

Citometría de flujo en la evaluación de enfermedad mínima residual en leucemia linfoblástica aguda

M en C. Rocío Juárez-Velázquez*, ** Dra. Patricia Pérez-Vera *

RESUMEN

La detección de enfermedad mínima residual (EMR) en leucemia linfoblástica aguda (LLA) por citometría de flujo, se basa en la identificación de diferentes perfiles inmunológicos que se expresan diferencialmente en las células leucémicas respecto a las células normales. Este ensayo tiene como finalidad evaluar la respuesta al tratamiento de los pacientes con esta enfermedad, a través de la detección de al menos una célula leucémica por cada 10,000 células normales. La evaluación de EMR ofrece la posibilidad de identificar tempranamente a los pacientes en riesgo de sufrir recaídas, lo que da por resultado un tratamiento adecuado de la leucemia. En esta revisión se presenta un panorama sobre los principios de la citometría de flujo que han permitido su aplicación en el área de la hematología y la oncología, con particular atención en el significado y utilidad de la evaluación de EMR, así como los aspectos que se deben tomar en cuenta para llevarla a cabo con éxito.

Palabras clave: Enfermedad mínima residual, leucemia aguda linfoblástica, citometría de flujo, respuesta al tratamiento, recaída.

ABSTRACT

Detection of minimal residual disease (MRD) by flow cytometry in acute lymphoblastic leukemia is based on the identification of immunological profiles, expressed only in leukemic but not in normal cells. The aim of MRD analysis is to assess the response to treatment by detection of at least one leukemic cell in 10,000 normal cells. MRD evaluation makes it possible to identify patients with high risk of relapse, resulting in an adequate management of leukemia. This review presents an overall picture of flow cytometry features which can be applied in hematology and oncology, focus in the meaning and usefulness of MRD assessment, as well as in those aspects considered for performing it successfully.

Key words: Minimal residual disease, acute lymphoblastic leukemia, flow cytometry, response to treatment, relapse.

CITOMETRÍA DE FLUJO, PRINCIPIOS Y APLICACIONES

La citometría de flujo ha encontrado amplia utilidad en áreas como la oncología, hematología, inmunología y la biología celular. Es una técnica que permite realizar un análisis celular

multiparamétrico de forma rápida, sensible, específica y es capaz de proporcionar información cuantitativa sobre cada célula en particular.¹⁻³ Por estas características, permite identificar en una muestra diferentes subpoblaciones celulares, incluso cuando están escasamente representadas.⁴

Esta tecnología consiste en hacer pasar células en suspensión alineadas y de una en una frente a un haz luminoso. La información obtenida es de dos tipos: la originada por la dispersión de la luz y la que se genera por la emisión de luz de los fluorocromos utilizados para marcar o teñir la célula. Las señales luminosas detectadas se transforman en impulsos eléctricos que se amplifican, y se convierten en señales digitales que son procesadas por una computadora.⁴

La citometría de flujo mide diferentes parámetros de una célula: nucleares, citoplasmáticos, de superficie y extracelulares. Una gran ventaja de esta metodología, es la posibilidad de medir tantos parámetros como anticuerpos hayan marcados con diferentes fluorocromos. Así es posible caracterizar una célula por su fenotipo morfológico o por los antígenos de superficie que presenta, conocer el

* Laboratorio de Cultivo de Tejidos, Departamento de Investigación en Genética Humana. Instituto Nacional de Pediatría.
** Facultad de Medicina, Posgrado en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México.

Correspondencia: Dra. Patricia Pérez-Vera. Instituto Nacional de Pediatría
Insurgentes Sur 3700-C, Colonia Insurgentes Cuicuilco C.P. 04530 México, D.F. MÉXICO. Tel. (55)10840900 ext. 1471, 1484. Tel. celular 044 5531220702 Correo electrónico: pperezvera@yahoo.com
Recibido: enero, 2012. Aceptado: mayo, 2012.

Este artículo debe citarse como: Juárez-Velázquez R, Pérez-Vera P. Citometría de flujo en la evaluación de enfermedad mínima residual en leucemia linfoblástica aguda. Acta Pediatr Mex 2012;33(4):198-206.

estado intracelular que guarda, como su patrón de secreción de citocinas, o bien la etapa del ciclo celular en la que se encuentra.⁴

Las aplicaciones de la citometría de flujo en la investigación básica y clínica son numerosas; se utiliza en la cuantificación de ADN⁵, en la expresión fenotípica, en el transporte de fármacos, en la cuantificación de proliferación, la determinación de apoptosis y en el análisis de cascadas de señalización.⁶ Actualmente la relación entre la aplicación básica y clínica es cada vez más estrecha, dando la oportunidad a su vez a la aplicación diagnóstica, pronóstica y de tratamiento en múltiples enfermedades.⁴

La disponibilidad de reactivos y la conjugación de marcadores fluorescentes con anticuerpos monoclonales o policlonales, han permitido estudiar la densidad y distribución de determinantes y de receptores en la superficie y en el citoplasma celular, e identificar subpoblaciones celulares favoreciendo la aplicación de este método en el diagnóstico, clasificación y valoración de enfermedad residual en pacientes con diversas leucemias agudas y crónicas.^{1,7,8}

ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL

El término enfermedad mínima residual (EMR) se refiere a niveles bajos de enfermedad detectada en diversas situaciones clínicas. En cáncer, este concepto describe a las células anormales que puede haber aún en baja proporción: 1 célula maligna en 10,000 células normales (0.01%), durante o tras finalizar la quimioterapia de inducción a la remisión. Al mismo tiempo el término se utiliza para referirse a un bajo grado de enfermedad potencialmente compatible con la recaída de un paciente que se encuentra en una remisión de largo plazo.⁹ La detección de EMR es de alto valor en el pronóstico de diversas enfermedades hematológicas malignas, como la leucemia linfoblástica aguda (LLA), la leucemia mieloide aguda (LMA) y la leucemia mieloide crónica (LMC).¹⁰⁻¹² En la LLA, diversos estudios han mostrado que la presencia de EMR se correlaciona de manera significativa con la evolución clínica del paciente.^{11,13}

El concepto de EMR describe la enfermedad detectada sólo por tecnologías más sensibles que la citomorfología, tales como la citometría de flujo o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las técnicas de detección de EMR se caracterizan por: a) tener alta especificidad; b) alta

sensibilidad (una célula anormal por cada 10,000 células normales); c) aplicabilidad para la mayoría de los pacientes en estudio; d) factibilidad (estandarización sencilla y obtención rápida de resultados para la aplicación clínica); e) cuantificación precisa de los niveles de enfermedad.¹⁴

La mayoría de estos criterios son cubiertos por tres metodologías: a) la inmunofenotipificación por citometría de flujo multiparamétrica (CFM); b) la detección de transcritos de genes fusionados mediante PCR en tiempo real cuantitativa (PCR-TR) y c) la detección clonal de rearrreglos en los genes de inmunoglobulinas (Ig) o del receptor de células T (TCR) utilizando la PCR en tiempo real cuantitativa.^{15,16} Al comparar las principales características de estas metodologías se encuentra que la sensibilidad de la CFM es de 1×10^{-3} - 10^{-4} , mientras que para la PCR-TR, tanto de genes fusionados como de rearrreglos Ig/TCR, es de 1×10^{-4} - 10^{-6} . La aplicabilidad de la CFM en pacientes con LLA-B y T es superior al 95%; para la PCR-TR de genes fusionados en LLA-B es hasta del 40% y para LLA-T del 15%, dependiendo de la frecuencia de las translocaciones en la población estudiada. La PCR-TR de rearrreglos de Ig/TCR se puede realizar en 90 a 95% de los casos siempre que se cuente con al menos dos blancos de amplificación por paciente. La CFM y la búsqueda de fusiones génicas por PCR-TR son métodos relativamente rápidos y de menor costo respecto al análisis de Ig/TCR por PCR-TR, que requiere un proceso largo, minucioso y costoso ya que se deben localizar dos blancos útiles para hacer la determinación de EMR.¹⁴ El cariotipo con bandas GTG y la hibridación in situ con fluorescencia (FISH) tienen sensibilidad limitada de aproximadamente 1×10^{-2} ; deben utilizarse sólo al momento del diagnóstico para detectar alteraciones cromosómicas o génicas de los linfoblastos, pero no pueden detectar de manera confiable la presencia de células residuales.¹⁵

INMUNOFENOTIPOS ÚTILES EN PACIENTES PEDIÁTRICOS PARA EL ESTUDIO DE EMR POR CITOMETRÍA DE FLUJO

El principio para entender los métodos de detección de EMR, es que el proceso de génesis de la leucemia tiene como resultado cambios moleculares y celulares que permite distinguir las células leucémicas de las normales.¹⁷ Los linfoblastos leucémicos expresan perfiles anormales de marcadores celulares que pueden observarse por ci-

tometría de flujo ¹⁸ y poseen inmunofenotipos diferentes que permiten detectar una célula leucémica entre las células normales con una sensibilidad de 1×10^{-4} . ^{19,20} Los cambios responsables de los inmunofenotipos aberrantes incluyen a los marcadores propios de linaje de diferentes estadios de diferenciación, así como a marcadores de un linaje diferente al del linfoblasto. Actualmente, con la gran variedad de reactivos disponibles, es raro que no se pueda identificar un inmunofenotipo alterado que funcione para detectar una EMR por citometría de flujo, es por ello que esta metodología se puede aplicar en el 95% de los pacientes con LLA de linaje B y T (Cuadro 1).

El análisis basado en citometría de flujo es rápido y permite cuantificar con precisión una EMR; al mismo tiempo proporciona información del estado de las células hematopoyéticas normales. El número de anticuerpos combinados para la identificación de las células leucémicas y la estabilidad de los marcadores, son factores importantes para la confiabilidad de este abordaje. ²¹

Al combinar los diferentes tipos de información que aporta cada célula, como el tamaño y la granularidad celular, más la intensidad de expresión de moléculas de superficie e intracelulares, la citometría de flujo puede

Cuadro 1. Combinación de marcadores utilizados en el St. Jude Children's Research Hospital, Estados Unidos para la vigilancia de EMR en niños con LLA

