipos aberrantes pueden ser del mismo linaje o de diferentes estadios de diferenciación. El análisis de EMM es rápido y permite cuantificar con precisión dando información de las células hematopoyéticas normales, el número de anticuerpos combinados para identificar las células leucémicas y la estabilidad de los marcadores son factores importantes para la confiabilidad de este abordaje. Los marcadores utilizados con mayor frecuencia en la EMR en niños con LLA para el linaje T son; Anti-TdT/CD5/CD3 con una frecuencia del 90-95% junto con CD34/CD5/CD3 (30-50%). Para el linaje B existen diferentes combinaciones de marcadores entre los más frecuentes se encuentran; CD19/CD34/CD10/CD58 (40-60%), CD19/CD34/CD10/CD38; CD19/CD34/CD10/CD45; CD19/CD34/CD10/anti-TdT (30-50%), CD19/CD34/CD10/CD22 (20-30%).<sup>(30)</sup> La combinación de estos marcadores dan información de la célula, como el tamaño y granularidad celular, junto con la intensidad de estos marcadores permite identificar el sello fenotípico de las células leucémicas con respecto de las células normales.<sup>(30,37)</sup> Con la citometría de flujo de nueva generación permite enfrentar uno de los desafíos que presentan los laboratorios que es identificar clonas residuales con patrón de maduración normal o la presencia de marcadores aberrantes.<sup>(38)</sup>

### **Marcadores específicos en enfermedad residual medible**

La enfermedad mínima residual (EMR) se define como una población de células leucémicas que han sobrevivido a la quimioterapia/radioterapia que se traduce en recaída de la

enfermedad, es fundamental para predecir el resultado y seleccionar la estrategia terapéutica adecuada.<sup>(39)</sup>

Los recuentos celulares en la EMR tienen un valor pronóstico general en el nivel de corte del 0.01% de células ( $\times 10^4$ ); es decir, 1 célula leucémica por cada 10,000 células de todas las células mononucleares de la médula ósea dentro de una muestra.<sup>(39)</sup>

El rastreo de la enfermedad especialmente en la leucemia de origen linfóide B, se propone incluir al menos la detección de antígenos CD19, CD79a, CD34, CD45 y CD3.<sup>(38)</sup> Algunas opciones para el monitoreo de EMR son; CD73, CD81, CD86, CD44, CD24, CD304, CD123 Y CD58.<sup>(40)</sup>

### **CD10**

Es un antígeno común en la LLA (CALLA), es una proteína de membrana integral de tipo II de 100 kDa identificada como endopeptidasa neutra asociada a membrana humana.<sup>(41) (13)</sup> Se expresa en precursores linfóide no diferenciados, CD10 se deja de expresar cuando las células acceden al linaje T, en el linaje B, la expresión de CD10 se pierde en la ontogenia, cuando las células adquieren la expresión de Ig de superficie.<sup>(42)</sup>

Las células blásticas leucémicas expresan marcadores en la membrana celular idénticos a los que se encuentran en los linfocitos B normales.<sup>(43,44)</sup> Se ha subdividido a la LLA en CD10 positivo y CD10 negativo. Sin embargo estas categorías no se han utilizado para determinar el enfoque del tratamiento.<sup>(42)</sup> La LLA proviene de una célula precursora hematopoyética que carece de expresión del antígeno común de la leucemia linfoblástica aguda (CALLA) (CD10) y antígenos de células maduras, y a menudo expresan HLA-DR y marcadores mieloides tal como el CD15.<sup>(44,45)</sup>

### **CD73**

Es una ectonucleotidasa que seque produce adenosina (ADO) a partir del trifosfato ADO extracelular (ATP). Fisiológicamente se expresa en la superficie de la membrana de algunas células de linaje B y subpoblaciones de células T y NK <sup>(46) (47)</sup> Su papel es crear un entorno supresor después de la hidrólisis del ATP extracelular (señal de daño) y reducir la inflamación mediante la generación de ADO, una molécula con potencial inmunosupresor.<sup>(38)</sup>



### **CD304**

La Neuropilina 1 conocido como CD 304 es una proteína que funciona como correceptor para el factor de crecimiento endotelial vascular y la semaforina. Se expresa en células dendríticas plasmocitoides y en algunas poblaciones de monocitos en condiciones fisiológicas, aunque las poblaciones normales pre-B suelen expresar niveles discretos. Las explosiones leucémicas B-ALL sobre expresan significativamente CD304. Su expresión se correlaciona con la presencia de t(12;21)*ETV6-RUNX1*, que origina la fusión TEL/AM1, y está inversamente relacionada con los reordenamientos en el gen MLL. En combinación con CD9, podría ser útil para la predicción de la translocación t(12;21).<sup>(38)</sup>

### **CD66c**

Es una glicoproteína involucrada en el proceso de la adhesión celular que se expresa en la superficie de las células de origen mieloide en condiciones normales; sin embargo, está ausente en las poblaciones de linfocitos no patológicos. En B-ALL aparece de forma aberrante en la superficie de las células, particularmente en los casos con translocación t(9;22) que produce la proteína de fusión BCR-ABL. Los subgrupos moleculares con hiperdiploidias expresan con frecuencia el antígeno CD66c.<sup>(38)</sup>

### **CD123**

Los progenitores mieloides las células dendríticas plasmocitoides y los basófilos expresan la cadena alfa del receptor IL-3 (IL-3), CD123 cuya señalización está involucrada en los procesos de diferenciación, proliferación y supervivencia. Los datos experimentales confirman que el CD123 está sobre expresado en la superficie de las poblaciones leucémicas LLA-B y LMA; sin embargo, está subrepresentado en las leucemias de tipo T. <sup>(38)</sup> Curiosamente, el genotipo hiperdiploide está asociado con una alta expresión de CD123. Por lo tanto, en combinación con CD86 y CD200, podría identificar potencialmente este subgrupo molecular. Además de ser expresada en células linfoides, esta molécula se utiliza actualmente como diana terapéutica para la terapia inmunológica, ya que también se expresa explícitamente en células madre leucémicas de AML.<sup>(38)</sup>

## **Principio de la citometría de flujo**

El método de citometría de flujo (CMF) es fundamental en la presencia o ausencia de células hematopoyéticas malignas dando como resultado un EMR positiva o negativa.<sup>(48)</sup> El uso de paneles con anticuerpos monoclonales unidos a fluorocromos como marcadores inmunológicos hacen los sistemas de detección altamente sensibles y específicos para identificar células hematopoyéticas cancerígenas.<sup>(48)</sup> Permitiendo la identificación fenotípica, capaz de detectar múltiples parámetros en una misma célula. El citómetro de flujo que se utiliza para identificar estas células debe equiparse con láseres azul (488 nm), violeta (405 nm) y rojo (633–640 nm) y contar con al menos dos o cuatro detectores para cada línea de excitación para poder lograr un ajuste estandarizado de valores de cada fluorocromo.<sup>(32,49)</sup> Los anticuerpos que se utilizan están dirigidos contra antígenos específicos expresados membrana celular, proteínas de superficie o intracitoplasmáticas, permitiendo evaluar estados de fosforilación y contenido de DNA para determinar la fase del ciclo celular.<sup>(48)</sup>

La detección de EMR es un análisis de 1 célula leucocitaria por  $10^5$  leucocitos donde la expresión de antígenos como CD10, CD3, DC7, CD19, CD20, CD34, CD38, mCD45, cD3+ y TdT en células leucémicas pueden predecir la aparición de la EMR.<sup>(48) (50)</sup>

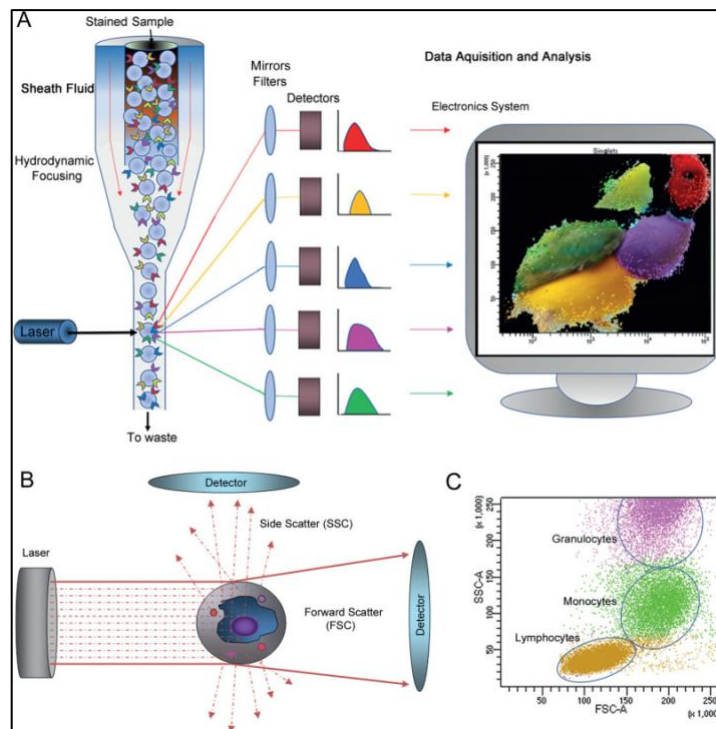
## **Método de citometría de flujo**

Los citómetros de flujo se basa en la identificación de las características ópticas y de fluorescencia de células marcadas con anticuerpos anclados a moléculas fluorescentes.<sup>(48,51)</sup> El citómetro de flujo está compuesto por tres sistemas principales: (I) sistema de fluidos (transporte de células a través de una solución salina tamponada con fosfato); (II) sistema óptico (transmisión de la dispersión de la luz, luz emitida por los fluorocromos y filtros de longitud de onda); y (III) sistema electrónico/digital (detección y procesamiento de señales).<sup>(51)</sup>

El sistema de fluido es responsable de transportar muestras a la celda de flujo donde las células forman un solo flujo constante y cruzan el rayo láser.<sup>(52)</sup> Figura 1. Una corriente de solución rodea la muestra introduciéndola en el instrumento a mayor presión permitiendo el flujo de las células de la muestra formando una corriente continua debido al fenómeno llamado enfoque hidrodinámico.<sup>(31,51)</sup> Las células o partículas viajan en un flujo continuo

atravesando la luz de uno o más láseres, eventualmente, la corriente de fluido se drena en un contenedor de residuos.<sup>(51)</sup>

El sistema óptico consta de fuentes de luz (láseres), lentes, filtros y detectores. Los láseres iluminan las células o partículas, y los espejos dicróicos y los filtros ópticos se utilizan para dirigir las señales de la luz resultante a los detectores apropiados.<sup>(51,53)</sup> Los espejos dicróicos hacen que la longitud de onda correspondiente pase mientras refleja luz de otras longitudes de onda. Los detectores suelen ser tubos fotomultiplicadores (PMT) o matrices de fotodiodos (PDA) que convierten las señales en impulsos eléctricos, que son medidos y convertidos en información digital por el sistema electrónico.<sup>(51-53)</sup> La información digital es recopilada e interpretada por el software de análisis, el sistema informático conectado interactúa directamente con el citómetro de flujo o en otros ordenadores que tienen acceso a los datos.<sup>(51,52)</sup>



