

ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL (EMR) EN LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA PEDIÁTRICA (LLA). ESTUDIO MULTICÉNTRICO.

Soria, M¹ , Agriello, E.^{2,3,13}, Gutierrez ,M¹; Ferraro,C¹; Gil,G¹ ;Iommi, P.²,
Torreguitart, F.², Caferri, H.³, Hernández, M.⁴, Cédola, A.⁵, Drosovsky, C.⁵, Majek,
E.⁶ Hiramatsu, E.⁷, Morell, D.⁷ Rizzi, L.⁸, Rodríguez, C.¹⁰ Gomel, D.¹⁰, Cabral, C.¹⁰
;Pistaccio, L.^{11,13},Schuttemberg,V.¹¹ Solari,L.^{12,13} Riccieri C.¹² Gaillard ,MI.^{1,13}

¹Htal de Niños R. Gutierrez, CABA ²LEB laboratorio, ³Hospital Penna y ⁴Clínica Dr. Matera, Bahía Blanca; ⁵Clínica San Lucas, Neuquén; ⁶Hospital de Niños Quintana, Jujuy; ⁷Hospital Infantil ,Cordoba, ⁸Sanatorio Allende, Cordoba, ⁹Hospital Nacional de Clínicas, Córdoba; ¹⁰Hospital de Niños, Corrientes ; ¹¹Hospital Sor Ludovica, La Plata; ¹²Hospital Nacional Prof. A . Posadas; ¹³ Laboratorios. para EMR GATLA

INTRODUCCIÓN:

En las últimas 4 décadas se profundizó el conocimiento en la cinética de la respuesta temprana al tratamiento en pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) para predecir riesgo de recaída¹. Sin embargo, 20% de los pacientes que inicialmente responden al tratamiento y morfológicamente no presentan blastos en médula ósea, recidivan durante el tratamiento o luego de la finalizar el mismo^{1,2}.

La presencia de enfermedad mínima residual (EMR) en LLA es un marcador pronóstico significativo para la detección temprana de recaídas^{2,3,4}. La determinación de EMR se realiza por reacción de cadena de polimerasa (PCR) mediante la detección de rearrreglos de genes de receptor T y/o de inmunoglobulinas ^{5,6} y por citometría de flujo (CF)⁷. El principio de la CF está basado en que las células leucémicas expresan características inmunofenotípicas distintivas que permiten distinguirlas de las células hematopoyéticas normales¹¹.

El inmunofenotipo asociado a leucemia se define al diagnóstico en más de un 95% de los pacientes con LLA y sirve para detectar EMR durante el tratamiento

con una sensibilidad de por lo menos 0.01% o de 1 blasto en 10.000 células normales¹².

La identificación de factores clínicos y biológicos asociados a pronóstico establece el concepto de estrategia ajustada al riesgo⁸. El análisis cuantitativo de EMR en niños con LLA es el factor pronóstico más importante para determinar la posibilidad de recaída. Permite intensificar el tratamiento en niños con respuesta inadecuada a la quimioterapia y potencialmente disminuir la toxicidad del mismo en pacientes de bajo riesgo^{9.10}.

Los objetivos del estudio son:

Evaluar EMR por citometría flujo en MO (días 15 y 33 de la inducción) en niños con LLA.

Determinar la asociación de EMR con variables demográficas y hematológicas.

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

MATERIAL Y METODOS:

Se realizó un estudio descriptivo retrospectivo en el período comprendido entre enero de 2006 y junio de 2013. Se incluyeron 192 pacientes con diagnóstico LLA entre 1 y 18 años de edad tratados según protocolo ALLIC/BFM/GATLA 2002 en Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez, Hospital Sor Ludovica de La Plata, Hospital Nacional. Prof. A. Posadas , Hospital infantil de Córdoba, Sanatorio Allende de Córdoba, Hospital Penna , Clínica Dr Matera de Bahía Blanca, Clínica San Lucas de Neuquén, Hospital de Niños Quintana de Jujuy y Hospital Pediátrico de Corrientes . Se excluyeron pacientes Phi +, pacientes fallecidos en inducción y remisión completa.

