

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**ANÁLISIS DE LA UTILIDAD DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO EN LA  
IDENTIFICACIÓN DE INFILTRACIÓN NEOPLÁSICA DEL LÍQUIDO  
CEFALORRAQUÍDEO EN PACIENTES CON LEUCEMIA AGUDA Y SU  
ASOCIACIÓN CON PARÁMETROS CLÍNICO-BIOLÓGICOS DE IMPORTANCIA  
PRONOSTICA**

**YULIETH XIMENA TORRES LLANOS**

**TRABAJO DE GRADO  
Presentado como requisito parcial  
Para optar al título de Magíster en Ciencias Biológicas**

**DRA. SANDRA QUIJANO GÓMEZ. MSc. PhD  
DIRECTOR**

**Bogotá, D.C. Colombia**

**2016**

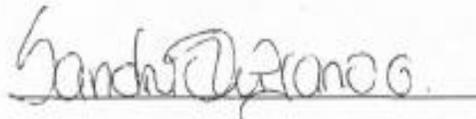
## **NOTA DE ADVERTENCIA**

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

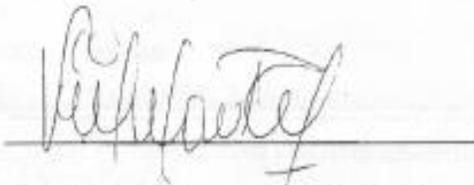
**Artículo 23 de la Resolución No 13 de julio de 1946**

ACEPTACIÓN DEL TRABAJO DE GRADO

DIRECTOR Y JURADOS



SANDRA MILENA QUIJANO GOMEZ. MSc. PhD.  
DIRECTORA



VIVIANA MARCELA RODRIGUEZ PARDO. MSc. PhD.  
DOCENTE DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA  
JURADO



OLGA RAQUEL VILLAMIZAR BELTRAN. PhD.  
DOCENTE DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA  
JURADO



YANETH ROCIO ORDUZ RODRIGUEZ. MD.  
HEMATOPATÓLOGA  
CLÍNICA COLSANITAS S.A

**FIRMAS DE ACEPTACIÓN DEL TRABAJO DE GRADO**

**DECANA DE FACULTAD Y DIRECTORA DE POSGRADO**

---

**ALBA ALICIA TRESPALACIOS RANGEL MSc. PhD.  
DIRECTORA DE POSGRADO**

---

**CONCEPCION JUDITH PUERTA BULA. PhD.  
DECANA FACULTAD DE CIENCIAS**

## **AGRADECIMIENTOS**

Aprovecho este espacio para agradecer en primera instancia a Dios quien me dio la oportunidad de volver a mi *Alma Mater* para continuar mi formación académica. En segundo lugar, quisiera agradecer especialmente a mi tutora de trabajo de grado, Dra Sandra Quijano quien fue mi mentora y guía durante todo el tiempo que transcurrió desde el inicio de mi maestría hasta hoy, le agradezco por confiar en mí y darme la oportunidad de ser una de sus estudiantes, por todo el conocimiento que me ha transmitido y porque me inculco el humanismo y profesionalismo que se debe tener cuando hacemos parte del diagnóstico de un paciente.

Agradezco también a la Dra Claudia Cardozo (Directora de Laboratorio Clínico del Hospital Universitario San Ignacio), porque en primera instancia fue quien me recomendó como estudiante a la Dra Sandra Quijano, y porque siempre fue una ayuda incondicional durante todo este proceso al permitirme asistir a capacitaciones, congresos, clases y reuniones indispensables para la ejecución de este trabajo. Por supuesto también agradezco a mis compañeras de trabajo quienes muy amablemente me colaboraban con mis funciones mientras estaba ausente. De forma especial, quiero agradecer al servicio de Citometría del Hospital Universitario San Ignacio conformado por Alba Campos y Niyireth Peñalosa, gracias a ustedes aprendí lo necesario para llevar a cabo todos los procedimientos descritos en este trabajo, a superar inconvenientes y darles solución.

En cuanto a la ejecución de este trabajo debo agradecer de manera especial a la Dra Iliana de los Reyes y Dra Paula Guzman (Hemato-oncólogas pediatras del Hospital Universitario San Ignacio), quienes siempre estuvieron dispuestas a colaborar identificando pacientes candidatos para este trabajo, al direccionamiento de las muestras a los servicios de citometría y patología del HUSI, a la reunión de información clínica necesaria para construir las tablas de variables clínicas asociadas a infiltración e SNC y porque siempre manifestaron su apoyo en la construcción del conocimiento.

También agradezco al grupo de patología de la Fundación Santa Fe de Bogotá: Dr. Carlos Saavedra, Dra. Martha Romero, Bacteriólogas Gina Cuéllar y Liliana Martín. Gracias por la colaboración brindada en la recolección de casos clínicos que cumplieran los criterios de inclusión, porque me ayudaron recolectando datos clínicos de cada paciente para construir las tablas de variables clínicas asociadas a infiltración e SNC.

Finalmente, pero no menos importante, a todos los integrantes del Grupo de Inmunobiología y biología celular PUJ, quienes hacen parte indiscutible de mi formación académica, ya que a partir de sus observaciones, críticas y opiniones pude construir una pieza más dentro de este mar de conocimiento.

## **TABLA DE CONTENIDO**

<b>1. RESUMEN</b> .....	1
<b>2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN</b> .....	3
<b>3. MARCO TEÓRICO</b> .....	6
<b>3.1 Leucemias Agudas</b> .....	6
<b>3.1.1 Definición</b> .....	6
<b>3.1.2 Incidencia de las LA</b> .....	7
<b>3.1.3 Clasificación y diagnóstico de las LA</b> .....	7
<b>3.1.4 Presentación clínica</b> .....	12
<b>3.2 Infiltración extramedular a SNC</b> .....	13
<b>3.2.1 Factores de riesgo asociados a infiltración en SNC</b> .....	15
<b>3.2.2 Clasificación del riesgo de infiltración en SNC en LLA</b> .....	16
<b>3.2.3 Mecanismos biológicos de infiltración a SNC en LA</b> .....	17
<b>3.3 Técnicas diagnósticas para detectar infiltración tumoral en SNC</b> .....	20
<b>3.3.1 Citología convencional</b> .....	22
<b>3.3.2 Citometría de flujo (CMF)</b> .....	24
<b>3.3.3 Biología molecular</b> .....	27
<b>3.4 Estudios que han evaluado la utilidad de la CMF vs. CC en la detección de infiltración tumoral en SNC</b> .....	28
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	33
<b>4.1 Objetivo general</b> .....	33
<b>4.2 Objetivos específicos</b> .....	33
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	34
<b>5.1 Diseño del estudio</b> .....	34
<b>5.2 Población y muestra</b> .....	34
<b>5.3 Criterios de inclusión</b> .....	35
<b>5.4 Criterios de exclusión</b> .....	35
<b>5.5 Descriptores de la población en estudio:</b> .....	36
<b>5.6 Obtención de la muestra de LCR para análisis de infiltración en SNC</b> .....	36
<b>5.7 Análisis inmunofenotípico en médula ósea (MO)</b> .....	37

5.7.1	Protocolo inicial para la preparación de la muestra de médula ósea ....	37
5.7.2	Protocolo de marcaje simultaneo de antígenos de membrana y citoplasma (Screening leucemia aguda).....	38
5.8	Protocolo de marcaje de muestras de LCR para detección de infiltración en SNC de pacientes con LA .....	42
5.9	Recolección de datos clínicos.....	45
5.10	Análisis estadístico.....	46
6.	RESULTADOS .....	47
6.1	Descripción de los hallazgos de CMF y CC en las muestras de LCR.....	47
6.2	Descripción de los hallazgos de CMF y CC en el total de pacientes con LA.....	52
6.3	Cálculo de la concordancia global entre la CMF y la CC.....	53
6.4	Análisis de otras poblaciones celulares en muestras de LCR por CMF en pacientes con LA.....	55
6.5	Asociación de los hallazgos de CMF con variables clínico-biológicas de impacto pronóstico en LA.....	58
6.6	Supervivencia total y enfermedad libre de eventos en pacientes con LA según su resultado de CMF.....	63
6.6.1	Análisis de enfermedad libre de eventos a 5 años de pacientes con LA y resultado de CMF .....	63
6.6.2	Análisis de supervivencia total en pacientes con LA y resultado de CMF .....	64
7.	DISCUSIÓN.....	66
8.	CONCLUSIONES.....	79
9.	PERSPECTIVAS Y APLICACIONES .....	81
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	82

## **TABLAS**

<b>Tabla 1. Panel de anticuerpos de superficie y de membrana con sus respectivos volúmenes empleados para screening básico de LA en muestras de médula ósea de pacientes de nuevo diagnóstico. ....</b>	<b>40</b>
<b>Tabla 2. Panel de anticuerpos del tubo ALOT de Euroflow para screening de LA. ....</b>	<b>40</b>
<b>Tabla 3. Panel de anticuerpos utilizados para la ampliación de LMA.....</b>	<b>41</b>
<b>Tabla 4. Panel de anticuerpos utilizados para la ampliación de LLA-T.....</b>	<b>41</b>
<b>Tabla 5 Panel de anticuerpos utilizados para la ampliación de LLA-B.....</b>	<b>42</b>
<b>Tabla 6. Panel de anticuerpos utilizados diagnóstico de infiltración en LCR para LLA-T .....</b>	<b>43</b>
<b>Tabla 7 Panel de anticuerpos utilizados diagnóstico de infiltración en LCR para LLA-B.....</b>	<b>43</b>
<b>Tabla 8 Panel de anticuerpos utilizados diagnóstico de infiltración en LCR para LMA.....</b>	<b>44</b>
<b>Tabla 9. Detección de infiltración en SNC en pacientes con LA (n = 130). Resultados de CMF vs CC.....</b>	<b>49</b>
<b>Tabla 10. Identificación del número de pacientes positivos para infiltración en SNC por CMF teniendo en cuenta la clasificación inmunofenotípica y el momento clínico en que se evaluó. ....</b>	<b>52</b>
<b>Tabla 11. Análisis de poblaciones celulares presentes en muestras de LCR pacientes con LLA-B con y sin infiltración en SNC. ....</b>	<b>56</b>

<b>Tabla 12. Análisis de poblaciones celulares presentes en pacientes con LLA-T con y sin infiltración en SNC.....</b>	<b>57</b>
<b>Tabla 13. Análisis de poblaciones celulares presentes en pacientes con LMA con y sin infiltración en SNC.....</b>	<b>57</b>
<b>Tabla 14. Análisis de variables de impacto pronóstico de pacientes con LLA-B agrupados según la presencia o no de infiltración en SNC.....</b>	<b>59</b>
<b>Tabla 15. Análisis de variables de impacto pronóstico de pacientes con LLA-T agrupados según la presencia de infiltración en SNC .....</b>	<b>61</b>
<b>Tabla 16. Análisis de variables de impacto pronóstico de pacientes con LMA agrupados según la presencia de infiltración en SNC.....</b>	<b>62</b>
<b>Tabla 17 Hallazgos relevantes de publicaciones que comparan la CC vs la CMF .....</b>	<b>68</b>

## **FIGURAS**

- Figura 1. Porcentaje de muestras de LCR obtenidas al momento del diagnóstico y durante el seguimiento clínico de la enfermedad en pacientes pediátricos con LA. .... 47**
- Figura 2. Muestras de LCR de pacientes con LA clasificados según el diagnóstico ..... 48**
- Figura 3. Número de muestras de LCR de pacientes con LA con infiltración en SNC según su diagnóstico..... 48**
- Figura 4. Representación del análisis de una muestra de LCR de un paciente con diagnóstico de LLA-B, en el que se detectaron blastos (92,4% que equivalen en números absolutos a 638 células/  $\mu$ l y representadas de color rojo). Los blastos son CD19+, CD10+ y tienen expresión parcial de CD34. En esta muestra también se observaron monocitos (color verde) y linfocitos T (color azul). En color violeta se representa la población de esferas fluorescentes adicionadas a la muestra para realizar los cálculos absolutos. Este caso fue reportado como sospechoso de infiltración por CC..... 50**
- Figura 5. Representación del análisis de una muestra de LCR de un paciente con diagnóstico de LLA-B, en el que se detectaron blastos (48% que equivalen en números absolutos a 63 células/ $\mu$ l y representadas de color rojo). Los blastos son CD19+, CD10+ y CD34+. En esta muestra también se observaron monocitos (color verde). En color violeta se representa la**

población de esferas fluorescentes adicionadas a la muestra para realizar los cálculos absolutos. Este caso fue reportado como negativo por CC. ....	51
Figura 6. Grafica de Kaplan-Meier para enfermedad libre de eventos en pacientes con LA en función su resultado de CMF. ....	64
Figura 7. Grafica de Kaplan-Meier para supervivencia total en pacientes con LA en función su resultado de CMF. ....	65

## 1. **RESUMEN**

La infiltración al sistema nervioso central (SNC) constituye una complicación clínica de leucemias agudas (LA), asociada a mal pronóstico y a mayor agresividad tumoral. En la actualidad, el diagnóstico temprano de meningitis neoplásica contribuye a realizar una mejor clasificación y seguimiento de los pacientes con riesgo de recaída en SNC. Teniendo en cuenta lo anterior, en los últimos años grupos expertos en citometría de flujo (CMF) han demostrado la utilidad de esta técnica principalmente en la identificación y cuantificación de células de linfoma en SNC en comparación con la técnica “*gold standard*” que es la citología convencional (CC).

La Asociación Colombiana de Hemato-oncología Pediátrica (ACHOP) en la Guía para la atención integral de niños con LA [1], identificó la necesidad de implementar la CMF para la evaluación del compromiso en SNC de las LA, pero para esto era necesario realizar un estudio que demostrara su utilidad en nuestros pacientes. Teniendo en cuenta lo anterior el objetivo del presente trabajo fue evaluar la presencia de infiltración neoplásica en muestras de LCR de pacientes con diagnóstico de LA mediante CMF comparada con la CC y su relación con diferentes parámetros clínico-biológicos. Se analizaron en total 123 muestras de LCR de 51 pacientes pediátricos con LA del Hospital Universitario San Ignacio y la Fundación Santa Fe de Bogotá. Estas muestras fueron analizadas de forma simultánea por CMF y CC en estas instituciones.

De las 123 muestras estudiadas, 21 (17%) mostraron infiltración tumoral mediante CMF, mientras que la CC solo fue positiva en 2 muestras (1.6%) y sugerente de infiltración en otros 2 casos (1.5%). La concordancia entre las 2 técnicas fue muy pobre obteniendo un índice Kappa menor a 0.2. Desde el punto de vista clínico biológico, la presencia de infiltración de LCR por CMF se asoció de forma significativa en leucemias agudas B con recuentos superiores de leucocitos y trombocitopenia en sangre periférica, mayor porcentaje de casos con infiltración extramedular, menor respuesta a la quimioterapia de inducción y a la terapia con esteroides y menor supervivencia total de los pacientes. Por otra parte, en las leucemias agudas T se asoció con menor respuesta al día 8 de tratamiento con esteroides y en las leucemias mieloides agudas en general con mayor carga tumoral en médula ósea y sangre periférica.

En conclusión, en este trabajo demostramos la sensibilidad superior de la CMF en la detección de infiltración de SNC en pacientes pediátricos con LA y su asociación con variables de valor pronóstico; por lo que es altamente recomendable incluir esta herramienta en el estudio de rutina de las muestras de LCR de pacientes pediátricos con LA en el momento del diagnóstico y en el seguimiento clínico de la enfermedad.

## 2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

La infiltración tumoral del sistema nervioso central (SNC) es una complicación clínica asociada a mal pronóstico en diferentes tipos de cáncer incluyendo las leucemias agudas (LA) y los linfomas. En la rutina clínica el diagnóstico de infiltración en SNC se realiza mediante citología convencional (CC) que es la técnica *Gold Estándar*). A pesar de tener una alta especificidad, la CC tiene una baja sensibilidad para la identificación de las células tumorales en muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) [2, 3]. Algunos estudios indican un rango promedio de detección de muestras positivas para infiltración tumoral entre 20 – 60 %, aunque esta detección se logra principalmente en muestras con un elevado porcentaje de células tumorales y en algunos casos llegando a ser negativa aun cuando el paciente tiene sintomatología de infiltración a SNC [4]. El análisis del LCR es un proceso minucioso de observación detallada por parte de profesional, sin embargo es importante tener en cuenta que estas muestras se caracterizan por ser generalmente paucicelulares y de baja viabilidad celular, por lo que se recomienda que estas muestras sean procesadas en periodos cortos de tiempo (menos de 1 hora) después de haberse obtenido, estas dos condiciones limitan en gran manera la técnica *Gold Estándar* y son parte de las razones por las cuales la técnica no alcanza la sensibilidad necesaria para el diagnóstico adecuado [5]. Con el fin de superar estos inconvenientes, se ha propuesto la aplicación en la rutina clínica de otras técnicas que tengan mayor sensibilidad y que por lo tanto sean capaces de detectar pequeñas cantidades de células tumorales en el LCR. Dentro

de estas técnicas, la citometría de flujo (CMF) puede identificar con alta precisión poblaciones celulares mínimas según su tamaño, complejidad e inmunofenotipo, estas características le confieren alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de infiltración en SNC, dejándole una clara ventaja sobre la CC [6]. Adicionalmente, se recomienda desde la fase pre-analítica en CMF la implementación de estabilizantes celulares que mejoren la calidad de estas muestras, empleándose en la actualidad el estabilizante Transfix™ (Cytomark) validado en clínica por grupos expertos en CMF [7].

En Colombia, la Asociación Colombiana de Hemato-Oncología Pediátrica (ACHOP) y la Guía de Práctica Clínica para la detección oportuna, diagnóstico y seguimiento leucemia linfocítica aguda y leucemia mieloide aguda en niños, niñas y adolescentes del 2013 [1], plasmaron la necesidad e importancia de llevar a cabo proyectos de investigación clínica que tengan como objetivo la implementación de mejores estrategias diagnósticas que cuenten con alta sensibilidad y especificidad para identificar de manera temprana poblaciones tumorales presentes en SNC, con el fin de realizar una clasificación del riesgo de la enfermedad de acuerdo a los hallazgos de la CMF y así permitir definir los mejores esquemas terapéuticos para mejorar la supervivencia y enfermedad libre de eventos de estos pacientes. Es importante demostrar la sensibilidad superior de la CMF en comparación con la CC para su recomendación obligatoria en los pacientes.

A la fecha en Colombia no existen estudios que analicen de forma sistemática y con metodologías adecuadas, bajo condiciones controladas de calidad en las fases pre-analítica y analítica, las muestras de LCR de pacientes pediátricos con

LA que contraste las tasas de infiltración en SNC, la utilidad y sensibilidad de la citometría de flujo en comparación con la citología convencional, ni se ha analizado la relación existente entre la presencia o ausencia de infiltración leptomeníngea ni la cantidad de células tumorales en LCR significativas para realizar una asociación con parámetros clínico-biológicos con valor pronóstico que permitan establecer grupos de riesgo. A nivel mundial, los estudios en LA que analicen estos parámetros son escasos y no incluyen muestras de LCR estabilizadas para garantizar su calidad.

Este análisis nos permitirá mejorar las estrategias diagnósticas en estas neoplasias, así como la identificación de factores pronósticos, que en un futuro permitan generar una mejor clasificación, diagnóstico y manejo terapéutico de estos pacientes y además incluir la CMF en futuros consensos nacionales e internacionales y en la Guía nacional para la atención integral de niños, niñas y adolescentes con LA para la clasificación y seguimiento de infiltración en SNC.

### **3. MARCO TEÓRICO**

#### **3.1 Leucemias Agudas**

##### **3.1.1 Definición**

Las leucemias agudas (LA) son un grupo de enfermedades hematológicas cuyo origen reside en la médula ósea, aunque su etiología es multifactorial son las alteraciones genéticas en la célula madre hematopoyética y las modificaciones en el microambiente lo que puede desencadenar la enfermedad, estos cambios pueden afectar genes que controlan la maduración y diferenciación de la célula madre hematopoyética hacia diferentes líneas celulares. Aproximadamente menos del 5% de los casos se pueden presentar debido a susceptibilidad genética como se ha reportado en pacientes con Síndrome de Down, Síndrome de Bloom, Ataxia Telangiectasia, entre otras patologías. Otros factores que han sido estudiados al ser relacionados con el incremento del riesgo de padecer la enfermedad son: la exposición a radiación ionizante, fármacos quimioterapéuticos e inmunosupresores, agentes infecciosos, pesticidas y solventes, consumo de tabaco y alcohol durante el embarazo [8, 9].