**Figura 1.** Diagrama esquemático de cómo funciona la citometría de flujo y la dispersión de la luz en las células.

## **Muestras y reactivos en citometría de flujo**

Los especímenes adecuados para el análisis de citometría de flujo incluyen sangre periférica, médula ósea, líquido cefalorraquídeo, derrames serosos, aspiraciones de aguja fina, y tejido fresco no fijado.<sup>(52)</sup> La MO es la muestra más utilizada para el diagnóstico, clasificación y detección de la EMR en la LLA, donde se recomienda recolectar un volumen entre 2 a 5 mL para examinar  $>5 \times 10^6$  células por citometría de flujo y obtener un rango de sensibilidad de  $10^{-4}$  células blásticas aberrantes, las muestras deben de estar anticoaguladas con EDTA (etilendiaminotetraacético) que actúa como quelante de calcio y de esta manera como anticoagulante.<sup>(48) (21)</sup>

De acuerdo al tipo de antígenos que se quieren estudiar dependerá la preparación de la muestra. Las partículas grandes deben filtrarse para evitar obstruir el tubo del citómetro y/o unir anticuerpos de forma no específica.<sup>(51)</sup> Estas muestras se incuban a temperatura ambiente con los anticuerpos junto con la muestra de médula ósea, seguido de la lisis de eritrocitos con una solución de cloruro de amonio, lavado con suero fisiológico o solución salina tamponada con fosfato (PBS) para después incubar con los respectivos fluorocromos.<sup>(32,48)</sup> La muestra debe de ser obtenida en pacientes con proceso de remisión o en el momento de remisión completa (aproximadamente el día 21 del primer ciclo) y durante el curso de la terapia de consolidación y mantenimiento.<sup>(48)</sup> También se puede realizar una lisis osmótica de los hematíes para concentrar un número mayor de células para las muestras que tengan recuentos celulares por de bajos del nivel de detección por el citómetro, detallando la presencia de células neoplásicas en la muestra, antes del marcaje inmunofluorescente (bulk lysis del Grupo EuroFlow) se eliminan las interferencias provocadas por lo hematíes mejorando una mejor adherencia de los anticuerpos y sus respectivos fluorocromos aumentando la sensibilidad de la técnica.<sup>(48,53)</sup>

Los reactivos para la citometría de flujo son los anticuerpos conjugados con un fluorocromo contra antígenos de superficie celular, citoplasmáticos o nucleares.<sup>(51)</sup>

## **Análisis de citometría de flujo**

El estudio de cada muestra se analiza mediante la combinación de anticuerpos y colorantes de viabilidad (intercalante de DNA o ligados a proteínas asociadas apoptosis), permitiendo

diferencias las células viables permitiendo la diferenciación de células normales de las anormales.<sup>(48,54)</sup>

El análisis se inicia eliminando los residuos celulares para visualizar una población células leucémicas en la region seleccionada (*gates*) e identificar las características inmunofenotípicas de acuerdo con la presencia de antígenos celulares determinados por la unión con los anticuerpos presentes y la excitación de los fluorocromos como FITC (isotiocianato de fluoresceína), PE (ficoeritrina), APC (aloficocianina), entre otros 40 acoplados a dichos anticuerpos.<sup>(48) (28,29)</sup>

### **Análisis de datos**

Se refiere a la recopilación de datos mediante el cual las células teñidas pasan atreves de un citómetro de flujo iluminadas por un láser y las señales resultantes son detectadas por el sistema óptico.<sup>(51)</sup> El número mínimo de eventos para la detección de EMR requiere un número mayor de células viables (>500.000/tubo) adquiridas para aumentar la sensibilidad para detectar una población muy pequeña de células malignas residuales.<sup>(48,51)</sup>

Cada citómetro de flujo tiene un software asociado para la adquisición y el análisis de datos. Los datos se pueden mostrar como histogramas o gráficos de puntos. Los histogramas muestran un solo parámetro mientras que el grafico de puntos muestra dos parámetros y cada punto representa una célula o partícula.<sup>(51)</sup>

### **Justificación**

La leucemia linfoblástica es el tipo de cáncer más frecuente en la infancia y la causa de muerte más común antes de los 20 años. Las leucemias agudas son responsables del 5.6 % de todas las muertes. Representa la segunda causa de mortalidad en niños y adolescentes en 2017 México fue el segundo país en América Latina con la tasa de mortalidad más alta por LLA, con un valor registrado de 2.26 muertes por cada 100 mil habitantes para ambos sexos en el grupo de edad de 5 a 14 años. El cáncer infantil tiene el peor pronóstico en países de américa latina la sobrevivencia a 5 años para todos los tipos de canceres es del 70%, mientras que en países desarrollados la sobrevivencia es de 90%. Los niños que viven en un entorno de bajos recursos tienen tasas de supervivencia significativamente más bajas, aproximadamente uno de cada 2 niños diagnosticados con cáncer fallecerá causa de la enfermedad. Después de la remisión del paciente el seguimiento es fundamental para poder

tener mayor éxito en la supervivencia, los altos costos que genera el seguimiento del paciente influyen de manera negativa aumentando la tasa de mortalidad, la enfermedad residual medible es uno de los estudios de seguimiento que se le realizan al paciente en remisión. Conocer los anticuerpos que se expresan en la EMR en pacientes con LLA-B en recaída que se encuentran en remisión a largo plazo permitirá conocer la frecuencia fenotípica en la población infantil del noreste del país sirviendo como indicador de riesgo en la EMR

## **Pregunta de Investigación**

¿Existe una correlación entre la falta de expresión de CD10 al diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda de la infancia y la expresión de CD66/CD123 y CD73/CD304 para detección de enfermedad residual medible?

## **Hipótesis**

H0: La ausencia de CD10 al diagnóstico de LLA-B de la infancia es de mal pronóstico y está asociada con la expresión de CD-66/123 y CD-73/304 en el estudio de enfermedad residual medible.

H1: La ausencia de CD10 al diagnóstico de LLA-B de la infancia no es de mal pronóstico y no está asociada con la expresión de CD-66/123 y CD-73/304 en el estudio de enfermedad residual medible.

## **Objetivo general**

Establecer la correlación de la expresión CD10 con la expresión de CD66/CD123 y CD73/CD304 y con la evolución clínica en pacientes con LLA-B de la infancia.

## **Objetivos específicos**

1. Investigar la correlación de CD10, CD66/CD123, y CD73/CD304 con la evolución clínica.
2. Establecer si hay correlación de la ausencia de CD10 con de la presencia individual de CD66, CD123, CD73, CD304 expresados como porcentaje de EMR.

## Materiales y Métodos

Se hizo un estudio retrospectivo y observacional en pacientes con diagnóstico de LLA-B con enfermedad medible residual en un periodo de mayo del 2017 a marzo del 2024 que acudieron al Servicio de Hematología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”.

Los datos los datos (edad y sexo) y la información del análisis del inmunofenotipo de la EMR (CD66/CD123, CD73/CD304 y CD10) se tomaron 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 diferentes programas estadísticos.

### Criterios de inclusión:

- Edad entre 1 a 17 años.
- EMR de LLA-B detectada.
- Expediente clínico completo
- Ambos sexos.

### Criterios de exclusión:

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

### Variables del estudio

Cualitativas	Cuantitativas
Sexo	Edad
Procedencia	
Resultado	

El estudio retrospectivo se llevó acabo de acuerdo con el siguiente procedimiento; se buscaron los expedientes de los pacientes diagnosticados con LLA-B en el periodo mencionado para obtener los resultados del estudio de EMR por citometría de flujo de donde se tomarán los resultados incluyendo el folio, fecha del estudio, edad, sexo, inmunofenotipo al diagnóstico (CD10, CD66, CD123, CD73 y CD304). La información obtenida se concentro en una base de datos que se realizó en Excel que después se ordenaron mediante

filtros a los pacientes que cumplieron con todos los criterios de inclusión. Cuando la base de datos se completó se exportó al programa SPSS para realizar las pruebas estadísticas. Los resultados se presentaron mediante, gráficos, tablas o diagramas según se requiso.

En el desarrollo de esta investigación ambispectiva se siguieron las políticas de protección del expediente clínico de la Institución la cual solo podrá disponer de la información personal autorizado de acuerdo al programa ISO/IS27002 para asegurar la confidencialidad conforme al marco legal, la identificación de los pacientes fue mediante códigos numéricos, sin información que revelara su identidad.

Solo se utilizaron datos personales actualizados de acuerdo a la investigación , respetando el cumplimiento de los principios de protección de datos personales establecidos por la ley federal de protección de datos personales en posesión de los particulares.

### **Criterios éticos**

La confidencialidad se respetó de acuerdo a los principios de datos personales y las normas éticas sobre los estudios clínicos en pacientes y siguiendo el protocolo de confidencialidad de la Institución. El estudio fue evaluado y aprobado por el Comité de ética en investigación y comité de investigación del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”.

### **Categoría de riesgo**

Esta protocolo fue una investigación sin riesgo de acuerdo con el artículo 17 del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación, debido a que es un estudio que emplea técnicas y métodos de investigación retrospectivos y en él no se realizó ninguna intervención o modificación intencionada en las variables fisiológicas, psicológicas y sociales de los individuos que participan en este estudio.

### **Análisis estadístico**

El análisis estadístico se hizo con los siguientes softwares IBM-Statistical Package for Social Sciences version 23 (IBM Corp., USA) 25, and the figures were produced using R version 4.2.0 (R Core Team, Austria) 26 with the package ggplot2 version 3.3.6 (Wickham, USA).27"; IBM Corp. (2015). IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0. Armonk, NY: IBM Corp; RStudio Team (2022). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA; Wickham H. ggplot2: elegant graphics for data analysis. New York: á



