

Programa de Doctorado (RD 778/1998)

Universidad Autónoma de Barcelona

TESIS DOCTORAL

2015

**ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL MEDIDA MEDIANTE
CITOMETRÍA DE FLUJO MULTIPARAMÉTRICA EN NIÑOS CON
LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA SOMETIDOS A
TRASPLANTE ALOGÉNICO DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS**

*Memoria presentada por Izaskun Elorza Álvarez para optar al grado de Doctor en Medicina por la
Universidad Autónoma de Barcelona*

Barcelona, 2015

Directora de Tesis

Doctoranda

Dr. Soledad Gallego Melcón

Izaskun Elorza Álvarez

Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología

Universidad Autónoma de Barcelona

Facultad de Medicina

PRESENTACION Y AGRADECIMIENTOS

Mi nombre es Izaskun Elorza Álvarez y en la actualidad desarrollo mi actividad como facultativo especialista en Pediatría en el Servicio de Oncología-Hematología Pediátricas del Hospital Universitario Vall d'Hebron. Mi labor se centra principalmente, en los niños que reciben un trasplante de progenitores hematopoyéticos.

Realicé mis estudios de Medicina y Cirugía en la Universidad de Navarra (1995-2001) y mi formación en la especialidad de "Pediatría y Áreas Específicas" en el Hospital Universitario Vall d'Hebron (2002-2006). Realicé una estancia formativa de 2 años en dicho hospital en el Servicio de Oncología-Hematología Pediátricas y desde 2008 trabajo en este servicio.

Inicié los estudios de Doctorado en Pediatría, Ginecología y Obstetricia de la UAB durante mi residencia.

Tras finalizar los cursos de formación, en el curso 2005/2006 finalicé mi trabajo de investigación bajo la tutoría de la Dra. Soledad Gallego Melcón, con el título: Leucemia linfoblástica aguda de riesgo intermedio en niños: comparación de la toxicidad durante el tratamiento de inducción con dos protocolos quimioterápicos diferentes: Implicaciones pronósticas". En 2007, presenté mi suficiencia investigadora.

La tesis que se desarrolla a continuación tiene su origen en un estudio retrospectivo que realicé en 2008. Fue una revisión de 31 niños (2002-2007) con Leucemia linfoblástica aguda que recibieron un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.

El interés de aquel estudio fue realizar una revisión de los pacientes trasplantados en nuestra unidad así como valorar si la presencia de enfermedad previa al trasplante condicionaba un peor pronóstico.

Los resultados de aquel primer estudio fueron suficientemente concluyentes como para realizar varias comunicaciones orales en reuniones internacionales (Meeting of European Bone Marrow Transplantation Paediatric Diseases Working Party y Training Course on Haematopoietic Stem Cell Transplantation in children and adolescents for pediatricians) y nacionales (Reunión anual de la Asociación Española de Hematología y Hemoterapia) culminando en la publicación de un artículo en la revista *Haematologica* en 2010.

Mi interés posterior ha sido avanzar en esta dirección, aumentando el número de pacientes e introduciendo nuevas variables que pudieran relacionarse con el riesgo de recaída y la supervivencia. Este fue mi propósito cuando en 2009 inscribí el proyecto de esta tesis doctoral que ahora les muestro, bajo la dirección de la Dra. Soledad Gallego Melcón.

Mis agradecimientos van dirigidos,

A los niños y sus familias,

A la Dra. Gallego, directora de esta tesis, por su apoyo inestimable durante toda mi formación,

Al Dr. Palacio y a la Dra. Gallur, por su trabajo en Enfermedad mínima residual estudiada mediante citometría de flujo, sin cuya labor dedicada me hubiera sido imposible realizar esta tesis; al Dr. Rodrigo, por su ayuda imprescindible en el análisis estadístico; a la Sra. C. O'Hara por su ayuda con el inglés,

A todos los integrantes del Hospital Universitario Vall d'Hebron y en especial al Servicio de Oncología-Hematología Pediátricas y Unidad de Trasplante de Progenitores Hematopoyéticos, a los que estuvieron y se quedaron y a los que se fueron, por su dedicación diaria en el cuidado de los pacientes,

Al Dr. Sánchez de Toledo y la Dra. Díaz de Heredia por creer en mí y darme la oportunidad de formar parte de este equipo extraordinario; a la Dra. Teresa Olivé por ser un modelo a seguir; a la Dra. Bastida y Dr. Ortega por descubrirme la Hematología Pediátrica; a la Dra. Llord, Dr. Dapena, Dr. Gros, Dr. Sábado, Dra. Vallés, Dra. Guillen,... por su amistad, generosidad y apoyo incondicional,

A mis compañeros de residencia Cristina, Luis, Daniel, Anna, Nuria, Fernando, Marc... por aquella época en la que aprendimos a ser pediatras; a Quique, Miquel, Cristina, Anna, Mónica, Juanjo... nuestros R mayores; al Dr. Castelló, Dra. Torán, Dr. Aso,... por enseñarme a amar mi profesión,

A mi familia, mis padres que siempre me han apoyado; a mi marido Oriol, por su paciencia y optimismo y a Jon, el último en llegar, por su ilusión sin límites que ha contagiado a su madre ayudándola a finalizar esta tesis.

No sé lo que pareceré a los ojos del mundo, pero a los míos es como si hubiese sido un muchacho que juega en la orilla del mar y se divierte de tanto en tanto encontrando un guijarro más pulido o una concha más hermosa, mientras el inmenso océano de la verdad se extendía, inexplorado frente a mí.

Isaac Newton

INDICE

PRESENTACION Y AGRADECIMIENTOS

ABREVIATURAS	9
RESUMEN	11
1. INTRODUCCION	13
1.1 HEMATOPOYESIS	13
1.2. LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA	19
1.2.1 LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE PRECURSORES B.....	20
1.2.2 LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE PRECURSORES T.....	22
1.3 TRASPLANTE ALOGÉNICO DE PROGENITORES HEMATOPOYETICOS	23
1.4 ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL	29
1.4.1 MICROSCOPIA, CITOGÉNÉTICA E HIBRIDACIÓN FLUORESCENTE IN SITU	33
1.4.2 BIOLOGÍA MOLECULAR.....	33
1.4.3 INMUNOFENOTIPADO Y CITOMETRÍA DE FLUJO MULTIPARAMÉTRICA.....	34
1.4.4 COMPARATIVA ENTRE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CITOMETRÍA DE FLUJO	36
2. HIPOTESIS DE TRABAJO	39
3. OBJETIVOS	41
4. PACIENTES Y METODOS	43
4.1 TIPO DE ESTUDIO	43
4.2 ÁMBITO	43
4.3 POBLACIÓN A ESTUDIO.....	43
4.4 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LOS PACIENTES.....	44
4.5 RECOGIDA DE INFORMACIÓN Y SEGUIMIENTO DE LA COHORTE.....	44
4.7 VARIABLES DEL ESTUDIO	44
4.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	46
4.9 CONSIDERACIONES ÉTICAS	46
4.10 MÉTODOS	46
4.10.1 ESTUDIO DE LA EMR MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO	46
4.10.2 ESTUDIO DE QUIMERISMO	48
4.11DEFINICIONES	49
4.11.1 PARÁMETROS DE RESULTADOS POSTRASPLANTE	49
4.11.2 TÉCNICAS DE ESTUDIO	49

5. RESULTADOS	51
5.1 PACIENTES	51
5.2 CARACTERIZACIÓN DE LA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA	52
5.3 CARACTERIZACIÓN DEL TRASPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS	53
5.4 RESULTADOS GLOBALES POSTRASPLANTE	57
5.4.1 FALLO DE IMPLANTE	57
5.4.2 ENFERMEDAD INJERTO CONTRA HUÉSPED AGUDA.....	57
5.4.3 ENFERMEDAD INJERTO CONTRA HUÉSPED CRÓNICA.....	59
5.5 RESULTADOS DE SUPERVIVENCIA	61
5.6 RESULTADOS DE SUBGRUPOS DE LLA	64
5.6.1 LLA PHILADELPHIA POSITIVO	64
5.6.2 LLA-MLL	66
5.6.3 LLA DE FENOTIPO T	66
5.7 ESTUDIO DE EMR PREVIA A TPH ALOGENICO	67
5.7.1 GRUPO EMR POSITIVA	68
5.7.2 GRUPO EMR NEGATIVA.....	72
5.7.3 RESULTADOS COMPARATIVOS SEGÚN ESTADO EMR	75
5.8. ANÁLISIS BIVARIADO DE ASOCIACIÓN DE VARIABLES CON RECAÍDA Y MORTALIDAD	78
5.8.1 FACTORES DE RIESGO RELACIONADOS CON RECAÍDA.....	78
5.8.2. FACTORES DE RIESGO RELACIONADOS CON MORTALIDAD	81
5.9 ANÁLISIS BIVARIADO DE VARIABLES ESTRATIFICADO POR ESTADO DE EMR PRE-TPH	85
5.9.1 FACTORES DE RIESGO RELACIONADOS CON RECAÍDA Y ESTRATIFICADOS POR EMR PRE-TPH	85
5.9.2 FACTORES DE RIESGO RELACIONADOS CON MORTALIDAD Y ESTRATIFICADOS EMR PRE-TPH	87
5.10 ESTUDIOS DE SEGUIMIENTO POSTRASPLANTE	89
5.10.1 ESTUDIOS DE EMR POR CITOMETRÍA DE FLUJO	89
5.10.2 QUIMERISMO POSTRASPLANTE	92
5.11 COMPARACIÓN ENTRE PACIENTES TRASPLANTADOS EN 2002-2007 Y 2008-2012	94
6. DISCUSION	97
6.1 RELACIÓN ENTRE LA EMR PRE-TPH Y RESULTADOS DE RECAÍDA Y MORTALIDAD	97
6.2 VARIABLES RELACIONADAS CON RECAÍDA Y MORTALIDAD	101
6.3.1 IRRADIACIÓN CORPORAL TOTAL	101
6.3.2. ENFERMEDAD INJERTO CONTRA HUÉSPED	101

6.3 SEGUIMIENTO POSTRASPLANTE	103
6.3.1 CUANTIFICACIÓN DE EMR POR CFM.....	103
6.3.2 ESTUDIOS DE QUIMERISMO.....	105
6.4 NUEVAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN Y FUTUROS ESTUDIOS.....	107
6.5 LIMITACIONES Y PUNTOS FUERTES DEL ESTUDIO	108
7. CONCLUSIONES.....	111
8. BIBLIOGRAFÍA	113
ANEXOS	121
I. TABLA DE PACIENTES	123
II. ÍNDICE DE FIGURAS.....	127
III ARTÍCULO ORIGINAL	131

ABREVIATURAS

A: año (s)	FI: familiar idéntico
A: agudo (ref. EICH)	Fnl: familiar no idéntico
Ara-C: arabinósido de citosina, citarabina	FISH: hibridación fluorescente <i>in situ</i>
Ac: anticuerpo (s)	Flu: fludarabina
Ag: antígeno(s)	FMO: fallo multiorgánico
ATG: globulina antitumoral	G-CSF: factor estimulante de colonias granulocíticas
Alo-: alogénico	GETH: grupo español de Trasplante Hematopoyético
AMO: aspirado de médula ósea	GETMON: Grupo Español de Trasplante de Médula ósea en niños
BMT: <i>bone marrow transplantation</i>	Gy: grey (unidad de radiación)
Bu: busulfan	HAPLO: haploidéntico
C: crónico (ref. EICH)	HEPA: high-efficiency particulate arresting filters
CD: <i>cluster of differentiation</i> , antígenos de superficie celular	HI: hermano HLA-idéntico
cGy: centigrey	HLA: antígenos leucocitarios humanos
CIBMTR: <i>Center for International Blood and Marrow Transplant Research</i>	ICT: irradiación corporal total
CFM: citometría de flujo multiparamétrica	id: idéntico
CFU: unidad (es) formadora de colonias	IFI: infección fúngica invasiva
CMV: citomegalovirus	Ig: inmunoglobulina
CNT: celularidad nucleada total	ILD: infusión de linfocitos del donante
Cy: ciclofosfamida	IR: índice de recaída
CyA: ciclosporina A	K-M: función de Kaplan-Meier
d: día (s)	LA: Leucemia aguda
DE: donante emparentado	LB: linfocito B
DLT: depleción de linfocitos T	LLA: Leucemia aguda linfoblástica
DNE: donante no emparentado	LMA: Leucemia aguda mieloblástica
DR: locus DR del sistema HLA	LT: linfocito T
EBMT: <i>European Group for Blood and Marrow Transplantation</i>	m: mes (s)
EGIL: Grupo Europeo de Clasificación Inmunológica de Leucemias	MO: médula ósea
EICH: Enfermedad injerto contra huésped	MRT: mortalidad relacionada con el trasplante
EMR: Enfermedad mínima residual	MTX: metotrexate
FAB: clasificación Franco-Américo-Británica de las leucemias	NK: <i>natural killer</i>
	NMDP: National Marrow Donor Program

QC: quimerismo completo

QM: quimerismo mixto

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PDN: prednisona

Ph: cromosoma Filadelfia

PH: progenitores hematopoyéticos

PTT: púrpura trombótica trombocitopénica

RC: remisión completa

RC1: primera remisión completa

RC≥2: segunda o posterior remisión completa

RCT: receptor de linfocito T

REC: recaída

REDMO: Registro de Donantes de Médula Ósea

RT: radioterapia

SCU: sangre de cordón umbilical

SG: supervivencia global

SLE: supervivencia libre de eventos

SLP: síndrome linfoproliferativo

SLR: supervivencia libre de recaída

SP: sangre periférica

t: translocación

Tdt: enzima deoxinucleotidil transferasa terminal

TPH: trasplante de progenitores hematopoyéticos

TT: tiotepa

VP (VP-16): etopósido

RESUMEN

El trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (alo-TPH) logra mejor supervivencia que la quimioterapia en los niños con leucemia linfoblástica aguda (LLA) de alto riesgo. El principal obstáculo para el éxito del trasplante es la recaída y la remisión completa morfológica pre-trasplante es el factor pronóstico principal para la supervivencia libre de recaída (SLR).

La presencia de enfermedad mínima residual (EMR) en médula ósea previa al trasplante, medida mediante técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha demostrado ser un factor independiente de menor SLR en niños con LLA ¹⁻⁴.

La citometría de flujo multiparamétrica (CFM) es una técnica ampliamente utilizada para detectar inmunofenotipos anómalos en el estudio de diagnóstico inicial de la LLA así como para su monitorización a lo largo del tratamiento ^{5,6}. En varios estudios se comparan las técnicas de PCR y CFM concluyendo que ambas son complementarias ^{7,8}.

El objetivo de esta tesis es determinar si existe relación entre la presencia de EMR medida mediante CFM previa a un alo-TPH en niños con LLA y los resultados post-trasplante; se estudiarán también, otros factores pre y postrasplante asociados a recaída y mortalidad.

La EMR fue cuantificada mediante CFM previamente a un alotrasplante en 80 niños con LLA (rango: 6 meses-19 años). De acuerdo con el nivel de EMR detectado, los pacientes se dividieron en 2 grupos: el grupo EMR-positiva (n= 25) con presencia de blastos igual o mayor de 0,01% respecto a la población total de células y el grupo EMR-negativa (n=55) con menor de 0,01% de blastos.

La supervivencia libre de recaída (SRL) en el grupo completo a los 3 años postrasplante fue del 72% siendo la supervivencia global (SG) del 51%.

La SLR en el grupo con EMR positiva fue del 50% comparada con el 80 % del grupo EMR negativa (Log Rank 9,5; $p=0,002$). La SG global en el grupo de EMR positiva fue del 30% comparada con el 59% del grupo EMR negativa (Log Rank 6,5; $p=0,01$). La presencia de EMR pretrasplante medida mediante CFM identificó a un grupo de pacientes con 5,5 veces mayor riesgo de recaer y 3,4 veces de fallecer, confirmándose la importancia de su presencia previa al trasplante así como la validez de la prueba para su identificación.

El análisis bivariado realizado mostró que el uso de radioterapia y la presencia de EICH aguda postrasplante fueron factores protectores de recaída, y en el caso de la EICH aguda, también de mortalidad. La SLR a los 3 años postrasplante en los que no presentaron EICHa fue del 36%, en los que lo presentaron en grado I-II del 79% y grados III-IV del 81%. La SG a los 3 años postrasplante en los que no presentaron EICHa fue del 23%, en los de grado I-II del 56% y III-IV del 57%. Al estratificar por EMR se observó, que la presencia de EICH agudo favorecía más a los pacientes con EMR positiva previa al trasplante.

En relación con los estudios de seguimiento postrasplante, se objetivó que los pacientes que presentaron EMR positiva medida mediante CFM recayeron más que en los que se mantuvo negativa.

Se requieren nuevos protocolos terapéuticos para el subgrupo de pacientes que presentan EMR positiva pretrasplante e investigar en la valoración de la EMR y quimerismo postrasplante como factores pronóstico de recaída.

1. INTRODUCCION

1.1 HEMATOPOYESIS

La hematopoyesis (del gr. *αἷμα*, -ατος-, 'sangre' y *ποίησις*, 'creación') es el proceso de formación, desarrollo y maduración de los elementos formes de la sangre (eritrocitos, leucocitos y plaquetas) a partir de un precursor celular común e indiferenciado conocido como célula hematopoyética pluripotencial o *stem cell*^{9,10}. Estas células son las más inmaduras de la hematopoyesis y responsables de la reconstitución hematopoyética cuando ésta sufre un daño citotóxico grave o tras un trasplante de médula ósea; no son reconocibles mediante técnicas de microscopia, debido a que no poseen distintivos morfológicos precisos. Se trata de células mononucleares pequeñas, agranulares, semejantes a células linfoides, cuya cuantificación se estima entre el 1-3% de los elementos medulares nucleados y se caracterizan por su capacidad de proliferación, diferenciación y auto-renovación.

Se denomina célula madre linfomieloide (CFU-LM) a la que posee capacidad de producir *in vitro* colonias constituidas por granulocitos, eritrocitos, monocitos, osteoclastos, megacariocitos así como linfocitos T y B.

A partir de la CFU-LM, aparecen la célula germinal linfoide (CFU-L) y la célula germinal mieloide (CFU-GEMM), cada una de las cuales estimulada por el microambiente, da lugar a otras poblaciones comprometidas hacia la diferenciación, denominadas precursores hematopoyéticos.

La célula madre común o tronco, totipotente, con capacidad de dar lugar al progenitor pluripotente es CD34 positiva, CD38 negativa sin expresión HLA-DR (*Figura 1.1*).

La diferenciación de las células va asociada a la pérdida de CD34 y al inicio de la expresión de otros antígenos característicos de estadios de diferenciación más avanzados.

El antígeno HLA-DR se halla en estadios muy tempranos de la célula CFU-LM y desaparece en estadios tempranos de diferenciación, excepto en la serie monocito-macrófago, en la que permanece hasta los elementos maduros.

La CFU-GEMM expresa CD34 y HLA-DR, adquiere CD38 y es positiva para CD33. Cuando presenta compromiso hacia la línea granulomonocítica y pasa a CFU-GM, además del CD33 y CD34 expresa el CD13, antígeno que conserva durante toda su evolución a granulocito maduro, por lo que se le considera como marcador de línea. La línea monocítica tiene como marcador el CD14.

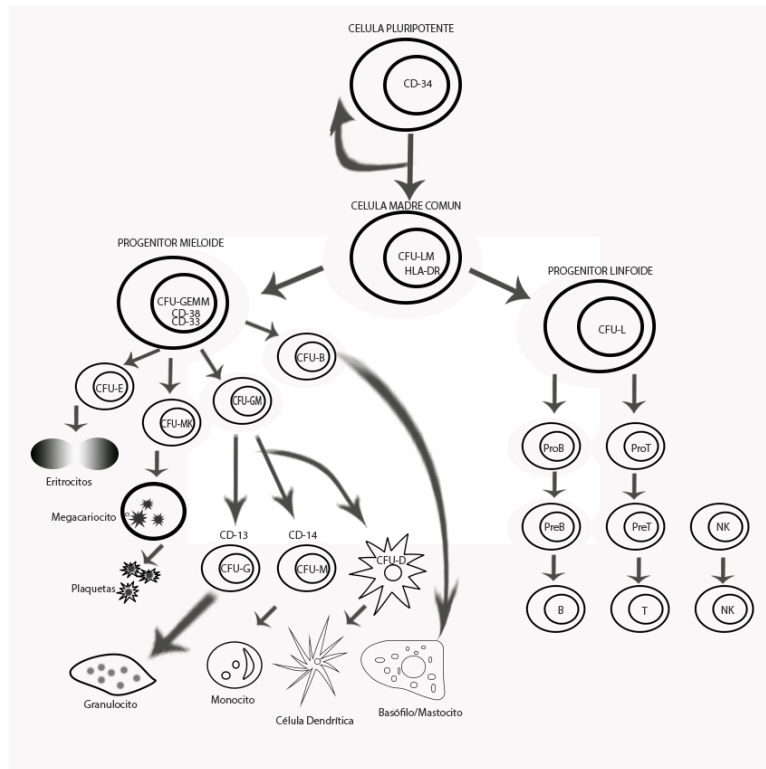


Figura 1.1 Maduración y diferenciación de las células durante la hematopoyesis. Modificado de Derek L. Nature Reviews Cancer 2003; 3: 650-665.

Los progenitores eritroides BFU-E y CFU-E comparten el CD33 y el CD34, así como la glucoforina C. La glucoforina A se adquiere en estadios más avanzados. Ambas glucoforinas se conservan durante la maduración hacia el hematíe.

Los progenitores megacariocíticos CFU-Meg comparten los antígenos CD33 y CD34 con el CD61 y el CD41 que se expresan durante toda su maduración. El promegacarioblasto adquiere un nuevo antígeno, el CD42, que junto a los otros dos permite identificar la línea megacariocítica.

Los linfocitos provienen de la misma célula primitiva germinal pluripotente CFU-LM que origina el resto de linajes hematopoyéticos.

Los linfocitos se desarrollan inicialmente en los órganos linfoides primarios (médula ósea y timo) para luego migrar a órganos linfoides secundarios (bazo, ganglios linfáticos, amígdalas faríngeas, placas de Peyer intestinales,...) donde finalizan su maduración. Las células linfoides maduras son los linfocitos B, linfocitos T y las células *natural killer* (NK).

1.1.1 Linfopoyesis B

Los precursores más inmaduros de los linfocitos B (LB), denominados pro-B, pueden ser identificados fenotípicamente mediante la detección de la molécula CD34, los antígenos HLA-DR, CD10, CD19, CD24 y la enzima Tdt. Las células pro-B no poseen inmunoglobulinas de superficie (Ig S), pero sí el reordenamiento del gen de la cadena pesada *mu*, que representa la primera indicación de compromiso con la línea B (*Tabla I.2*).

El linfocito en estadio pre-B expresa los anteriores marcadores junto con el CD20 y la molécula específica de linaje CD22; en esta fase se expresa el antígeno leucocitario común CD45. Estos precursores B también expresan CD79a, molécula que se asocia con las Ig S y está implicada en la transducción de señales tras la unión de las Ig S con el antígeno, a semejanza de lo que ocurre con el CD3 y la RCT en la célula T. Este estadio es el primero en el que pueden identificarse cadenas pesadas *mu* citoplasmáticas, en ausencia de cadenas ligeras y de Ig S.

A medida que la maduración progresa, se pierde el CD10, que se vuelve a expresar cuando el linfocito es estimulado por un antígeno, se reordenan los genes de las cadenas ligeras que se transcriben, se sintetizan y ensamblan con las cadenas pesadas *mu*. El LB inmaduro expresa Ig M de superficie y el LB maduro sintetiza Ig D y es positivo para los antígenos CD20, CD21, CD22, CD23 y CD79a.

Los LB maduros pasan a sangre periférica donde constituyen sólo un 5-15% de la población de linfocitos total y se afincan en los ganglios linfáticos, donde tras contactar con el antígeno maduran a células plasmáticas o evolucionan a células memoria.

El desarrollo de los LB en la médula ósea es independiente de antígeno y alcanza su madurez funcional con la expresión en su membrana de los receptores de reconocimiento antigénico. En los LB estos receptores son las Ig S. Las Ig tienen una unidad básica constituida por dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas. Cada LB está comprometido con una cadena ligera (*kappa* o *lambda*) y toda su progenie expresará la misma cadena. Las cadenas pesadas difieren según el tipo de Ig (*gamma*, *mu*, *alfa*, *delta* y *épsilon*).

Durante la maduración del LB tiene lugar una secuencia de reordenamientos de los genes de las Ig y cambios del fenotipo; una vez reordenados se expresan, apareciendo una molécula de Ig en la membrana celular.

Los estudios de clonalidad de los Linfocitos B se basan en el análisis del reordenamiento de los genes que codifican las cadenas de las inmunoglobulinas. ¹¹

CÉLULA	PRECURSORES PRO-B			PRE-B	LINFOCITO B INMADURO	LINFOCITO B MADURO	LINFOCITO B ACTIVADO	LINFOCITO B CON MEMORIA	
MOLECULAS Ig				μ + citoplasmático	Ig M de superficie	Ig M, Ig D superficie	Ig M, Ig D superficie	Ig G o Ig M Ig G o Ig A HLA-DR CD19 CD20 CD22	
EXPRESIÓN DE MOLECULAS	CD34 Tdt HLA-DR CD19 CD38	CD34 Tdt HLA-DR CD19 CD24 CD24 CD38	CD34 Tdt HLA-DR CD19 CD24 CD10 CD20 CD10 CD20 CD22	Tdt HLA-DR CD19 CD24 CD10 CD20 CD22	Tdt HLA-DR CD19 CD24 CD20 CD21 CD22	HLA-DR CD19 CD24 CD20 CD21 CD22 CD5	HLA-DR CD19 CD10 +/- CD20 CD21 CD22 CD23 CD38 +/- CD71 CD25	LB HLA-DR CD19 CD20 CD38	Célula plasmática CD19 CD38 PCA-1 CD138 Ig

Tabla 1.2 Esquema de diferenciación de los linfocitos B definido por marcadores inmunológicos

1.1.2 Linfopoyesis T

Los linfocitos T (LT) proceden de la célula primitiva linfoide ubicada en la médula ósea. Los precursores de los LT emigran al timo, donde sufren su proceso de maduración y adquieren inmunocompetencia; posteriormente, pasan a la sangre periférica y a los órganos linfáticos secundarios: ganglios linfáticos, bazo y tejido linfoide asociado a las mucosas, piel y tubo digestivo..., transformándose en LT funcionalmente maduros.

La madurez de los LT se alcanza con la expresión en la membrana citoplasmática de los receptores de células T, estructuras que actúan como receptores específicos para el antígeno (RCT). Son unos heterodímeros compuestos por dos cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro. Existen dos tipos: uno constituido por las cadenas *alfa* y *beta*, presente en la mayoría de los LT periféricos, y otro formado por cadenas *gamma* y *delta*, presente en un 5-10%. Ambos receptores están asociados al complejo CD3, constituido por un grupo de tres polipéptidos (*gamma*, *delta* y *épsilon*) que son variables y juntos forman el complejo receptor de la célula T (RCT-CD3). El proceso de reordenamiento de los genes que codifican los RCT se inicia en el timo siguiendo la siguiente secuencia: primero se reordena el gen de la cadena *delta* y le siguen la *gamma*, la *beta* y finalmente el de la cadena *alfa*.

El análisis del reordenamiento de los genes de las cadenas *alfa/beta* y *delta/gamma* del receptor de los linfocitos T (RCT) se utilizan como marcadores de clonalidad en estudios moleculares de EMR.

Las variaciones del fenotipo se suceden básicamente y de forma esquemática en tres etapas:

1. Fase de timocito inmaduro: se expresan la enzima Tdt y los antígenos CD44 y CD25; los antígenos CD4 y CD8 (células doble negativas) son negativos.

En la fase más precoz de este proceso de maduración, expresan CD3 con reordenamiento de RCT *gamma/delta*. En un periodo más avanzado de timocito inmaduro, se reordena la cadena *beta* del receptor T (RCT) y se expresa el CD3 en el citoplasma. El linfocito adquiere CD2 y CD5. En esta fase se pueden detectar algunos marcadores de proliferación como el CD38 y el CD71. Los timocitos inmaduros representan el 10% de la población.

2. Fase de timocito intermedio o común: pierde la expresión de Tdt y se caracteriza por presenta CD1, ser negativo para CD44 y CD25 y adquirir los antígenos CD4 y CD8 (célula doble positiva). Se reordenan los genes que codifican la cadena *alfa* del receptor RCT y se expresan, muy débilmente, las cadenas *alfa* y *beta* junto con el complejo CD3 en la superficie de la célula. La expresión de CD3 aparece al mismo tiempo que las cadenas *beta* y está involucrada en el transporte del receptor T a la superficie y en la transducción de señales al interior de la célula. Estos timocitos de la parte profunda de la corteza representan cerca del 80% de los timocitos.
3. Fase de timocito maduro. En este estadio pierde el CD1, expresa intensamente el complejo CD3 junto al RCT *alfa/beta* y se diferencia en dos poblaciones, una que expresa el antígeno CD4 y otra que expresa el antígeno CD8.

Esta última fase (selección positiva) acontece en la médula del timo. Todos los linfocitos T maduros de la sangre periférica que emigran del timo expresan los antígenos CD2, CD5, CD7 y CD45RA. Entre un 70% y un 75% expresa la molécula CD4 y constituyen la población linfocitaria colaboradora o helper. Estos linfocitos presentan un receptor para el fragmento Fc de la Ig M y facilitan la diferenciación de los linfocitos B. El 25-30% poseen el CD8 y constituyen la población T citotóxica, aunque ambas poblaciones pueden ser citotóxicas.

Los LT llegan a los órganos linfoides periféricos donde los LT “naive”, bajo la influencia de un primer estímulo antigénico, sufren una etapa de transformación blástica (T-inmunoblasto) con producción de glicoproteínas de bajo peso molecular, denominadas linfocinas. Los inmunoblastos T dan lugar a los LT memoria y LT efectores antígeno-específicos, y a diferencia de los timocitos, son Tdt y CD1 negativos e intensamente positivos para los antígenos T, expresando CD4 o CD8 o ninguno de los dos (*Tabla 1.3*).

CELULA	CÉLULA PROGENITORA	PRO TIMOCITO	TIMOCITO MADURO	TIMOCITO INTERMED	TIMOCITO MADURO MEDULAR	LINFOCITO T MADUROS: COLADOR Y SUPRESOR
REORDENAMIENTO GENES TCR		$\delta\gamma$	$\delta\gamma\beta$	$\delta\gamma\beta\alpha$		
TDT	+	+	+	+/-	-	-
EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS	CD34 HLA-DR	CD34 HLA-DR CD7 CD2 CD45R	CD34 CD3 citoplasmático leve CD7 CD2 CD5 CD38	CD7 CD2 CD5 CD3 citoplasmático CD1 CD4/CD8 $\gamma\delta$ TCR/ $\alpha\beta$ TCR	CD7 CD2 CD5 CD3 membrana CD4 O CD8 $\gamma\delta$ TCR/ $\alpha\beta$ TCR	CD7 CD2 CD5 CD3 CD45RA CD4 O CD8 $\gamma\delta$ TCR/ $\alpha\beta$ TCR

Tabla 1.3 Esquema de diferenciación de los linfocitos T definido por marcadores inmunológicos

1.2. LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA

Las leucemias agudas son proliferaciones clonales malignas de células hematopoyéticas inmaduras ó blásticas, cuya acumulación progresiva se acompaña de una disminución en la producción de los elementos medulares normales. La organización mundial de la salud (OMS) la define como una expansión clonal de células blásticas en médula ósea, sangre periférica y otros tejidos y se incluye dentro de las neoplasias de precursores de células B y T.

