

CORRELACIÓN DEL PERFIL GENÉTICO CON LA ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL AL DÍA 15 Y
AL FINAL DE LA INDUCCIÓN EN NIÑOS MENORES DE 18 AÑOS CON DIAGNÓSTICO DE
LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA DE PRECURSORES B, EN UN CENTRO DE REFERENCIA.

JESSICA FLECHAS AFANADOR

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:
Especialista en Oncohematología Pediátrica

Directora: Teresa Adriana Linares Ballesteros
Oncohematóloga Pediatra
Profesora Titular
Departamento de Pediatría
Universidad Nacional de Colombia
HOMI Fundación Hospital La Misericordia

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA
ESPECIALIDAD EN ONCOHEMATOLOGÍA PEDIÁTRICA
BOGOTÁ D.C
2019

Correlación del perfil genético con la enfermedad mínima residual al día 15 y al final de la inducción en niños menores de 18 años con diagnóstico de Leucemia linfocítica aguda de precursores B, en un centro de referencia.

Resumen:

En niños con Leucemia linfocítica aguda se recomienda tomar estudios de citogenética y alteraciones moleculares. En población colombiana no se conoce la prevalencia de estos hallazgos ni su asociación con la enfermedad mínima residual (EMR).

Objetivo:

Correlacionar los hallazgos del perfil genético con la Enfermedad mínima residual (EMR) al día 15 de iniciado el tratamiento y al final de inducción en niños menores de 18 años con diagnóstico de Leucemia Linfocítica Aguda de precursores B, en un centro de Referencia desde enero de 2015 a julio de 2019.

Resultados:

Se analizaron 254 pacientes. Encontrando citogenética Normal en 178 (70,1%), anormal en 46(18%), de estos cariotipos anormales 25(9,8%) mostraban Hiperdiploidía. De las alteraciones moleculares, la t(12;21) fue positiva en 26 (10,2%), t(9;22) en 8(3,1%), y t(4;11) en 1(0,4%). La EMR al día 15 en 70 (27%) pacientes se encontró <0,1%, 105 (41,3%) tuvieron entre 0,1 a <10%, y 73 (28%) presentaron EMR >10%. Al final de la inducción 192 (75.5%) tenían EMR <0,01%. En la correlación del perfil genético con la EMR, los que presentaron EMR al día 15 $\geq 10\%$ 8/73 (10,9%) tenían la t(12;21), 7/73(9,5%) la t(9;22) y 1 (1,36%) la t(4;11). Se encontró que tener translocación 9;22 positiva tiene OR 18,9 (IC95% 2,27-156) con una p 0,001 para tener EMR >10% al día 15; pero no se encuentra esta asociación al día 33. Se necesitan más estudios que permitan establecer la asociación entre alteraciones citogenéticas y moleculares con desenlaces como persistencia de enfermedad mínima residual.

Palabras clave: Leucemia linfoblástica, niños, genética, citometría de flujo.

Introducción:

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es el cáncer más frecuente en los niños, constituye el 23% del total de las neoplasias en menores de 15 años, con supervivencia en países desarrollados del 80-90% (Pui, 2006. Möricke, 2010. Hunger, 2015).

En los países en vías de desarrollo las tasas de supervivencia son menores que en los países desarrollados (Howard, 2008). En un estudio de Trujillo y cols 2016 estudiaron 119 pacientes, encontrando tasas de supervivencia global y libre de evento de 79,9% y 73,3% respectivamente.

El tratamiento se basa en la estratificación en grupos de riesgo definido por características como edad al diagnóstico, recuento de leucocitos al debut, linaje de las células leucémicas ya sean B o T, compromiso o no del sistema nervioso central, anomalías citogenéticas y moleculares, respuesta al tratamiento al día 8, además de la medición de enfermedad mínima residual medida por citometría de flujo al día 15 y 33 de iniciado el tratamiento (Ratei, 2009).

La identificación de estas anomalías moleculares tiene importancia pronóstica (Pui, 2006), pues muchas de ellas desregulan oncogenes o codifican proteínas que juegan un papel en la leucemogénesis (Reshmi, 2017). En los estudios de citogenética, se puede caracterizar las alteraciones numéricas o estructurales de los cromosomas, ejemplo hipodiploidía (menos de 45 cromosomas por célula leucémica) o hiperdiploidía (más de 50 cromosomas), de estas la más comúnmente involucrada es la ganancia del cromosoma 4, 10, 14, 17 y 21, pero su rol aún no está establecido (Roberts, 2015).

Los rearrreglos moleculares varían en su prevalencia de acuerdo con la edad y el grupo de riesgo, la $t(12;21)$ se presenta en un 30,6% en los niños de 1 a 9 años de riesgo estándar, la $t(9;22)$ que fusiona el oncogen ABL1 con la región BCR del cromosoma 22, es más frecuente en adolescentes en un 5,9%, y la $t(4;11)$ hasta en un 4,8% en los niños de 1 a 9 años del grupo de alto riesgo. Recientemente se ha descrito un subgrupo caracterizado por un perfil de expresión génica similar al BCR-ABL 1, denominado Philadelphia like y este se ha encontrado hasta en un 12,3% en los adolescentes. (Pui, 2006. Mullighan, 2014).

La EMR es un factor pronóstico independiente de recaída, permite evaluar respuesta al tratamiento. Los métodos comúnmente utilizados para su detección son la citometría de flujo para la detección de blastos leucémicos por aberrancia en su inmunofenotipo y el uso de técnicas de análisis de PCR cuantitativa (qPCR) para el análisis de rearrreglos de Inmunoglobulinas o del receptor de la célula T. La sensibilidad de la CMF, es un logaritmo menor a las técnicas moleculares (1×10^{-4}) (Brüggemann,2017). Ambas muestran tasas de concordancias del 90% en la mayoría de estudios, usando el punto de corte para determinar EMR negativa de 0,01% , se demuestran sobrevida global y libre de evento a 5 años similar en las dos pruebas (Coustan-Smith E,2002. Wood, 2018). La mayoría de discrepancias son frecuentemente encontradas en los pacientes que tienen niveles de EMR $< 10^{-4}$, en los cuales la CMF se reporta como negativa y qPCR es positiva , esto puede ser explicado por la mayor sensibilidad de qPCR, en la detección de blastos no viables, la amplificación no específica de DNA normal o los cambios del inmunofenotipo posterior al tratamiento. (Chen,2017).

El objetivo principal de este trabajo es identificar si hay correlación del perfil genético (citogenética y alteraciones moleculares recurrentes) con la presencia de enfermedad mínima residual medida por citometría de flujo al día 15 y 33 de iniciado el tratamiento, en niños menores de 18 años con diagnóstico de Leucemia Linfocítica Aguda de precursores B, en un centro de Referencia.

