



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Descripción de los resultados de la citometría de flujo y la evaluación morfológica durante la inducción de leucemia linfoblástica aguda

Mónica Maritza Carrasco De Los Ríos

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Departamento de Pediatría
Bogotá, Colombia
2022

Descripción de los resultados de la citometría de flujo y la evaluación morfológica durante la inducción de leucemia linfoblástica aguda

Mónica Maritza Carrasco De Los Ríos

Tesis o trabajo de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:
Especialista en Oncohematología pediátrica

Directora:

Doctora Adriana Linares Ballesteros. Oncohematóloga pediatra.

Codirectora temática:

Bacterióloga y magister en ciencias biológicas Gloria Inés Uribe Botero

Asesores temáticos:

Doctor Jimmy Javier Lagos Ibarra. Oncohematólogo pediatra

Doctora Edna Margarita Quintero Canasto. Patóloga.

Doctora Natalia Olaya Morales. Patóloga

Doctor Nelson Aponte Barrios. Oncohematólogo pediatra y Epidemiólogo.

Línea de Investigación: Leucemia en niños

Grupo de Investigación: Oncohematología pediátrica

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina, Departamento de Pediatría

Bogotá, Colombia

2022

A mi madre que desde la hora cero de mi carrera me ha apoyado en todos los sentidos posibles, a mi esposo por su comprensión y por ser generador del cumplimiento de mis sueños y a mi padre que estoy segura estaría orgulloso del camino que he recorrido para lograr mis propósitos.

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



Nombre: Monica M. Carrasco De Los Ríos

Fecha 02/02/2022

Resumen

Descripción de los resultados de la citometría de flujo y la evaluación morfológica durante la inducción de leucemia linfoblástica aguda

La evaluación de la respuesta al tratamiento en leucemia linfoblástica aguda (LLA) es parte integral de la clasificación del riesgo y terapia dirigida. Las metodologías de evaluación incluyen técnicas morfológicas y la citometría de flujo (CMF) que pueden mostrar diferencias en sus resultados. No es claro el efecto de estas diferencias en los desenlaces clínicos.

Este es un estudio de corte transversal retrospectivo que evaluó las diferencias entre las metodologías de evaluación del día 15 de tratamiento de niños con LLA y exploró los desenlaces clínicos por grupo de diferencias entre métodos.

Para 82 pacientes la comparación entre impronta y CMF mostro un 57,3% de casos concordantes, en el subgrupo de 69 pacientes con muestras para las 3 técnicas, la comparación entre extendido de médula ósea y CMF mostró resultados concordantes en 66,7% con asociación positiva entre técnicas. La impronta fue el método con más alta cuantificación de blastos. La recaída fue menos frecuente en el grupo discordante con porcentaje de blastos bajos por CMF (<5%) aun con extendidos de MO altos (M1/M2), $p < 0,05$; no se encontraron diferencias estadísticas en el grupo discordante de impronta y CMF.

Las técnicas de evaluación morfológicas frente a CMF muestran en su mayoría resultados concordantes, los pocos datos no nos permiten esclarecer el impacto de las diferencias entre técnicas en desenlaces clínicos, pero los resultados sugieren que la técnica más adecuada para la clasificación del riesgo en el día 15 en los casos discordantes es la CMF.

Palabras clave: *Leucemia linfoblástica aguda, niños, citometría de flujo, enfermedad mínima residual*

Abstract

Description of the results of flow cytometry and morphological evaluation during induction therapy in acute lymphoblastic leukemia

The evaluation of the response to treatment in patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL) is an integral part of the risk classification and therapy directed to it. The evaluation methodologies that include morphological techniques and flow cytometry (CMF), may show differences in their results. The effect of these differences between techniques on the clinical outcomes is not clear.

Retrospective study that evaluated the differences between the assessment methodologies on day 15 of treatment in children with ALL and explored the clinical outcomes in the group of differences between methods

In a group of 82 patients, the comparison between touch imprint and flow cytometry showed 57.3% of cases concordant, in the subgroup of 69 patients with adequate samples for the 3 techniques, the comparison between bone marrow aspirates and flow cytometry showed concordant results in 66.7% with a positive association. Touch imprint was the method with the highest quantification of blasts. Relapse was less frequent in the discordant group with <5% blasts by Flow cytometry even with bone marrow aspirates M2 / M3, $p < 0.05$; no statistical differences were found in the discordant group of touch imprints/Flow cytometry.

The morphologic assessment methodologies show concordant results with flow cytometry that support an adequate risk stratification, the few data do not allow us to clarify the impact of differences between techniques on clinical outcomes, but the results suggest that flow cytometry is the most appropriate technique for risk classification on day 15 in discordant cases.

Key words: Acute lymphoblastic leukemia, childhood, flow cytometry, minimal residual disease

Contenido

	Páginas
Resumen	V
Lista de gráficas	VI
Lista de tablas	VII
Lista de símbolos	VII
1. Introducción	1
2. Objetivos	3
2.1 Objetivo general	3
2.2 Objetivos específicos	3
3. Materiales y métodos	3
3.1 Tipo de estudio	3
3.2 Selección de muestra	3
3.3 Criterios de inclusión	3
3.4 Criterios de exclusión	4
3.5 Análisis estadístico	9
4. Resultados	11
5. Discusión y conclusiones	19
6. Aspectos éticos y clasificación de riesgo	22
7. Conflictos de interés	22
A. Anexos	23
Bibliografía	28

Lista de gráficas

	Páginas
Gráfica 1: Clasificación de riesgo según ALLIC IC-BFM 2009	8
Gráfica 2: Diagrama de Venn con los resultados concordantes de médula ósea por diferentes metodologías, incluye diferencia de mediana en porcentaje de blastos (69 pacientes)	15
Gráfica 3: Diagrama de bigotes para porcentaje de blastos por metodología de evaluación	16
Gráfica 4: Eventos durante el seguimiento	17

Lista de tablas

	Páginas
Tabla 1: Características demográficas en la población de estudio	11
Tabla 2: Evaluación del día 15 por método de impronta de biopsia de médula ósea y CMF. N (%)	13
Tabla 3: Evaluación del día 15 por método de extendido de médula ósea e impronta de médula ósea en el subgrupo de 69 pacientes, N (%)	14
Tabla 4: Evaluación del día 15 por método de extendido de médula ósea y CMF en el subgrupo de 69 pacientes, N (%)	14
Tabla 5: Porcentaje de blastos por metodología en evaluación del día 15 subgrupo de 69 pacientes	16
Tabla 6: Descripción de casos de recaída por grupo de discordancia.	18

Listas de símbolos y abreviaturas

LLA	Leucemia linfoblástica aguda
CMF	Citometría de flujo
MO	Médula ósea
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
EMR	Enfermedad mínima residual
SLE	Supervivencia libre de eventos
HOMI	Fundación Hospital de la Misericordia
LCR	Líquido cefalorraquídeo
SNC	Sistema nervioso central
OMS	Organización mundial de la salud
FISH	Hibridación fluorescente in situ
BFM	Berlín, Frankfurt, Münster
EDTA	Ácido etilen-diaminotetraacético
RNM	Resonancia nuclear magnética
TAC	Tomografía computarizada

1. Introducción

La leucemia es el cáncer más frecuente de la población pediátrica en el mundo. En Colombia para el período de 2015-2020 la leucemia linfoblástica aguda se encontró en el primer lugar de todos los casos de tumores para esta población con una frecuencia del 27,9% (1); así como también con la mayor tasa de mortalidad reportada entre 2007-2011 (2). Sin embargo, debido al progreso en el cuidado de soporte, los esfuerzos por lograr la más adecuada estadificación, y la optimización de los protocolos de tratamiento, se ha logrado mejorar la supervivencia de los pacientes con esta enfermedad (3-5).