La incidencia del cáncer infantil es de 120-150 casos por año y por millón de habitantes menores de 14 años de edad.

Las leucemias agudas constituyen una tercera parte de todos los casos de cáncer infantil y en la edad pediátrica el 75% de las leucemias son linfoblásticas agudas.¹²

El mecanismo general de la leucemogénesis se basa en la aparición en los progenitores hematopoyéticos de translocaciones específicas que generan nuevos genes de fusión. Estos genes son responsables de la expresión de protooncogenes que codifican quinasas y activan factores de transcripción, que aumentan la capacidad de auto-regeneración celular e impiden su diferenciación y apoptosis.

En los subtipos genéticos más frecuentes de LLA en niños, la primera alteración se da en útero, como se demuestra en la presencia del gen de fusión TEL/AML1 o hiperdiploidías en las muestras neonatales de Guthrie.

Estas primeras anomalías muestran estadios pre-leucémicos, que no leucémicos, dado que la mayoría de estos niños no presentará una leucemia aguda a lo largo de su vida. Las LLA de estirpe T no aparecen en estudios neonatales, por lo que se cree que las alteraciones se adquieren más tardíamente.

La heterogeneidad biológica que caracteriza la LLA pediátrica ha determinado la necesidad de estratificar a los pacientes en grupos de riesgo de recaída con el fin de ofrecer terapias adaptadas a cada paciente, manteniendo la misma tasa de curación con menor toxicidad en pacientes de bajo riesgo de recaída. El valor pronóstico de determinadas variables ha permitido la estratificación en pacientes de bajo riesgo, intermedio (50-60% del total) y de alto riesgo.

El tratamiento poliquimioterápico y estratificado según el riesgo de recaída han hecho de la LLA pediátrica un exitoso ejemplo de curación del cáncer¹³. El tratamiento de la LLA tiene como objetivo inducir una remisión clínica y hematológica y mantener dicha remisión, mediante quimioterapia sistémica y del sistema nervioso central.

Los protocolos de la década de los 90 obtienen una supervivencia global a los 5 años del 80%, acercándose en la actualidad al 90% ^{12, 14, 15}. Este progreso es el resultado del mejor conocimiento de los mecanismos etiopatogénicos de la enfermedad, la mejora de las medidas de soporte y los avances obtenidos en su tratamiento, así como la inclusión de los pacientes en protocolos clínicos de grupos cooperativos.

Existe un grupo de alto riesgo formado por los pacientes no respondedores o que presentan una recaída precoz que no es subsidiario de curación sólo con quimioterapia, a pesar de recibir los tratamientos más agresivos. Este grupo constituye un 5-7% de las LLA y son los candidatos a trasplante de progenitores hematopoyéticos alogénico ¹⁶.

1.2.1 Leucemia linfoblástica aguda de precursores B

La leucemia linfoblástica aguda de precursores B (LLA-B) representa la proliferación de células comprometidas hacia la línea B y constituye el 85% del total de las leucemias agudas en la edad pediátrica.

El estudio de determinadas alteraciones genéticas y el inmunofenotipo poseen un papel relevante en la clasificación pronóstica. ¹⁷

a) Clasificación genética

El desarrollo de las técnicas de biología molecular ha permitido la detección de anomalías cromosómicas en LLA-B con cariotipos aparentemente normales en el 60-85% de los casos.

Se establecen según la OMS dos grandes grupos ¹⁸:

- Buen pronóstico con alta sensibilidad a la quimioterapia ¹⁹: hiperdiploidía (DNA Índex > 1.16 o > 50 cromosomas por célula leucémica) y t (12;21) (p13; q22) que da lugar al gen de fusión TEL/AML1.
- Mal pronóstico:
 - a) Hipodiploidía: menos de 44 cromosomas
 - b) Translocación t (9;22) (q34; q11.2) que resulta en el gen de fusión BCR/ABL, denominado cromosoma *Philadelphia*: este gen provoca una actividad tirosincinasa de ABL anómala con aumento de la proliferación y descenso de la apoptosis celular. Se observa en el 2-3% de las LLA infantiles ^{20,21}

- c) Translocaciones que implican al gen MLL como reordenamientos MLL/AF4 t (4; 11), MLL/ENL t (11;19) y MLL/AF9 t (9; 11). El reordenamiento MLL (11q23) o de leucemia de linaje mixto se asocia a expresión anormal genes HOX provocando un crecimiento anómalo de las células hematopoyéticas²². Aparece en el 80% de los casos de LLA en lactantes y sólo en el 2% de los niños mayores de 2 años.
- d) Translocación (1;19) (q23; p13.3) que da lugar al gene de fusión E2A/PBX se encuentra en el 25% de las LLA infantiles pre-B.

b) Clasificación inmunológica

Según la clasificación del Grupo Europeo de Clasificación Inmunológica de Leucemias (EGIL), basada en el grado de diferenciación de la clona proliferante, se reconocen cuatro subtipos de LLA-B: B1 o pro-B, B2 o común, B3 o pre-B y B4 o madura.

El panel de anticuerpos específicos de línea para la clasificación de la LLA de precursores B según la OMS incluye: precursores hematopoyéticos: CD34, HLA-DR, Tdt, CD45 y línea B: CD19, CD20, CD22 citoplasmático y CD79a citoplasmático (también se puede expresar en T).

- Pro-B Tdt+ DR+ CD19+ CD10- Ig C- Ig S-
- B común Tdt+ DR+ CD19+ CD10+ Ig C- Ig S-
- Pre-B Tdt+ DR+ CD19+ CD10+ Ig C+ Ig S-
- B madura Tdt- DR+ CD19+ CD10+ Ig C+ Ig S+

Determinadas alteraciones genéticas se correlacionan con inmunofenotipos definidos:

- La LLA-B con t (12;21) muestran CD19, CD10 y HLA-DR positividad y son habitualmente CD20 negativas. Este tipo de leucemia presenta característicamente CD13 y CD33. La negatividad o expresión parcial de CD9 y CD20 son altamente predictivas de presencia del gen TEL/AML1.
- Las LLA-B con reordenamiento MLL se asocian a fenotipo pro-B.
- La mayoría de las LLA con *Philadelphia* positivo presentan un inmunofenotipo común.
- Las LLA-B con t (1; 19) son de inmunofenotipo pre-B, CD34 negativas, CD10 positivas, CD20 débil o negativas y cadenas *mu*-intracitoplasmáticas positivas.

1.2.2 Leucemia linfoblástica aguda de precursores T

La leucemia linfoblástica aguda de precursores T constituye el 15% de las LLA en niños. Se caracteriza por su resistencia a la quimioterapia, dado que los precursores T acumulan menor cantidad de metotrexate y citarabina que los precursores B. En los protocolos se considera este grupo de alto riesgo y reciben quimioterapia más intensiva, obteniéndose en la actualidad resultados cercanos a los del linaje B.

a) Clasificación genética

Un 25-30% de los casos de LLA-T presentan alteraciones cromosómicas que implican fundamentalmente a los puntos de rotura de los cromosomas donde se localizan los genes de los receptores de célula T (TCR). Estos genes incluyen factores de transcripción como MYC (8q24.1), TAL1 (1p32), RBTN1 (11q15), RBTN2 (11p13) y HOX11 (10q24), y la tirosinasa de citoplasma LCK (1p34.3-35). En la mayoría de los casos, estas translocaciones conducen a desregulación de la transcripción con la región reguladora de uno de los locus del receptor de célula T. A diferencia de las LLA-B, ninguna de las alteraciones observadas permite clasificar a los pacientes en diferentes grupos de riesgo.

b) Clasificación inmunológica

La LLA-T se estratifica según los diferentes estadios de diferenciación intratímica, de acuerdo con el número y secuencia de los antígenos expresados: CD3 de citoplasma, CD2 y CD7 son los más tempranos, seguidos de CD5 y el CD1a y finalmente el CD3 de membrana. El 70% de LLA-T presentan las características de timocitos 1 y el resto corresponden a timocitos 2, siendo excepcionales las de fenotipo maduro. De todos los marcadores mencionados, el CD3 de citoplasma y el CD7 son positivos en la mayoría de los casos. Los blastos a menudo coexpresan CD4 y CD8 y el CD10 puede ser positivo. Pueden aparecer antígenos mieloides asociados como el CD13 y/o el CD33 y rara vez el CD117. El grupo EGIL propuso una clasificación inmunológica de las LLA-T partiendo de una positividad para el anticuerpo CD3 citoplasmático o de membrana:

- LLA-T1 o pro-T CD7+
- LLA-T2 o pre-T CD2+ y/o CD5+ y/o CD8 +
- LLA-T3 o cortical CD1a +
- LLA-T4 madura CD3s y CD1a negativa

En algunos estudios se observa relación entre los estadios de diferenciación T y la supervivencia, aunque por el momento no se ha encontrado ninguna correlación definitiva.

1.3 TRASPLANTE ALOGÉNICO DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS

La mayoría de los niños con LLA presentan una excelente curación con los protocolos de tratamiento quimioterápico actuales obteniendo supervivencias del 80-90%, aunque existe un grupo de muy alto riesgo con altos índices de recaída (IR).

El grupo de niños con LLA de muy alto riesgo obtienen la mejor supervivencia con el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.^{23,24}

La mayoría de los grupos definen el grupo de alto riesgo como los pacientes que presentan una supervivencia libre de recaída (SLR) menor del 50%. Este grupo de pacientes se trasplantan tras alcanzar la primera remisión (RC1) de la enfermedad^{25, 26, 27, 28} (RC1): en la mayoría de estudios se objetiva un menor índice de recaída con una mayor mortalidad relacionada con el trasplante (MRT).

Los criterios de muy alto riesgo no son uniformes para todos los grupos y a medida que se mejoran los resultados con nuevos protocolos de quimioterapia, las indicaciones de trasplante se reservan para pacientes considerados resistentes al tratamiento o con un lento aclaramiento de blastos²⁹: pacientes que no alcanzan la remisión completa tras la inducción y los que presentan EMR positiva post-inducción (>1%), previo a la consolidación (> 0,1%) ó tras la consolidación (> 0,1%).

En la actualidad, ninguna anomalía citogenética o el fenotipo T son indicaciones absolutas de trasplante en RC1 *per se*:

- El grupo de pacientes con hipoploidía se trasplantan en RC1 los malos respondedores al tratamiento con corticoides en el día +8.
- La introducción de los fármacos inhibidores de tirosin quinasa como imatinib en el tratamiento de inducción de la LLA Philadelphia positiva se consiguen SLR mayores de 80%, por lo que el trasplante en RC1 se reserva a los malos respondedores al tratamiento con corticoides en el día +8³⁰.
- En el grupo de pacientes MLL positivo se trasplantan en RC1 un subgrupo de especialmente mal pronóstico: menores de 6 meses de edad con mala respuesta al día +8 o cifra de leucocitos al debut mayor de $300 \times 10^9/L$, en los que el trasplante reduce el riesgo de recaer o fallecer en un 64%³¹.
- La supervivencia de las LLA de estirpe T en la actualidad ha mejorado sustancialmente por lo que se reserva el trasplante en RC1 al subgrupo de “early T”, que presenta muy mal pronóstico con SLR del 20%³².

El principal motivo de trasplante en primera remisión es la mala respuesta al tratamiento que es el mayor factor predictivo de recaída de la LLA.

Los pacientes que presentan una recaída medular precoz, es decir, durante el tratamiento o en los primeros 6 meses de su finalización ^{33, 34} presentan muy mal pronóstico, por lo que se trasplantan tras alcanzar una segunda remisión ³⁵ (RC2). En los casos de recaída más tardía, el TPH no parece ofrecer mejores resultados que la quimioterapia convencional ³⁶. Los pacientes en tercera remisión o mayor son también candidatos a recibir un alo-TPH.

Las series publicadas muestran los siguientes resultados según si los pacientes se trasplantan en primera o segunda remisión: la recaída es de un 10-20% en los trasplantados en RC1 y de un 20-40% en los trasplantados en RC2. En relación con la mortalidad relacionada con el trasplante en RC1 es del 10-15% y en RC2 del 15-25%. Finalmente, la SLE en RC1 es del 60-80% y en RC2 del 40-50%.

Los resultados del trasplante están relacionados también con el donante disponible. El hermano HLA-idéntico (HI) es el mejor donante posible aunque sólo lo poseen un 25% de los pacientes. En la actualidad, con el desarrollo de nuevas técnicas de estudio del HLA clase I y II así como de registros internacionales, los resultados con donantes compatibles no emparentados (DNE) han mejorado significativamente, acercándose a los de HI para algunas indicaciones, como sería el caso de la LLA ³⁷. La sangre de cordón umbilical (SCU) de hermanos idénticos se empezó a utilizar en 1988 y desde entonces su uso se ha extendido a unidades de donantes no emparentados ³⁸. Un análisis retrospectivo de Eurocord comparó los resultados de 541 niños con LLA trasplantados con SCU (n=99) y MO de donantes no emparentados. En el día + 100 postrasplante los resultados de recaída fueron similares. La SCU presentó una recuperación hematológica más lenta, mayor mortalidad relacionada con el procedimiento y menor incidencia de EICH aguda ³⁹.

La secuencia de selección de un donante sería: primero MO de un HI y en su ausencia, iniciar una búsqueda de DNE siendo la MO la fuente de primera elección y/o SCU con celularidad mayor de 3×10^7 /kg de receptor ⁴⁰.

En relación con el donante de progenitores, en una publicación reciente del International Bone Marrow Transplantation Research (IBMTR), se compararon los resultados de supervivencia en niños con LLA tras trasplante de MO de HI (n=101) y DNE con MO (n=85) y SCU (n=81).

La SG y SLE fue similar en los tres grupos, no encontrándose diferencias según la fuente utilizada. La MRT fue diferente: 31%, 15% y 6% en MO DNE, SCU DNE y MO HI respectivamente ⁴¹.

Otro estudio del grupo alemán Berlín-Frankfurt-Münster (BFM) ³⁵ que compara HI y DNE objetivó en 411 niños que la SLE era del 71% y 67% respectivamente, no encontrándose diferencias significativas tampoco en la tasa de recaída que era del 24% y 22% respectivamente, así como en la mortalidad relacionada con el procedimiento (MRT) que era de un 2% y 10%, respectivamente.

El régimen de acondicionamiento utilizado previamente al trasplante posee un impacto significativo en los resultados. El régimen de Irradiación corporal total (ICT) combinado con ciclofosfamida (Cy), actualmente considerado el régimen de acondicionamiento estándar fue inicialmente utilizado por Brochstein *et al*, en la década de los 80 ⁴².

La dosis única de ICT se ha fraccionado actualmente por 6 dosis , administrándose la dosis total de 12 Gy ⁴³, con menores efectos adversos aunque siguen siendo graves, en especial, el riesgo de neoplasias secundarias y daños en el desarrollo neurológico en niños menores de 3 años; en este grupo de edad, la ICT se sustituye por busulfan.

Se han publicado múltiples estudios donde se utilizan otros quimioterápicos como citarabina, melfalán, vincristina, tiotepa, etopósido... Los datos concluyen que se observa mejor supervivencia con regímenes con radioterapia aunque el uso de etopósido en vez de Cy o la adición de tiotepa pueden mejorar estos resultados.

Los estudios de cohortes de niños con LLA que recibieron un alo-TPH y que han sido publicados en los últimos años por los principales grupos se muestran en las siguientes tablas I.4, I.5 y I.6.

AUTOR GRUPO	t	N	ACOND	Seg (a)	SLR %	REC %
Bordigoni/Francia(44)	1980-87	32	ICT/Cy	2,5	84,4	3,5
Von Bueltzingsloewen /Francia (45)	1982-92	16	BU + otros QT	3,9	61,1	38,9
Saarinen/Países nórdicos (46)	1981-91	22	ICT/Cy	>2	73	9
Chessells/Reino Unido (47)	1985-90	34	ICT/Cy	3,8	69	11
Satwani/EEUU (27)	1993-96	29	ICT/Cy	3,1	58,6	35
Balduzzi/Italia (23)	1995-00	77	ICT/VP, BU/Cy/VP	5	56,7	34
Ribera/España(48)	1993-02	24	ICT/Cy, BU/Cy	6,5	45	33

Tabla 1.4 Estudios de cohortes de niños con LLA que recibieron un alo-TPH en primera remisión. t: tiempo del periodo a estudio; Acond: acondicionamiento; Seg(a): media de seguimiento en años; BU: busulfan; Cy: ciclofosfamida; VP: etopósido; ICT: Irradiación corporal total; REC: recaída.

AUTOR GRUPO	t	N	SUBGRUPOS (n)	ACOND	Seg (a)	SLR %	REC %
Barrett/IBMTR (16)	1983- 91	255	RC2	Múltiple		40	45
Mousalem/Francia(49)	1983- 93	42	RC2	Múltiple	3	53	17
Uderzo/Italia(50)	1986- 93	46	RC2	ICT/Cy/VCR	2,8	58,2	30
Torres/ España (51)	1980- 88	21	RC2	Múltiple	14,5	42,8	40
Davies/IBMTR(52)	1988- 95	627		Bu/Cy (176)		35	41
				ICT/Cy(451)		50	35
Vicent/España(53)	1995- 99	67	SP (34)	BU/Cy,	2,1	53	28,7
			MO (33)	ICT/Cy		54,9	27,1
Eapen/COG y IBMTR(36)	1991- 97	186	RC2	ICT/Cy, Bu/Cy	8,4	41	43
Muñoz/GETMON(54)	1999- 04	31				43	

Tabla 1.5 Estudios de cohortes de niños con LLA que recibieron un alo-TPH de hermano HLA-idéntico. GETMON: Grupo Español de Trasplante de Médula Ósea en el niño; RC: remisión completa. IBMTR: International Bone Marrow Transplant Research; VCR: vincristina; SP: sangre periférica; MO: médula ósea

AUTOR GRUPO	t	N	SUBGRUPOS (n)	ACOND	Seg (a)	SLR%	RECAÍDA %
Oakhill/Bristol (55)	1988-97	137	RC1 24 RC2 88 RC>2 25	Campath, Cy, ICT	3,2	42 45 26	36,5
Woolfrey/Seattle (56)	1983-99	88	RC1 10 RC2 34 RC3 10	ICT/Cy		67 47 20	11 33 20
Davies/Minnesota (57)	1985-94	35	RC1 4 RC2 15 RC3 14	ICT/Cy/VP	2,1	21 21 42	
Casper /Milwaukee (58)	1986-91	25		ICT/Cy/Ara-C +/- Bu	4,1	40	16
Hongeng/Toronto (59)	1990-98	26		ICT/VP	3,2	49	28
Bunin/NMDP (60)	1988-00	363	RC2	Múltiple 90% ICT	2,4	36	22
Saarinen /Soc Nórdica (61)	1990-97	28	RC2	Múltiple	4,5	54	40
Borgmann/Grupo alemán (35)	1983-01	81	RC2	ICT/Cy/VP (86%)	4,1	42	25
MuñozGETMON (54)	1999-04	27	RC2			37	19

Tabla 1.6 Estudios de cohortes de niños con LLA que recibieron un alo-TPH de donante no emparentado. NMDP: National Marrow Donor Program; Ara-C: citarabina; Bu: busulfan

1.4 ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL

El concepto de enfermedad mínima residual se basa en el principio de que la probabilidad de que un paciente recaiga de una enfermedad neoplásica tras recibir un tratamiento, depende de la cantidad de células tumorales que permanezcan viables ⁶².

El conocimiento actual de la LLA permite asegurar que en los pacientes que recaen persisten células leucémicas a pesar de los tratamientos administrados.

Los pacientes con enfermedad persistente, es decir, con más de 1 célula leucémica entre 100, pueden ser valorados mediante microscopía óptica pero cuando el número de células supervivientes es menor a esta cifra se necesitan otras técnicas de estudio para identificarlas. La detección de estas células es lo que se conoce como seguimiento de la enfermedad mínima residual ^{63, 64, 65} (Figura 1.4).

El estudio de la EMR en niños afectados de LLA tiene dos objetivos principales:

1. Conocer la velocidad de destrucción de la masa leucémica. Este objetivo se consigue determinando la EMR en las primeras fases del tratamiento. La rápida desaparición de las células leucémicas es un factor de buen pronóstico ^{66, 67, 68}.

Este parámetro puede permitir tomar decisiones terapéuticas: intensificar el tratamiento en pacientes con EMR positiva o evitar tratamientos agresivos y sus efectos adversos en niños con EMR indetectable ²⁹.

2. Predecir precozmente la recaída. La monitorización secuencial se realiza a lo largo de todo el tratamiento y una vez finalizado éste. Su objetivo es detectar la recaída antes de la aparición de manifestaciones clínicas y/o hematológicas.

La importancia clínica del estudio de la EMR en pacientes con LLA ha quedado confirmada por la mayoría de los grupos. El grupo alemán, utilizando técnicas de biología molecular demostró su valor pronóstico en los primeros puntos de análisis, durante la inducción y post-inducción, estableciendo tres grupos pronósticos de riesgo de recaída ⁶⁹. También se observó que las LLA-T presentaban una eliminación de la EMR más lenta ⁷⁰.

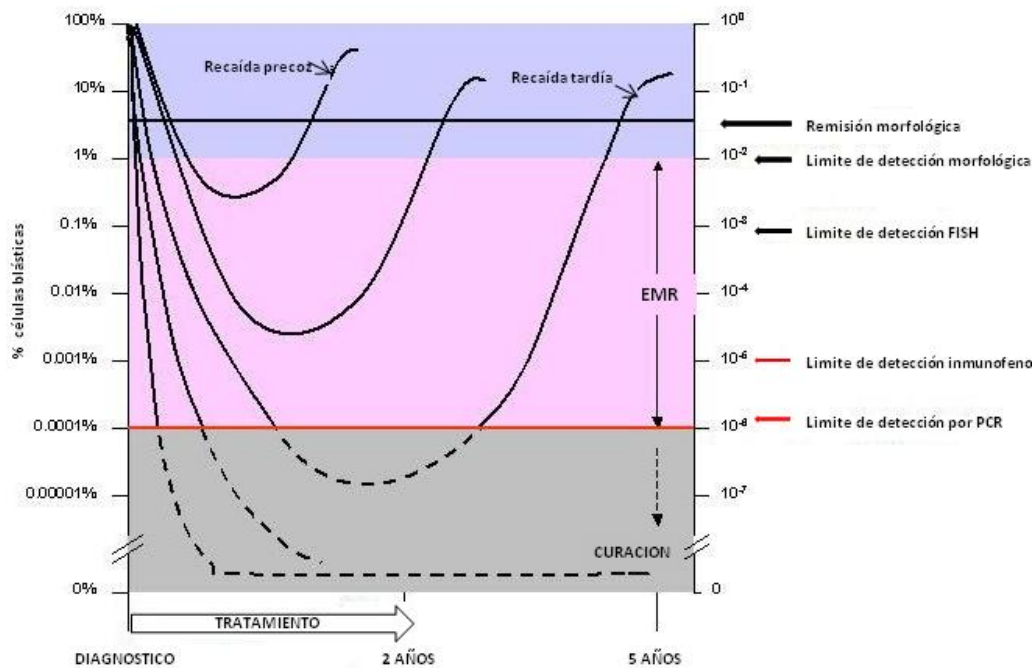


Figura 1.7 Nivel de detección de la EMR

El grupo del St. Jude ^{29, 71}, toma como indicativos de alto riesgo de recidiva, la presencia de ERM $>1\%$ al finalizar la inducción (día +35 a +40) y $>0,1\%$ al finalizar la fase de consolidación (semana 14-16) ^{72, 71, 73}. Según sus resultados el 70% de los pacientes en los que se detecta ERM positiva en la semana 14 y el 86% de aquellos en que se detecta en la semana 32 presentaran recidivas por lo que deben recibir quimioterapia intensiva.

El Children's Oncology Group publicó en 2008 un análisis del impacto pronóstico de la presencia de EMR medida mediante CFM en niños con LLA de precursores B ^{74, 75}. Se midió la EMR en sangre periférica el día + 8 y en médula ósea al fin de la inducción y consolidación en 1971 niños. Se objetivó que la presencia de EMR en el día + 8 y post-inducción se asociaba a menor supervivencia libre de eventos, independientemente de otros factores.

La presencia de EMR después de la inducción demostró ser el factor pronóstico de SLR más significativo en la LLA pediátrica.

La importancia de la presencia de EMR fue independiente de otros factores de riesgo clásicos como la edad, el número de leucocitos al diagnóstico, las alteraciones cromosómicas y la respuesta inicial a la inducción,... por lo que su estudio se ha incluido de forma rutinaria en los esquemas de tratamiento ^{76, 28, 77}.

En la actualidad, se realiza el estudio de EMR en médula ósea en el día +35 (EMR1) y después del primer ciclo de consolidación (EMR2). Si la EMR2 es positiva se realiza un estudio (EMR3) tras el segundo ciclo de consolidación. Se considera aconsejable realizar monitorización secuencial al finalizar la fase de reinducción y al finalizar el tratamiento.

Según los resultados de la EMR, los pacientes son estratificados según el riesgo de recaída y se modifican los tratamientos que deben recibir así como la indicación de TPH.

Hay varios métodos para detectar la presencia de EMR ^{78, 62} (Tabla 1.5):

- Mediante la detección de translocaciones cromosómicas específicas ⁷⁹.
- El estudio de los reordenamientos de genes que codifican la síntesis de inmunoglobulinas o receptores de las células T, por técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- La citometría de flujo (CF) permite la detección de diferentes “inmunofenotipos leucémicos”, esto es, infidelidades de línea, asincronismos madurativos, marcadores ectópicos o fenotipos infrecuentes en la población linfocitaria normal.

Las técnicas de microscopia, citogenética, hibridación fluorescente *in situ* (FISH), biología molecular e inmunofenotipo mediante citometría de flujo constituyen hoy en día herramientas imprescindibles dentro del diagnóstico, estratificación y seguimiento de niños con LLA ⁸⁰.

Todos los métodos proporcionan mucha información en el aspecto diagnóstico y pronóstico de las leucemias agudas aunque para obtener resultados concluyentes es imprescindible tener experiencia y seguir las pautas estandarizadas ^{81, 82, 83}.

ANOMALÍA CELULAR A ESTUDIO	MÉTODO	% DE CASOS	S	PROS	CONTRAS
Alteración cromosómica numérica y/o estructural	Citogenética FISH	30%	10^{-1} 10^{-1} a 10^{-3}	Estandarizado Cuantitativo	Poco sensible
Mutaciones Sobreexpresión Reordenamiento de genes	PCR transcripción gen de fusión	< 50%	10^{-3} a 10^{-6}	Sensible Específico	Difícil cuantificación Contaminación Evolución clonal No diferencia células vivas
Reordenamiento de genes	Amplificación por PCR de Ig y TCR	90%	10^{-4} a 10^{-6}	Sensible Específico	Contaminación Laborioso Evolución clonal No diferencia células vivas
Inmunofenotipo leucémico	Citometría de flujo multiparamétrica	98%	10^{-4} a 10^{-5}	Sensible Simple Rápido Cuantitativo Diferencia células vivas	Difícil estandarizar Evolución clonal

Tabla 1.8 Métodos de detección de EMR en LLA. FISH: hibridación fluorescente in situ. S: sensibilidad.

1.4.1 Microscopía, citogenética e hibridación fluorescente *in situ*

En los protocolos de quimioterapia para valorar la sensibilidad de la enfermedad al tratamiento recibido, se realizan los estudios morfológicos mediante microscopía óptica. Estos estudios detectan la enfermedad cuando se presentan 1-5 blastos respecto a 100 células de morfología normal.

Si la LLA a estudiar presenta translocaciones específicas, se pueden realizar estudios citogenéticos aunque la sensibilidad es muy baja.

Los estudios de hibridación de fluorescencia *in situ* (FISH) solventan las limitaciones de la microscopía y de la citogenética convencional siendo capaces de detectar enfermedad si existe de 0,1 a 1 blastos respecto a 100 células de morfología normal.

Los estudios FISH tienen la ventaja de visualizar señales aberrantes sobre el resto de células normales por lo que en interfase puede identificar cambios cromosómicos de significado pronóstico. Las pruebas centroméricas son ideales para la detección de ganancias cromosómicas completas como en la hiperdiploidía. Existen determinadas alteraciones que no se detectan por citogenética convencional como la t (12; 21) (p13; q22) y se realizan mediante FISH por rutina.

La mayoría de los niños que recaen tienen enfermedad persistente a un nivel menor del 0,1%, lo que denominamos enfermedad mínima residual (EMR), por lo que necesitamos otras técnicas para detectarla ⁸⁴.

1.4.2 Biología molecular

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica enzimática que amplifica un trozo de DNA, duplicando el producto en cada ciclo y al final de 40 ciclos lo amplifica a 10^{12} . El objetivo a amplificar puede ser el producto quimérico producido por un gen de fusión debido a translocaciones cromosómicas. Si el producto quimérico se encuentra en abundancia se puede identificar un blasto entre 1 millón de células normales ^{85, 80}. El 30% de las LLA no presentan translocaciones identificables que puedan ser utilizadas como objetivos, por lo que el uso aislado de translocaciones mediante RT-PCR no es suficiente en el seguimiento de la mayoría de casos.

En la gran mayoría de las LLA, los linfoblastos T o B presentan una parada en su maduración. Durante la diferenciación inicial de las células T y B, los segmentos de variabilidad (V), diversidad (D) y unión (J) de las inmunoglobulinas (Ig) y receptor T (TCR) se reordenan bajo el control del sistema enzimático recombinante V(D)J. La relación de inserción/delección de nucleótidos en los puntos de unión de los genes V, D y J es única para cada célula.

En la mayoría de la LLA de los niños la parada en la diferenciación es posterior a este reordenamiento por lo que al ser una enfermedad clonal, es posible usar estas dianas. Inicialmente se utiliza un panel de primers para identificar clonalidad en la cadena pesada de Ig (Ig H), cadena ligera de Ig (Ig L) y los reordenamientos gamma y delta de TCR. Los productos obtenidos son analizados para confirmar que proceden de la clona blástica y utilizados en el seguimiento.

La PCR en tiempo real (RQ-PCR) es capaz de cuantificar la cantidad inicial de la diana y valorar dinámicamente su desaparición, por tanto, dar información sobre la velocidad de la respuesta al tratamiento que recordemos es el principal factor pronóstico ^{86, 87}. Estos estudios se pueden realizar en más del 95% de los casos y su sensibilidad es del 10^{-4} a 10^{-5} .

1.4.3 Inmunofenotipado y citometría de flujo multiparamétrica

La citometría de flujo multiparamétrica (CFM) es una técnica de análisis celular cuyo fundamento se basa en hacer circular por una columna de flujo una suspensión de partículas, generalmente células, alineadas de una en una, por delante de un haz luminoso (láser) focalizado. La interacción del rayo luminoso con las células genera señales de distintas longitudes de onda que son recogidas por detectores que generan, a su vez, impulsos eléctricos proporcionales a la cantidad de luz incidente. Estos impulsos eléctricos se amplifican y se convierten en señales digitales que se procesan en un ordenador. De esta forma, se permite el análisis cualitativo y cuantitativo de diferentes poblaciones celulares.

Las propiedades de dispersión de la luz nos informan acerca del tamaño celular, cómo desvía la luz incidente (forward scatter-FSC) y granularidad, o complejidad interna (side scatter-SSC).

Las señales de dispersión son de dos tipos:

- Forward scatter (FS): luz dispersada frontalmente en ángulo cónico pequeño (0-10 grados) coincidente con luz incidente y es proporcional al tamaño de la partícula que produce la dispersión.
- Side scatter (SSC): luz dispersada lateralmente es proporcional a la complejidad y granularidad de la estructura celular.

La CFM puede identificar células inmaduras anormales en líquidos corporales y tejidos extramedulares, distinguir blastos de células inmaduras normales en médula ósea y timo y además determinar el linaje de la proliferación blástica.