## Resultados

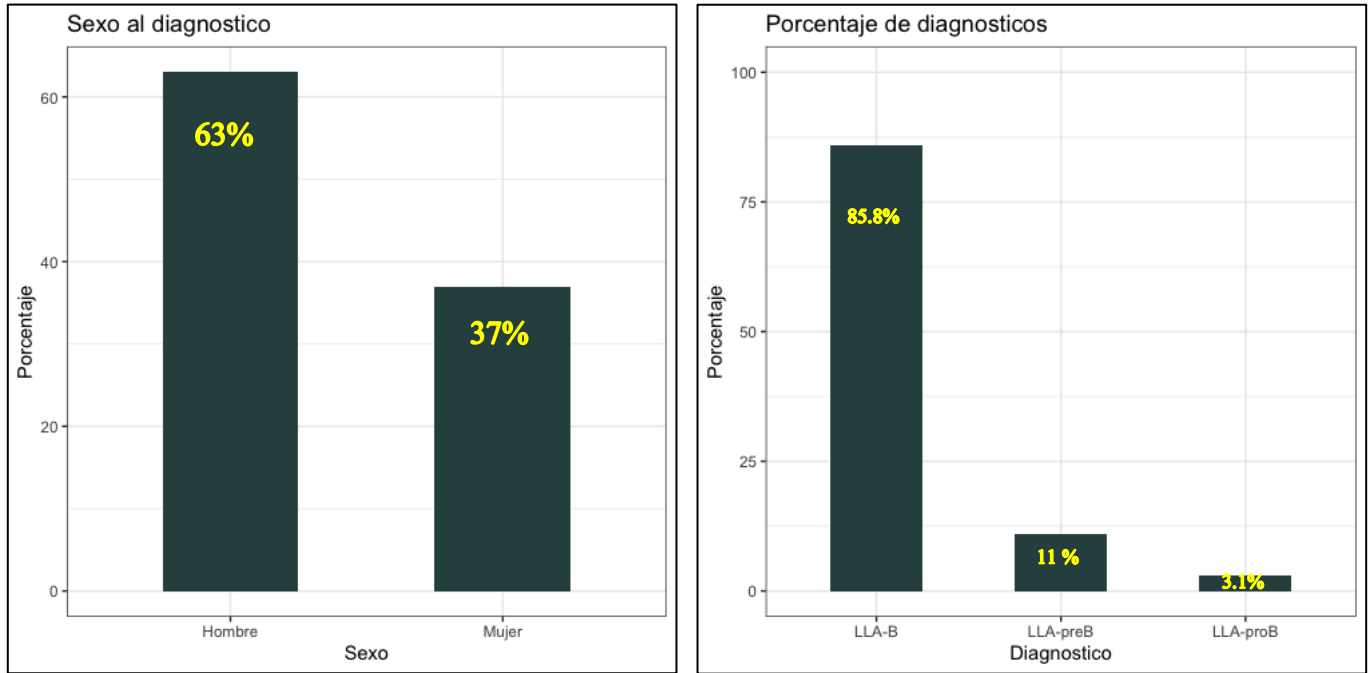


Figura 1. Variables sociodemográficas en pacientes pediátricos con LLA-B

La muestra incluyo 127 pacientes, 63% hombres y 37% mujeres, relación 2:1. El promedio de edad al diagnóstico fue de 4 años. La distribución fue 85.8% LLA-B, 11% LLA-preB y 3.1% para LLA-proB.

Tabla 2. Datos al diagnóstico de LLA-B en pacientes pediátricos

<b>Datos al diagnóstico</b>		
<b>HB (media)</b>	7.8 (5.7 - 9.9)	7.76 ± 2.76
<b>Leucocitos</b>	6155 (2955 - 24475)	
<b>Neutrófilos</b>	632 (258 - 1297)	
<b>Linfocitos</b>	3500 (1665 - 13200)	
<b>Plaquetas (media)</b>	39000 (18000 - 74000)	
<b>LDH</b>	447 (292 - 857)	
<b>Blastos SP (media)</b>	70% (37% - 90%)	61.12% ± 31.69
<b>Blastos MO</b>	83 (69 - 91)	
<b>Muestra</b>		
<b>MO</b>	123 (96.9%)	
<b>SP</b>	4 (3.1%)	

En cuanto a parámetros de laboratorio con relevancia clínica en el diagnóstico en la biometría hemática la media de hemoglobina (Hb) fue de 7.8 gr/dL, leucocitos (6155/ $\mu$ L), los neutrófilos absolutos (632 / $\mu$ L), la media de linfocitos absolutos (3500/ $\mu$ L), en cuanto a los niveles de deshidrogenasa láctica (LDH) la media fue 447 UI (292-857). La media de blastos fue de 70% en sangre periférica (SP) y 83% para médula ósea (MO). En cuanto al tipo de muestra que se envió al laboratorio para hacer el diagnóstico por citometría de flujo de los 127 pacientes 123 (96.9%) fue MO y solo 4 ( 3.1%) por SP.

Tabla 3. Inmunofenotipo por CMF al diagnóstico

<b>Inmunofenotipo al diagnóstico</b>	
<b>CD10 +</b>	120 (94.5%)
<b>CD79 acy +</b>	126 (99.2%)
<b>CD9 +</b>	109 (85.8%)
<b>CD19 +</b>	126 (99.2%)
<b>CD20 +</b>	71 (55.9%)
<b>CD22 +</b>	119 (93.7%)
<b>CD34 +</b>	100 (78.77%)
<b>CD38 +</b>	94 (74%)
<b>CD66 c +</b>	71 (55.9%)
<b>TdT +</b>	109 (85.8%)

La expresión de los marcadores de superficie en el inmunofenotipo al diagnóstico de LLA-B en cuanto a su prevalencia el de mayor expresión es el CD79+ y CD19+ con una prevalencia de 99.2% (126/127), el CD10+ se expresó solo en el 94.5% (120/127) de los pacientes, el CD22+ lo expresaron 93.7% (119/127), el CD9+ junto con el TdT+ se expresó en un 85.8% la expresión cd34+ y CD38 fue del 78.77%(100/127) y 74% (94/127) respectivamente, CD20+ y CD66c+ en un 55.9% (71/127).

Tabla 4. Enfermedad Medible Residual (EMR)post-inducción en pacientes con LLA-B.

<b>Enfermedad Medible Residual (EMR)</b>		
Día, mediana (rango)	36 (34 - 40)	
Resultado positivo	33 (26%)	
Blastos	0.1162% (0.0067% - 1.519%)	
CD10+	28 (22%)	28/33 (84.8%)
D66c+	19 (15%)	19/33 (57.5%)
CD123+	19 (15%)	19/33 (57.5%)
CD73+	25 (19.7%)	25/33 (75.7%)
CD304+	25 (19.7%)	25/33 (75.7%)

El tiempo promedio en el que se realizó la EMR post inducción fue de 36 días teniendo 26% de EMR (33/127) detectadas con una media de blastos 0.1162%. La expresión de los marcadores de enfermedad medible residual para CD10+ fue de 28/33 (84.8%), la expresión de CD73+/CD304+ fue de 25/33 (75.7%) por arriba de CD66c+/CD123+ que obtuvieron 19/33 (57.5%) de expresión.

Tabla 5. Exploración física pacientes con LLA-B

<b>Exploración física</b>		
Organomegalia	46 (36.2%)	46/125 (36.8%)
Esplenomegalia	46 (36.2%)	46/124 (37.1%)
Hepatomegalia	69 (54.3%)	69/124 (55.6%)
Adenomegalia	43 (33.9%)	43/125 (34.4%)
Riesgo		
Alto	35 (27.6%)	
Intermedio	48 (37.8%)	
Habitual	43 (33.9%)	
Bajo	1 (0.8%)	
Respuesta a Esteroide	94 (74%)	94/123 (76.4%)

En la exploración física se encontró hepatomegalia con una frecuencia del 54.3%, la esplenomegalia 36.2%, adenomegalia 33.9% y solo 36.2% presentaron organomegalia (hígado, bazo y ganglios).

La clasificación de los pacientes de acuerdo al riesgo hubo un predominio los de riesgo intermedio 37.8%, los de riesgo habitual en un 33.9%, los pacientes con riesgo alto representan el 27.6% y los de bajo riesgo solo el 0.8%

Tabla 6. EMR post consolidación en pacientes con LLA-B (1- 90 días)

<b>3-6 Meses ( 90-180 días)</b>		
RESULTADO DETECTADO	11 (8.7%)	11/32 (34.4%)
Blastos	0.3332% (0.0028 - 4.2%)	
CD10+	9 (7.1%)	9/11 (81.8%)
CD66c/CD123+	7 (5.5%)	7/11 (63.6%)
CD73/CD304+	7 (5.5%)	7/11 (63.6%)

De los 39 pacientes que tuvieron una EMR detectada post consolidación solo el 28.2% presentaron enfermedad residual medible antes de los 90 días post consolidación, teniendo una media del 0.1131% de células leucémicas en la médula ósea, con expresión de marcadores aberrantes como el CD10+ que fue en un 100%, para los marcadores CD66c/CD123+ 63.6% y CD73/CD304+ en un 75%.

Tabla 7. EMR post consolidación en pacientes con LLA-B (90-180 días).

<b>1-3 meses (1-90 días)</b>		
RESULTADO DETECTADO	11 (8.7%)	11/39 (28.2%)
Blastos	0.1131% (0.0074% - 80%)	
CD10+	11 (8.7%)	11/11 (100%)
CD66c/CD123+	7 (5.5%)	7/11 (63.6%)
CD73/CD304+	9 (7.1%)	9/12(75%)

Los 39 pacientes con EMR detectada durante los primeros 90 días post consolidación se les hizo un seguimiento y se les realizo EMR para LLA-B entre el día 90-180 teniendo 34.4% (11/32) de pacientes con EMR detectada con una media de blastos de 0.3332%, con expresión

de CD10+ en el 81.8% de los pacientes con expresión de CD66c/CD123+ y CD73/CD304+ del 63.6% (7/11).

Tabla 8. EMR post consolidación en pacientes con LLA-B (180-270 días)  
**6-9 Meses (180-270 días)**

RESULTADO DETECTADO	4 (3.1%)	4/21 (19%)
Blastos	26% (7.5% - 31.75%)	
CD10+	3 (2.4%)	3/4 (75%)
CD66c/CD123+	3 (2.4%)	3/4 (75%)
CD73/CD304+	3 (2.4%)	3/4 (75%)

Entre el día 180-270 se realizó a 21 pacientes EMR de seguimiento post consolidación teniendo EMR detectada en el 19% (4/21) de los pacientes con un promedio de blastos de 26% y una expresión de CD10+, CD66c/CD123+ y CD73/CD304+ del 75%.

Tabla 9. EMR post consolidación en pacientes con LLA-B (270-360 días)  
**9-12 Meses (270-360 días)**

RESULTADO DETECTADO	6 (4.7%)	6/19 (31.5%)
Blastos	12.03% (0.0056% - 39.86%)	
CD10+	4 (3.1%)	4/5 (80%)
CD66c/CD123+	3 (2.4%)	3/5 (60%)
CD73/CD304+	4 (3.1%)	4/6 (66.6%)

A los 360 días post inducción se les dio seguimiento a los pacientes que habían presentado EMR detectada teniendo 31.5% (6/19) de detección en su EMR con una media de blastos 12.03% con una expresión en sus marcadores de superficie aberrantes para CD10+ 80%, CD66c/CD123+ 60% y CD73/CD304+ 66.6%.

Tabla 10. EMR post consolidación en pacientes con LLA-B (360-540 días)  
**12-18 Meses (360-540 días)**

RESULTADO DETECTADO	2 (1.6%)	2/16 (12.5%)
Blastos	31% (23% - 31%) N=2	
CD10+	2 (1.6%)	2/2 (100%)
CD66c/CD123+	2 (1.6%)	2/2 (100%)
CD73/CD304+	1 (0.8%)	1/2 (50%)

Después de un año y medio solo el 12.5% (2/16) pacientes seguían presentando EMR detectada con una media de blastos de 31% y con expresión del 100% en marcadores CD10+ CD66c/CD123+ y el 50% para CD73/CD304+

Tabla 11. EMR post consolidación en pacientes con LLA-B (540-720 días)

<b>18-24 meses (540-720 días)</b>		
RESULTADO DETECTADO	3 (2.4%)	3/12 (25%)
Blastos	0.59% (0.81% - 73%)	
CD10+	3 (2.4%)	3/3 (100%)
CD66c/CD123+	2 (1.6%)	2/3 (66.6%)
CD73/CD304+	3 (2.4%)	3/3 (100%)

Entre los 18-24 meses post consolidación de los 12 pacientes que se les realizo EMR solo el 25% (3/12) tuvieron EMR detectada con una media de blastos del 0.59% y una expresión del 100% para los marcadores CD10+ /CD73/CD304+ y un 66.5% expreso CD66c/CD123+.