Subtipo de leucemia	Combinación de marcadores	Frecuencia (%) *
LLA de linaje T	Anti-TdT/CD5/CD3	90-95
	CD34/CD5/CD3	30-50
LLA de linaje B	CD19/CD34/CD10/CD58	40-60
	CD19/CD34/CD10/CD38	30-50
	CD19/CD34/CD10/CD45	30-50
	CD19/CD34/CD10/anti-TdT	30-50
	CD19/CD34/CD10/CD22	20-30
	CD19/CD34/CD10/13	10-13
	CD19/CD34/anti-TdT/anti-IgM	10-20
	CD19/CD34/CD10/CD66c	10-20
	CD19/CD34/CD10/CD33	5-10
	CD19/CD34/CD10/CD65	5-10
	CD19/CD34/CD10/CD15	5-10
	CD19/CD34/CD10/CD21	5-10
	CD19/CD34/CD10/anti-NG2	3-5

* Porcentaje de casos dentro de un subtipo de leucemia en la que la combinación de marcadores indicada, permite realizar estudios de EMR con una sensibilidad de 1×10^{-4} .

identificar el sello fenotípico distintivo de las células leucémicas con respecto a las células normales. Para lograr esto las células se incuban con los anticuerpos monoclonales adecuados, los cuales reconocen los antígenos expresados tanto en las células leucémicas como en las normales, pero su expresión debe ser diferencial, de tal forma que permiten distinguir entre las poblaciones celulares normal y leucémica. En la Figura 1 se ejemplifica la expresión diferencial del antígeno CD38 presente en las células normales y en los blastos de un paciente con LLA de linaje B. Los anticuerpos utilizados para detectar los diversos marcadores empleados en el análisis deben estar conjugados con diferentes fluorocromos, lo cual es imprescindible para la detección multiparamétrica de las células. ²²

La sensibilidad en la detección de EMR es inherente a la metodología de elección. Al utilizar citometría de flujo, se aplican los marcadores existentes (Cuadro 1) sin que se afecte la sensibilidad del método. La elección de los marcadores específicos para cada paciente al momento del diagnóstico, dependerá de que sean característicos y expresen las células leucémicas en cada caso. Existen diferencias en la aplicabilidad de las diferentes combinaciones de marcadores, de tal forma que se pueden utilizar algunas con mayor frecuencia; por ejemplo, el marcador más utilizado en LLA-B pediátrica es el CD19/CD34/CD10/CD58, que se detecta con una frecuencia de 40% a 60% de los casos. En el Cuadro 1 se resume la combinación de los marcadores que identifican los inmunofenotipos

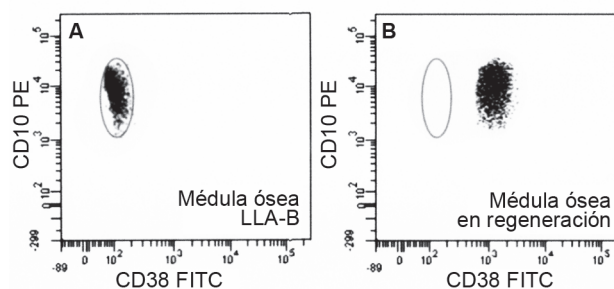


Figura 1. Diferencias inmunofenotípicas entre células de médula ósea leucémicas y células normales. Las gráficas de puntos muestran la expresión de marcadores utilizados para la detección de EMR. En **A** se muestra la expresión típica de CD38 en médula ósea con LLA pre-B y en **B** se muestra la expresión del mismo marcador en la médula ósea de un paciente en regeneración con células normales después de la quimioterapia. Las áreas marcadas por óvalos corresponden a la ubicación de las células leucémicas.

aberrantes más frecuentemente detectados en los pacientes pediátricos con LLA, acorde a la experiencia del hospital pediátrico St. Jude en Estados Unidos, para el estudio de EMR y su aplicabilidad.²³

BASES DEL PROCEDIMIENTO PARA DETERMINAR EMR

Para identificar una EMR se debe contar con una muestra de médula ósea al momento del diagnóstico del paciente; a partir de ésta se determinarán los marcadores útiles para identificar las células leucémicas. Dichos marcadores se utilizarán para vigilar la presencia de las células residuales

a lo largo de la terapia de inducción a remisión o durante la consolidación. Los pasos a seguir para detectar EMR por citometría de flujo se muestran en la Figura 2. En principio se determinan las características de dispersión de luz e inmunofenotipo de diez mil eventos (células). A partir de estos datos se generan dos gráficas; en la primera se seleccionan los puntos que dispersan la luz en forma típica de blastos leucémicos (R1); la segunda se utiliza para seleccionar los puntos (R2) que reflejan la expresión de marcadores celulares particulares (CD19, CD34). A partir de estas gráficas se obtiene un grupo de eventos que cumplen con los criterios de CD19+, CD34+ (R3). El estudio