La CFM puede determinar el porcentaje preciso de células con inmunofenotipo aberrante respecto al total de células analizadas.

Los blastos difieren de las células maduras porque expresan marcadores de inmadurez o presentan ausencia de marcadores de madurez.

La CFM es capaz de:

- identificar y enumerar subpoblaciones celulares únicas y definidas
- seleccionar y separar físicamente subpoblaciones de células deseadas por deflexión electrostática. Esta tecnología de separación se llama "*electronic cell sorting*"
- medir la capacidad funcional de subpoblaciones celulares definidas.

La CFM ha evolucionado rápidamente con el uso de múltiples fluorocromos para la identificación de diferentes subpoblaciones celulares en una sola muestra. Además se pueden utilizar de forma simultánea múltiples fluorocromos sobre la misma célula, utilizando varios rayos láser. Una de las aplicaciones más comunes de la CFM es la caracterización celular de diferentes estadios madurativos mediante el uso de anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos contra marcadores de superficie e intracitoplasmáticos. Los métodos inmunológicos posibilitan la detección de antígenos, moléculas de inmunoglobulinas y receptores de la membrana celular que pueden ser específicos para una línea celular o para un estadio madurativo determinado ⁸⁸. Se han clasificado miles de anticuerpos monoclonales que se han agrupado hasta la actualidad en 300 grupos denominados CD (*cluster designation/cluster differentiation*).

Un grupo o CD puede incluir una serie de anticuerpos monoclonales que detectan diferentes epítomos de una molécula y, por tanto, sus propiedades funcionales y bioquímicas.

El grupo cooperativo MIC en Leuven (Bélgica, 1985) determinó las directrices para la clasificación morfológica, inmunológica y citogenética de las leucemias agudas. A la clasificación inmunológica se ha llegado a través de distintas etapas y en función de las técnicas de estudio en las diferentes épocas. Inicialmente al utilizar como marcadores de población linfoide las rosetas E y las inmunoglobulinas de superficie, se desglosaron 3 tipos de LLA: T, B y no T no B, este último denominado nulo ^{89,90}.

El segundo paso en la clasificación inmunológica fue el descubrimiento del antisuero anti-CALLA o CD10, hecho que permitió identificar las LLA “comunes” (CALLA positivas) y las nulas propiamente dichas, que son CALLA negativas. Posteriormente, se advirtió que un 15-30% de las formas comunes presentaban, además, cadenas pesadas *mu*-intracitoplasmáticas sin cadenas ligeras, quedando así definidas las LLA de tipo pre-B.

Finalmente, se ha observado que las LLA “nulas” presentan ensamblaje de los genes que codifican la síntesis de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas y que son capaces de reaccionar con anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos de serie B, por lo que se ha demostrado que los linfoblastos de la denominada LLA nula pertenece en realidad a la estirpe B.

La CFM se realiza en 3 etapas independientes:

1. En la fase pre-citometría se realiza la preparación de los reactivos y de las células, diseño del protocolo y coloración de las células con los reactivos fluorescentes. Se emplean anticuerpos monoclonales antígeno-específicos marcados con un fluorocromo dirigidos al marcador que queremos evaluar. Para esto, es necesario aislar previamente las células a analizar; por ejemplo linfocitos, a partir de sangre total, por gradiente de ficol.
2. Las células son luego estimuladas a producir los marcadores poniéndolas en contacto con un antígeno capaz de estimular su síntesis. Posteriormente estas son incubadas con una sustancia denominada brefeldina A (BFA) cuya función es impedir que las células expulsen las citocinas que están sintetizando, haciendo entonces que se acumulen en su interior.
3. Después las células son fijadas, permeabilizadas y finalmente marcadas con los anticuerpos específicos. Una vez realizado este último procedimiento, las células están listas para ser leídas en el citómetro. La fase de citometría de flujo involucra el procesamiento de las células marcadas y la recolección de los datos para cada una de las medidas (parámetros) realizados en cada célula individual. En la última fase se analizan los datos recolectados.

1.4.4 Comparativa entre biología molecular y citometría de flujo

Los estudios de EMR actuales se basan en la citometría de flujo multiparamétrica y en la amplificación mediante PCR de genes que codifican receptores de células T y gammaglobulinas. ^{6, 71}

La mayoría de grupos han realizado estudios con ambas técnicas obteniendo una alta concordancia en la mayoría de las muestras de niños con LLA ^{7, 78,91} cuando los niveles de EMR son de 0,01% o mayor respecto a la población normal.

- Neale et al. comparó ambas técnicas en 1300 muestras de sangre periférica y médula ósea de niños con LLA. En su estudio concluyó que los resultados son concordantes en un 97% cuando se utiliza un nivel del 0,01% de EMR ⁹².
- Malec et al, en 71 muestras de 22 niños con LLA, encontró una concordancia del 89% cuando el *cut off* era 0,01% ⁹³.
- Robillard et al, analizó 140 muestras de 91 pacientes siendo las técnicas concordantes en el 97% de los casos. De los 4 discordantes, 3 detectaron EMR pero a diferentes niveles. En cambio hubo 3 pacientes (2 eran T) que no pudieron inmunofenotiparse apropiadamente y fueron estudiados por PCR ⁶³.

Las ventajas de la citometría de flujo se pueden resumir en ⁹⁴: análisis rápido (5.000 eventos /seg) de un número estadísticamente significativo de células ($10^3 - 10^5$), múltiples marcajes de una sola célula, alta sensibilidad y objetividad, medidas separadas de cada célula (no sólo el promedio), medidas cuantitativas con discriminación de las células según la cantidad de marcador, eliminación de blastos apoptóticos que provocan falsos positivos en estudios de PCR, múltiples parámetros (subpoblaciones complejas) y se puede utilizar en sangre periférica con escasa celularidad.

Otra de las ventajas de la CFM que se puede utilizar en prácticamente todos los pacientes que tengan un estudio individualizado del inmunofenotipo de su leucemia aguda en el momento del diagnóstico, es decir, el inmunofenotipo asociado a la leucemia (LAIP). En el estudio de Kerst et al, la CFM permitió monitorizar el 90% de los pacientes con LLA-B y el 100% de los de linaje T, en 102 muestras ⁸. Robillard et al, observó que en lactantes con CD10 negativas y/o t (4; 11) precursores B y niños con LLA-T inmadura la EMR pudo ser detectada por CFM y no por PCR.

Las desventajas de esta técnica incluyen: poca información morfológica de la célula, no proporciona información de la localización celular en un tejido, analiza una cantidad limitada de material (10 millones de células / h), necesita una suspensión de células individuales, costos de la tecnología, método destructivo, incapacidad de visualizar las células que se analizan y posibilidad de falsos negativos.

Los falsos positivos se dan principalmente por cambios de inmunofenotipo o selección de poblaciones minoritarias debidas al tratamiento ^{82, 83}; para evitarlos, no se debe considerar la sobreexpresión de CD10 como único marcador y se deben poseer de cada paciente varias LAIPs.

Para obtener resultados comparables, el estudio de EMR mediante CFM se debe realizar en un centro de referencia y amplia experiencia y dentro de los estándares internacionales.

En los últimos años las técnicas de estudio y detección de EMR son objeto de estandarización dentro de los proyectos BIOMED-1, BIOMED-2, Estudio europeo en la detección de EMR en LA, I-BFM-ALL-FLOW-MRD Network, ESG-MRD-ALL, el Consorcio Euroflow, que publicó un protocolo recientemente en 2012 ⁸¹ y el grupo francés en 2015 ⁹⁵.

La CFM ofrece una detección de la EMR fácilmente aplicable a la práctica clínica por su rapidez y fácil metodología y ofrece resultados de EMR cuantificable, además de informar sobre el resto de celularidad normal ⁸. Es un método rápido, objetivo y cuantitativo de análisis de células y sus componentes internos.

2. HIPOTESIS DE TRABAJO

La presencia de enfermedad mínima residual en médula ósea, medida mediante citometría de flujo multiparamétrica, previamente a recibir un Trasplante Alogénico de Progenitores Hematopoyéticos en niños con Leucemia Linfoblástica Aguda, es un factor pronóstico en la evolución postrasplante que se correlaciona con la recaída y la supervivencia global.

Si esta hipótesis es correcta, la detección de la EMR medida mediante CFM permitirá definir un grupo de pacientes con alto riesgo de recaída que podrían beneficiarse de nuevas estrategias terapéuticas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo primario

Valorar la presencia de EMR en médula ósea previa a un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos mediante citometría de flujo multiparamétrica y su impacto pronóstico en términos de supervivencia libre de recaída y global.

3.2 Objetivos secundarios

- a) Identificar factores de riesgo relacionados con la recaída y supervivencia.
- b) Valorar si los factores de riesgo afectan de forma distinta a los pacientes según la presencia o no de EMR pre-TPH.
- c) Valorar los estudios de seguimiento postrasplante como EMR por CFM y quimerismo con el objetivo de predecir o detectar precozmente la recaída.

4. PACIENTES Y METODOS

4.1 TIPO DE ESTUDIO

Estudio de cohortes con recogida retrospectiva de los datos correspondientes a los años 2002-2007 y posteriormente con recogida prospectiva de la información.

4.2 ÁMBITO

El estudio se ha llevado a cabo en el Servicio de Hematología y Oncología Pediátrica y Unidad de Trasplante de Progenitores Hematopoyéticos del Hospital Universitario Vall d'Hebron de Barcelona. Este centro es un referente a nivel nacional e internacional en el tratamiento de niños con leucemia linfoblástica aguda y en la realización de trasplantes. Como centro de referencia pertenece a la Red Internacional de Excelencia en el Tratamiento del Cáncer en la Infancia y Adolescencia, llevando a cabo su labor clínica, investigadora y docente en coordinación con las sociedades científicas internacionales (SIOP, EBMT , CIBMTR) y nacionales (SEHOP, PETHEMA) así como con otros centros hospitalarios de prestigio. Sobre la base de los datos del Registro Nacional de Tumores Infantiles, es el hospital del Estado que más niños diagnostica y trata así como mayor actividad trasplantadora tiene. La unidad de trasplante de progenitores se abrió en 1984 y desde entonces se han realizado más de mil trasplantes de todo tipo y para todas las indicaciones, de donante familiar y alternativo, usando médula ósea, sangre periférica y cordón umbilical.

En 2012 la Unidad de TPH obtuvo la acreditación de calidad JACIE, la más específica para los procesos de trasplante de progenitores hematopoyéticos que concede el comité conjunto del ISCT (International Society for Cellular Therapy - Sociedad Internacional de Terapia Celular) y del EBMT (European Group for Blood and Marrow Transplantation - Grupo Europeo de Trasplante de Sangre y Médula Ósea).

4.3 POBLACIÓN A ESTUDIO

Los niños afectos de LLA que han recibido un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos entre 2002 y 2012.

Los pacientes han sido tratados según los protocolos vigentes y según las directrices de los diferentes grupos nacionales, europeos e internacionales. Los protocolos usados fueron los del grupo Pethema^{96,97} y SHOP⁷².

4.4 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LOS PACIENTES

Se incluyeron todos aquellos pacientes en los que:

- al diagnóstico de la LLA se identificaron inmunofenotipos aberrantes asociados a la leucemia (LAIPs) mediante CFM y tuvieron como mínimo un fenotipo útil para la identificación y seguimiento de las células blásticas.
- previo al TPH, se realizó un aspirado de médula ósea para confirmación citológica de la remisión morfológica, estudios moleculares y estudio de EMR mediante CFM.

4.5 RECOGIDA DE INFORMACIÓN Y SEGUIMIENTO DE LA COHORTE

Se ha obtenido la información de la historia clínica de los pacientes. Se realizó seguimiento de los pacientes hasta el día 31/12/2013, siendo el tiempo mínimo de seguimiento de 15 meses.

4.7 VARIABLES DEL ESTUDIO

Se han estudiado los datos demográficos de los pacientes, las características de la enfermedad de base y el tipo de trasplante así como los datos de su evolución incluyendo información relacionada con la recaída y mortalidad.

Las variables que se recogen en este estudio son:

- Variables relacionadas con el paciente:
 - Sexo: varón o mujer
 - Edad al trasplante: medida en años
- Variables relacionadas con la LLA:
 - Fenotipo: B (B común, pre-B y pro-B) y T (T, pre-T y pro-T)
 - Presencia de genes de fusión: BCR/ABL, MLL/AF4, TEL/AML.
- Variables relacionadas con el trasplante:
 - Número de remisión de la enfermedad al trasplante: primera, segunda y mayor que segunda.

- Indicación de trasplante: recaída precoz, mala respuesta inicial y grupo de alto riesgo (EMR positiva, genes de fusión BCR/ABL y MLL y fenotipo T), tercera o mayor remisión y recaídas medular y testicular.
- Donante de progenitores hematopoyéticos: familiar (hermano HLA-idéntico, familiar idéntico y no idéntico) y donante no emparentado.
- Fuente de progenitores hematopoyéticos: médula ósea, sangre periférica y sangre de cordón umbilical.
- Acondicionamiento
 - Quimioterapia (dosis): etopósido, ciclofosfamida, busulfan, fludarabina, tiotepa y melfalán.
 - Irradiación corporal (12 Gy fraccionada): sí o no administrada
- Estudio pre-TPH de EMR por CFM/biología molecular: % de células blásticas respecto a celularidad normal/ presencia o ausencia de gen de fusión.
- Variables relacionadas los resultados postrasplante:
 - Presencia y grado de Enfermedad injerto contra huésped aguda: sí o no y grado (I, II, III y IV)
 - Presencia y grado de Enfermedad injerto contra huésped crónica: sí o no y extensión (limitado o extensa)
 - Recaída de la enfermedad: sí o no
 - Tiempo de trasplante a recaída: medido en meses
 - Estado: vivo/éxito
 - Tiempo de trasplante a éxito: medido en meses
 - Motivo éxito: recaída, infección y toxicidad.
 - Estudio postrasplante de EMR por CFM/biología molecular: % de células blásticas respecto a celularidad normal/ presencia o ausencia de gen de fusión.
 - Quimerismo postrasplante: completo, mixto o autólogo.

4.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se describieron las variables continuas usando medidas de tendencia central (media y mediana) y de dispersión (desviación estándar y rango). Si las variables continuas mostraban una distribución normal se usó la media como medida de tendencia central y la desviación estándar como medida de dispersión. En caso contrario, se empleó la mediana y el rango respectivamente. Para comprobar la distribución normal de las variables continuas se usó la prueba W de Shapiro-Wilk. Las variables categóricas se describieron mediante las frecuencias y proporciones con su intervalo de confianza del 95% (IC 95%).

Las probabilidades de SLR y SG fueron estimadas mediante el método de Kaplan-Meier. Se realizó un análisis bivariado de variables independientes como el sexo, el estado de remisión previo al trasplante, tipo de trasplante, acondicionamiento, presencia de EICH aguda/crónica y detección de EMR previa al trasplante en relación con la recaída y éxito, usando la diferencia de riesgos, la razón de riesgos y la odds ratio (95% de intervalo de confianza). Se estratificaron los riesgos dependiendo del estado de EMR. Todos los análisis estadísticos se realizaron con los programas estadísticos Stata 13 (StataCorp LP. College Station. Texas) y SPSS 12 (IBM. Armonk. New York)

4.9 CONSIDERACIONES ÉTICAS

Se siguieron las directrices de la Declaración de Helsinki. Se solicitó valoración por el Comité de Ética en la Investigación Clínica del Hospital Universitario Vall d'Hebron, que fue positivo a su realización. El investigador del estudio se compromete a respetar la confidencialidad de los datos de los participantes y que en todo momento se cumpla lo establecido por la legislación vigente. Las muestras de médula ósea valoradas en el estudio son las mismas que se utilizan para el estudio y monitorización rutinaria de los pacientes, por tanto, no se ha requerido obtener muestras extra de los pacientes ni se ha realizado intervención alguna en el protocolo a seguir en cada paciente.

4.10 MÉTODOS

4.10.1 Estudio de la EMR mediante citometría de flujo

En este estudio se han seguido los pasos consensuados y previamente publicados, que se resumen seguidamente [6, 98, 99, 81](#).

- La médula ósea se recoge en tubo de EDTA, se mantiene a temperatura ambiente y procesa en las primeras 24 horas de la extracción. El análisis de inmunofenotipo se realizó mediante citometría de flujo de 4 colores.
- La técnica consiste en teñir las células (1×10^6 /tubo) mediante inmunofluorescencia directa usando anticuerpos monoclonales conjugados: isotiocianato fluorescente, ficoeritrina, el tándem ficoeritrina-rojo Texas y el tándem ficoeritrina-cianin 5.1. Las células fueron incubadas durante 10 minutos a temperatura ambiente sin luz con una cantidad saturada de anticuerpos conjugados con fluorocromo. Los eritrocitos fueron lisados mediante el método de un tiempo.
- Las células fueron adquiridas en 2 tiempos en un citómetro de flujo (F-500, Beckman-Coulter, Miami, FL, USA) con un láser de argón a 488 nm: primero, $2-5 \times 10^4$ células nucleadas fueron adquiridas para determinar el porcentaje de linfocitos CD19+ (en B-LLA) o CD7+ (en T-LLA) y posteriormente en una ventana se aplicaron sólo los eventos CD19+ y CD7+, en cada caso, para diferenciar el grupo de células de interés.

Un total de $0,5-1 \times 10^6$ células se obtuvieron para cada combinación de anticuerpos. Se utilizaron inicialmente SSC/CD19 y SSC/CD7 en B y T LLA, respectivamente ([Tabla M.1](#)).

- El *gating* secuencial fue utilizado para identificar los inmunofenotipos asociados a cada leucemia específica. El número de células blásticas residuales fue calculado como porcentaje del total de células nucleadas.
- Para la adquisición y análisis de resultados se utilizó el paquete de software CXP (versión 2.0, Beckman-Coulter, Miami, FL, USA). Este método tiene una sensibilidad de al menos 10^{-4} para la detección de células leucémicas entre las normales.

En las LLA se debe realizar el análisis por citometría de flujo con un mínimo de anticuerpos monoclonales que permita su diagnóstico inmunofenotípico.

Es imprescindible el estudio de marcadores citoplasmáticos que definan la línea celular implicada: para la línea B, se utiliza el CD79a/CD22 y para la línea T, el CD3. Es recomendable el empleo simultáneo de marcadores citoplasmáticos y de membrana que permitan identificar con mayor exactitud la población blástica.

De acuerdo con la experiencia de nuestro centro y siguiendo las publicaciones internacionales se consideró como *cut off* para definir EMR positiva como la presencia de 0,01% blastos respecto a la población normal.

	Número de tubo	FITC	PE	ECD	PC5
LLA-B	1	IgG1	IgG1	CD19	CD45
	2	CD10	CD20	CD19	CD34
	3	CD38	CD34	CD19	CD45
	4	X	X	CD19	X
LLA-T	1	CD7	IgG1	CD45	IgG1
	2	CD7	CD1a	CD45	CD34
	3	CD7	CD5	CD3	CD2
	4	CD7	X	X	X

Tabla M.1 Panel de estudio de EMR mediante CFM. FITC: isocianato de fluoresceína; PE: ficoeritrina; ECD: ficoeritrina-Rojo Texas; PC5: ficoeritrina-Cianina 5.1; IgG1: inmunoglobulina isotipo-matched; X: variable dependiente de inmunofenotipo al diagnóstico; anticuerpos monoclonales: IgG1, CD19, CD45, CD20, CD34, CD7, CD1a, CD3 y CD2 de Beckman-Coulter; CD38 de Dako.

4.10.2 Estudio de quimerismo

La evaluación del porcentaje de células del donante presentes en el receptor tras un trasplante de progenitores se evalúa mediante 2 posibles técnicas:

1. Detección de microsatélites de DNA ó *short tandem repeats* (STR) que se realiza en todos los casos debido a su elevada precisión. Se precisa una muestra de sangre periférica pretrasplante del donante y receptor para establecer el patrón de STR de cada uno. Cuando es necesario se puede realizar un estudio de quimerismo en poblaciones celulares concretas denominado quimerismo diferencial.
2. Detección del cromosoma Y que se realiza mediante FISH como técnica adicional a la detección de STR en los pares donante/receptor con disparidad sexual. Este estudio puede realizarse en sangre periférica y en médula ósea pero suele preferirse ésta última.

4.11 DEFINICIONES

4.11.1 Parámetros de resultados postrasplante

Se define fallo de implante (FI) primario como la situación de un paciente que no alcanza recuentos de neutrófilos $> 0,5 \times 10^9/L$, plaquetas $> 20 \times 10^9/L$ y Hb > 8 g/dl mantenidos en el día +28 postrasplante. Se considera FI secundario el del paciente que presenta pérdida de dos líneas celulares previamente implantadas y funcionales.

Se define enfermedad injerto contra huésped (EICH) como la reacción resultante del reconocimiento como extraños de antígenos del receptor por parte de los linfocitos T del donante. Para que ocurra dicha situación se deben cumplir las siguientes condiciones: el implante debe contener células inmunocompetentes, el receptor debe tener aloantígenos que difieran de los del donante o reconocer autoantígenos de forma inadecuada y el receptor debe ser incapaz de producir respuesta inmune contra el injerto. De forma clásica se ha dividido la EICH en aguda y crónica según la clínica se presentara antes o después del día + 100 postrasplante, respectivamente. En el presente estudio se sigue dicha clasificación así como la gradación de la EICHa de Glucksberg y la valoración en de la EICHc limitada y extensa según el grupo de Seattle.

En relación con los índices de supervivencia:

- la supervivencia libre de recaída (SLR) fue definida como el tiempo que sobrevive el paciente sin recaer.
- se define evento como la situación de recaída o éxitus que puede presentar un paciente. La supervivencia libre de eventos (SLE) fue definida como el tiempo que el paciente permaneció vivo sin recaída.
- la supervivencia global (SG) fue definida como el tiempo que el paciente permanece vivo desde el TPH hasta el éxitus por cualquier causa.

4.11.2 Técnicas de estudio

Las definiciones de los grupos según el estado EMR son como siguen:

Grupo con EMR-positiva: presencia 0.01% o más células con inmunofenotipo aberrante medidas mediante CFM respecto al total de linfocitos presentes en la médula ósea estudiada previamente al trasplante.

Grupo con EMR-negativa: presencia de menos de 0.01% de células con inmunofenotipo aberrante respecto al total de linfocitos.

Se define como quimerismo a la coexistencia en un mismo organismo de poblaciones celulares originadas en dos individuos genéticamente distintos. En el contexto del trasplante de progenitores hematopoyéticos alogénico se obtiene una situación de quimerismo, dado que el paciente trasplantado posee células de estirpe hemopoyética del donante. Según la existencia o ausencia de células del paciente tras el TPH se distinguen dos situaciones:

- Quimerismo completo: situación en la que todas las células hematopoyéticas proceden del donante.
- Quimerismo mixto: coexistencia de células hematopoyéticas del donante y receptor.

5. RESULTADOS

5.1 PACIENTES

En este estudio se incluyen 80 niños afectados de LLA de alto riesgo que recibieron de forma consecutiva un alo-TPH desde setiembre 2002 a setiembre 2012.

El primer trasplante incluido en el estudio se realizó el día 12/09/2002 y el último el día 27/09/2012.

- Entre los años 2002 y 2007 se incluyeron 34 pacientes
- Entre los años 2008 a 2012 fueron 46 pacientes.

El seguimiento de los pacientes se realizó hasta el 31/12/2013, siendo como mínimo 15 meses post-trasplante. El grupo de estudio lo formaron: 41 varones (51,2%) y 39 mujeres (48,7%).

La media de edad al trasplante fue de 7,2 años (6 meses - 19 años). La mediana de edad al trasplante fue de 6,5 años. La edad es una variable que sigue una distribución normal.

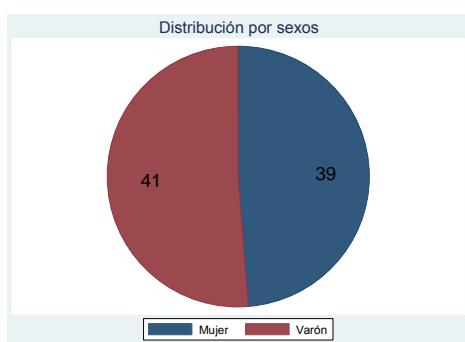


Gráfico R.1 Distribución por sexos

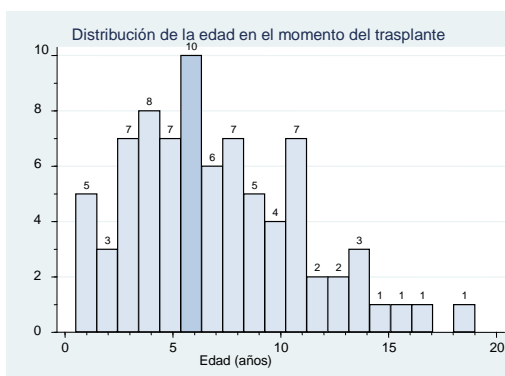


Gráfico R.2 Distribución de la edad en el momento de trasplante

5.2 CARACTERIZACIÓN DE LA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

La mayoría de los pacientes presentaba una LLA de estirpe B, principalmente B común (68%).

El grupo estaba formado por:

- 67 pacientes con LLA de precursores B (83%): B común (55), pre-B (11) y pro-B (1).
- 13 pacientes con LLA de precursores T (16%): T (10), pre-T (2) y pro-T (1).

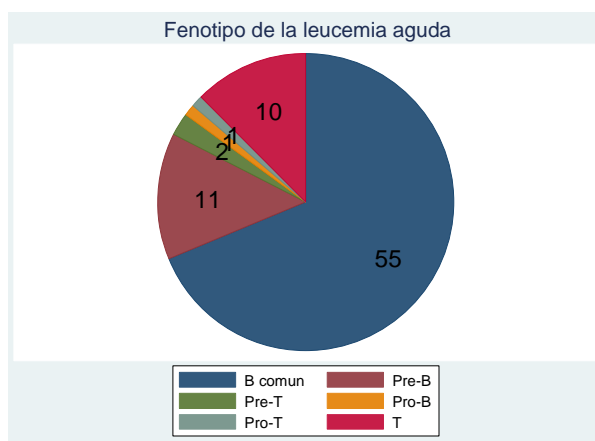


Gráfico R.3 Fenotipo de la LLA

Se detectaron anomalías cromosómicas con implicación pronóstica en 24 pacientes: translocación BCR/ABL en 9 casos (11%), TEL/AML1 en 8 casos (10%) y la MLL/AF4 en 7 casos (8,75%).

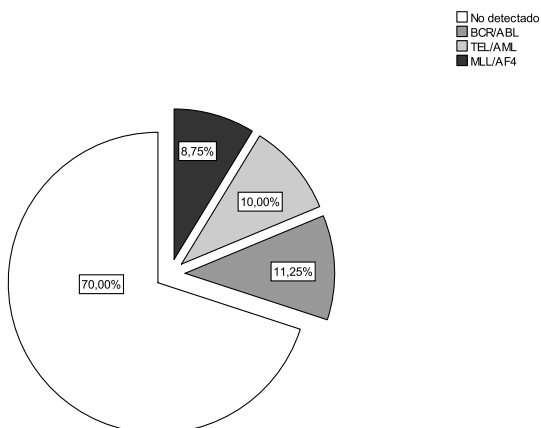


Gráfico R.4 Genes de fusión detectados en el grupo de pacientes

5.3 CARACTERIZACIÓN DEL TRASPLANTE ALOGÉNICO DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS

El estado de remisión previo al trasplante fue:

- en primera remisión (1RC): 35 pacientes (43,8%)
- en segunda remisión (2RC): 38 pacientes (47,5%)
- en tercera o posterior remisión (> 2RC): 7 pacientes (8,8%)

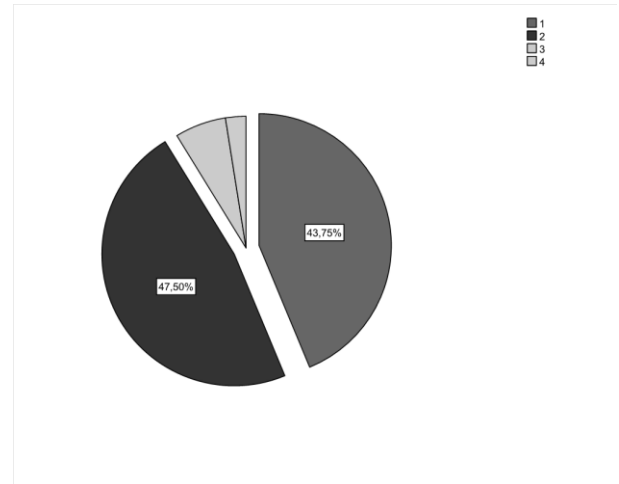


Gráfico R.5 Porcentaje de pacientes según estado de remisión pre alo-TPH

Las indicaciones para recibir un alo-trasplante fueron:

- Recaída medular precoz: 32 pacientes (40 %).
- Mala respuesta inicial: 22 pacientes (27,5%)
- Alto riesgo: 15 pacientes (18,75 %)
 - EMR persistentemente positiva: 5
 - MLL positivo: 5
 - LLA-*Philadelphia* positivo: 4
 - LLA de estirpe T: 1
- Tercera o posterior remisión: 7 pacientes (8,8%).
- Recaída medular y testicular: 4 pacientes (5%).

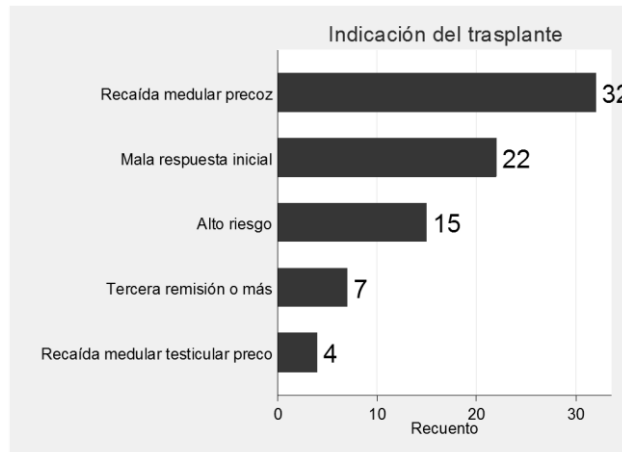


Gráfico R.6 Porcentaje de pacientes según su indicación para alo-TPH

El donante fue un hermano HLA-idéntico (HI) en 18 casos (22,5%) y en 62 casos un donante alternativo:

- Donante no emparentado: 56 (70%)
- Familiar no idéntico: 4 (5%)
- Familiar idéntico: 1
- Haploidéntico: 1

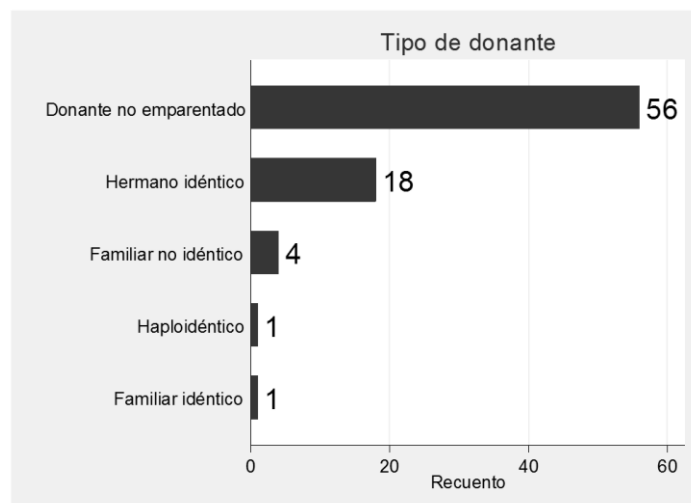


Gráfico R.7 Porcentaje de pacientes según su donante

La fuente de progenitores fue:

- Médula ósea: 32 casos (40 %)
- Cordón umbilical: 42 casos (52,5%)
- Sangre periférica: 6 casos (7,5%):
 - familiar no idéntico: 3
 - familiar idéntico: 1
 - DNE: 1
 - Haploidéntico: 1

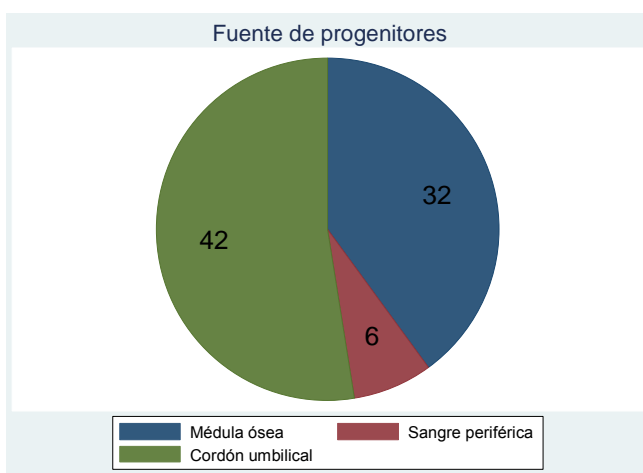


Gráfico R.8 Número de pacientes según la fuente recibida

En relación con el acondicionamiento, la mayoría de los pacientes, un total de 63 (78,75%) recibieron regímenes con irradiación corporal total de 12 Gy (6 fracciones de 2Gy, 2 sesiones por día, tres días consecutivos) asociada a:

- Etopósido (VP) (30mg/kg) y ciclofosfamida (Cy) (120 mg/kg): 61 casos (76,25%)
- VP (30mg/kg), Cy (120 mg/kg) y fludarabina (160 mg/kg): 1 caso
- Fludarabina (160 mg/kg): 1 caso

En 17 pacientes (21,25 %) no se utilizó radioterapia en el acondicionamiento, que consistió en:

- Busulfan (BU) (16mg/kg) + tiotepa (10mg/kg) + fludarabina (160 mg/kg): 14 (17,5%): en niños menores de 3 años y en acondicionamientos para trasplante de sangre de cordón umbilical (SCU).
- Busulfan (16mg/kg), Cy (120 mg/kg) y VP (30mg/kg): 2 lactantes (menores de 1 año).
- Busulfan (16mg/kg), melfalán (140 mg/m²) y fludarabina (160 mg/kg): en un paciente con miocardiopatía secundaria a quimioterapia previa.



