

DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO DE LEUCEMIAS AGUDAS EN PACIENTES PEDIÁTRICOS DE REGIONES VULNERABLES DE MÉXICO

Rubí Romo-Rodríguez^{1,2}, Dalia Ramírez-Ramírez¹, Gabriela Rocío Zamora-Herrera^{1,2}, Giovanni Amador-Cardoso^{1,2}, Jebea Anaclara López-Blanco¹, Armando Vilchis-Ordóñez^{1,3}, Nuria Luna-Silva⁴, Angélica Martínez-Martell⁴, Astin Cruz-Maza^{5,6}, Vanessa Terán-Cerqueda⁷, Karina Beatriz Martínez-José⁷, Lilia Adela García Stivalet⁷, Miguel Ángel Garrido-Hernández⁸, Rocío Baños-Lara⁹, Juan Carlos Rodríguez-Espinoza⁹, Juan Carlos Núñez-Enriquez¹⁰, Diana Casique-Aguirre^{1,6,11}, Rosana Pelayo¹

- Laboratorio de Citómica del Cáncer Infantil. Centro de Investigación Biomédica de Oriente, HGZ 5, Metepec, Puebla
- Instituto de Fisiología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
- Hospital Infantil de México Federico Gómez, Ciudad de México
- Servicio de Hematología, Hospital de la Niñez Oaxaqueña "Doctor Guillermo Zarate Mijangos", Secretaría de Salud, Oaxaca de Juárez, Oaxaca
- Laboratorio Juárez, Oaxaca
- Unidad de Desarrollo e Investigación en Bioterapéuticos, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México
- Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital de Especialidades Manuel Ávila Camacho, IMSS Puebla
- Hospital para el Niño Poblano, Puebla
- Una Nueva Esperanza, Puebla
- Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional siglo XXI-IMSS, Ciudad de México
- Investigadoras e Investigadores por México, CONACYT.



Contacto: rubiromo2306@gmail.com

INTRODUCCIÓN

La leucemia es la principal causa de mortalidad no accidental en niños de edad escolar, por lo que se ha convertido en una prioridad de salud nacional. Las tasas de supervivencia libre de enfermedad a menudo son menores al 35% en algunas regiones de nuestro país, con desenlaces de recaídas y muerte temprana al menos tres veces más frecuentes que en el mundo de economías desarrolladas. El incremento en las tasas de mortalidad en México también se ven impactadas debido al diagnóstico poco preciso o tardío para poblaciones alejadas de áreas urbanas. Las leucemias agudas se caracterizan por la producción descontrolada de células precursoras hematopoyéticas linfoides o mieloides en la médula ósea (MO), denominados blastos, los cuales ocupan hasta el 95% del tejido interfiriendo con la hematopoyesis normal. El diagnóstico se establece cuando los blastos representan más de 20% de las células nucleadas de MO y se clasifican de acuerdo con la expresión de marcadores de diferenciación de las etapas de linaje y maduración en: leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia linfoblástica aguda (LLA), la cual se subclasifica de acuerdo al origen de las células precursoras ya sea de B (LLA-B) o de T (LLA-T) y en leucemia aguda de linaje ambiguo. El pronóstico en las tasas de supervivencia de leucemia depende del diagnóstico oportuno, la adecuada estratificación de riesgo, el apego al tratamiento y la detección de enfermedad residual. La inmunofenotipificación mediante citometría de flujo multiparamétrica es una valiosa técnica que:

- Permite la clasificación de leucemias agudas y su carga tumoral.
- Tiene aplicaciones pronósticas o terapéuticas ya que el inmunofenotipo de los blastos es uno de los factores que establecen el riesgo de recaída.
- Permite monitorear la respuesta al tratamiento a través de la evaluación de la enfermedad mínima/medible residual (EMR), que constituye el mejor parámetro con valor pronóstico.

OBJETIVO

Contribuir al diagnóstico y seguimiento preciso, oportuno e integral, de la leucemia pediátrica en regiones vulnerables de México.