En la médula ósea los blastos leucémicos proliferan descontroladamente representando así más del 20% de celularidad total para posteriormente migrar a la sangre periférica en donde comúnmente alcanzan órganos como nódulos linfoides, hígado, bazo y en menor frecuencia sistema nervioso central, testículos, tejido orbital, entre otros [8].

### **3.1.2 Incidencia de las LA**

Las LA son el tipo de cáncer más común en niños, de forma particular se presentan con mayor frecuencia en el sexo masculino con un pico de aparición que oscila entre los 2-5 años. La incidencia mundial de la LA corresponde al 30% de todas las neoplasias malignas y dentro de este porcentaje resulta ser el fenotipo linfoide el más frecuente aproximadamente con un 75% de presentación. En pacientes pediátricos dentro del fenotipo linfoide cerca del 80% corresponden a LLA-B mientras que las LLA-T se presentan entre un 10-15%. Colombia y Ecuador son los países latinoamericanos con mayor incidencia de la enfermedad, según las tasas ajustadas por edad para nuestro país se presentan 5.6 – 6 casos por cada 100.000 menores de 15 años en niñas y niños, respectivamente.

El pronóstico de estas enfermedades ha cambiado drásticamente desde la implementación de nuevos esquemas terapéuticos y la aplicación de quimioterapia intratecal, logrando una tasa libre de eventos superior al 80% en países desarrollados, mientras que en países en vía de desarrollo esta tasa varía considerablemente alcanzando únicamente entre el 40-50% [1, 10-13] .

### **3.1.3 Clasificación y diagnóstico de las LA**

Dentro de los criterios diagnósticos descritos por la clasificación actual de la Organización Mundial para la Salud (OMS) se incluye el análisis morfológico (mielograma) en aspirado y biopsia de MO, el análisis inmunofenotípico por citometría de flujo en MO y análisis por inmunohistoquímica en tejidos infiltrados por el tumor y el análisis genético por técnicas de cariotipo convencional y técnicas

moleculares (FISH, RT-PCR y qPCR) para la identificación de alteraciones genéticas recurrentes asociadas a pronóstico presentes en las células neoplásicas [14, 15]. Los signos y síntomas de estas patologías son similares entre sí, sin embargo cada grupo presenta alteraciones genéticas, tratamientos y pronósticos diferentes.

El estudio del inmunofenotipo es un componente esencial para el diagnóstico y clasificación de las LA. De acuerdo al inmunofenotipo las LA se dividen en tres grupos principales, las leucemias linfoides agudas de precursores B (LLA-B), leucemias linfoides agudas de precursores T (LLA-T) y las leucemias mieloides agudas (LMA) [9, 14, 16]. La OMS en 2008 definió un grupo adicional conocido como Leucemias Agudas de Linaje Ambiguo o mixtas, que pueden ser bilineales o bifenotípicas. La leucemia bifenotípica aguda se define como una leucemia en la que la población de blastos expresa simultáneamente marcadores de linaje mieloide y linfoide (T o B). Este tipo de leucemia es raro, con una incidencia aproximada de 5%, y es más frecuente en el sexo masculino y en adultos [17].

Desde el punto de vista fenotípico, la LLA-B se subclasifica en cuatro subgrupos:

- 1) LLA BI o pro B con expresión de CD19 y/o CD22 y/o CyCD79a, en ausencia de CD10, cylgμ o slg;
- 2) LLA BII o B común, caracterizada por la expresión de CD10 asociada a los marcadores pan-B CD19, CD22 y CyCD79a, en ausencia de cylgμ y slg;
- 3) LLA BIII o pre B, en la que es característica la expresión de cylgμ en ausencia de slg y positividad variable para CD10, TdT y CD20 y;
- 4) LLA BIV o madura, en la que los linfoblastos coexpresan, junto a marcadores pan-B, slg con frecuencia asociada a una elevada reactividad para CD20 y CD22, en ausencia de

TdT y CD34. Así mismo, en una frecuencia importante de casos (>50%) se han descrito diferentes patrones inmunofenotípicos aberrantes en LLA como consecuencia de las anomalías genéticas presentes en las células tumorales que incluyen asincronismos madurativos (CD34+/CD20+), infidelidad de línea (positividad para antígenos mieloides como CD13, CD33, CD15, CD65, CD11b) y sobre-expresión e infra-expresión antigénica. La detección de estas aberraciones fenotípicas es de gran relevancia para el seguimiento de los pacientes en estudios de enfermedad mínima residual [18-20].

Las LLA-T se subclasifican en 4 subgrupos principales de acuerdo a los diferentes estadios de maduración de la célula T en el timo, estos incluyen la LLA-T Pro-T (cyCD3+, CD7+, CD34+), LLA-T Pre-T (CD2+, cyCD3+, CD5-/+ , CD7+, CD34-/+), LLA-T cortical (CD1a+, CD2+, cyCD3+, SCD3+, CD4-/+ , CD5-/+ , CD7+ y CD8-/+ ) y LLA-T medular (CD2+, cyCD3+, SCD3+, CD4+ ó CD8+, CD5+, CD7+) [8].

Las LMA se dividen en 8 subgrupos principales según la clasificación FAB (Franco-anglo-americana) que se fundamenta en las características morfológicas y citoquímicas de los blastos, desde la M0 a la M7: M0: LMA sin diferenciación; M1: LMA sin maduración; M2: LMA con maduración; M3: LMA promielocítica; M4: LMA mielomonocítica (incluye la variante M4eo: LMA mielomonocítica con eosinofilia en M0); M5: LMA monocítica (incluye los tipos M5a: monoblástica Aguda y M5b: monocítica aguda); M6: Eritroleucemia y M7: Megacariocítica. En la actualidad la clasificación de la OMS 2008 proporciona mayor información desde el punto de vista del inmunofenotipo y la genética y por lo tanto en el pronóstico [14, 15]. Esta clasificación incluye las LMA con anomalías genéticas recurrentes como la

presencia de la t(8;21) en LMA mielomonocítica; la t(16;16) o inv(16) observada en pacientes con LMA-M4eo y la t(15;17) en las LMA promielocíticas [14, 21]; entre otras. Adicionalmente, incluye las LMA asociadas a displasia multilineaje, LMA asociadas a tratamiento con agentes alquilantes, inhibidores de topoisomerasa II o radiación y LMA no categorizadas [21].

El diagnóstico de las LA de linaje ambiguo requiere un extenso análisis por CMF multiparamétrica. Dentro de esta clasificación se distinguen 3 subgrupos, uno de ellos es la Leucemia Aguda Indiferenciada, en la mayoría de casos se presenta por la expresión únicamente de CD34 y/o HLA-DR. El segundo subgrupo es la Leucemia Aguda Bifenotípica o Leucemia Aguda de fenotipo mixto, en dicho grupo los blastos leucémicos son morfológicamente indistinguibles; sin embargo, ellos expresan antígenos de diferentes linajes. La identificación inmunofenotípica de este subgrupo se hace utilizando al menos 26 anticuerpos tanto de los linajes linfoides como mieloides, teniendo como referencia la expresión fuerte de 2 marcadores citoplasmáticos claves como lo son: la MPO (linaje mieloides) y el cyCD3 (linaje linfoides T) y un marcador de superficie como lo es el CD19 asociado a otro marcador como cyCD79a, cyCD22 o CD10 (linaje linfoides B). En este sentido, se pueden observar varias combinaciones incluyendo linaje B/mieloides, T/mieloides, B/T y en raros casos B/T/mieloides [22].

En relación a las alteraciones genéticas la OMS, incluye diferentes subgrupos diagnósticos con distintas características biológicas y de agresividad tumoral, que son importantes para la clasificación de los pacientes por grupos de riesgo. En general se ha descrito que el 60-80% de los casos pediátricos de LA tienen

alteraciones genéticas numéricas y/o estructurales que pueden ser identificadas por técnicas convencionales como cariotipo, técnicas moleculares (RT-PCT, FISH) y por citometría de flujo [14, 15].

En las LLA-B pediátricas se consideran alteraciones genéticas asociadas a buen pronóstico la presencia de cariotipos hiperdiploides con 51-65 cromosomas (detectados en 27-29% de los casos) y la t(12;21) (p13;q22) con TEL-AML1 (presente en el 22-25% de los pacientes). Por el contrario, la hipodiploidía de menos de 30 cromosomas (5-6% de los casos) y las traslocaciones t(9;22) (q34;q11) con BCR-ABL (reportada en 2-3% de los casos), t(1;19) (q23;p13) con E2A-PBX1 (reportada en 3-6% de los casos) y t(4;11)(q21;q23) con MLL-4F4 (descrita en 2-3% de los casos), junto a otros reordenamientos a nivel de 11q23, se asocian a LLA de alto riesgo. Otras alteraciones como la del(6q), del(9p), del(12p), la hiperdiploidía de <51 cromosomas, triploidías y tetraploidías, junto a un cariotipo diploide, se consideran de pronóstico intermedio [8, 20].

En las LLA-T pediátricas, aproximadamente el 40% de los casos tienen traslocaciones cromosómicas que afectan el *TCR*; sin embargo el potencial oncogénico y el significado pronóstico depende del perfil de oncogenes que se sobre-expresen asociados a estas traslocaciones. Dentro de las anormalidades asociadas a mejor pronóstico se encuentran la sobre-expresión de *TLX1* causada por la t(10;14) (q24;q11) (presente en el 40-50% de los casos) y la del (1)(p32) con fusión de *SIL-TAL1* (20-30% de los casos); mientras que se asocian a peor pronóstico la t(10;11) (p12;q14) con *PICALM-MLLT10* (10% de los casos) y alteraciones en *TLX13* originada por la t(5;14) (q35;q32). Cerca del 50%-60% de

los casos de LLA-T tienen mutaciones activantes en NOTCH1 y delección en CDKN2A pero su papel en el pronóstico sigue siendo de controversia [23].

En las LMA, las alteraciones genéticas asociadas a pronóstico favorable incluyen la t(8;21) (q22;q22) con RUNX1- RUNX1T1, t(16;16) (p13;q22) o inv(16) (p13;q22) con CBFM-MYH11, t(15;17) (q22;q21) con PML-RARA, mutaciones en *NPM1* y *CEBPA* en ausencia de mutaciones en *FLT3* y dentro de las alteraciones relacionadas con pronóstico desfavorable se encuentran mutaciones en *FLT3*, monosomía del cromosoma 7 y del cromosoma 2 y cariotipos complejos detectados en LMA asociadas a tratamiento [21, 23].

En las Leucemias agudas de linaje mixto se pueden presentar anomalías genéticas que permiten realizar una clasificación entre ellas y son la presencia de la t(9;22)/BCRABL1, la t(v;11q23)/MLL o sin otras especificaciones [22].

#### **3.1.4 Presentación clínica**

Los signos y síntomas asociados a LA están directamente correlacionados con la carga de células leucémicas presentes en la médula ósea, la proliferación descontrolada de estas células afecta la hematopoyesis normal alterando la producción de las otras líneas celulares, generando consigo diferentes grados de citopenias o pancitopenia. Con base en lo anterior y de forma frecuente, el paciente manifestara síntomas asociados a anemia como fatiga, disnea y adinamia, fiebre e infecciones recurrentes debido a la neutropenia, sangrados esporádicos, hematomas, equimosis o petequias debido a la trombocitopenia. Adicionalmente, algunos pacientes con LLA-T pueden llegar a presentar masa

mediastinal o síndrome de vena cava superior. Además de estos síntomas es frecuente encontrar hepatomegalia, esplenomegalia y linfadenopatías. Los hallazgos comúnmente encontrados a nivel de laboratorio corresponden a alteraciones en el cuadro hemático en donde se pueden encontrar los siguientes parámetros: hemoglobina <10 g/dL, trombocitopenia (<100.000 plaquetas/ul) y neutropenia (<1500 células/ul). Adicional a estas alteraciones, se puede observar aumento en los niveles de lactatodeshidrogenasa (LDH), ácido úrico, potasio y fosforo. En la exploración física, aproximadamente en el 50% de los pacientes se detectan linfadenopadenopatías, hepatomegalia y/o esplenomegalia [10, 24, 25]

Al momento del diagnóstico los pacientes pueden tener infiltrados otros sitios extramedulares como el testículo, tejido orbital, piel y aproximadamente entre el 5-15% presentan compromiso del sistema nervioso central (SNC) [16, 26]. La infiltración extramedular confiere peor pronóstico en el paciente.

### **3.2 Infiltración extramedular a SNC**

La infiltración a SNC constituye una complicación asociada a mal pronóstico en pacientes con LA y Linfomas No-Hodgkin's agresivos, puede presentarse al momento del diagnóstico o durante el seguimiento de los pacientes. Este espacio anatómico ha considerado como un nicho protector o santuario para las células tumorales [27].

En los últimos 50 años se han hecho grandes esfuerzos por mejorar las tasas de supervivencia libre de eventos en niños con LA, con la implementación de protocolos que incluyen diversos agentes quimioterapéuticos a nivel sistémico

suministrados a largo plazo (2-3 años) y terapia profiláctica dirigida al SNC se han alcanzado tasas de recuperación hasta de un 90% para pacientes con LLA y del 50% para pacientes con LMA [2, 16].

A pesar de estos avances, el compromiso a SNC sigue siendo una complicación asociada a mal pronóstico siendo detectada en <10% de los casos en el momento del diagnóstico y hasta en un 30-40% de los casos pacientes que recaen, este hecho en parte puede ser atribuible a la eliminación o reducción de dosis de radiación en los protocolos de atención a pacientes independientemente de su diagnóstico con el fin de evitar las secuelas a largo plazo que esta terapia pueda desencadenar, como por ejemplo neoplasias secundarias, defectos neurocognitivos, desordenes endocrinológicos, alteraciones en el crecimiento y desarrollo y efectos neurotóxicos [2, 3].

Aunque la mayoría de pacientes cursan asintomáticos, aquellos que manifiestan síntomas de infiltración y pueden ser detectados debido a la presencia de abundantes células tumorales en el LCR presentan uno o varios síntomas asociados a parálisis de nervios craneales, compresión medular o hemorragia en SNC, convulsiones, alteración de la conciencia, dolor de cabeza, déficit neurológico, dolor de espalda, parestesias, pérdida de control de esfínteres, desviación de la mirada, visión doble o pérdida de la visión [2].

Los pacientes con LA, particularmente los diagnosticados con LLA, son más propensos a una infiltración meníngea, incluyendo dentro de esta categoría los pacientes con linfoma tipo Burkitt y linfoma linfoblástico [28]. La incidencia de

infiltración en SNC en niños con LLA y LMA se estima entre un 3-8%, aunque dicho valor varía según los protocolos de tratamiento para la enfermedad [2]. Aunque, la infiltración en SNC en pacientes con LMA es infrecuente, padecer el subtipo LMA mielomonocítico incrementa hasta un 20% la probabilidad de presentar esta condición [28].

### **3.2.1 Factores de riesgo asociados a infiltración en SNC**

La identificación de factores de riesgo que puedan favorecer el compromiso en SNC resulta de vital importancia para poder clasificar y seguir adecuadamente a los pacientes. Existen algunos factores de riesgo propios del individuo que pueden aumentar el riesgo de recaída a nivel del SNC y varían dependiendo del diagnóstico.

Para los pacientes con LLA han sido identificados los siguientes factores de riesgo asociados a infiltración a SNC:

1. Inmunofenotipo T [29].
2. Hiperleucocitosis (recuentos de leucocitos  $>100$  células  $\times 10^9/L$ ) [24].
3. Alteraciones genéticas como: t(9;22) (q34;q11) con BCR-ABL; t(4;11) con MLL-AF4; inv 16 y t(1;19) con E2A-PBX1 [2, 3, 30].
4. Presencia de blastos en LCR identificados por CC con un conteo superior a 5 WBC/uL [31]
5. Introducción iatrogénica de blastos en el LCR [3].
6. Polimorfismos en el receptor de la vitamina D y actividad aumentada del genotipo 3/3 de la timidilato sintasa [32, 33] .

7. Leucemia en SNC al diagnóstico [26]
8. Niveles de LDH superiores a >3000 UI/l [34].
9. Niveles aumentados de IL-15 [35, 36]

En los pacientes con LMA se han identificado otros factores de riesgo que incluyen: anormalidades del cromosoma 11, edad <2 años, hiperleucocitosis, hepatoesplenomegalia, leucemia en SNC al diagnóstico y los fenotipos LMA-M4 (mielomonocítica) y LMA-M5 (monoblástica y monocítica) [37].

### **3.2.2 Clasificación del riesgo de infiltración en SNC en LLA**

La clasificación del riesgo para las LLA está dada principalmente por los hallazgos de CC en el LCR en donde se pueden distinguir 3 categorías:

- CNS1 (Bajo riesgo): ausencia de blastos en LCR.
- CNS2 (Riesgo intermedio): presencia de blastos en muestra que contenga <5 WBC/ $\mu$ L.
- CNS3 (Riesgo alto): presencia de blastos en muestra no traumática que contenga  $\geq$ 5 WBC/ $\mu$ L o presencia masa cerebral o parálisis de pares craneales.
- TLP+: punción lumbar traumática (cuando hay  $\geq$  10 eritrocitos/ul de LCR) y presencia de blastos en periferia.
- TLP-: punción lumbar traumática (cuando hay  $\geq$  500 eritrocitos/ul de LCR) sin blastos

La definición de estos grupos de riesgo tiene un impacto claro en la probabilidad de supervivencia a 5 años libre de leucemia en SNC (siendo en CNS1: 96%; CNS2: 87% y CNS3: 74%) y en la probabilidad de supervivencia total a 5 años (siendo en CNS1: 75%, CNS2: 49% y CNS3: 53%) [38].

### **3.2.3 Mecanismos biológicos de infiltración a SNC en LA**

Los mecanismos de infiltración a SNC aún no están completamente dilucidados, sin embargo en los últimos años se han investigado factores solubles como quemoquinas, receptores de quemoquinas e interleucinas, que podrían intervenir en este proceso.

El SNC es considerado un sitio inmunoprivilegiado; en un individuo sano pequeñas cantidades de células del sistema inmune como los linfocitos T, células NK y monocitos, entre otras, pueden atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) libremente dependiendo del estado de activación de la célula y de las interacciones mediadas principalmente por moléculas de adhesión celular que incluyen P-selectina, E-selectina, L-selectina,  $\beta$ 2-integrina y moléculas de adhesión celular (ICAM-2, ICAM-1, VCAM-1); sin embargo en procesos infecciosos y neoplásicos el flujo de células hacia este espacio cambia significativamente alterando el microambiente y la permeabilidad de la BHE favoreciendo así procesos como la inflamación y migración de más células entre ellas los blastos leucémicos [39].

Desde el punto de vista anatómico, las células tumorales pueden salir de la MO y alcanzar el espacio subaracnoideo a través de los vasos sanguíneos alcanzando

el LCR por el plexo coroideo y/o el parénquima cerebral al atravesar los capilares o infiltrando directamente las leptomeninges por consecuencia de una lesión ósea en el cráneo. En algunas ocasiones las células tumorales pueden crecer a lo largo de las terminaciones nerviosas alcanzando el espacio subaracnoideo a través del foramen neural. Eventualmente, puede presentarse una introducción iatrogénica por parte del médico que realiza la punción lumbar cuando el paciente tiene blastos en circulación o si el paciente presenta una hemorragia a nivel del SNC [2, 26].

La interacción de las células leucémicas con las células de los vasos sanguíneos de la BHE es un paso crucial para el inicio de infiltración en SNC. En este paso ha sido estudiada la molécula VCAM-1 ya que de forma basal promueve la adhesión y diapédesis de los leucocitos, aunque se ha visto relacionada con angiogénesis y crecimiento tumoral, encontrándose niveles elevados en pacientes con linfoma no-Hodgkin y LA. El siguiente paso importante para la invasión es la ruptura de la matriz extracelular (MEC) y de las uniones intercelulares de la BHE, las metaloproteasas (MMP) hidrolizan los componentes de la MEC dando paso a las células tumorales, la MMP-9 juega un rol crítico en la degradación del colágeno tipo IV, la cual es la proteína más abundante de la MEC, las células leucémicas secretan MMP-9 capaz de digerir las proteínas de unión fuerte de la BHE logrando infiltrarse al cerebro, de esta forma MMP-9 está directamente correlacionada con la capacidad migratoria hacia la BHE [39, 40]

A nivel de microambiente, existen diferentes estímulos que pueden inducir el paso de las células tumorales hacia el SNC. Dentro del nicho del SNC, las

interneuronas expresan receptores como el CXCR4 y CXCR7 los cuales pueden direccionar la migración de las células tumorales que secreten CXCL12, de forma similar a la señalización *homing* en médula ósea precedida principalmente por la interacción CXCR4/CXCL12. Otro regulador importante es el CCR7 cuyos ligandos son CCL19 y CCL21, el efecto de la inhibición de esta interacción ha sido probado en modelos animales con LLA-T en los cuales se evidenció una disminución significativa del infiltrado tumoral a SNC [41].