Gráfico R.9 Porcentaje de pacientes que recibieron radioterapia como parte de su tratamiento de acondicionamiento

La profilaxis de la Enfermedad injerto contra huésped se administró según el tipo de trasplante y fuente utilizada. Los pacientes que recibieron un trasplante de donante no emparentado recibieron como parte del acondicionamiento 7,5 mg/kg de globulina antitimocito (ATG) dividida en 3 dosis, 1 dosis diaria. En el caso de que la fuente fuera médula ósea (MO) o sangre periférica (SP) recibieron pauta corta de metotrexate (15 mg/m²/ día +1, 10 mg/m² los días +3, +6 y +11).

En todos los casos se utilizó ciclosporina A (CyA) a dosis entre 2-4 mg/k/día, realizándose niveles plasmáticos trisemanales para obtener niveles entre 200-300 ng/ml. En SCU se administró además metilprednisolona (1 mg/kg/día) a partir del día +14 postrasplante.

5.4 RESULTADOS GLOBALES POSTRASPLANTE

5.4.1 Fallo de implante

Se presentó un caso de fallo de implante primario en el grupo completo de 80 pacientes (1,2%). Fue una paciente mujer de 11 años de edad, con LLA B-común sin anomalías citogenéticas. Se trasplantó en segunda remisión por recaída medular precoz. El donante fue no emparentado de sangre de cordón umbilical.

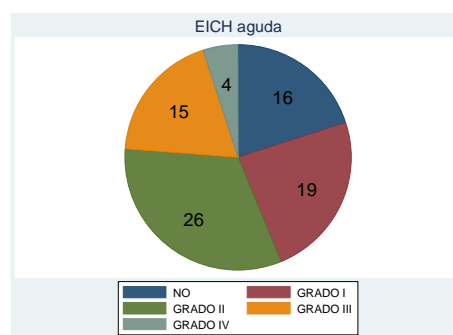
Se acondicionó con ICT, Cy y VP y recibió profilaxis de EICH con ciclosporina y corticoides, según protocolo de SCU. La paciente no presentó recuperación hematológica en ningún momento. Los estudios que se realizaron mostraron una médula ósea sin presencia de LLA y un quimerismo perteneciente al donante inicialmente en un 58%. Falleció en el día + 82 en el contexto de fallo multiorgánico secundario a enfermedad por adenovirus.

5.4.2 Enfermedad injerto contra huésped aguda

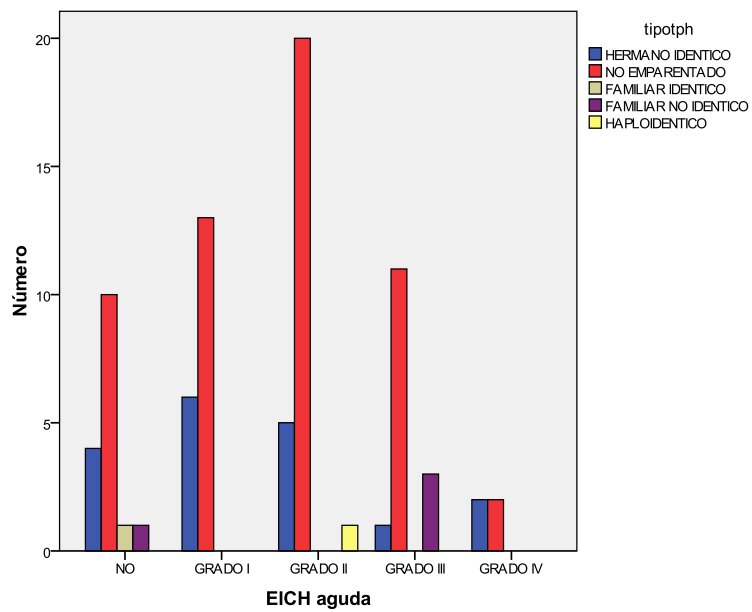
La EICH aguda (EICHa) se presentó en 64 pacientes (80%) en diferentes grados de intensidad; de los que la presentaron, la mayoría fue un grado I y II (56%) siendo menos frecuente grados III - IV (24%).

En el grupo de pacientes trasplantado de HI los grados de EICHa I-II se presentaron en el 61% de los casos y en DNE en el 58%; en el grupo de pacientes trasplantado de HI los grados de EICHa III-IV se presentaron en el 16% de los casos y en DNE en el 23%. En el grupo de pacientes trasplantado con MO los grados de EICHa I-II se presentaron en el 68% de los casos y en SCU en el 50%; en el grupo de pacientes trasplantado de MO los grados de EICHa III-IV se presentaron en el 15% y en SCU en el 28%.

	<i>Frecuencia</i>	<i>%</i>
NO	16	20
GRADO I	19	23,8
GRADO II	26	32,5
GRADO III	15	18,8
GRADO IV	4	5



EICH AGUDO	TIPO DE TPH SEGÚN DONANTE					TOTAL
	HI	DNE	FI	FnI	HAPLO	
NO	4	10	1	1	0	16
GRADO I	6	13	0	0	0	19
GRADO II	5	20	0	0	1	26
GRADO III	1	11	0	3	0	15
GRADO IV	2	2	0	0	0	4
TOTAL	18	56	1	1	1	80



EICH AGUDO	FUENTE DE PROGENITORES			TOTAL
	MO	SP	SCU	
NO	5	2	9	16
GRADO I	9	1	9	19
GRADO II	13	1	12	26
GRADO III	1	2	12	15
GRADO IV	4	0	0	4
TOTAL	32	6	42	80

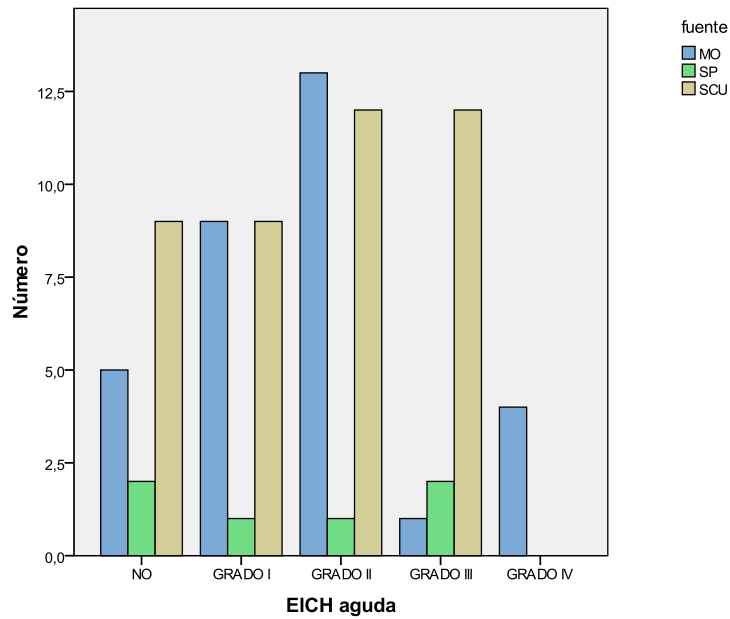


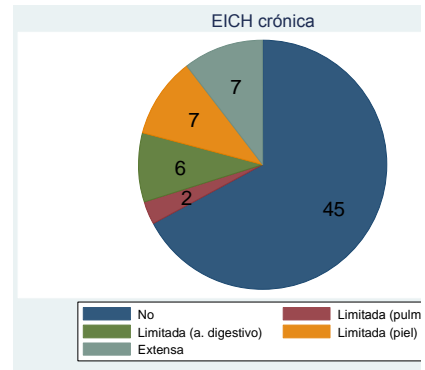
Tabla y gráficos R.10 Frecuencia de pacientes que presentaron EICH aguda y su grado de intensidad. HI: hermano HLA-idéntico; DNE: donante no emparentado; FI: familiar idéntico; Fnl: familiar no idéntico; HAPLO: haploidéntico; MO: médula ósea; SP: sangre periférica; SCU: sangre de cordón umbilical.

5.4.3 Enfermedad injerto contra huésped crónica

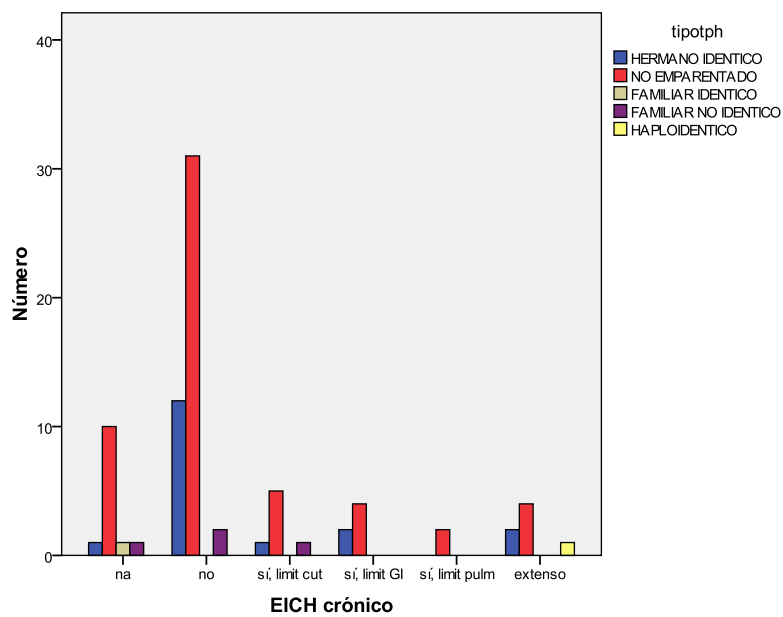
En relación con la EICH crónica (EICHc), no fue valorable en 13 pacientes, que fallecieron antes de los 100 días post-trasplante. De los 69 pacientes valorables: no presentaron EICH crónica el 65% de los casos y sí presentaron EICH crónica 22 pacientes: limitada en un 68% y extensa en un 31%.

En el grupo de HI así como en el de DNE la EICHc se presentó en el 26% de los pacientes valorables. En el grupo de pacientes trasplantado con MO la EICHc se presentó en el 35% de los pacientes valorables y en los trasplantados de SCU en el 28%.

	Frecuencia	%
NA	13	16,3
NO	45	56,3
SI, LIMITADO CUTANEO	7	8,8
SI, LIMITADO GASTROINTESTINAL	6	7,5
SI, LIMITADO PULMONAR	2	2,5
EXTENSO	7	8,8



EICH CRÓNICO	TIPO DE TPH SEGÚN DONANTE					TOTAL
	HI	DNE	FI	FnI	HAPLO	
NA	1	10	1	1	0	13
NO	12	31	0	2	0	45
Limitado cut	1	5	0	1	0	7
Limitado GI	2	4	0	0	0	6
Limitado pulmón	0	2	0	0	0	2
Extenso	2	4	0	0	1	7
TOTAL	18	56	1	1	1	80



EICH CRONICO	FUENTE DE PROGENITORES			TOTAL
	MO	SP	SCU	
NA	4	2	7	13
NO	18	2	25	45
Limitado cut	2	1	4	7
Limitado GI	3	0	3	6
Limitado pulmón	2	0	0	2
Extenso	3	1	3	7
TOTAL	32	6	42	80

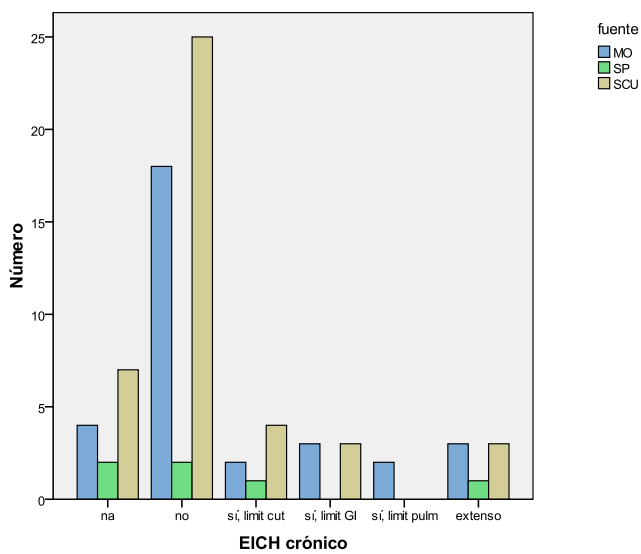


Tabla y gráfico R.11 Frecuencia de pacientes que presentaron EICH crónica y según su extensión. Cut: cutáneo, GI: gastrointestinal.

5.5 RESULTADOS DE SUPERVIVENCIA

En el grupo completo recayeron 18 pacientes que supone un 22,5% de los pacientes. La media de días desde el trasplante hasta la recaída fue de 270,7 (49-1087). La media de días de la recaída hasta el éxito fue de 56,6 (8-133).

	Frecuencia	%
REMISION	62	77,5
RECAIDA	18	22,5

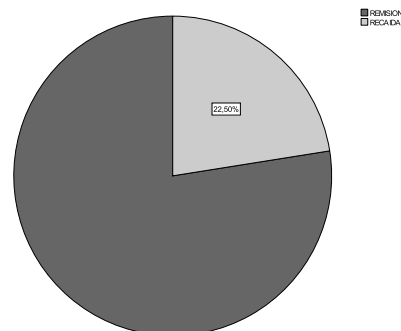


Tabla y gráfico R.12 Porcentaje de recaída en la población a estudio

En el grupo completo fallecieron 39 pacientes que supone un 48,8% de los pacientes. El 43,5 % de ellos fallecieron debido a recaída de la LLA.

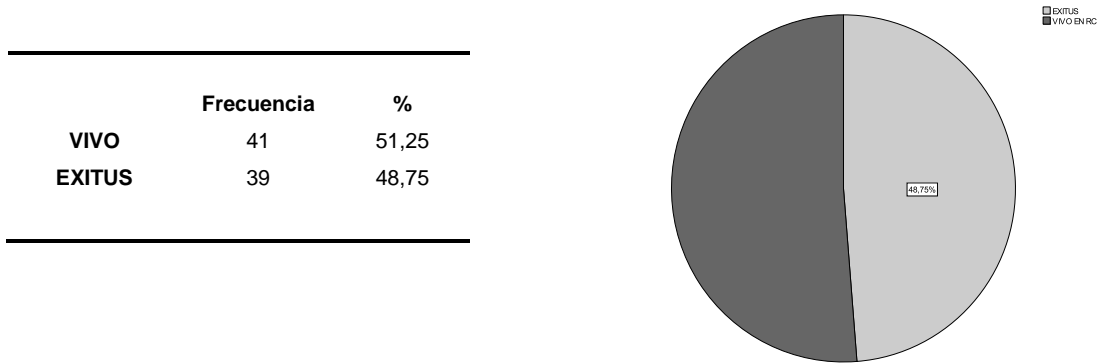


Tabla y gráfico R.13 Porcentaje de éxitos en la población a estudio

La proporción de pacientes que sobrevivieron libres de recaída (SLR) a los 3 años postrasplante fue del 72 % (IC95%: 58,7-81,6). La media de seguimiento fue de 2,7 años.

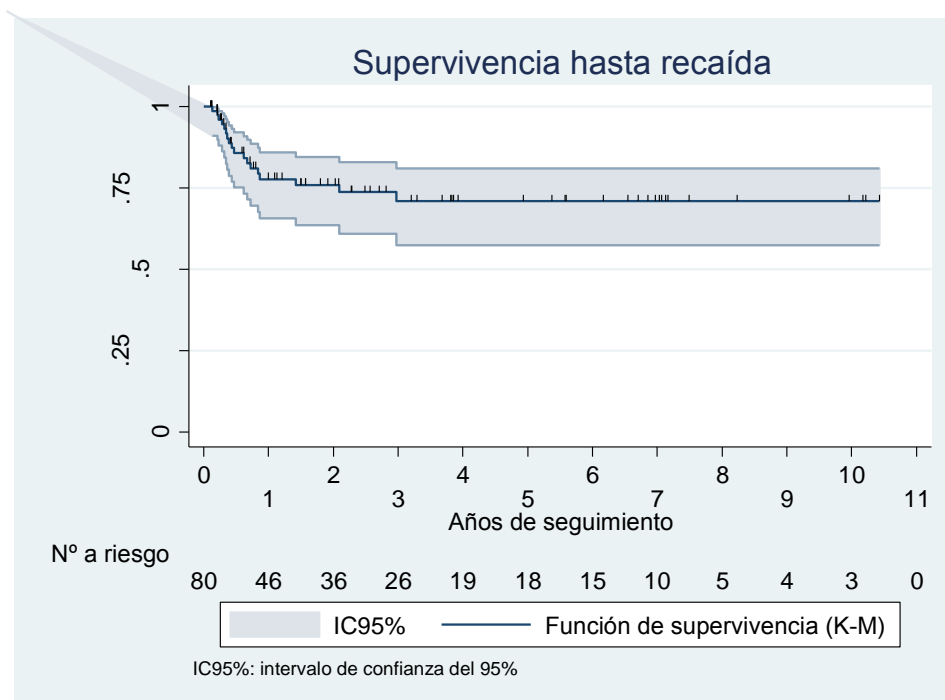


Gráfico R.14 Kaplan-Meier de supervivencia libre de recaída (SLR) en el grupo completo

La proporción de pacientes que sobrevivieron libres de eventos (**SLE**) fue de 46 % (SE 0,05).
 La mediana de supervivencia fue de 2 años.

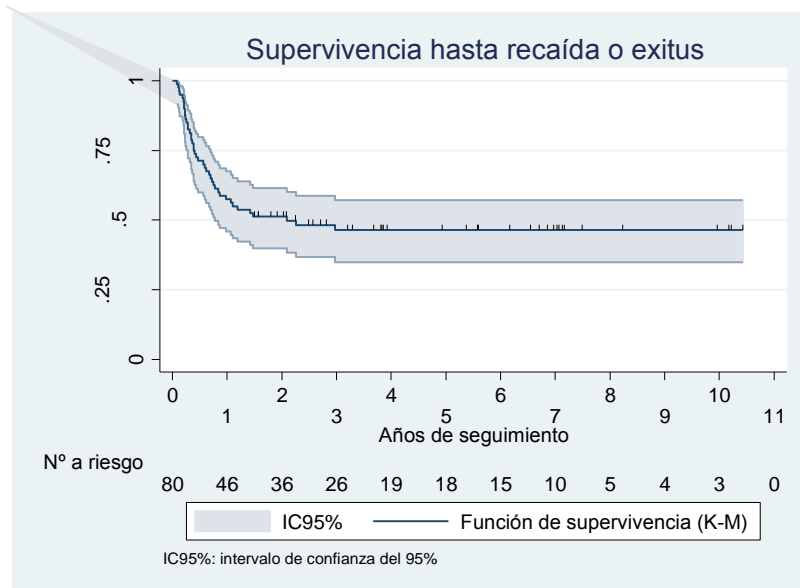


Gráfico R.15 Kaplan-Meier de supervivencia libre de eventos (SLE) en el grupo completo

La proporción de pacientes que sobrevivieron (**SG**) a los 3 años postrasplante fue del 51 % (IC95%: 38,4-60,6) y la media de seguimiento de 2,8 años.

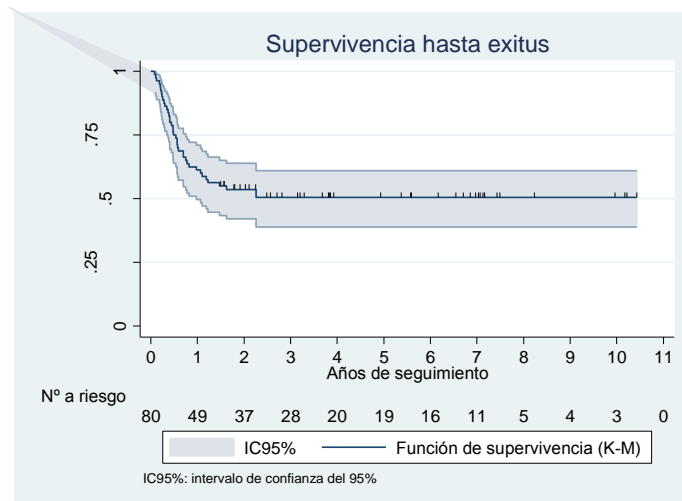


Gráfico R.16 Kaplan-Meier y media de supervivencia global (SG) en el grupo completo

Las características de los pacientes que recaeron y fallecieron se exponen en la Tabla R.17 así como un resumen descriptivo del grupo completo de pacientes.

	RECAIDOS	EXITUS	POBLACIÓN
N PACIENTES	18	39	80
FENOTIPO B/T	72% / 27%	82% / 17%	83% / 16%
RC1/RC2/>2RC	33% / 61% / 5%	38% / 51% / 10%	43% / 47%
H/DNE	33% / 67%	18% / 82%	22,5% / 77%
SCU/MO/SP	50% / 38% / 11%	51% / 33% / 15%	52% / 40% / 7%
ICT + VP + Cy	61%	74%	78%
EICH aguda NO vs I/II vs III/IV	44% / 44% / 11%	30% / 48% / 20%	20% / 56% / 23%
EICHc limitado / extenso	19% / 0%	15% / 15%	18% / 8%
EMR + / EMR -	55% / 44%	43% / 56%	31% / 68%

Tabla R.17 Resumen de los pacientes recaídos y fallecidos respecto al grupo completo

5.6 RESULTADOS DE SUBGRUPOS DE LLA

Dado que la LLA es una patología heterogénea, a continuación se describen los resultados por subgrupos bien definidos dentro de la LLA como son los pacientes con LLA *Philadelphia* positivo, los que presentan fusión MLL y las LLA de fenotipo T.

5.6.1 LLA *Philadelphia* positivo

En el subgrupo LLA *Philadelphia* positivo (LLA-Phi) se incluyeron 9 pacientes con una mediana de edad de 9 años y una media de 8,3 años (1-14 años). Todos ellos presentaron fenotipo de LLA-B común. El 77,8% de los casos se trasplantó en RC1 (n=7) por mala respuesta inicial en 4 casos y por considerarse alto riesgo en 3 casos. Dos casos se trasplantaron en RC2 tras recaída medular precoz.

Todos los pacientes recibieron un trasplante de DNE: de MO en 4 casos y SCU en 5 casos.

Dos pacientes entraron a trasplante con EMR positiva siendo el estudio de BCR/ABL también positivo. Todos los estudios postrasplante tanto de CFM como por biología molecular fueron negativos.

Uno de los 9 pacientes recayó, a los 305 días postrasplante. Este paciente recibió tratamiento con fármacos inhibidores de la tirosin quinasa y se encuentra vivo en RC a fin de estudio.

La SLR a los 3 años fue del 87% y en el grupo no LLA Phi + del 68% (log Rank 1,1; p 0,27), sin diferencias significativas.

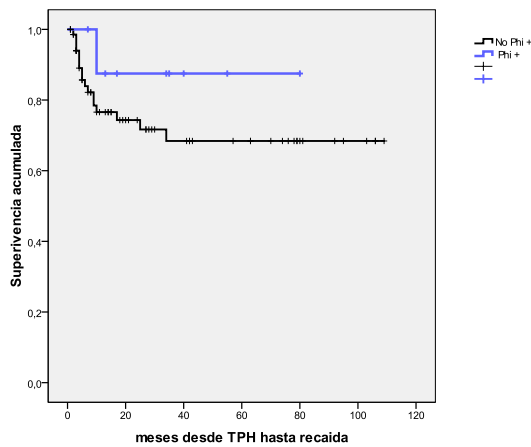


Gráfico R.18 Kaplan-Meier de SLR de pacientes LLA-Phi (azul) comparado con en el grupo completo

Dos pacientes fallecieron: uno por neumonitis por CMV y otro por insuficiencia hepática. La SG a los 3 años fue del 77% y en el grupo LLA no Phi + del 46% (log Rank 2,6; p 0,1), sin diferencias significativas.

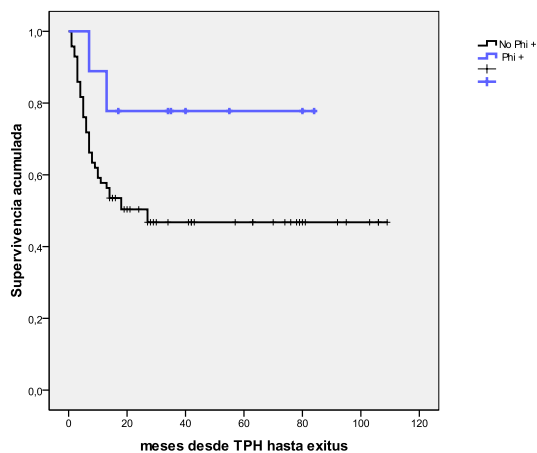


Gráfico R.19 Kaplan-Meier de SG de pacientes LLA-Phi (azul) comparado con en el grupo completo

5.6.2 LLA-MLL

En el subgrupo de MLL se incluyeron 7 pacientes con una mediana de edad de 1 año (6 meses-14 años): cuatro de los 7 pacientes eran menores de un año al diagnóstico (57%).

El 71,4% de los casos se trasplantó en RC1 (n=5) por considerarse alto riesgo. Un caso se trasplantó en tercera y otro en cuarta remisión.

El donante fue HI en 2 casos (MO y SCU), un familiar idéntico en 1 caso (SP) y DNE en 4 (SCU).

Un paciente entró a trasplante con EMR positiva, recayendo 77 días postrasplante y falleciendo por este motivo.

Dos de los 7 pacientes recayeron, a los 77 y 259 días postrasplante, falleciendo ambos: el primero por progresión y el segundo por sepsis.

Cuatro de los 7 pacientes fallecieron: 1 por progresión y 3 por MRT (fallo multiorgánico, sepsis y neumopatía).

No se encontraron diferencias de supervivencia entre los dos grupos.

La SLR en el grupo MLL a los 3 años fue del 60% y en el grupo no MLL del 71% (log Rank 0,6; p 0,7). La SG en el grupo MLL fue del 42% y en el grupo no MLL del 51% (log Rank 0,9; p 0,6).

5.6.3 LLA de fenotipo T

En el subgrupo LLA de fenotipo T se incluyeron 13 pacientes con una mediana de edad de 9 años y una media de 7,9 años (2-14 años). El 69% de los pacientes se trasplantó en RC1 (n=9) por mala respuesta inicial en 7 casos y por considerarse alto riesgo en 2 pacientes; tres pacientes se trasplantaron en RC2 por recaída medular precoz.

Un paciente se trasplantó en tercera remisión. El donante fue HI en 2 casos (MO y SCU), un familiar idéntico en 1 caso (SP) y DNE en 10: 5 de MO y 5 con SCU.

Ocho pacientes entraron a trasplante con EMR positiva (61%), recayendo 3 de ellos. Uno de los que recayó se encontraba en tratamiento a fin de estudio y los otros dos fallecieron por progresión; de los 5 pacientes restantes 3 están vivos y en RC y los otros 2 fallecieron por motivos infecciosos.

Cinco de los 13 pacientes recayeron, falleciendo 4 de ellos por progresión. Uno de ellos se encuentra en tratamiento a fin de estudio. Siete de los 13 pacientes fallecieron: 4 por progresión y 3 por infecciones (1 infección fúngica invasiva, 1 enfermedad por adenovirus y 1 neumonitis por CMV).

No se encontraron diferencias de supervivencia entre los dos grupos. La SLR en el grupo de LLA con fenotipo T a los 3 años fue del 50% y en el grupo fenotipo B del 74% (log Rank 2,7; p 0,25). La SG en el grupo de LLA con fenotipo T a los 3 años fue del 46% y en el grupo fenotipo B del 51% (log Rank 0,3; p 0,58).

5.7 ESTUDIO DE EMR PREVIA A TPH ALOGENICO

Todos los pacientes al diagnóstico tuvieron por lo menos un “inmunofenotipo asociado a leucemia” útil para el seguimiento. Las muestras de médula ósea para estudio fueron recogidas 20 días de media antes de iniciar el procedimiento de trasplante.

Los pacientes no recibieron tratamiento quimioterápico entre la extracción de la muestra de médula ósea y el inicio del procedimiento de trasplante.

En los estudios de microscopia todos los pacientes se encontraban en remisión morfológica.

Se obtuvieron valores de EMR comprendidos entre 0,003 y 3,3%: nueve pacientes tuvieron niveles de EMR entre 0,01 y 0,1%, 9 pacientes entre 0,1 y menos de 1%, 7 pacientes tuvieron más de 1% y en un paciente se detectó una EMR del 0,0003% y se incluyó en el grupo de EMR negativa.

De acuerdo con el resultado de citometría de flujo: grupo con EMR positiva: 25 (31,25%) y grupo con EMR negativa: 55 (68,75%).

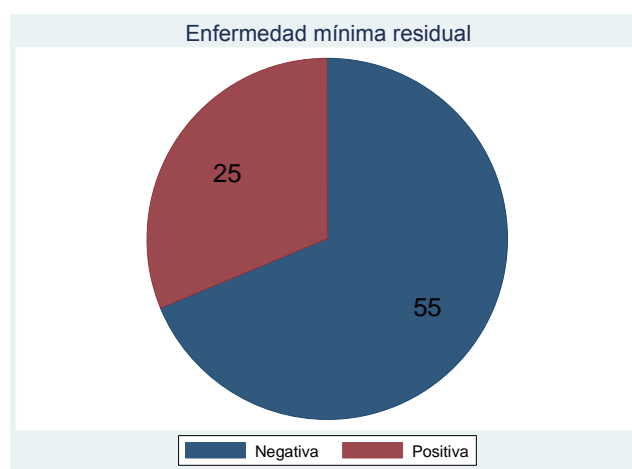


Gráfico R.20 Frecuencia de pacientes según la presencia de EMR pre-TPH

En los pacientes con marcadores moleculares conocidos (MLL y BCR/ABL) no hubo discrepancia entre los resultados de EMR pre-TPH obtenido mediante CFM y detección de genes de fusión mediante PCR.