MATERIAL Y MÉTODOS



Figura 1. Flujo de trabajo. Las muestras de médula ósea de pacientes pediátricos con sospecha de leucemia aguda son colectadas por médicos especialistas en hospitales de Puebla, Oaxaca y Tlaxcala y recibidas en el Laboratorio de Citómica del Cáncer Infantil, CIBIOR-IMSS. Al debut y seguimiento se clasifica y evalúa enfermedad medible residual, respectivamente, acorde al método estandarizado EUROFLOW™. Los leucocitos totales son teñidos con anticuerpos monoclonales acoplados a fluorocromos (tabla 1) y adquiridos en un citómetro de flujo multiparamétrico BD FACSCanto™ II. Los datos son analizados mediante el software Infinicyt™ para establecer el inmunofenotipo correspondiente y con FlowJo para la generación de tSNE.

Estatus	Orientación de linaje	Tubo	V450	V500	FITC	PE	PerCP-Cyanine5.5	PE-Cyanine7	APC	APC-H7
Debut	Tubo de orientación de leucemias agudas (ALOT)	1	cyCD3	CD45	cyMPO	cyCD79a	CD34	CD19	CD7	smCD3
	LLA-B	1	CD20	CD45	CD58	CD66c	CD34	CD19	CD10	CD38
		2	smIlgk	CD45	syIlgj	CD33	CD34	CD19	smlgk y CD117	smlgA
	LLA-T	1	syCD3	CD45	nuTdT	CD99	CD5	CD10	CD1a	smCD3
Enfermedad medible residual	LLA-B	1	HLA-DR	CD45	CD16	CD13	CD34	CD117	CD11b	CD10
		1	CD20	CD45	CD81	CD66c y CD123	CD34	CD19	CD10	CD38

Tabla 1. Paneles de anticuerpos para la investigación de leucemias agudas (Plataforma estandarizada Euroflow™). Al debut, la médula ósea es evaluada con el tubo ALOT (tubo de orientación de leucemias agudas) para la identificación del linaje leucémico. Posteriormente, las células son teñidas con el panel de caracterización correspondiente (LLA-B, LLA-T o LMA) para su subclasificación. Para el monitoreo de la respuesta al tratamiento, la muestra es teñida con el panel de EMR de LLA-B, si el paciente debutó con este inmunofenotipo, en los casos de LLA-T y LMA se teñen con los paneles empleados al debut.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto se conduce con recursos del Fondo PRONACES FORDECYT del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto No. 302994) y es administrado por Fundación IMSS. Rubí Romo recibe beca de posgrado CONACYT.

RESULTADOS

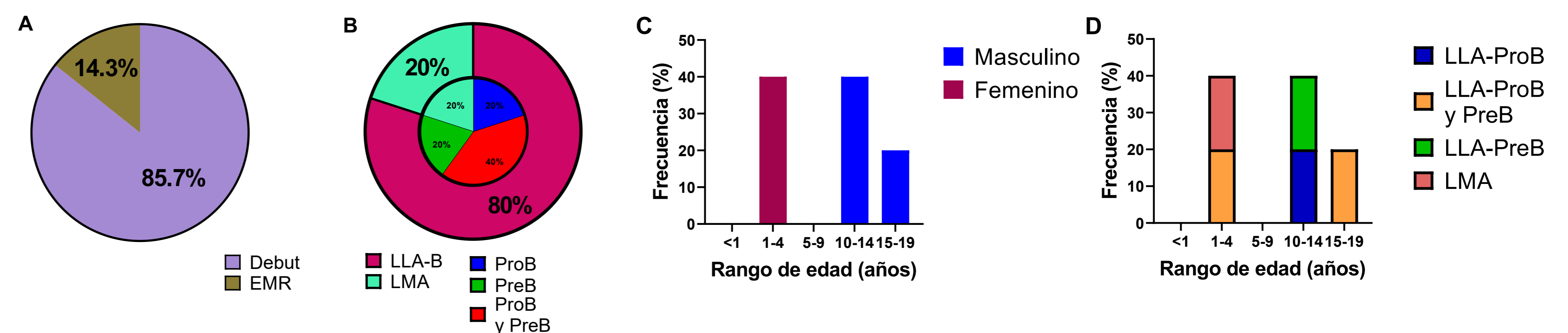


Figura 2. Distribución de casos de leucemias pediátricas de Marzo 2022. **A** Distribución de muestras recibidas para establecer el diagnóstico de leucemias agudas o para evaluar enfermedad residual. **B** Distribución de leucemias agudas por su inmunofenotipo, el gráfico externo indica la clasificación del linaje de la leucemia aguda, mientras que, el gráfico interno la subclasificación del estado de maduración de las LLA-B. **C** Distribución de casos de leucemias agudas por edad y sexo. **D** Distribución de casos de leucemias agudas por edad y diagnóstico.