Material y Métodos:

Tipo de estudio: Se trata de un estudio observacional descriptivo anidado en una cohorte.

Población:

Criterios de inclusión:

Pacientes mayores de 1 año y menores de 18 años que ingresan al servicio de Oncohematología de la Fundación Hospital de La Misericordia, se realice el diagnóstico de LLA de precursores B y reciban tratamiento institucional. Previa aceptación de participación en el estudio por los padres/cuidadores.

Criterios de exclusión:

Pacientes con LLA en recaída

Pacientes que no hayan recibido la fase de inducción del tratamiento en el servicio de Oncohematología pediátrica de la Fundación HOMI Hospital de La Misericordia.

Tamaño de muestra:

Se analizaron los niños con diagnóstico confirmado de LLA de precursores B de novo que consultaron a la institución desde Enero 1 de 2015 a Julio 31 de 2019. Todos los pacientes firmaron consentimiento de aceptación de ingreso a tratamiento institucional para paciente con LLA de precursores B.

Procedimientos para diagnóstico de Leucemia Linfocítica Aguda:

Dentro de la estrategia de tratamiento actual que se desarrolla en la Institución, se toman muestras de médula ósea a todos los pacientes con sospecha diagnóstica de LLA. Las muestras de médula ósea comprenden extendidos del aspirado para tinciones con giemsa y evaluar la morfología, cilindro de biopsia para evaluación en caso de material insuficiente del aspirado, muestra con heparina para estudio de citogenética y tubo con EDTA para estudios moleculares. Primero se evalúa la morfología en el aspirado y si esta es sugestiva y orienta a leucemia linfocítica aguda, se establece el diagnóstico de acuerdo con los criterios de la OMS. El inmunofenotipo se obtiene mediante técnica de citometría de flujo (FACScanto II, Becton Dickinson Biosciences, San José, CA, EE. UU.) utilizando los paneles Euroflow ALOT (cyCD3-v450, CD45-V500, cyMPO-FITC, cyCD79Ape, CD34-PerCPCy5.5, CD19-PECy7, CD7-APC, CD3-APCH7); Tubo 1B (CD20-V450, CD45-V500c, CD58-FITC, CD66c-PE, CD34-PerCPCy5.5, CD19-PECy7, CD10-APC, CD38-APCH7); Tubo 2B (smlgk-V450, CD45-V500c, cyIgM-FITC, CD33-PE, CD34-PerCPCy5.5, CD19-PECy7, sIgM / CD17-APC, smlgλ-APCH7); Tubo 3B (CD9-PB / V450, CD45-V500c, TdT-FITC, CD13-PE, CD34-PerCPCy5.5, CD19-PECy7, CD22-APC, CD24-APCH7) y Tubo 4B (CD21-V450, CD45-V500c, CD34-PerCPCy5.5, NG2-PE, CD19-PECy7, CD123-APC, CD15-FITC, CD81-APCH7), siguiendo

las recomendaciones para la evaluación del linaje (www.euroflow.org). Los datos se analizan utilizando el software Infinicyt, v. 2.0 (Cytognos SL, Salamanca, España). Para los estudios de citogenética se realiza cariotipo con bandeado G para estados leucémicos y de biología molecular en búsqueda de traslocaciones t(12:21), t(4:11) y t(9:22) de acuerdo a las recomendaciones de la Guía de Práctica Clínica y diagnóstico de leucemia linfocítica aguda en menores de 18 años (Linares, 2013). Con los datos de laboratorio tomados al diagnóstico, hemograma inicial, edad al diagnóstico y respuesta a prednisona al día 8, evaluación de médula ósea al día 15 y de final de inducción los pacientes se estratifican en grupos de riesgo. La evaluación de Enfermedad Mínima Residual medible por citometría de flujo de manera estandar refleja la respuesta al tratamiento y se toma de manera rutinaria al día 15 y al final de la inducción (día 33 de iniciado el tratamiento).

Resultados esperados:

Describir la correlación entre las diferentes alteraciones genéticas y la Enfermedad mínima residual medida por citometría de flujo, en niños mayores de 1 año y menores de 18 años con diagnóstico de novo de Leucemia Linfocítica Aguda de precursores B.

Variabes

Las variables que se tendrán en cuenta en la recolección de datos se describen en el anexo 1. Con la definición de desenlaces. (Ver suplemento).

Desenlaces:

Evaluación de EMR al día 15 define los pacientes de riesgo estandar con CMF < 0,1%, los de riesgo intermedio entre >0,1% y <10% y los de alto riesgo >10%.

Evaluación de EMR al final de la inducción (día 33 de iniciado el tratamiento) medida por citometría de flujo, se define EMR negativa con punto de corte 0,01%.

Remisión al final de inducción: Por criterios morfológicos es el recuento de células blásticas en médula ósea (MO) M1: <5% de blastos en un conteo de 500 células.

Falla de la inducción: Extendido de MO con un recuento de más del 5 % de los blastos, en un conteo de 500 células.

Muerte en la inducción: Muerte ocurrida durante los primeros 33 días de iniciado el tratamiento y hasta una semana después de finalizada esta fase de inducción.

Tabla 1. Clasificación de riesgo según la estrategia de protocolo BFM ALLIC 2009.

Riesgo Estándar:	Distribución de pacientes según clasificación ALL IC- BFM2009. 13%	Definido como: Edad mayor de 1 año y menor de 6 años. Recuento inicial de glóbulos blancos menor de 20.000/mm ³ . SP en el día 8 menor de 1000 blastos por mm ³ . Día 15 CMF < 0.1% o MO M1/M2. M1 en la MO del día 33.
Riesgo alto	21%	Definido como SP en el día 8 > de 1000 blastos/mm ³ . RI y CMF día 15 > 10% o M3 en la MO del día 15. RS y CMF día 15 > 10%. M2 o M3 en el día 33. Traslocación 9;22, o t(4;11) o Hiploidia < 44 cromosomas.
Riesgo intermedio	66%	Todos los pacientes que no sean estratificados como RS o RA. Siendo Edad mayor de 6 años. Recuento inicial de glóbulos blancos mayor de 20.000/mm ³ . SP en el día 8 menor de 1000 blastos por mm ³ . Día 15 CMF >0.1% o <10% ,MO M1/M2. M1 en la MO del día 33.

Tabla de elaboración propia.

Consideraciones éticas:

A nivel nacional según la Resolución 008430 de Octubre 4 de 1993, por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud, Título II: de la Investigación en Seres Humanos, Capítulo I: de los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos: en toda investigación en la que el ser humano sea sujeto de estudio, deberá prevalecer el criterio del respeto a su dignidad y la protección de sus derechos y bienestar (Artículo 5), según su artículo 11, esta investigación se clasifica sin

riesgo, en la cual no se realiza intervención o modificación intencionada a variables de los individuos sujetos a estudio, se basa en métodos de investigación documental.