Tabla 12. EMR post consolidación en pacientes con LLA-B (720-900 días)

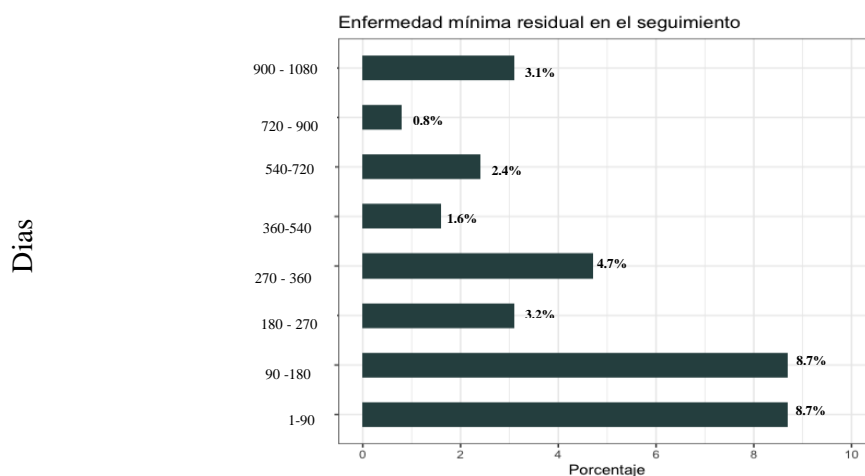
<b>24-30 Meses (720-900 días)</b>		
RESULTADO DETECTADO	1 (0.8%)	1/2 (50%)
Blastos	0.07%	n=1
CD10+	1 (0.8%)	1/1 (100%)
CD66c/CD123+	0 (0%)	0/1 (0%)
CD73/CD304+	0 (0%)	0/1 (0%)

Solo dos pacientes tienen seguimiento a los 30 meses y el 50% de estos presento EMR detectada con 0.07% de blastos en médula ósea expresando solo CD10+ sin expresar marcadores aberrantes como CD66c/CD123+ y CD73/CD304+

Tabla 13. EMR post consolidación en pacientes con LLA-B (900-1080 días)

<b>30-36 Meses (900-1080 días)</b>		
RESULTADO DETECTADO	4 (3.1%)	4/7 (57.1%)
Blastos	7.89% (0.078% - 70.64%)	
CD10+	4 (3.1%)	4/4 (100%)
CD66c/CD123+	2 (1.6%)	2/4 (50%)
CD73/CD304+	3 (2.4%)	3/4 (75%)

De los 7 pacientes que estuvieron en vigilancia durante 3 años el 57.1% presento EMR detectada con una media de blastos de 7.89% y con el 100% de expresión de CD10+, 75% CD73/CD304+ y 50% CD66c/CD123+.



El grafico representa el porcentaje de EMR detectadas después de la consolidación de los pacientes con EMR detectada a los que se les dio un seguimiento de acuerdo a su evolución clínica, observándose < 1% de EMR detectada a los 2.5 años de vigilancia aumentando este porcentaje a 3.1% a los 3 años en mantenimiento.

Tabla 14. Evolución clínica de los pacientes pediátricos con LLA-B durante la enfermedad.

<b>Datos clínicos y evolución</b>		
Hospitalización	103 (81.1%)	103/124 (83.1%)
Sangrado	8 (6.3%)	8/124 (6.5%)
Transfusión	49 (38.6)	49/125 (39.2%)
Concentrado eritrocitario	35 (27.6%)	
Concentrado plaquetario	28 (22.0%)	
Recuperación completa	81 (63.8%)	81/121 (66.9%)
Recuperación parcial	101 (79.5%)	101/116 (87.1%)
Recupero medula	93 (73.2%)	93/120 (77.5%)
Remisión morfológica	102 (80.3%)	102/122 (83.6%)
Muerte	20 (15.7%)	20/118 (16.9%)

En la evolución clínica 83.1% fueron hospitalizados y tan solo el 6.5% presento sangrado, con respecto a las transfusiones sanguíneas el 39.2% de los pacientes fue transfundido, lo que representa el 27.6% de concentrados eritrocitarios y 22.0% de concentrados plaquetarios. La recuperación de la médula ósea fue del 77.5% y la remisión morfológica fue de 83.6% teniendo una recuperación parcial del 87.1% por arriba de la recuperación completa que fue de 66.9%, teniendo solo el 16.9% (20/118) de muertes.

Tabla 15. Comparación de variables en pacientes con CD10+ contra CD10- al diagnóstico

Variable	CD10+ al diagnóstico (N=120)	CD10- al diagnóstico (N=17)	P-valor
Edad (años)	4.5 (3 - 9)	3 (1 - 5)	0.064
Sexo (hombre)	76 (63.3%)	4 (57.1%)	0.709
Diagnóstico			<0.001
LLA-preB	14 (11.7%)	0 (0%)	
LLA-B	105 (87.5%)	4 (57.1%)	
LLA-proB	1 (0.8%)	3 (49.9%)	

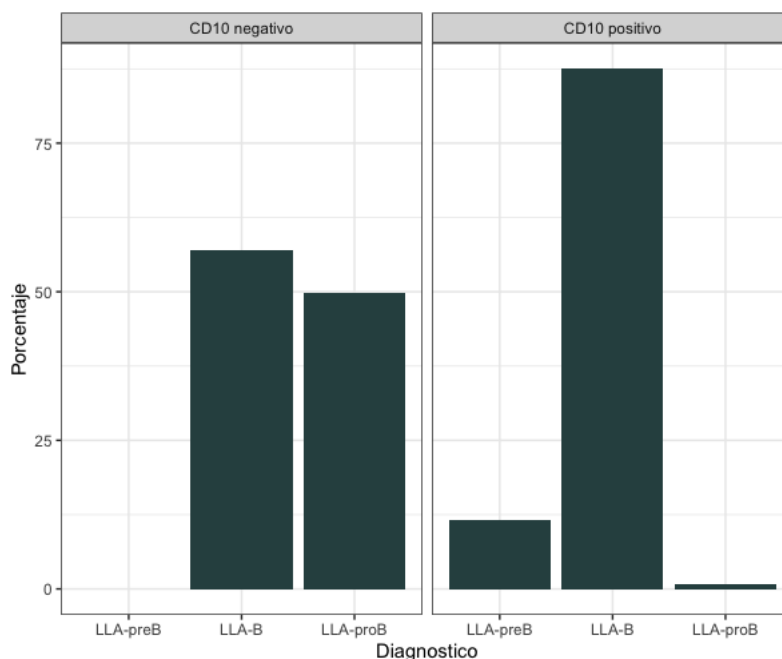


Figura 3. Expresión de CD10 de acuerdo al tipo de LLA.



La media de edad para los individuos con CD10- es de 3 años y 4.5 años para CD10+ en con un predominio del en hombres con 63.3% y 57.1% respectivamente. En cuanto a la clasificación por diagnóstico la LLA-B con expresión CD10+ fue del 87.5% y los de CD10- 57.1%, la LLA-preB 11.7% expreso CD10+, en cuanto a la LLA-proB el 0.8% expreso CD10+ y el 49.9% fue CD10-.

Tabla 16. Comparación de los datos de laboratorio al diagnóstico en pacientes CD10+ contra CD10 -

Datos al diagnóstico			
HB	7.85 (5.72 - 9.97)	6.8 (4.7 - 8.0)	0.291
Leucocitos	5800 (2770 - 23175)	33700 (5310 - 159980)	0.036
Neutrófilos	650 (257 - 1305)	614 (251 - 8910)	0.766
Linfocitos	3500 (1660 - 12600)	16705 (2660 - 42555)	0.223
Plaquetas	38000 (17300 - 69275)	55000 (35750 - 214000)	0.152
LDH	421 (285 - 838)	720 (292 - 720)	0.553
Blastos SP	70% (25% - 90%)	85% (40% - 85%)	0.593
Blastos MO	84% (69% - 91%)	75% (62% - 84%)	0.149

Los pacientes con CD10- tuvieron una media de 6.8mg/dL de Hb por debajo del grupo CD10+ con 7.85 gr/dl. En la formula blanca el grupo CD10- fue el que tuvo mayor hiperleucocitosis con una media de 33700 /ul de leucocitos, los neutrófilos predominaron en el grupo CD10+ con una media de 650/ul, en cuanto a los linfocitos el grupo CD10- obtuvo una media de 16705/ul, el grupo CD10- presento mayores niveles de LDH con una media de 720UI. Los blastos en sangre periférica 85% en pacientes CD10- y 70% en CD10+, los blastos en Médula Ósea los CD10+ 84% y CD10- 75%. Los valores mostrados en la tabla tienen una  $P > 0.05$  lo que significa que no son datos significativos considerando que nuestra cantidad de pacientes CD10- es  $n=7$ .

Figura 4. Comparación del Inmunofenotipo al diagnóstico en pacientes CD10- vs CD10 + en LLA-B

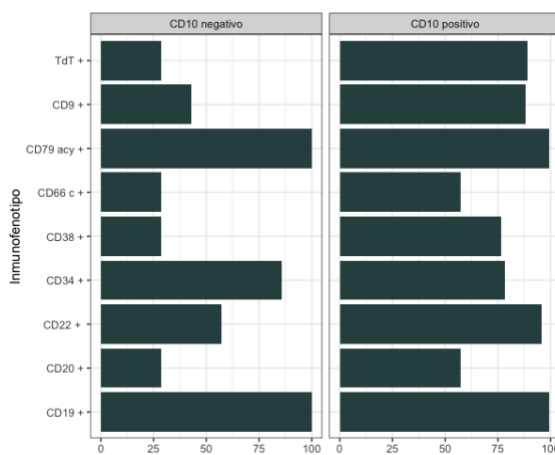


Tabla 17. Comparación del Inmunofenotipo al diagnóstico en pacientes CD10+ y CD10 – en LLA-B

<b>Inmunofenotipo al diagnóstico</b>			
CD79 acy +	119 (99.2%)	7 (100%)	1
CD9 +	106 (88.3%)	3 (42.9%)	0.001
CD19 +	119 (99.2%)	7 (100%)	1
CD20 +	69 (57.5%)	1 (28.6%)	0.123
CD22 +	115 (95.8%)	4 (57.1%)	0.005
CD34 +	94 (78.3%)	6 (85.7%)	0.643
CD38 +	92 (76.7%)	2 (28.6%)	0.013
CD66 c +	69 (57.5%)	2 (28.6%)	0.239
TdT +	107 (89.2%)	2 (28.6%)	0.001

Comparando el inmunofenotipo al diagnóstico entre el grupo CD10+ y el CD10- podemos observar que de nuestra n=127 los pacientes con CD10- obtuvieron un 28.6% de expresión en los marcadores; CD38+, CD66c, TdT+y CD20+, el 42.9% expreso CD9+ y 57.1% CD22+. En el grupo de pacientes CD10+ la frecuencia de expresión más baja fue para el CD20+ y CD66c+ con un porcentaje de 57.5%, CD34+ Y CD38+ tuvo una frecuencia de expresión de 78.3% y 76.7% respectivamente, el TdT+ se expresó en el 89% de los pacientes CD10+, CD22+ 95.8% y CD79acy+ junto con CD19+ en un 99.2% de los pacientes.