La identificación de factores asociados a resultados como las características demográficas tales como la edad del paciente, y en algunos informes la relación a la raza y el sexo; además de los referentes a características clínicas, biológicas y genéticas de la enfermedad como el fenotipo, conteo de leucocitos al diagnóstico, la citogenética y las anormalidades cromosómicas, han sido parte esencial en la terapia dirigida al riesgo (5-7). También se ha demostrado que la monitorización de la cantidad de células leucémicas habla sobre la respuesta a la terapia y permite identificar con mejor precisión aquellos pacientes que requerirán de mayor intensidad de tratamiento, y a la vez evitar la posible toxicidad en quienes no lo requieran (3, 8); la medición de la enfermedad mínima residual se considera en la actualidad un importante factor pronóstico de los resultados finales de los pacientes. La evaluación de la respuesta al manejo depende entonces del examen morfológico en muestras de médula ósea y también incluye medición de poblaciones residuales detectadas por técnicas como citometría de flujo multiparamétrica (CMF) o reacción por cadena de la polimerasa (PCR) para reordenamientos de genes de inmunoglobulinas y/o de receptores de células T, entre otros métodos con menor disponibilidad como secuenciación de alto rendimiento (4, 9, 10).

La evaluación microscópica y el análisis de citometría de flujo en médula ósea en la mayoría de los casos muestran resultados concordantes (11), sobre todo en presencia de altos conteos de blastos, pero pueden no ser tan precisos cuando las células blásticas son escasas (12). Adicionalmente se conoce la dificultad para distinguir morfológicamente los linfoblastos de las células regeneradoras no malignas (hematogonias) después de la exposición a la quimioterapia, así como también, la variabilidad de la hemodilución en algunas muestras. Lo anterior podría estar relacionado con la diferencia de resultados entre la morfología y la citometría de flujo en algunos pacientes (12-14).

Pocos estudios han descrito la discrepancia que se da en aquellos con EMR baja $<5\%$ con morfología M2 / M3 (9) y dado el número pequeño de casos no se ha podido estudiar ampliamente la SLE (supervivencia libre de eventos); sin embargo, se ha visto como pacientes con estos resultados discrepantes (M1/EMR $\geq 5\%$) podrían tener una supervivencia libre de eventos inferior en comparación con los pacientes con resultados concordantes en M1/EMR $\leq 5\%$, pero SLE superior con aquellos concordantes por morfología M2 y CMF $\geq 5\%$. Se ha sugerido que lo mencionado posiblemente tendría relación con los resultados diferenciales de EMR (15).

Los escasos datos sobre las diferencias entre las técnicas de evaluación en médula ósea reflejan el vacío en el conocimiento respecto a la relevancia clínica real de este hallazgo; la búsqueda de su caracterización y su análisis establece la base para lograr plantear recomendaciones respecto al de técnicas complementarias como la impronta de biopsia de médula ósea dentro del seguimiento de la enfermedad (3, 16-18). Este trabajo explora los resultados entre técnicas morfológicas de evaluación del día 15 y cuantificación de blastos por CMF así como también la frecuencia de recaída en el grupo de resultados no coincidentes.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Evaluar las diferencias entre los resultados obtenidos en la evaluación del día 15 de tratamiento de leucemia linfoblástica aguda mediante diferentes técnicas como lo son: el extendido de médula ósea, la impronta de la biopsia de médula ósea y la citometría de flujo en una corte transversal de pacientes pediátricos con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda de novo.

2.2 Objetivos específicos

- Explorar los desenlaces clínicos en el grupo de pacientes donde se encontraron diferencias entre metodologías de evaluación del día 15 de tratamiento de la población de estudio.

3. Materiales y métodos

3.2 Tipo de estudio: Estudio de corte transversal retrospectivo

3.2 Selección de la muestra: se realizó un muestreo no probabilístico por conveniencia con pacientes pediátricos (1-18 años) tratados en La Fundación Hospital la Misericordia (Bogotá), con diagnósticos CIE-10 relacionados con leucemia linfocítica aguda, de quienes se realizó la búsqueda del material de estudio de médula ósea (disponible bajo custodia de la institución) susceptible a su valoración.

3.3 Criterios de inclusión:

- Pacientes entre 1 y 18 años que fueron diagnosticados de novo con leucemia linfoblástica aguda entre noviembre de 2012 hasta diciembre de

2014, en el servicio de oncohematología pediátrica de la Fundación Hospital la Misericordia (HOMI), centro de referencia de cáncer infantil de la ciudad de Bogotá, Colombia

3.4 Criterios de exclusión:

- Pacientes que ingresaran con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda en recaída
- Pacientes en quien las evaluaciones del día 15 se hayan retrasado por cualquier motivo y la evaluación no cumpliera con la definición de día 15 (7)
- Pacientes en quien la muestra para la evaluación por las diferentes técnicas no fuera tomada el mismo día
- Pacientes en quienes no existiera la disponibilidad de impronta de la biopsia de médula ósea
- Paciente con diagnóstico de síndrome de Down
- Paciente con datos incompletos por traslado a otra institución o pérdidas del registro durante la inducción

Una vez realizado el diagnóstico de LLA mediante morfología y clasificación del inmunofenotipo con citometría de flujo, se realizaron los estudios citogenéticos correspondientes mediante cariotipo de estados leucémicos y pruebas moleculares consistentes en t(9;22), t(4;11) y t(12;21). En todos los pacientes se realizó evaluación del compromiso del sistema nervioso central (SNC) (ver definiciones en Anexo I). Posterior al diagnóstico de la enfermedad se inició el tratamiento según el protocolo usado institucionalmente ALLIC IC-BFM 2009.

La primera evaluación de la respuesta al tratamiento se realiza al día 8 con hemograma y extendido de médula ósea. Con los datos obtenidos relacionados con la edad del paciente, características de laboratorios al inicio de la enfermedad, fenotipo, criterios de citogenética y biología molecular, además de la evaluación al

día 8 para respuesta a corticoide se clasificó el riesgo inicial de cada paciente (Gráfica 1).

- **Evaluación del día 15:**

Se realizó la toma de las muestras de médula ósea para su evaluación mediante: extendido de médula ósea, impronta de biopsia de médula ósea y citometría de flujo en los pacientes que cumplieron la definición de día 15 que fueron aquellos que recibieron hasta ese momento 1 dosis de vincristina, 1 dosis de daunorrubicina, 1 dosis de L asparaginasa y 2 dosis de metotrexato intratecal (7).

Recolección de la muestra de médula ósea:

El procedimiento se realiza bajo anestesia general, se posiciona al paciente en decúbito lateral y se prepara el área anatómica mediante medidas estándar de asepsia y antisepsia, se localiza la espina iliaca posterosuperior y se infiltra por planos con una jeringa con anestésico local lentamente en el tejido subcutáneo hasta el periostio dando pequeños golpes y ampliando la zona anestesiada, se extrae la jeringa y posteriormente se introduce el trocar de aspiración (aguja de Illinois) con movimientos giratorios de la muñeca y se penetra hasta la corteza del hueso hasta que la aguja quede firme para luego retirar el mandril, se realiza el aspirado de médula ósea con una jeringa de 20 cc y finalmente se retira la aguja. Las muestras tomadas se usan para la preparación del mielograma, extendiendo los grumos de médula ósea en portaobjetos que posteriormente se colorearan con tinción de Wright-Giemsa en el laboratorio de hematología especial; una muestra para CMF que se introduce en un tubo con EDTA y se toman el resto de muestras para citogenética y estudios moleculares (19).

Se procede a la realización del material para la biopsia de médula ósea mediante la introducción de la aguja de biopsia de médula ósea (Jamshidi) penetrando la corteza del hueso con el trocar en la proximidad del sitio de punción del aspirado anteriormente descrito, esto se realiza con movimientos circulares de la muñeca

bajo presión controlada, una vez la aguja está fijada al hueso se retira el mandril y se penetra aproximadamente 1,5 a 2 cm que se confirman con la guía, se introduce el capturador del cilindro hasta el tope y se retira con movimientos de izquierda a derecha hacia afuera, se finaliza el procedimiento aplicando presión local sobre el sitio de punción. Con el cilindro de médula ósea se realizan varios toques suaves sobre un portaobjetos para la toma de improntas y posteriormente se deposita la muestra en solución fijadora, la muestra se procesa en patología primero mediante el uso de solución decalcificante con posterior inclusión en parafina, se realizan cortes y tinciones histológicas para su estudio por el servicio de patología (19, 20).

Descripción de las muestras de médula ósea:

a. Extendido de médula sea

El procedimiento se realizó con personal experto en evaluación morfológica, dado que la celularidad para el día 15 de tratamiento esta disminuida, se realizó la cuantificación del porcentaje de blastos mediante el conteo de 100 células en campo de alto poder de microscopio (19).