Se realizó cuantificación de EMR al día15 y día33 en MO por citometría de flujo multiparamétrica de 4 colores utilizando combinaciones de anticuerpos conjugados contra antígenos de superficie, citoplasmáticos y/o nucleares. Panel para LLA B: CD19, CD45, CD20, CD38, CD10, CD34, Tdt, CD58. Panel para LLA T: CD7, CD3citoplasmático y de superficie, CD5, CD99, Tdt, CD34, CD4, CD8, CD1a CD45. La adquisición de datos se realizó en un citómetro de flujo Facscalibur y FacsCanto (BD Biosciences) usando CellQuest y DIVA software. En todos los casos se adquirieron como mínimo 300.000 células, a fin de alcanzar una sensibilidad de por lo menos 0.01%. Para el análisis de los datos se utilizó Paint-a-gate(BD Biosciences) y/o Infinicyt (Cytognos SL, Salamanca, Spain) En las LLA-B se realizó un gate primario en células CD19+, mientras que en las LLA-T en células CD7+.

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS 15.0. El análisis univariado se realizó con T-test para variables continuas y con χ^2 o test de Fisher para variables categóricas. El análisis de supervivencia se estimó según el método de Kaplan Meier¹⁹. El análisis multivariado se realizó por regresión múltiple. Se consideró estadísticamente significativa a valores de $p < 0.05$.

RESULTADOS:

Se evaluaron 192 pacientes con LLA. La media de seguimiento fue 57.5 meses (r:16.9- 91.1m), la media de edad al diagnóstico 7.7 años (r:1.2-19.24 años).

Sexo masculino 106 pacientes (55.2%), femenino 86 pacientes (44.8%). El fenotipo más frecuente según clasificación EGIL II fue de estirpe B 92.7% (178), de los cuales fueron B común 75.5% (145 pacientes), proB 2.6% (5) y preB 14.6% (28). Precursor T 6.3% (12). Bifenotípicas 1% (2).

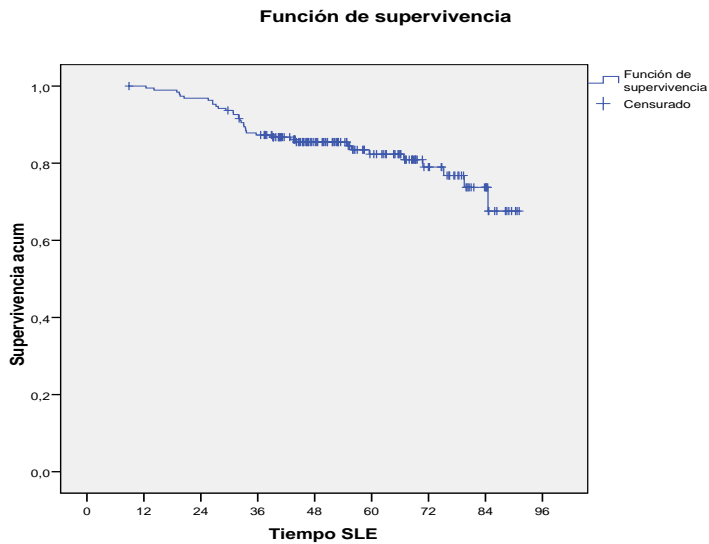
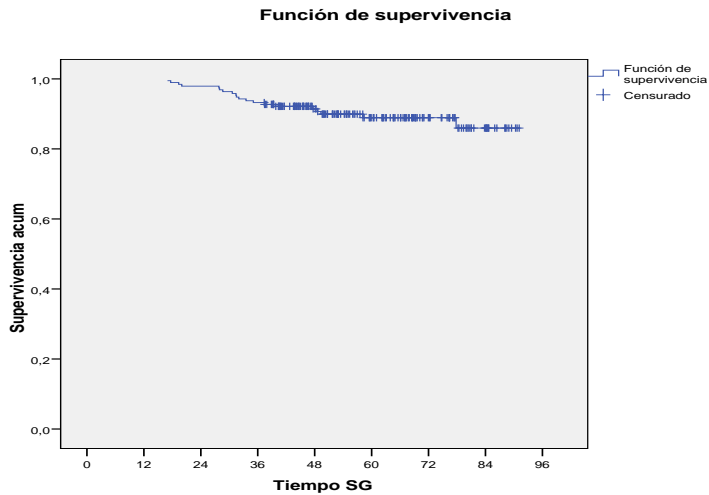
El 93.2% (179) presentaron buena respuesta al día 8 de tratamiento con prednisona (6.8% mala respuesta). En cuanto a la determinación de grupos de riesgo según características clínicas-hematológicas; 31.2% (60) estándar, 59.4% (114) intermedio y 9.4% (18) alto riesgo. La EMR al día 15 fue evaluable en el

76.6% de los pacientes (147), siendo positiva (mayor de 0,01%) en 87 pacientes (59.2%). Si se hubiera considerado EMR día15 según protocolo actual BFM/ALLIC/GATLA 2010 los grupos de riesgo serían: estándar 17.2% (33), intermedio 62.5% (120) y alto riesgo 20.3% (39). Tabla1.