Otra interacción estudiada ha sido CXCL10-CXCR3, en modelos *in vivo* e *in vitro* se ha encontrado una sobre-regulación del receptor en paciente con LLA-B y LLA-T con recaída en SNC, adicionalmente la quemoquina es capaz de inducir migración dependiente de su receptor, confiriéndole también resistencia a la apoptosis mediada por metrotexate y citarabina, dos medicamentos ampliamente utilizados para el tratamiento de pacientes con infiltración en SNC [42].

MCP-1 (CCL2) secretada por fibroblastos, células endoteliales y epiteliales y monocitos y macrófagos, juega un papel importante como quimioatrayente de monocitos y linfocitos con alta afinidad a los receptores CCR2 y CCR4 a los sitios de inflamación. Esta molécula ha sido reportada en blastos de pacientes con LLA, asociándose de forma significativa con infiltración en SNC, por lo cual la postulan como blanco terapéutico [43].

El tráfico y el *homing* de los leucocitos también han sido relacionados con la actividad de la IL-15, debido a que esta citoquina actúa como un factor inductor de proliferación celular de los blastos de LLA-T *in vitro*, incluso favoreciendo la

transformación de células normales a células malignas tras la exposición crónica con este factor de crecimiento mediante la activación de diversas rutas de señalización celular que incluyen JAK/STAT y PI3K/AKT y por la inducción de la expresión de moléculas anti-apoptóticas como Bcl-2 y Mcl-1 [44]

La recaída a nivel de SNC se ha asociado con niveles aumentados de mRNA de IL-15, observándose que los blastos leucémicos pueden responder de forma autocrina, juxtacrina y paracrina a este estímulo, no por ser directamente quimiotrayente sino por incrementar los niveles de moléculas como glicoproteína 1 P-selectina (PSGL1), CXCR3 y SERPINE1, los cuales en conjunto pueden favorecer el tráfico de los blastos a través de la barrera hematoencefálica [35]. También, se ha estudiado el papel del receptor soluble de la IL-2 (CD25) en pacientes con LLA encontrando una relación significativa en esta enfermedad como marcador de compromiso en SNC cuando se obtienen valores superiores a >10 U/ml [45]. Estos estudios demuestran que el microambiente inflamatorio juega un papel fundamental en la migración de células tumorales a SNC, pero en la actualidad la cuantificación de estas moléculas no se realiza en la rutina clínica para predecir riesgo de evolución o de infiltración a SNC en estos pacientes.

### **3.3 Técnicas diagnósticas para detectar infiltración tumoral en SNC**

Ante la sospecha de infiltración en SNC primero el médico tratante debe realizar una exploración física con el fin de identificar si el paciente presenta sintomatología neurológica, de ser así la detección de células tumorales leucémicas en SNC se realiza mediante la técnica *Gold Estándar* la cual consiste

en un examen microscópico de preparaciones de LCR utilizando métodos de concentración como el *Cytospin*, la técnica ha demostrado ser bastante específica (94%) sin embargo poco sensible (sensibilidad entre el 20-70%) dejando un porcentaje considerable de falsos negativos en pacientes con enfermedad leptomeníngea oculta [6, 46].

Dentro de las técnicas de apoyo diagnóstico también se utilizan los métodos neuroradiográficos los cuales incluyen: la tomografía craneal computarizada (TAC) la cual detecta anomalías entre el 35-56% pacientes con enfermedad leptomeníngea y la resonancia magnética (RM) de cerebro y médula espinal la cual constituye el mejor método de imagen diagnóstica ya que en comparación con la tomografía la RM puede detectar entre 1.5 a 2 veces más lesiones en SNC, similares resultados se obtienen con el uso de la mielografía por tomografía computarizada y la RM contrastada. También se utilizan estudios de flujo del LCR por radionúclidos (Ventriculografía por radionúclidos) la cual demuestra ser superior detectando interrupciones del flujo del LCR en comparación con los procedimientos descritos anteriormente, sin embargo estos resultados son solo informativos en cuanto a la compartimentalización del LCR y no logran aclarar acerca del origen de la infiltración leptomeníngea lo cual podría sopesar la RM y el TAC. Las imágenes diagnósticas contrastadas pueden detectar compresión de la médula espinal o metástasis en el parénquima del cordón espinal, el surgimiento de estas complicaciones requiere radioterapia de emergencia en la mayoría de los casos [28].

Estos métodos resultan ser altamente sensibles para detectar las patologías meníngeas pero poco sensibles para determinar la entidad de la enfermedad, presentando una cantidad considerable de falsos negativos (RM: 30% y TAC: 58%), en todo caso debe hacerse un diagnóstico diferencial con meningitis crónicas de origen no maligno como: tuberculosis, infecciones fúngicas, encefalitis de origen toxico o metabólico, entre otras [28, 47].

En un estudio se comparó la RM vs la inmunocitología (IC) en el diagnóstico de diferentes patologías meníngeas, la RM demostró ser altamente sensible en la detección de tumores sólidos causantes de meningitis neoplásicas (RM: 100% vs IC 46%), mientras que en tumores que no siempre se establecen en el parénquima cerebral como las leucemias y los Linfomas la IC es superior en la detección de compromiso en SNC (LLA-B: IC: 89% vs RM 44%; Linfoma: IC 95% vs RM 48%) [48]. El establecimiento del tumor en el parénquima genera sintomatología evidente en la exploración física realizada por el médico tratante, lo cual en contraste a los tumores sólidos no es fácil de percibir en pacientes con leucemias y linfomas ya que ellos pueden presentar compromiso a nivel del SNC sin tener compromiso sistémico o incluso al encontrarse en remisión [28].

### **3.3.1 Citología convencional**

La citología convencional (CC) presenta varias limitantes que repercuten directamente en su desempeño diagnóstico, una de ellas es el volumen de muestra necesario para un análisis adecuado, se han sugerido en algunos reportes al menos 10.5 ml de muestra lo cual a nivel clínico es difícil de obtener,

otra limitante es la similitud morfológica que puede existir entre linfocitos reactivos y blastos leucémicos, otra condición es el procesamiento de la muestra el cual debe ser inmediato puesto que hay una pérdida significativa de la viabilidad celular por el cambio de condiciones basales del LCR, significando esto un problema en la mayoría de centros de salud por el difícil acceso a los centros de análisis de la muestra, adicionalmente se sugiere repetir la muestra si el resultado ha sido negativo lo cual también repercute en el costo de la prestación del servicio y en el bienestar del paciente y por último se recomienda obtener la muestra del sitio más proximal a la sospecha de infiltración en SNC [48]. Lamentablemente, los casos positivos para CC se presentan cuando hay una gran cantidad de células tumorales en el LCR, por tal motivo no le permite ser predictiva.

Otra falencia detectada en la técnica son los casos considerados como sospechosos o atípicos, estos resultados se reportan cuando el profesional que analiza no afirma ni descarta que las células observadas sean blastos malignos lo cual puede tener graves consecuencias en el tratamiento del paciente. Un estudio realizado con el fin de determinar la evolución clínica durante 1 año en 32 pacientes con leucemia o linfoma diagnosticados por CC como sospechosos o atípicos, demostró que 19 de ellos (59.4%) en el transcurso de ese tiempo fueron positivos por CMF y/o CC, demostrando así compromiso en SNC, lo cual concluye que gran cantidad de estos pacientes pudieron haber sido diagnosticados con infiltración si se hubiese utilizado la CMF como técnica diagnóstica desde el inicio del tratamiento [49].

En un estudio realizado por Glass et al en 1979 correlacionó los resultados de la CC con los hallazgos de necropsias de pacientes fallecidos con metástasis leptomeníngea incluyendo: tumores primarios de cerebro, tumores sólidos sistémicos de pulmón, testículo, seno, melanoma, neuroblastoma, carcinoma renal, leucemias, linfomas, entre otros. En un total de 13 muestras de LCR correspondientes a enfermedad focal la CC pudo detectar 5 muestras positivas (38%) y de 38 muestras de LCR correspondientes a enfermedad multifocal o diseminada la CC pudo detectar 25 muestras positivas (66%). Este hallazgo determina que para incrementar la sensibilidad de la CC debería conocerse con certeza la ubicación del tumor lo cual no es fácil de identificar aun utilizando imágenes diagnosticas que se ha reportado una baja sensibilidad de detección si el tumor no está establecido en el parénquima cerebral [50, 51].

### **3.3.2 Citometría de flujo (CMF)**

La CMF es una técnica altamente sensible (sensibilidad reportada en LCR: 96%) y específica (especificidad reportada en LCR: 97%) que evalúa diferentes parámetros de las células como su tamaño, complejidad e inmunofenotipo. La evaluación de todas estas características en una sola célula le permite diferenciar poblaciones presentes en muestras biológicas entre ellas el LCR, por lo cual no solo detecta blastos tumorales sino también grupos celulares difíciles de identificar utilizando únicamente la CC [52].

La CMF detecta fluorescencias producidas por uniones específicas en anticuerpos y marcadores de superficie e intracelulares que son específicos de linaje los

cuales son expresados tanto por las poblaciones normales como anormales, esta característica permite seleccionar y enriquecer la población que se desea analizar. Uno de los marcadores comúnmente utilizado en la identificación de las células *stem* hematopoyéticas, tanto de corto como de largo plazo, es el CD34 [53]. Este marcador es utilizado en varios esquemas de identificación de LA, sin embargo, no siempre se encuentra expresado en las células leucémicas. La identificación de los blastos leucémicos debe realizarse en conjunto con otros marcadores para garantizar el correcto diagnóstico de la enfermedad. Un estudio realizado por Van Dogen et al (2012) permitió diseñar un panel de anticuerpos capaz de detectar de forma rápida y confiable el tipo de leucemia sospechado, a partir de esta información se prosigue a la identificación completa del subtipo de la LA. El tubo denominado ALOT, contiene 8 marcadores altamente sensibles denominados *backbone* que deben ser analizados según sus niveles de expresión [54]:

- CyCD3: Marcador de linaje T.
- CD45: Marcador de antígeno común leucocitario.
- CyMPO: Marcador de linaje mieloide.
- CyCD79a: Marcador de linaje B.
- CD34: Marcador de inmadurez presente en cualquier linaje.
- CD19: Marcador de linaje B.
- CD7: Marcador de linaje T.
- CD3: Marcador de linaje T.

A lo largo del tiempo la técnica ha sido estandarizada y perfeccionada para la detección de compromiso no solo en MO sino también en diferentes sitios de

infiltración como el SNC, a través de la implementación de citómetros capaces de utilizar hasta 8 o más combinaciones de fluorescencias diferentes. En los últimos seis años el Consorcio Europeo Euroflow ha validado y estandarizado para la rutina clínica los protocolos técnicos, las clonas de anticuerpos, los paneles inmunofenotipos en 8 fluorescencias, los citómetros de flujo y los análisis e interpretación de estos paneles, con el fin de incrementar la sensibilidad y el rendimiento de la CMF para la detección de tumores de origen hematopoyético incluyendo las LA y en diversos tipos de muestras biológicas [54].

Sin embargo, una variable necesaria a controlar es la calidad de la muestra de LCR en la fase pre-analítica; esto se debe a características propias de la muestra ya que son paucicelulares, contienen escaso volumen y pierden muy rápidamente viabilidad (1 hora) [54]. Para superar este inconveniente se ha implementado el uso de estabilizantes celulares o de Buffers que mantengan la viabilidad celular. En distintos reportes y consensos se recomienda el uso de Buffer fosfato (PBS) suplementado con suero fetal bovino o con albúmina sérica bovina a diferentes concentraciones y más recientemente se ha publicado el uso del Transfix™ (cytomark) como estabilizador y fijador de las células permitiendo el análisis hasta 10 días después de su obtención. En la actualidad se recomienda procesar la muestra de LCR, después de un contacto mínimo de 18 horas con Transfix™ (cytomark), ya que mejora la capacidad de detección de células tumorales de origen hematopoyético y permite la detección de recuentos absolutos superiores de leucocitos en comparación con las muestras de LCR que no se estabilizan o respecto a LCR mantenidos con Buffer fosfato + suero fetal bovino [7]. No

obstante, escasas publicaciones han demostrado que en ciertos casos la CMF no logra detectar células tumorales en LCR y por tal motivo recomiendan el uso combinado de CMF y CC [55-57].

En relación al efecto del estabilizante Transfix™ (cytomark) en las muestras de LCR, se reporta que este previene la muerte celular gracias a la acción del aldehído alifático (AA) que fija leucocitos por entrecruzamiento con residuos de aminoácidos y también contiene sales de metal pesado que estabilizan leucocitos y reducen la autofluorescencia causada por AA [7, 58].

### **3.3.3 Biología molecular**

Las técnicas de biología molecular también han sido utilizadas para el diagnóstico de infiltración en SNC, así como en la detección de enfermedad mínima residual. Se basan principalmente en la detección fragmentos de DNA tumoral sin la necesidad de tener las células intactas lo cual podría considerarse una ventaja. La implementación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha sido propuesta como técnica complementaria de la CC tanto para LA cómo Linfomas, en especial cuando hay alta sospecha de infiltración y la CC no es conclusa. En un reciente estudio fue probada la PCR-RT para rearrreglos en IGH probada en conjunto con CMF en pacientes pediátricos con LA, en donde ambas demostraron ser entre dos y tres veces más sensibles que la CC, sin embargo la técnica molecular se sugiere como alternativa ya que no hubo detección en algunos pacientes. Algunos limitantes de estas pruebas pueden estar relacionados con la presencia de hipermutaciones somáticas que previenen la unión de los *primers*, no

disponibilidad de un panel de *primers* bien establecido para la región V, los posibles casos de falsos positivos por contaminación de la muestra y tener conocimiento de las alteraciones genéticas en las células tumorales que permitan la identificación de las células en el LCR, aunque no todas tiene mutaciones identificadas [59, 60].

En otros estudios también se ha utilizado la PCR para la detección de rearrreglos del TCR $\delta$  y TCR $\gamma$ , considerándose una alternativa en conjunto con la citología [61, 62].

### **3.4 Estudios que han evaluado la utilidad de la CMF vs. CC en la detección de infiltración tumoral en SNC**

La detección oportuna de infiltración en SNC antes que el paciente tenga síntomas clínicos, constituye uno de los objetivos más importantes en el tratamiento de la enfermedad dado su significado pronóstico. Por tanto, la técnica elegida para la detección de infiltración leptomeníngea debe ser capaz de distinguir con precisión las poblaciones celulares presentes en la muestra de LCR, contribuyendo en el diagnóstico diferencial al ser altamente sensible y específica para evitar la aplicación de terapias innecesarias en el paciente o por el contrario errar en la omisión de su intervención.

Infortunadamente, la CC que es considerada la técnica *Gold estándar* para la detección de compromiso en SNC en pacientes con LA y linfomas, resulta ser poco útil dada su baja sensibilidad (20-60% de falsos negativos) cuando se

compara con técnicas más sensibles como la CMF o las pruebas de biología molecular.

En algunas publicaciones realizadas no se observa una clara ventaja de la CMF sobre la CC incluyendo pacientes con LA y Linfomas [63, 64]. Por ejemplo, Mitri et al realizaron un estudio comparativo entre las dos técnicas utilizando LCR de pacientes adultos con LA, encontrando un porcentaje de infiltración del 1.25% por CMF contra un 1.5% detectado por CC, al comparar estos resultados no se observa diferencia significativa entre las dos técnicas, sin embargo de este estudio llama la atención los porcentajes de infiltración detectados en las muestras los cuales son los más bajos publicados aun cuando se utilizaron 800 muestras de LCR en diferentes momentos de la enfermedad, adicionalmente estos hallazgos pueden estar asociados con la metodología empleada, ya que por un lado se utilizaron únicamente combinaciones de 4 anticuerpos para el diagnóstico en comparación con otros trabajos, lo cual podría impactar en la sensibilidad de la técnica, la falta de utilización de un estabilizador del LCR o un buffer de transporte adecuado, conduciendo a la obtención de falsos negativos por la pérdida celular ya descrita [65].

También se han hecho publicaciones que sugieren la realización de ambas técnicas ya que son complementarias entre sí, a esta conclusión se llega principalmente por la presentación de casos en los que pacientes fueron positivos solo por CC y no por CMF, sin una clara explicación de estos hallazgos, aunque es importante resaltar que la mayoría de estos estudios incluyen grupos heterogéneos de pacientes con diferentes diagnósticos en donde no se permite

evaluar el desempeño de la técnica por cada patología, tampoco utilizan soluciones estabilizantes para evitar la pérdida celular en las muestras de LCR y finalmente se observa la utilización de combinaciones entre 2-4 anticuerpos disminuyendo la sensibilidad de la técnica [55, 57, 60, 66-69]. Sayeda et al publicaron un estudio realizado en 45 pacientes pediátricos con LLA, utilizando como técnicas diagnósticas la CC, CMF y rearrreglos del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas, las técnicas lograron detectar 22%, 46% y 60% de los pacientes con infiltración. Con estos valores se sigue demostrando que la CMF es más sensible para detectar este tipo de infiltración, aunque en algunos casos la CMF fue negativa mientras que la CC fue positiva aún en pacientes con sintomatología asociado a compromiso del SNC, ellos sugieren tener precauciones con cada técnica ya que la CC solo fue positiva cuando hubo gran cantidad de células presentes en la muestra, así que debe haber precaución en la fijación de las tinciones y la distinción entre *debris* y células tumorales, en cuanto al caso positivo por CC y negativo por la otras dos técnicas se consideró un falso positivo debido a la reactividad de las células [60].

Finalmente, varias publicaciones realizadas con muestras de LCR de pacientes con LA y Linfomas han demostrado la superioridad de la técnica. En estos estudios de forma particular han utilizado estabilizantes del LCR como el Transfix™ (Cytomark) o han mencionado el procesamiento casi al tiempo de haberse recolectado, utilizando combinaciones de anticuerpos entre 3-11 fluorescencias y evitando al máximo la centrifugación innecesaria de la muestra, mejorando así la estabilidad de la muestra y la sensibilidad de la técnica. Una vez

analizados los resultados se puede concluir que la CMF detecta hasta el doble de casos de infiltración con respecto a la CC [4, 49, 70-78].

Uno de los estudios más importantes que ha controlado variables importantes para la correcta identificación de infiltración en SNC fue el realizado por Quijano et al. En este estudio multicéntrico participaron 27 hospitales en España y se evaluaron 123 pacientes con nuevo diagnóstico de Linfoma no-Hodgkin agresivo de células B y que además tenían alto riesgo de recaída en SNC. En la fase pre-analítica del estudio, las muestras de LCR fueron estabilizadas con Transfix™ (Cytomark), analizadas por CMF empleando combinaciones de 6 fluorescencias distintas y comparadas simultáneamente con la CC. Se encontró que 27 pacientes (23%) fueron positivos para infiltración tumoral por CMF, mientras que la CC sólo fue positiva en 7 pacientes (6%), demostrando así una clara ventaja de la CMF sobre la técnica *Gold Estandar* [65]. De forma relevante los pacientes CMF+/CC- en el seguimiento mostraron menor supervivencia total y mayores tasas de recaídas en SNC.

Ranta et al recolectaron y analizaron muestras de LCR de 214 pacientes pediátricos diagnosticados con LLA, comparando los resultados de la CC vs la CMF. Se utilizó Transfix™ (Cytomark) como estabilizante de las muestras y combinaciones de 3-8 fluorescencias para los análisis de CMF. Como resultado se detectaron 17% de casos positivos para infiltración por CMF contra un 9.8% detectados por CC.

La CMF ha mejorado considerablemente con el paso de los años, sin embargo la falta de estandarización puede perjudicar su desempeño. Para solucionar este problema el Servicio de Citometría de la Universidad de Salamanca y posteriormente el Consorcio Europeo Euroflow ha reunido suficiente evidencia científica para proponer una metodología estandarizada que pueda unificar el procedimiento y parametrizar el uso de anticuerpos realmente importantes para la detección de células tumorales en LCR, aunque para ello el personal profesional encargado de la lectura, interpretación y análisis de los resultados debe estar altamente entrenado y debidamente capacitado para ejercer esta función [54].

#### **4. OBJETIVOS**

##### **4.1 Objetivo general**

Evaluar la presencia de infiltración neoplásica en muestras de LCR de pacientes con diagnóstico confirmado de leucemia aguda mediante citometría de flujo multiparamétrica comparada con la citología convencional y su relación con diferentes parámetros clínico-biológicos.