Se utiliza información suficiente, se explica la toma de datos de los sujetos de estudio en términos sencillos y actuales. En este caso la unidad de recolección utilizada, es la revisión de la historia clínica, estos datos son registrados de manera estandarizada, ya que por estrategia de tratamiento actual se toman de rutina bajo protocolo institucional, estudios moleculares y citogenéticos al momento del diagnóstico, y se evalúa respuesta a quimioterapia cuantificando enfermedad mínima residual por medio de citometría de flujo. Esta recolección de información se hizo previo consentimiento informado, se aclara a los sujetos de estudio que se utilizara de manera confidencial, en los cuales sus datos serán anónimos e identificados por un número consecutivo. No se tomaron muestras adicionales. El presente estudio fue aprobado por el comité de ética de ética institucional Acta No.010 CEI 29-18 y se acompaña el envío con la carta de aprobación por parte de dicho comité.

Resultados:

Se analizaron 254 pacientes diagnosticados con LLA desde Enero de 2015 a Julio de 2019, con una mediana de edad de 6 años (1-17), 138 varones (54,3%) para una relación 1,18:1, mediana de leucocitos al diagnóstico de 10.545, se encontraron 25 pacientes que fueron hiperleucocitarios (>100.000 ul), siendo el 9,8% de la pacientes analizados. Se clasificaron en el grupo de riesgo estándar 29 (11,4%) pacientes, riesgo intermedio 134 (52,8%) y 91 (35,8%) estuvieron en el grupo de alto riesgo.

Los estudios de citogenética se realizaron en 241 pacientes (94,8%). Los hallazgos más frecuentes fueron: Normal 178 (70,1%), anormal en 46 (18%), de los cuales mostraban Hiperdiploidía 25 (9,8%), hipodiploides 6 (2,4%), con trisomía 21 7(2,75%), no se obtuvo ningún cariotipo complejo y se presentaron otros hallazgos no contenidos dentro de las alteraciones anteriores en 8 (3,15%). En 17 pacientes (7,4%) no se obtuvieron metafases para su análisis, y en 13 pacientes (5,1%) no se realizó.

Con respecto a las alteraciones moleculares la traslocación más frecuente fue t(12;21) se realizó en 213 (83%) pacientes, fue positiva en 26(10,2%). La t(9;22) se realizó en 234 (92,1%) pacientes siendo positiva en 8 (3,1%), y la t(4;11) se realizó en 214 pacientes y fue positiva en 1(0,4%).

De los pacientes analizados 208 (81,9%) tuvieron buena respuesta al corticoide y 40 (15,7%) tuvieron mala respuesta a esteroide, no se evaluó respuesta a esteroides en 6 pacientes (1,6%). Se evaluó la EMR por CMF al día 15 en 248 pacientes (6 fallecieron antes de ese día), 70 (27%) pacientes tuvieron EMR <0,1, 105 (41,3%) tuvieron entre 0,1 a <10%, y 73 pacientes (28%) presentaron EMR >10%. Al final de la inducción 192 (75.5%) pacientes alcanzaron EMR <0,01%, 35 (13,77%) pacientes tuvieron EMR entre 0,01 a <1%, 10 (3,9%) presentaron >1% con fallo en la inducción.

De los 70 pacientes que tuvieron EMR al día 15 <0,1% 7 (10%) tenían t(12;21) positiva, 48 pacientes (68,5%) tuvieron estudios de traslocaciones negativos. Los 105 pacientes que tuvieron EMR entre >0,1 y <10%, se encontraron negativas las alteraciones moleculares evaluadas en 72 pacientes (69,2%), 1/104 (0,95%) tenía t(9;22), 11/104 (10,4%) tenían la t(12;21) y ninguno tenía la t(4;11), por último los que presentaron EMR al día 15 \geq 10% fueron 73 pacientes, de ellos 41 pacientes (56,1%) tuvieron estudios negativos para las traslocaciones recurrentes, en 8/73(10,9%) se encontró t(12;21), 7/73(9,5%) tenía t(9;22) y 1 (1,36%) presentó la t(4;11). Con respecto a las alteraciones citogenéticas, se procesó el cariotipo con bandeado G y fue evaluable en 224 pacientes, en 164 fue normal (72,9%), en 25 pacientes se encontró cariotipo Hiperdiploide, 7 de estos pacientes tuvieron EMR al día 15 <0,1%, 10 entre >0,1 y <10%, 7 \geq 10% y en 1 paciente no se pudo evaluar. De los 6 pacientes que presentaron un cariotipo Hipodiploide 1 presentó EMR al día 15 <0,1%, 3 entre >0,1 y <10%, 2 \geq 10%. De los 10 pacientes que tuvieron EMR al día 33 >1% solo 1 tenían los estudios de cariotipo anormal.

Al final de la inducción (día 33), se evaluó EMR en 237 pacientes. De los 192 pacientes que tuvieron EMR $\leq 0,01$, (81%), en 118 pacientes (61,4%) se obtuvieron estudios negativos para las traslocaciones recurrentes, 22(11,45%) tenían la t(12;21), 5(2,6%) presentaron la t(9;22) y ninguno la t(4;11). De los 10 pacientes, que presentaron EMR $> 1\%$ en 7 (70%) no se encontraron alteraciones para los estudios moleculares de las traslocaciones recurrentes, 1 no se tomó la t(4;11) en 2 no se tomaron estudios de traslocaciones para t(12;21) y 1 fue positivo para t(12;21).

En el análisis bivariado entre EMR al día 15 y alteraciones moleculares se encontró que tener traslocación 9;22 positiva tiene OR 18,9 (IC95% 2,27-156) p 0,001 para tener EMR $> 10\%$ al día 15; pero no se encuentra influencia en la EMR al día 33 de iniciado el tratamiento.

En la tabla 2 se describe la población analizada según sus características demográficas.