Tabla 18. Expresión de marcadores de enfermedad residual medible post inducción en pacientes con CD10+ Y CD10- al diagnóstico.

<b>Enfermedad Medible Residual</b>			
Día	36 (34 - 40)	36 (34 - 43)	0.826
RESULTADO DETECTADO	31 (25.8%)	2 (28.6%)	0.872
Blastos	0.116% (0.0076% - 1.67%)	0.39% (0.0004% - 0.39%)	0.392
CD10+	27 (22.5%)	1 (14.3%)	0.286
D66c+	19 (15.8%)	0 (0%)	0.176
CD123+	19 (15.8%)	0 (0%)	0.176
CD73+	24 (20%)	1 (14.3%)	0.588
CD304+	24 (20%)	1 (14.3%)	0.588

Los valores en cuanto a la expresión de marcadores aberrantes de EMR realizada post inducción en el grupo CD10+ vs CD10- es importante mencionar que el grupo CD10- con n=7 solo 28.6% tuvo enfermedad medible residual detectada a los 36 días de terminar la

inducción en comparación con el grupo CD10+ que obtuvo 25.8% de EMR detectada en el mismo tiempo, la media de blastos en MO para los grupos fue 0.39% y 0.116% respectivamente. La expresión en el grupo CD10+ fue del 22.5% vs CD10- 14.3%. Es importante mencionar que de los marcadores aberrantes solo el 14.3% de CD10- expresaron CD73+/CD304+, el grupo CD10+ expreso CD66c+/CD123+ 15.8% y CD73+/CD304+ en un 20%.

Tabla 19. Datos de la exploración física en pacientes con CD10+ contra CD10-

<b>Exploración</b>			
Organomegalia	41/118 (34.7%)	5/7 (71.4%)	0.063
Bazo	42/118 (35.6%)	4/6 (66.7%)	0.193
Hepatomegalia	64/117 (54.7%)	5/7 (71.4%)	0.387
Adenomegalia	38/118 (32.2%)	5/7 (71.4%)	0.047
Riesgo			0.466
Alto	32/120 (26.7%)	3/7 (42.9%)	
Intermedio	45/120 (37.5%)	3/7 (42.9%)	
Habitual	42/120 (35.0%)	1/7 (14.3%)	
Bajo	1/120 (0.8%)	0/0 (0%)	
Respuesta a Esteroides	89/116 (76.7%)	5/7 (71.4%)	0.668

En cuanto a la exploración física en el grupo CD10+ vs CD10- la organomegalia (hígado, Bazo y ganglios) fue de 34.7% y 71.4% respectivamente para cada grupo teniendo mayor predominio en los pacientes del grupo CD10- (5/7), en el grupo CD10+ la hepatomegalia tuvo una frecuencia de 54.7% la esplenomegalia 35.6% y la adenomegalia del 32.2% el grupo CD10- obtuvo un 66% de frecuencia para esplenomegalia.

En cuanto a la clasificación por riesgo de acuerdo al grupo en el de CD10+ el riesgo intermedio obtuvo una frecuencia del 37.5%, el habitual 35.0% y el alto 26.7% en cuanto al segundo grupo CD10- el de mayor frecuencia fue el alto junto con el intermedio con 42.9% y el habitual solo el 14.3% dejando el riesgo bajo en 0.8% solo en el grupo CD10+. En lo que respecta al tratamiento con esteroides y la respuesta que hubo de acuerdo al grupo CD10+/CD10- ambos grupos tiene un porcentaje de respuesta entre el 76.7% y 71.4% respectivamente.

Tabla 20. Expresión de marcadores CD66c/CD123+, CD73/CD304+ en EMR del día 1, 90 y 180 de seguimiento.

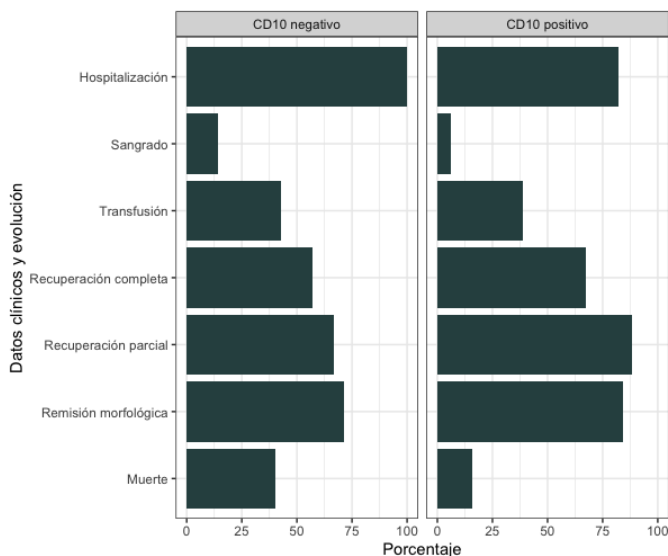
<b>Seguimiento 1-90 días</b>			
RESULTADO DETECTADO	11/120 (29.7%)	0/7 (0%)	1
CD66c/CD123+. 7	109/120 (90.8%)	7/7 (100%)	0.704
CD73/CD304+. 9	108/120 (90.0%)	7/7 (100%)	0.679
<b>Seguimiento 90-180 días</b>			
RESULTADO DETECTADO	10/30 (33.3%)	1/2 (50%)	0.631
CD66c/CD123+	7/10 (70%)	0/1 (0%)	0.364
CD73/CD304+	6/10 (60%)	1/1 (100%)	0.428

A los pacientes que tuvieron una EMR detectada a los 36 días después de la inducción, se les realizó una EMR entre el día 1-90 teniendo 29.7% de pacientes del grupo CD10+ con EMR detectada y ningún paciente del grupo CD10- a los 180 días se les dio seguimiento y 33% del grupo CD10+ tuvo EMR detectada y el 50% para el grupo CD10-.

Tabla 21. Comparación de variables en pacientes positivos a CD10 vs grupo CD10 negativo al diagnóstico.

<b>Datos clínicos y evolución</b>			
Hospitalización	96/117 (82.1%)	7/7 (100%)	0.601
Sangrado	7/117 (6%)	1/7 (14.3%)	0.381
Transfusión	46 (39%)	3 (42.9%)	0.838
Recuperación completa	77/114 (67.5%)	4/7 (57.1%)	0.683
Recuperación parcial	97/110 (88.2%)	4/6 (66.7%)	0.172
Remisión morfológica	97/115 (84.3%)	5/7 (71.4%)	0.322
Muerte	18/113 (15.9%)	2/5 (40%)	0.16

Figura 5. Comparación de variables en pacientes positivos a CD10 vs grupo CD10 negativo al diagnóstico.



El grupo de pacientes con CD10 negativo presento el 100% de hospitalización y el CD10 positivo 82.1%, en cuanto al sangrado los pacientes del grupo CD10 negativo solo uno de los siete tuvo sangrado y 7% del grupo CD10 positivo. Considerando el porcentaje de transfusión para ambos grupos +/- es de 39% y 42.9% respectivamente no se encontró diferencia significativa que se asocie a un riesgo de presentar sangrado si expresan CD10-/+. En la recuperación ambos grupos se comportan de manera similar teniendo un porcentaje del 67.5% para el grupo CD10+ y 57.1% para los de CD10-, en cuanto a la recuperación parcial fue de 88.2% en CD10+ por arriba de CD10- que fue de 66.7%, en la remisión morfológica podemos decir que ambos grupos presentan 84.3% y 71.4% sin diferencia significativa  $p > 0.05$ . En las muertes consideremos que el grupo CD10- solo fueron evaluados 7 pacientes de los cuales murieron 2 representando un 40%, dos de los pacientes no regresaron al seguimiento no se encontraron datos de su fallecimiento.

Tabla 22. Índice de correlación de Spearman (Rho) entre CD10 negativo al diagnóstico e inmunofenotipo en enfermedad mínima residual.

Índice de correlación (Rho)	CD10 negativo	P-value
Datos clínicos y evolución		
Hospitalización	0.11	0.222
Sangrado	0.078	0.389
Transfusión	0.018	0.84
Recuperación completa	0.052	0.574
Recuperación parcial	-0.142	0.128
Remisión morfológica	-0.081	0.374
Muerte	0.129	0.163

Nuestra  $n=7$  no es significativa por lo tanto podemos confirmar si hay o no una correlación. Los datos analizados indican que no existe una correlación lineal entre la ausencia de CD10 al diagnóstico de LLA con la expresión de los marcadores de EMR.

Tabla 23. Índice de correlación de Spearman (Rho) entre CD10 negativo al diagnóstico y características de datos clínicos y evolución

Índice de correlación (Rho)	CD10 negativo	P-value
Enfermedad medica residual		
D66c+	-0.296	0.095
CD123+	-0.296	0.095
CD73+	-0.153	0.396
CD304+	-0.153	0.396

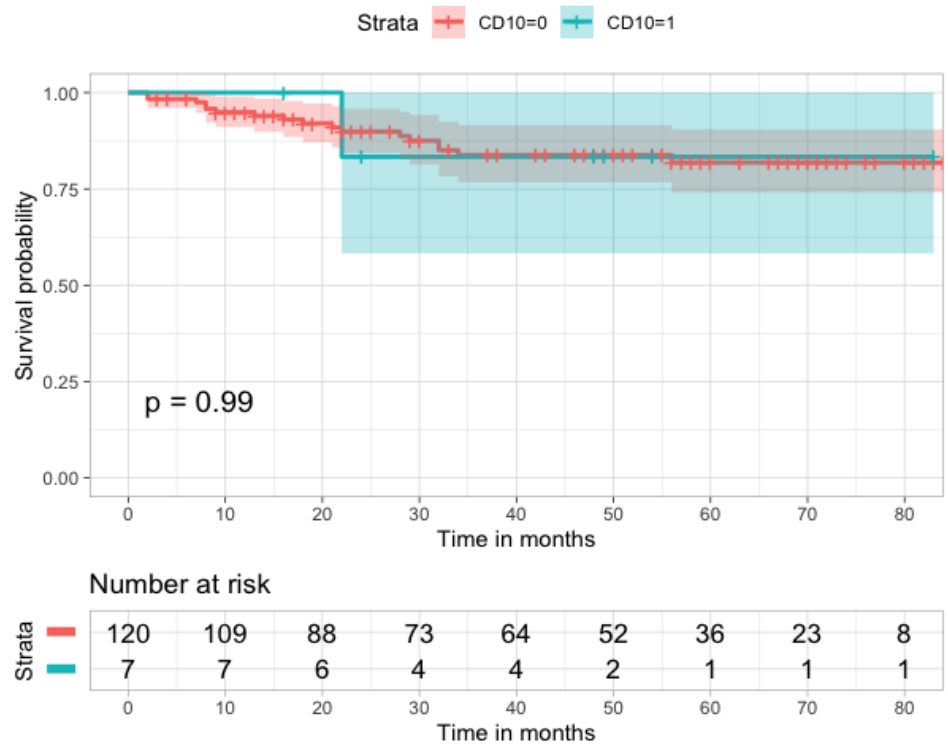
Los datos clínicos en el grupo CD10- no tienen correlación no podemos concluir si existe o no mayor riesgo de recaída si no es expresado este marcador.