5.7.1 Grupo EMR positiva

Se incluyeron **25 pacientes** en el grupo de EMR positiva pre-TPH: fenotipo B n=17 (68%) y fenotipo T n=8 (32%). En este grupo 2 pacientes presentaban translocación BCR/ABL y 1 paciente MLL.

La indicación de trasplante fue: recaída medular precoz (40%), mala respuesta inicial (32%), alto riesgo (12%) y tercera o mayor remisión (12%). Se trasplantaron en 1RC el 44%, en 2RC 44% y en 3 o mayor un 12%.

El 72% de los pacientes recibió un TPH de DNE y el 24% de hermano HLA-idéntico. En 1 caso fue de familiar no idéntico. Se utilizó como fuente: SCU en el 52% de los casos, médula ósea en el 44% y un 4% de sangre periférica. El acondicionamiento consistió en el 72% de los casos VP, Cy e irradiación corporal total.

Los resultados del procedimiento fueron:

- EICH aguda: 2 pacientes presentaron EICH aguda grado I (8%), 10 pacientes grado II (40%), 4 pacientes grado III (16%) y 1 paciente grado IV (4%).
- EICH crónica 4 pacientes limitada (16%) y 4 pacientes extensa (16 %).

Diez de los 25 pacientes de este grupo recayeron (40%), lo que supone el 55% de las recaídas (10 de 18 recaídas en el grupo global). La mediana de tiempo desde el TPH a la recaída fue de 139 días, alrededor de 4 meses. Se produjeron los días: + 48, + 77, + 114, +127, + 128, + 150, 156, + 169, +250 y +1095.

La proporción de pacientes que sobrevivieron libres de recaída (**SLR**) a los 3 años postrasplante fue del 50% (IC95%: 26,2-70,7) siendo la media de seguimiento de 1,6 años (19 meses).

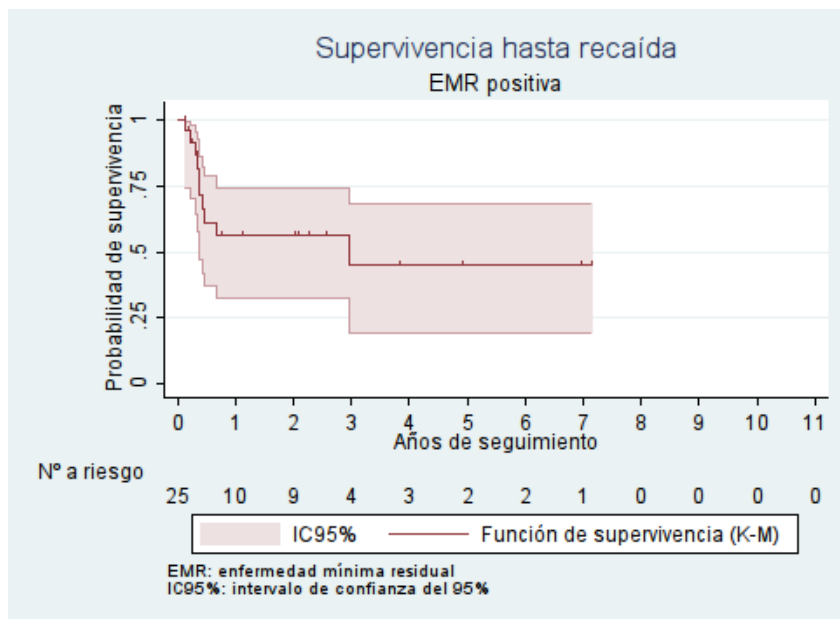


Gráfico R.21 Media, mediana y Kaplan-Meier de SLR en el grupo EMR-positiva

La proporción de pacientes que sobrevivieron libres de eventos (**SLE**) fue del 24% a los 3 años (SE 0,09).

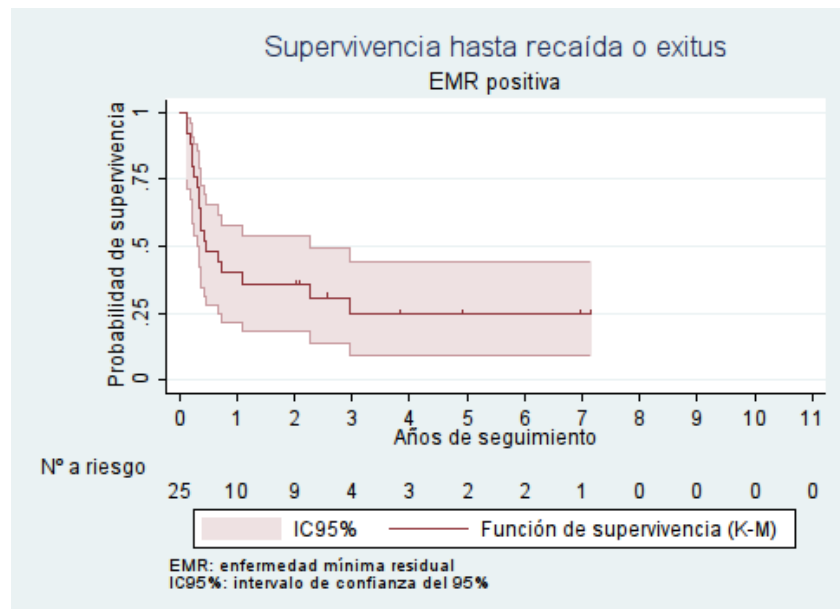


Gráfico R.22 Media, mediana y Kaplan-Meier de SLE en el grupo EMR-positiva

Todos los pacientes que recayeron, fallecieron por progresión menos uno que se encuentra al fin de este estudio recibiendo un nuevo tratamiento de inducción.

- ✓ Paciente nº 29: día + 48: éxitus en 4 meses por progresión
- ✓ Paciente nº 12: día + 77: éxitus en 4 meses por progresión
- ✓ Paciente nº 31: día + 114: éxitus en 1 mes por progresión
- ✓ Paciente nº 8: día + 127: éxitus en 2 meses por progresión
- ✓ Paciente nº 71: día + 128: éxitus en 1 mes por progresión
- ✓ Paciente nº 66: día + 150: éxitus en 1 mes por progresión
- ✓ Paciente nº 46: día + 156: éxitus en 2 meses por progresión
- ✓ Paciente nº 45: día + 169: éxitus en 1 mes por progresión
- ✓ Paciente nº 16: día + 250: éxitus en 1 semana por progresión
- ✓ Paciente nº 58: día + 1095: vivo en tratamiento

La mediana de tiempo de la recaída al éxitus fue de un mes; durante este periodo recibieron cuidados paliativos. Diez y siete de los 25 pacientes de este grupo fallecieron (68%). La media de tiempo desde el trasplante hasta el éxitus fue de 19 meses (1-81).

Los motivos de éxitus fueron:

- Progresión (9): 52%
- Infecciones (5): 29%
 - Neumonitis CMV (2)
 - Adenovirus (1)
 - Infección fúngica invasiva (2)
- Enfermedad injerto contra huésped (2)
- Toxicidad hepática (1)

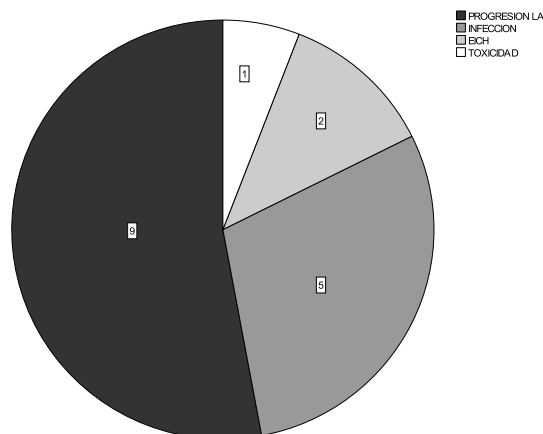


Gráfico R.23 Causas de éxitus en el grupo EMR-positivo

La proporción de pacientes que sobrevivieron (**SG**) a los 3 años postrasplante fue del 30% (IC95%:14,4-49,6) y la media de seguimiento de 1,7 años (19 meses).

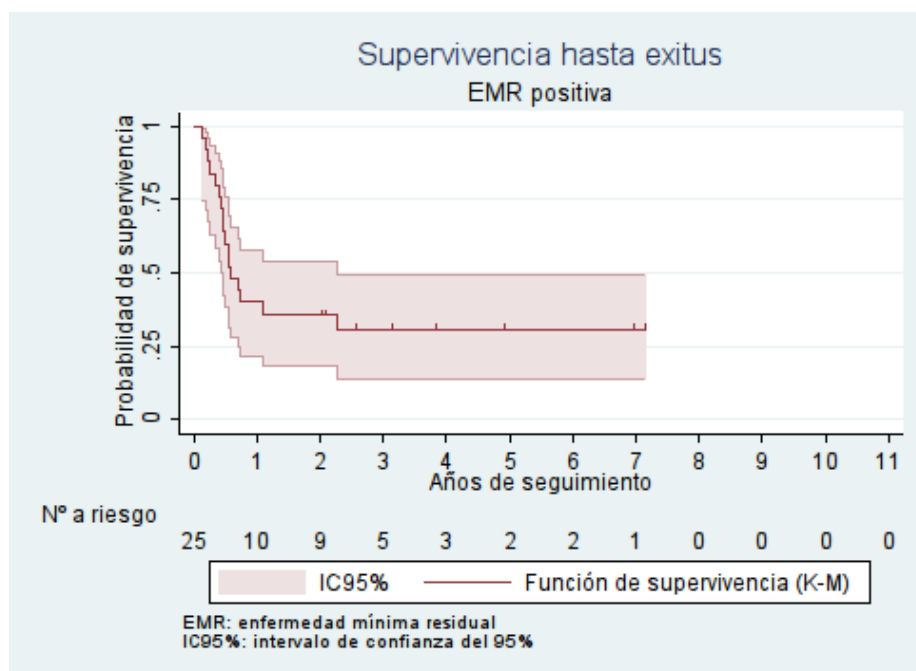


Gráfico R. 24 Media y mediana de SG en el grupo EMR-positiva

A fin de estudio, 8 de los 25 pacientes permanecen vivos:

- ✓ Un paciente (nº 58) presentó a los 3 meses postrasplante una EMR 0,9% y posteriormente controles negativos. Recayó 34 meses postrasplante y se encontraba vivo recibiendo tratamiento al fin de estudio.

Se encontraban en remisión morfológica:

- ✓ Paciente nº 17: 81 meses postrasplante con EMR persistentemente positiva (0.03%) y EICH extensa. EMR negativa desde 2011
- ✓ Paciente nº 21: 79 meses postrasplante con EMR negativa sin EICHc
- ✓ Paciente nº 44: 55 meses postrasplante con EMR negativa sin EICHc
- ✓ Paciente nº 51: 42 meses postrasplante con EMR negativa con EICHc intestinal limitado
- ✓ Paciente nº 62: 28 meses postrasplante con EMR negativa con EICHc cutáneo limitado
- ✓ Paciente nº 67: 21 meses postrasplante con EMR negativa con EICHc extenso
- ✓ Paciente nº 68: 20 meses postrasplante con EMR negativa con EICHc pulmonar limitado

5.7.2 Grupo EMR negativa

Se incluyeron 55 pacientes en el grupo de EMR negativa pre-TPH: fenotipo B [n=50 (91%)] y fenotipo T [n=5 (9%)]. En este grupo 7 pacientes presentaban translocación BCR/ABL y 6 pacientes MLL. La indicación de trasplante fue: recaída medular precoz (40%), mala respuesta inicial (25,5%), alto riesgo (21,8%) y tercera o posterior remisión (7,3%). Se trasplantaron en 1RC el 43,6%, en 2RC 49% y en 3 o posterior un 7,2%. El 69% de los pacientes recibió un TPH de DNE y el 21,8% de hermano HLA-idéntico. En 3 casos fue de familiar no idéntico, 1 caso de familiar idéntico y 1 haploidéntico. Se utilizó como fuente SCU en el 52,7% de los casos, médula ósea en el 38,2% y sangre periférica en un 9% de los casos. El acondicionamiento fue en el 78% de los casos VP, Cy e irradiación corporal total. En total se utilizó radioterapia en el 81,8 % de los trasplantes. Los resultados del procedimiento fueron:

- Se presentó fallo de implante en un paciente con LLA-B común en RC2 por recaída medular precoz que recibió un acondicionamiento mieloablativo con ICT y un alo-TPH de DNE de SCU.
- EICH aguda: 17 pacientes presentaron EICH aguda grado I (30,9%), 16 pacientes grado II (29%), 11 pacientes grado III (20%) y 3 paciente grado IV (5,5%).
- EICH crónica 11 pacientes limitada (20%) y 3 pacientes extensa (5,5%).

En este grupo recayeron 8 pacientes (14,5%) los días + 87, +90, + 219, + 259, + 305, +310, +510 y +760. La media de tiempo desde el TPH a la recaída fue de 317 días y la mediana 282 (87-760). La proporción de pacientes que sobrevivieron libres de recaída (**SLR**) a los 3 años postrasplante fue del 80% ((IC95%:65,8-90,4) siendo la media de seguimiento de 3,2 años.

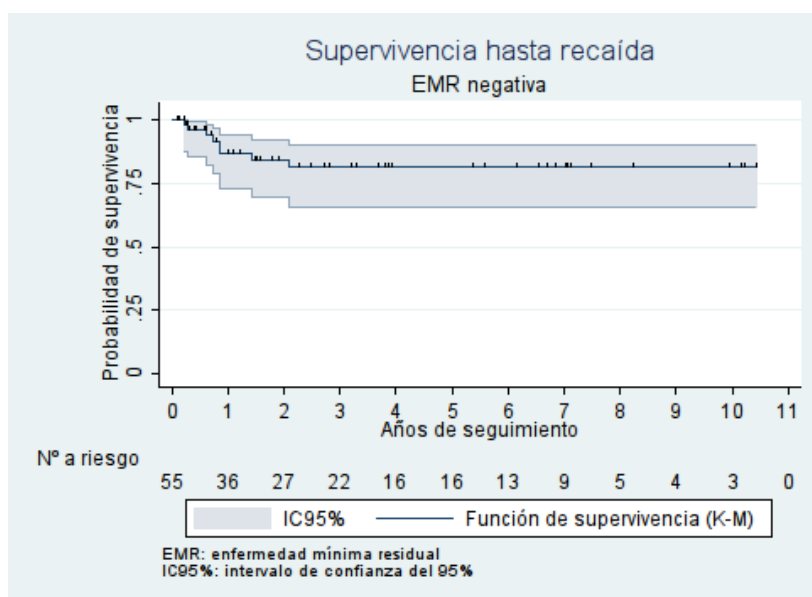


Gráfico R.25 Media y Kaplan-Meier de SLR en el grupo EMR-negativa

Los 8 pacientes que recayeron, evolucionaron de la siguiente manera:

- 4 éxitos por progresión
 - Paciente nº80: día + 87: éxitus en 1 mes
 - Paciente nº41: día + 90: éxitus en 1 mes
 - Paciente nº76: día + 310: éxitus en 4 meses
 - Paciente nº30: día + 510: éxitus en 1 mes
- 2 recibieron nueva quimioterapia y fueron éxitus por infección:
 - Paciente nº48: día + 259: en tratamiento de recaída presentó sepsis, falleciendo 6 meses después.
 - Paciente nº25: día + 760: en tratamiento de recaída presentó una infección fúngica invasiva, falleciendo 2 meses después.
- 2 pacientes se encuentran en remisión
 - Paciente nº72: día + 219: entró en RC y se ha realizado un segundo TPH. Se encuentra vivo 16 meses postrasplante.
 - Paciente nº14: día +305: este paciente tenía una LLA de precursores B Phi + y fue tratado con corticoides e imatinib, encontrándose vivo y en remisión 84 meses tras la recaída.

La proporción de pacientes que sobrevivieron libres de eventos (**SLE**) fue del 55% a los 3 años (SE 0,06).

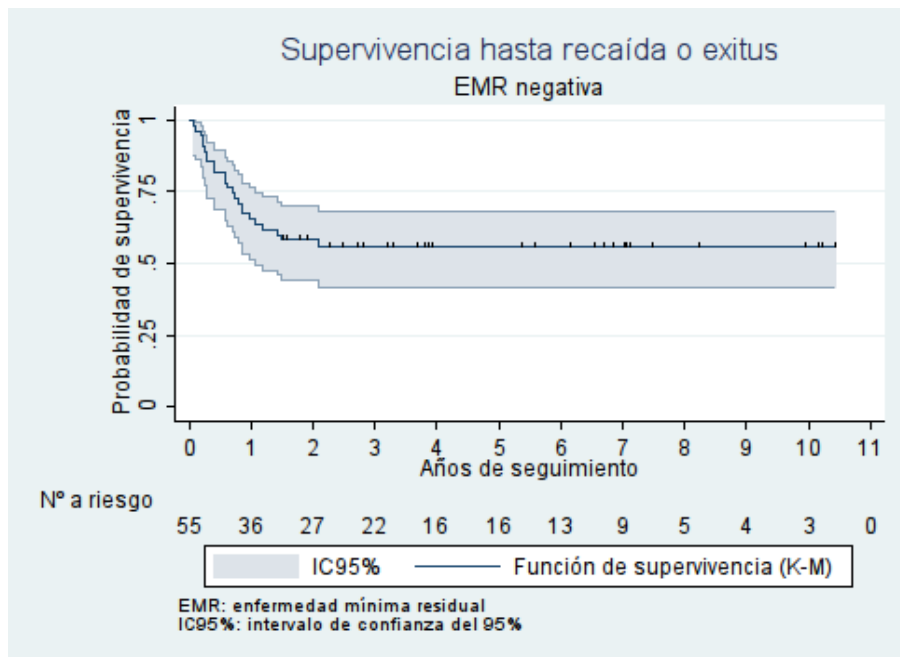


Gráfico R.26 Media y Kaplan-Meier de SLE en el grupo EMR-negativa

Fallecieron 22 pacientes de 55 (40%). La media de tiempo desde el trasplante hasta el éxitus fue de 38 meses (1-109).

Los motivos de éxitus fueron:

- Infecciones (12): 54%
 - Virus (8): adenovirus (4), VRS (1), CMV (2) y VEB (1)
 - Infección fúngica invasiva (3)
 - Sepsis (1)
- Progresión (4): 18%
- EICH (3): 13%
- Toxicidad (3): Purpura trombótica (2) y fallo multiorgánico (1)

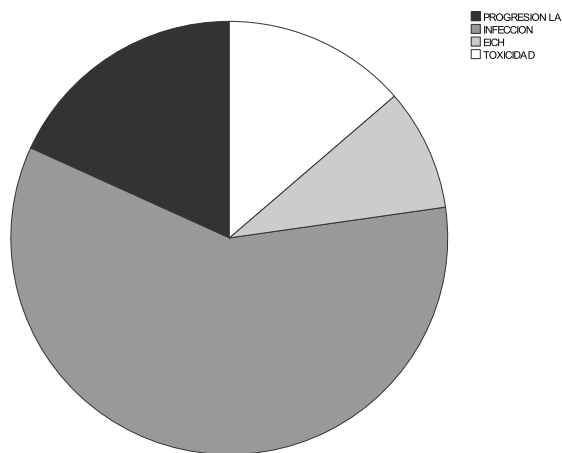


Gráfico R.27 Causas de éxitus en el grupo EMR-negativa

La proporción de pacientes que sobrevivieron (**SG**) a los 3 años postrasplante fue del 59% (IC95%: 44,2-70,6) y la media de seguimiento de 3,3 años. Se mantiene vivos en remisión completa al final del estudio 33 pacientes (60%).

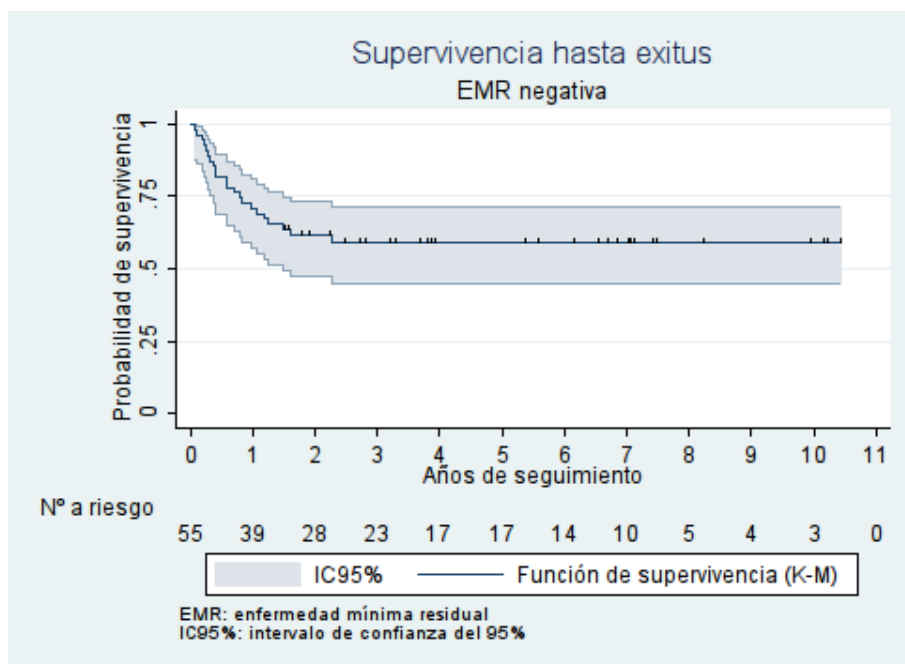
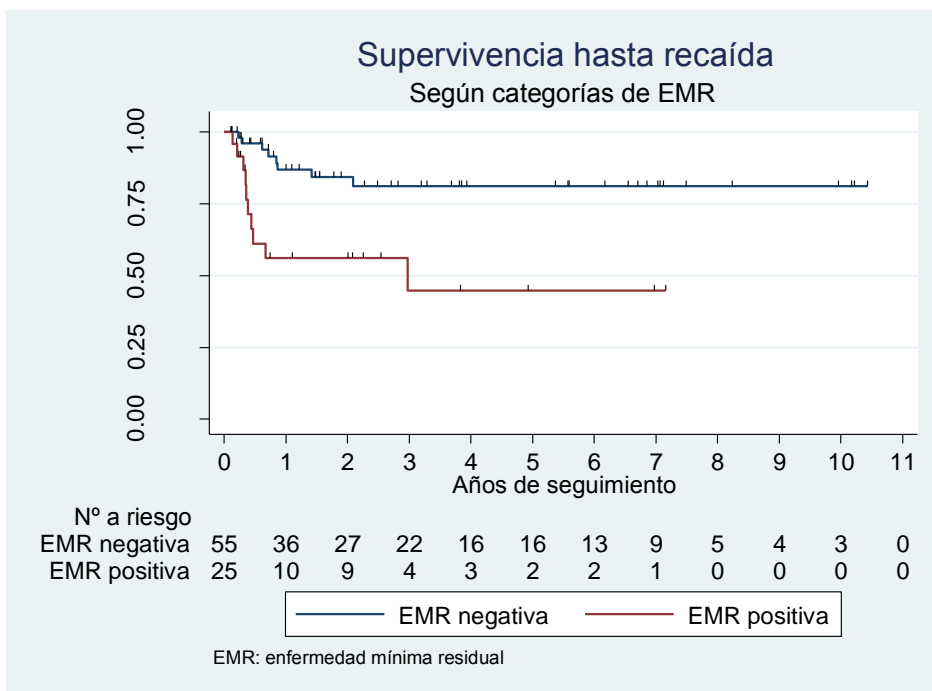


Gráfico R.28 Media de supervivencia y Kaplan-Meier de SG) en el grupo EMR-negativa

5.7.3 Resultados comparativos según estado EMR

La supervivencia libre de recaída (SLR) a los 3 años en el grupo de EMR negativa fue del 80% comparada con el 50 % del grupo de EMR positiva (Log Rank 9,5; p 0,002).

EMR	Media				Mediana			
	Estimado	Error St.	95% Intervalo Confianza		Estimado	Error St.	95% Intervalo Confianza	
			Limite inf.	Limite sup.			Limite inf.	Limite sup.
NEGATIVA	90,6	5,943	78,952	102,248				
POSITIVA	42,231	8,797	24,989	59,473	34	29,934	0	92,67
Total	,80,484	5,803	69,111	91,857				



Tablas y gráfico R. 29 Media y mediana y Kaplan-Meier de SLR comparado según EMR pre-TPH

La supervivencia (SG) a los 3 años en el grupo de EMR negativa fue del 59% comparada con el 30 % del grupo de EMR positiva (Log Rank 6,5; p 0,01).

EMR	Media				Mediana			
	Estimado	Error St.	95% Intervalo Confianza		Estimado	Error St.	95% Intervalo Confianza	
			Limite inf.	Limite sup.			Limite inf.	Limite sup.
NEGATIVA	67,916	6,782	54,623	81,209
POSITIVA	30,063	6,989	16,364	43,762	7,000	1,249	4,552	9,448
Total	58,888	5,743	47,632	70,144

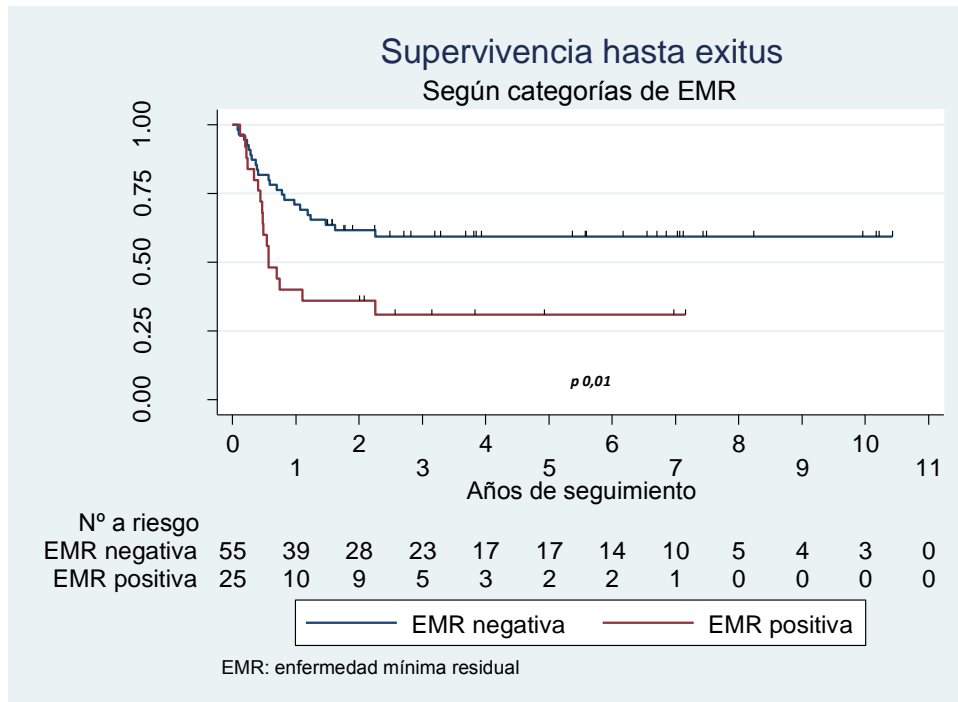


Tabla y gráfico R. 30 Media y mediana y Kaplan-Meier de SG comparado según EMR pre-TPH

En este estudio con 80 pacientes, estos son los resultados:

- En el grupo de EMR positiva las recaídas fueron más frecuentes y más precoces: la media de tiempo de TPH a recaída fue de 19 meses vs 38 meses en el grupo con EMR negativa.
- La SLR fue del 50% en el grupo EMR positiva y del 80% en el EMR negativa.
- En el grupo de EMR positiva, los pacientes que recayeron fallecieron en su mayoría (9/10); en cambio, en el grupo con EMR negativa, sólo fallecieron la mitad (4/8).
- Los motivos de éxitus también fueron diferentes, siendo la progresión de la enfermedad la causa más frecuente en el grupo EMR positiva 9/17 (52%) respecto a EMR negativa 4/22 (18%). En el grupo de EMR positiva pre-TPH la media de tiempo de TPH al éxitus fue de 19 meses vs 37 meses en el grupo EMR negativa.
- La SG fue del 30% en el grupo EMR positiva y del 59% en el EMR negativa.

En la tabla R.31 se detalla el estudio descriptivo de los grupos según su estado de EMR previo al trasplante.

	EMR POSITIVA N= 25	EMR NEGATIVA N= 55	POBLACION N= 80
FENOTIPO B/T	68% / 32%	91% / 9%	83% / 16%
RC1/RC2/>2RC	44% / 44% / 12%	43% / 49% / 7,2%	43% / 47%
HI/DNE	24% / 72%	21% / 69%	22,5% / 77%
SCU/MO/SP	52% / 44% / 4%	52% / 38% / 9%	52% / 40% / 7%
ICT + VP + Cy	72%	78%	78%
EICH aguda NO vs I/II vs III/IV	32% / 48% / 20%	14% / 61% / 25%	20% / 56% / 23%
EICHc limitado / extenso	16% / 16%	20% / 5%	18% / 8%
RECAIDA	10/25 (40%)	8/55 (14,5%)	18/80 (22,5%)
SLR (3 años)	50%	80%	72%
SLE (3 años)	24%	55%	46%
EXITUS Mediana de tiempo de TPH a éxitus (meses)	17/25 (68%) 19	22/55 (40%) 38	39/80 (48,8%) 34,6
SG (3 años)	30%	59%	51%

Tabla R.31 Resumen comparativo de los grupos según EMR y grupo completo

5.8. ANÁLISIS BIVARIADO DE ASOCIACIÓN DE VARIABLES CON RECAÍDA Y MORTALIDAD

5.8.1 Factores de riesgo relacionados con recaída

Se encontró relación entre la presencia de EMR pretrasplante y riesgo de recaída. (Risk ratio 5.4 (IC 95% 1,9 a 15,7), p 0,0003). La prueba de log rank de diferencia entre las funciones de supervivencia fue estadísticamente significativa (Long-rank test 6,6; p 0,01).

Se presentó mayor tasa de recaída en pacientes con EMR positiva pretrasplante respecto a los pacientes con EMR negativa, siendo este dato estadísticamente significativo.

Los pacientes con EMR positiva pre-trasplante presentaron 5,5 veces mayor riesgo de recaer que los que presentaron EMR negativa.