##### **4.2 Objetivos específicos**

- Detectar la presencia de infiltración neoplásica en muestras de LCR de pacientes con LA mediante citometría de flujo empleando paneles inmunofenotípicos de 6 fluorescencias en el momento del diagnóstico y en el seguimiento post-tratamiento.
- Evaluar la sensibilidad de la citometría de flujo multiparamétrica para la detección de células neoplásicas en LCR respecto a la citología convencional.
- Analizar los resultados obtenidos con las características clínicas y biológicas de valor pronóstico de la enfermedad.

## 5. **MATERIALES Y MÉTODOS**

5.1 **Diseño del estudio**: Estudio de pruebas diagnósticas de concordancia por conformidad considerando como patrón de oro un constructo que incluye la prueba de citología en LCR (análisis morfológico).

### 5.2 **Población y muestra**

- a. **Población universo**: sujetos en edad pediátrica de nuevo diagnóstico de LA o con presencia de síntomas de afectación neurológica que acudan al servicio de hemato-oncología en centros especializados de la ciudad de Bogotá.
- b. **Población de estudio**: sujetos en edad pediátrica de nuevo diagnóstico de LA o con presencia de síntomas de afectación neurológica que acudan al servicio de Hemato-Oncología en: Fundación Santa Fe de Bogotá y Hospital Universitario San Ignacio-Centro de Oncología Javeriano. El estudio fue aprobado por el comité de ética de cada institución participante.
- c. **Muestra de LCR**: sujetos en edad pediátrica (0-18 años) de nuevo diagnóstico de LA o que durante su seguimiento presenten o no síntomas de afectación neurológica, que acudieron al servicio de Hemato-Oncología en los centros anteriormente nombrados durante 2008 y 2016. La recolección de las muestras se llevó a cabo en el momento del diagnóstico o durante el seguimiento de la enfermedad al presentarse o no síntomas de afectación neurológica. A los pacientes a los que se les detectó infiltración tumoral en SNC se les recogieron otras muestras hasta que ya no se detectara infiltración por CMF. El cálculo de la muestra se hizo sobre

la estimación de la prevalencia por citología del 10% y por CMF del 20%, para determinar si esta diferencia es estadísticamente significativa se necesitaron al menos 122 muestras (con una confianza del 95% y un poder 80%).

Los pacientes cumplieron los siguientes criterios de inclusión.

### **5.3 Criterios de inclusión**

1. Sujetos hombres y mujeres menores de 18 años.
2. Sujetos con diagnóstico confirmado de LA.
3. Sujetos que al diagnóstico presenten o no compromiso en SNC y durante el tratamiento y/o seguimiento tienen síntomas neurológicos.
4. Sujeto al cual se le haya practicado punción lumbar y se tenga el resultado de la CC y la CMF de la misma muestra.
5. Sujeto que acepte participar en el estudio y firme y/o exprese de manera verbal (llamada telefónica) el consentimiento informado con visto bueno de sus padres o cuidadores.

### **5.4 Criterios de exclusión**

Sujetos hombres y mujeres menores de 18 años con LA que además cursen con procesos inflamatorios o infecciosos a nivel de SNC.

1. Sujetos con diagnóstico confirmado de LA con infección por Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) u otras condiciones de inmunodeficiencia.

## **5.5 Descriptores de la población en estudio:**

**Grupo 1:** Pacientes positivos para infiltración tumoral en SNC con diagnóstico clínico de LA que cumplan con los criterios de inclusión y que asistan al servicio de Hemato-Oncología de una de las dos instituciones.

**Grupo 2:** Pacientes negativos para infiltración tumoral en SNC con diagnóstico clínico de LA que cumplan con los criterios de inclusión y que asistan a los servicios de Hemato-Oncología de las cuatro instituciones participantes.

## **5.6 Obtención de la muestra de LCR para análisis de infiltración en SNC**

Las muestras obtenidas en las entidades participantes fueron tomadas a través de punción lumbar por el hemato-oncólogo tratante, quienes programaban los pacientes según la rutina clínica de tratamiento de la enfermedad o si sospechaban infiltración en SNC. La muestra de LCR fue dividida en 2 tubos conservando en lo posible la misma cantidad en cada uno de ellos.

Para el análisis por CC, la muestra fue conducida en refrigeración (2-8°C) al laboratorio de patología en un lapso menor a 1 hora para evitar la pérdida de viabilidad celular y garantizar el cumplimiento de la fase analítica para dicho procesamiento. La evaluación morfológica se hizo utilizando el método de citocentrifugación (*Cytospin*) y coloraciones como tinción con Hematoxilina Eosina y/o Giemsa ó Wright.

La muestra tomada para CMF fue dispensada inmediatamente en un tubo con EDTA y 200 µl de Transfix™ (Cytomark) (dilución final 1/10), llevada al laboratorio protegida de la luz y en refrigeración (2-8°C). Fue procesada 12 horas después de obtención según lo descrito por De Jongste (2014).

## **5.7 Análisis inmunofenotípico en médula ósea (MO)**

Para la realización de los estudios por CMF en MO en el momento del diagnóstico se empleó un panel básico de anticuerpos monoclonales combinados en 4-6 fluorescencias distintas para la identificación y caracterización fenotípica de leucemias agudas. Los siguientes protocolos se hicieron con base a lo descrito por van Dongen (2012) y Roa-Higuera (2010).

### **5.7.1 Protocolo inicial para la preparación de la muestra de médula ósea**

1. Pipetear 300 µl de la muestra en un tubo Falcon de 15 ml.
2. Adicionar al tubo 10 ml de buffer PBS + albumina sérica bovina (ASB) (0.5%) filtrada.
3. Centrifugar durante 10 minutos a 2000 rpm.
4. Retirar el sobrenadante obtenido con pipeta Pasteur
5. Adicionar al tubo 10 ml de buffer PBS + ASB 0.5% al *pellet* celular obtenido.
6. Centrifugar a 2000 rpm durante 10 minutos.
7. Retirar sobrenadante obtenido con pipeta Pasteur.
8. Resuspender el pellet celular con 200 µl de buffer PBS + ASB 0.5%.
9. Transferir 50 µl de muestra lavada a cada tubo que hace parte del panel\*.

\*Se utilizó un panel para *screening* básico o tamizaje el cual contiene los anticuerpos más relevantes que pueden definir el linaje de la población problema y de esta manera seleccionar el panel inmunofenotípico adecuado para la clasificación inmunológica de la enfermedad (Tabla 1). Para cada muestra se prepararon dos tubos denominados blanco de membrana y blanco de citoplasma, los cuales sirvieron como control de autofluorescencia y que fueron procesados de la misma manera que los otros tubos del panel, a excepción que no se les adicionó anticuerpo primario ni secundario.

#### **5.7.2 Protocolo de marcaje simultaneo de antígenos de membrana y citoplasma (Screening leucemia aguda)**

1. Realizar el marcaje de antígenos de membrana adicionando el volumen estandarizado de cada anticuerpo monoclonal según el panel de la tabla 2.
2. Mezclar con Vórtex.
3. Agregar 100 µl del reactivo A (Solución de fijación *IntraStain* Dako).
4. Mezclar con Vórtex.
5. Incubar 15 minutos a temperatura ambiente (20-25°C) y en oscuridad.
6. Agregar 2 ml de buffer PBS + ASB 0.5%.
7. Centrifugar durante 10 minutos a 2000 rpm.
8. Retirar el sobrenadante obtenido con pipeta Pasteur.
9. Resuspender el *pellet* celular mezclando bien.

- 10.** Agregar 100 µl de solución B (Solución de permeabilización *IntraStain* Dako) y mezclar con Vórtex.
- 11.** Realizar el marcaje de antígenos de intracelulares adicionando el volumen estandarizado de cada anticuerpo monoclonal según el panel en la tabla 1.
- 12.** Mezclar con Vórtex
- 13.** Incubar 20 minutos a temperatura ambiente (20-25°C) y en oscuridad.
- 14.** Agregar 2 ml de PBS + ASB 0.5%.
- 15.** Centrifugar durante 10 minutos a 2000 rpm.
- 16.** Retirar el sobrenadante obtenido con pipeta Pasteur.
- 17.** Resuspender el pellet celular con 200 µl de PBS + ASB 0.5%.
- 18.** Mezclar y adquirir las células de forma inmediata en el citómetro de flujo FACS Canto II BD o conservarlas a 4°C por un máximo de 1 hora post marcaje.
- 19.** Adquirir un número total 50.000 de eventos.

**Tabla 1. Panel de anticuerpos de superficie y de membrana con sus respectivos volúmenes empleados para *screening* básico de LA en muestras de médula ósea de pacientes de nuevo diagnóstico.**

<b>TUBO</b>	<b>FITC</b>	<b>PE</b>	<b>PerCPCy5</b>	<b>PECy7</b>	<b>APC</b>	<b>APCCy7</b>
<b>1</b>	CD7	CD117	CyCD3	sCD3	CD34	CD45
<b>2</b>	nTdT	cyMPO	CD45	-	CD34	-
<b>3</b>	CD19	CyCD79a	CD45	-	CD34	-
<b>Volumen</b>	5 µl / cy 10 µl	4 µl / cy 10 µl	4 µl / cy 10 µl	3 µl	3 µl	2 µl

Cy: hace referencia a marcaje de antígenos citoplasmáticos. FITC, isotiocianato de fluoresceína; PE, ficoeritrina; PerCPCy5, peridinina clorofila proteína cianina 5; PECY7, PE cianina (Cy)7; APC, alofocianina; APC7, APC cianina 7.

En algunos pacientes se implementó el protocolo del Consorcio Europeo Euroflow para el diagnóstico de LA (Tubo ALOT) (Tabla 2):

**Tabla 2. Panel de anticuerpos del tubo ALOT de Euroflow para *screening* de LA.**

<b>TUBO</b>	<b>V450</b>	<b>V500</b>	<b>FITC</b>	<b>PE</b>	<b>PerCPCy5</b>	<b>PECy7</b>	<b>APC</b>	<b>APCCy7</b>
<b>1</b>	CD3	CD45	cyMPO	CyCD79a	CD34	CD19	CD7	CD3
<b>Volumen</b>	5 µl	5 µl	10 µl	10 µl	7 µl	5 µl	3 µl	3 µl

Cy: hace referencia a marcaje de antígenos citoplasmáticos. FITC, isotiocianato de fluoresceína; PE, ficoeritrina; PerCPCy5, peridinina clorofila proteína cianina 5; PECY7, PE cianina (Cy)7; APC, alofocianina; APC7, APC cianina 7.

Dependiendo de los hallazgos del panel básico de LA o del tubo ALOT, se hizo la ampliación de los marcadores correspondientes de acuerdo al linaje (LMA tabla 3, LLA-T tabla 4 y LLA-B tabla 5), siguiendo los mismos pasos de centrifugación, incubación, marcaje y adquisición anteriormente descritos.

**Tabla 3. Panel de anticuerpos utilizados para la ampliación de LMA.**

TUBO	FITC	PE	PerCPCy5	PECy7	APC	APCCy7
1	CD34	CD14	CD33	CD38	CD64	CD45
2	CD2	CD56	CD19	-	CD34	CD45
3	CD34	CD11b	CD45	CD117	CD13	-
4	CD15	CD123	HLA-DR	-	CD34	CD45
5	CD71	7.1	CD45	-	CD34	-
<b>Volumen</b>	5 µl	4 µl	4 µl	3 µl	3 µl	2 µl

FITC, isotiocianato de fluoresceína; PE, ficoeritrina; PerCPCy5, peridina clorofila proteína cianina 5; PECy7, PE cianina (Cy)7; APC, alofocianina; APC7, APC cianina 7.

**Tabla 4. Panel de anticuerpos utilizados para la ampliación de LLA-T.**

TUBO	FITC	PE	PerCPCy5	PECy7	APC	APCCy7
1	HLA-DR	CD1a	cyCD3	sCD3	CD34	CD45
2	CD2	CD5	sCD13	CD38	CD10	CD45
<b>Volumen</b>	5 µl	4 µl	4 µl	3 µl	3 µl	2 µl

FITC, isotiocianato de fluoresceína; PE, ficoeritrina; PerCPCy5, peridina clorofila proteína cianina 5; PECy7, PE cianina (Cy)7; APC, alofocianina; APC7, APC cianina 7.

**Tabla 5 Panel de anticuerpos utilizados para la ampliación de LLA-B.**

TUBO	FITC	PE	PerCPCy5	PECy7	APC	APCCy7
1	cyIgM	cyCD22	CD19	-	CD34	-
2	HLA-DR	CD33	CD19	-	CD13	-
3	CD20	CD10	CD19	CD38	CD34	CD45
4	CD45	7.1	CD19	-	CD34	-
<b>Volumen</b>	5 µ / cy 10µl	4 µl	4 µl	3 µl	3 µl	2 µl

cy hace referencia a marcaje de antígenos citoplasmáticos. FITC, isotiocianato de fluoresceína; PE, ficoeritrina; PerCPCy5, peridina clorofila proteína cianina 5; PECY7, PE cianina (Cy)7; APC, alofocianina; APC7, APC cianina 7.

### **5.8 Protocolo de marcaje de muestras de LCR para detección de infiltración en SNC de pacientes con LA**

El protocolo indicado a continuación se hace con base a lo descrito por Quijano et al (2008), Kraan (2008) y van Dongen (2012) para muestra de líquido cefalorraquídeo.

1. Medir volumen el volumen total del LCR.
2. Centrifugar durante 10 minutos a 2000 rpm.
3. Descartar el sobrenadante con pipeta Pasteur.
4. Adicionar 300 µl de PBS + ASB 0.5% al *pellet* celular obtenido.
5. Transferir 150 µl de la muestra al tubo correspondiente para el marcaje.

6. Adicionar los anticuerpos monoclonales de acuerdo al linaje detectado en la muestra de MO (LLA-T: tabla 6, LLA-B: tabla 7 o LMA: tabla 8).

**Tabla 6. Panel de anticuerpos utilizados diagnóstico de infiltración en LCR para LLA-T**

TUBO	FITC	PE	PerCPCy5	PECy7	APC	APCCy7
1	NTdT o CD7	CD34	cyCD3	sCD3	CD14	CD45
2	CD8	CD4	CD3	-	CD56	CD45
<b>Volumen</b>	5 µl	4 µl	4 µl	3 µl	3 µl	2 µl

cy hace referencia a marcaje de antígenos citoplasmáticos. FITC, isotiocianato de fluoresceína; PE, ficoeritrina; PerCPCy5, peridina clorofila proteína cianina 5; PECY7, PE cianina (Cy)7; APC, alofocianina; APC7, APC cianina 7.

**Tabla 7 Panel de anticuerpos utilizados diagnóstico de infiltración en LCR para LLA-B.**

TUBO	FITC	PE	PerCPCy5	PECy7	APC	APCCy7
1	CD34	CD10	CD19	sCD3	CD14	CD45
2	CD8	CD4	CD3	-	CD56	CD45
<b>Volumen</b>	5 µl	4 µl	4 µl	3 µl	3 µl	2 µl

FITC, isotiocianato de fluoresceína; PE, ficoeritrina; PerCPCy5, peridina clorofila proteína cianina 5; PECY7, PE cianina (Cy)7; APC, alofocianina; APC7, APC cianina 7.

**Tabla 8 Panel de anticuerpos utilizados diagnóstico de infiltración en LCR para LMA**

TUBO	FITC	PE	PerCPCy5	PECy7	APC	APCCy7
1	CD34	CD117	CD19	sCD3	CD14	CD45
2	CD8	CD4	CD3	-	CD56	CD45
<b>Volumen</b>	5 µl	4 µl	4 µl	3 µl	3 µl	2 µl

FITC, isotiocianato de fluoresceína; PE, ficoeritrina; PerCPCy5, peridina clorofila proteína cianina 5; PECY7, PE cianina (Cy)7; APC, alofocianina; APC7, APC cianina 7.

7. Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente (20-25°C) y en oscuridad.
8. Adicionar 2 ml de lisis de eritrocitos (FACS lysing BD).
9. Incubar 15 minutos a temperatura ambiente (20-25°C) y en oscuridad.
10. Centrifugar durante 10 minutos a 2000 rpm.
11. Descartar el sobrenadante con pipeta Pasteur.
12. Adicionar 200 µl de PBS + ASB 0.5% y adicionar las perlas fluorescentes para realizar los cálculos absolutos de las diferentes poblaciones celulares (nota: en algunas muestras se emplearon tubos *Truecount* que contienen también perlas fluorescentes dependiendo la disponibilidad en la Unidad de citometría).
13. Mezclar y adquirir toda la muestra de forma inmediata en el citómetro de flujo FACS Canto II BD.
14. Calcular el número absoluto de cada subpoblación celular, de acuerdo a la siguiente fórmula (1):

$$(Células/uL) = \frac{\# \text{ células en el gate}}{\# \text{ de microesferas en el gate}^a} * \frac{\# \text{ microesferas añadidas por tubo}^a}{\text{volumen de muestra (ul)}^b} * \text{Factor de conversión}^c$$

Donde:

- a) El número total de microesferas añadidas al tubo: volumen de microesferas añadidas al tubo x concentración de microesferas (microesferas/u/l) (este dato lo provee el fabricante).
- b) Volumen total de la muestra de LCR en el momento de su obtención.
- c) El factor de corrección: Volumen inicial de la muestra

El análisis de los datos tanto de las muestras de MO como de los LCR se realizó empleando los programas INFINICYT™ (Cytognos SL, Salamanca, España) y Paint-A-Gate™ de BD Biosciences, con el fin de identificar y cuantificar poblaciones presentes en las muestras y determinar los porcentajes de expresión los antígenos presentes en estas células.

## **5.9 Recolección de datos clínicos**

Los resultados retrospectivos de los análisis de LCR realizados entre 2008 a 2014 fueron obtenidos a partir del software SAHI de manejo de datos e historias clínicas de cada institución en las áreas de patología y citometría de flujo.

Se recolectaron datos clínicos de cada paciente en colaboración con los médicos tratantes teniendo en cuenta la siguiente información clínica de los pacientes: edad, sexo, diagnóstico, fecha de diagnóstico, resultado de citogenética, recuento

de leucocitos, hemoglobina, plaquetas, LDH y neutrófilos al diagnóstico, sitios de infiltración extramedular, presentación de síntomas neurológicos, tratamiento recibido, respuesta al tratamiento al día 8 (Aplica para las LA), remisión completa, fecha de recaída, muerte y causa de muerte.

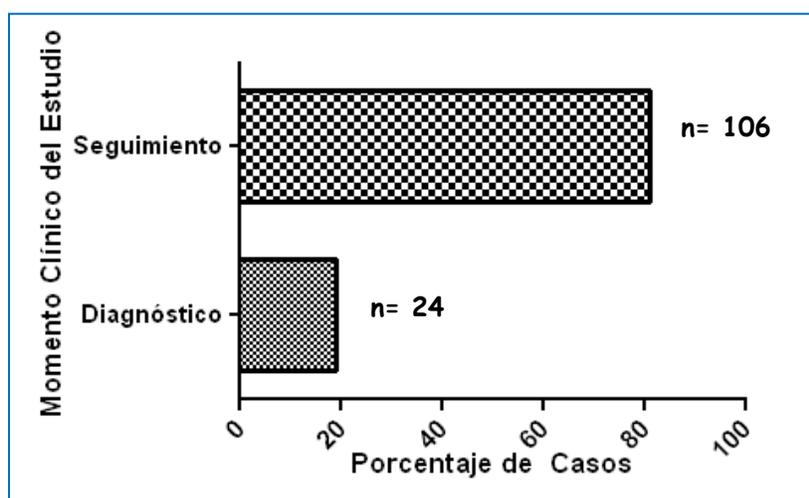
### **5.10 Análisis estadístico**

Utilizando el programa estadístico SPSS versión 20, se realizaron análisis descriptivos para obtener los valores promedio, rangos y frecuencias de cada datos clínico obtenido en la revisión y de los resultados de las poblaciones celulares obtenidos en las muestras agrupadas por tipo de diagnóstico y presencia o ausencia de infiltración en SNC, determinando diferencias significativas que entre cada grupo evaluado. Se determinó también el índice Kappa o fuerza de concordancia entre la CC y CMF. Se determinaron factores de asociación pronostica de infiltración en SNC comparando los casos positivos y negativos para infiltración según su resultado de CMF, teniendo en cuenta los factores evaluados al diagnóstico, sintomatología asociada a infiltración en SNC y respuesta a los tratamientos. Se construyeron graficas de *Kaplan-Meier* para estimar la supervivencia total y enfermedad libre de eventos a 5 años de los pacientes positivos versus aquellos negativos por CMF.