Tabla 2. Tabla demográfica

		Número	%
Género	Femenino	116	45,7%
	Masculino	138	54,3%
Leucocitos al diagnóstico			
< 20000		160	63%
20001 – 99999		69	27,2%
> 100000		25	9,8%
Cariotipo	Normal	178	70,1%
	Hipodiploíde	6	2,4%
	Hiperdiploíde	25	9,8%
	Complejo	0	0
	Sin metafases	17	6,7%
	No realiza	13	5,1%
	Síndrome de Down	7	2,75%
	Otros hallazgos	8	3,15%
Translocación 9;22	Negativa	226	89%
	Positiva	8	3,1%

	No se hizo	20	7,9%
Translocación 4;11	Negativa	213	83,9%
	Positiva	1	0,4%
	No se hizo	40	15,7%
Translocación 12;21	Negativa	187	73,6%
	Positiva	26	10,2%
	No se hizo	41	16,2%
Riesgo	Estandar	29	11,4%
	Intermedio	134	52,8%
	Alto	91	35,8%
Respuesta a Corticoide	Buena Respuesta	208	81,9%
	Mala Respuesta	40	15,7%
	No se Evaluó	6	2,4%
CMF al día 15	≤0,1%	70	27,6%
	0,1% a 10%	105	41,3%
	≥10%	73	28,7%
	NA	6	2,4%
CMF al día 33	≤0,01%	192	75,5%
	0,01% a 1%	35	13,7%
	≥1%	10	3,9%
	NA	17 16/17 Muerte en inducción 1 /17 Traslado	6,69%
Evento	Falla de remisión por morfología al final de la inducción	6/237	2,5%
	Traslado	11	4,3%
	Muerte en Inducción	16	6,3%

En la tabla 3 se presenta la comparación de la prevalencia de alteraciones citogenéticas y moleculares reportada en población caucásica y lo encontrado en la muestra caracterizada.

Tabla 3. Prevalencia de alteraciones citogenéticas y moleculares

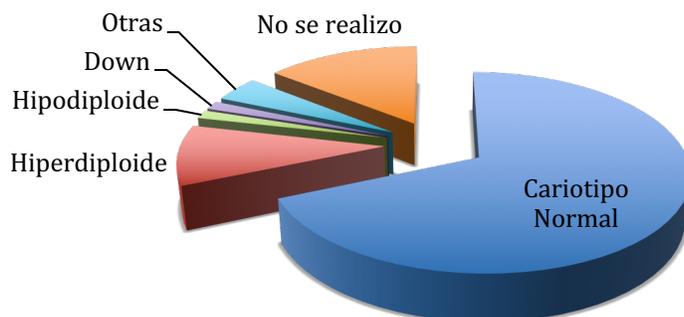
Citogenética	Prevalencia reportada (Roberts, 2015)	Encontrada	Comentario
<u>Hiperdiploidía</u> con más de 50 cromosomas	20-30%	9,8%	Pronóstico favorable
<u>Hipodiploidía</u> con menos de 44 cromosomas	2-3%	2,4%	Es caracterizada por dos subtipos: <u>Cercana a la Haploidía</u> con 24 a 31 cromosomas(Mutaciones activadoras del Ras y de IKZF3) y <u>baja hipodiploidía</u> con 32 a 39 cromosomas con alteraciones de TP53,CDKN2A/B,RB1 e IKZF2.
Molecular	Prevalencia reportada	Encontrada	Comentario
t(12;21)	15-25%	10,2%	Pronóstico favorable
t(9;22)	2-4%	3,1%	Enfermedad de alto riesgo con probabilidad de falla al tratamiento y recaída
t(4;11)	1-2%	0,4%	
CRLF2	5-7%	*	Pobre pronóstico, incrementa su prevalencia con la edad.
Ph-Like	10-15%	*	

*Estas alteraciones moleculares no fueron estudiadas en este grupo de pacientes.

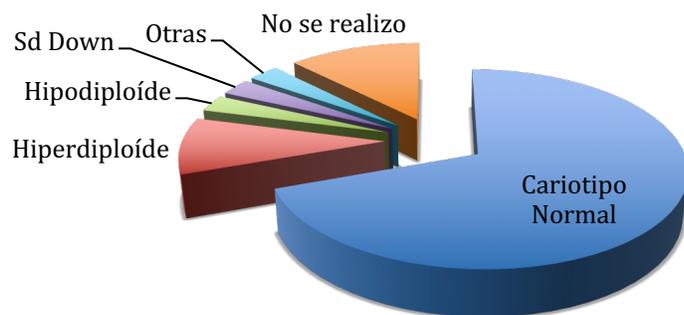
Fuente: Adaptado de Roberts,2015.

Figura 1. EMR al día 15 y principales alteraciones citogenéticas encontradas en la muestra analizada.

CMF al día 15 $\leq 0,1\%$ (70/254)



CMF Dia 15 0,1 a $<10\%$ (105/254)



CMF al día 15 $\geq 10\%$ (73/254)

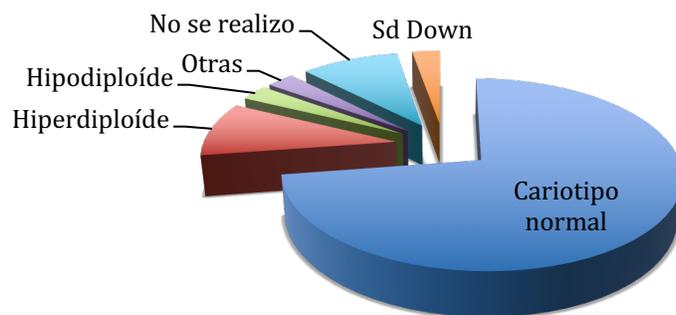
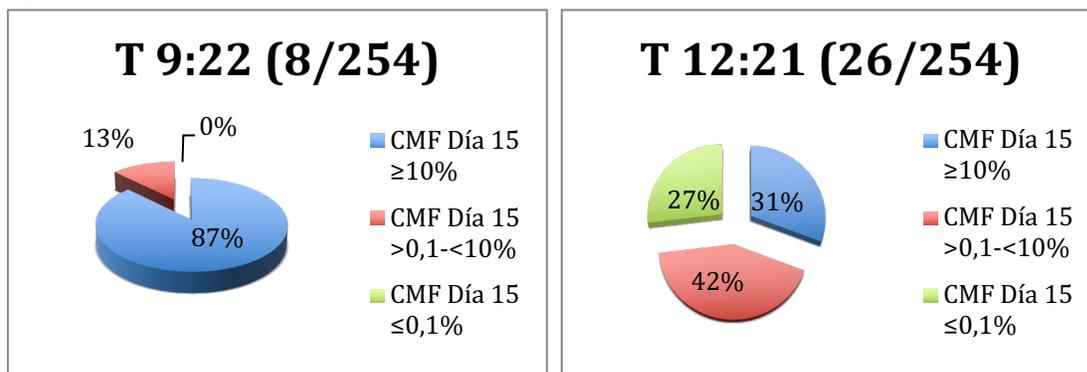


Tabla 4. Correlación entre las alteraciones moleculares y la EMR al día 15 y día 33.