EMR	REMISION	RECAIDA	TOTAL
NEGATIVA	47	8	55
POSITIVA	15	10	25
TOTAL	62	18	80

EMR	EVENTO OBSERVADO	EVENTO ESPERADO
NEGATIVA	22	28,98
POSITIVA	17	10,02
TOTAL	39	39

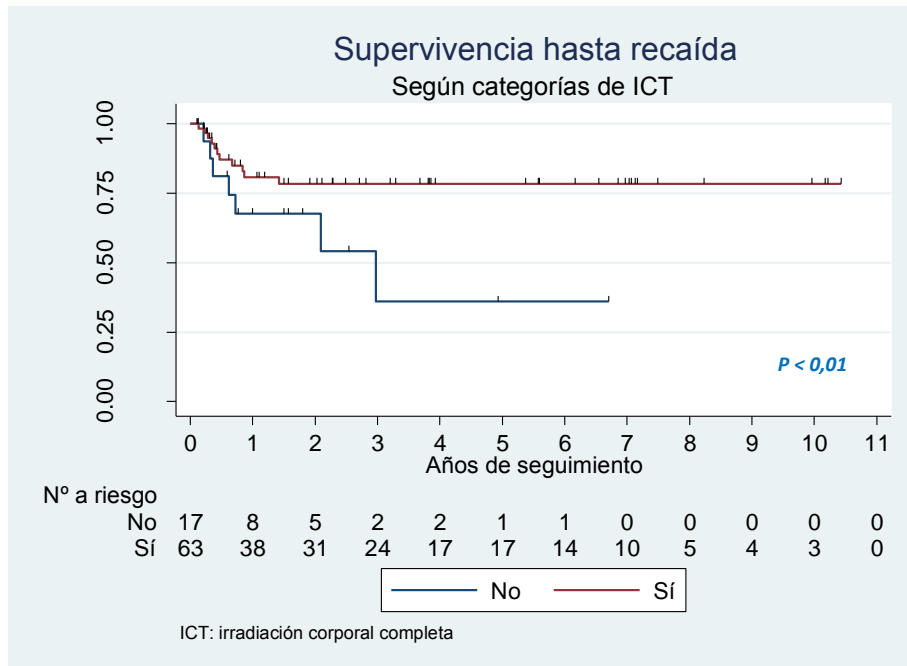
Tablas R. 32 Análisis bivariado del estado de EMR pre-TPH y recaída

Se encontró relación estadística entre el uso de radioterapia durante el acondicionamiento y el riesgo de recaída (Risk ratio 0,23 (IC 95% 0,08 a 0,72), p 0,003). La prueba de log rank de diferencia entre las funciones de supervivencia fue estadísticamente significativa (Long-rank 3,96; p 0,04).

Los pacientes que recibieron ICT como parte del acondicionamiento presentaron un 76% menos de riesgo de recaída que los no irradiados.

ICT	REMISION	RECAIDA	TOTAL
NO	10	7	17
SI	52	11	63
TOTAL	62	18	80

ICT	EVENTO OBSERVADO	EVENTO ESPERADO
NO	7	3,6
SI	11	14,38
TOTAL	18	18



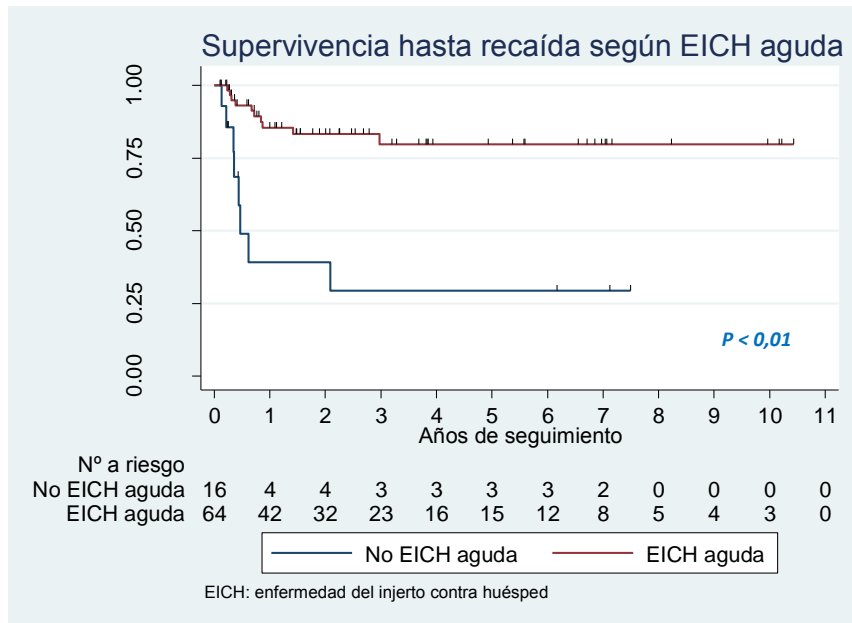
Tablas y gráfico R. 33 Análisis bivariado y K-M de SLR según el del uso de radioterapia

Se encontró relación estadística entre la presencia de EICH aguda y el riesgo de recaída. (Risk ratio 0,17 (IC 95% 0,06 a 0,50), p 0,0004). La prueba de log rank de diferencia entre las funciones de supervivencia fue estadísticamente significativa (Long-rank 17,7; p 0,00).

Los pacientes que presentaron EICH aguda presentaron un 82% menos de riesgo de recaída que los que no la presentaron.

EICH AGUDA	REMISION	RECAIDA	TOTAL
NO	8	8	16
SI	54	10	64
TOTAL	62	18	80

EICH AGUDA	EVENTO OBSERVADO	EVENTO ESPERADO
NO	8	2,19
SI	10	15,81
TOTAL	18	18



Tablas y gráfico R. 34 Análisis bivariado y K-M de SLR según la presencia de EICH aguda

Si dividimos los pacientes según el grado EICH aguda observamos los siguientes resultados:

- Los del grupo I-II presentaron un 82% menor riesgo de recaída que los que no presentaron EICH aguda (p 0,001).
- Los del grupo III-IV presentaron un 88% menor riesgo de recaída que los que no la presentaron (p 0,008).

La **SLR** a los 3 años postrasplante en los que no presentaron EICHa fue del 36%, en los de grado I-II del 79% y III-IV del 81%.

No se encontraron diferencias estadísticas entre la recaída y otros factores estudiados: sexo, fenotipo de la LLA, indicación del trasplante, estado de remisión pre-TPH ni tipo de donante así como la presencia de EICH crónica.

5.8.2. Factores de riesgo relacionados con mortalidad

Se encontraron relaciones estadísticamente significativas con las siguientes variables:

EMR pre-trasplante: **los pacientes que presentaron EMR positiva pre-trasplante presentaron 3,4 veces mayor riesgo de fallecer que los que presentaron EMR negativa.** (Risk ratio 3,37 (IC 95% 1,6 a 6,6), p 0,0002).

La prueba de log rank de diferencia entre las funciones de supervivencia es estadísticamente significativa (Long-rank 6,6; p 0,01).

EMR	VIVO	EXITUS	TOTAL
NEGATIVA	33	22	55
POSITIVA	8	17	25
TOTAL	41	39	80

EMR	EVENTO OBSERVADO	EVENTO ESPERADO
NEGATIVA	22	28,98
POSITIVA	17	10,02
TOTAL	39	39

Tablas R. 35 Análisis bivariado del estado de EMR pre-TPH y supervivencia

La edad del paciente al trasplante: cada año más de edad al trasplante aumenta un 16% el riesgo de muerte (HR 1,15 CI 95% 1-1,24 ; p 0).

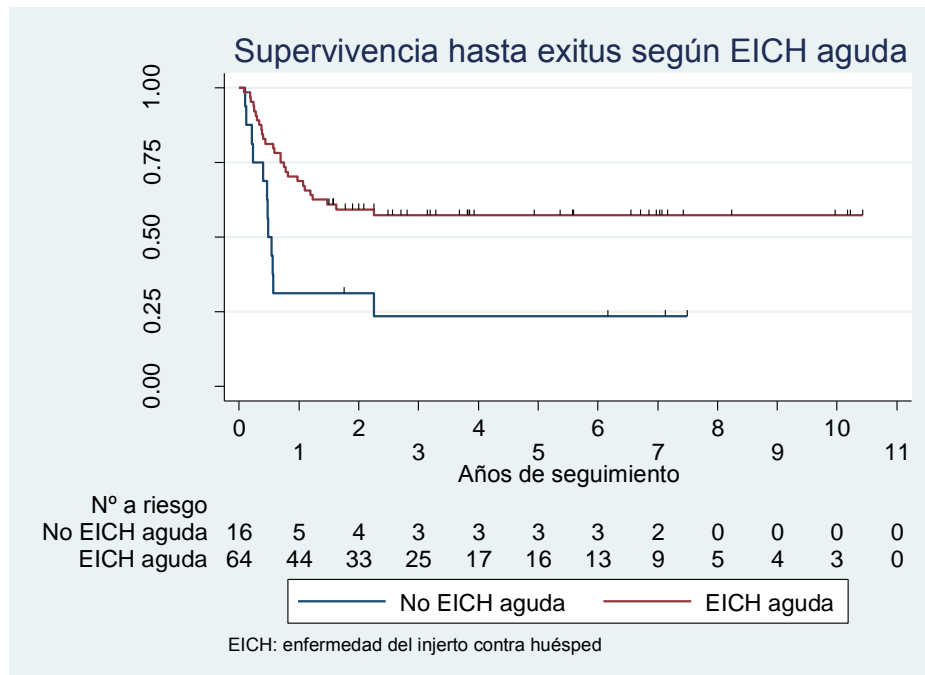
EICH aguda: Los pacientes que presentaron EICH aguda tuvieron un 67 % menos de riesgo de fallecer que los que no la presentaron. (Risk ratio 0,32 (IC 95% 0,16 a 0,70), p 0,0016). La prueba de log rank de diferencia entre las funciones de supervivencia fue estadísticamente significativa (Long-rank 8,9; p 0,002). Si dividimos los pacientes según el grado EICH aguda observamos los siguientes resultados

- Los del grupo I-II presentaron un 64% menor riesgo de éxitus que los que no presentaron EICH aguda (p 0,001).
- Los del grupo III-IV presentaron un 60% menor riesgo de éxitus que los que no presentaron EICH aguda (p 0,001)

La SG a los 3 años postrasplante en los que no presentaron EICHa fue del 23 %, en los de grado I-II del 56 % y III-IV del 57 %.

EICH AGUDA	VIVO	EXITUS	TOTAL
NO	4	12	16
SI	37	27	64
TOTAL	41	39	80

EICH AGUDA	EVENTO OBSERVADO	EVENTO ESPERADO
NO	12	5,52
SI	27	33,48
TOTAL	39	39



Tablas y gráfico R. 36 Análisis bivariado y K-M de SG según de la presencia de EICH

No se encontraron diferencias estadísticas entre la mortalidad y los siguientes factores estudiados: sexo, fenotipo de la LLA, indicación del trasplante, estado de remisión pre-TPH ni tipo de donante, la administración de ICT ni con la presencia de EICH crónica.

FACTORES	RISK RATIO (CI) de recaída (p)	RR (CI) de éxitus (p)
Sexo varón vs mujer	1,26 (0,4-3,6) (0,3)	1,1 (0,3)
Edad	HR 1 (0,93-1,19)	HR 1,15
Fenotipo B vs T	0,37 (0,04)	0,64(0,14)
Indicación 1RC vs ≥2RC	2,4 (0,83-7,82) (0,03)	1,5 (0,07)
Donante: alternativo vs hermano idéntico	0,9 (0,32-3,06) (0,4)	1,75 (0,07)
ICT Sí vs No	0,23 (0,084-0,72) (0,003)	0,52 (0,05)
EICH aguda Sí vs No	0,17 (0,06-0,5) (0,0004)	0,32 (0,001)
EICH crónica Sí vs No	0,75 (0,35)	1,39 (0,21)
EMR (%) pre alo TPH Negativa (<0,01) vs positiva (≥ 0,01)	5,39 (1,92-15,72) (0,0003)	3,37 (0,0002)

Tabla R. 37 Análisis bivariado de factores de riesgo de recaída y exitus postrasplante. HR: hazard ratio.

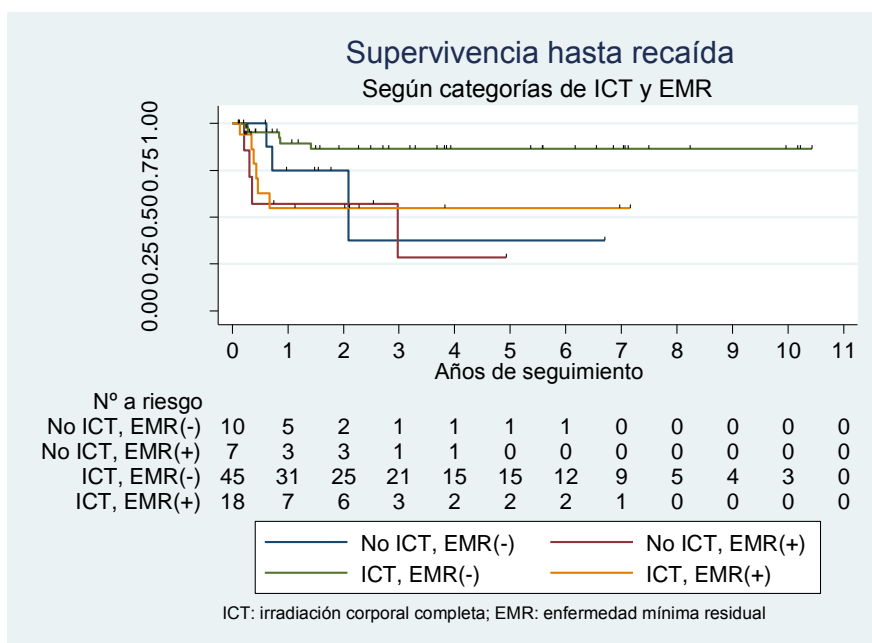
5.9 ANÁLISIS BIVARIADO DE VARIABLES ESTRATIFICADO POR ESTADO DE EMR PRE-TPH

5.9.1 Factores de riesgo relacionados con recaída y estratificados por estado de EMR pre-TPH

Cuando se estratifica por EMR, en el grupo de EMR negativa los pacientes que reciben irradiación recaen un 83% menos que los que no la reciben; en el grupo de EMR positiva los pacientes que reciben irradiación recaen un 38% menos que los que no la reciben ($p=0,17$).

ICT	EMR NEGATIVA		EMR POSITIVA	
	REMISION	RECAÍDA	REMISION	RECAIDA
NO	7	3	3	4
SÍ	40	5	12	6
TOTAL	47	8	15	10

ICT, EMR	EVENTOS OBSERVADOS	EVENTOS ESPERADOS
No, Negativa	3	2,24
No, Positiva	4	1,39
Sí, Negativa	5	11,42
Sí, Positiva	6	2,96
TOTAL	18	18

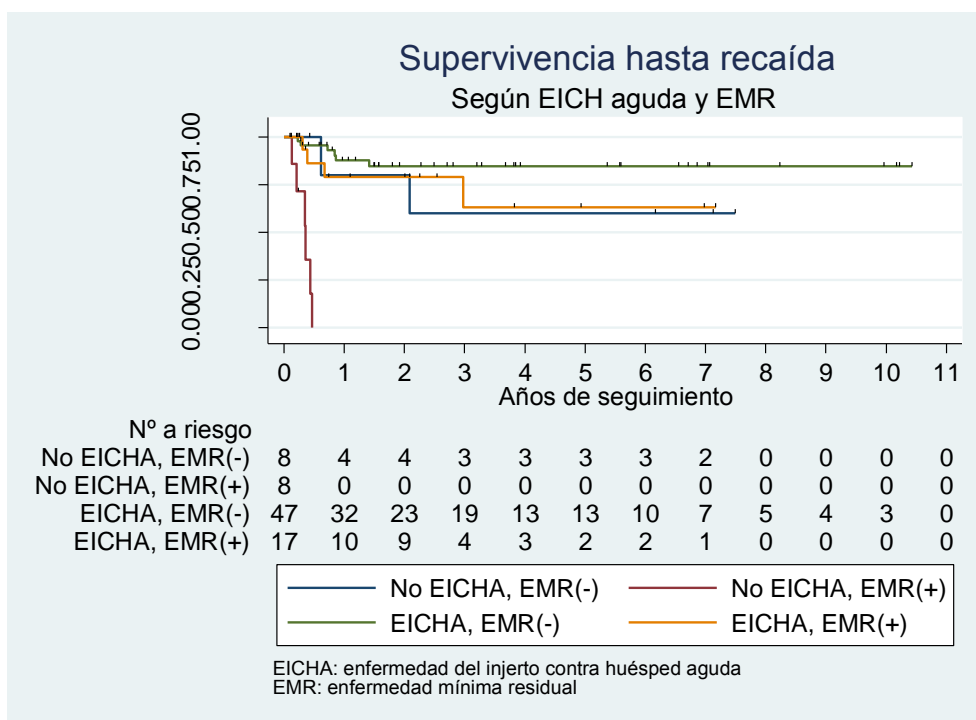


Tablas y gráfico R. 38 Análisis bivariado de uso de radioterapia estratificado por estado de EMR y la recaída

Se encontró relación entre la presencia de EICH aguda y el riesgo de recaída cuando se estratifica por EMR. Cuando se estratifica por EMR, en el grupo de EMR negativa los pacientes que presentan EICH aguda recaen un 53% menos que los que no la presentan; en el grupo de EMR positiva los pacientes que presentan EICH aguda recaen un 97% menos que los que no la presentan ($p=0,01$).

EICH AGUDA	EMR NEGATIVA		EMR POSITIVA	
	REMISION	RECAÍDA	REMISION	RECAIDA
NO	6	2	2	6
SI	41	6	13	4
TOTAL	47	8	15	10

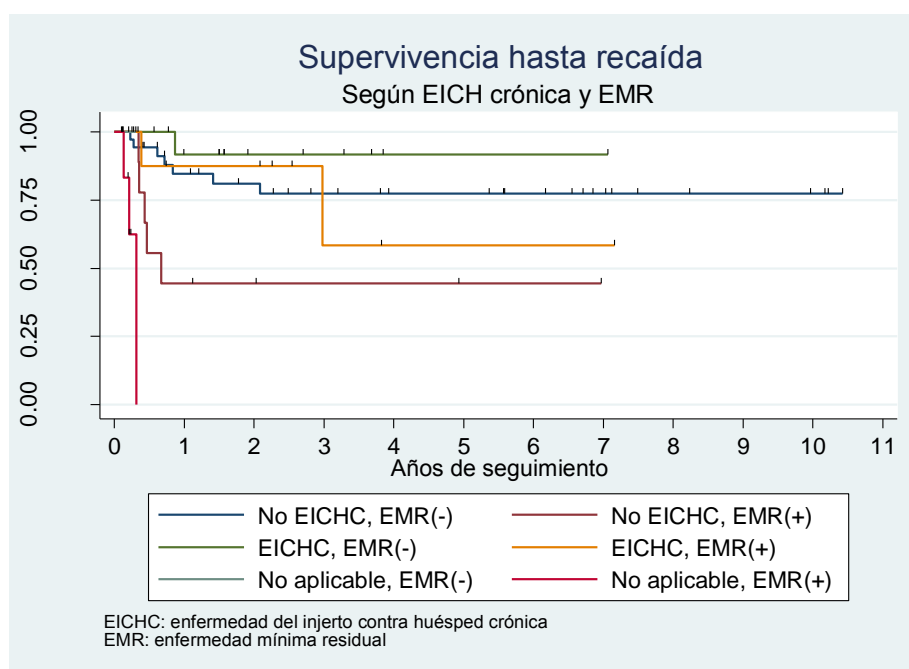
EICH AGUDA, EMR	EVENTOS OBSERVADOS	EVENTOS ESPERADOS
No, Negativa	2	1,65
No, Positiva	6	0,5
Sí, Negativa	6	12,01
Sí, Positiva	4	3,8
TOTAL	18	18



Tablas y gráfico R. 39 Análisis bivariado de presencia de EICH aguda estratificada por estado de EMR y la recaída

Los pacientes con EMR negativa y que presentaron EICH aguda fueron los que presentaron mayor SLR. En el grupo de pacientes con EMR positiva los que presentaron EICH aguda fueron los que más se beneficiaron siendo la SLR de los que no la presentaron del 0%.

En el grupo de EMR negativa los pacientes que presentaron EICH crónica recaen un 35% menos que los que no la presentaron; en el grupo de EMR positiva los pacientes que presentaron EICH crónica recaen un 68% menos que los que no la presentaron. ($p=0,6$)



Tablas y gráfico R. 40 Análisis bivariado de presencia de EICH crónica estratificada por estado de EMR y la recaída

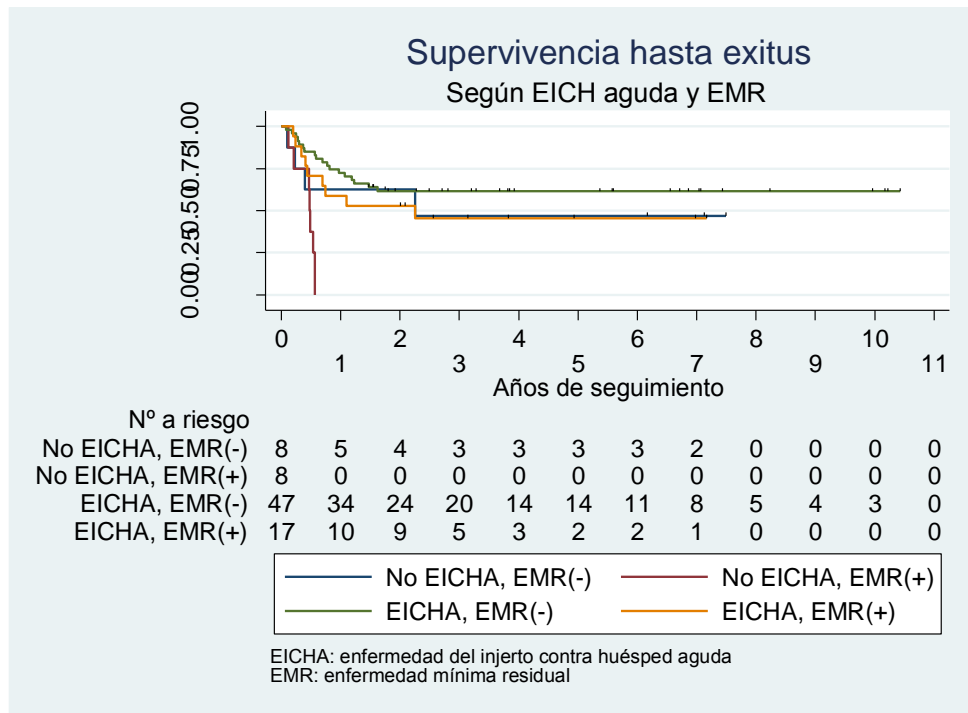
5.9.2 Factores de riesgo relacionados con mortalidad y estratificados por estado de EMR pre-TPH

Se encontró relación estadísticamente significativa con la presencia de EICH aguda y la supervivencia. Cuando se estratifica por EMR, en el grupo de EMR negativa los pacientes que presentan EICH aguda fallecen un 29% menos que los que no la presentan.

En el grupo de EMR positiva los pacientes que presentan EICH aguda fallecen un 91% menos que los que no la presentan ($p=0,005$).

EICH AGUDA	EMR NEGATIVA		EMR POSITIVA	
	VIVO	EXITUS	VIVO	EXITUS
NO	4	4		8
SI	29	18	8	9
TOTAL	33	22	8	17

EICH AGUDA, EMR	EVENTOS OBSERVADOS	EVENTOS ESPERADOS
No, Negativa	4	3,6
No, Positiva	8	1,9
Sí, Negativa	18	25,36
Sí, Positiva	9	8,12
TOTAL	39	39



Tablas y gráfico R. 41 Análisis bivariado de EICH aguda estratificada por estado de EMR y la mortalidad

En el grupo de EMR negativa los pacientes que presentaron EICH crónica fallecen dos veces más que los que no la presentaron; en el grupo de EMR positiva los pacientes que presentaron EICH crónica fallecen 65% menos que los que no la presentaron ($p = 0,03$).

5.10 ESTUDIOS DE SEGUIMIENTO POSTRASPLANTE

5.10.1 Estudios de EMR por citometría de flujo

Se encontraron datos de valoración antes del día +100 postrasplante en 67 pacientes, es decir, 83% de los casos: 60 de ellos fueron negativos. En los 7 pacientes con EMR positiva post-TPH los resultados fueron:

- Los pacientes que presentaron EMR positiva en los primeros 100 días:
 - ✓ Paciente nº 31: la EMR fue del 8% y recayó en el día + 114
 - ✓ Paciente nº 71: la EMR fue del 0.01%
 - ✓ Paciente nº 58: presentó una EMR de 0,9% aunque posteriormente se negativizó tras retirar el tratamiento con ciclosporina. Este paciente presentó una recaída tardía 3 años postrasplante.

- Los pacientes que presentaron EMR positiva 3 meses y 6 meses postrasplante:
 - ✓ Paciente nº 71: presentó nuevas determinaciones de EMR positiva (0,07 y 0,2%) recayendo en el día + 128.
 - ✓ Paciente nº 16: la EMR fue del 0,68% y se mantuvo positiva con una nueva determinación de 0.22%. Este paciente recayó en el día +250, 8 meses postrasplante.
 - ✓ Paciente nº 30: la EMR fue del 0,016% y posteriormente se negativizó. Este paciente recayó en el día + 510, 17 meses postrasplante.
 - ✓ Paciente nº 17: la EMR fue del 0,03% presentó una nueva determinación de EMR positiva (0.035%). Esta paciente se mantenía viva y en remisión 62 meses postrasplante siendo los últimos controles negativos.

No se detectó en ningún paciente EMR positiva más allá de los 6 meses postrasplante. Los pacientes que recayeron más de 6 meses postrasplante presentaron infiltración en más de un 20% de la médula ósea por células blásticas iguales al diagnóstico, cumpliendo criterios de recaída.

Este estudio presenta limitaciones en el número de pacientes para valorar los resultados aunque se observa que:

- los pacientes que presentan de forma precoz EMR positiva (primeros 6 meses) poseen mayor riesgo de recaer (83% vs 17%).
- el estudio de EMR no parece dar información pronóstica a partir de los 6 meses postrasplante.

- la cantidad y forma de presentación de EMR detectada durante los primeros 6 meses se relaciona con el tiempo hasta la recaída:
 - o la detección de EMR positiva a niveles altos ($> 0,1\%$) es un parámetro de recaída inminente
 - o EMR positiva en ascenso/persistente es un parámetro de recaída precoz
 - o la detección de EMR positiva aislada puede indicar un riesgo aumentado de recaída tardía....

- el único paciente con EMR positiva que se encuentra vivo sin recaída presentó bajos niveles de EMR y EICH crónica extensa.

PACIENTE	CONTROL 1 EMR % Día + 100	CONTROL 2 EMR % >+ 3 meses	CONTROL 3 EMR % + 6 meses	CONTROL 4 EMR % >+ 6 meses	EICH AGUDO/CRONICO	EVOLUCION
31	8	RECAIDA día + 114			III / NA	EXITUS
71	0,01	0,07 ; 0,2 RECAIDA día + 128			0 / 0	EXITUS
58	0.9	-	-	-	III / limitado cutáneo	RECAIDA TARDIA 3 años TRATAMIENTO
16	-	0.68	0.22	RECAIDA día + 250	II / 0	EXITUS
30	-	0.016	-	RECAIDA día + 510	I / 0	EXITUS
17	-	0.03	0.035	-	II / extenso	VIVO EN RC

Tabla R. 42 Resumen evolución seguimiento de los pacientes con EMR positivo postrasplante mediante citometría de flujo. NA=no aplica. Paciente con numeración en azul: estudio EMR pre-TPH negativo; paciente con numeración en rojo: estudio EMR pre-TPH positivo.

5.10.2 Quimerismo postrasplante

En el presente estudio analizamos los resultados a partir del 2008 y hasta el 2012, periodo en el que se estudiaron 40 de los 46 pacientes trasplantados (87%).

La media de días desde el trasplante hasta el primer estudio de quimerismo fue de 86 (19-1658). El 87% de los estudios demostraron un quimerismo completo, es decir, 100% de células del donante. El grupo de pacientes estudiados mediante quimerismo postrasplante presentaron 12 recaídas: todos ellos tenían quimerismo completo en el momento del diagnóstico.

En este trabajo no se observó que los estudios de quimerismo postrasplante ofrecieran datos con valor clínico en relación a la recaída.

Ninguno de los 5 pacientes que presentaron quimerismo mixto presentó una recaída: 1 presentó un fallo de implante y falleció por infección, 1 falleció por infección en RC y 3 se encontraban vivos y en remisión a fin de estudio, como se explica a continuación.

- ✓ Paciente nº 47 con quimerismo del 33% del donante: se retiró inmunosupresión y el control de quimerismo posterior pasó a un 55% del donante en 1 mes. No se realizaron más estudios dado que fue éxitus por neumonitis por CMV después del segundo control.
- ✓ Paciente nº 61 con quimerismo 36% del donante: se retiró inmunosupresión y el control de quimerismo posterior pasó a quimerismo completo en 2 meses. Se encontraba vivo y en remisión completa.
- ✓ Paciente nº 55 quimerismo 58% del donante: posteriormente presentó un fallo de implante secundario sin recuperación autóloga. En el contexto de aplasia falleció 3 meses postrasplante por infección por adenovirus. Este paciente es el único que presentó un fallo de implante.
- ✓ Paciente nº 52 quimerismo 69% del donante: se disminuyó inmunosupresión y el control de quimerismo posterior fue de quimerismo completo. Se encontraba vivo y en remisión completa al fin de estudio.
- ✓ Paciente nº 53 quimerismo 93% del donante: se disminuyó inmunosupresión y el control de quimerismo posterior fue de quimerismo completo. Se encontraba vivo y en remisión completa al fin de estudio.

PACIENTE	QUIMERISMO %	INMUNOSU PRESIÓN	QUIMERISMO2 % TIEMPO	EVOLUCION
47	33%	Suspendida	1 mes 55%	EXITUS / CMV
61	36%	Suspendida	2 meses 100%	VIVO RC
55	58%	Menor dosis	1 mes 0%	APLASIA EXITUS/ Adenovirus
52	69%	Menor dosis	1 mes 100%	VIVO RC
53	93%	Menor dosis	1 mes 100%	VIVO RC

Tabla R.43 Resumen evolución y seguimiento de los pacientes con quimerismo mixto postrasplante. Paciente con numeración en azul: estudio EMR pre-TPH negativo; paciente con numeración en rojo: estudio EMR pre-TPH positivo.

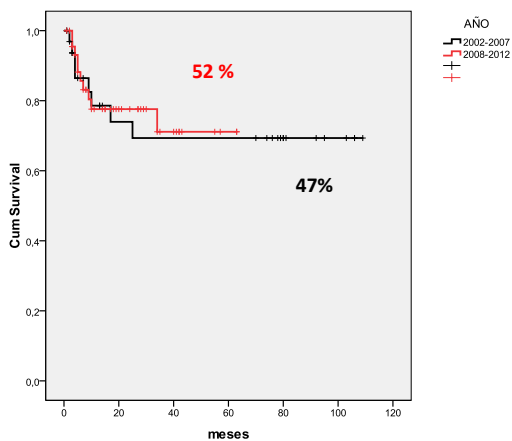
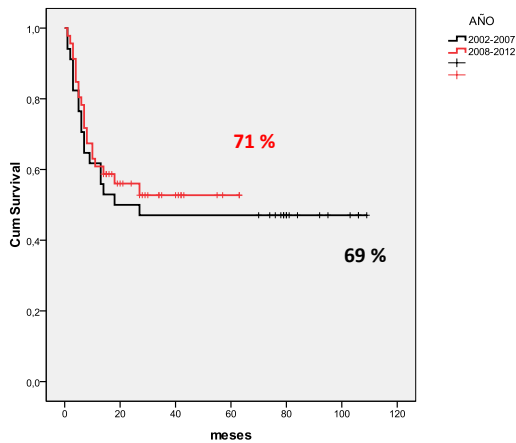
5.11 COMPARACIÓN ENTRE PACIENTES TRASPLANTADOS EN 2002-2007 Y 2008-2012

En este estudio se valoraron los datos de pacientes durante 10 años.

Para conocer la evolución de los resultados a lo largo del tiempo se dividió el grupo en dos periodos:

- Entre los años **2002-2007** se incluyeron 34 pacientes (42%).
- Entre los años **2008-2012** se incluyeron 46 pacientes (57%).

No se observaron diferencias significativas entre los resultados de supervivencia entre los dos periodos.