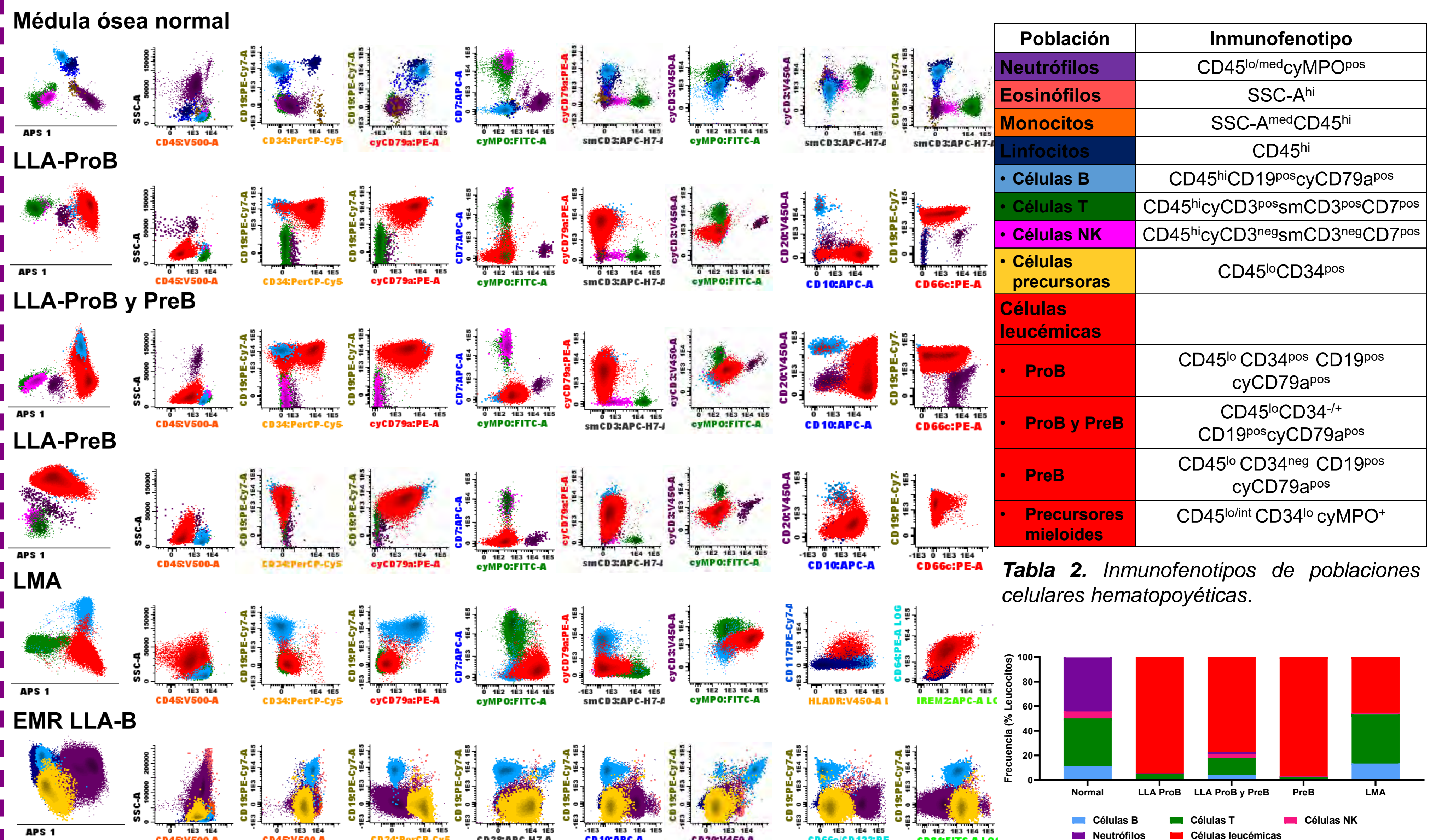


Figura 3. Estrategia de análisis para la inmunofenotipificación de leucemias agudas. Casos representativos que muestran las diferentes poblaciones hematopoyéticas, tanto normales y leucémicas, identificables en las muestras de médula ósea de pacientes pediátricos. Los colores de las poblaciones celulares se indican en la tabla 2. APS, separador automático de poblaciones.