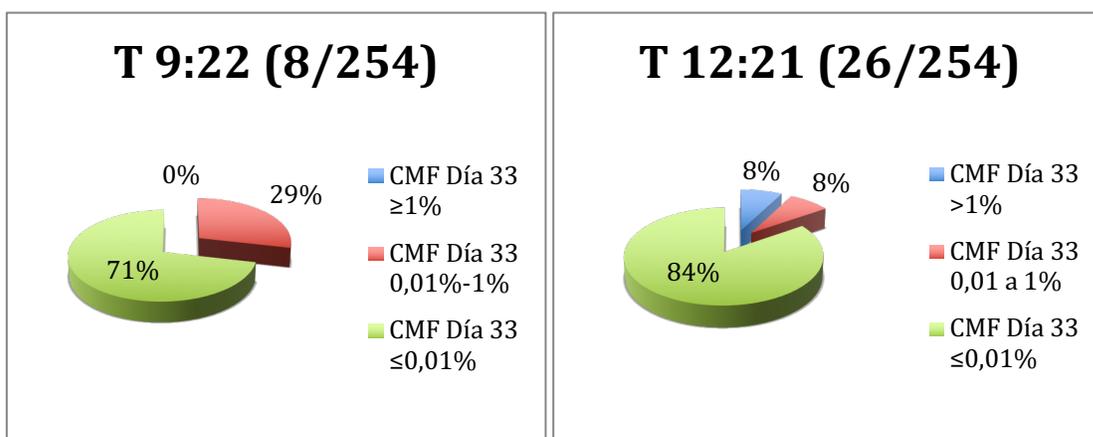
Traslocaciones	CMF Día 15 $\geq 10\%$	CMF Día 15 0,1- <10%	CMF Día 15 $\leq 0,1\%$	CMF Día 33 $\leq 0,01\%$	CMF Día 33 $\geq 0,01$ a 1%	CMF Día 33 $\geq 1\%$
T 9:22 (8/254) 1 muerte en inducción	7	1	0	5	2	0
T 4:11 (1/254)	1	0	0	1	0	0
T 12:21 (26/254) 1 muerte en inducción	8	11	7	22	2	2

Figura 2. Alteraciones moleculares* vs EMR al día 15.



*Solo se encontro 1 paciente con t(4;11).

Figura 3. Alteraciones moleculares vs EMR al día 33.



Discusión:

Es conocida la asociación entre la presencia de algunas alteraciones moleculares y desenlaces como persistencia de enfermedad o recaída, el objetivo principal de este trabajo es correlacionar los hallazgos del perfil genético de una cohorte de 254 pacientes pediátricos mayores de 1 año y menores de 18 años, con diagnóstico de novo de LLA B que ingresaron a un centro de referencia e iniciaron tratamiento según protocolo Institucional, con la presencia de Enfermedad mínima residual medible por citometría de flujo al día 15 y al final de la inducción.

Al revisar la adherencia a las recomendaciones de la Guía de Práctica Clínica (GPC) Colombiana para el componente del diagnóstico molecular en LLA, se recomienda tomar cariotipo y 3 alteraciones recurrentes por métodos de biología molecular (Linares, 2013). En este grupo de pacientes se siguieron esas recomendaciones y se encontró que el 95% de los pacientes tuvieron estudios moleculares, y es en el primer semestre de 2015 donde se encuentra la mayor frecuencia de estudios no tomados. A partir de 2016 todos los pacientes tuvieron la totalidad de los estudios moleculares.

Se observó al debut casi un 10 % de los pacientes presentaban gran carga tumoral con leucocitos mayor de 100.000 ul, además de mayor frecuencia de distribución de pacientes en el grupo de riesgo alto en un 35,8% vs 21% de lo estimado según la estrategia del protocolo ALL-IC BFM 2009 (Stary, 2014).

De los pacientes analizados lo más frecuente en los estudios citogenéticos fue encontrar un cariotipo normal, se presentó una prevalencia similar a lo reportado en la literatura en cuanto a hipodiploidía, t(9;22) y t(4;11), pero menor frecuencia en hiperdiploidía y t(12;21), que son alteraciones asociadas a mejor pronóstico (Roberts, 2015). De la cohorte analizada de 254 pacientes (2,8%) tuvieron Síndrome de Down, sus desenlaces y características biológicas merecen un subanálisis separado que escapa a los objetivos propuestos dentro de este trabajo.

Los estudios de citogenética permiten evaluar anomalías cromosómicas numéricas y estructurales grandes de >3 a 5Mb de DNA, pero hay limitantes que escapan a la sensibilidad de esta prueba como anomalías intersticiales o traslocaciones crípticas. Las técnicas de FISH permiten evaluar por medio de sondas para genes específicos que están frecuentemente involucrados, estas pruebas son rápidas y confiables, actualmente son el gold estándar del diagnóstico inicial de las malignidades hematológicas (Prakash,2016). En la literatura se encuentra hasta un 30 % cariotipos hiperdiploides (Hunger,2015). Para las alteraciones moleculares de un 15-25% para la t(12;21) que es la más prevalente (Roberts,2015). En este estudio solo se evaluó las 3 alteraciones moleculares más frecuentes, de acuerdo a las recomendaciones de la GCP para diagnóstico y tratamiento de LLA en menores de 18 años, en la muestra 192 pacientes tenían todos los estudios realizados (cariotipo y traslocaciones) y de ellos se encontró en 125/192 (65,1%) todas las pruebas negativas (cariotipo normal y las traslocaciones negativas). La gran proporción de pacientes con estudios moleculares negativos plantea la necesidad de complementar el perfil genético con la búsqueda de otras anomalías frecuentes como el recientemente descrito subgrupo de expresión tipo Ph like, que se caracterizan por la sobre-expresión de receptores tirosin kinasas y tienen una prevalencia de 10-15% en niños, en adolescentes y adultos jóvenes del 25% (Roberts,2015.Chiairetti,2016). La prevalencia de este subgrupo puede variar con la etnia, en hispanos dentro de este grupo se presenta con un 50% de sobreexpresión del gen CRLF2 (Harvey,2010). En grupos de alto riesgo las deleciones en IKZF1 (también conocido como IKAROS) que presentan en un 29% (Roberts,2015). Estos son algunos de los subtipos no estudiados en la actualidad en nuestro medio.

En la correlación del perfil genético con la EMR, en los pacientes que tuvieron alteraciones moleculares positivas como la t(9;22), se observó una mayor carga de enfermedad medida al día 15, esta traslocación fue positiva en 8 pacientes, y en 7 se encontró una CMF al día 15 $\geq 10\%$. Sin embargo todos entraron en remisión al final de la inducción con EMR $\leq 0,01\%$.