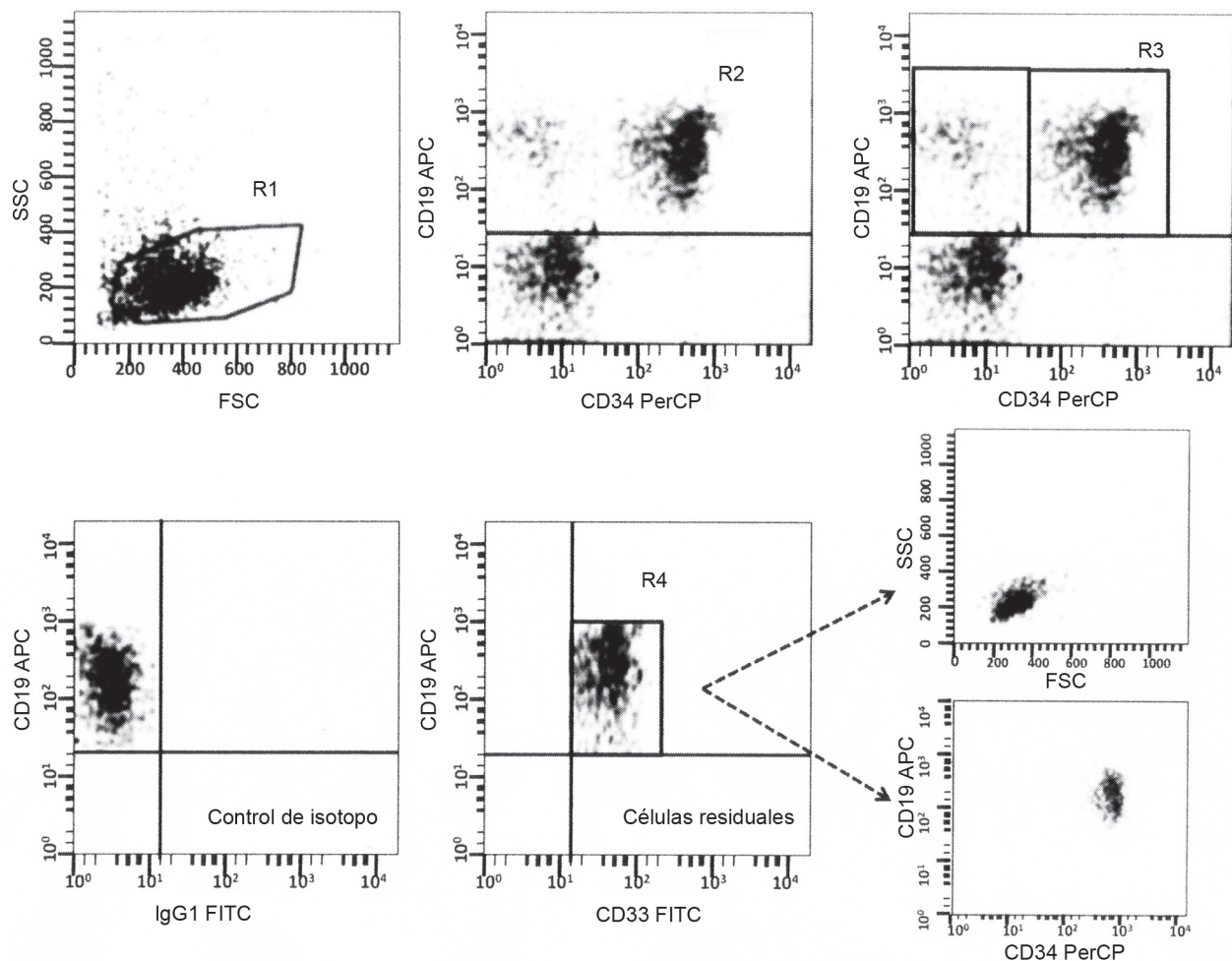


Figura 2. Protocolo para la detección de EMR por citometría de flujo. Las gráficas de puntos ilustran el estudio de una muestra de médula ósea de un paciente con LLA durante remisión clínica. Las células leucémicas expresaban CD19, CD34 y CD33. Las células mononucleadas de médula ósea en remisión fueron marcadas con estos mismos anticuerpos. En un tubo paralelo el CD33 fue remplazado por el control de isotipo IgG para delimitar la expresión positiva de CD33. En este caso las células leucémicas residuales equivalen al 0.14% del total de las células mononucleadas de médula ósea.²¹

de estas células se continúa con el análisis de los fenotipos “asociados a leucemia” como es la expresión de CD33 que no se obtiene en células normales, pero sí en las leucémicas (R4). Estas células deben ser analizadas nuevamente en una gráfica de dispersión de luz para comprobar que se trata de un grupo homogéneo de células. Una vez determinados los marcadores útiles, éstos se vuelven a utilizar en las muestras de médula ósea subsecuentes, tomadas para la evaluación del tratamiento de inducción a la remisión. Si en este momento se encuentran una o más células con el inmunofenotipo leucémico entre 10 mil células (0,01%), se considera una muestra positiva a EMR.²⁰

En la identificación de los marcadores útiles para analizar EMR, se consideran las variaciones en la composición y en el inmunofenotipo de las poblaciones celulares en la médula ósea, las cuales pueden ocurrir debido al avance de la edad o por la exposición a fármacos. Por ejemplo, los progenitores linfoides tempranos pueden ser abundantes en la médula ósea de niños pequeños²⁴⁻²⁶ y de pacientes con neoplasias malignas después de un trasplante de médula ósea o cuando ha concluido la quimioterapia.²⁷⁻²⁹ Estas condiciones conducen a la repoblación de la médula ósea por células normales, que expresan fenotipos que normalmente no se detectan en muestras de individuos sanos. Por lo tanto, para definir con certeza los inmunofenotipos relacionados a la LLA, se realizan análisis minuciosos de médulas óseas sanas o en regeneración, obtenidas bajo diversas condiciones.²²