Población	Inmunofenotipo
Neutrófilos	CD45 ^{lo} medcyMPO ^{pos}
Eosinófilos	SSC-A ^{hi}
Monocitos	SSC-A ^{med} CD45 ^{hi}
Linfocitos	CD45 ^{hi}
Células B	CD45 ^{hi} CD19 ^{pos} cyCD79a ^{pos}
Células T	CD45 ^{hi} cyCD3 ^{pos} smCD3 ^{pos} CD7 ^{pos}
Células NK	CD45 ^{hi} cyCD3 ^{neg} smCD3 ^{neg} CD7 ^{pos}
Células precursoras	CD45 ^{lo} CD34 ^{pos}
Células leucémicas	
• ProB	CD45 ^{lo} CD34 ^{pos} CD19 ^{pos} cyCD79a ^{pos}
• ProB y PreB	CD45 ^{lo} CD34 ⁺ CD19 ^{pos} cyCD79a ^{pos}
• PreB	CD45 ^{lo} CD34 ^{neg} CD19 ^{pos} cyCD79a ^{pos}
• Precursores mieloides	CD45 ^{lo} intCD34 ^{lo} cyMPO ⁺

Tabla 2. Inmunofenotipos de poblaciones celulares hematopoyéticas.

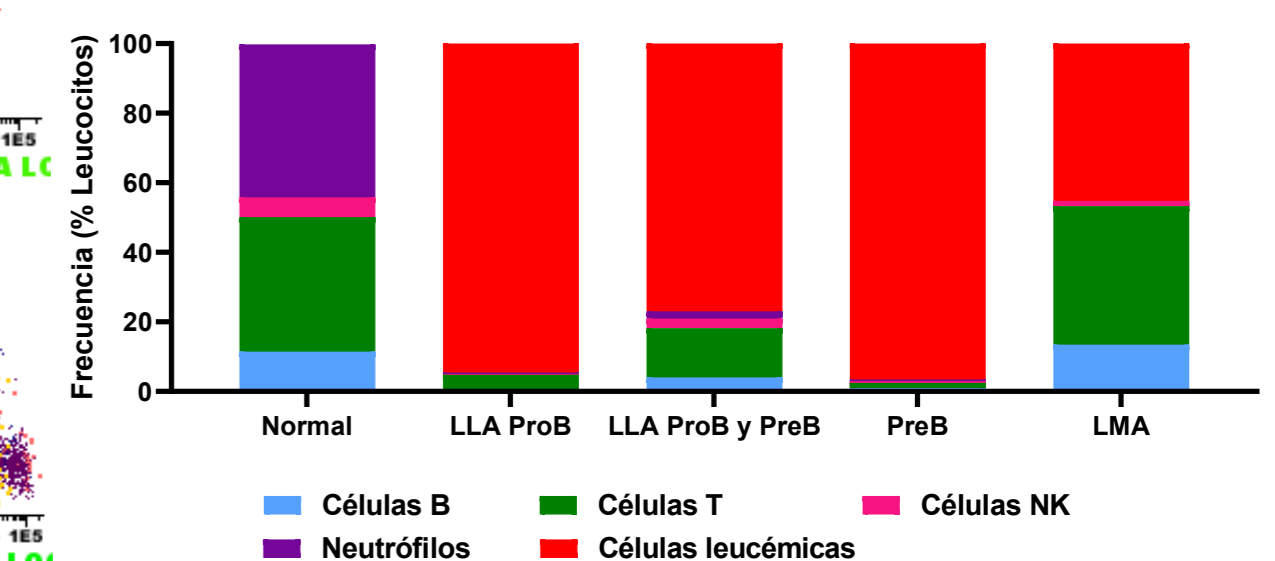


Figura 4. Distribución de poblaciones celulares hematopoyéticas en médulas óseas de pacientes pediátricos al debut.