Se procedió a la revisión de todas las muestras disponibles de los pacientes en el estudio. Se valoro su calidad y se calificó como evaluable aquellas muestras con presencia de espícula, megacariocitos y otros precursores (20) o con algún nivel de dilución, pero valorables; frente a las no evaluables. Posterior a esto, aquellas muestras evaluables, se calificaron de forma cualitativa en no infiltradas con <25% de blastos, infiltradas $\geq 25\%$ de blastos (18) y se contabilizó el porcentaje de compromiso en las muestras. Además, se clasificaron los resultados de extendido de médula ósea como M1 (<5% de blastos), M2, (≥ 5 -<25%) y M3 ($\geq 25\%$) (18).

b. Impronta de médula ósea

El procedimiento de cuantificación celular se hizo igual que para el extendido de médula ósea. En este caso se incluyeron las improntas de biopsia de médula ósea disponibles sin hacerse la calificación de muestra evaluable o no evaluable como se realizó para el extendido. Se clasificó como infiltrada o no infiltrada por blastos y se realizó la evaluación cuantitativa de las mismas.

Se utilizó la misma definición de M1, M2 y M3 mencionada en la caracterización del extendido de médula ósea para la clasificación de los resultados en impronta.

Se consideró que la evaluación de la impronta de biopsia de médula ósea tenía implicación clínica cuando este resultado llevara a la posibilidad de cambio en la clasificación del riesgo del paciente, diferente a la que se estableció por historia clínica (si o no).

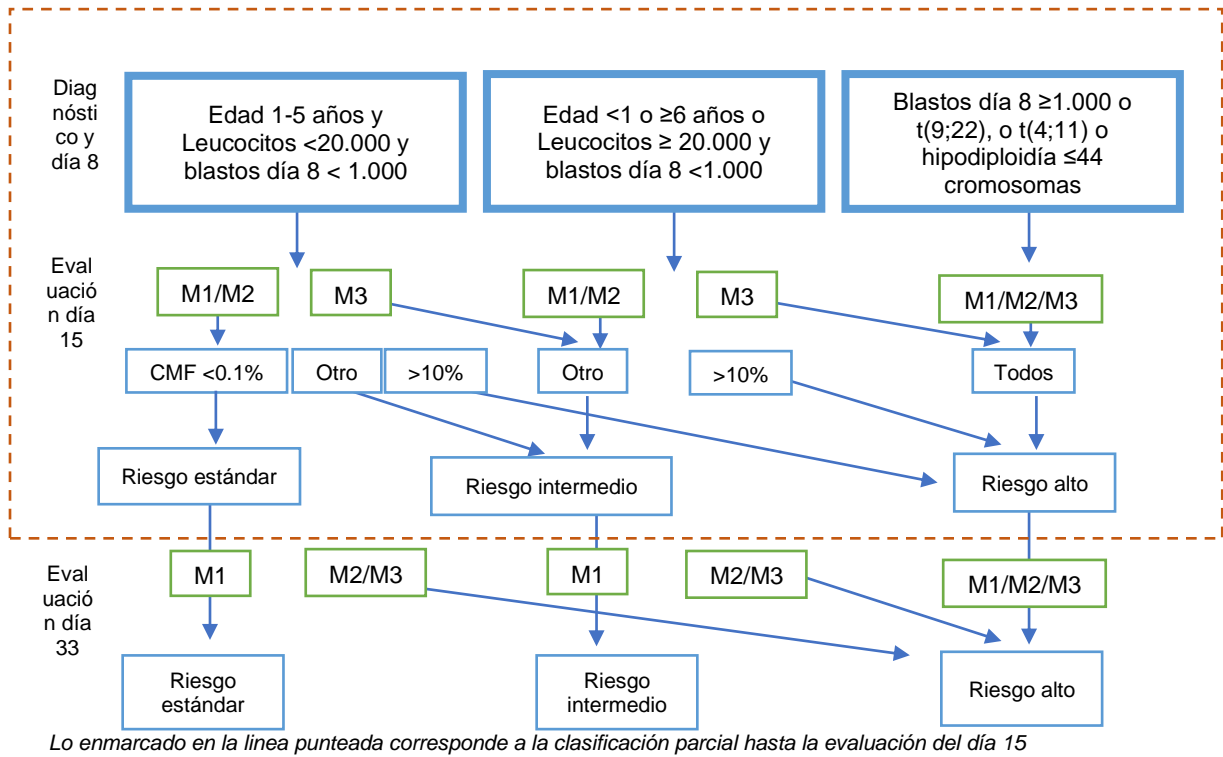
c. Procesamiento de muestra para citometría de flujo

Las muestras de médula ósea evaluadas para citometría de flujo se enviaron para procesamiento en un centro de referencia, usando el citómetro FACS Canto I. Se recopilaron los datos respecto a las características de la muestra para CMF reportados en el resultado (eventos y viabilidad) que se agruparon según el número de eventos adquiridos en $<300\ 000$ (7), $\geq 300\ 000$ a $1\ 000\ 000$ y $\geq 1\ 000\ 000$ (21) y el porcentaje de viabilidad celular en $<30\%$ (22), $\geq 30\%$ a $<90\%$ y $\geq 90\%$ (7).

Se describió el compromiso por la enfermedad entre las técnicas evaluadas en tablas comparativas agrupando los resultados en M1, M2 y M3 para la evaluación morfológica según la definición mencionada y $<5\%$; $\geq 5\%$ - $<25\%$ y $\geq 25\%$ para el porcentaje de blastos por citometría de flujo.

Con estos resultados se consideró reclasificación del riesgo por evaluación del día 15 según los parámetros descritos en la Gráfica 1 y se recolectaron los datos en relación con la clasificación del riesgo al día 33.

Gráfica 1. Clasificación de riesgo según ALLIC IC-BFM 2009 (7).



Se obtuvieron datos de los desenlaces en el seguimiento hasta Julio 2021 que se definieron así (7, 23):

- *Recaída*: Reaparición de la enfermedad que incluye recaída hematológica (detección de linfoblastos $\geq 25\%$ en médula ósea); compromiso testicular (verificadas con incremento insensible del tamaño testicular unilateral o bilateral, con volúmenes de más de 2 desviaciones medidas con orquidometr  de Prader, confirmado por biopsia); recaída en SNC (células $>5/uL$, identificación de linfoblastos en centrifuga o masa intracerebral en

TAC/RNM sin blastos en LCR, sangre periférica o médula ósea); o combinada (compromiso de 2 o más localizaciones, con MO comprometida en este caso con >5% de linfoblastos)

- *Muerte en inducción*: Muerte durante los primeros 33 días del tratamiento, o antes de iniciar fase Ib
- *Muerte en remisión completa*: muerte que ocurre después de los primeros 33 días de tratamiento sin evidencia clínica o paraclínica de actividad de la enfermedad
- *Abandono*: Interrupción del tratamiento por 4 o más semanas sin razones médicas y combinado con compromiso de 2 o más ubicaciones
- *Traslado*: pacientes transferidos a otra institución para continuar el tratamiento por parte de la aseguradora
- *Sin evento*: que no presentara ninguno de los anteriores durante el periodo de seguimiento

Los datos clínicos se tomaron de la historia clínica sistematizada y se recopilaron en una base de datos en el programa Microsoft Excel, todas las variables recolectadas están definidas en el Anexo I.

Este estudio fue aprobado por el comité de ética de la Fundación Hospital pediátrico de la Misericordia el 05 de octubre de 2020, acta No. 345-20

3.4 Análisis estadístico

Los datos fueron incorporados en el software estadístico Stata/SE. El análisis descriptivo para todas las variables se realizó con medidas de tendencia central y dispersión para las variables continuas, y de frecuencias absolutas y relativas (%) para las variables nominales. Para el análisis estadístico las variables cuantitativas

serán informadas como medias \pm desviación estándar (DE) o mediana y rango intercuartílico, según la naturaleza y distribución de las variables continuas. Previo a este análisis se realizó la prueba de normalidad (Fórmula de Shapiro Wilks) de las variables cuantitativas para establecer si la muestra se comportó de manera paramétrica o no paramétrica.