Al día 33 la EMR fue evaluable en el 71,9% de los pacientes (138), siendo positiva en 21 pacientes (15.2%).

La SG a 36 meses fue 0.92 y la SLE global 0.86. Figura1.

Figura 1: Sobrevida global y Sobrevida libre de evento (Kaplan Meier)



Asociación de variables hematológicas y demográficas con EMR al día 15 (n=147).

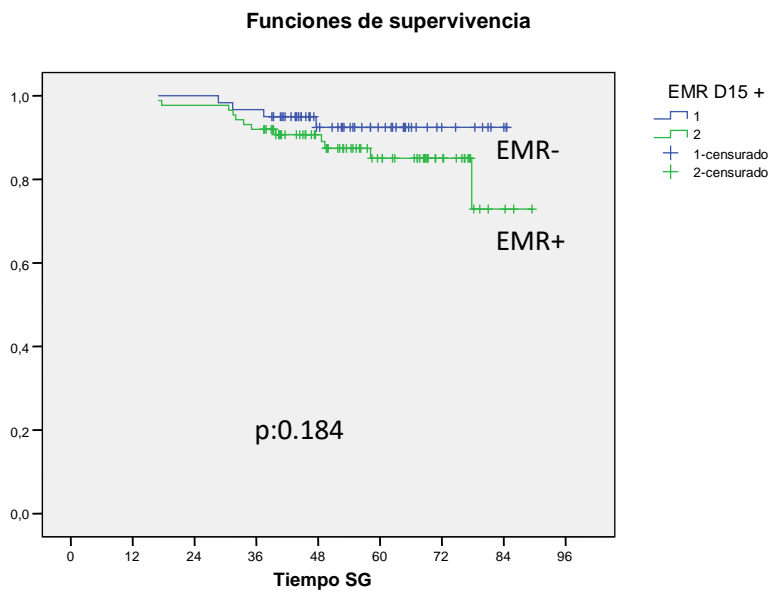
No se observó diferencia estadísticamente significativa cuando se asoció EMR al día 15 con sexo (p0.98), edad al diagnóstico (p0.66), fenotipo pro B (p0.146), B común (p0.50), preB (p 0.36), T (p 0.24) ni bifenotípicas (p0.40).

Tampoco se observó diferencia estadísticamente significativa cuando se asoció con respuesta al día 8 (p0.24). Fue significativo cuando se asoció EMR al

día 15 con alto riesgo ($p=0.039$) y con recaídas ($p=0.002$). no así con riesgo estándar ($p=0.83$) e intermedio ($p=0.12$)

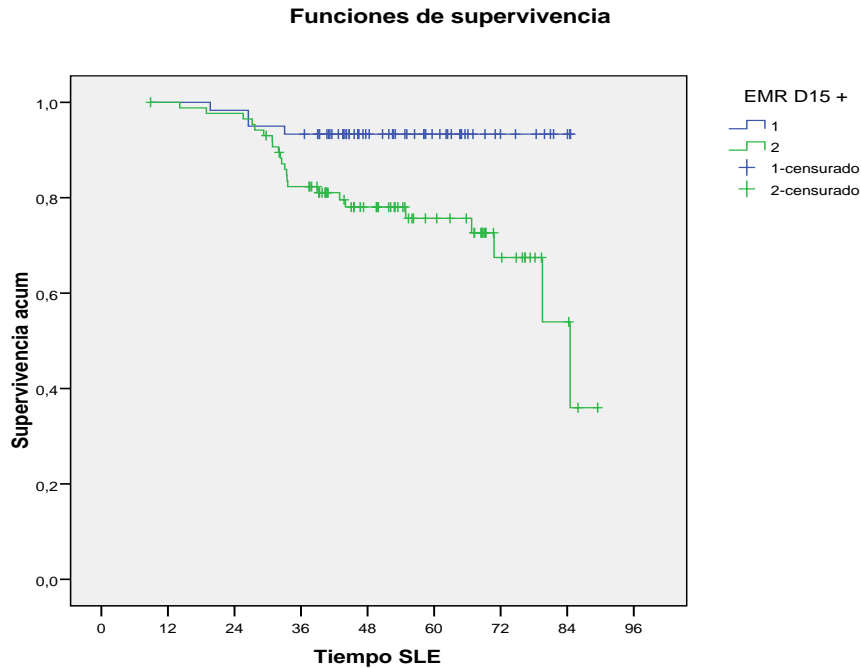
La SG a 36 meses en pacientes con EMR+ al día 15 fue 0.87 y en pacientes con EMR- 0.92 ($p=0.184$).