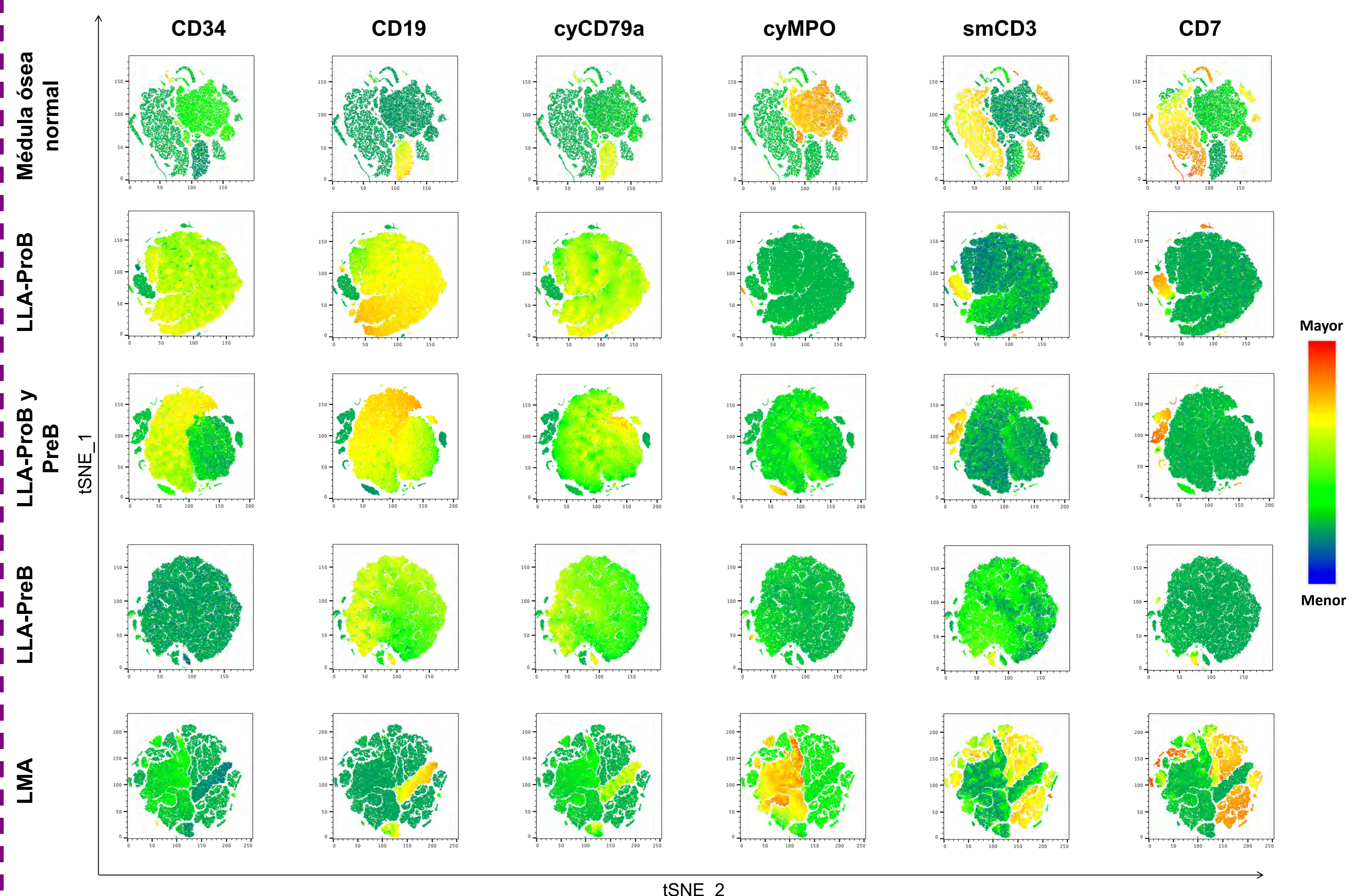


Figura 5. Visualización de t-SNE de médulas óseas pediátricas al debut. Los gráficos muestran las células hematopoyéticas de la médula ósea teñidas con el panel ALOT, las cuales se proyectan basadas en la expresión de los antígenos mediante el método de reducción de dimensiones t-SNE (T-distributed Stochastic Neighbor Embedding).

CONCLUSIONES

La inmunofenotipificación extendida y estandarizada de las leucemias agudas en los niños, niñas y adolescentes de poblaciones vulnerables de nuestro país, contribuirá al diagnóstico integral y a la elección adecuada y oportuna del tratamiento para la prevención de pronósticos desfavorables y desenlaces fatales.