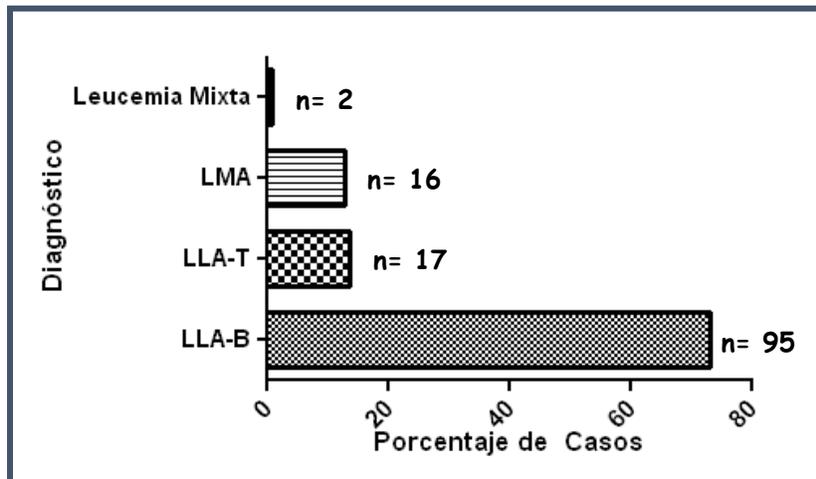
## 6. RESULTADOS

### 6.1 Descripción de los hallazgos de CMF y CC en las muestras de LCR

Se recolectaron en total 130 muestras de LCR de 52 pacientes con LA, 16 (30,7%) mujeres y 36 (69,3%) hombres. La edad promedio de los pacientes fue de 9 años (rango: 0.16 años – 18 años). La mayoría de muestras de obtuvieron en el seguimiento clínico de la enfermedad post-quimioterapia: 106 (81,4%), seguido de pacientes evaluados en el momento del diagnóstico: 24 (18,6%) (**Figura 1**). La mayor cantidad de muestras analizadas correspondían a pacientes con LLA-B: 95 (73%), seguido de 17 (13%) con LLA-T, 16 (12,5%) con LMA y 2 (1,5%) con LA de linaje mixto (**Figura 2**).

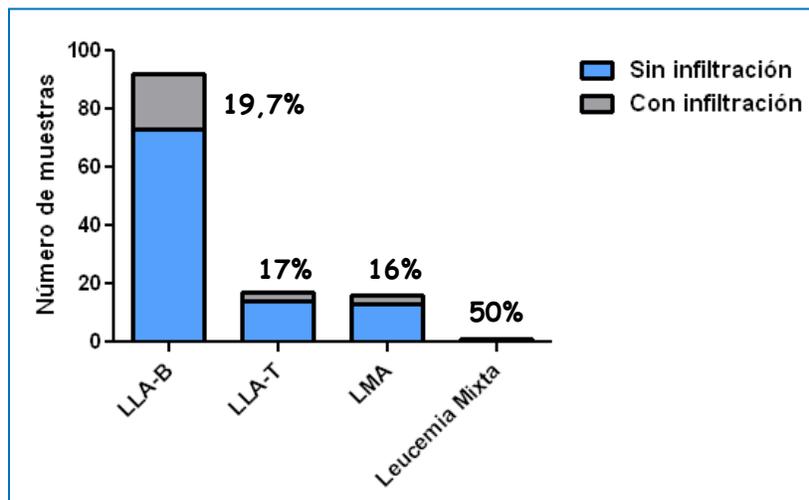


**Figura 1.** Porcentaje de muestras de LCR obtenidas al momento del diagnóstico y durante el seguimiento clínico de la enfermedad en pacientes pediátricos con LA.



**Figura 2.** Muestras de LCR de pacientes con LA clasificados según el diagnóstico

El 19,7% de las muestras de LCR de LLA-B, el 17% de las LLA-T y el 16% de las LMA, tenían infiltración tumoral en SNC mediante CMF (**figura 3**).



**Figura 3.** Número de muestras de LCR de pacientes con LA con infiltración en SNC según su diagnóstico.

Es importante resaltar que la citología únicamente se reportó como positiva en dos muestras en las cuales la CMF identificó un porcentaje elevado de blastos (98% en cada muestra) (rango: 310-13232 blastos/ $\mu$ l), es decir que la CC fue positiva sólo cuando hay una alta carga tumoral en la muestra de LCR. El límite mínimo de detección de células tumorales en las muestras de LCR analizadas por CMF es de 0.01 blastos/uL.

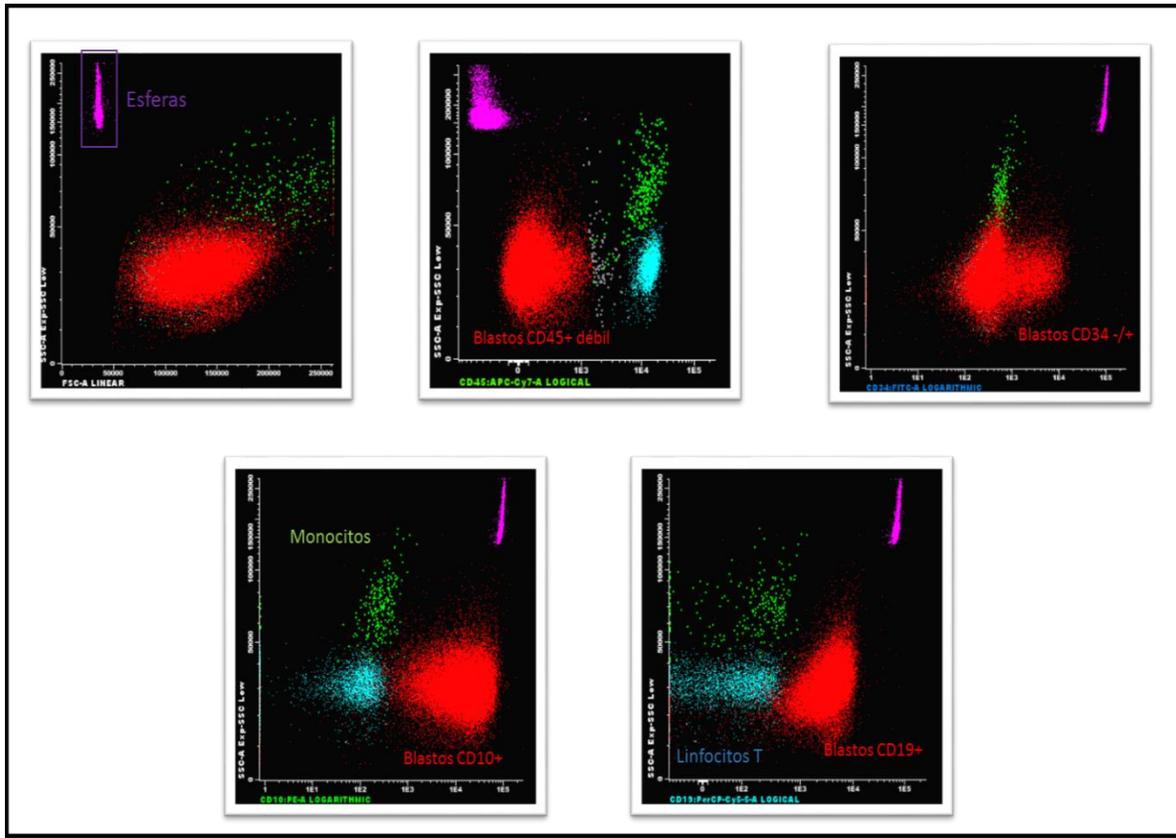
El análisis comparativo de los resultados obtenidos por CMF respecto a la CC mostró que 102 muestras de LCR (78,4%) fueron CMF-/CC-; 21 (16%) fueron CMF+/CC- ; 2 muestras (1,5%) CMF+/CC+ y ninguna muestra fue CMF-/CC+. Se encontró discordancia en 5 muestras de LCR ya que dos se reportaron negativas por CMF- y la CC las reportó como sospechosas de infiltración y las otras tres restantes fueron CMF+/CC sospechosas de infiltración ( $p = 0,01$ ) (Tabla 9).

**Tabla 9. Detección de infiltración en SNC en pacientes con LA (n = 130).**

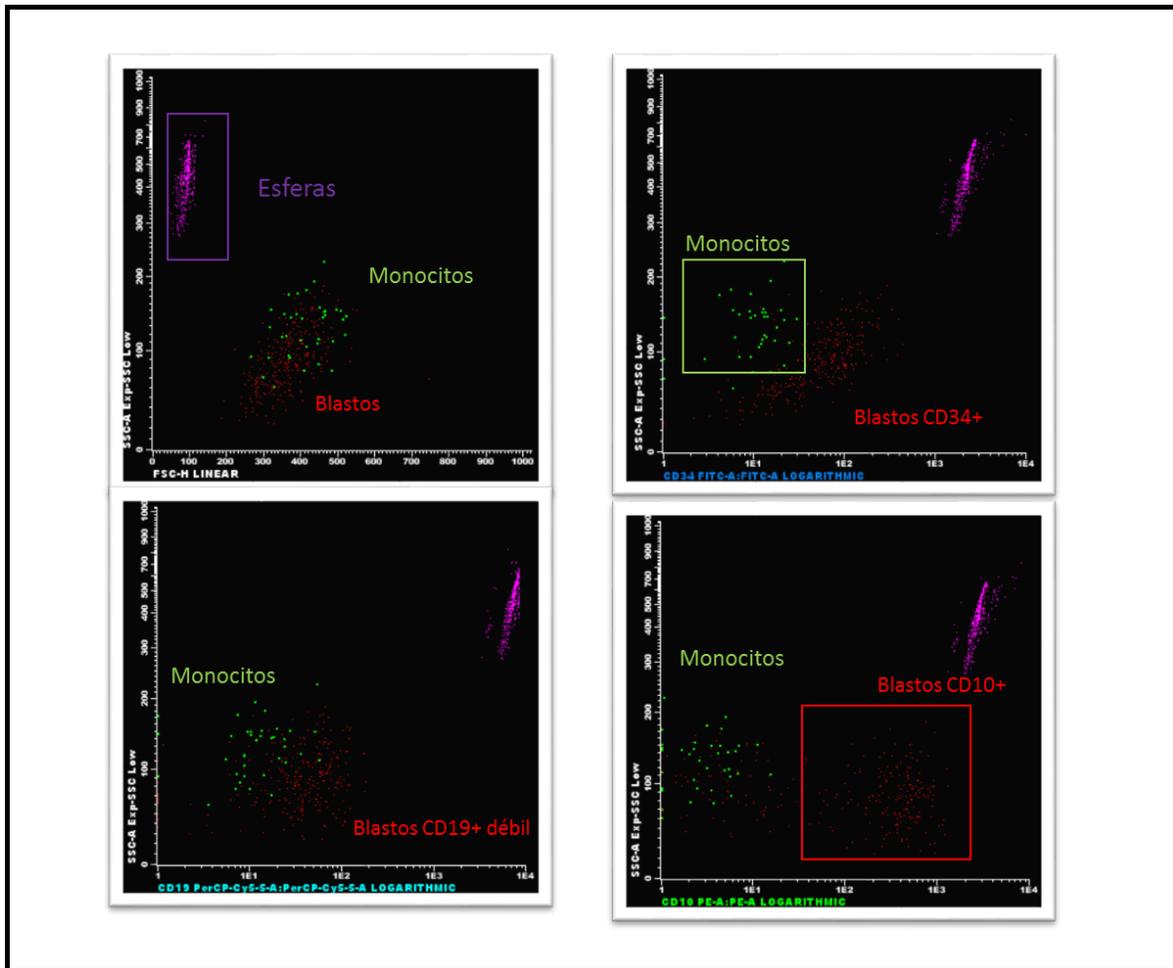
**Resultados de CMF vs CC.**

<b>Análisis comparativo de resultados entre ambas técnicas</b>				
<b>Citología convencional</b>	<b>Citometría de Flujo</b>			<b>p</b>
	<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>	<b>Total</b>	
Positivo	2	0	<b>2</b>	0,01
Negativo	21	102	123	
Sospechoso	3	2	5	
<b>Total</b>	<b>26</b>	104	130	

En las figuras 4 Y 5 se muestran ejemplos representativos de los análisis mediante CMF de LCR de pacientes con LA con su respectivo resultado de CC.



**Figura 4.** Representación del análisis de una muestra de LCR de un paciente con diagnóstico de LLA-B, en el que se detectaron blastos (92,4% que equivalen en números absolutos a 638 células/  $\mu$ l y representadas de color rojo). Los blastos son CD19+, CD10+ y tienen expresión parcial de CD34. En esta muestra también se observaron monocitos (color verde) y linfocitos T (color azul). En color violeta se representa la población de esferas fluorescentes adicionadas a la muestra para realizar los cálculos absolutos. Este caso fue reportado como sospechoso de infiltración por CC.



**Figura 5.** Representación del análisis de una muestra de LCR de un paciente con diagnóstico de LLA-B, en el que se detectaron blastos (48% que equivalen en números absolutos a 63 células/ $\mu$ l y representadas de color rojo). Los blastos son CD19+, CD10+ y CD34+. En esta muestra también se observaron monocitos (color verde). En color violeta se representa la población de esferas fluorescentes adicionadas a la muestra para realizar los cálculos absolutos. Este caso fue reportado como negativo por CC.

## 6.2 Descripción de los hallazgos de CMF y CC en el total de pacientes con

### LA

Se detectaron en total 16/52 pacientes positivos para infiltración en SNC, de los cuales 7 (13,4%) presentaron compromiso al diagnóstico. De los 36 pacientes con LLA-B, 3 (8%) fueron positivos en el momento del diagnóstico y 7 (19%) positivos durante la evolución de la enfermedad. Se identificaron 7 pacientes con LLA-T, de los cuales 1 (14%) fue positivo para infiltración en SNC al diagnóstico y 1 (14%) positivo durante la evolución de la enfermedad. En relación a las LMA (n=8), 2 pacientes (25%) fueron positivos para infiltración en SNC al diagnóstico y 1 (12,5%) positivo durante la evolución de la enfermedad. Un paciente clasificado como LA de linaje mixto fue positivo para infiltración en el momento del diagnóstico (Tabla 10).

**Tabla 10.** Identificación del número de pacientes positivos para infiltración en SNC por CMF teniendo en cuenta la clasificación inmunofenotípica y el momento clínico en que se evaluó.

Diagnóstico	No de pacientes	Momento clínico de evaluación	
		Diagnóstico	Seguimiento
LLA-B	35	3 (8%)	7 (19%)
LLA-T	7	1 (14%)	1 (14%)
LMA	8	2 (25%)	1 (12,5%)
LA MIXTA	2	1 (50%)	0
TOTAL	52	7	9

### 6.3 Cálculo de la concordancia global entre la CMF y la CC

Para calcular la concordancia global entre ambas técnicas se implementó la siguiente ecuación (2).

$$\text{Concordancia Global} = \left( \frac{a + d}{a + b + c + d} \right) * 100$$

Donde

- a) Número de muestras positivas por citometría y citología.
- B) Número de muestras positivas por citometría pero negativas para citología.
- C) Número de muestras negativas por citometría pero positivas por citología.
- D) Número de muestras negativas por ambas técnicas

La concordancia global es igual a 83%. Sin embargo, se hizo el cálculo de la fuerza de la concordancia debido a la cantidad de muestras negativas podrían estar ocultando el valor real de la CMF, para ello se utilizaron las siguientes ecuaciones:

(3) Proporción de acuerdo entre las dos técnicas:

$$pr(a) = \frac{(CMF - CC -) + (CMF + CC +)}{125} = \frac{102 + 2}{125} = 0.83$$

(4) Probabilidad de acuerdo entre CMF y CC se deba al azar

- prA) CMF: POSITIVO: 26 = 0.208. NEGATIVO: 104 = 0.832
- prB) CC: POSITIVO: 2 = 0.016. NEGATIVO: 123 = 0.984

(5) Probabilidad de que las dos técnicas sean positivas:

$$pr(A+) \times pr(B+) = 0.208 \times 0.016 = 0.0033 \times 100 = 0.33\%$$

(6) Probabilidad de que las dos técnicas sean negativas:

$$pr(A-) \times pr(B-) = 0.832 \times 0.984 = 0.818 \times 100 = 0.818\%$$

(7) Suma de probabilidades de decir Positivo y negativo:

$$pr(e): 0.0033 \times 0.818 = 0.8213$$

(8) Índice Kappa (Fuerza de concordancia)

$$k = \frac{pr(a) - pr(e)}{1 - pr(e)} = \frac{0.83 - 0.8213}{1 - 0.8213} = 0.048$$

De acuerdo al valor del índice Kappa para las dos pruebas se obtiene un resultado <0.2 lo cual significa que la concordancia entre las pruebas es **pobre**.

#### **6.4 Análisis de otras poblaciones celulares en muestras de LCR por CMF en pacientes con LA**

En las muestras de LCR infiltradas o no por blastos, se identificaron otras poblaciones celulares que incluyen monocitos, linfocitos T, linfocitos B, neutrófilos, entre otras. De forma general para los 3 tipos de diagnósticos se observó una diferencia significativa entre el recuento absoluto de células en el LCR, teniendo mayores recuentos aquellos positivos para infiltración por CMF (Tablas 11-13). También se observaron diferencias entre las poblaciones celulares presentes en los LCR dependiendo del diagnóstico del paciente, de forma específica los LCR de las LLA-B con infiltración tumoral se encontraron valores absolutos superiores de células totales, monocitos y linfocitos T ( $p=0,000$ ,  $0,001$  y  $0,002$ , respectivamente) en comparación con las muestras no infiltradas (Tabla 11).

**Tabla 11. Análisis de poblaciones celulares presentes en muestras de LCR pacientes con LLA-B con y sin infiltración en SNC.**

Muestras de LCR de pacientes con LLA-B					
VARIABLE	Con infiltración		Sin infiltración		<i>p</i>
	Media	Rango	Media	Rango	
Recuento total de células/μL en LCR	818	0,1-13461	12,5	0,01-220	<b>0,000</b>
Linfocitos T/μL	23,5	0,03-229	5,53	0,001-74	<b>0,001</b>
Monocitos/μL	8,3	0,006-39	1,89	0,006-21	<b>0,002</b>
PMN/μL	95	0,26 - 189	78,5	6-146	ns
Linfocitos B/μL	1,57	0,006-4,7	1,2	0,002-3	ns
Células NK/μL	11,7	11,7 - 11,7	2,96	0,3-7.5	ns
% Blastos	58,4	0,1-98,8	-	-	-
Blastos/μL	868	0,01 - 13232	-	-	-

NS: no significativo.

Mientras que en los LCR de las LLA-T con infiltración tumoral se encontraron valores absolutos superiores de células totales ( $p < 0,001$ ) y de monocitos ( $p = 0,02$ ) en comparación con las muestras no infiltradas (Tabla 12). En cuanto a los LCR de la LMA positivos para infiltración se observaron mayores recuentos absolutos de células totales y de linfocitos T ( $p = < 0,001$ ; respectivamente).

**Tabla 12. Análisis de poblaciones celulares presentes en pacientes con LLA-T con y sin infiltración en SNC.**

Muestras de LCR de pacientes con LLA-T					
VARIABLE	Con infiltración		Sin infiltración		p
	Media	Rango	Media	Rango	
Recuento total de células/ $\mu$ L en LCR	13	0,1-37	0,4	0,009-1,2	<b>&lt;0,001</b>
Linfocitos T/ $\mu$ L	0,95	0,02-1,8	0,3	0,009-1	ns
Monocitos/ $\mu$ L	0,6	0,1-1,1	0,17	0,01-0,63	<b>0,02</b>
% Blastos	11,6	0,07-34,8	-	-	-
Blastos/ $\mu$ L	59	5-94,2	-	-	-

NS: no significativo.

**Tabla 13. Análisis de poblaciones celulares presentes en pacientes con LMA con y sin infiltración en SNC.**

Muestras de LCR de pacientes con LMA					
VARIABLE	Con infiltración		Sin infiltración		p
	Media	Rango	Media	Rango	
Recuento total de células/ $\mu$ L en LCR	117	0,4-352	1,25	0,008-12	<b>&lt;0,001</b>
Linfocitos T/ $\mu$ L	45,7	0,11-137	0,21	0,04-0,52	<b>&lt;0,001</b>
Monocitos/ $\mu$ L	5,2	5,2-5,2	1,6	0,01-12	ns
% Blastos	33,3	9,6-70,4	-	-	-
Blastos/ $\mu$ L	11,4	0,007-33,8	-	-	-

NS: no significativo.

## **6.5 Asociación de los hallazgos de CMF con variables clínico-biológicas de impacto pronóstico en LA**

En los pacientes con LLA-B, la presencia de infiltración tumoral en SNC detectada por CMF se asoció de forma significativa con mayor recuento total de leucocitos en sangre periférica, mayor porcentaje de blastos en MO al diagnóstico y con recuentos absolutos superiores de neutrófilos ( $p < 0,05$ ). Se observó una tendencia a tener menores recuentos de plaquetas en los casos positivos ( $p = 0,07$ ). No se encontró asociación con la citogenética ni con la clasificación de los pacientes según el riesgo. En relación a la respuesta al tratamiento, se encontró que los pacientes con infiltración positiva por CMF mostraron menor respuesta al día 8 con esteroides evidenciándose en el hemograma mayores valores absolutos de blastos ( $p < 0,001$ ) (Tabla 14), además estos pacientes no alcanzaron la remisión completa y de forma particular aquellos que la alcanzaron no la mantuvieron. La supervivencia total también fue inferior en los pacientes con infiltración en SNC ( $p < 0,002$ ) (Tabla 14).