Se evaluaron las diferencias en la calificación del porcentaje de blastos de los 3 métodos: impronta de médula ósea, extendido de medula ósea y citometría de flujo que se realizó en dos grupos de análisis definidos por la disponibilidad de las muestras adecuadas; un primer grupo de comparación de impronta de biopsia y porcentaje de blastos en citometría de flujo y un segundo grupo de pacientes que contaron con muestras evaluables para las 3 técnicas, excluyéndose aquellos con calificación no evaluable del extendido de médula ósea. En estos grupos de comparación se confirmó que las variables cuantitativas no siguen la normalidad y se aplicó como medida de asociación la correlación de Spearman definiéndose como positiva o negativa y planteando el valor significativo de $p < 0,05$.

Se examinó el evento recaída para cada grupo de discordancias entre técnicas de evaluación (porcentaje de blastos por CMF-impronta; porcentaje de blastos por CMF –extendido de médula ósea) así como también para el grupo con resultados concordantes en las 3 técnicas y para la determinación de asociación entre los grupos comparativos y el desenlace de interés se empleó el estadístico Chi cuadrado o la prueba exacta de Fisher según la cantidad de datos obtenidos considerándose significativo un valor de p menor de 0,05.

4. Resultados

Se encontraron un total de 82 pacientes que se incluyeron en el análisis principal y un subgrupo de 69 pacientes con muestras evaluables y disponibles para las 3 metodologías.

Las características demográficas del grupo de estudio se describen en la Tabla 1. Dentro de estas se calculó la mediana para la edad de los pacientes que fue de 6 años (RIQ 3-12 años).

Respecto a las características clínicas de la enfermedad se observó como en LLA fenotipo B más de la mitad de los casos tuvieron $<50\ 000$ leucocitos frente al 50% de los casos de LLA T cuyos conteos al diagnóstico fueron $\geq 100\ 000$, con una mediana para conteo de leucocitos de $10\ 020\ 10^3/uL$ (RIQ 4480 – 42 030).

En la revisión de la impronta de biopsia de médula ósea tomada para evaluación del día 15 se evidencia que más de la mitad de los casos se calificaron como infiltradas, el resultado de la cuantificación de blastos en impronta obtenía implicación clínica en el cambio de clasificación del riesgo en 22 pacientes (26,8%) si se hubiera tenido en cuenta como parámetro principal de clasificación. Para el extendido de médula ósea fueron más frecuentes los casos de no infiltración, con 15,8% del total de las muestras en las cuales su calidad no permitió la evaluación (Tabla 1).

Tabla 1. Características demográficas y clínicas en la población de estudio

Total N (%)	82 (100%)
Edad al diagnóstico	
De 1 a <6 años	34 (41,4%)
≥ 6 años	48 (58,6%)
Sexo	
Masculino	42 (51,2%)
Femenino	40 (48,8%)

Linaje	74 (90,2%)
LLA-B	8 (9,8%)
LLA-T	
Leucocitos (10³/uL)	
<50 000	64 (78,1%)
≥50 000 y <100 000	7 (8,5%)
≥100 000	11 (13,4%)
Clasificación estatus SNC	
SNC 1	81 (98,8%)
SNC 2	0 (0%)
SNC 3	1 (1,2%)
Categorización del cariotipo	
Normal	51 (62,2%)
Hiperdiploide	4 (4,9%)
Metafases no adecuadas	16 (19,5%)
No se realiza	6 (7,3%)
Otras	5 (6,1%)
t(9;22)	
Negativa	61 (74,4%)
Positiva	2 (2,4%)
No se realiza	18 (22%)
Muestra insuficiente	1 (1,2%)
t(4;11)	
Negativa	57 (69,5%)
No se realiza	24 (29,3%)
Muestra insuficiente	1 (1,2%)
t(12;21)	
Negativa	46 (56,1%)
Positiva	9 (11%)
No se realiza	26 (31,7%)
Muestra insuficiente	1 (1,2%)
Respuesta a corticoide, día 8	
Buena respuesta	74 (90,2%)
Mala respuesta	6 (7,3%)
No evaluable	2 (2,5%)
Extendido de médula ósea en evaluación día 15	
No infiltrado (<25% de blastos)	46 (56,1%)
Infiltrado (≥ 25% de blastos)	23 (28%)
No evaluable	13 (15,9%)
Calidad del extendido de médula ósea día 15	
Evaluable	69 (84,2%)
No evaluable	13 (15,8%)
Impronta en evaluación día 15	
No infiltrada (<25% de blastos)	36 (43,9%)
Infiltrada (≥ 25% de blastos)	46 (56,1%)
Viabilidad celular de CMF al día 15	
<30%	3 (3,7%)
≥30% a <90%	43 (52,4%)
≥90%	12 (14,6%)
Sin datos)	24 (29,3%)
Número de eventos de la muestra de CMF al día 15	
<300 000	3 (3,7%)
≥300 000 a <1 000 000	43 (52,4%)

≥1 000 000	12 (14,6%)
Sin datos	24 (29,3%)
Categorización del riesgo al día 15	
Estándar	7 (8,5%)
Intermedio	50 (61%)
Alto	25 (30,5%)
Clasificación del riesgo al día 33	
Estándar	6 (7,3%)
Intermedio	51 (62,2%)
Alto	25 (30,5%)

En la comparación de los resultados de la evaluación del día 15 por diferentes métodos, en el grupo de 82 pacientes se evidenció que el conteo de blastos por CMF fue concordante con el resultado de la impronta de la biopsia de médula ósea en el 57,3% de los casos (M1 y <5% en CMF o M2 y ≥5-<25% en CMF o M3 para impronta y ≥25% blastos en CMF), los casos restantes mostraron diferencias en sus resultados con cuantificaciones de linfoblastos mayores para la impronta frente a la CMF (Ver Tabla 2).

Tabla 2. Evaluación del día 15 por método de impronta de biopsia de médula ósea y CMF. N (%)

		<i>Porcentaje blastos en impronta</i>			Total
		<i>M1</i>	<i>M2</i>	<i>M3</i>	
<i>Porcentaje blastos en CMF</i>	<i><5%</i>	27 (32,9)	10 (12,2)	11 (13,4)	48 (58,5)
	<i>≥5 a <25%</i>	0	0	14 (17,1)	14 (17,1)
	<i>≥25%</i>	0	0	20 (24,4)	20 (24,4)
	Total	27 (32,9)	10 (12,2)	45 (54,9)	82 (100)

M1: Blastos < 5%. M2 blastos ≥5-<25%, M3 blastos ≥25%
Coefficiente de correlación de Spearman: 0.85, p < 0,05

En el subgrupo de análisis de 69 pacientes en la comparación por morfología entre la impronta y el extendido de médula ósea, el 66,7% de los casos tuvieron resultados similares frente al 33,3% con resultados discordantes, en este último grupo en la gran mayoría de casos la impronta valoró al alta en número de linfoblastos frente al extendido de médula ósea (Ver Tabla 3).

Tabla 3. Evaluación del día 15 por método de extendido de médula ósea e impronta de médula ósea en el subgrupo de 69 pacientes, N (%)

		<i>Porcentaje blastos por extendido de médula ósea</i>			
<i>Porcentaje blastos por impronta</i>		<i>M1</i>	<i>M2</i>	<i>M3</i>	Total
	<i>M1</i>	21 (30,4)	1 (1,4)	0	22 (31,8)
	<i>M2</i>	5 (7,3)	2 (2,9)	0	7 (10,2)
	<i>M3</i>	3 (4,3)	14 (20,3)	23 (33,4)	40 (58)
Total	29 (42)	17 (24,6)	23 (33,4)	69 (100)	

M1: Blastos < 5%. M2 blastos ≥5-<25%, M3 blastos ≥25%
Coefficiente de correlación de Spearman: 0.87, p < 0.05

En este mismo subgrupo se encontró que la mayoría de los casos (75,3%) fueron concordantes en la comparación entre evaluación por extendido de médula ósea y citometría de flujo como lo muestra la Tabla 4. Dentro del grupo no concordante en 13 de los 17 casos el extendido de médula ósea cuantificó un más alto porcentaje de blastos frente a la evaluación por CMF.