APLICACIÓN DE OTROS MARCADORES EN LA DETECCIÓN DE EMR

Se han referido otras combinaciones de marcadores inmunológicos útiles para el estudio de EMR en LLA. Lucio P et al. en 2001,³⁰ informaron en 264 pacientes con LLA de células B y con edades de ocho meses hasta 83 años, las siguientes combinaciones y porcentajes de aplicabilidad: a) TdT/CD10/CD19 en 78% de los casos; b) CD10/CD20/CD19 en 64%; c) CD34/CD38/CD19 en 56%; d) CD34/CD22/CD19 en 46% y e) CD19/CD34/CD45 en 22%. En otro estudio Porwit-MacDonald et al. en 2000,³¹ encontraron que en pacientes edades de uno a 52 años y con LLA de células T la combinación más informativa fue TdT/CD7/cyCD3, detectada en 91% de los casos con este subtipo. Recientemente Muzzafar et al. en 2009,³² refirieron la utilidad de la combinación CD10/CD81/

CD34/CD19, aplicable al 75% de pacientes con LLA-B estudiados.

Los marcadores descritos permiten vigilar la presencia de EMR en cualquier fase de la enfermedad. Recientemente se ha diseñado un método simplificado que utiliza sólo los marcadores CD10/CD19/CD34, que se encuentran típicamente en LLA de linaje B y son suficientes para la detección de EMR en médula ósea exclusivamente en el día 19 posterior a la terapia de inducción a remisión. Esto se debe a que en este punto se logra una reducción de células leucémicas por el tratamiento con prednisona, que a la vez elimina a los progenitores linfoides normales de la médula ósea, ya que son altamente sensibles a este agente. Por lo tanto, las células que se detecten y que sean positivas a los marcadores mencionados, sólo podrán ser leucémicas y resistentes al tratamiento. Es importante considerar que el uso de este método está limitado al análisis en el día 19, ya que su aplicación en una etapa posterior lleva inevitablemente a la obtención de resultados falsos positivos, debido a que el grupo de anticuerpos utilizado detectará la presencia de progenitores de células B normales, presentes por efecto de la regeneración medular. Sin embargo, tiene alta aplicabilidad y resulta valioso para determinar tempranamente la respuesta al tratamiento.³³

La necesidad de contar con marcadores inmunológicos útiles para la mayoría de los pacientes con LLA, ha llevado al estudio de moléculas como el WT1 (gene 1 de tumor de Wilms). Mediante el análisis de PCR en tiempo real se ha observado que tanto la baja como la alta expresión de este gen, tienen mal pronóstico para los pacientes.³⁴ La sobreexpresión del RNAm que se observa frecuentemente en la LLA, ha hecho de esta molécula un candidato atractivo para ser marcador de EMR.³⁵ Sin embargo, al analizar los niveles de expresión del transcrito de WT1 respecto a la proteína codificada por citometría de flujo en cinco líneas celulares leucémicas y en 40 muestras provenientes de niños con LLA, se observó que la expresión de la proteína difiere considerablemente con la cantidad de transcrito; adicionalmente se encontró que la expresión de la proteína WT1 es muy baja para ser utilizada en la búsqueda de EMR por citometría de flujo.³⁵

También se han utilizado las proteínas quiméricas producidas por las fusiones génicas *BCR-ABL1*, *ETV6-RUNX1* y *TCF3-PBX1*, así como el antígeno NG2 que se expresa en la superficie de los linfoblastos de las LLA con alteraciones en el gen *MLL*. Estos marcadores ofrecen alta

especificidad de detección de las células leucémicas, pero los anticuerpos utilizados no siempre son adecuados para realizar análisis por citometría de flujo.³⁶

SENSIBILIDAD EN LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE EMR POR CITOMETRÍA DE FLUJO

En condiciones ideales, con células blanco fenotípicamente diferentes y un gran número de células (mayor a 1×10^6) disponibles para el análisis, la sensibilidad de la citometría de flujo es similar a la obtenida mediante PCR. Sin embargo, al buscar EMR en muestras clínicas de niños, el número de células que pueden ser analizadas para cada combinación de marcadores usualmente es menor a 1×10^6 . Debido a que el análisis por citometría de flujo requiere grupos de al menos 10 a 20 puntos para interpretar eventos sospechosos de EMR, la máxima sensibilidad posible en estas circunstancias podría ser de una célula en cien mil. En el caso de la LLA de linaje B, la sensibilidad de detección dependerá del tratamiento usado y del momento en que se toma la muestra, debido a la proporción variable de precursores de células B normales. Por consiguiente, la sensibilidad de una célula en diez mil probablemente es la máxima alcanzada de manera constante durante el examen rutinario de EMR.²²

La citometría de flujo se ha llegado a considerar el método más accesible para la detección de EMR. Una ventaja específica que ofrece sobre los ensayos basados en PCR es que permite la cuantificación directa y precisa de las células leucémicas residuales, en contraste con la extrapolación de las cuantificaciones obtenidas del producto de la PCR.³⁷ Además, la citometría de flujo identifica células muertas y detritos celulares; a la vez evalúa el estado de las células hematopoyéticas normales.