Gráficos R. 44 Kaplan-Meier supervivencia global y libre de recaída. Comparación 2002-07 (negro) y 2008-12(rojo)

Se obtienen los siguientes resultados con poder estadístico:

Entre los años 2002-2007:

- Los pacientes que reciben ICT tiene un 87% menor riesgo de recaída que los que no reciben ICT ($p=0,008$). Al estratificar en EMR negativa tienen un 83% menos de recaída y en EMR positiva un 96% (NS; $p=0,37$).
- Los EMR positivas tienen un riesgo de recaída 10 veces superior a los EMR negativas ($p=0,0009$).
- Los pacientes que reciben un DNE tiene un riesgo de éxitus 4,5 veces superior a los que reciben HI ($p=0,01$).
- Los EMR positivas tienen un riesgo de éxitus 5 veces superior a los EMR negativas ($p=0,0007$).

Entre los años 2008-2012:

- Los pacientes que presentan EICH agudo tiene un 97% menor riesgo de recaída que los que no lo presentan ($p=0$). Al estratificar en EMR positiva tienen un 96% menos de recaída y en EMR negativa un 95% menor (NS; $p=0,85$).
- Los pacientes que presentan EICH agudo tiene un 87% menor riesgo de éxitus que los que no lo presentan ($p=0,0007$). Al estratificar en EMR positiva tienen un 91% menos de éxitus y en EMR negativa un 67% menor (NS; $p=0,3$).

6. DISCUSION

6.1 RELACIÓN ENTRE LA EMR PRE-TPH Y RESULTADOS DE RECAÍDA Y MORTALIDAD

El trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos logra mejor supervivencia que la quimioterapia en los niños con LLA de alto riesgo. El principal obstáculo para el éxito del trasplante es la recaída.

En nuestra población de 80 niños de características heterogéneas, similares a otros grupos publicados, que incluyen trasplantes de donantes familiares idénticos y alternativos así como el uso de médula ósea, sangre periférica y sangre de cordón umbilical con la gran mayoría acondicionados con ICT, la SLR a los 3 años fue del 72%. La causa más frecuente de éxitus en el grupo completo fue la recaída (43%).

La remisión completa morfológica pre-TPH es el factor pronóstico principal para la supervivencia libre de recaída postrasplante ^{100, 101}. Como se ha explicado anteriormente, la valoración del número de células residuales mediante morfología tiene limitaciones, por lo que técnicas como PCR y CFM ^{102, 62} se utilizan cada vez más en este campo. Según los estudios publicados, ambas técnicas ofrecen resultados similares cuando el nivel de EMR es de 0,01% o mayor. La detección de EMR pre-TPH mediante PCR ha sido estudiada como marcador predictivo de recaída postrasplante en múltiples estudios (*Tabla D.1*):

- En un estudio retrospectivo de 56 niños, Knechtli *et al*, observaron que la presencia de EMR previa al trasplante pronosticaba una peor supervivencia ². Van de Velden y Bader confirmaron estos resultados en publicaciones posteriores ^{103, 104}.
- El grupo de estudio internacional de EMR pre-TPH analizó la presencia de EMR y la supervivencia en 140 niños con LLA: la EMR detectada mediante PCR, fue un factor independiente predictivo de menor supervivencia libre de eventos ³ siendo la supervivencia directamente proporcional al nivel de EMR previo al trasplante.
- Sramkova *et al*, cuantificaron la EMR pre-TPH en 36 niños, siendo esta el único valor pronóstico de supervivencia en un análisis multivariable ⁴.
- Bader *et al*, estudiaron la EMR en 91 niños, encontrando una SLE a los 5 años del 27% en los que la EMR era de 10^{-4} o mayor y del 60% en aquellos que era menor ¹.
- En el estudio previo a esta tesis que se publicó en *Haematologica* en 2010 ¹¹¹, con 31 de los niños incluidos en esta tesis, la SLE en el grupo EMR positiva fue del 20% y en el grupo con EMR negativa del 74% ($p < 0,005$).

En un estudio reciente (2013), Sánchez-García *et al*¹⁰⁵ estudiaron 102 pacientes previamente al TPH, mediante citometría de flujo. La SLR fue del 65,9%, 42,9% y 0% para los pacientes con EMR negativa, bajos niveles y niveles medios-altos, respectivamente ($p < 0,001$). La SG fue del 52,3%, 28,6% y 0% para los pacientes con EMR negativa, bajos niveles y niveles medios-altos, respectivamente ($p < 0,001$). En el análisis de Cox la detección de EMR mediante CFM fue el factor pronóstico más significativo para la supervivencia. En otros estudios mediante PCR publicados en los últimos años (2014 y 2015):

- Gandemer *et al*¹⁰⁶ estudiaron la EMR pre-TPH en 122 niños. Se observó que la incidencia de recaída (IR) es mayor en los pacientes que presentan EMR positiva (43,6%) que en los que poseen EMR negativa (16,7%); la SG es 40,4% y 72,3%, respectivamente.
- En un estudio reciente de Balduzzi *et al*, se estudiaba la EMR pre y postrasplante en 82 niños que recibieron un alo-TPH¹⁰⁷. La SLE y la IR fueron del 77,7% y 11,4% en los EMR negativa pre-TPH, siendo en los EMR positiva del 30,8% y 61,5% ($p < 0,001$); la EMR pre-TPH positiva se asoció a 9,2 veces mayor riesgo de recaída.
- Pochon C *et al*, incluyeron 133 niños en un estudio prospectivo¹⁰⁸. Los pacientes con EMR negativa presentaron mayor supervivencia global, 52% vs 14% que los que presentaron EMR-positiva.
- Sutton *et al*⁵, realizó estudios de EMR pre y postrasplante a 81 niños. Los pacientes con EMR positiva pre-TPH presentaron una menor SLR y SG (41% y 64%) que aquellos en los que la EMR fue negativa (83% y 92%) ($p < 0,0001$).

Reunidos todos los estudios las conclusiones son consistentes, objetivándose una alta incidencia de recaída (75%) en los casos que presentan un alto nivel de EMR pre-TPH, un riesgo intermedio de recaída (50%) en los casos que presentan un nivel medio de EMR pre-TPH y baja tasa de recaída (15%) en los casos que presentan EMR negativa pre-TPH⁶².

En el presente estudio, 25 pacientes entraron a trasplante con EMR mayor o igual a 0,01%. Las características de los pacientes con EMR positiva pre-TPH y EMR negativa y el tipo de trasplante que recibieron no presentaron diferencias. Los pacientes con EMR positiva tuvieron un mayor riesgo de recaer y fallecer; la recaída se presentó de forma más precoz y las posibilidades de rescate postrasplante fueron menores. La causa más frecuente de éxitus en el grupo EMR positiva fue la recaída, en cambio, en el grupo EMR negativa fue la infección.

Nuestros resultados, usando la CFM, son comparables con los que obtienen los grupos que utilizan la PCR y muestran la fuerte relación entre la presencia de EMR previa al TPH y la supervivencia libre de recaída y global. Los pacientes con EMR mayor o igual a 0,01% tienen un mayor riesgo de recaer y fallecer.

AUTORES	TIPO Y N	TÉCNICA	TIPO TPH	RESULTADOS	p
Knechtli et al (2) (Blood, 1998)	Retrospectivo 64	PCR semicuantitativa reordenamiento Ig o TCR 10^{-2} a 10^{-3}	MA Cy/ ICT	SLE 2 años EMR ++ 0% EMR + 36% EMR - 73%	< 0,001 Análisis multivariante factor independent
Uzunel et al (109) (Blood, 2001)	Retrospectivo 30	PCR cuantitativa reordenamiento Ig o TCR 10^{-3} a 10^{-5}	MA BU/Cy Cy/ ICT	IR EMR + 52% EMR - 0%	
Van der Velden et al (103) (Leukemia, 2003)	Retrospectivo 17	PCR semicuantitativa reordenamiento Ig o TCR 10^{-4} a 10^{-5}	MA VP/Cy/ BU VP/Cy/ ICT	SLE 5 años EMR + 33% EMR - 80%	
Krejci et al (3) (BMT, 2003)	Retrospectivo 140 (incluye pacientes de 2, 23 y 1)	PCR cuantitativa reordenamientos Ig o TCR	MA	SLE 5 años EMR ++ 21,4% EMR + 40,7% EMR - 75,2%	< 0,001 Análisis multivariante factor independent
Sramkova et al (4) (Ped Blood Ca, 2007)	Prospectivo 25	PCR cuantitativa reordenamientos Ig o TCR 10^{-3} a 10^{-4}	MA	SLE 4 años EMR + 0% EMR - 94%	< 0,0001 Análisis multivariante factor independent
Paganin et al (110) (Leukemia, 2008)	Prospectivo 60	PCR cuantitativa reordenamientos Ig o TCR 10^{-4} a 10^{-5}	MA	SLE 3 años EMR ++ 21% EMR + 50% EMR - 90%	
Bader et al (104,1) (Leukemia 2002, J Clin Oncol 2009)	Prospectivo 91	PCR cuantitativa reordenamientos Ig o TCR 10^{-4} a 10^{-5}	MA	SLE/IR 3 años EMR ++ 21/57% EMR + 48/20% EMR - 64/11%	< 0,001 Análisis multivariante factor independent

Elorza et al (111) <i>(Haematologica, 2010)</i>	Retrospectivo	CFM	MA	SLE/SG 2 años	0,005
	31	EMR + $\geq 0,01\%$ EMR - $< 0,01\%$	VP/Cy /ICT BU/FLU/TT	EMR + 20/20% EMR – 74/80%	Análisis multivariante factor independent
Leung et al (112) <i>(Blood, 2012)</i>	Retrospectivo	CFM	MA	SG 5 años	Análisis multivariante factor independent
	64	EMR + $\geq 0,01\%$ EMR - $< 0,01\%$		EMR ++ 42,9% EMR + 66,7% EMR – 87,5%	
Ruggeri et al (113) <i>(Leukemia, 2012)</i>	Retrospectivo	PCR cuantitativa reordenamiento Ig o TCR (119)	MA SCU (Eurocord)	SLE/IR 4 años EMR ++ 21/57% EMR + 29/39% EMR – 54/24%	0,05 Análisis multivariante factor independent
	170	CFM (51) 10^{-3} a 10^{-5}			
Gandemer et al (106) <i>(Br J Haematol, 2014)</i>	Retrospectivo	PCR cuantitativa reordenamientos Ig o TCR	MA	IR/SG EMR + 43/40% EMR - 16/72%	
	122	10^{-4} a 10^{-5}			
Balduzzi et al (107) <i>(Br J Haematol, 2014)</i>	Retrospectivo	PCR cuantitativa reordenamientos Ig o TCR	MA	SLE/IR EMR + 30/61% EMR - 77/11%	0,001
	82	10^{-4} a 10^{-5}			
Pochon et al (108) <i>(Br J Haematol, 2014)</i>	Prospectivo	PCR cuantitativa reordenamientos Ig o TCR	MA	SG EMR + 14% EMR – 52%	
	133	10^{-4} a 10^{-5}			
Sutton et al (5) <i>(Br J Haematol, 2015)</i>	Retrospectivo	PCR cuantitativa reordenamientos Ig o TCR	MA	SLR/SG 4 años EMR + 41/64% EMR – 83/92%	0,0001 Análisis multivariante factor independent
	81	10^{-4} a 10^{-5}			

Tabla D.1 Grupos de estudio de EMR pre-trasplante en niños con LLA. Abreviaciones: AtoTPH= trasplante alogénico; IR= incidencia acumulada de recaída; ICT= irradiación corporal total; Cy= ciclofosfamida; BU= busulfan; VP= etopósido; FLU= fludarabina; TT= Tiotepa; EMR= enfermedad mínima residual; N= número de sujetos; MA: mieloablato; SLE=: supervivencia libre de eventos; SLR= supervivencia libre de recaída; SG= supervivencia global. CFM=citometría de flujo multiparamétrica

6.2 VARIABLES RELACIONADAS CON RECAÍDA Y MORTALIDAD

En una publicación reciente Shah NN *et al*, estudiaron los factores relacionados con la recaída postrasplante en un grupo de 93 niños con leucemia aguda o síndrome mielodisplásico ¹²⁸. En el estudio multivariado: la enfermedad en SNC, la presencia de EMR y los acondicionamientos no mieloablativos se asociaron independientemente a una mayor incidencia de recaída.

En nuestro estudio previo, Elorza *et al* ¹¹¹, el único factor de riesgo relacionado con recaída y éxitus fue la presencia de EMR pre-TPH. En el presente estudio, con mayor número de pacientes aparecen otros factores relacionados estadísticamente. El uso de radioterapia como parte del acondicionamiento y la presencia de EICH aguda fueron protectores de recaída y en el caso de la EICH, también de mortalidad.

6.3.1 Irradiación corporal total

Un análisis del registro Internacional de Trasplante de médula ósea (IBMTR) comparó el uso de ICT (n=451) o busulfan (n= 176) junto con ciclofosfamida en un grupo de niños trasplantados de hermano HLA-idéntico. Se observó que la probabilidad de SLR a los 3 años fue del 50% en el grupo que recibió irradiación ¹⁴² respecto a un 35% ($p=0.005$). La mortalidad relacionada con el trasplante fue mayor en el grupo de busulfan (RR 1,68; $p= 0,01$). Estos datos de mejor SLR y SG con ICT se confirman en otros estudios como el de Bunin *et al* ¹²⁹.

En el presente estudio, los resultados muestran que **los pacientes que recibieron ICT presentaron menos de riesgo de recaída que los no irradiados**, como publican otros grupos. Además, podemos decir que al estratificar por EMR, en el grupo de EMR negativa los pacientes que reciben irradiación recaen un 83% menos que los que no la reciben; en el grupo de EMR positiva los pacientes que reciben irradiación recaen un 38% menos que los que no la reciben. Según estos resultados, parece que la ICT es menos protectora en el grupo de EMR positiva, posiblemente porque en este grupo la cantidad de enfermedad residual es mayor y excede la capacidad de la radioterapia para eliminar la enfermedad.

6.3.2. Enfermedad injerto contra huésped

En el presente estudio la incidencia de EICH aguda y crónica es similar a lo publicado por otros grupos. La EICH aguda en grados I-II se presenta en un 55% aproximadamente y los grados III-IV en un 24%. Si lo separamos por tipo de trasplante vemos que los grados I-II en el de HI y en el DNE afectan a un 60% de los pacientes y los grados III-IV en el HI en un 16% y en el DNE un 23%. Se estudio la variable EICH y posteriormente los pacientes se agruparon para su estudio en 3 grupos: los que no presentaron EICH, los de grados leves-moderados y los de grado grave.

En el grupo de EICH III-IV se agrupan los pacientes con formas graves y los resultados que se discuten a continuación se refieren principalmente a los que presentaron grado III ya que los pacientes que presentaron grado IV (n=4) no aportan información suficiente por su escaso número y la pérdida de dos de ellos por complicaciones relacionadas con el EICH agudo grave. En relación con el EICHc se presenta en un aproximadamente un 25% de los pacientes sin observarse diferencias entre tipos de donante. Se debe tener en cuenta que en nuestro estudio la fuente de progenitores fue principalmente MO sin manipular y SCU.

En algunos estudios se observa que los pacientes que entran a trasplante con EMR positiva tienen mayor supervivencia si se utilizan productos no manipulados en comparación con productos T-deplecionados, dado que este grupo presenta mayor incidencia de EICH ^{2, 104, 130}. La ausencia de EICH se relaciona con mayor riesgo de recaída ^{131, 132}.

El grupo de Schneider et al, publicó que niños con altos niveles de EMR medidos mediante PCR pre-alloTPH que se trasplantaban con donantes no emparentados no deplecionados de células T se asociaba a una mayor probabilidad de mantenerse en remisión ⁶⁴. Los que se trasplantaban con donantes deplecionados recaían en un 100%. Estos datos se añaden a otros que muestran el efecto injerto contra leucemia cuando la EMR se encuentra a niveles bajos ¹³³.

Uzunel *et al*, publicaron que la combinación de EICH aguda y crónica se asocia a un significativo menor riesgo de recaída (p 0,03) ^{114, 109}. Presentaron datos que demostraban que los pacientes con EMR positiva pre-TPH que se trasplantaban con donantes no deplecionados tenían menos del 50% de posibilidades de recaer.

En el presente estudio se objetivó que la presencia de EICH aguda fue protectora de recaída y de éxito.

En relación con la recaída, los pacientes con grados III-IV de EICHa fueron los que presentaron mayor SLR. Los pacientes con EMR positiva fueron los que más se beneficiaron de la presencia de EICHa siendo la SLR de los que no la presentaron del 0%. Los pacientes con EMR negativa y que presentaron EICHa fueron los que presentaron mayor SLR.

En relación a la mortalidad, los pacientes con EICHa sobrevivieron más que los que no presentaron EICHa. Los grados graves de EICH presentan una alta mortalidad, aunque a pesar de ello los resultados son mejores que en los pacientes que no presentaron EICHa. También en relación a la mortalidad, los pacientes con EMR positiva fueron los que más se beneficiaron de la presencia de EICHa.

En el presente estudio, no se encontró relación estadísticamente significativa entre la presencia de EICHc y la supervivencia, posiblemente por un insuficiente número de pacientes incluidos. La tendencia de los resultados muestra que el EICHc es protector de recaída en ambos grupos aunque protege más a los que entran con EMR positiva a trasplante.

De los pacientes del grupo de EMR positiva pre-TPH que a fin de estudio se encuentran vivos, el 70% presentaron EICHc. En relación con la mortalidad, la EICHc es un factor protector en el grupo de EMR positiva pero en el grupo EMR negativa, fallecen a largo plazo más los que presentan. Este resultado nos llevaría a pensar que es protector de recaída pero un factor adverso de larga supervivencia por las complicaciones relacionadas.

6.3 SEGUIMIENTO POSTRASPLANTE

6.3.1 Cuantificación de EMR por CFM

La monitorización de la EMR identifica a niños con LLA con alto riesgo de recaída ^{114, 115, 116, 117, 118} así que podría ser una herramienta útil en el seguimiento postrasplante de los pacientes.

Existen múltiples estudios realizados mediante PCR ([Tabla D.2](#)) :

- En el estudio del grupo alemán de Knechtli et al, se observó que la EMR podía ser positiva los primeros 6 meses post-trasplante tanto en pacientes que recaían como en los que posteriormente permanecían en remisión ².
- En el estudio multicéntrico japonés de Imashuku et al, con 95 niños afectados de LLA que recibieron un alo-TPH, no se objetivó valor predictivo de recaída dado que la mayoría de los casos que recayeron (78%) presentaron un cambio clonal que no permitía detectar la clona leucémica al perderse las dianas de estudio mediante PCR ¹¹⁹.
- Este problema de la técnica de PCR se solventó con los estudios realizados por Szczepanski et al, aumentando el número de primers diana, aunque el tiempo desde la detección de EMR hasta la recaída clínica era tan corto que no permitía realizar ningún procedimiento terapéutico de rescate ⁸⁸.
- Uzunel *et al* ¹¹⁴, publicaron los resultados de 23 niños afectados de LLA que recibieron un alo-TPH. Se observó EMR positiva postrasplante en 9 casos, recayendo el 88% de ellos), con un tiempo medio de 5,5 meses (0,5 -30). En el paciente con EMR positiva que no recayó, la determinación se realizó 1 mes postrasplante y posteriormente se negativizó. En el resto del grupo, con EMR negativa, recayeron 6 de 23 pacientes (26%). Los factores relacionados con recaída sin detección de EMR fueron: recaída extramedular (SNC) y cambio clonal.
- Spinelli *et al*, valoraron la EMR de 43 pacientes adultos con LLA previamente al TPH y después en el día + 30 y 100 post TPH ¹²⁰. La recaída en el grupo EMR positiva pretrasplante fue del 46% respecto al 0% en el grupo EMR negativa (p=0.027). La recaída en el grupo con EMR positiva postrasplante en el día +100 fue del 80% respecto al 7% en el grupo negativo (p=0,0006). Estos autores plantean la posibilidad que los pacientes que no alcanzan la EMR negativa post-trasplante en el día +100 deberían ser candidatos a inmunoterapia.

- Pochon *et al* ¹⁰⁸, estudiaron 133 niños. La presencia de EMR persistentemente positiva después del día 90 fue un factor pronóstico de recaída.
- Balduzzi *et al*, publicaron que los pacientes que presentaron EMR positiva postrasplante recayeron 2,5 veces más que los que se mantuvieron con EMR negativa los primeros 100 días y 7,8 veces más si se detecta después de los 6 meses postrasplante ¹⁰⁷. Los autores concluían que la EMR postrasplante si es de detección precoz y a bajos niveles no implica necesariamente la recaída.
- Sutton *et al* ⁵, observaron que los pacientes que presentaban EMR persistentemente positiva postrasplante tuvieron los peores resultados con SLR del 35% y SG del 55%: En el estudio multivariante los pacientes con EMR positiva presentaron un riesgo de recaída 4 veces mayor.
- Bader *et al* ¹²¹, en un estudio reciente, analizaron la presencia de EMR postrasplante en 113 pacientes trasplantados en 2RC o mayor remisión. La SLE a los 3 años fue del 55%, la incidencia de recaída (IR) del 33% y la mortalidad relacionada con el trasplante de un 12%. Los niveles de EMR se correlacionaron inversamente con la SLE ($p < 0,004$) y directamente con la IR ($p < 0,01$). La probabilidad de recaer si se detectaba EMR en el primer mes fue del 96%; a los 3 meses de un 87%, a los 6 meses del 71% y del 61% a los 9 meses postrasplante.

Existen pocos estudios realizados mediante CFM. Uno de ellos es el de Sánchez *et al*, quienes valoraron la EMR en pacientes adultos con LLA pre-TPH y en el día + 30, +60, +90 y posteriormente cada 2-3 meses ¹²². La SLE en el grupo EMR positiva pretrasplante fue del 33,3% respecto al 73,5% en el grupo EMR negativa ($p = 0,03$). Durante el seguimiento, se detectó EMR positiva en 9 pacientes de los cuales recayeron 8 (88%), entre 1 y 6 meses postrasplante. En el resto del grupo sólo recayó un paciente (3,4%). En 6 pacientes se realizó infusión de linfocitos pero sólo se presentó respuesta en un caso Phi + sin recaída franca. Dos pacientes con niveles positivos bajos de EMR se mantienen en RC al final del estudio con mediana de seguimiento de 29,5 meses.

En el presente estudio los pacientes que presentaron EMR positiva los primeros 100 días recayeron en un 100% y los que presentaron EMR positiva partir de los 3 meses en un 66 %. En el grupo, con EMR negativa postrasplante, recayeron sólo 13 pacientes (17%). Estos datos concuerdan con los anteriormente expuestos. Según nuestros datos, el estudio de EMR después de los 6 meses no dio información sobre la recaída.

REFERENCIA	TECNICA	RECAÍDA POSTRASPLANTE
Knechtli et al (2) <i>(Blood, 1998)</i>	PCR	No se encontró valor pronóstico los primeros 6 meses
Sánchez et al (122) <i>(B J Haematol, 2002)</i>	CFM	EMR + 88% vs 3,4%
Imashuku et al (119) <i>(BMT, 2003)</i>	PCR	No valor pronóstico Problemas técnicos
Uzunel et al (114) <i>(B J Haematol, 2003)</i>	PCR	EMR + 88% vs 26% Estudio multivariado
Spinelli et al (120) <i>(Haematologica, 2007)</i>	PCR	EMR + 80% vs 7%
Balduzzi et al (107) <i>(Br J Haematol, 2014)</i>	PCR	Recaída 100 días: x 2,5 >6 meses: x 7,8
Sutton et al (5) <i>(Br J Haematol, 2015)</i>	PCR	Recaída x4
Bader et al (121) <i>(J Clin Oncol, 2015)</i>	PCR	Menor SLR

Tabla D.2 Grupos de estudio de EMR post-trasplante en pacientes con LLA.

6.3.2 Estudios de quimerismo

El estudio de quimerismo tiene como objetivo conocer en el periodo post-trasplante la proporción de células circulantes que proceden del donante y del receptor. En el contexto de la leucemia aguda se desea un 100% de quimerismo del donante (QC), dado que la persistencia de células del receptor aumenta el riesgo de presentar una recaída. El quimerismo es un dato complementario al estudio de la EMR post-trasplante. En varios estudios [123](#), [124](#), [105](#) principalmente del grupo alemán, se considera que la presencia de quimerismo mixto (QM) es un indicador de alto riesgo de recaída.

La retirada de la inmunosupresión y/o la infusión de linfocitos del donante de forma precoz serían el tratamiento idóneo, según estos autores, para revertir el quimerismo a completo del donante y eliminar la presencia de EMR no detectada, antes de la recaída hematológica ^{125, 126} (Tabla D.6). Bader *et al*, publicaron un estudio multicéntrico prospectivo con 163 niños con ALL: 101 presentaron QC o bajos niveles de QM, en 46 pacientes se detectó QM creciente y en 16 decreciente ¹²⁴. La recaída fue mayor en los pacientes que presentaron un QM creciente (26 de 46; 56%) que los que tenía QC ó en bajos niveles (8 de 101; 8%) o decreciente (0 de 16) ($p < 0,0001$). La SLE a tres años fue del 54% para todos los pacientes: 66% para los de bajo riesgo y 23% para los que presentaron QM creciente. De los 46 pacientes con QM creciente, a 31 se les infundieron linfocitos del donante: los que recibieron inmunoterapia presentaron una SLE a 3 años del 37% en comparación con los otros 15 niños en los que no se realizó ninguna intervención, que tuvieron una SLE del 0%.

En el artículo de Pochon *et al*, la presencia de EMR es útil para valorar la recaída pero el quimerismo no parece tener ninguna implicación pronóstica clínicamente útil ¹⁰⁸. En otro artículo de Terwey *et al*, se observa que la incidencia de recaída es mayor en 101 pacientes adultos con quimerismo mixto, especialmente en los que se incrementa en el tiempo, aunque la sensibilidad del estudio es baja a la hora de utilizarse en la clínica diaria ¹²⁷.

En el presente estudio, el resultado del quimerismo no parece relacionarse con la recaída dado que ninguno de los pacientes con quimerismo mixto presentó recaída. Los pacientes estudiados mediante quimerismo presentaron 12 recaídas, momento en el cual todos tenían quimerismo completo. Los resultados son provisionales dado el escaso de número de pacientes incluidos.

REFERENCIA	PACIENTES	RESULTADOS
Zetterquist <i>et al</i> (125) (<i>BMT, 2000</i>)	12	QM IR 4/5 (80%) EMR + QC RC 7/7
Bader <i>et al</i> (124) (<i>J Clin Oncol, 2004</i>)	163	SLE 66% vs 23% IL SLE 37% vs 0%
Pochon <i>et al</i> (108) (<i>Br J Haematol, 2014</i>)	133	No pronóstico
Terwey <i>et al</i> (127) (<i>Biol Blood Marrow Transplant 2014</i>)	101 adultos	Mayor incidencia de recaída. Baja sensibilidad

Tabla D.3 Grupos de estudio de quimerismo post-trasplante en pacientes con LLA. IL: infusión de linfocitos del donante; QM: quimerismo mixto; IR: incidencia de recaída; QC: quimerismo completo; RC: remisión completa.

6.4 NUEVAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN Y FUTUROS ESTUDIOS

Muchos han sido los avances realizados en el campo del tratamiento de la LLA en niños y paralelamente en el desarrollo del procedimiento de trasplante como el uso de mejores donantes alternativos o acondicionamiento de intensidad reducida¹³⁴. En esta revisión se muestra que un 60% de los niños con LLA de alto riesgo sobreviven a los 3 años postrasplante y los que entran a trasplante con EMR positiva tiene menos supervivencia principalmente porque recaen.

Aunque los pacientes con alto riesgo de recaer pueden ser identificados a priori poco se conoce hasta el momento en relación a la prevención de la recaída. El grupo de pacientes con EMR positiva pre-TPH^{123, 108, 128} debería recibir un tratamiento específico dirigido a evitar la recaída y los pacientes que positivizan la EMR postrasplante y/o presentan un quimerismo mixto creciente también se podrían beneficiar de tratamientos de rescate. Existen escasos estudios en relación a la actitud terapéutica a tomar, dado que el tiempo entre la positivización de la EMR y la recaída es corto¹²³.

Bader *et al*,¹²⁸ administraron a los pacientes con quimerismo mixto creciente linfocitos del donante y obtuvieron una SLE a 3 años del 37% en comparación a los que no se realizó ninguna intervención, que tuvieron una SLE del 0%. La publicación reciente de Pochon C *et al*, incluye 133 niños en un estudio prospectivo¹⁰⁸ en el que los pacientes con EMR medida mediante PCR pre o post-trasplante superior a 10^{-3} recibían infusión de linfocitos y rápido descenso de la dosis de ciclosporina (9 pacientes). Esta actitud es similar a otros trabajos publicados¹²⁰. Los pacientes con EMR negativa presentaron mayor supervivencia global, 52% vs 14%.

En un estudio reciente de Balduzzi *et al*¹⁰⁷, no se observó respuesta en el grupo con EMR positiva a los que se suspendió la inmunosupresión y/o infundió linfocitos.

Algunas de las posibles estrategias de tratamiento se apuntan a continuación:

Pre-TPH:

- Terapia citoreductiva adicional
- Clásica: aceptando el aumento de toxicidad en este grupo de pacientes que ya han recibido altas dosis¹³⁵
- Nuevos fármacos: como imatinib en la LLA Philadelphia positiva^{136, 137} análogos de las purinas, antimetabolitos (clofarabina),...
- Nuevos protocolos de acondicionamiento que favorezcan el efecto injerto vs leucemia

Postrasplante:

- Quimioterapia de mantenimiento como imatinib ¹³⁸, ¹³⁹ dasatinib, nilotinib ¹⁴⁰ en la LLA Phi positiva
- Uso de sirolimus como profilaxis de EICH
- Terapias inmunológicas
 - o Retirada precoz de profilaxis EICH
 - o Donantes con diferencias en el receptor para inmunoglobulinas de las células natural killer (NK) ¹⁴¹
 - o Anticuerpos monoclonales
 - o Terapia celular
 - con linfocitos del donante ^{122, 124,126, 128} en pacientes con aparición de EMR y/o aumento de quimerismo del receptor. ^{142, 143, 144,145}
 - con NK

La posibilidad de rescatar pacientes de la recaída está relacionada con la detección precoz de EMR a niveles bajos y que la presencia EICH sea capaz de eliminarla.

Parece ser que realizar los estudios de EMR y quimerismo combinados serían la actitud más eficaz para el seguimiento de estos pacientes, dado que en algunos casos el quimerismo mixto se detecta antes que la EMR ¹⁴⁶. Este hecho obligaría a realizar estudios medulares seriados, que en la edad pediátrica tendrían limitaciones. Se ha estudiado la posibilidad de seguimiento de EMR en sangre periférica, y aunque sin datos concluyentes, en el grupo de las LLA derivadas de precursores T podría ser una posibilidad en la práctica clínica ^{147,148}. Se están explorando otras pruebas que puedan predecir la recaída y que sean complementarias a la EMR y al quimerismo postrasplante ¹²⁴.

6.5 LIMITACIONES Y PUNTOS FUERTES DEL ESTUDIO

Este estudio tiene 2 limitaciones principales: el escaso número de pacientes y la heterogeneidad de sus factores de riesgo. Además, algunos resultados obtenidos que no son significativos estadísticamente pudieran cobrar validez o finalmente desecharse si se aumentara el número de pacientes incluidos. También sería interesante conocer la relación entre la extensión del EICH crónico y su relación con la recaída postrasplante.

El interés del estudio recae en el uso de la CFM como instrumento de cuantificación de la EMR. Los resultados del estudio son comparables a los obtenidos por otros autores usando técnicas de PCR y apoya la tesis de la relación entre EMR pre-TPH y supervivencia postrasplante.