Tabla 4. Evaluación del día 15 por método de extendido de médula ósea y CMF en el subgrupo de 69 pacientes, N (%)

		<i>Porcentaje blastos por extendido de médula ósea</i>			
<i>Porcentaje blastos por CMF</i>		<i>M1</i>	<i>M2</i>	<i>M3</i>	Total
	<5%	27 (39,1)	8 (11,6)	4 (5,8)	39 (56,5)
	≥5 a <25%	2 (2,9)	7 (10,2)	1 (1,5)	10 (14,6)
	≥25%	0	2 (2,9)	18 (26)	20 (28,9)
Total	29 (42)	17 (24,7)	23 (33,3)	69 (100)	

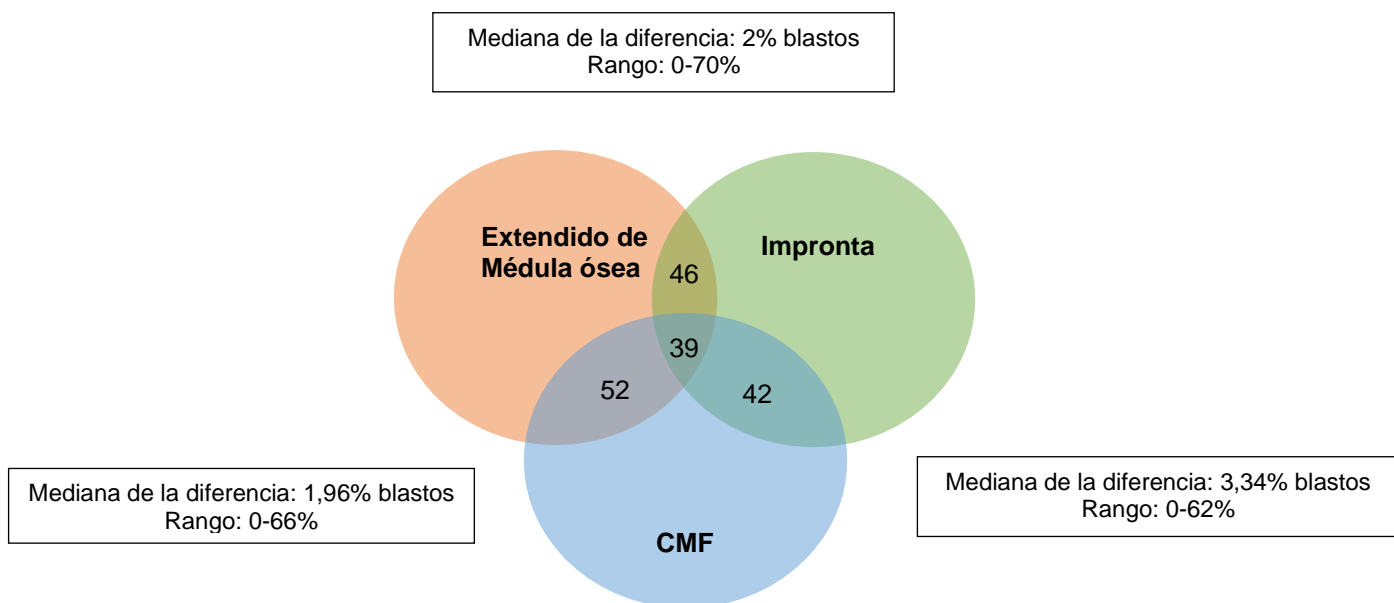
M1: Blastos < 5%. M2 blastos ≥5-<25%, M3 blastos ≥25%
Coefficiente de correlación de Spearman: 0.80, p < 0.05

Los resultados de las concordancias entre las metodologías de la evaluación del día 15 se muestran en la Gráfica 2. La comparación de las técnicas demostró una mayor frecuencia de casos con resultados concordantes entre el extendido de

médula ósea y los blastos en CMF, de este grupo el 51,9% de los casos mostró calificaciones de extendido de médula ósea en M1 y <5% de blastos por CMF.

Se evidencia que un 56,5% de casos del subgrupo tuvieron resultados similares entre las 3 técnicas, siendo más frecuente la calificación concordante en cuantificaciones bajas de blastos (extendido de médula ósea e impronta en M1 y <5% de blastos por CMF).

Gráfica 2. Diagrama de Venn con los resultados concordantes de médula ósea por diferentes metodologías, incluye diferencia de mediana en porcentaje de blastos (69 pacientes).

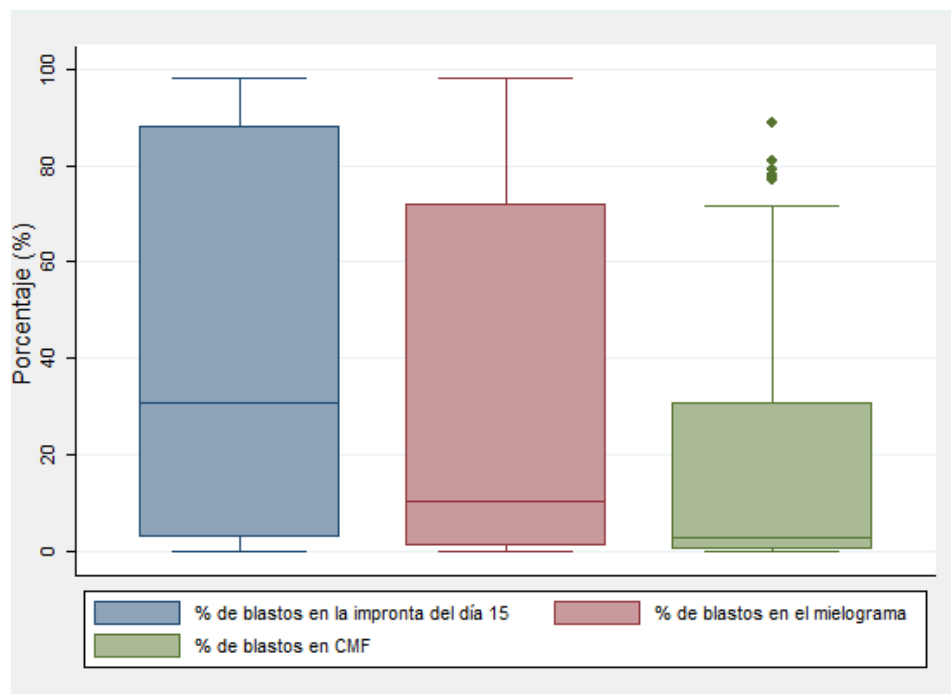


En relación con las medianas del porcentaje de blastos por metodología de evaluación se observó que los valores más altos se obtuvieron con la impronta y los valores más bajos con CMF (Ver Gráfica 3 y Tabla 5).

Tabla 5. Porcentaje de blastos por metodología en evaluación del día 15 subgrupo de 69 pacientes

Variable	Mediana (min-max)	Rango intercuartílico
% de blastos en impronta	31 (0-98)	85
% de blastos en extendido de médula ósea	11,5 (0-98)	71,5
% de blastos en CMF	3,5 (0-88,8)	30,6

Gráfica 3. Diagrama de bigotes para porcentaje de blastos por metodología de evaluación.