MUESTRAS BIOLÓGICAS ADECUADAS PARA EL ESTUDIO DE EMR

Es importante que la EMR se analice de preferencia en un mismo tejido, ya sea médula ósea o sangre periférica, durante las diferentes etapas de la evolución de cada paciente con el fin de obtener resultados comparables entre sí.⁹ Existe controversia sobre la equivalencia de los resultados al utilizar una muestra proveniente de sangre periférica con una de médula ósea. Algunos estudios muestran que

los niveles de EMR son mucho más altos en médula ósea que en sangre periférica; por ejemplo, al analizar pacientes con LMA por PCR en tiempo real.^{38,39} Se han obtenido resultados similares en trabajos realizados en pacientes con LLA por citometría de flujo; en un estudio se determinó que de 104 muestras de médula ósea de pacientes con LLA de linaje B positivas a EMR, sólo 37 muestras de sangre periférica de los mismos pacientes tuvieron resultados positivos.⁴⁰ En contraste, en un estudio realizado en México donde se analizó EMR en 93 pacientes con leucemia aguda tanto por citometría de flujo como por PCR, no se encontraron diferencias al realizar la estimación en ambos tipos de muestras. También se refiere que a pesar de tener una menor sensibilidad que la PCR, la citometría de flujo fue la mejor opción de evaluación durante el seguimiento de los pacientes, ya que fue posible realizarla en todos los casos estudiados.⁴¹

Cabe mencionar que la mayor parte de los grupos de investigación obtienen reproducibilidad en sus estimaciones de EMR cuando emplean muestras de médula ósea, por lo que se sugiere que se utilice este material siempre que esté disponible.^{19,30-33}

IMPORTANCIA EN EL PRONÓSTICO DE EMR EN LLA

Diversas investigaciones han mostrado la importancia de la EMR en el pronóstico de los niños con LLA.⁴³⁻⁴⁵ La determinación de EMR es una forma de evaluar la respuesta al tratamiento de cada paciente; ésta puede ser evaluada en cualquier momento dentro de las diferentes fases del tratamiento (inducción a remisión, consolidación y mantenimiento) de LLA. En la mayoría de los protocolos actuales la EMR se evalúa, al final del ciclo de inducción a remisión, lo que permite la identificación de pacientes de alto riesgo por tener respuesta pobre al tratamiento.^{40,44} Dependiendo del resultado de EMR en esta fase, se puede modificar la estrategia quimioterapéutica para intentar tener mejores resultados. La probabilidad de recaída del paciente, tiene una relación directa con el incremento en los valores de EMR; los de mayor riesgo son los pacientes con valores de EMR iguales o mayores a una célula residual en 100 (1%), comparados con pacientes con valores menores o iguales a una célula residual en 1,000 (0.1%) al final del tratamiento de inducción.^{40,44} Los estudios prospectivos de la Organización Europea para el Estudio y Tratamiento del Cáncer (EORTC por sus siglas

en inglés), por el hospital pediátrico de St. Jude y por el grupo BFM (Berlin-Frankfurt-Munster), mostraron de forma contundente que la presencia de EMR durante los primeros dos y tres meses del tratamiento es un poderoso indicador de recaída.³⁶ También se refiere que los pacientes que tuvieron EMR con valores de una célula residual en 10,000 (0.01%) o mayores en muestras de médula ósea, en cualquier momento durante el período de tratamiento, tienen un riesgo significativamente mayor de presentar recaída.^{19,40,43} Dentro de este grupo con EMR detectada, los pacientes con valores de EMR de 1 célula leucémica en 100 (1%) o mayores al término del tratamiento de inducción a remisión y que tuvieron valores de una célula residual en 1,000 (0.1%) o mayores durante la terapia de consolidación, mostraron un riesgo extremadamente alto de sufrir una recaída.⁴⁰ Con base en este argumento, el ensayo de EMR es útil para identificar pacientes con diversos subtipos de LLA que tienen alto riesgo de presentar recaída, y en consecuencia también discrimina al grupo de pacientes con pronóstico favorable.^{36,40} La presencia de EMR también se considera un factor de riesgo independiente que predice recaídas subsecuentes en pacientes con LLA que han tenido una primera recaída, aún cuando hayan logrado entrar a una segunda remisión.⁴²

La importancia de la detección de EMR en el pronóstico no sólo se ha demostrado en pacientes pediátricos. En pacientes adultos con LLA y negativos para la fusión génica *BCR-ABL1*, la EMR detectada por citometría de flujo tiene un impacto importante en la respuesta al trasplante de células troncales hematopoyéticas, en particular, la EMR detectada previamente al acondicionamiento para el trasplante ha mostrado ser un indicador de falla del mismo.^{36,46}

CONCLUSIONES

La presencia de EMR en pacientes con LLA es un indicador directo de la respuesta al tratamiento y en consecuencia un factor de predicción de recaída. La EMR puede ser evaluada en etapas muy tempranas, como al final de la terapia de inducción a remisión, o durante etapas posteriores del tratamiento. La información que provee contribuye a la identificación de grupos de pacientes en riesgo de sufrir una recaída, lo cual permite que el médico tratante tome decisiones sobre la terapéutica a seguir. Debido a que la evaluación de EMR identifica células leucémicas que se presentan en muy baja proporción, las metodologías

empleadas para este fin deben tener alta sensibilidad y especificidad de detección, y la posibilidad de ser aplicadas en la mayoría de los pacientes con este padecimiento. La citometría de flujo cumple con estas características además de ser un método relativamente accesible comparado a otras técnicas alternativas.