Figura 2: Sobrevida global en meses según EMR al día 15.(Kaplan Meier)



La SLE, considerando evento a la muerte y/o recaída, a 36 meses fue 0.78 en pacientes con EMR+ y 0.93 en pacientes con EMR- al día 15 (p0.004).

Figura 3: Sobrevida libre de evento en meses. según EMR al día 15. (Kaplan Meier)



Asociación de variables hematológicas y demográficas con EMR al día 33 (n=138).

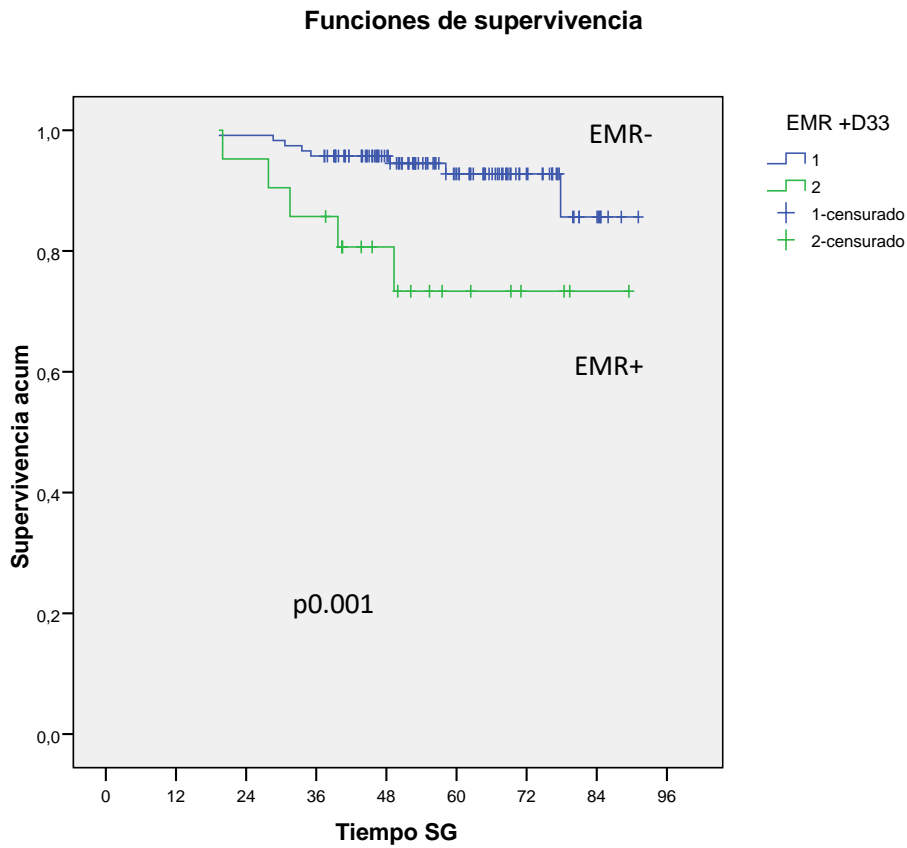
No se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando se asoció EMR al día 33 con sexo (p0.50), fenotipos B común (p 0.41), preB (p0.062) y bifenotípicas (p0.546). Tampoco cuando se asoció con recuento de leucocitos y respuesta al día 8. Se encontró diferencia estadísticamente significativa cuando se asoció EMR al día 33 con edad mayor de 1 año y menor de 9 años (p0.007) y fenotipo T (p 0.005), proB (p0.049).