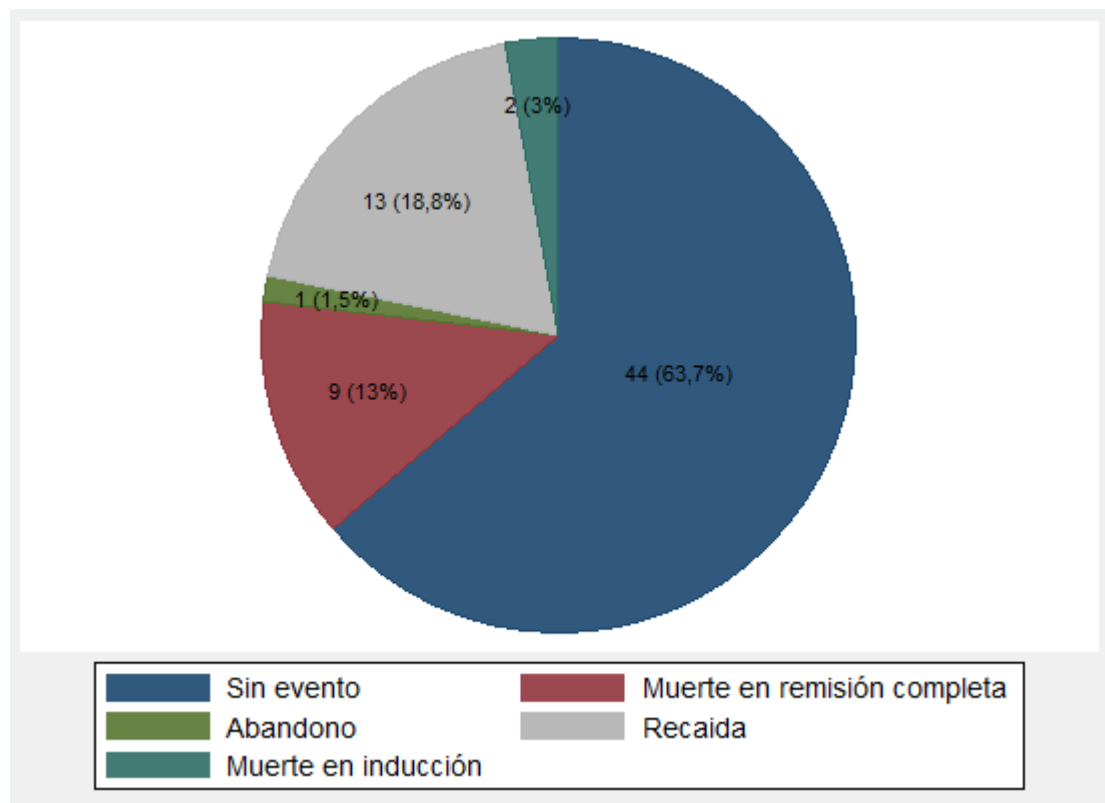


Al día 15 de evaluación se identificaron 29 pacientes de los 69 que requirieron cambio en la clasificación a un riesgo mayor, en los casos donde hubo diferencias entre el extendido de médula ósea y la CMF (#17), el cambio de riesgo se hizo favoreciendo el resultado de la CMF y según el esquema de la gráfica 1.

Respecto a la clasificación del riesgo al final de la inducción solamente 1 paciente cambió de riesgo y para la mayoría de los pacientes el riesgo definitivo fue intermedio (Tabla 1).

En relación con los eventos en el seguimiento (mediana 4,9 años RIQ 2,2-6,7) la mayoría de los pacientes no presentaron ninguno, seguido por los casos de recaída como lo muestra la Gráfica 4.

Gráfica 4. Eventos durante el seguimiento



Dentro de los grupos comparativos entre extendido de médula ósea/porcentaje de blastos en CMF y el grupo de impronta de biopsia de médula ósea/porcentaje de blastos en CMF las recaídas fueron más frecuentes en el grupo concordante y de estos principalmente en aquellos donde la concordancia se daba entre la técnica morfológica calificada como M3 y % de blastos en CMF $\geq 25\%$.

En la Tabla 6 se muestra como en los grupos discordantes la recaída de la enfermedad fue menos frecuente cuando el porcentaje de blastos en CMF fue <5% aun con una cuantificación mayor de blastos por extendido de médula ósea, en este grupo comparativo (extendido médula ósea y % de blastos en CMF), se mostró un valor $p=0,049$. El resto de los casos de recaída (#8) se encontraron en los grupos concordantes.

Los grupos de comparación entre impronta de biopsia de médula ósea y CMF y los casos de recaídas se describen en la Tabla 6, en estos no se encontraron diferencias estadísticas $p=0,051$.

Adicionalmente la recaída no mostro diferencias estadísticas entre los pacientes que requirieron cambio en el riesgo frente a los que no lo requirieron al día 15 de evaluación.

Tabla 6. Descripción de casos de recaída por grupo de discordancia

Grupo de discordancia	Casos de recaída (%)	Total de pacientes en subgrupo
Porcentaje de blastos en CMF <5% y extendido de médula ósea $\geq 5\%$	2 (16,6%)	12
Porcentaje de blastos en CMF $\geq 25\%$ y extendido de médula ósea < 25%	2 (100%)	2
Porcentaje de blastos en CMF $\geq 5- <25\%$ y extendido de médula ósea $\geq 25\%$[†]	1 (100%)	1
Porcentaje de blastos en CMF <5% e impronta $\geq 5\%$	2 (11,7%)	17
Porcentaje blastos en CMF <5% e impronta $\geq 5- <25\%$^v	1 (14%)	7

[†] Para otros grupos donde existían casos discordantes (M1/CMF $\geq 5- <25\%$) no hubo eventos de recaída

^v Para otros grupos donde existían casos discordantes (M2/CMF $\geq 5- <25\%$) no hubo eventos de recaída

5. Discusión y conclusiones

La evaluación de la respuesta al día 15 del tratamiento de pacientes con leucemia linfoblástica aguda juega un papel importante en la búsqueda por la adecuada clasificación del riesgo y de esta forma la optimización del manejo de la enfermedad; es así como se utilizan diferentes métodos especializados que permiten la detección de blastos residuales.

Este estudio es el primero que pretende evaluar la diferencias entre los resultados de las técnicas usadas para evaluación del día 15, incluyendo la impronta de biopsia de médula ósea dentro de la valoración morfológica de la enfermedad y también explora los casos de recaída de los pacientes en el grupo de discordancia de resultados entre las metodologías.

La comparación entre técnicas evidenció que existe una asociación positiva de las mismas, mostrando que las comparaciones entre metodologías morfológicas que incluyen extendido de médula ósea o impronta de biopsia de médula ósea frente a las mediciones de linfoblastos por citometría de flujo, en la mayoría de los casos arrojaron resultados concordantes, acorde a lo reportado en la literatura.

Respecto a los casos discordantes entre la impronta de médula ósea y la CMF, la técnica de valoración morfológica cuantifica un mayor porcentaje de blastos y se evidencia que la impronta es la metodología que detecta valores más altos de linfoblastos, incluso en la comparación con el extendido de médula ósea. Existen publicaciones que mencionan resultados similares en pacientes con enfermedades hematológicas malignas, sin encontrar diferencias estadísticas importantes de estos resultados en el adecuado diagnóstico. Dentro de las posibles hipótesis de explicación de este fenómeno las referencias sugieren que podrían tener relación con los cambios morfológicos posterior al tratamiento quimioterapéutico recibido,

además de las dificultades en la diferenciación de los linfoblastos con las hematogonias, siendo estas últimas, precursores de células B inmaduros no malignos y que morfológicamente resultan casi indistinguibles (14, 17).

Frente al grupo comparativo entre el extendido de médula ósea y la detección de blastos en CMF, existen reportes como el de Gupta S et al, donde evaluaron resultados al final de la inducción de pacientes con LLA, encontrando que en los casos discordantes de la evaluación la mayoría de los pacientes mostraban cifras detectables de blastos en CMF mayores que las demostradas por morfología. Lo anterior se menciona en contraste con lo evidenciado en este estudio, donde el extendido de médula ósea cuantificó mayor cantidad de blastos frente a la CMF en la mayoría de los casos discordantes. Esta diferencia también podría explicarse tanto como por las dificultades en la identificación morfológica post tratamiento ya mencionadas, como por la posibilidad de hemodilución de la muestra, la cual podría afectar y dificultar la interpretación de los resultados en la citometría de flujo. Vale la pena mencionar que en un mismo paciente y en un mismo procedimiento la toma de aspiraciones secuenciales de médula ósea podría mostrar proporciones decrecientes de blastos (12, 24).

La literatura menciona estudios retrospectivos que comparan técnicas morfológicas en el diagnóstico de enfermedades hematológicas (extendido de médula ósea, impronta y biopsia) encontrando que estas técnicas tienen buena precisión al diagnóstico y que cada método tiene un papel y aporte similar (18, 24-26). Aunque nuestro estudio no evaluó las concordancias y diferencias entre las técnicas en el diagnóstico de la enfermedad, durante la evaluación de la respuesta al tratamiento en la mayoría de los resultados, la comparación entre las técnicas morfológicas, impronta y extendido de médula ósea, fueron concordantes; estos resultados están alineados con las publicaciones citadas. En este punto se puede mencionar que algunos estudios muestran que es más común encontrar hallazgos concordantes entre técnicas cuando la carga de la enfermedad es alta (15), sin

embargo, en este estudio se evidenció que la frecuencia de resultados concordantes entre los 3 métodos evaluados fue mayor cuando las cuantificaciones de blastos se encontraron en calificaciones bajas, M1 para los métodos de morfología y <5% de blastos para citometría de flujo.