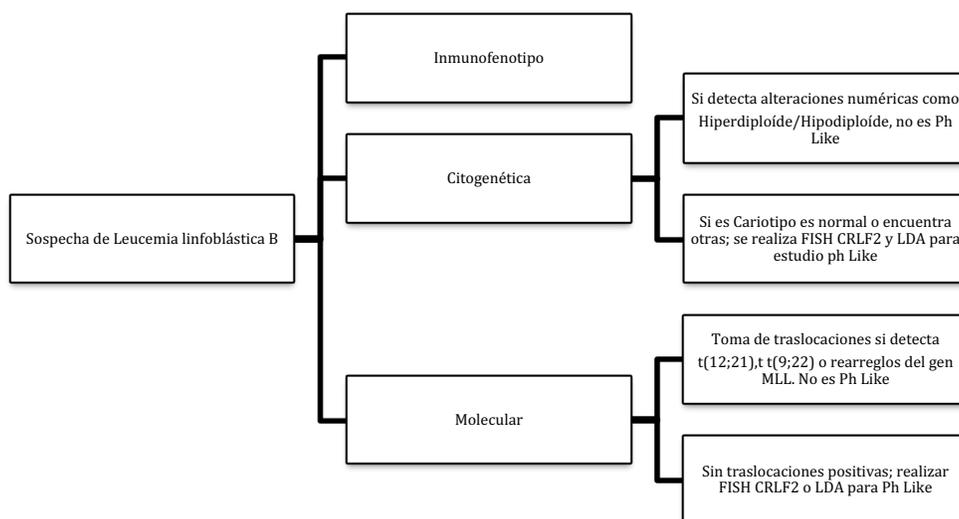
Como hallazgo interesante 2 pacientes con t(12;21), presentaron EMR $\geq 1\%$ al día 33 de iniciado el tratamiento, la t(12;21) se ha relacionado con mejores tasas de remisión completa (Pui, 2017). Solo se encontro t(4;11) positiva y esta presento al día 15 una EMR $\geq 10\%$ pero entro en remisión al final de la induccion.

La inclusión de la EMR ha mejorado la evaluacion de la respuesta al tratamiento y la estratificación del riesgo para el manejo clínico, dada la fuerte correlación entre la EMR y el pronóstico, esta ha sido incorporada en múltiples ensayos que exploran su utilidad para orientar la terapia dirigida a riesgo del paciente (Chen,2017). Puede utilizarse para la identificacion de pacientes que pueden manejarse con regímenes de baja intensidad y toxicidad, así como aquellos que requieren intensificación de la terapia (Campana,2017. Chen,2017.Pui,2017). En la muestra analizada, un 28,7 % de la población presentaba una CMF al día 15 $\geq 10\%$ y estos recibieron quimioterapia para riesgo alto durante la inducción.

La medición más sensible se logra actualmente por técnicas como CMF y qPCR, el umbral de EMR que han demostrado los estudios recientes es de 0,01%, y es útil para identificar pacientes que tienen un peor resultado clínico, en especial en el subgrupo de alto riesgo (Wood,2018), Las técnicas de cuantificación de EMR tienen un límite inferior de detección, por lo tanto la negatividad no es sinónimo de ausencia de enfermedad residual, razón por la cual puede usarse el término de “Enfermedad residual medible” en lugar de “Enfermedad mínima residual” (Brüggemann,2017). Este es un factor pronóstico independiente, en los niños que presentan una EMR $>0,01\%$ se reporta de 3 a 5 veces mas riesgo de falla al tratamiento y muerte (Hunger, 2015). En la cohorte analizada se encontró en el análisis bivariado, una asociación entre EMR al día 15 y tener translocación 9;22 positiva tiene OR 18,9 (IC95% 2,27-156) $p < 0,001$ para tener EMR $>10\%$ al día 15; pero, no se encuentra asociación entre esta misma alteración molecular y la EMR al día 33, posiblemente tiene relación con que el inicio del Imatinib generalmente se da posterior al día 15 , que es cuando el clínico tiene el resultado de laboratorio de la translocación. En los demás análisis no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

En este trabajo se observó más carga tumoral al diagnóstico, mayor frecuencia de pacientes en el grupo de alto riesgo, una gran proporción de pacientes con estudios moleculares negativos, esto deja en claro que existen otras anomalías genéticas no están siendo detectadas como es el grupo Ph like, para lo cual se propone una idea de flujograma de diagnóstico inicial que permita ampliar el estudio genético (Ver flujograma 1).

1. Flujograma de estudios moleculares



Adaptado de Siegele, 2018

Conclusión:

Se encontró que la población estudiada tuvo mayor frecuencia de distribución en el grupo de alto riesgo. Respecto a los hallazgos de citogenética la prevalencia es similar a lo reportado en la literatura en hipodiploidía, $t(9;22)$ y $t(4;11)$, menor frecuencia de hiperdiploidía y $t(12;21)$, alteraciones moleculares relacionadas a mejor pronóstico, sin asociarse claramente con mayor EMR al día 15 y al día 33. Se plantea la necesidad de

ampliar los estudios genéticos que actualmente se realizan, dado que hay una proporción grande de pacientes con cariotipos normales y traslocaciones negativas, de esta manera se podría detectar subgrupos específicos frecuentes como por ejemplo el espectro denominado Philadelphia Like en los pacientes de alto riesgo, esto puede ser una estrategia útil que mejore los resultados de tratamiento. Por último se describió las frecuencias actuales de EMR medida por citometría de flujo tanto al día 15 como al día 33 de iniciado el tratamiento, esta herramienta disponible en el país, abre el camino a estudios de seguimiento posteriores, que demuestren su asociación con desenlaces como recaída y persistencia de enfermedad.

Conflicto de Interés:

Por parte de los autores no se declara conflictos de intereses en la realización del presente estudio.

Financiación:

Este trabajo es un producto que contribuyo a la formación de Estudiante de 2 especialidad médica- Oncohematologa pediatra- equivalente a maestría. Incluye un grupo de pacientes del proyecto de investigación en ejecución titulado Identificación del perfil de expresión Filadelfia like (Ph-like) en menores de 18 años diagnosticados con leucemia linfoblástica Aguda en una cohorte de pacientes de un centro de referencia en Bogotá (contrato No 782 de 2018), que esta financiado por Colciencias en la convocatoria 807 - 2018 para proyectos de ciencia, tecnología e Innovación en salud 2018.

Agradecimientos: A la Dr Gloria Uribe y Dr Edna Quintero por la orientación en el soporte bibliográfico de Citometría de flujo. Al Dc Nelson Aponte por la revisión epidemiológica .

BIBLIOGRAFÍA

Brüggemann, M., & Kotrova, M. (2017). Minimal residual disease in adult ALL: technical aspects and implications for correct clinical interpretation. *Blood advances*, 1(25), 2456–2466. doi:10.1182/bloodadvances.2017009845

Campana, D., & Pui, C. H. (2017). Minimal residual disease-guided therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 129(14), 1913–1918. doi:10.1182/blood-2016-12-725804.

Chen X, Wood BL. How do we measure MRD in ALL and how should measurements affect decisions. Re: Treatment and prognosis?. Best Practice & Research Clinical Haematology. (2017).doi: 10.1016/j.beha.2017.07.002.