**Tabla 14. Análisis de variables de impacto pronóstico de pacientes con LLA-B agrupados según la presencia o no de infiltración en SNC.**

<b>VARIABLES DE IMPACTO PRONOSTICO EN PACIENTES CON LLA-B n=36</b>				
<b>VARIABLES</b>		<b>CMF- n=24</b>	<b>CMF+ n=11</b>	<b>p</b>
<b>Al diagnóstico</b>				
Recuento de WBC		18.6 (2-161)	80.6 (2.7-426)	<b>&lt;0.001</b>
% Blastos en MO		85.4 (37-97.6)	69.5 (24-95)	<b>0,001</b>
% Blastos en SP		38 (0-88)	43.6 (6-95)	ns
Recuento de plaquetas		132 (6.3-417)	49 (6-125)	<b>0,07</b>
Recuento absoluto de PMN		2.2 (0.1-12.5)	18 (0.06-101.4)	<b>&lt;0.001</b>
Hemoglobina		9.2 (5.1-16.2)	7.6 (4.9-10.6)	ns
LDH		1770 (367-6263)	1306 (350-2627)	ns
<b>Citogenética</b>				
	t (9;22)	9,1	25	
	Normal	59,1	75	
	t (12;21)	4,5		ns
	t (1;19)	9		
	Hiperdiploide	18,2		
<b>Clasificación del riesgo</b>				
	Bajo	45,8	22,2	
	Intermedio	12,5	11,1	ns
	Alto	41,7	66,7	
<b>Infiltración extramedular</b>				
	Si	4,2	100	<b>&lt;0.001</b>
	No	95,8		
<b>Síntomas neurológicos</b>				
		1 (4%)	4 (44%)	<b>&lt;0.001</b>
<b>Respuesta al tratamiento</b>				
Recuento absoluto blastos día 8		540 (0-2,714)	57239 (0-282,768)	<b>&lt;0.001</b>
Remisión completa al final de la inducción				
	Si	95,8	77,8	<b>0,002</b>
	No	4,2	22,2	
Mantiene la remisión completa				
	Si	75	33	<b>0,03</b>
	No	25	67	
Situación de la última visita				
	Vivo con enfermedad	24	62,5	ns
	Vivo sin enfermedad	86	37,5	
Muerte				
	Si	9,1	37,5	<b>0,002</b>
	No	90,9	62,5	

En los pacientes con LLA-T, la presencia de infiltración tumoral en SNC detectada por CMF se asoció de forma significativa con recuentos absolutos superiores de neutrófilos ( $p=0,002$ ) y con trombocitopenia ( $p=0,001$ ). Se observó una tendencia a tener menores porcentajes de blastos en MO y pero mayor presencia de blastos en SP al diagnóstico ( $p=0,08$  y  $p=0,06$ ; respectivamente. De forma similar a lo observado en las LLA-B, los pacientes con LLA-T con infiltración positiva por CMF mostraron menor respuesta al día 8 con esteroides evidenciándose en el hemograma mayores valores absolutos de blastos ( $p<0,001$ ) (Tabla 15).

En los pacientes con LMA, los casos con infiltración de SNC detectada por CMF mostraron mayores porcentajes de blastos en MO ( $p=0,046$ ) y SP ( $p=0,029$ ) y de forma contradictoria menores recuentos de leucocitos ( $p=0,004$ ) (Tabla 16).

**Tabla 15. Análisis de variables de impacto pronóstico de pacientes con LLA-T agrupados según la presencia de infiltración en SNC**

<b>VARIABLES DE IMPACTO PRONOSTICO EN PACIENTES CON LLA-T n=7</b>				
<b>VARIABLES</b>	<b>CMF- n=5</b>	<b>CMF+ n=2</b>	<b>p</b>	
<b>Al diagnostico</b>				
Recuento de WBC	130 (6.2-259)	135.5 (26-245)	ns	
% Blastos en MO	82.8 (68.7-96.7)	78.5 (73.6-83)	<b>0,08</b>	
% Blastos en SP	72.5 (44-96)	53 (12-94)	0,06	
Recuento de plaquetas	111 (36.7-176.7)	24 (20-28)	<b>0,001</b>	
Recuento absoluto de PMN	7.32 (1.6-13)	24 (5.6-42.3)	<b>0,002</b>	
Hemoglobina	9.7 (6.7-12.9)	10.1 (8.2-12)	ns	
LDH	8533 (847-21,500)	6142 (3,166-9,119)	ns	
<b>Citogenética</b>				
	Normal	75	100	ns
	Hiperdiploide	25		
<b>Clasificación del riesgo</b>				
	Bajo			ns
	Intermedio		50	
	Alto	100	50	
<b>Infiltración extramedular</b>				
	Si		100	ns
	No	100		
<b>Respuesta al tratamiento</b>				
Recuento absoluto blastos día 8	1565 (243-3,800)	41730 (20-83,440)	<b>&lt;0.001</b>	
Remisión completa al final de la inducción				
	Si	100	100	ns
	No			
Mantiene la remisión completa				
	Si	100	50	ns
	No		50	
Situación de la última visita				
	Vivo con enfermedad		50	ns
	Vivo sin enfermedad	100	50	
Muerte				
	Si		50	ns
	No	100	50	

**Tabla 16. Análisis de variables de impacto pronóstico de pacientes con LMA agrupados según la presencia de infiltración en SNC.**

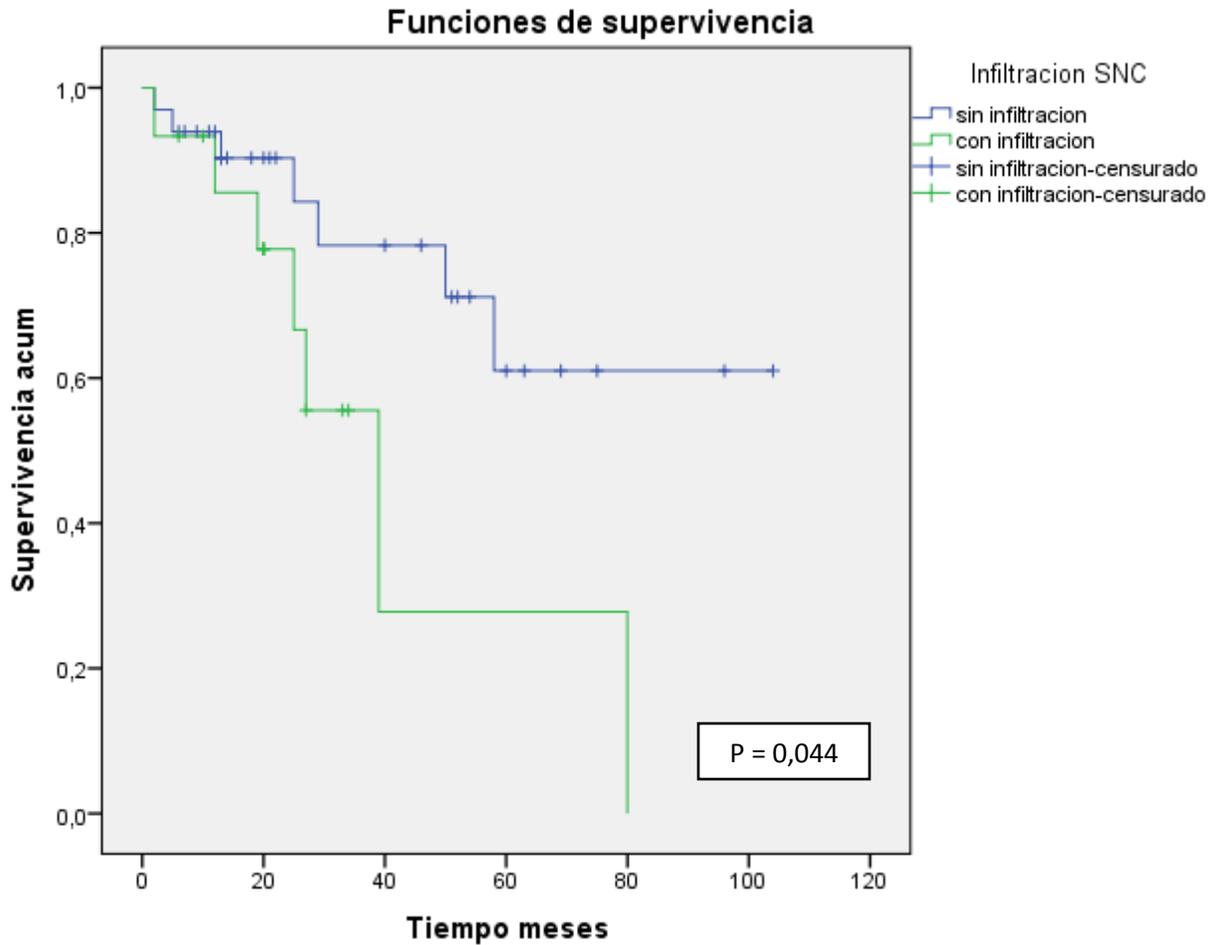
<b>VARIABLES DE IMPACTO PRONOSTICO EN PACIENTES CON LMA n=8</b>			
<b>VARIABLES</b>	<b>CMF- n=5</b>	<b>CMF+ n=3</b>	<b>p</b>
<b>Al diagnostico</b>			
Recuento de WBC	118 (7-286)	34.9 (5-69)	<b>0.004</b>
% Blastos en MO	21.16 (15-39.8)	48.3 (5.9-82)	<b>0.046</b>
% Blastos en SP	33.6 (7-67)	40.7 (30-52)	<b>0.029</b>
Recuento de plaquetas	67 (32-131)	91.8 (27-150)	ns
Recuento absoluto de PMN	52.9 (2.2-179)	10.6 (2.3-17)	ns
Hemoglobina	9.4 (6.1-13.7)	12 (9.1-17.1)	ns
LDH	3625 (893-8143)	2624 (1050-4892)	ns
<b>Citogenética</b>			
t (8;21)	25	33.3	
GATA	25	33.3	ns
Normal	25		
Hiperdiploide	25	33.3	
<b>Clasificación del riesgo</b>			
Favorable		33.3	
Intermedio		33.3	ns
Desfavorable		33.3	
<b>Infiltración extramedular</b>			
Si	20	100	0,09
No	80		
<b>Respuesta al tratamiento</b>			
Remisión completa al final de la inducción			
Si	75	66.7	ns
No	25	33.3	
Mantiene la remisión completa			
Si	50	33.3	ns
No	50	66.7	
Situación de la última visita			
Vivo con enfermedad	40	66.7	ns
Vivo sin enfermedad	60	33.3	
Muerte			
Si	25	33.3	ns
No	75	66.7	

## **6.6 Supervivencia total y enfermedad libre de eventos en pacientes con LA según su resultado de CMF**

Los análisis se hicieron en 48 pacientes de los cuales se tenía información de su estado de salud actual. Los datos obtenidos de cada paciente fueron: fecha de muerte y de recaída. Se compararon estas fechas teniendo en cuenta si tuvieron infiltración en SCN detectada por CMF.

### **6.6.1 Análisis de enfermedad libre de eventos a 5 años de pacientes con LA y resultado de CMF**

En la figura 6 se puede apreciar la gráfica correspondiente a enfermedad libre de eventos de pacientes con LA y con CMF+ (con infiltración) versus CMF- (Sin infiltración). Teniendo en cuenta los datos observados se puede identificar que el 60% de los pacientes CMF+ recaen cerca a los 20 meses luego de ser diagnosticados, contrario a lo observado en pacientes CMF- los cuales siendo el mismo porcentaje recaen en un tiempo aproximado de 60 meses ( $p = 0,044$ ).

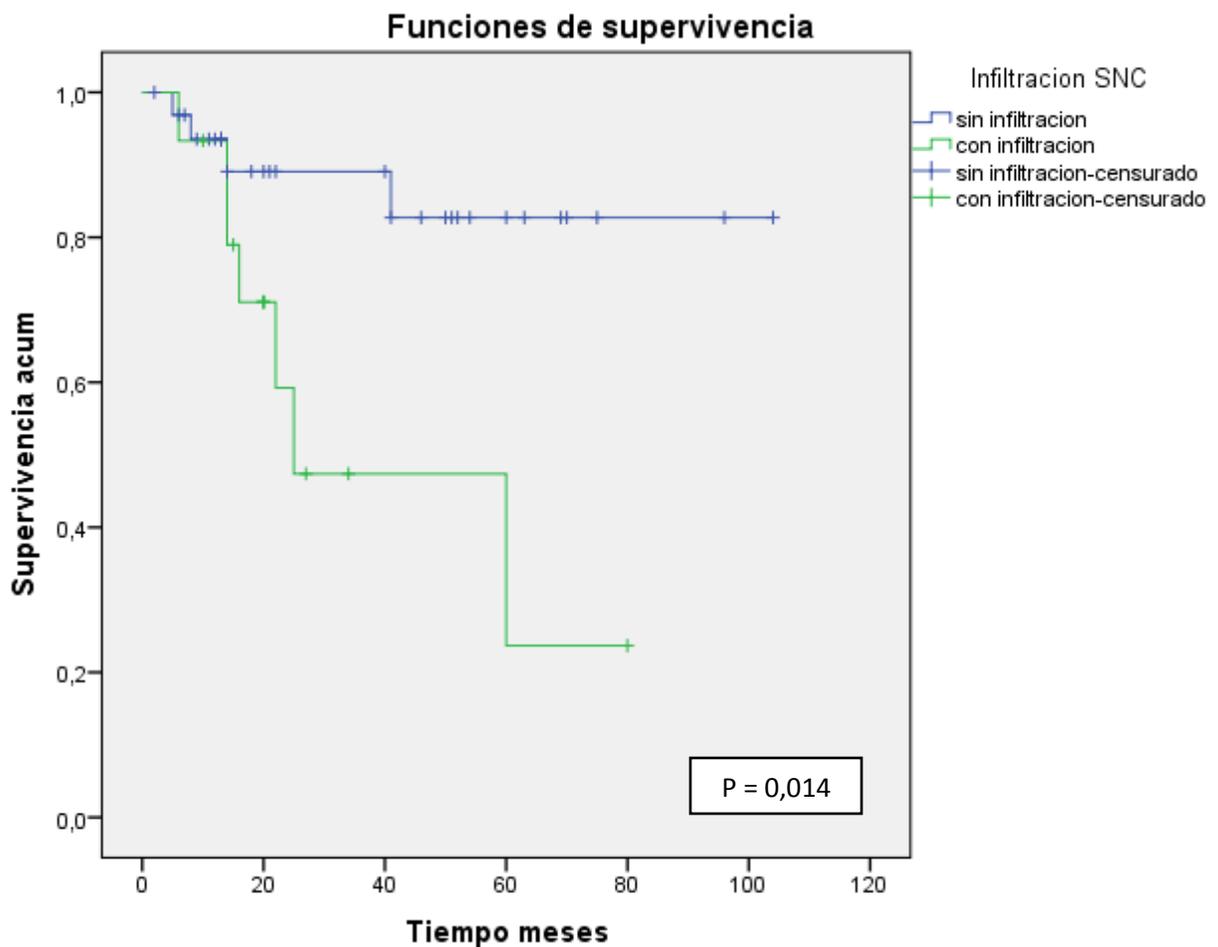


**Figura 6.** Grafica de Kaplan-Meier para enfermedad libre de eventos en pacientes con LA en función su resultado de CMF.

### 6.6.2 Análisis de supervivencia total en pacientes con LA y resultado de CMF

En la figura 7 se puede apreciar la gráfica perteneciente a la supervivencia total de pacientes con LA y con CMF+ (Con infiltración) versus CMF- (Sin infiltración). Teniendo en cuenta los datos observados se puede identificar que 50% de los

pacientes CMF+ mueren cerca a los 20 meses luego de ser diagnosticados y demuestran una supervivencia total aproximada de 80 meses. Contrario a estos pacientes, cerca del 80% que fueron CMF- sobrevivieron más de 40 meses y mantienen una supervivencia total de más de 100 meses según el periodo evaluado ( $p = 0,014$ ).



**Figura 7.** Grafica de Kaplan-Meier para supervivencia total en pacientes con LA en función su resultado de CMF.

## 7. DISCUSIÓN

La infiltración en SNC constituye una complicación clínica asociada a peor pronóstico en pacientes con LA y Linfomas [26], aunque su incidencia es baja aún resulta ser la causa más frecuente de recaída y falla terapéutica [2]. En la actualidad, el diagnóstico de infiltración en SNC se realiza implementando la CC (*Gold estándar*), sin embargo diferentes estudios han demostrado una limitada sensibilidad de la técnica (20-60%) lo cual impacta directamente en el pronóstico del paciente ya que impide el adecuado tratamiento del paciente a nivel de SNC [44], la CC tiene varias limitantes que la hacen difícil de interpretar dentro de estas figura la rápida pérdida celular característica del LCR y la confusión que puede existir entre un blasto tumoral y linfocito reactivo [7, 48]. En los últimos años, la CMF ha sido implementada como alternativa diagnóstica para la detección de infiltración en LCR en pacientes con linfoma y LA, y ha demostrado su superioridad frente a la CC [3, 60, 66-67,69, 71-72]. Recientemente, Ranta et al [3] demostraron la superioridad de la CMF en el diagnóstico de infiltración en SNC en una cohorte de 214 pacientes pediátricos con LLA, de los cuales 20 fueron detectados en total por ambos métodos, 17 de ellos únicamente utilizando CMF y 1 por CC (7.9% vs 0.4%, respectivamente). En adultos con LLA, Maria Iliria del Príncipe et al [71] también observan la alta sensibilidad de la CMF en la detección de enfermedad leptomenígea oculta, en un total de 38 pacientes, 14 (37%) fueron detectados por CMF mientras solo 5 (13%) fueron detectados por CC.

Con base a lo observado en anteriores publicaciones, se planteó como objetivo principal analizar la sensibilidad y la utilidad de la detección de infiltración en SNC

por CMF, comparando los resultados de la CMF y la CC y determinar un conjunto de variables clínico-biológicas que pudieran estar asociadas con infiltración en SNC en pacientes pediátricos con LA frente a aquellos negativos para infiltración, con el fin de proponer como técnica indispensable y confiable para el estudio de muestras de LCR por CMF para la detección de infiltración leptomenígea en estos pacientes.

En concordancia con los hallazgos citados con anterioridad, este trabajo también demuestra la superioridad de la CMF en el diagnóstico de compromiso leptomenígeo por LA, de las 130 analizadas 26 fueron detectadas como positivas por CMF (20%) mientras que únicamente 2 fueron positivas por CC (1.5%), no se presentaron casos CC+/CMF-. Llama la atención que la CC fue positiva cuando la CMF reportó 98% de blastos que en números absolutos correspondían a 13,232 blastos/ $\mu$ L, siendo este un gran hallazgo ya que demuestra que la CC es positiva únicamente cuando el paciente tiene una gran cantidad de células tumorales en el LCR y es asintomático para infiltración. Sin embargo, la evolución clínica de los pacientes CMF+/CC- aún no se puede discernir con exactitud, pero si se puede apreciar con estos hallazgos que el 44% de los pacientes positivos para infiltración demostraron sintomatología en SNC (cefalea, desviación de la mirada, parpadeo dominante por un ojo, convulsiones y alteración de la conciencia), los cuales aparentemente estaban libres de enfermedad por CC. A continuación se citan las publicaciones más relevantes que han comparado los resultados de la CC vs la CMF junto con los resultados de este trabajo (Tabla 17).