Adicionalmente no existe grandes reportes que permitieran dilucidar si estas diferencias entre técnicas de evaluación de respuesta al tratamiento tienen algún significado en los desenlaces clínicos de los individuos; los escasos datos respecto a este planteamiento muestran que aquellos pacientes con calificaciones de M1 en extendido de médula ósea/EMR $\geq 5\%$ podrían tener una supervivencia libre de eventos inferior si se compara con aquellos concordantes con cuantificaciones bajas de la enfermedad, pero a su vez SLE superiores a aquellos concordantes en alta carga de enfermedad (M2 y CMF $\geq 5\%$) (15). Estos resultados podrían estar cercanos a lo encontrado en esta investigación donde la frecuencia en la presentación de recaída fue mayor en el grupo concordante (extendido médula ósea/CMF) principalmente en M3/CMF $\geq 25\%$ y dentro de aquellos con discordancias, se encontró una menor frecuencia de casos de recaída en pacientes con cuantificación de blastos en CMF menor del 5% aun con resultados de morfología en M2/M3 con diferencias estadísticas en el grupo de comparación ($p=0,049$). Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas en el grupo de comparación de impronta/CMF, pero los resultados deberán ser interpretados con cautela dado el número bajo de casos que limita la posibilidad de determinar una verdadera significancia de estos.

En conclusión, los hallazgos sugieren que en su mayoría los resultados entre las técnicas morfológicas y la cuantificación de blastos por CMF en la evaluación del día 15 de tratamiento de niños con LLA son resultados concordantes, técnicas que en conjunto apoyan la decisión para una mejor clasificación del riesgo. En este punto en relación con el grupo pequeño de aquellos casos discordantes en la evaluación del extendido de médula ósea y CMF, los resultados sugieren que la

CMF baja aun con morfología calificada más alta se asocia estadísticamente con menos recaídas, apoyando que la utilización de la CMF para la clasificación del riesgo en este grupo discordante podría ser la conducta más adecuada. Se necesitan más estudios que incluyan un mayor número de casos discordantes y así la posibilidad de evaluar el impacto pronóstico de esas diferencias entre técnicas en los resultados clínicos de los pacientes.

6. Aspectos éticos y clasificación de riesgos

Este proyecto se rige bajo las políticas de investigación pública que constituye los estándares para la investigación y se basa en principios de justicia, respeto, no maleficencia, beneficencia, autonomía y capacidad. Se ajusta a la normatividad internacional particularmente la declaración de Helsinki y a las pautas éticas para la investigación biomédica preparadas por el Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas “CIOMS” y la resolución 8430 de 1993 del ministerio de salud.

Se considera que el presente estudio constituye una investigación sin riesgo para el paciente o sus familias dado que se trata de un estudio retrospectivo y no se realiza ningún tipo de intervención o modificación de las variables biológicas de sus participantes. Riesgo identificado según la Res. 8430 de 1993 del Ministerio de Salud.

7. Conflictos de interés

La investigación carece de conflictos de intereses desde el punto de vista de patrocinios o remuneración alguna (Art. 51 Res. 8430/2003).

A. Anexo

Variable	Definición	Tipo	Valores de codificación
Variables demográficas			
Edad	Tiempo de vida en años cumplidos al momento del diagnóstico	Cuantitativa continua	Años
Sexo	Masculino o femenino	Cualitativa nominal	0 Masculino 1 Femenino
Variables clínicas			
Fecha del diagnóstico	Fecha en la cual se realizó el diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda	Cuantitativa discreta	Día/mes/año
Tipo de LLA	Fenotipo de leucemia linfoblástica aguda al diagnóstico determinada en médula ósea	Cualitativa nominal	0 LLA B 1 LLA T
Leucocitos al diagnóstico	Recuento de leucocitos al momento del diagnóstico	Cuantitativo discreta	$10^3/uL$
Clasificación de SNC (7)	Clasificación del compromiso por LLA del SNC, evaluada por citológico de líquido cefalorraquídeo (LCR), imágenes, clínica y valoración oftalmológica	Cualitativa ordinal	0 Estatus 1: Negativo (no hay evidencia clínica, ni imágenes anormales de SNC, fondo de ojo normal y LCR sin blastos y sin otra evidencia de leucemia en SNC) 1 Estatus 2: Negativo: blastos en un citocentrifugado de LCR $<5/uL$ y relación GR:LEU en LCR $\leq 100:1$ (punción lumbar no traumática y LCR no contaminado con sangre) o linfoblastos en citocentrifugado de LCR con GR:LEU $>100:1$ (punción lumbar traumática y LCR contaminado con sangre) o punción lumbar traumática (LCR contaminado con sangre) asociado a recuento de

			leucocitos >50 000/uL 2 Estatus 3: Positiva (imágenes TAC/RNM con masa tumoral en cerebro o meninges, parálisis nervio craneal sin importar imágenes ni resultado de LCR, compromiso retinal aislado, LCR no traumático con >5/uL células la mayoría blastos en el citocentrifugado, si contaminación con sangre es dudosa recuento de células >5/uL con la mayoría blastos, GR:LEU ≤100:1 o si >5/uL células con % mayor de blastos en LCR que sangre periférica
Cariotipo	Hallazgos en cariotipo al momento del diagnóstico	Cualitativo nominal	0 Normal 1 Hipodiploide bajo: 32-39 cromosomas (10) 2 Hiperdiploide alto: ganancia de ≥ 5 cromosomas (6) 3 Complejo: ≥ 5 anormalidades cromosómicas (6) 4 No metafases 5 No se hizo 6 Otras
t(9;22)	Presencia de traslocación (9;22)	Cualitativo nominal	0 Negativa 1 Positiva 2 No se tomo 3 Muestra insuficiente
t(4;11)	Presencia de traslocación (9;22)	Cualitativo nominal	0 Negativa 1 Positiva 2 No se tomo 3 Muestra insuficiente
t(12;21)	Presencia de traslocación (12;21)	Cualitativo nominal	0 Negativa 1 Positiva 2 No se tomo 3 Muestra insuficiente
Clasificación del riesgo al día 15 (7)	Clasificación del riesgo al día 15 de evaluación	Cualitativo ordinal	0 Estándar 1 Intermedio 2 Alto

Respuesta a prednisona (7)	Evaluación de respuesta a corticoide se hace en base a blastos en hemograma del día 8	Cualitativo nominal	0 Buena respuesta: <1000 blastos 1 Mala respuesta: ≥1000 blastos 2 No evaluable
Citometría de flujo día 15	Porcentaje de blastos en médula ósea por citometría de flujo en evaluación día 15	Cuantitativo continua	Porcentaje (%)
Viabilidad de la muestra para citometría de flujo día 15	% de células viables en la muestra	Cualitativa nominal	0 <30% (22) 1 ≥30% a <90% 2 ≥90% Optima: ≥90% de viabilidad (7)
Eventos adquiridos en muestra para CMF	Número de eventos adquiridos para la muestra de CMF	Cuantitativa continua	Número de eventos
Extendido de médula ósea en evaluación día 15 (7)	Hallazgos en aspirado de médula ósea al día 15	Cualitativo nominal	0 No infiltrado < 25% de blastos 1 Infiltrado ≥25% de blastos 2 No evaluable
Porcentaje de blastos en extendido de médula ósea en evaluación día 15	Porcentaje de células blásticas en extendido de médula ósea en aspirado de médula ósea al día 15 (<i>solamente en extendido de médula ósea de calidad evaluable</i>)	Cuantitativo continuo	Porcentaje (%)
Categorización de calidad de muestra para extendido de médula ósea del día 15	Calidad de la muestra para extendido de médula ósea	Cualitativo nominal	0 Evaluable: aquellas muestras adecuadas: muestra con presencia de espículas, megacariocitos y otros precursores (27) o algo diluidas pero valorables 1 No evaluables: aquellas que no cumplían los requisitos de las evaluables
Categorización del extendido de médula ósea del día 15 (M) (7)	Porcentaje de blastos en 3 categorías	Cualitativo nominal	1 0-<5% de blastos 2 ≥5-<25% de blastos 3 ≥25% de blastos 4 no evaluable
Impronta médula ósea día 15	Hallazgos en la impronta al día 15	Cualitativo nominal	0 No infiltrada < 25% de blastos 1 Infiltrada ≥25% de blastos