Chiaretti, S., Gianfelici, V., O'Brien, S. M., & Mullighan, C. G. (2016). Advances in the genetics and therapy of acute lymphoblastic leukemia. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, 36, e314-e322

Conant, JL, Czuchlewski, DR. BCR-ABL1-like B-lymphoblastic leukemia/lymphoma: Review of the entity and detection methodologies. Int J Lab Hematol. (2019); 41(Suppl. 1): 126- 130. doi.org/10.1111/ijlh.13012.

Coustan-Smith E, Sancho J, Behm FG, Hancock ML, Razzouk BI, Ribeiro RC, et al. Prognostic importance of measuring early clearance of leukemic cells by flow cytometry in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*.(2002);100:52–58, doi: [10.1182 / sangre-2002-01-0006](https://doi.org/10.1182/sangre-2002-01-0006).

Harvey, R. C., Mullighan, C. G., Chen, I. M., Wharton, W., Mikhail, F. M., Carroll, A. et al. (2010). Rearrangement of CRLF2 is associated with mutation of JAK kinases, alteration of IKZF1, Hispanic/Latino ethnicity, and a poor outcome in pediatric B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 115(26), 5312–5321. doi:10.1182/blood-2009-09-245944

Howard, S. C., Metzger, M. L., Wilimas, J. A., Quintana, Y. , Pui, C. , Robison, L. L. and Ribeiro, R. C. (2008), Childhood cancer epidemiology in low income countries. *Cancer*, 112: 461-472. doi:10.1002/cncr.23205.

Hunger, S. P., & Mullighan, C. G. (2015) Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *N Engl J Med*, 373(16), 1541–1552. doi:10.1056/nejmra1400972.

Kuhlen M, Klusmann J-H and Hoell JI (2019) Molecular Approaches to Treating Pediatric Leukemias. *Front. Pediatr.* 7:368. doi: 10.3389/fped.2019.00368.

Linares A, Torres M, Vizcaíno M, Ramírez O, Lotero V, Cols. "Guía de Práctica Clínica para la detección oportuna, diagnóstico, tratamiento y seguimiento de Leucemia Linfocítica Aguda y Leucemia Mieloide Aguda en niños, niñas y adolescentes. GUIA COMPLETA. Guía No. 9" En: Colombia 2013. ed: Ministerio de Salud y Protección Social - Colciencias ISBN: 978-958-57937-2-9 v. págs. Disponible en www.gpc.minsalud.gov.co.

Ministerio de Salud y Protección Social - Instituto Nacional de Cancerología, ESE.

Plan Decenal para el control del cáncer en Colombia, 2012- 2021.

<https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INCA/plannacional-control-cancer.pdf>.

Momeneh MS, et al. Genetic alterations in B-acute lymphoblastic leukemia. *Acta Haematol Pol.* (2016), doi.org/10.1016/j.achaem.2016.11.002.

Möricke, A., Zimmermann, M., Reiter, A. et al. Long-term results of five consecutive trials in childhood acute lymphoblastic leukemia performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000. *Leukemia* 24, 265–284 (2010) doi:10.1038/leu.2009.257

Mullighan Charles G; The genomic landscape of acute lymphoblastic leukemia in children and young adults. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2014; 2014 (1): 174–180. doi: <https://doi.org/10.1182/asheducation-2014.1.174>

Prakash, G., Kaur, A., Malhotra, P., Khadwal, A., Sharma, P., Suri, V., ... Varma, S. (2016). Current Role of Genetics in Hematologic Malignancies. *Indian journal of hematology & blood transfusion : an official journal of Indian Society of Hematology and Blood Transfusion*, 32(1), 18–31. doi:10.1007/s12288-015-0584-4

Pui CH, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.* 2006;354:166-78.

Pui CH, Pei, D., Raimondi, S. C., Coustan-Smith, E., Jeha, S., Cheng, C., et al. (2017). Clinical impact of minimal residual disease in children with different subtypes of acute lymphoblastic leukemia treated with Response-Adapted therapy. *Leukemia*, 31(2), 333–339. doi:10.1038/leu.2016.234.

Pui CH, Roberts KG, Yang JJ, Mullighan CG. Philadelphia Chromosome-like Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2017; 17 (8): 464-70.

Ratei R1, Basso G, Dworzak M, Gaipa G, Veltroni M, Rhein P, Biondi A, Schrappe M, Ludwig WD, Karawajew L; AIEOP-BFM-FCM-MRD-Study Group. Monitoring treatment response of childhood precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia in the AIEOP-BFM-ALL 2000 protocol with multiparameter flow cytometry: predictive impact of early blast reduction on the remission status after induction. *Leukemia*. 2009 Mar;23(3):528-34. doi: 10.1038/leu.2008.324. Epub 2008 Nov 20.

Reshmi, S. C., Harvey, R. C., Roberts, K. G., Stonerock, E., Smith, A., Jenkins, H., Hunger, S. P. (2017). Targetable kinase gene fusions in high-risk B-ALL: A study from the Children's Oncology Group. *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-12-758979>.

Roberts KG, Pei D, Campana D, et al. Outcomes of children with BCR-ABL1-like acute lymphoblastic leukemia treated with risk-directed therapy based on the levels of minimal residual disease. *J Clin Oncol*. 2014;32(27):3012-3020.

Roberts, K. G., & Mullighan, C. G. (2015). Genomics in acute lymphoblastic leukaemia: Insights and treatment implications. *Nature Reviews Clinical Oncology*. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2015.38>

Sarmiento-Urbina IC, Linares-Ballesteros A, Contreras-Acosta A, Cabrera-Bernal EV, Pardo-González CA, Uribe-Botero GI, et al. Resultados del Protocolo ACHOP 2006 en los niños con leucemia linfoblástica aguda en la Fundación HOMI Hospital de la Misericordia de Bogotá, en el periodo 2007 – 2012. *Iatreia*. 2019 Abr-Jun; 32(2):71-81. DOI 10.17533/udea.iatreia.07.

Siegele, BJ, Nardi, V. Laboratory testing in BCR-ABL1-like (Philadelphia-like) B-lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Am J Hematol*. 2018; 93: 971– 977. <https://doi.org/10.1002/ajh.25126>

Suárez A, Guzmán C, Villa B, Gamboa O. Abandono del tratamiento: una causa evitable de muerte en el niño con cáncer. *Rev Colomb Cancerol* 2011;15(1):22-29.

Sary J, Zimmermann M, Campbell M, Castillo L, Dibar E, Donska S, et al. Intensive chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia: results of the randomized intercontinental trial ALL IC-BFM 2002. *J Clin Oncol*. 2014;32(3):174-84.

Tasian, S. K., Loh, M. L., & Hunger, S. P. (2017). Philadelphia chromosome–like acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 130(19), 2064–2072.