Tabla 17 Hallazgos relevantes de publicaciones que comparan la CC vs la CMF

AUTOR	PATOLOGÍA	AÑO DE PUBLICACIÓN	No PACIENTES	No MUESTRAS	EDAD	PAÍS	ESTABILIZANTES	COMBINACIONES DE ANTICUERPOS UTILIZADOS	MEJOR TÉCNICA	PORCENTAJE DE MUESTRAS CMF +	PORCENTAJE DE MUESTRAS CC +
SILVA CAMILA et al	LLA	2013	20	23	PEDIÁTRICO	BRASIL	NO	4	INCONCLUSO	10	5
SANCHO JUAN et al	LINFOMA	2010	123	105	ADULTO	ESPAÑA	TRANSFIX	11	CMF	13	6.6
R. Di. NOTO et al	LINFOMA	2008	42	NO ESPECIFICA	NO ESPECIFICA	ITALIA	NO	4-6	CMF	26	9.5
SUSANA RANTA et al	LLA	2014	214	NO ESPECIFICA	PEDIÁTRICO	FINLANDIA	TRANSFIX	3-8	CMF	7.9	0.4
HOLGER NUCKEL et al	HETEROGÉNEO	2006	50	NO ESPECIFICA	NO ESPECIFICA	ALEMANIA	NO	3	AMBAS TÉCNICAS	33	33
MALCOLM SCHINSTINE et al	HETEROGÉNEO	2006	32	NO ESPECIFICA	ADULTO PEDIÁTRICO	EEUU	NO	3-4	CMF	59	28
CAROLINA MARTINEZ et al	LLA	2013	108	990	PEDIÁTRICO	ESPAÑA	TRANSFIX	6	CMF	27.8	2.8
CRISTOPHER FRENCH et al	HETEROGÉNEO	2000	32	35	NO ESPECIFICA	EEUU	NO	2-3	AMBAS TÉCNICAS	17	14
SABINE URBANIST et al	LINFOMA	2002	18	NO ESPECIFICA	ADULTO	AUSTRIA	NO	4	CMF	60	33

AUTOR	PATOLOGÍA	AÑO DE PUBLICACIÓN	No PACIENTES	No MUESTRAS	EDAD	PAÍS	ESTABILIZANTES	COMBINACIONES DE ANTICUERPOS UTILIZADAS	MEJOR TÉCNICA	PORCENTAJE DE MUESTRAS CMF +	PORCENTAJE DE MUESTRAS CC +
FIONA E. CRAIG et al	HETEROGÉNEO	2011	145	230	NO ESPECIFICA	EEUU	NO	4	CMF	3	0.86
CLARA CESANA et al	HETEROGÉNEO	2011	110	227	NO ESPECIFICA	ITALIA	NO	4	AMBAS TÉCNICAS	19.3	14.5
UPENDRA HEGDE et al	LINFOMA	2005	51	NO ESPECIFICA	ADULTO PEDIÁTRICO	EEUU	NO	3-4	CMF	22	2
MARIA ILARIA DEL PRINCIPE et al	LLA	2014	38	NO ESPECIFICA	ADULTO	ITALIA	NO	6-8	CMF	37	13
SANDRA QUIJANO et al	LINFOMA	2009	123	123	ADULTO	ESPAÑA	TRANSFIX	9	CMF	22	6
DOUAA SAYED et al	LLA	2009	45	NO ESPECIFICA	PEDIÁTRICO	EGIPTO	NO	3-4	CMF	46	22
ZAHY MATRI et al	LLA	2014	80	800	ADULTO	EEUU	NO	4	INCONCLUSO	1.25	1.5
ROLAND SCHROERS et al	LINFOMA	2010	37	NO ESPECIFICA	ADULTO	ALEMANIA	NO	5	AMBAS TÉCNICAS	27.9	18.9
GIULIA BENEVOLO et al	LINFOMA	2012	174	NO ESPECIFICA	ADULTO	ITALIA	NO	3-4	CMF	10	4
ALESSANDRA STACCHINI et al	LINFOMA	2012	44	62	NO ESPECIFICA	ITALIA	NO	10	CMF	24	16
MEREDITH PITTMAN et al	LINFOMA	2013	373	501	ADULTO	EEUU	NO	5	AMBAS TÉCNICAS	5	4
XIMENA TORRES et al	LA	2016	52	130	PEDIÁTRICO	COLOMBIA	TRANSFIX	6-8	CMF	16	1,5

Por otra parte y contrario a lo reportado por algunos autores quienes han demostrado resultados discordantes como CC+/CMF- [52, 54, 63, 65], en este análisis de resultados no se encontraron casos positivos por CC y negativos por CMF, sin embargo si se reportaron 3 muestras CMF+ y CC sospechosas en donde los pacientes si cursaron con sintomatología en SNC, lo cual apoya el resultado por CMF. También se analizaron 2 muestras CMF- y CC sospechosas aunque los pacientes no presentaron síntomas de infiltración en SNC, nuevamente apoyando lo observado por CMF. Observando estos resultados se demuestra que las técnicas no son complementarias entre sí lo cual también se corrobora con el cálculo del índice *Kappa* el cual permite conocer la concordancia entre las técnicas, que para este caso puntual es 0.048 siendo menor a 0.2 se puede determinar que la concordancia entre las técnicas es pobre.

La CC tiene varias desventajas que claramente afectan su desempeño, dentro de ella están que el LCR se caracteriza por ser un fluido paucicelular, en donde se necesitan según algunos reportes, al menos 10 ml de LCR para que el análisis sea confiable, necesitándose varias tomas de muestras para aumentar la sensibilidad de la técnica, adicionalmente pierde viabilidad rápidamente y se presta para confusión en cuanto a la diferenciación de células neoplásicas y células normales [48], para sopesar estas dificultades se implementaron las recomendaciones del Servicio de Citometría de la Universidad de Salamanca y del Consorcio Europeo Euroflow utilizando un protocolo estandarizado en donde se recomienda el uso de 6-8 fluorescencias para el marcaje de muestras de LCR y en conjunto con el uso de Transfix™ (cytomark) como estabilizador del LCR para estos análisis. Con

estas recomendaciones implementadas en el presente trabajo se logró una sensibilidad de detección de 0.01 blastos/ $\mu$ L en volúmenes de LCR inferiores a 1 ml, este resultado apoya aún más la capacidad superior de la técnica en el diagnóstico de enfermedad leptomenígea oculta.

El compromiso en SNC al momento del diagnóstico es una variable de impacto pronóstico muy importante para los pacientes, con este trabajo se reporta un porcentaje de infiltración correspondiente a 13,4% (7/52) detectado por CMF en el total de casos de LA, el cual resulta ser el doble de lo observado por Buendía et al quien ha hecho el único estudio en Colombia que reportó en pacientes con LLA un porcentaje de infiltración detectado por CC más no por CMF equivalente a un 6% de casos positivos en una cohorte de 100 pacientes, si bien el objetivo del trabajo de Buendía et al no era detectar la incidencia de casos positivos para infiltración en SNC, sus resultados habían sido hasta este momento el único dato disponible asociado a los pacientes en Colombia. Adicionalmente, se observa que la CMF no solo logra detectar los pacientes con infiltración en SNC al diagnóstico sino también es capaz de detectarlos durante la evolución clínica de la enfermedad, esta capacidad de detección es muy relevante ya que los pacientes con LA reciben quimioterapia intratecal de forma profiláctica y bajo este escenario es aún más difícil la detección de células tumorales, la CMF logro detectar un 17.3% (9/52) de casos positivos para infiltración luego de haber iniciado tratamiento.

El análisis comparativo de las poblaciones celulares por CMF en pacientes con o sin infiltración agrupados según su diagnóstico demostró un aumento importante

de los recuentos celulares en todas las patologías, aunque su componente varía entre cada una de ellas, según lo observado en los LLA-B aumentan tanto los recuentos de monocitos como los de linfocitos T, mientras que para las LLA-T se observa incremento en los recuentos de monocitos y para las LMA incrementos de linfocitos T. Pocos estudios describen las poblaciones celulares presentes en los LCR con infiltración en pacientes con LA, sin embargo el trabajo realizado en Linfomas agresivos por Quijano et al demuestra de forma similar a este trabajo, mayores recuentos de células totales en los LCR acompañados de un aumento en el recuento de linfocitos T [73]. En pacientes con LA y Linfomas, Almeida et al observa mayores recuentos de monocitos, linfocitos T y neutrófilos, aunque esta determinación fue realizada por CC [20].

Es importante resaltar que el tráfico de linfocitos T y monocitos a través de la BHE se hace de forma libre aunque en pequeñas cantidades [5], sin embargo el paso de estas poblaciones en pacientes infiltrados en SNC y LA podría favorecer un microambiente tumoral pro-inflamatorio. El aumento del reclutamiento de leucocitos desde la sangre periférica a la BHE puede surgir como consecuencia de un proceso inflamatorio inducido por la misma quimioterapia intratecal que altera la permeabilidad de la BHE activando las células endoteliales presentes en dicho sitio y favoreciendo el paso tanto de leucocitos como de blastos al interior de esta o menos frecuente por infecciones secundarias que eventualmente pueda presentar el paciente debido a una inmunodeficiencia secundaria al tratamiento [79]. Bajo este escenario cabe la posibilidad de un tránsito temporal de blastos al

LCR que no siempre desencadena un proceso patológico, aunque determinar bajo que concentración estas células puedan afectar el SNC sigue siendo tema de discusión [77], aunque con la implementación de la CMF en este tipo de diagnóstico se pueden crear nuevos rangos o clasificaciones que permitan discernir de forma más sensible y específica un conteo absoluto de células acorde con la manifestación de la enfermedad en este sitio anatómico.

Los parámetros clínico-biológicos contemplados en este trabajo se analizaron teniendo en cuenta las variables asociadas a peor pronóstico en pacientes con LA según la Guía de Práctica Clínica para la detección oportuna, diagnóstico y seguimiento de leucemia linfocítica aguda y leucemia mieloide aguda en niños, niñas y adolescentes del 2013. Se realizó un análisis comparativo entre los diferentes diagnósticos y la presencia o no de infiltración en SNC detectado por CMF.

La infiltración en SNC en pacientes con LA se asoció de forma significativa con mayor porcentaje de blastos en MO para los pacientes con LMA, aunque en los pacientes con LLA-B y LLA-T se observa menor infiltración en MO. En cierta medida estos hallazgos son contradictorios y no se han reportado estas variables asociadas a infiltración en SNC, sin embargo de forma hipotética podría pensarse que los pacientes que son positivos para infiltración en SNC movilizan más blastos desde la MO hacia el SNC explicando de cierta forma este resultado.

En pacientes con LLA-B se puede asociar la infiltración en SNC con leucocitosis, este hallazgo es acorde a lo descrito ya que se considera como una variable

asociada a mayor riesgo de recaída en SNC aunque ha sido descrita principalmente en pacientes con LLA-T (hiperleucocitosis), sin embargo en este estudio no se encontró diferencia significativa en los pacientes con este tipo de diagnóstico [3]. Es importante recalcar que los pacientes que presentan hiperleucocitosis son propensos a desarrollar leucostasis con la consecuente falla multiorgánica asociada a la lisis tumoral, esta complicación debe ser tratada de forma inmediata ya que puede comprometer la vida del paciente y además resulta ser un impedimento para realizar punción lumbar en el caso de sospecha de infiltración en SNC o en la valoración inicial para determinar compromiso en SNC al diagnóstico [8].

Los resultados obtenidos en cuanto al porcentaje de blastos en SP son significativos aunque contradictorios en pacientes con LLA-T y LMA, si bien es cierto que esta variable no ha sido considerada como factor pronóstico de infiltración en SNC podría estar vinculada a un tránsito temporal de blastos que tendrán el potencial de hacer infiltración extramedular incluyendo SNC.

En pacientes con LLA e infiltración en SNC se observó asociación con trombocitopenia, esta manifestación clínica ha sido relacionada en otros estudios con mayor riesgo de infiltración en SNC ya que por un lado puede aumentar el riesgo de realizar una punción lumbar traumática que podría eventualmente introducir de forma involuntaria blastos al LCR durante el procedimiento, es por ello que el recuento de plaquetas siempre se debe realizar antes de llevarse a cabo la punción lumbar, el rango descrito de requerimiento para transfusión de

plaquetas es cuando el paciente presenta menos de  $100 \times 10^9/L$ , por otro lado también puede presentarse riesgo de sangrado a nivel de SNC y favorecer el ingreso de blastos al LCR [2, 28]. Este hallazgo no se observó en pacientes con LMA.

Otro factor identificado en pacientes con infiltración en SNC y LLA es la presencia de neutrofilia. Un estudio reciente describe la presencia de neutrofilia en SP y en el tumor instaurado (neutrófilos asociados a tumor), como un factor pronóstico importante en el seguimiento de pacientes oncológicos. El impacto clínico está basado en la capacidad de los neutrófilos a asociarse a células tumorales, generando así eventos de mal pronóstico para el paciente como la angiogénesis, invasión y metástasis de células tumorales. El constante estudio de la relación de los neutrófilos con las células tumorales ha generado diferentes esfuerzos terapéuticos cuyos blancos principales han sido la inhibición del reclutamiento de los neutrófilos al tejido tumoral o las funciones pro-tumorigénicas antes descritas [80]. Este reporte concuerda con lo observado en pacientes con LLA, quienes a pesar de no haber demostrado de forma significativa la presencia de neutrófilos en el LCR, si demuestran conteos absolutos en SP lo cual podría ser un factor clave en el pronóstico de infiltración en SNC,

Se han descrito diferentes alteraciones genéticas asociadas a mayor riesgo de infiltración en SNC como:  $t(9;22)$  (q34;q11) con BCR-ABL;  $t(4;11)$  con MLL-AF4; inv 16 y  $t(1;19)$  con E2A-PBX1 [2, 3, 30], las cuales también impactan junto con otras variables la clasificación del riesgo del paciente [1]. Sin embargo, en le

presente trabajo no se encontró asociación entre la presencia de alteraciones genéticas y la infiltración en SNC. Estos hallazgos pueden estar asociados al bajo número de casos positivos para las alteraciones genéticas encontradas.

De forma importante, tampoco se encontró relación entre la concentración de hemoglobina y los niveles de LDH, esta última si se ha reportado asociada a mal pronóstico para pacientes con LLA e infiltración en SNC [32].

En cuanto a la respuesta al tratamiento se encontró que los pacientes con infiltración positiva por CMF y LLA-B, mostraron menor respuesta al día 8, no lograron la remisión completa o en casos en las que si la alcanzaron no la lograron mantener. Sin embargo, es importante destacar que la infiltración en SNC repercute directamente en la respuesta al tratamiento de estos pacientes porque se evidenció mayor mortalidad en aquellos que fueron detectados como positivos para infiltración lo cual se puede explicar teniendo en cuenta la falta de respuesta a los esteroides y al no lograr la remisión completa, estos pacientes además recaen más rápido en comparación a los pacientes negativos para infiltración en SNC, este hallazgo corrobora que el SNC es un santuario para los blastos leucémicos [25].

Con respecto a los pacientes con LLA-T e infiltración en SNC detectada por CMF, también se observa pobre respuesta con corticoides medida en el día 8 post tratamiento, lo cual se asocia con peor pronóstico para el paciente [1]. Sin embargo, para este tipo de patología la falta de respuesta a este tipo de

tratamiento no se asocia con mayor mortalidad aunque podría tratarse de un valor subestimado dado el tamaño de la muestra para hacer este tipo de análisis y la falta de información respecto a la evolución de algunos de ellos por pérdida de la comunicación de las entidades tratantes con el paciente, esta variable se relaciona con procesos administrativos propios de la EPS o porque los pacientes solicitaban traslado para sus ciudades de origen, este problema afecta la adecuada recolección de datos de algunos pacientes diagnosticados con LA para este estudio.

El diagnóstico de infiltración en SNC tiene un significado pronóstico muy importante para el paciente en términos de sobrevida, ya que dependiendo de ello se suministra una terapia dirigida a SNC o solo se actuara de forma profiláctica [77]. El error en el diagnóstico repercute en la decisión clínica generando consigo fallas terapéuticas que podrían comprometer la vida del paciente. El impacto pronóstico de la CMF en el diagnóstico de infiltración leptomeníngea teniendo en cuenta la supervivencia total y la enfermedad libre de eventos de los pacientes con LA, determinó que aquellos positivos para infiltración tienen menor sobrevida y recaen más rápido en comparación a aquellos negativos para infiltración. Estos hallazgos resultan ser de vital importancia ya que demuestran una clara asociación entre los resultados de CMF y el pronóstico del paciente, teniendo un peor desenlace aquellos que fueron CMF+ ya que presentaban enfermedad leptomeníngea oculta, no presentaban sintomatología asociada y no fueron detectados por la CC, en términos generales estos pacientes no recibieron terapia

dirigida al SCN y por tanto se afectó su pronóstico en términos de sobrevida. Sin lugar a duda la detección oportuna de los pacientes con compromiso en SNC los beneficiaría al recibir un tratamiento terapéutico mas no profiláctico. Estos resultados también son extrapolables a la enfermedad libre de eventos en pacientes CMF+, quienes también demuestran mayores tasas de recaída lo cual se puede relacionar con una falla terapéutica debido al suministro inadecuado de tratamiento a los pacientes con estos hallazgos. Sin embargo, esta falla no es fácil de identificar ya que los médicos tratantes no pueden apreciar el compromiso en SNC porque la CMF no hace parte de la rutina diagnostica en Colombia y la CC no logra detectar este tipo de compromiso de forma eficiente.

Los resultados obtenidos de la correlación entre pacientes CMF+ y supervivencia total, son similares a los observados por Del Príncipe et al quienes evaluaron este comportamiento en pacientes con LLA en etapa adulta, observando menores tasas de sobrevida en pacientes con CMF+ [72]. La evaluación realizada por Ranta et al en niños con LLA también se correlaciona de forma similar a los resultados descrito anteriormente con mayores tasas de recaída en pacientes CMF+ y CC- [4].

## 8. **CONCLUSIONES**

- La CMF es la mejor técnica para el diagnóstico de infiltración en SNC, ya que logra detectar pequeñas cantidades de blastos leucémicos presentes en las muestras de LCR (0.01 células/ $\mu$ L) y se correlaciona con la presencia de sintomatología asociada a compromiso en SNC en los pacientes con LLA-B. Por tanto debe ser implementada dentro de los protocolos diagnósticos de pacientes con LA.
- La CMF y la CC son positivas únicamente cuando el paciente tiene una carga tumoral en LCR, lo cual es perjudicial para el tratamiento del paciente. Idealmente, es necesario el diagnosticarlo antes de que ocurra la recaída y las complicaciones en SNC y para ello se debe utilizar una técnica bastante difícil capaz de detectar mínimas concentraciones de blastos leucémicos en el LCR. Todas estas características las cumple la CMF.
- Los estudios realizados implementando CMF permitieron conocer la incidencia de infiltración en SNC en pacientes con LA es equivalente al 13.4 %. Este dato hasta el momento no era conocido con exactitud.
- La CMF permitió la identificación de poblaciones celulares en el LCR de todos los pacientes con LA. Las LLA-B demuestran tener un ingreso importante de linfocitos T y monocitos infiltrantes en el LCR, mientras que

la LLA-T presentan mayor afluencia de monocitos, y las LMA presentan mayores cantidades de linfocitos T.

- Los resultados positivos por CMF para infiltración en SNC resultan estar acordes con la sintomatología clínica asociada a la paciente, siendo este hallazgo de gran importancia a nivel de valor predictivo positivo de la técnica.
- Los reportes de la CMF permiten la cuantificación de los blastos leucémicos presentes en la muestra, a diferencia de la CC que únicamente reporta los resultados de forma cualitativa (Positivo, negativo, sospechoso y atípico)
- La infiltración en SNC en pacientes con LA varía dependiendo el diagnóstico, aunque comparten algunos factores asociados con infiltración.
  - LLA-B: menor carga tumoral en MO al diagnóstico, leucocitosis, trombocitopenia y neutrofilia, asociación con sintomatología en SNC, pobre respuesta al tratamiento y mayor mortalidad
  - LLA-T: menores porcentajes de blastos en MO y SP al dx, trombocitopenia y neutrofilia y pobre respuesta al día 8 de esteroides.
  - LMA: mayor porcentaje de blastos en MO y SP.
- Los pacientes con LA y CMF+ presentan menor supervivencia total y mayores recaídas en comparación a aquellos CMF-. Gran cantidad de pacientes no fueron tratados adecuadamente dados los hallazgos de CC ya que no detecto en la mayoría de casos el compromiso en SNC.

## 9. PERSPECTIVAS Y APLICACIONES

Los resultados de este trabajo impactaran directamente en los esquemas de tratamiento y diagnóstico de pacientes con LA en nuestro país, ya que actualmente la CMF figura como técnica sugerida en casos puntuales como: pacientes que requieren estadificación, aquellos que no hayan recibido tratamiento y que recibieron esteroides u otros citotóxicos para tratar otro tipo de enfermedades diferentes al cáncer [1]. Los resultados de la CMF demuestran que puede ser utilizada en cualquier momento de la evolución de la enfermedad, independientemente del tratamiento que reciba el paciente ya que esto no afecta la sensibilidad ni el desempeño de la técnica. Sin lugar a duda, los pacientes serán beneficiados con la implementación de la CMF ya que la infiltración en SNC podrá ser detectada incluso antes del inicio de la sintomatología siendo este hecho en términos económicos muy conveniente para el paciente y su EPS.