			2 No evaluable
Categorización de la impronta en evaluación día 15 (M)	Porcentaje de blastos en 3 categorías	Cualitativo nominal	1 Menos del 5% 2 Entre el ≥ 5 -<25% 3 Más o igual del 25% 4 No evaluable
Porcentaje de blastos en la impronta del día 15	Porcentaje de células blásticas en impronta del día 15 en las improntas infiltradas	Cuantitativo continuo	Porcentaje (%)
Clasificación del riesgo al día 33 (7)	Clasificación del riesgo al momento del diagnóstico	Cualitativo ordinal	0 Estándar 1 Intermedio 2 Alto
Variables de desenlace			
Fecha de último control vivo	Fecha en la cual el paciente asistió por última vez a control médico	Cuantitativa discreta	Día/mes/año
Evento al último control (23)	Cualquier evento categorizado como desenlace, el que primero aparezca	Cualitativa nominal	0 Sin evento: que no presentara ninguno de los otros desenlaces en el período de seguimiento 1 Muerte en remisión completa: muerte que ocurre después de los primeros 33 días de tratamiento sin evidencia clínica o paraclínica de actividad de la enfermedad 2 Abandono: Interrupción del tratamiento por 4 o más semanas sin razones médicas y combinado con compromiso de 2 o más ubicaciones 3 Recaída: Reparición de la enfermedad que incluye recaída hematológica (detección de linfoblastos $\geq 25\%$ en médula ósea); compromiso testicular (verificadas con incremento insensible del tamaño testicular unilateral o bilateral, con volúmenes de más de 2 desviaciones medidas con orquidómetro

			<p>de Prader, confirmado por biopsia); recaída en SNC (células >5/uL, identificación de linfoblastos en centrifuga o masa intracerebral en TAC/RNM sin blastos en LCR, sangre periférica o médula ósea); o combinada (compromiso de 2 o más localizaciones, con MO comprometida en este caso con >5% de linfoblastos)</p> <p>4 Traslado: pacientes transferidos a otra institución para continuar el tratamiento por parte de la aseguradora</p> <p>5 Muerte en inducción: Muerte durante los primeros 33 días del tratamiento, o antes de iniciar fase Ib</p>
--	--	--	--

Bibliografía

1. InNdS. Comportamiento epidemiológico de cáncer en menores de 18 años, período 2015 a 2020, Colombia. Semana epidemiológica 0531 de enero al 6 de febrero de 2021. Tomada de Boletín de alto costo.
2. Acuña L SP, Uribe D, Pulido D, Valencia O. *Situación Del Cáncer En Colombia 2015*. 2015.
3. Kato M, Manabe A. Treatment and biology of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Int*. 2018;60(1):4-12.
4. Minimal Residual Disease Evaluation in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: A Clinical Evidence Review. *Ont Health Technol Assess Ser*. 2016;16(7):1-52.
5. Hunger SP, Mullighan CG. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *N Engl J Med*. 2015;373(16):1541-52.
6. Malard F, Mohty M. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2020;395(10230):1146-62.
7. Campbell M CL, Riccheri C, Dragana J, Jazbec J, Kaiserova E, Konja J, Kovacs G, Kowalczyk J, Yuksel L, Kiss C, Schrappe M, Stary J, Dworzak M, Kappelmayer J, Szczepanski T, Zimmermann M. Protocolo de estudio y tratamiento de Leucemia linfoblástica infantil LLA PINDA 2009 LLA IC BFM 2009.
8. O'Connor D, Moorman AV, Wade R, Hancock J, Tan RM, Bartram J, et al. Use of Minimal Residual Disease Assessment to Redefine Induction Failure in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Oncol*. 2017;35(6):660-7.
9. Rathe M, Preiss B, Marquart HV, Schmiegelow K, Wehner PS. Minimal residual disease monitoring cannot fully replace bone marrow morphology in assessing disease status in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Apmis*. 2020.
10. Gramatges M, O'Brien M, Rabin K. Acute Lymphoblastic Leukemia. In: Kluwer W, editor. *Pizzo & Poplack's pediatric oncology*. 8 ed: Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2020. p. 1445-585.

11. Kreft A, Holtmann H, Schad A, Kirkpatrick CJ. Detection of residual leukemic blasts in adult patients with acute T-lymphoblastic leukemia using bone marrow trephine biopsies: comparison of fluorescent immunohistochemistry with conventional cytologic and flow-cytometric analysis. *Pathol Res Pract.* 2010;206(8):560-4.
12. Loken MR, Chu SC, Fritschle W, Kalnoski M, Wells DA. Normalization of bone marrow aspirates for hemodilution in flow cytometric analyses. *Cytometry B Clin Cytom.* 2009;76(1):27-36.
13. Shalabi H, Yuan CM, Kulshreshtha A, Dulau-Florea A, Salem D, Gupta GK, et al. Disease detection methodologies in relapsed B-cell acute lymphoblastic leukemia: Opportunities for improvement. *Pediatr Blood Cancer.* 2020;67(4):e28149.
14. Chantepie SP, Cornet E, Salaün V, Reman O. Hematogones: an overview. *Leuk Res.* 2013;37(11):1404-11.
15. Gupta S, Devidas M, Loh ML, Raetz EA, Chen S, Wang C, et al. Flow-cytometric vs. -morphologic assessment of remission in childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group (COG). *Leukemia.* 2018;32(6):1370-9.
16. Proytcheva M. Bone marrow evaluation for pediatric patients. *Int J Lab Hematol.* 2013;35(3):283-9.
17. Aboul-Nasr R, Estey EH, Kantarjian HM, Freireich EJ, Andreeff M, Johnson BJ, et al. Comparison of touch imprints with aspirate smears for evaluating bone marrow specimens. *Am J Clin Pathol.* 1999;111(6):753-8.
18. Chandra S, Chandra H. Comparison of bone marrow aspirate cytology, touch imprint cytology and trephine biopsy for bone marrow evaluation. *Hematol Rep.* 2011;3(3):e22.
19. Ryan D. Chapter 3: Examination of marrow. In: Education M-H, editor. *Williams Hematology. Ninth Edition ed2016.* p. 27-39.
20. Hernandez L, Raya J, Alvarez-Arguelles H, Cabello M, Carrasco J, Garcia M, Giraldo P, Hernandez M, Martin T, Roca M, Rozman M, Tobalina L. Biopsia de

la médula ósea. Perspectiva clínico-patológica. hemoterapia FEdHyHSEdHy, editor. 2017.

21. Correia RP, Bento LC, de Sousa FA, Barroso RS, Campregher PV, Bacal NS. How I investigate minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Int J Lab Hematol*. 2021;43(3):354-63.
22. Szánthó E, Kárai B, Ivády G, Baráth S, Száraz-Széles M, Kappelmayer J, et al. Evaluation of Sample Quality As Preanalytical Error in Flow Cytometry Analysis in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Ejifcc*. 2019;30(4):385-95.
23. Trujillo ÁM, Linares A, Sarmiento IC. Intensive chemotherapy in children with acute lymphoblastic leukemia. Interim analysis in a referral center in Colombia. *Revista de la Facultad de Medicina*. 2016;64:417-25.
24. Bain BJ, Bailey K. Pitfalls in obtaining and interpreting bone marrow aspirates: to err is human. *J Clin Pathol*. 2011;64(5):373-9.
25. Gong X, Lu X, Wu X, Xu R, Tang Q, Xu G, et al. Role of bone marrow imprints in haematological diagnosis: a detailed study of 3781 cases. *Cytopathology*. 2012;23(2):86-95.
26. Baskota U, Singh S.K. Bone marrow touch imprint smears as an adjunct to bone marrow aspiration smears in hematological disorders. *Journal of pathology of Nepal*. 2015;5:739-46.
27. Lee SH, Erber WN, Porwit A, Tomonaga M, Peterson LC. ICSH guidelines for the standardization of bone marrow specimens and reports. *Int J Lab Hematol*. 2008;30(5):349-64.