Trujillo AM, Linares A, Sarmiento IC. Intensive chemotherapy in children with acute lymphoblastic leukemia. Interim analysis in a referral center in Colombia. *Rev.Fac.Med.* 2016; 64(3): 417-25.

Van Dongen JJM, Lhermitte L, Bottcher S, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia* 2012;26:1908–1975.

Vera, Anyul Milena et al. Análisis de la mortalidad por leucemia aguda pediátrica en el Instituto Nacional de Cancerología. *Biomédica*, [S.l.], v. 32, n. 3, p. 355-64, mar. 2012. ISSN0120-4157. Disponible en: www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/691/1722.

Wood, B., Wu, D., Crossley, B., Dai, Y., Williamson, D., Gawad, C., et al. (2018). Measurable residual disease detection by high-throughput sequencing improves risk stratification for pediatric B-ALL. *Blood*, 131(12), 1350–1359. doi:10.1182/blood-2017-09-806521

Wu, C., & Li, W. (2018). Genomics and pharmacogenomics of pediatric acute lymphoblastic leukemia. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2018.04.002>

Anexo 1. Variables evaluadas y categorizadas para pacientes con LLA de precursores B.

VARIABLE	DESCRIPCIÓN	NATURALEZA	UNIDAD DE MEDICION
Edad	Edad en años cumplidos al momento del diagnóstico	Cuantitativa- Razón- Discreta	Años
Género	Sexo biológico	Cualitativa- Nominal- Dicotómica	0. Femenin o 1. Masculin o

Fecha de diagnóstico	Fecha de consulta cuando se realiza diagnóstico	Cuantitativa- Razón- Discreta	dd/mm/aaaa
Leucocitos al Diagnóstico	Numero de leucocitos en el primer hemograma al ingreso a la institución	Cuantitativa- Razón- Continua	/Mm3
Respuesta al día 8	Número absoluto de blastos en hemograma tomado al completar 8 días de esteroide: buena respuesta < de 1000 blastos o mala respuesta > de 1000 blastos	Cualitativa- Nominal- Dicotómica	1 Buena respuesta 2 Mala respuesta
Estatus SNC	Análisis de LCR	Cualitativa - Nominal	Status 1 Status 2 Status 3
Riesgo	<p>Definido como</p> <p>Riesgo Estándar: SP en el día 8 menos de 1000 blastos por mm³. Edad mayor de 1 año y menor de 6 años. Recuento inicial de glóbulos blancos menor de 20.000/mm³. Día 15 CMF < 0.1% o MO M1/M2. M1 en la MO del día 33</p> <p>Riesgo alto: RI y CMF día 15 > 10% o M· en la MO del día 15. RS y CMF día 15 > 10%. SP en el día 8 > de 1000 blastos/mm³. M2 o M3 en el día 33. Traslocación 9;22. Hiploidia < 44</p> <p>Riesgo intermedio: Todos los pacientes que no sean estratificados como RS o RA</p>	Cualitativa	1 Riesgo estándar 2 Riesgo intermedio 3 Riesgo alto
Inmunofenotipo	Los diferentes estadios de maduración de las células B neoplásicas en las muestras de médula ósea, se empleará el Panel de Screening de Euroflow una combinación de 8 fluorescencias distintas que incluyen marcadores	Cualitativa nominal	Panel ALOT Tubo 1 Tubo 2 Tubo 3

	reportados en la literatura que permiten la identificación y caracterización fenotípica de leucemias agudas de linaje B		Tubo 4
Médula ósea del día 15 evaluación morfológica	Cuantificación de blastos por morfología	Cualitativa nominal	M1 M2 M3
Médula ósea del día 15 por CMF	Cuantificación de blastos por CMF	Cuantitativa-Razón-Continua	% blastos en CMF
Médula ósea del día 33 evaluación morfológica	Cuantificación de blastos por morfología	Cualitativa nominal	M1 M2 M3
Remisión al Final de la Inducción	Definir estado de remisión al final de inducción	Cualitativa-Dicotómica	0: no 1: si
EMR al final de la Inducción	Cuantificación de blastos por CMF	Cuantitativa-Dicotómica	0: negativa (menor de 0,001) 1: positiva (> de 0,001)
Cariotipo para estados leucémicos	Estudios de citogenética corresponden al cariotipo para estados leucémicos por técnicas convencionales de bandeó G y Q.	Cualitativa	Resultado de cariotipo
Traslocación 9;22	Resultado del análisis por biología molecular de la traslocación en médula ósea en el momento del diagnóstico	Cualitativa-Nominal-Dicotómica	1 Si 2 No
Traslocación 12;21	Resultado del análisis por biología molecular de la traslocación en médula ósea en el momento del diagnóstico	Cualitativa-Nominal-Dicotómica	1 Si 2 No

Traslocación 4;11	Resultado del análisis por biología molecular de la traslocación en médula ósea en el momento del diagnóstico	Cualitativa- Nominal- Dicotómica	1 Si 2 No
Estado vital	Estar vivo o muerto	Cualitativa- Nominal- Dicotómica	0. Vivo 1. Muerto
Fecha estado vital	Fecha en que se presentó la muerte o último control vivo	Cuantitativa- Razón- Discreta	dd/mm/aaaa

DEFINICIÓN DE DESENLACES (Tomado de Sarmiento,2019).

- Muerte en la inducción: Ocurre en la fase IA (durante los primeros 33 días de iniciado el tratamiento) o hasta una semana después de finalizado.

-Falla de la inducción: más del 5 % de los blastos en la médula ósea al final de la inducción.

-Traslado: cambio a otro centro de tratamiento por la decisión del asegurador (se tomó la fecha en la que el paciente sale del Hospital de La Misericordia hacia otra institución).

Anexo 2.

Tabla 5. EMR al día 15 vs alteraciones citogenéticas

CMF Día 15	Número	%	Cariotipo Normal	Hiperdiploide	Hipodiploide	Sd Down	Otras	No se realizó
≤ 0,1%	70	27%	48	7	1	1	3	10
0,1 a <10	105	41,3%	73	10	3	3	3	13
≥10%	73	28%	53	7	2	2	2	7
NA*	6	2,36%	4	1	0	1	0	0

Tabla 6. EMR al día 33 vs alteraciones citogenéticas

CMF Dia 33	Número	%	Cariotipo normal	Hiperdiploide	Hipodiploide	Sd Down	Otras	No se realizó
------------	--------	---	------------------	---------------	--------------	---------	-------	---------------

≤0,01 %	192/237	81%	133	22	5	3	5	24
>0,01-1%	35	14,76%	25	1	0	2	2	5
≥1%	10	4,21%	9	0	0	0	1	0
NA*	17/254	6,69%	11	2	1	2		1

*NA se obtuvieron 16 muertes en inducción y 1 traslado en inducción.

Para la descripción se realizó sobre 237(254-17).