La investigación exhaustiva sobre las combinaciones de marcadores útiles para esta determinación, así como el diseño y desarrollo de reactivos de alta calidad, han permitido que sea factible encontrar marcadores adecuados para identificar a las células leucémicas prácticamente en todos los pacientes con LLA mediante citometría de flujo. El reto a resolver por los investigadores expertos en EMR, consiste en la identificación de nuevos marcadores que se expresen de forma específica en las células leucémicas y cuya evaluación sea reproducible. Estas características permitirán la simplificación y el mejoramiento de los métodos de vigilancia de EMR, para lograr en un futuro la evaluación de todos los pacientes sin excepción, con los beneficios que esto representa.

Agradecimiento

Se agradece al CONACYT por su apoyo al proyecto SALUD-2006-C01-44402 y la beca 165427 otorgada a R.J-V.

REFERENCIAS

1. Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, Boyett JM, Behem FG, Raimondi SC. Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000;15:2691-6.
2. Ibrahim SF, van den Engh G. Flow cytometry and cell sorting. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2007;106:19-39.
3. Bergquist PL, Hardiman EM, Ferrari BC, Winsley T. Applications of flow cytometry in environmental microbiology and biotechnology. *Extremophiles* 2009;13(3):389-401.
4. Barrera R, Drago S, Perez R, Zamora AC, Arroyo F, Sainz Espuñes T y cols. Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2004;17:42-55.
5. Pérez-Vera P, Frías S, Carnevale C, Betancourt M, Mujica M, Rivera-Luna R y cols. A strategy to detect chromosomal abnormalities in children with acute lymphoblastic leukemia. *J Ped Hem/Oncol* 2004;26:294-300.
6. McCloskey TW, Oyaizu N, Coronese M, Pahwa S. Use of a flow cytometric assay to quantitate apoptosis in human lymphocytes. *Clin Immunol Immunopathol* 1994;7:14-8.
7. van der Velden VH, Szczepanski T, Wijkhuijs JM, Hart PG, Hoogeveen PG, Hop WC y cols. Age-related patterns of