Se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando se asoció EMR al día 33 con riesgo estándar (p0.027) y alto (p0.000). No fue significativa la

asociación de EMR con riesgo intermedio ($p=0.84$). Se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando se relacionó EMR+ día 33 y pacientes recaídos ($p=0.049$)

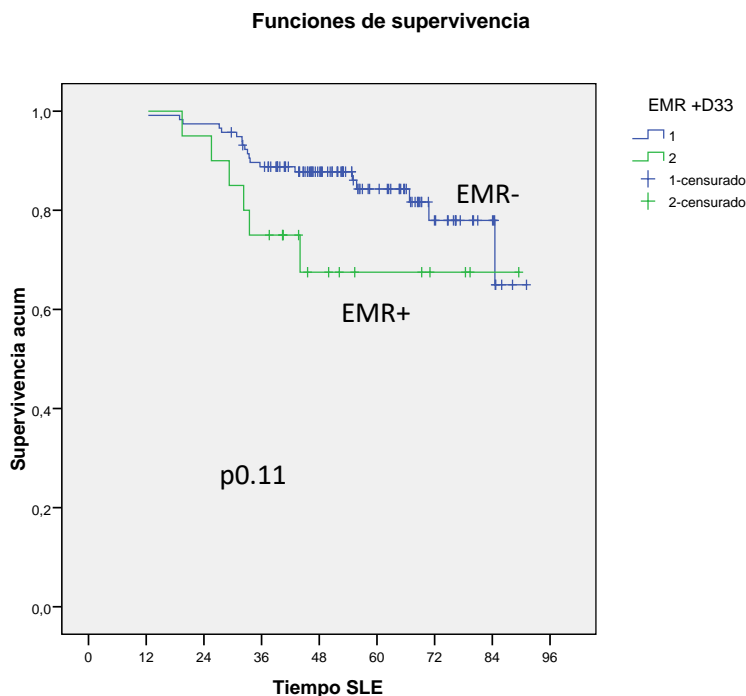
La SG a 36 meses en pacientes con EMR+ al día 33 fue 0,73 y en pacientes con EMR- 0,94 ($p=0.001$).

I



La SLE a 36 meses fue 0.67% en pacientes con EMR + al día 33 y 0.87% en pacientes con EMR- al día 33 ($p=0.11$).

Figura5: SLE er



La EMR al día 15 y 33 demostró ser una variable independiente para predecir recaídas ($p0,029$ y $p0.00$ respectivamente) según el análisis de regresión lineal múltiple y logística

Discusión.

La definición de remisión completa en pacientes con leucemias agudas se realiza por citomorfología y EMR¹³. El conocimiento del inmunofenotipo de células normales es fundamental para poder identificar células patológicas y así establecer los fenotipos asociados a leucemias.

El punto de corte utilizado en LLA para definir EMR positiva es 0.01%. Este valor está asociado al límite de detección de la citometría de

flujo¹⁴⁻¹⁵. El riesgo de recaída es directamente proporcional al nivel de EMR determinada en diferentes puntos del tratamiento. La cuantificación de EMR a las 2 o 3 semanas de iniciado el tratamiento permite intensificar el tratamiento en pacientes con mayor riesgo de recaída¹⁷⁻¹⁸.

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

En concordancia con lo publicado, la EMR positiva al día 15 en el 59.2% de los pacientes se correlacionó con riesgo alto, mayor porcentaje de recaída y menor SLE. La EMR positiva al día 33 en el 15.2% de los pacientes se correlacionó en forma significativa con mayor edad, fenotipo T y proB, riesgo alto y riesgo intermedio, mayor porcentaje de recaída y menor SG.

Numerosos estudios han demostrado que la detección de EMR al final de la inducción y al inicio de la consolidación constituye un factor pronóstico significativo para predecir recaídas. Actualmente se ha demostrado la importancia de evaluar EMR a las dos semanas del inicio del tratamiento de inducción. El grupo BFM evaluó la cinética de reducción de blastos en sangre periférica al día 8 y en médula ósea al día 15, demostrando asociación con persistencia de EMR positiva al día 33 y riesgo de recaída¹⁸.