Tabla 24. Regresión logística univariada y regresión lineal como predictor de mortalidad debido a CD10- al diagnóstico.

CD10 negativo como factor de riesgo para			
	OR (95% CI)	P-value	
<b>Mortalidad</b>	3.519 (0.548 - 22.574)	0.185	
	R y R2	Coef B	P-value
<b>Mortalidad</b>	0.129 / 0.017	0.241	0.163

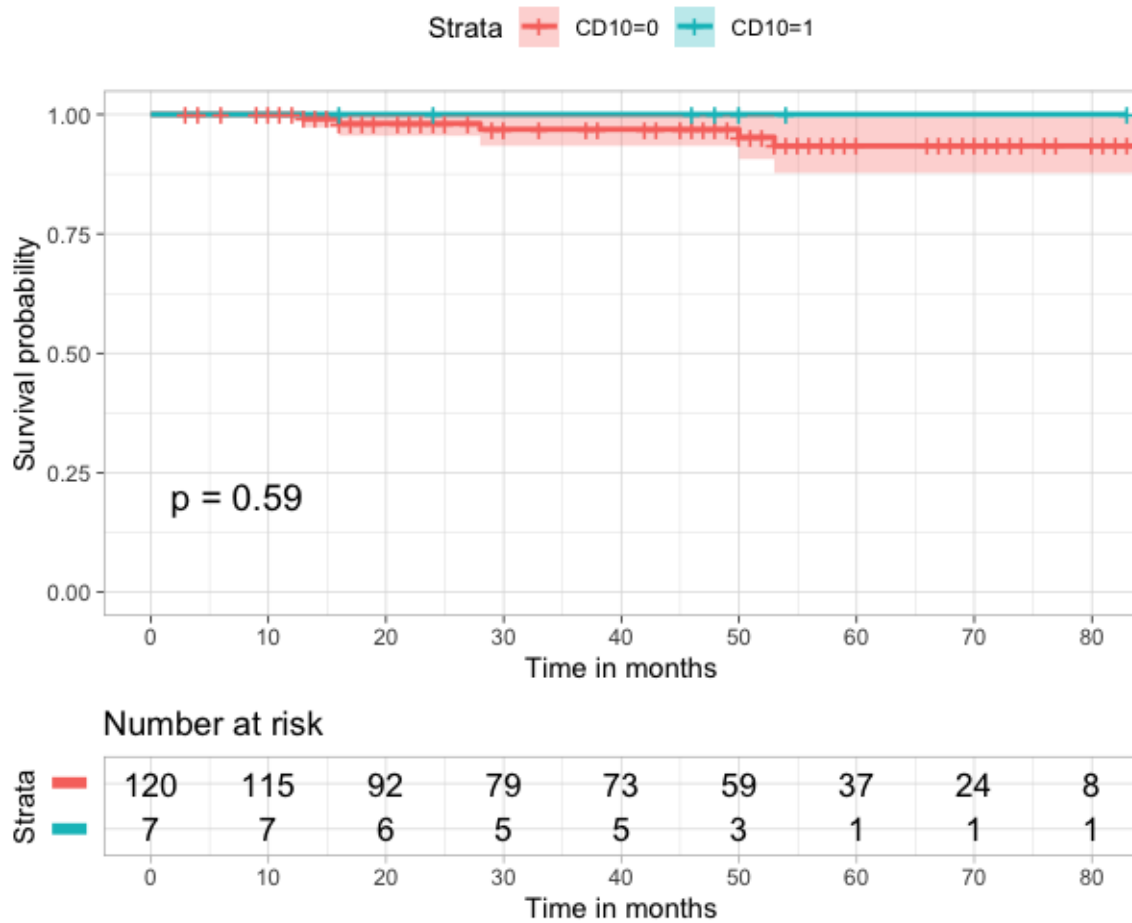
Un antígeno CD10 negativo al diagnóstico de LLA no es factor predictivo para mortalidad en niños de esta cohorte, un OR de 3.519 (IC 95% 0.548 - 22.574),  $p = 0.185$  en el análisis de regresión logística, y una R cuadrada de 0.017, en el análisis de regresión lineal  $p = 0.163$ .

**Figura 6. Kaplan Meier para riesgo de muerte entre pacientes con CD10 positivo (0) y CD10 negativo (1) al diagnóstico.**



Se realizó una prueba de Log Rank para comparar la supervivencia entre ambos grupos. No se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos.

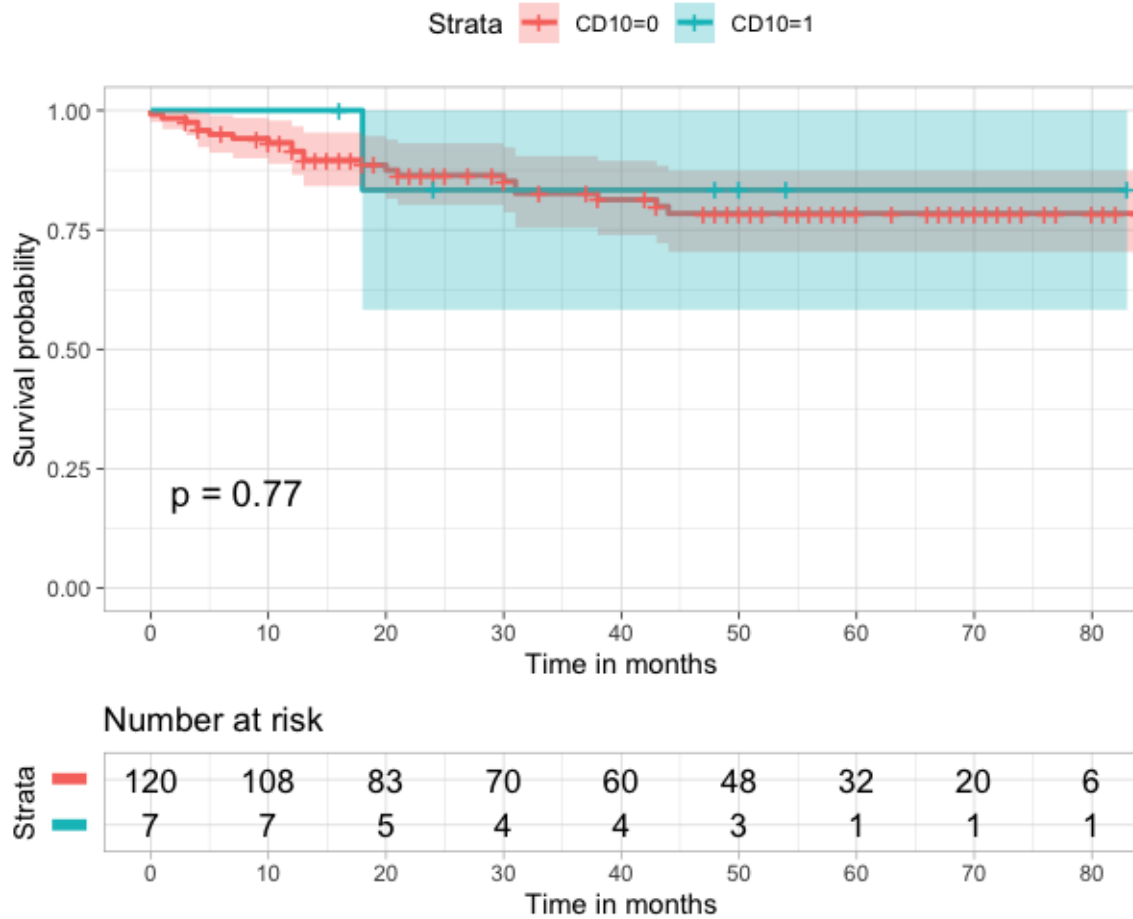
**Figura 7. Kaplan Meier para riesgo de recaída temprana entre pacientes con CD10 positivo (0) y CD10 negativo (1) al diagnóstico.**



Se realizó una prueba de Log Rank para comparar la supervivencia entre ambos grupos. No se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos.



**Figura 8. Kaplan Meier para riesgo de recaída tardía entre pacientes con CD10 positivo (0) y CD10 negativo (1) al diagnóstico.**



Se realizó una prueba de Log Rank para comparar la supervivencia entre ambos grupos. No existió una diferencia estadísticamente significativa.

## Discusión

El CD10 negativo al momento del diagnóstico de LLA-B en la infancia en la actualidad no es de mal pronóstico y no está asociada con la expresión de CD-66/123 y CD73/304 en el estudio de enfermedad residual medible, nuestro estudio rebela que ambos grupos de pacientes CD10+/- tenían el mismo porcentaje de riesgo en tener una recaída después o durante el tratamiento. Las limitaciones impuestas para este estudio incluyen el número reducido de casos CD10 negativos debido a la baja frecuencia de pacientes con este inmunofenotipo por lo que no se pudo comprobar la asociación de la ausencia de CD10 negativo al diagnóstico de LLA-B con una evolución clínica negativa, ni la correlación con la presencia de marcadores de EMR, por lo tanto esto limitó la capacidad de emplear modelos estadísticos complejos; el tiempo de seguimiento, que es relativamente corto para algunos grupos de pacientes, lo cual impide la evaluación a largo plazo de las asociaciones clínicas de los marcadores inmunofenotípicos utilizados.

En Latinoamérica el 80% de las leucemias linfoblásticas agudas se manifiestan en edad pediátrica teniendo una alta prevalencia en los niños.<sup>(55)</sup> Fajardo y colaboradores informan que en México la leucemia aguda ocupa el primer lugar y corresponde a 34.4% del total de neoplasias, de éstas la LLA es la más frecuente (83.3%).<sup>(56)</sup>

La citometría de flujo en las últimas décadas se ha convertido en una herramienta de gran utilidad gracias a su alta sensibilidad y especificidad que comparándola con otras técnicas moleculares esta técnica solo utiliza anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromos como lo indican las guías y recomendaciones estandarizadas por EuroFlow.<sup>(57)</sup> Durante la década de los 80s la ausencia del marcador CD10 en LLA en población latina era considerado de mal pronóstico teniendo una sobrevida para estos pacientes de 1 año siendo éste un hallazgo raro dentro del inmunofenotipo de LLA.<sup>(58)</sup> Luigi de Salvo y colaboradores en 1992 realizaron un estudio entre 1985-1990 donde describen por primera vez pacientes con CD10 negativo teniendo una media de edad de 11 años con una relación masculino-femenino 5:3 comparando con nuestro estudio una mediana de 4 años con relación 2:1 teniendo predominio en el sexo masculino. De acuerdo a estudios publicados por Jaime- Pérez y colaboradores reportan la frecuencia de leucemia linfoblástica aguda de acuerdo a la edad y sexo en una corte hispana donde la frecuencia entre hombres y mujeres era 1:1 y después de los 10 años

la incidencia aumentaba 1.5 veces mayor en varones, datos que son corroborados con nuestro estudio en el cual la población se comportó de la misma manera. En el estudio que se presenta se observan datos coincidentes con esas afirmaciones, también mencionan la alta expresión de antígenos de histocompatibilidad mayor de clase II (DR) y CD19 lo que se confirma con el inmunofenotipo de la población que se estudió, en cuanto a la adenomegalia y hepatomegalia todos sus pacientes la presentaron con la misma frecuencia, contrario a nuestro estudio, en donde la hepatomegalia tuvo una mayor frecuencia como lo confirman otros estudios publicados en México.