De este trabajo se desprende una investigación futura concerniente a moléculas solubles que están implicadas en infiltración en SNC en pacientes con LA, para ello se realizara un análisis comparativo entre las moléculas presentes en el plasma de MO y el sobrenadante de los LCR de pacientes con y sin infiltración que consintieron participar en este proyecto, las muestras todavía se están recolectado. Adicionalmente, se podrá realizar una caracterización de moléculas presentes en el LCR de un mismo paciente que haya presentado infiltración en SNC con el fin de observar la aparición de moléculas nuevas que antes de la infiltración no estuvieran presentes.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Colciencias, M.d.S.y.P.S.-. Guía de Práctica Clínica para la detección oportuna, diagnóstico y seguimiento de leucemia linfocítica aguda y leucemia mieloide aguda en niños, niñas y adolescentes. 2013. **Guía No 9**.
2. Pui, C.-H. and S.C. Howard, Current management and challenges of malignant disease in the CNS in paediatric leukaemia. *The Lancet Oncology*, 2008. **9**(3): p. 257-268.
3. Pui, C.H. and E. Thiel, Central nervous system disease in hematologic malignancies: historical perspective and practical applications. *Semin Oncol*, 2009. **36**(4 Suppl 2): p. S2-S16.
4. Ranta, S., et al., Detection of central nervous system involvement in childhood acute lymphoblastic leukemia by cytomorphology and flow cytometry of the cerebrospinal fluid. *Pediatr Blood Cancer*, 2015. **62**(6): p. 951-6.
5. de Graaf, M.T., et al., Flow cytometric characterization of cerebrospinal fluid cells. *Cytometry B Clin Cytom*, 2011. **80**(5): p. 271-81.
6. Ahluwalia, M.S., P.K. Wallace, and D.M. Peereboom, Flow cytometry as a diagnostic tool in lymphomatous or leukemic meningitis: ready for prime time? *Cancer*, 2012. **118**(7): p. 1747-53.
7. de Jongste, A.H., et al., Use of TransFix cerebrospinal fluid storage tubes prevents cellular loss and enhances flow cytometric detection of malignant hematological cells after 18 hours of storage. *Cytometry B Clin Cytom*, 2014. **86**(4): p. 272-9.

8. Onciu, M., Acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2009. **23**(4): p. 655-74.
9. Pui, C.-H., L.L. Robison, and A.T. Look, Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet*, 2008. **371**(9617): p. 1030-1043.
10. Lustosa de Sousa, D.W., et al., Acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents: prognostic factors and analysis of survival. *Rev Bras Hematol Hemoter*, 2015. **37**(4): p. 223-9.
11. Vera, A.M., et al., Experiencia en el análisis de la mortalidad por leucemia aguda pediátrica en el Instituto Nacional de Cancerología. *Biomédica*, 2012. **32**(3).
12. Chiarini, F., et al., Advances in understanding the acute lymphoblastic leukemia bone marrow microenvironment: From biology to therapeutic targeting. *Biochim Biophys Acta*, 2016. **1863**(3): p. 449-63.
13. Piñeros Marion, P.C., Otero Johana, Suárez Amaranto, Vizcaíno Martha, Álvarez Victor Hugo, Castiblanco César, Trejo Ruby, Guidelines for Epidemiologic Surveillance of Acute Pediatric Leukemias in Colombia. *Rev Colomb Cancerol*, 2007. **11**(4): p. 219-227.
14. S, M.G., Beyond the 2008 World Health Organization classification the role of the hematopathology laboratory in the diagnosis and management of acute lymphoblastic leukemia. Elsevier, 2008. **29**(1): p. 2-11.
15. Swerdlow SH, C.E.a.H.N., WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. . 4th Edition ed2008, Lyon, France: IARC Press.

16. Bhojwani, D., J.J. Yang, and C.H. Pui, Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Clin North Am*, 2015. **62**(1): p. 47-60.
17. Martha Vizcaíno, C.G., Iliana De los Reyes, Sandra Quijano, Alba Campos, Diagnóstico de leucemias bifenotípicas por citometría de flujo. *Biomédica* 2010. **30**: p. 22-6.
18. Seegmiller AC, K.S., Karandikar NJ, McKenna RW, Characterization of immunophenotypic aberrancies in 200 cases of B acute lymphoblastic leukemia. *Am J Clin Pathol* 2009. **132**: p. 940-9.
19. Saavedra C, Q.S., Romero M, Jaramillo R, Orduz R, Echeverri C, et al. , Reporte del Primer Consenso Colombiano de Citometría de Flujo para el estudio de trastornos hematológicos. *Biomedica*, 2012. **30**: p. 11–21.
20. Sérgio M. de Almeida, E.N., Arnaldo J. de Conto, Luciana P. Souza, Dario Antonelli Filho, Carlos D. Roda, Cerebrospinal fluid cytological and biochemical characteristics in the presence of CNS neoplasia. *Arq Neuropsiquiatr* 2007. **65(3-B)**: p. 803-809.
21. Davis K, M.N., Arber D, Ma L, Cherry A, Dahl G, Heerema-McKenney A, Pediatric Acute Myeloid Leukemia as Classified Using 2008 WHO Criteria. A Single-Center Experience. *Am J Clin Pathol* 2013. **139**: p. 818-825.
22. Porwit, A. and M.C. Bene, Acute leukemias of ambiguous origin. *Am J Clin Pathol*, 2015. **144**(3): p. 361-76.
23. Burger, B., Diagnostic Cerebrospinal Fluid Examination in Children With Acute Lymphoblastic Leukemia: Significance of Low Leukocyte Counts With

- Blasts or Traumatic Lumbar Puncture. *Journal of Clinical Oncology*, 2003. **21**(2): p. 184-188.
24. Kong, S.G., et al., Childhood acute lymphoblastic leukemia with hyperleukocytosis at presentation. *Blood Res*, 2014. **49**(1): p. 29-35.
  25. Inaba, H., M. Greaves, and C.G. Mullighan, Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet*, 2013. **381**(9881): p. 1943-1955.
  26. Chamberlain, M.C., Neoplastic meningitis. *Neurologist*, 2006. **12**(4): p. 179-87.
  27. Chiarini Francesca, L.A., Evangelisti Camilla, Buontempo Francesca, Orsini Ester, Evangelisti Cecilia, Cappellini Alessandra, Neri Luca M, . McCubrey James A and Martelli Alberto M., Advances in understanding the acute lymphoblastic leukemia bone marrow microenvironment From biology to therapeutic targeting *Biochimica et Biophysica Acta*, 2015.
  28. Chamberlain, M.C., C. Nolan, and L.E. Abrey, Leukemic and lymphomatous meningitis: incidence, prognosis and treatment. *J Neurooncol*, 2005. **75**(1): p. 71-83.
  29. Lazarus, H.M., et al., Central nervous system involvement in adult acute lymphoblastic leukemia at diagnosis: results from the international ALL trial MRC UKALL XII/ECOG E2993. *Blood*, 2006. **108**(2): p. 465-72.
  30. Taylor, J.W.a.K., Central nervous system prophylaxis in haematological malignancies. *Internal Medicine Journal* 2002. **32**: p. 252–258.
  31. Mahmoud, H.H., Rivera, G. K., Hancock, M. L., Krance, R. A., Kun, L. E., Behm, F. G., ... & Pui, C. H. , Low leukocyte counts with blast cells in

- cerebrospinal fluid of children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia. *New England Journal of Medicine*, 1993. **329**(5): p. 314-319.
32. M Krajinovic, I.C., S Chiasson, Polymorphism of the thymidylate synthase gene and outcome of acute lymphoblastic leukaemia *Lancet*, 2002. **359**: p. 1033–34.
33. Rocha, J.C.C., Cheng, C., Liu, W., Kishi, S., Das, S., Cook, E. H., & Pui, C. H., Pharmacogenetics of outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 2005. **105**(12): p. 4752-4758.
34. Ohanian Maro, R.U., Ravandi Farhad, Garcia-Manero Guillermo, Jabbour Elias, M. Kantarjian Hagop and Estrov Zeev, Very high levels of lactate dehydrogenase at diagnosis predict central nervous system relapse in acute promyelocytic leukaemia *British Journal of Haematology*, 2014. **169**: p. 595–604.
35. Williams MT, Y.Y., Cox C, Blair A, Carmody R, Sai S, et al, IL-15 enhances cellular proliferation and upregulated homing molecules in pre-B acute lymphoblastic leukemia *Blood*, 2014. **123**(20): p. 3116–27.
36. Cario, G., et al., High interleukin-15 expression characterizes childhood acute lymphoblastic leukemia with involvement of the CNS. *J Clin Oncol*, 2007. **25**(30): p. 4813-20.
37. Johnston, D.L., et al., Risk factors and therapy for isolated central nervous system relapse of pediatric acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(36): p. 9172-8.

38. Davis, I.R. and D.A. Westerman, Cerebrospinal fluid analysis by flow cytometry in acute lymphoblastic leukemia: is it all that it is cracked up to be? *Leuk Lymphoma*, 2014. **55**(7): p. 1441-3.
39. Kleine, T.O. and L. Benes, Immune surveillance of the human central nervous system (CNS): different migration pathways of immune cells through the blood-brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier in healthy persons. *Cytometry A*, 2006. **69**(3): p. 147-51.
40. Si, M.Y., et al., The prognostic significance of serum and cerebrospinal fluid MMP-9, CCL2 and sVCAM-1 in leukemia CNS metastasis. *J Neurooncol*, 2015. **122**(2): p. 229-44.
41. Silvia Buonamici, T.T., Maria Grazia Ruocco, Linsey Reavie, Severine Cathelin, Brenton G., Apostolos Klinakis, Yevgeniy Lukyanov, Jen-Chieh Tseng, Filiz Sen, Eric Gehrie, Mengling Li, Elizabeth Newcomb, Jiri Zavadil, Daniel Meruelo, Martin Lipp, Sherif Ibrahim, Argiris Efstratiadis, and J.S.B. David Zagzag, Michael L. Dustin and Iannis Aifantis, CCR7 signalling as an essential regulator of CNS infiltration in T-cell leukaemia *Nature*, 2009. **459**(18): p. 1000-1005.
42. Ana M. Gómez, C.M., Miguel González, Alfonso Luque, Gustavo J. Melen, Jesús Martínez, Sonsoles Hortelano, Álvaro Lassaletta, LuíMadero and Manuel Ramírez, Chemokines and relapses in childhood acute lymphoblastic leukemia A role in migration and in resistance to antileukemic drugs *Blood Cells, Molecules and Diseases*, 2015. **55**: p. 220–227.

43. Arik Eisenkraft, I.K., Bela Bielorai, Nathan Keller, Amos Toren and Gideon Paret, MCP-1 in the cerebrospinal fluid of children with acute lymphoblastic leukemia *Leukemia Research* 2006. **30**: p. 1259–1261.
44. Shenoy, A.R., S. Kirschnek, and G. Häcker, IL-15 regulates Bcl-2 family members Bim and Mcl-1 through JAK/STAT and PI3K/AKT pathways in T cells. *European Journal of Immunology*, 2014. **44**(8): p. 2500-2507.
45. Wonbae Lee, S.J.K., Soonwook Lee, Jayoung Kim, Myungshin Kim, Jihyang Lim, Yonggoo Kim, Bin Cho, Eun Jung Lee and Kyungja Han, Significance of cerebrospinal fluid sIL-2R level as a marker of CNS involvement in acute lymphoblastic leukemia. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 2005. **35**(407-412).
46. Galati, D., R. Di Noto, and L. Del Vecchio, Diagnostic strategies to investigate cerebrospinal fluid involvement in haematological malignancies. *Leuk Res*, 2013. **37**(3): p. 231-7.
47. Wasserstrom W, G.J., Posner J, Diagnosis and treatment of leptomeningeal metastases from solid tumors experience with 90 patients. . *Cancer* 1982. **49**: p. 759–772.
48. Zeiser R, B.J., Bley TA, Windfuhr-Blum M, Schulte-Monting J, Behringer DM. and Clinical follow-up indicates differential accuracy of magnetic resonance imaging and immunocytology of the cerebral spinal fluid for the diagnosis of neoplastic meningitis—a single centre experience. *Br J Haematol.*, 2004. **124**: p. 762-8.

49. Schinstine, M., et al., Detection of malignant hematopoietic cells in cerebral spinal fluid previously diagnosed as atypical or suspicious. *Cancer*, 2006. **108**(3): p. 157-62.
50. Michael J. Glantz, B.F.C., Lisa K. Glantz, Janet Cobb, Pamela Mills, Andrew Lekos, Beverly C. Walters, Lawrence D. Recht, Cerebrospinal fluid cytology in patients with cancer minimizing false negative results. *Cancer*, 1998. **82**(4): p. 733-739.
51. Pauls, S., et al., Use of magnetic resonance imaging to detect neoplastic meningitis: limited use in leukemia and lymphoma but convincing results in solid tumors. *Eur J Radiol*, 2012. **81**(5): p. 974-8.
52. Subirá Dolores, C.S., Aceituno Esther, Hernández Jaime, Jiménez-Garófano Carmen, Jiménez Antonio, Jiménez Ana Maria, Román Alejandro and Orfao Alberto, Flow Cytometric Analysis of Cerebrospinal Fluid Samples and Its Usefulness in Routine Clinical Practice. *Anatomic Pathology*, 2002. **117**: p. 952-958.
53. Granick, J.L., S.I. Simon, and D.L. Borjesson, Hematopoietic stem and progenitor cells as effectors in innate immunity. *Bone Marrow Res*, 2012. **2012**: p. 165107.
54. van Dongen, J.J., et al., EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*, 2012. **26**(9): p. 1908-75.
55. Nuckel Holger, J.R., Novotny, Noppeney Richard, Savidou Irini, Duhrsen Ulrich, Detection of malignant haematopoietic cells in the cerebrospinal fluid

- by conventional cytology and flow cytometry. Clin. Lab. Haem, 2006. **28**: p. 22-29.
56. Christopher A. French, D.M.D., Ghada Shaheen and Edmund S. Cibas, Diagnosing Lymphoproliferative Disorders Involving the Cerebrospinal Fluid Increased Sensitivity Using Flow Cytometric Analysis. Diagnostic Cytopathology, 2000. **23**(6): p. 369-374.
57. Cesana, C., et al., Flow cytometry and cytomorphology evaluation of hematologic malignancy in cerebrospinal fluids: comparison with retrospective clinical outcome. Ann Hematol, 2011. **90**(7): p. 827-35.
58. Barnett D, G.V., Mayr P, Reilly JT., Preparation and stabilisation of cells. , P. WO, Editor 1995.
59. Galoin S, D.G., Apoil PA, Chollet F, Roda D, Blancher A, et al. , Polymerase chain reaction on cerebrospinal fluid cells in the detection of leptomeningeal involvement by B-cell lymphoma and leukemia a novel strategy and its implications. Br J Haematol, 1997. **99**: p. 122-130.
60. Sayeda Douaa , B.H., Ali Amany M. and Shakera Sanaa, Immunophenotyping and immunoglobulin heavy chain gene rearrangement analysis in cerebrospinal fluid of pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. Leukemia Research, 2009. **33**: p. 655-661.
61. Scrideli CA, Q.R., Bernardes JE, Valera ET, Tone LG., PCR detection of clonal IgH and TCR gene rearrangements at the end of induction as a non-remission criterion in children with ALL: comparison with standard

- morphologic analysis and risk group classification. *Med Pediatr Oncol*, 2003. **41**(1): p. 10-6.
62. Li X, Y.A., Fei H., Detection of minimal leukemic cells in cerebral spinal fluid of children with acute lymphoblastic leukemia using the polymerase chain reaction technique. *J Tongji Med Univ*, 1998. **18**(1): p. 49-53.
63. Silva Peres Cancela Camila, M.M., De Lima Souza Marcelo Eduardo, Barcelos José Márcio, Miguel Furtado Virginia, Silva Maria Luiza, Borato Viana Marcos and De Oliveira Benigna Maria, Central nervous system involvement in acute lymphoblastic leukemia diagnosis by immunophenotyping. *J Bras Patol Med Lab*, 2013. **49**(4): p. 260-263.
64. Di Noto, R., et al., Critical role of multidimensional flow cytometry in detecting occult leptomeningeal disease in newly diagnosed aggressive B-cell lymphomas. *Leuk Res*, 2008. **32**(8): p. 1196-9.
65. Mitri, Z., et al., Sensitivity and specificity of cerebrospinal fluid flow cytometry for the diagnosis of leukemic meningitis in acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Leuk Lymphoma*, 2014. **55**(7): p. 1498-500.
66. French Christopher A, D.D.M., Shaheen Ghada and Cibas Edmund S, Diagnosing Lymphoproliferative Disorders Involving the Cerebrospinal Fluid: Increased Sensitivity Using Flow Cytometric Analysis. *Diagnostic Cytopathology*, 2000. **23**(6): p. 369-374.
67. D. Subira, S.C., A. Román, E. Aceituno, C. Jiménez-Garófano, A. Jiménez, R. García<sup>1</sup> and M. Bernácer, Flow cytometry and the study of central

- nervous disease in patients with acute leukaemia. *British Journal of Haematology*, 2001. **112**: p. 381-384.
68. Schroers, R., et al., Diagnosis of leptomeningeal disease in diffuse large B-cell lymphomas of the central nervous system by flow cytometry and cytopathology. *Eur J Haematol*, 2010. **85**(6): p. 520-8.
69. Pittman, M., et al., Utility of flow cytometry of cerebrospinal fluid as a screening tool in the diagnosis of central nervous system lymphoma. *Arch Pathol Lab Med*, 2013. **137**(11): p. 1610-8.
70. Sancho, J.M., et al., Clinical significance of occult cerebrospinal fluid involvement assessed by flow cytometry in non-Hodgkin's lymphoma patients at high risk of central nervous system disease in the rituximab era. *Eur J Haematol*, 2010. **85**(4): p. 321-8.
71. Martinez-Laperche, C., et al., Detection of occult cerebrospinal fluid involvement during maintenance therapy identifies a group of children with acute lymphoblastic leukemia at high risk for relapse. *Am J Hematol*, 2013. **88**(5): p. 359-64.
72. Urbanits Sabine, G.A., Hopfinger Georg, Stockhammer Gunther, Karimi Alireza, Muller Mathias M., Pittermann Elisabeth and Grisold Wolfgang, FACS analysis - a new and accurate tool in the diagnosis of lymphoma in the cerebrospinal fluid. *Clinica Chimica*, 2002. **317**: p. 101-107.
73. Hegde Upendra, F.A., Little Richard F., Janik John E., Grant Nicole, Steinberg Seth M., Dunleavy Kieron, Jaffe Elaine S., Abati Andrea, Stetler-Stevenson Maryalice and Wilson Wyndham H. , High incidence of occult

- leptomeningeal disease detected by flow cytometry in newly diagnosed aggressive B-cell lymphomas at risk for central nervous system involvement the role of flow cytometry versus cytology. *Blood*, 2005. **105**(2): p. 496-502.
74. Craig, F.E., et al., Flow cytometric immunophenotyping of cerebrospinal fluid specimens. *Am J Clin Pathol*, 2011. **135**(1): p. 22-34.
75. Del Principe, M.I., et al., High sensitivity of flow cytometry improves detection of occult leptomeningeal disease in acute lymphoblastic leukemia and lymphoblastic lymphoma. *Ann Hematol*, 2014. **93**(9): p. 1509-13.
76. Quijano, S., et al., Identification of leptomeningeal disease in aggressive B-cell non-Hodgkin's lymphoma: improved sensitivity of flow cytometry. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(9): p. 1462-9.
77. Stacchini, A., et al., Ten antibodies, six colors, twelve parameters: a multiparameter flow cytometric approach to evaluate leptomeningeal disease in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Cytometry B Clin Cytom*, 2012. **82**(3): p. 139-44.
78. Benevolo Giulia, S.A., SpinaMichele, Ferreri Andre's J. M., Arras Marcella, Bellio Laura, Botto Barbara, Bulian Pietro, Cantonetti Maria, Depaoli Lorella, Di Renzo Nicola, Di Rocco Alice, Evangelista Andrea, Franceschetti Silvia, Godio Laura, Mannelli Francesco, Pavone Vincenzo, Pioltelli Pietro, Vitolo Umberto and Pogliani Enrico M., Final results of a multicenter trial addressing role of CSF flow cytometric analysis in NHL patients at high risk for CNS dissemination. *Blood*, 2012. **120**(16): p. 3222-3228.

79. Crespo-Solis, E., et al., Diagnosis of acute leukemia in cerebrospinal fluid (CSF-acute leukemia). *Curr Oncol Rep*, 2012. **14**(5): p. 369-78.
80. Moses, K. and S. Brandau, Human neutrophils: Their role in cancer and relation to myeloid-derived suppressor cells. *Seminars in Immunology*.