- immunoglobulin and T-Cell receptor gene rearrangements in precursor-B-ALL: implications for detection of minimal residual disease. *Leukemia* 2003;17(9):1834-44.
8. Steinbach D, Schramm A, Eggert A, Onda M, Dawczynski K, Rump A y cols. Identification of a set of seven genes for the monitoring of minimal residual disease in pediatric acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2006;12(8):2434-41.
 9. Paietta E. Assessing minimal residual disease (MRD) in leukemia: a changing definition and concept?. *Bone Marrow Transplant* 2002;29(6):459-65.
 10. Campana D. Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Hematology* 2010;7-12.
 11. Koh DN, Park M, Kim BE, Im HJ, Park CJ, Jang S y cols. Prognostic significance of minimal residual disease detected by a simplified flow cytometric assay during remission induction chemotherapy in children with acute lymphoblastic leukemia. *Korean J Pediatr* 2010;53(11):957-64.
 12. Grimwade D, Vyas P, Freeman S. Assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Curr Opin Oncol* 2010;22(6):656-63.
 13. van der Velden VH, van der Sluijs-Geling A, Gibson BE, te Marvelde JG, Hoogeveen PG, Hop WC y cols. Clinical significance of flow cytometric minimal residual disease detection in pediatric acute myeloid leukemia patients treated according to the DCOG ANLL97/MRC AML12 protocol. *Leukemia* 2010;24(9):1599-606.
 14. Szczepanski T. Why and How to quantify minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia? *Leukemia* 2007;21:622-6.
 15. Campana D. Determination of minimal residual disease in leukemia patients. *Br J Haematol* 2003;121:823-38.
 16. Szczepanski T, van der Velden VH, van Dongen JJ. Flow-cytometric immunophenotyping of normal and malignant lymphocytes. *Clin Chem Lab Med* 2006;44(7):775-96.
 17. Campana D. Status of minimal residual disease testing in childhood hematological malignancies. *Br J Haematol* 2008;143: 481-9.
 18. Rubnitz JE, Onciu M, Pounds S, Shurtleff S, Cao X, Raimondi SC y cols. Acute mixed lineage leukemia in children: the experience of St Jude Children's Research Hospital. *Blood* 2009;113:5083-9.
 19. Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, Razzouk BI, Ribeiro RC, Rivera GK y cols. Use of peripheral blood instead of bone marrow to monitor residual disease in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;100(7):2399-402.
 20. Campana D y Coustan-Smith E. Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. *Cytometry (Communications in clinical Cytometry)* 1999;38:139-52.
 21. Campana D. Molecular determinants of treatment response in acute lymphoblastic leukemia. *Acute lymphoblastic leukemia. Haematol Am Soc Hematol Educ Program* 2008;366-73.
 22. Jólkowska J, Derwich K, Dawidowska M. Methods of minimal residual disease (MRD) detection in childhood hematological malignancies. *J Appl Genet* 2007;48(1):77-83.
 23. Campana D. Minimal Residual Disease studies in acute leukemia. *Am J Clin Pathol* 2004;122(Suppl 1):S47-S57.
 24. Longacre TA, Foucar K, Crago S, Chen IM, Griffith B, Dressler L y cols. Hematogones: a multiparameter analysis of bone marrow precursor cells. *Blood* 1989;73(2):543-52.
 25. Caldwell CW, Patterson WP. Relationship between CD45 antigen expression and putative stages of differentiation in B-cell malignancies. *Am J Hematol* 1991;36(2):111-5.
 26. Lucio P, Parreira A, van den Beemd MW, van Lochem EG, van Wering ER, Baars E y cols. Flow cytometric analysis of normal B cell differentiation: a frame of reference for the detection of minimal residual disease in precursor-B-ALL. *Leukemia* 1999;13(3):419-27.
 27. van Lochem EG, Wiegers YM, van den Beemd R, Hählen K, van Dongen JJ, Hooijkaas H. Regeneration patterns of precursor-B-cells in bone marrow of acute lymphoblastic leukemia patients depends on the type of preceding chemotherapy. *Leukemia* 2000;14(4):688-95.
 28. McKenna RW, Washington LT, Aquino DB, Picker LJ, Kroft SH. Immunophenotypic analysis of hematogones (B-lymphocyte precursors) in 662 consecutive bone marrow specimens by 4 color flow cytometry. *Blood* 2001;98(8):2498-507.
 29. Coustan-Smith E, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Razzouk BI, Pui CH, Pounds S y cols. Clinical significance of residual disease during treatment in childhood acute myeloid leukemia. *Br J Haematol* 2003;123(2):243-52.
 30. Lucio P, Gaipa G, van Lochem EG, van Wering ER, Porwit-MacDonald A, Faria T y cols. BIOMED-I concerted action report: flow cytometric immunophenotyping of precursor B-ALL with standardized triple-stainings. BIOMED-1 Concerted Action Investigation of Minimal Residual Disease in Acute Leukemia: International Standardization and Clinical Evaluation. *Leukemia* 2001;15(8):1185-92.
 31. Porwit-MacDonald A, Björklund E, Lucio P, van Lochem EG, Mazur J, Parreira A y cols. BIOMED-1 concerted action report: flow cytometric characterization of CD7+ cell subsets in normal bone marrow as a basis for the diagnosis and follow-up of T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL). *Leukemia* 2000;14(5):816-25.
 32. Muzzafar T, Medeiros LJ, Wang SA, Brahmandam A, Thomas DA, Jorgensen JL. Aberrant under expression of CD81 in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia: utility in detection of minimal residual disease by flow cytometry. *Am J Clin Pathol* 2009;132(5):692-8.
 33. Coustan-Smith E, Ribeiro RC, Stow P, Zohu Y, Pui CH, Rivera GK y cols. A simplified flow cytometric assay identifies children with acute lymphoblastic leukemia who have a superior clinical outcome. *Blood* 2006;108(1):97-102.
 34. Boublikova L, Kalinova M, Ryan J, Quinn F, O'Marcaigh A, Smith O y cols. Wilms' tumor gene 1 (WT1) expression in childhood acute lymphoblastic leukemia: a wide range of WT1 expression levels, its impact on prognosis and minimal residual disease monitoring. *Leukemia* 2006;20(2):254-63.
 35. Kerst G, Bergold N, Gieseke F, Coustan-Smith E, Lang P y cols. WT1 protein expression in childhood acute leukemia. *Am J Hematol* 2008;83(5):382-6.
 36. Campana D. Role of minimal residual disease monitoring in adult and pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2009;23(5):1083-98.
 37. Neale GA, Coustan-Smith E, Pan Q, Chen X, Gruhn B, Stow P y cols. Tandem application of flow cytometry and polymerase chain reaction for comprehensive detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1999;13(8):1221-6.

38. Tobal K, Newton J, Macheta M, Chang J, Morgenstern G, Evans PA y cols. Molecular quantitation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia with t(8;21) can identify patients in durable remission and predict clinical relapse. *Blood* 2000;95(3):815-9.
39. Tobal K, Moore H, Macheta M, Yin JA. Monitoring minimal residual disease and predicting relapse in APL by quantitating PML-RAR alpha transcripts with a sensitive competitive RT-PCR method. *Leukemia* 2001;15(7):1060-5.
40. Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, Boyett JM, Behm FG, Raimondi SC y cols. Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000;96(8):2691-6.
41. Ruiz-Argüelles G, Fernández-Lara, Estrada-Gomez R, Manzano C, Ruiz-Delgado GJ, Pérez-Romano B y cols. Minimal Residual Disease Testing in Acute Leukemia by Flow Cytometry Immunophenotyping: Prognostic Significance. *Lab Hematol* 2007;13:22-6.
42. Coustan-Smith E, Gajjar A, Hijjiya N, Razzouk BI, Ribeiro RC, Rivera GK y cols. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia after first relapse. *Leukemia* 2004;18(3):499-504.
43. Coustan-Smith E, Behm FG, Sanchez J, Boyett JM, Hancock ML, Raimondi SC y cols. Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukemia. *Lancet* 1998;351:550-4.
44. Dworzak MN, Fröschl G, Printz D, Mann G, Pötschger U, Mühlergger N y cols. Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;99(6):1952-8.
45. Borowitz MJ, Devidas M, Hunger SP, Bowman WP, Carroll AJ, Carroll WL y cols. 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;111(12):5477-85.
46. Sánchez J, Serrano J, Gomez P, Martinez F, Martin C, Madero L y cols. Clinical value of immunological monitoring of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia after allogeneic transplantation. *Br J of Haematol* 2002;116:686-94.