Halfon Domenech describió en las características epidemiológicas de la LLA que la edad entre dos y cinco años era la que más frecuente en su grupo de estudio por lo que concluyo que este tipo de patología tiene mayor predominio principalmente en edades pediátrica.<sup>(59)</sup>

En la mayoría de los ensayos clínicos la clasificación del riesgo se basa en la edad, cuenta de leucocitos al momento del diagnóstico, anormalidades genéticas, inmunofenotipo y en algunos estudios el género masculino se considera un factor adverso, Lourdes C. Correa, González y Colb realizaron un estudio retrospectivo en un Hospital de San Luis Potosí, describiendo las frecuencias de LLA de acuerdo al inmunofenotipo en donde la LLA-B común presentó mayor prevalencia teniendo en segundo lugar la LLA-preB, la frecuencia en cuanto al tipo de leucemia descritas en población latina corresponde a la de nuestra población.<sup>(60)</sup>

En cuando al inmunofenotipo de la LLA-B la expresión de CD34, CD10 Y CD19 se han asociado a eventos clínicos relacionados a la biometría hemática como lo describe Munawar Ali Shah y colaboradores en su investigación en el Hospital de Pakistán en donde demuestran que la expresión de CD10/CD34 está asociado a un aumento de leucocitos y en el porcentaje de blastos en sangre periférica y una disminución del recuento plaquetario, datos que coinciden con la investigación de Nadia Dakka y colaboradores en Marruecos en donde asociaron estos marcadores con la sobrevida global de los pacientes que expresaban CD19, CD34 Y CD10 la cual era mayor respecto a los que no lo expresaban, en base al estudio realizado se observó similitud en la expresión marcadores tiene el mismo impacto clínico en cuanto a la biometría hemática teniendo un aumento de leucocitos y blastos en sangre periférica y bajo recuento plaquetario, teniendo misma sobrevida global de los que no los expresaron.<sup>(40,61,62)</sup>

La respuesta precoz al tratamiento de inducción es uno de los factores pronósticos más importantes en niños con LLA. En la actualidad la remisión citológica es del 95-99% en pacientes pediátricos de raza caucásica según P.Bastida y colaboradores. Nuestro trabajo demostró que la remisión morfológica está por debajo de ese porcentaje en los últimos 5 años, uno de los factores por los que nuestros pacientes tienen menor respuesta morfológica pudiera ser en primer lugar la etapa en la que es diagnosticada la enfermedad pues en su mayoría son pacientes diagnosticados en etapas muy avanzadas esto por falta de atención médica especializada y el segundo es el desapego y abandono al tratamiento razón por la que los medicamentos no cumplen su objetivo.

P.Bastida y colaboradores realizaron un estudio para darle seguimiento a los pacientes post inducción y consolidación, a 6 y 11 meses de mantenimiento, al final del tratamiento y 3 meses después encontrando que el 37% de sus pacientes tenían EMR post-inducción y 20% post-consolidación, el presente trabajo demuestra que nuestro porcentaje de EMR detectada mayor a la que ellos reportaron considerando que el esquema de tratamiento fue diferente ellos reportan EMR detectada post consolidación un 20%, en comparación con nuestra población que tuvo un porcentaje menor al reportado en aquella época, lo que significa que los tratamientos actuales permiten tener una mayor respuesta temprana disminuyendo el porcentaje de detección., hay que considerar que la citometría de flujo es un método de alta sensibilidad lo que permite ser más preciso al momento del diagnóstico la cual es factor de gran impacto al momento del seguimiento de la enfermedad.

Estefanía Cuta menciona que el Boletín Epidemiológico semanal del instituto nacional de Salud de Colombia reporta 55% de recaída en pacientes con proceso de remisión. Cuta y colaboradores en su estudio hicieron una estratificación de riesgo de EMR por citometría de flujo de acuerdo a la sensibilidad de detección celular hematológica conforme al porcentaje de blastos, proponen un grupo de alto riesgo aquel que tiene  $EMR \geq 10^{-3}$  (0.1%) en el día 33 y su detección continua en el día 78 y de riesgo normal enfermedad mínima residual  $\leq 10^{-2}$  (< 0.1%) en el día 15 del tratamiento.<sup>(48)</sup> Considerando esta clasificación nuestros pacientes con EMR detectada post inducción se clasifican en el grupo de alto riesgo de recaída aumentando la probabilidad de esta misma.

En cuanto a la supervivencia libre de recaída Jaime-Pérez y colaboradores reportaron en su estudio en una población hispana en México que los varones a partir de los 10 años tienen mayor incidencia y peor pronóstico que las mujeres, en nuestra investigación no hubo diferencia significativa en cuanto al sexo como factor de mal pronóstico. <sup>(27,63)</sup>. La edad es un factor que si influye fuertemente en la evolución clínica de LLA de acuerdo a Jaime-Pérez y colaboradores en su estudio donde demuestran que la edad es una variable que, si favorece la respuesta y supervivencia de los pacientes, algo que se pudo confirmar con el presente estudio el cual demuestra que los pacientes pediátricos tienen mayor supervivencia y mejor pronóstico que los pacientes en etapa de pubertad. <sup>(64)</sup>

## **Conclusiones**

La ausencia de CD10 al diagnóstico de LLA-B de la infancia no se asoció con la expresión de CD66c/123 y CD73/304 en el estudio de enfermedad residual medible.

La investigación demostró que un antígeno CD10 negativo al diagnóstico de LLA no fue un factor pronóstico para mortalidad o recaída en los pacientes de esta cohorte.

## Referencias

1. Bouriche L, Bernot D, Nivaggioni V, Arnoux I, Loosveld M. Detection of Minimal Residual Disease in B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Using an Eight-Color Tube with Dried Antibody Reagents. *Cytometry B Clin Cytom.* 2019;96(2):158–63.
2. Cavé 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.* el 27 de agosto de 1998;339(9):591–8.
3. Gaipa G, Basso G, Biondi A, Campana D. Detection of minimal residual disease in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom.* 2013;84(6):359–69.
4. Faster clinical decisions in B-cell acute lymphoblastic leukaemia: A single flow cytometric 12-colour tube improves diagnosis and minimal residual disease follow-up. [citado el 11 de marzo de 2024]; Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bjh.19390>
5. A Lassaletta Atienza. Leucemias. Leucemia linfoblástica aguda. *Pediatría Integral.* agosto de 2016;XX(6):380–9.
6. Peters C, Locatelli F, Bader P. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children and Adolescents. En: Carreras E, Dufour C, Mohty M, Kröger N, editores. *The EBMT Handbook* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2019 [citado el 11 de marzo de 2024]. p. 539–45. Disponible en: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-02278-5\\_72](http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-02278-5_72)
7. Sánchez MAO, Ortega MLO, Barrientos JVR. Leucemia linfoblástica aguda. *Med Interna México.* 2007;
8. Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J.* el 1 de junio de 2017;7(6):e577–e577.
9. Gong Y, Fan N, Yang X, Peng B, Jiang H. New advances in microfluidic flow cytometry. *Electrophoresis.* el 22 de septiembre de 2018;
10. Morales-Peralta A, Covarrubias-Espinoza G, Rendón-García H, Larios-Farak TC. Supervivencia en Niños con Leucemia Aguda Linfoblástica Tratados en Base a Factores de Riesgo Inmunomoleculares.
11. Dorantes-Acosta E, Medina-Sanson A, Dávila-Ornelas K, López-Martínez B. Clasificación inmunológica de las leucemias agudas linfoblásticas del Hospital Infantil de México Federico Gómez, de acuerdo al EGIL ( European Group for the Immunological Classification of Leukemia). *Gac Mex Oncol.* 2013;12(3):136–42.
12. Sędek Ł, Theunissen P, Sobral da Costa E, van der Sluijs-Gelling A, Mejstrikova E, Gaipa G, et al. Differential expression of CD73, CD86 and CD304 in normal vs. leukemic B-cell precursors and their utility as stable minimal residual disease markers in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *J Immunol Methods.* diciembre de 2019;475:112429.
13. Verbeek MWC, Buracchi C, Laqua A, Nierkens S, Sedek L, Flores-Montero J, et al. Flow cytometric minimal residual disease assessment in B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia patients treated with CD19-targeted therapies - a EuroFlow study. *Br J Haematol.* abril de 2022;197(1):76–81.
14. Balandrán JC, Camacho RP. Ontogenia de los linfocitos B. *Rev Alerg México.* el 1 de marzo de 2016;63(1):71–9.
15. García-Muñoz R. Aspectos inmunológicos relacionados con la generación de linfomas y autoinmunidad. *Inmunología.* el 1 de enero de 2010;29(1):34–49.
16. Calleja CM, Puras AM. Diagnóstico y monitorización inmunofenotípica de las