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

Tabla1: Características hematológicas de la población n: 192.

	n=192 (%)
Inmunofenotipo	
• B común	146 (76)
• PreB	29 (14.8)
• Pro B	5 (2.6)
• T	12 (6.3)
• Bifenotípica	2 (1)
Buena Respuesta al día 8	179 (93.2)
Recuento leucocitos	
• < 20.000/mm ³	131 (68.2)
• 20.000 -100.000	49 (25.5)
• 100.000-300.000	10 (5.2)
• >300.000	2 (1)
Riesgo	
• Estándar	60 (31.3)
• Intermedio	114 (59.4)
• alto	18 (9.4)
Status SNC	
• 1	185 (96.4)
• 2	5 (2.6)
• 3	2 (1)

BIBLIOGRAFÍA

1. Jacquillat C, Weil M, Gemon MF, et al.: Combination therapy in 130 patients with acute lymphoblastic leukemia (protocol 06 LA 66-Paris). *Cancer Res* 1973, 33:3278–3284.
2. Pui CH, Boyett JM, Rivera GK, Hancock ML, Sandlund JT, Ribeiro RC et al. Long-term results of total therapy studies 11, 12 and 13^a for childhood acute lymphoblastic leukemia at St Jude Children's Research Hospital. *Leukemia* 2000; 14: 2286–2294.
3. Schrappe M, Reiter A, Zimmermann M, Harbott J, Ludwig WD, Henze G et al. Long-term results of four consecutive trials in childhood ALL performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 1995. Berlin-Frankfurt-Munster. *Leukemia* 2000; 14: 2205–2222.
4. Riehm H, Reiter A, Schrappe M, Berthold F, Dopfer R, Gerein V et al. [Corticosteroid-dependent reduction of leukocyte count in blood as a prognostic factor in acute lymphoblastic leukemia in childhood (therapy study ALL-BFM 83)]. *Klin Padiatr* 1987; 199:151–160.
5. Szczepanski T, Willemse MJ, Brinkhof B, et al. Comparative analysis of Ig and TCR gene rearrangements at diagnosis and at relapse of childhood precursor-B-ALL provides improved strategies for selection of stable PCR targets for monitoring of minimal residual disease. *Blood*. 2002;99:2315-2323.
6. Campana D, Coustan-Smith E. The use of flow cytometry to detect minimal residual disease in acute leukemia. [Review]. *Eur J Histochem*. 1996;40:39-42.
7. Borowitz MJ, Devidas M, Hunger SP, et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors. a Children's Oncology Group study. *Blood*. 2008.

8. Sandlund JT, Harrison PL, Rivera G, et al. Persistence of lymphoblasts in bone marrow on day 15 and days 22 to 25 of remission induction predicts a dismal treatment outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2002;100:43-47.
9. Panzer-Grumayer ER, Schneider M, Panzer S, Fasching K, Gadner H. Rapid molecular response during early induction chemotherapy predicts a good outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2000;95:790-794.
10. Zhou J, Goldwasser MA, Li A, Dahlberg SE, Neuberg D, Wang H, Dalton V, McBride KD, Sallan SE, Silverman LB, Gribben JG. Quantitative analysis of minimal residual disease predicts relapse in children with B-lineage acute lymphoblastic leukemia in DFCI ALL Consortium Protocol 95-01. *Blood* 2007 Sep 1;110(5):1607-11.
11. Bradstock KF, Janossy G, Tidman N, et al. Immunological monitoring of residual disease in treated thymic acute lymphoblastic leukaemia. *Leuk Res* 1981;5(45):301–309.
12. Ciudad J, San Miguel JF, Lopez-Berges MC, et al. Prognostic value of immunophenotypic detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 1998;16(12):3774–3781.
13. Campana D. Progress of minimal residual disease studies in childhood acute leukemia. *Curr Hematol Malig Rep*. 2010 Jul;5(3):169-76.
14. Coustan-Smith E, Behm FG, Sanchez J, et al.: Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 1998;351:550–554.
15. Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, et al.: Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000, 96:2691–2696.

16. Panzer-Grumayer ER, Schneider M, Panzer S, et al.: Rapid molecular response during early induction chemotherapy predicts a good outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000, 95:790–794.
17. Coustan-Smith E, Ribeiro RC, Stow P, et al.: A simplified flow cytometric assay identifies children with acute lymphoblastic leukemia who have a superior clinical outcome. *Blood* 2006, 108:97–102.
18. Ratei R, Basso G, Dworzak M, Gaipa G, Veltroni M, Rhein P, Biondi A, Schrapppe M, Ludwig WD, Karawajew L. Monitoring treatment response of childhood precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia in the AIEOP-BFM-ALL 2000 protocol with multiparameter flow cytometry: predictive impact of early blast reduction on the remission status after induction. *Leukemia*. 2009 Mar;23(3):528-34.
19. Kaplan L, Meier P. Non-parametric estimation for incomplete observations. *Am Stat Assoc*. 1958;53:457-481.