- neoplasias leucocitarias: Sociedad Española de Inmunología. Elsevier Health Sciences; 2018. 126 p.
17. Tarlinton D. B-cell memory: are subsets necessary? *Nat Rev Immunol.* octubre de 2006;6(10):785–90.
  18. Yokoyama WM, Colonna M. Innate immunity to pathogens. *Curr Opin Immunol.* el 1 de febrero de 2008;20(1):1–2.
  19. Matthias P, Rolink AG. Transcriptional networks in developing and mature B cells. *Nat Rev Immunol.* junio de 2005;5(6):497–508.
  20. Marsán Suárez V, Sánchez Segura M, Socarrás Ferrer BB, Martínez Machado M, Cos Padrón Y, del Valle Pérez L, et al. Leucemia linfocítica aguda común: Estudio del inmunofenotipo y las características clínicas y morfológicas. *Rev Cuba Hematol Inmunol Hemoter.* agosto de 2004;20(2):0–0.
  21. Cuéllar-Mendoza ME, Chávez-Sánchez FR, Dorantes-Acosta E, Arsuaga-Jiménez BM, Zapata-Tarrés MM. Aberrant immunophenotypes in acute lymphoblastic leukemia. *Bol Méd Hosp Infant México.* el 24 de agosto de 2020;77(6):3943.
  22. Meza-Junco J, Montañón-Loza A, Aguayo-González Á. Bases moleculares del cáncer.
  23. Galano LAS, Pérez LYD, Cantillo M. FILIAL CIENCIAS MÉDICAS BARACOA.
  24. Asakura K, Uchida H, Miyachi H, Kobayashi H, Miyakawa Y, Nimer SD, et al. TEL/AML1 overcomes drug resistance through transcriptional repression of multidrug resistance-1 gene expression. *Mol Cancer Res MCR.* junio de 2004;2(6):339–47.
  25. Joyce D, Albanese C, Steer J, Fu M, Bouzahzah B, Pestell RG. NF-kappaB and cell-cycle regulation: the cyclin connection. *Cytokine Growth Factor Rev.* marzo de 2001;12(1):73–90.
  26. Peters C, Locatelli F, Bader P. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children and Adolescents. En: Carreras E, Dufour C, Mohty M, Kröger N, editores. *The EBMT Handbook* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2019 [citado el 11 de marzo de 2024]. p. 539–45. Disponible en: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-02278-5\\_72](http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-02278-5_72)
  27. Jaime-Pérez JC, López-Razo ON, García-Arellano G, Pinzón-Uresti MA, Jiménez-Castillo RA, González-Llano O, et al. Results of Treating Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia in a Low-middle Income Country: 10 Year Experience in Northeast Mexico. *Arch Med Res.* noviembre de 2016;47(8):668–76.
  28. Díaz CIE. Leucemia linfoblástica aguda y complicaciones neurológicas en niños y adolescentes. 2019;
  29. Berry DA, Zhou S, Higley H, Mukundan L, Fu S, Reaman GH, et al. Association of Minimal Residual Disease With Clinical Outcome in Pediatric and Adult Acute Lymphoblastic Leukemia: A Meta-analysis. *JAMA Oncol.* el 13 de julio de 2017;3(7):e170580.
  30. Rocío Juárez-Velázquez, Patricia Pérez-Vera. Citometría de flujo en la evaluación de enfermedad mínima residual en leucemia linfoblástica aguda. *Acta Pediátrica México* [Internet]. el 9 de julio de 2014 [citado el 28 de febrero de 2023];33(4). Disponible en: <https://ojs.actapediatrica.org.mx/index.php/APM/article/view/567>
  31. Theunissen P, Mejstrikova E, Sedek L, van der Sluijs-Gelling AJ, Gaipa G, Bartels M, et al. Standardized flow cytometry for highly sensitive MRD measurements in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* el 19 de enero de 2017;129(3):347–57.
  32. van Dongen JJ, van der Velden VH, Brüggemann M, Orfao A. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies. *Blood J Am Soc Hematol.* 2015;125(26):3996–4009.

33. Eveillard M, Robillard N, Arnoux I, Garand R, Rialland F, Thomas C, et al. Major impact of an early bone marrow checkpoint (day 21) for minimal residual disease in flow cytometry in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol*. junio de 2017;35(2):237–43.
34. Brassesco MS, Xavier DJ, Camparoto ML, Montaldi AP, de Godoy PRDV, Scrideli CA, et al. Cytogenetic instability in childhood acute lymphoblastic leukemia survivors. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:230481.
35. El-Sharnouby JA, Abou El-Enein AM, El Ghannam DM, El-Shanshory MR, Hagag AA, Yahia S, et al. Expression of lung resistance protein and multidrug resistance-related protein (MRP1) in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *J Oncol Pharm Pract Off Publ Int Soc Oncol Pharm Pract*. septiembre de 2010;16(3):179–88.
36. Gayet L, Dayan G, Barakat S, Labialle S, Michaud M, Cogne S, et al. Control of P-glycoprotein activity by membrane cholesterol amounts and their relation to multidrug resistance in human CEM leukemia cells. *Biochemistry*. el 22 de marzo de 2005;44(11):4499–509.
37. Determinación cuantitativa de la enfermedad mínima residual por citometría de flujo en pacientes con leucemia aguda linfoblástica [Internet]. [citado el 27 de febrero de 2023]. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-gaceta-mexicana-oncologia-305-pdf-X1665920114581999>
38. Juárez-Avendaño G, Méndez-Ramírez N, Luna-Silva NC, Gómez-Almaguer D, Pelayo R, Balandrán JC, et al. Molecular and cellular markers for measurable residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Bol Méd Hosp Infant México*. junio de 2021;78(3):159–70.
39. Kruse A, Abdel-Azim N, Kim HN, Ruan Y, Phan V, Ogana H, et al. Minimal Residual Disease Detection in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Int J Mol Sci*. el 5 de febrero de 2020;21(3):1054.
40. Aberuyi N, Rahgozar S. Negative value of CD10-/CD34- immunophenotype in pediatric leukemia and development of a related cell line model for investigating drug resistance. *Clin Transl Oncol Off Publ Fed Span Oncol Soc Natl Cancer Inst Mex*. junio de 2022;24(6):1148–56.
41. Beckman Coulter. Beckman coulter. [citado el 5 de abril de 2023]. CD10. Disponible en: <https://www.beckman.mx/reagents/coulter-flow-cytometry/antibodies-and-kits/single-color-antibodies/cd10>
42. Ortiz-Rey JA, Gómez de María C, Peláez Boismorand E, Fernández Costas A, Barbosa Barreiro MJ, Antón Badiola I. Expresión de CD10 y del marcador de carcinoma renal en el carcinoma renal de células claras: Análisis en matrices tisulares. *Actas Urol Esp*. marzo de 2006;30(3):281–6.
43. Castañeda-Partida L, Ocadiz-Delgado R, Sánchez-López JM, García-Villa E, Peñaloza-González JG, Velázquez-Aviña MM, et al. Global expression profiling of CD10 + /CD19 + pre-B lymphoblasts from Hispanic B-ALL patients correlates with comparative TARGET database analysis. *Discov Oncol*. el 21 de abril de 2022;13(1):28.
44. López Almaraz R, Raya Sánchez JM, Martínez Pineda B, Cabrera Rodríguez R, Rodríguez Luis J. Estudio de la enfermedad mínima residual en el cáncer infantil. *Oncol Barc [Internet]*. 2004 [citado el 5 de abril de 2023];27(10). Disponible en: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-48352004001000001&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-48352004001000001&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
45. Hernández F, Wendolynee N. Factores pronóstico para recaída en pacientes con



- leucemia linfoblástica aguda tratados con protocolo ST jude total XV, en el Departamento de Hemato-Oncología Pediátrica del Centenario Hospital Miguel Hidalgo. marzo de 2023 [citado el 5 de abril de 2023]; Disponible en: <http://bdigital.dgse.uaa.mx:8080/xmlui/handle/11317/2461>
46. Otega MTM. Diagnóstico y Tratamiento Leucemia Linfoblástica Aguda en el Adulto.
  47. Montante S, Brinkman RR. Flow cytometry data analysis: Recent tools and algorithms. *Int J Lab Hematol*. 2019;41:56–62.
  48. Cuta-Hernández E, Cruz-Baquero CA. Minimal residual disease by flow cytometry in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Rev Hematol*. 2022;23(1):58–69.
  49. Leucemia mínima residual: nuevo concepto de remisión completa [Internet]. [citado el 27 de febrero de 2023]. Disponible en: <https://www.analesdepediatria.org/es-pdf-13080401>
  50. Junior F, Flores P, Prato C, Pelloso L, Chapchap E, Kerbauy F, et al. Venetoclax e citarabina em baixa dose (cbd) associado a azóxico como 1ª linha de tratamento para leucemia mieloide aguda em pacientes não elegíveis à quimioterapia intensiva - série de casos. *Hematol Transfus Cell Ther*. el 1 de octubre de 2022;44:S174–5.
  51. Li W. Flow Cytometry in the Diagnosis of Leukemias. En: Li W, editor. *Leukemia* [Internet]. Brisbane (AU): Exon Publications; 2022 [citado el 14 de abril de 2023]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK586209/>
  52. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol*. el 17 de febrero de 2017;37(2):163–76.
  53. Lúcio P, Parreira A, van den Beemd MW, van Lochem EG, van Wering ER, Baars E, et al. Flow cytometric analysis of normal B cell differentiation: a frame of reference for the detection of minimal residual disease in precursor-B-ALL. *Leukemia*. marzo de 1999;13(3):419–27.
  54. Zhang Y, Zhao Y, Cole T, Zheng J, Bayinqiaoge null, Guo J, et al. Microfluidic flow cytometry for blood-based biomarker analysis. *The Analyst*. el 27 de junio de 2022;147(13):2895–917.
  55. Reyes-López A, Miranda-Lora AL, Ruíz-Cano J, Manuell-Lee G, Dorantes-Acosta E, Zapata-Tarrés M, et al. Factores pronósticos de supervivencia en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda afiliados al Seguro Popular. *Bol Méd Hosp Infant México*. junio de 2012;69(3):197–204.
  56. Fajardo-Gutiérrez A, Mejía-Arangur JM, Hernández-Cruz L, Mendoza-Sánchez HF, Garduño-Espinosa J, Martínez-García MDC. Epidemiología descriptiva de las neoplasias malignas en niños. *Rev Panam Salud Pública*. agosto de 1999;6(2):75–88.
  57. Glier H, Heijnen I, Hauwel M, Dirks J, Quarroz S, Lehmann T, et al. Standardization of 8-color flow cytometry across different flow cytometer instruments: A feasibility study in clinical laboratories in Switzerland. *J Immunol Methods*. diciembre de 2019;475:112348.
  58. Salvo LD, Plumacher Z, Ríos M, Romero E, Weir J, Gómez O, et al. Leucemia linfoblástica aguda CD10 (calla) negativo. Grupo de mal pronóstico. *Investig Clínica* [Internet]. 1992 [citado el 12 de junio de 2024];33(4). Disponible en: <https://produccioncientificaluz.org/index.php/investigacion/article/view/28219>
  59. Halfon-Domenech C. Leucemia linfoblástica aguda del niño y el adolescente. *EMC - Pediatría*. el 1 de marzo de 2021;56(1):1–9.
  60. Correa-González LC, Mandeville PB, Manrique-Dueñas J, Alejo-González F, Salazar-Martínez A, Pérez-Ramírez O de J. Valor pronóstico del inmunofenotipo en la respuesta temprana de la leucemia aguda linfoblástica pre-B en niños. 2005;141(6).

61. Ali Shah M, Ahmad U, Tariq Mahmood M, Ahmad AH, Abu Bakar M. Frequency of CD34 and CD10 Expression in Adolescent and Young Adult Patients Having Precursor B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia and Its Correlation With Clinical Outcomes: A Single-Center Study. *Cureus*. enero de 2022;14(1):e21261.
62. Cáp J, Babusíková O, Kaiserová E, Jamárik M. Expression of CD10, CD19 and CD34 markers in bone marrow samples of children with precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia in clinical and hematological remission. *Neoplasma*. 1998;45(4):231–6.
63. Jaime-Pérez JC, Hernández-De Los Santos JA, Fernández LT, Padilla-Medina JR, Gómez-Almaguer D. Sexual Dimorphism in Children and Adolescents With Acute Lymphoblastic Leukemia: Influence on Incidence and Survival. *J Pediatr Hematol Oncol*. julio de 2020;42(5):e293–8.
64. Jaime-Pérez JC, Fernández LT, Jiménez-Castillo RA, Gómez-De León A, Cantú-Rodríguez OG, Gutiérrez-Aguirre CH, et al. Age Acts as an Adverse Independent Variable for Survival in Acute Lymphoblastic Leukemia: Data From a Cohort in Northeast Mexico. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. septiembre de 2017;17(9):590–4.