Las valoraciones de datos postrasplante son limitadas a la hora de valorar las posibilidades terapéuticas en el grupo de pacientes de alto riesgo de recaída. Se requieren más estudios para confirmar estos resultados y definir nuevos protocolos para el subgrupo de pacientes que presentan EMR positiva previa al alo-TPH. También se deberán realizar estudios de la valoración de la EMR y quimerismo postrasplante como factores pronóstico de recaída y qué actitud tomar ante sus resultados.

7. CONCLUSIONES

1. La detección de EMR medida mediante CFM previa al alo-TPH, en un grupo de 80 niños con LLA determinó un grupo de pacientes con mayor riesgo de recaída y menor supervivencia global comparados con los pacientes que presentan una EMR pretrasplante indetectable ($< 0,01\%$).
 - a) **El grupo de pacientes con EMR positiva pretrasplante recayeron 5,5 veces más y de forma más precoz que los que presentaron EMR negativa.**
 - b) La supervivencia libre de recaída (SLR) a los 3 años en el grupo de EMR negativa fue del 80% comparada con el 50 % del grupo EMR positiva (Log Rank 9,5; $p=0,002$).
 - c) **Los pacientes con EMR positiva pretrasplante presentaron 3,4 veces mayor riesgo de fallecer.**
 - d) La supervivencia global (SG) en el grupo de EMR negativa fue del 59% comparada con el 30% del grupo EMR positiva (Log-Rank 6,5; $p=0,01$).

2. **Este estudio demuestra la relación existente entre la presencia de EMR previa al trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos y la supervivencia posterior y apoya los resultados de publicaciones previas que han estudiado la EMR mediante técnica de PCR.**

3. Los pacientes que recibieron irradiación corporal total como parte del acondicionamiento recayeron menos que los que no la recibieron.

4. Los pacientes que presentaron EICH aguda recayeron menos.
 - a) Los pacientes con EICH aguda grados III-IV presentaron menor recaída que los de grados I-II.
 - b) Los pacientes con EMR positiva pre-TPH se beneficiaron más de la presencia de EICHa.
 - c) Los pacientes con EMR negativa pre-TPH y EICHa fueron el grupo que presentaron mayor supervivencia libre de eventos.

5. Los pacientes que presentaron EICH aguda fallecieron menos.
 - a) Los pacientes con EMR positiva pre-TPH se beneficiaron más de la presencia de EICHa.
 - b) Los pacientes con EMR negativa pre-TPH y EICHa fueron los que presentaron mayor supervivencia global.

6. Los pacientes que presentan de EMR positiva los primeros 6 meses postrasplante, recaen más, relacionándose la cantidad de EMR detectada con el tiempo de recaída.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. **Bader P**, Kreyenberg H, Henze GH, Eckert C, Reising M, Willasch A, et al. Prognostic value of minimal residual disease quantification before allogeneic stem-cell transplantation in relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia: the ALL-REZ BFM Study Group. *J Clin Oncol*. 2009; 27(3):377-384.
2. **Knechtli CJ**, Goulden NJ, Hancock JP, Grandage VL, Harris EI, Garland RJ, et al. Minimal residual disease status before allogeneic bone marrow transplantation is an important determinant of successful outcome for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1998; 92(11):4072-9.
3. **Krejci O**, Van der Velden V, Bader P, Kreyenberg H, Goulden N, Hancock J, et al. Level of minimal residual disease prior to hematopoietic transplantation predicts prognosis in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia: a report of the Pre-BMT MRD study group. *Bone Marrow Transplant*. 2003; 32(8):849-51.
4. **Sramkova L**, Muzikova K, Fronkova E, Krejci O, Sedlacek P, Formankova R, et al. Detectable minimal residual disease before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation predicts extremely poor prognosis in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2007; 48(1):93-100.
5. **Sutton R**, Shaw PJ, Venn NC, Law T, Dissanayake A, Kilo T, et al. Persistent MRD before and after allogeneic BMT predicts relapse in children with acute lymphoblastic leukemia. *Br J Haematol* 2015; 168(3):395-404
6. **Campana D**, Coustan-Smith E, Janossy G. The immunologic detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1990; 76(1):163-71.
7. **Coustan-Smith E**, Behm FG, Sánchez J, Boyett JM, Hancock ML, Raimondi SC, et al. Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 1998; 351(9102):550-1.
8. **8.Kerst G**, Kreyenberg H, Roth C, Well C, Dietz K, Coustan-Smith E, et al and P Bader. Concurrent detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukaemia by flow cytometry and real-time PCR. *British J Haematology* 2005;128:774-782
9. **9. Woessner S** and Florensa L. La citología óptica en el diagnóstico hematológico. *Acción médica* 5ª Ed. 2006
10. **Leung AY**, Verfaillie CM. Stem cell model of hematopoiesis. En: Hoffman R (Ed.). *Hematology. Basic principles and practice*. Elsevier 2005; 200-18.
11. **Van der Velden VH**, Bie M, van Wering ER and JJ van Dongen. Immunoglobulin light chain gene rearrangements in precursor-B-acute lymphoblastic leukemia: characteristics and applicability for the detection of minimal residual disease *Haematologica* 2006 May 91: 679-682
12. **Pui CH**, Robinson LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 2008;371:1030-1043
13. **Pui CH**, Sandlund JT, Pei D, et al. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Total Therapy Study XIIB at St Jude Children's Research Hospital. *Blood*. 2004; 104:2690-2696.
14. **Pui CH**, Campana D, Evans WE. Childhood acute lymphoblastic leukaemia-current status and future perspectives. *Lancet Oncol* 2001;2:597-607
15. **Pui CH**, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukaemia. *N England J med* 2006;354:166-78
16. **Barret AJ**, Horowitz MM, Pollock BH, Zhang M-J, Bortin MM, Buchanan GR, et al. Bone marrow transplants from HLA-identical siblings as compared with chemotherapy for children with acute lymphoblastic leukemia in a second remission. *N Engl J Med*. 1994; 331:1253-8.
17. **Pui C-H**, Behm F, Crist W. Clinical and biologic relevance of immunologic marker studies in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 1993; 82 (2) pp: 343-362.
18. **Moorman AV**, Ensor HM, Richards SM, et al. Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: results from the UK Medical Research Council ALL97/99 randomized trial. *Lancet Oncol* 2010
19. **Kaspers GJ**, Smets LA, Pieters R, et al. Favorable prognosis of hiperdiploid common acute lymphoblastic leukemia may be explained by sensitivity to antimetabolites and other drugs: results of an in vitro study. *Blood* 1995; 85: 751–56.
20. **Arico M**, Valsecchi MG, Camitta B, et al. Outcome of treatment in children with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2000; 342: 998–1006.

21. **Schultz KR**, Bowman WP, Aledo A, et al. Improved early event free survival with imatinib in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukaemia: a Children's Oncology Group study. *J Clin Oncol* 2009; 27: 5121–23.
22. **Pui CH**, Gaynon PS, Boyett JM, et al. Outcome of treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia with rearrangements of the 11q23 chromosomal region. *Lancet* 2002; 359: 1909–15.
23. **Balduzzi A**, Valsecchi MG, Uderzo C. Chemotherapy versus allogeneic transplantation for very-high-risk childhood acute lymphoblastic leukaemia in first complete remission: comparison by genetic randomization in an international prospective study. *Lancet* 2005;366:635-42
24. **Peters C**, Schrauder A, Schrappe M. Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation in children with acute lymphoblastic leukaemia: the BFM/IBFM/EBMT concepts. *Bone marrow Transplantation* 2005;35 (suppl 1):S9-11
25. **Locatelli F**, Giorgiani G, Di-Cesare-Merlone A. The changing role of stem cell transplantation in childhood. *Bone Marrow Transplantation* 2008; 41:S3-S7
26. **Handgretinger R**, Kurtzberg J, Maarten R. Indications and donor selections for allogeneic stem cell transplantation in children with hematologic malignancies. *Pediatr Clin N Am* 2008;55:71-96
27. **Satwani P**, Sather H, Ozkaynak F et al. Allogeneic bone marrow transplantation in first remission for children with very ultra-high-risk features of acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group Study Report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006;13:218-27
28. **Schultz KR**, Pullen DJ, Sather HN, et al. Risk- and response-based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukaemia: a combined analysis of prognostic markers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children's cancer Group (CCG). *Blood*. 2007; 109:926-935.
29. **Coustan-Smith E**, Sancho J, Behm FG, et al. Prognostic importance of measuring early clearance of leukemic cells by flow cytometry in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Blood* 2002;100:52-8
30. **Schultz KR**, Bowman WP, Aledo A et al. Improved early event-free survival with imatinib in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: A children's oncology group study. *J Clin Oncol* 2009;27:5175-5181
31. **Mann G**, Attarbaschi MG, Schrappe M et al. Improved outcome with HSCT in a poor prognostic subgroup of infants with mixed-lineage-leukemia-MLL-rearranged ALL: results from the Interfant-99 study. *Blood* 2010;116:2644-2650
32. **Moricke A**, reiter A, Zimmermann Me et al. Risk-adjusted therapy of acute lymphoblastic leukemia can decrease treatment burden and improve survival: treatment results of 2169 unselected pediatric and adolescent patients enrolled in the trial ALL-BFM 95. *Blood* 2008; 111:447-4489
33. **Gaynon PS**, Qu RP, Chappell RJ. Survival after relapse in childhood acute lymphoblastic leukaemia: impact of site and time to first relapse-the Children's Cancer Group experience. *Cancer* 1998;82:1387-95
34. **Chessells JM**, Veys P, Kempfski H. Long-term follow-up of relapse childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2003;123:396-405
35. **Borgmann A**, von Stackelberg A, Hartmann R et al. Unrelated donor stem cell transplantation compared with chemotherapy for children with acute lymphoblastic leukemia in a second remission: a matched-pair analysis. *Blood* 2003;101:3835-9
36. **Eapen M**, Raetz E, Zhang M et al. Outcomes after HLA-matched sibling transplantation or chemotherapy in children with B-precursor acute lymphoblastic leukemia in second remission: a collaborative study of the Children's Oncology Group and the Center for International Blood and Marrow Transplant Research. *Blood* 2006;107:4961-7
37. **Rocha V**, Locatelli F. Searching for alternative hematopoietic stem cell donors for pediatric patients. *Bone Marrow Transplant* 2008;41:207-214
38. **Gluckman E**, Rocha V. Cord Blood transplantation: state of the art. *Haematologica* 2009; 94:451-454.
39. **Rocha V**, Cornish J, Sievers EL et al. Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. *Blood* 2001; 97:2962-2971
40. **Mehta PA** and Davies SM. Allogeneic transplantation for childhood ALL. *Bone marrow Transplantation* 2008; 41: 133-139
41. **Eapen M**, Rubinstein P, Zhang M-J et al. Comparable long-term survival after unrelated and HLA-matched sibling donor HSCT for AL in Children younger than 18 months. *J Clin Oncol* 2006; 24:145-51
42. **Brochstein JA**, Kernan NA, Groshen S et al. Allogeneic bone marrow transplantation after hyperfractionated total body irradiation and cyclophosphamide in children with acute leukemia. *N Engl J Med* 1987;317:1618-24

43. **Marks DI**, Forman SJ, Blume KG, et al. A comparison of cyclophosphamide and total body irradiation with etoposide and total body irradiation as conditioning regimens for patients undergoing sibling allografting for ALL in first and second remission. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006;12:438-53
44. **Bordigoni P**, Vernant JP, Souillet G et al. Allogeneic marrow transplantation for children with ALL in first remission: a cooperative study of the Groupe d'Etude de al Greffe de Moelle Osseuse. *J Clin Oncol* 1989;7:747-53
45. **Von Buelzingsloewen A**, Esperou-Bordeau H, Souillet G et al. Allogeneic bone marrow transplantation following a busulfan-based conditioning regimen in young children with ALL: a cooperative study of the Societe Francaise de Greffe de Moelle. *Bone Marrow Transplant* 1995;16:521-7
46. **Saarinen UM**, Mellander L, Nysom K et al. Allogeneic bone marrow transplantation in first remission in children with very high risk acute lymphoblastic leukemia. *Nordic Society for Paediatric Hematology and Oncology. Bone Marrow Transplant* 1996;17:357-63
47. **Chessells JM**, Bailey C, Wheeler K et al. Bone marrow transplantation for high-risk childhood lymphoblastic leukemia in first remission: experience in MRC UKALL X. *Lancet* 1992;8819:656-8
48. **Ribera JM**, Ortega JJ, Oriol A et al. Comparison of intensive chemotherapy, allogeneic or autologous stem-cell transplantation as post-remission treatment for children with very high risk ALL: PETHEMA ALL-93 Trail. *J Clin Oncol* 2007;25:16-24
49. **Moussalem M**, Esperou Bordeau H, Devergie A et al. Allogeneic bone marrow transplantation for childhood acute lymphoblastic leukemia in second remission: factors predictive of survival, relapse and graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 1995;15:943-7
50. **Uderzo C**, Rondelli R, Dini G et al. High-dose vincristine, fractionated total body irradiation and cyclophosphamide as conditioning regimen in allogeneic and autologous bone marrow transplantation for childhood acute lymphoblastic leukemia in second remission: a 7 year Italian multicentre study. *Br J Haematol* 1995; 89:790-7
51. **Torres A**, Alvarez MA, Sanchez J et al. Allogeneic bone marrow transplantation vs chemotherapy for the treatment of acute lymphoblastic leukemia in second complete remission. *Bone Marrow Transplant* 1999;23:1257-60
52. **Davies SM**, Ramsay NKC, Klein JP et al. Comparison of preparative regimens in transplant for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2000;18:340-7
53. **Vicent MG**, Madero L, Martinez A et al. Matched-pair analysis comparing allogeneic PBCT and BMT from HLA-identical relatives in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant* 2002;30:9-13
54. **Muñoz A**, Diaz-Heredia C, Diaz MA et al. Allogeneic hemopoietic stem cell transplantation for childhood acute lymphoblastic leukemia in second complete remission: similar outcomes after matched related and unrelated donor transplant: a study of the Spanish Working party for Blood and Marrow Transplantation in children GETMON. *Pediatr hematol Oncol* 2008;25:245-59
55. **Oakhill A**, pamphilon DH, Potter MN et al. Unrelated donor bone marrow transplantation for children with relapsed acute lymphoblastic leukemia in second complete remission. *Br J Haematol* 1996;94:574-8
56. **Woolfrey AE**, Anasetti C, Storer B et al. Factors associated with outcome after unrelated marrow transplantation for treatment of acute lymphoblastic leukemia in children. *Blood* 2002;99:2002-8
57. **Davies SM**, Wagner JE, Shu XO et al. Unrelated donor bone marrow transplantation in children with acute leukemia. *J Clin Oncol* 1997;15:557-65
58. **Casper J**, Camitta B, Truitt R et al. Unrelated bone marrow donor transplants for children with leukemia o myelodisplasia. *Blood* 1995;85:2354-63
59. **Hongeng S**, Krance RA, Bowman LC et al. Outcomes of transplantation with matched-sibling and unrelated-donor bone marrow in children with leukemia. *Lancet* 1997;350:767-71
60. **Bunin N**, Carston M, Wall D et al. And the National marrow donor program working party. Unrelated marrow transplantation for children with acute lymphoblastic leukemia in second remission. *Blood* 2002;99:3151-7
61. **Saarinen-Pihkala UM**, Gustafsson G, Ringden O et al for the Nordic Society of pediatric hematology and Oncology. No disadvantage in outcome of using matched unrelated donors for bone marrow transplantation in children with acute lymphoblastic leukemia in second remission. *J Clin Oncol* 2001;19:3406-14
62. **Buckley SA**, Appelbaum FR and Walter RB. Prognostic and therapeutic implications of minimal residual disease at the time of transplantation in acute leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 2012; 1-12

63. **Robillard N**, Cavé H, Méchinaud F, Guidal C, Garnache-Ottou F, Rohrlach PS, et al. Four-color flow cytometry bypasses limitations of Ig/TCR polymerase chain reaction for minimal residual disease detection in certain subsets of children with acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2005; 90(11):1516-23.
64. **Schneider M**, Hettinger K, Matthes-Martin S. Influence of transplantation regimen on prognostic significance of high-level minimal residual disease before allogeneic stem cell transplantation in children with ALL. *Bone marrow Transplant* 2001;28:1087-89
65. **Campana D**. Determination of minimal residual disease in leukemia patients. *Br J Haematol*. 2003; 121:823-838.
66. **Cave H**, van der Werff ten Bosch J, Suci S, et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer- Childhood Leukemia Cooperative Group. *N England J Med* 1998; 339:591-8
67. **Panzer-Grumayer ER**, Schneider M, Panzer S. Rapid molecular response during early induction chemotherapy predicts a good outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000; 95:790-4
68. **Campana D**. Molecular determinants of treatment response in acute lymphoblastic leukemia. *Hematology* 2008;366-373
69. **Van Dongen JJM**, Seriu T, Panzer-Grümayer ER, Biondi A, Pongers-Willensen MJ, Corral L, et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet* 1998;352:1731-8
70. **Willemse MJ**, Seriu T, Hettinger K, D'Aniello E, Hop WC, Panzer-Grümayer ER, et al. Detection of minimal residual disease identifies differences in treatment response between T-ALL and precursor B-ALL. *Blood* 2002;99:4386-93
71. **Li A**, Zhou J, Zuckerman D. Sequence analysis of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in children with acute lymphoblastic leukemia at diagnosis and at relapse: implications for pathogenesis and for the clinical utility of PCR-based methods of minimal residual disease detection. *Blood*. 2003; 102:4520-4526.26.
72. **Badell I**, Muñoz A, Estella J, Fernández-Delgado R, Javier G, Verdeguer A, et al. Long-term results of two consecutive trials in childhood acute lymphoblastic leukaemia performed by the Spanish Cooperative Group for Childhood Acute Lymphoblastic Leukaemia Group (SHOP) from 1989 to 1998. *Clin Transl Oncol*. 2008; 10(2):117-24.
73. **Pui C-H**, Campana D. New definition of remission in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Leukaemia*. 2000;14:783-5
74. **Borowitz MKJ**, Pullen DJ, Shuster JJ, Viswanatha D, Montgomery K, William CL, et al. Minimal residual disease detection in childhood precursor-B-cell acute lymphoblastic leukaemia: relation to other risk factors. A Children's Oncology Group Study. *Leukemia*. 2003;17:1566-72
75. **Borowitz MJ**, Devidas M, Hunger SP, Bowman WP, Carroll AJ, Carroll WL, et al. Clinical significance of Minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukaemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study. *Blood*. 2008;111:5477-85
76. **Bastida P**, Palacio C, Solsona M, Ortega JJ y J Sánchez de Toledo. Leucemia mínima residual: nuevo concepto de remisión completa. *An Pediatr (Barc.)* 2005; 63(5):390-5
77. **Brüggemann M**, Gökbuget N, Kneba M. Acute lymphoblastic leukaemia: monitoring minimal residual disease as a therapeutic principle. *Semin Oncol*. 2012. 39; 47-57
78. **Campana D**. Status of minimal residual disease testing in childhood haematological malignancies. *Br J Haematol*. 2008; 143(4):481-9.
79. **van Dongen JJ**, Macintyre EA, Gabert JA, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease: report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia*. 1999; 13:1901-1928.
80. **Frederik W van Delft** and Vaskar Saha. Molecular Techniques to improve outcome in childhood ALL. *Methods in molecular medicine: Paediatric Haematology: Methods and Protocols*. Edited by NJ Goulden and CG Steward. Humana Press Inc. Totowa, NJ.
81. **Kalina T**, Flores-Montero J, van der Velden VHJ, Martin-Ayuso M, Böttcher, Ritgen M, Almeida J and A Orfao on behalf of the Euroflow Consortium. Euroflow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia* 2012;26:1986-2010

82. **Borowitz MJ**, Pullen DJ, Winick N, Martin PL, Bowman WP, Camitta B. Comparison of diagnostic and relapse flow cytometry phenotypes in childhood acute lymphoblastic leukemia: implications for residual disease detection: a report from the children's oncology group. *Cytometry* 2005; 68:18-24
83. **Gaipa G**, Basso G, Maglia O, Leoni V, Faini A, Cazzaniga G, et al. Drug-induced immunophenotypic modulation in childhood ALL: implications for minimal residual disease detection. *Leukemia* 2005; 19:49-56
84. **Brüggemann M**, Schrauder A, Raff T, Pfeifer H, Dworzak M, Ottmann OG, et al. Standardized MRD quantification in European ALL trials: proceedings of the second international symposium on MRD assessment in Kiel, Germany, 18-20 September 2008. *Leukemia* 2010;24:521-535
85. **van der Velden VH**, Joosten SA, Willemse MJ, van Wering ER, Lankester AW, van Dongen JJ, et al. Real-time quantitative PCR for detection of minimal residual disease before allogeneic stem cell transplantation predicts outcome in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia*. 2001; 15(9):1485-7.
86. **Eckert C** and Landt O. Real-time PCR to detect minimal residual disease in childhood ALL. *Methods in Molecular Medicine*, Vol. 91: Pediatric Hematology: Methods and Protocols Edited by: N. J. Goulden and C. G. Steward Humana Press Inc., Totowa, NJ
87. **Flohr T**, Schrauder A, Cazzaniga G, Panzer-Grumayer R, van der Velden V, Fischer S et al. Minimal residual disease-directed risk stratification using real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the international multicenter trial AIEOP-BFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2008; 22:771–782.
88. **Szczepanski T**, Willemse MJ, Brinkhof B et al. Comparative analysis of Ig and TCR gene rearrangements at diagnosis and at relapse of childhood precursor-B-ALL provides improved strategies for selection of stable PCR targets for monitoring of minimal residual disease. *Blood* 2002;99:2315-2323
89. **Craig FE** and Foon K. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood* 2008; 111:3941-67
90. **Salganik MP**, Milford EL, Hardie DL, Shaw S, Wands MP. Classifying antibodies using flow cytometry data: class prediction and class discovery. *Biom J* 2005; 47:740-54.
91. **Ryan J**, Quinn F, Meunier A, Boublikova L, Crampe M, Tewari P, et al. Minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukaemia patients at multiple time-points reveals high levels of concordance between molecular and immunophenotypic approaches. *Br J Haematol*. 2009; 144(1):107-15.
92. **Neale GAM**, Coustan-Smith E, Stow P, pan Q, Chen X, Pui CH, et al. Comparative analysis of flow cytometry and polymerase chain reaction for the detection of Minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia*. 2004; 18: 934-8
93. **Malec M**, van der Velden VH, Björklund E, Wijkhuijs JM, Soderhall S, Mazur J, et al. Analysis of minimal residual disease in childhood with acute lymphoblastic leukemia: comparison between RQ-PCR analysis of Ig/TcR gene rearrangement and multicolor flow cytometric immunophenotyping. *Leukemia* 2004; 18(10):1630-6.
94. **Irvig J**, Jesson J, Virgo P, Case M, Minto L, et al on behalf of the UKALL Flow MRD group and UK MRS steering group. Establishment and validation of a standard protocol for the detection of minimal residual disease in B lineage childhood acute lymphoblastic leukaemia by flow cytometry in a multi-center setting. *Haematologica*. 2009; 94(6): 870-4
95. **Fossat C**, Roussel M, Arnoux I, Asnafi V, Brouzes C, Garnache-Ottou F, et al. Methodological aspects of minimal residual disease assessment by flow cytometry in acute lymphoblastic leukemia: a French multicenter study. *Cytometry Clin Cytom* 2015;88(1):21-9
96. **Ribera JM**, Ortega JJ, Oriol A, Bastida P, Calvo C, Pérez-Hurtado JM, et al. Comparison of intensive chemotherapy, allogeneic or autologous stem-cell transplantation as postremission treatment for children with very high risk acute lymphoblastic leukemia: PETHEMA ALL-93 Trial. *J Clin Oncol*. 2007; 25(1):16-24.
97. **Ortega JJ**, Ribera JM, Oriol A, Bastida P, González ME, Calvo C, et al. Early and delayed consolidation chemotherapy significantly improves the outcome of children with intermediate risk acute lymphoblastic leukemia. Final results of the prospective randomized PETHEMA ALL-89 TRIAL. *Haematologica*. 2001; 86(6):586-95.
98. **Campana D**, Coustan-Smith E. Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. *Cytometry*. 1999; 38(4):139-52.

99. **Dworzak MN**, Gaipa G, Relei R, Veltroni M, Schumich A, Maglia O, et al. Standardization of flow cytometric minimal residual disease evaluation in acute lymphoblastic leukemia: multiparametric assessment is feasible. *Cytometry*. 2008; 74(6):331-40.
100. **Mehta PA**, Davies SM. Pre-transplant minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2007; 48:1-3.
101. **Uckun FM**, Kersey JH, Haake R, Weisdorf D, Nesbit ME, Ramsay NK. Pretransplantation burden of leukemic progenitor cells as a predictor of relapse after bone marrow transplantation for acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 1993; 329:1296-1301.
102. **Schilham MW**, Balduzzi A, Bader P. Is there a role for minimal residual disease levels in the treatment of ALL patients who receive allogeneic stem cell? *Bone Marrow Transplant*. 2005; 35 (Suppl 1):S49-52.
103. **van der Velden VH**, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, van Dongen JJ. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time PCR: principles, approaches and laboratory aspects. *Leukemia*. 2003; 17(6):1013-1035.
104. **Bader P**, Hancock J, Kreyenberg H, Goulden NJ, Niethammer D, Oakhill A, et al. Minimal residual disease status prior to allogeneic stem cell transplantation is a powerful predictor for post-transplant outcome in children with ALL. *Leukemia*. 2002; 16(9):1668-72.
105. **Sánchez-García J**, Serrano J, Serrano-López J, Gómez-García P, Martínez F, García-Castellano JM, et al. Quantification of minimal residual disease levels by flow cytometry at time of transplant predicts outcome after myeloablative allogeneic transplantation in ALL. *Bone Marrow Transplant* 2013;48(3):396-402
106. **Gandemer V**, Pochon C, Oger E, Dalle JH, Michel G, Schmitt C, et al. Clinical value of pre-transplant minimal residual disease in childhood lymphoblastic leukemia: the results of the French minimal residual disease-guided protocol. *Br J Haematol* 2014; 165(3):392-401
107. **Balduzzi A**, Di Maio L, Silvestri D, Songia S, Bonanomi S, Rovelli A, et al. Minimal residual disease before and after transplantation for childhood acute lymphoblastic leukemia: is there any room for intervention? *Br J Haematol* 2014;164(3):396-408
108. **Pochon C**, Oger E, Michel G, Dalle J, Salmon A, Nelken B, et al. Follow-up of post-transplant minimal residual disease and chimerism in childhood lymphoblastic leukemia:90 d to react. *Br J Haematol* 2014. Dec 19
109. **Uzunel M**, Mattsson J, Jaksch M, Remberger M, Ringder O. The significance of graft-versus-host disease and Pretransplantation minimal residual disease status to outcome after allogeneic stem cell transplantation in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2001; 98(6):1982-4.
110. **Paganin M**, Zecca M, Fabbri G. Minimal residual disease in an important predictive factor of outcome in children with relapsed "high risk" acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2008;22:2193-2200
111. **Elorza I**, Palacio C, Dapena JL, Gallur L, Sanchez de Toledo J, Diaz de Heredia C. Relationship between minimal residual disease measured by multiparametric flow cytometry prior to allogeneic stem cell transplantation and outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2010;93:936-941
112. **Leung W**, Pui CH, Coustan-Smith E. Detectable minimal residual disease before haematopoietic cell transplantation is prognostic but does not preclude cure for children with very-high-risk leukemia. *Blood* 2012;120(2):468-72
113. **Ruggeri A**, Michel G, Dalle JH, et al. Impact of pre-transplant minimal residual disease after cord blood transplantation for childhood acute lymphoblastic leukemia in remission. A Eurocord, PDWP-EBMT analysis. *Leukemia* 2012;26(12):2455-61
114. **Uzunel M**, Jaksch M, Mattsson J, Ringden O. Minimal residual disease detection after allogeneic stem cell transplantation is correlated to relapse in patients with acute lymphoblastic leukaemia. *B J Haematol*. 2003; 122(5):788-94.
115. **Bader P**, Willasch A, and Klinedbiel T. Monitoring of post-transplant remission of childhood malignances: is there a standard? *Bone Marrow Transplant* 2008. 41(Suppl. 2):S31-34
116. **Miyazaki T**, Fujita H, Fujimaki K. Clinical significance of minimal residual disease detected by multidimensional flow cytometry: serial monitoring after allogeneic stem cell transplantation for acute leukemia. *Leuk Res*. 2012. 36:998-1003

117. **Miglino M**, Berisso G, Grasso R, Canepa L, Calvio M, Pierri I, et al and A Bacigalupo. Allogeneic bone marrow transplantation for adults with acute lymphoblastic leukemia: predictive role of minimal residual disease monitoring on relapse. *Bone Marrow Transplantation* 2002;30:579-585
118. **Kröger N**, Bacher U, Bader P, Böttcher S, Borowitz MJ, Dreger P, et al. NCI First International Workshop on the Biology, Prevention, and Treatment of Relapse after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Report from the Committee on Disease-Specific Methods and Strategies for Monitoring Relapse following Allogeneic Stem Cell Transplantation. Part I: Methods, Acute Leukemias, and Myelodysplastic Syndromes. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010; 16: 1187-1211
119. **Imashuku S**, Terui K, Matsuyama T, Asami K, Tsuchiya S, Ishii E, et al for the MRD Study Group in Allogeneic Bone Marrow Transplantation for Childhood ALL. Lack of clinical utility of minimal residual disease detection in allogeneic stem cell recipients with childhood acute lymphoblastic leukemia: multi-institutional collaborative study in Japan. *Bone Marrow Transplantation* 2003; 31:1127-1135
120. **Spinelli O**, Peruta B, Tosi M. Clearance of minimal residual disease after allogeneic stem cell transplantation and the prediction of the clinical outcome of adult patients with high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2007; 92: 612-18.
121. **Bader P**, Kreyenberg H, von Stackelberg A, Eckert C, Salzmann-Manrique E, Meisel R, et al. Monitoring of minimal residual disease after allogeneic stem-cell transplantation in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia allows for the identification of impending relapse: results of the ALL-BFM-SCT 2003 Trial. *J Clin Oncol* 2015. Jan 20.
122. **Sánchez J**, Serrano J, Gómez P, et al. Clinical value of immunological monitoring of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia after allogeneic transplantation. *British J Haematol* 2002;116:686-694
123. **Pulsipher MA**, Bader P, Klindebiel T. Allogeneic transplantation for pediatric acute lymphoblastic leukemia: the emerging role of peritransplantation minimal residual disease/quimerism monitoring and the novel chemotherapy, molecular, and immune approaches aimed at preventing relapse. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008;15 (1 Suppl):62-71
124. **Bader P**, Kreyenberg H, Hoelle W, Dueckers G, Handgretinger R, Lang P, et al. Increasing mixed chimerism is an important prognostic factor for unfavourable outcome in children with acute lymphoblastic leukaemia after allogeneic stem-cell transplantation: possible role for pre-emptive Immunotherapy? *J Clin Oncol*. 2004; 22(9):1696-705.
125. **Zetterquist H**, Mattsson J, Uzunel M, Näsman-Björk I, Svenberg P, Tammik L, et al. Mixed quimerism in the B-cell lineage is a rapid and sensitive indicator of minimal residual disease in bone marrow transplant recipients with B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplantation* 2000; 25:843-851
126. **Klindebiel T**, Bader P. Delayed lymphocyte infusion in children given SCT. *Bone Marrow Transplantation* 2008;41:S23-S26
127. **Terwey TH**, Hemmati PG, Nagy M, Pfeifer H, Gökuşbuğ N, Brüggemann M et al. Comparison for relapse prediction after allogeneic stem cell transplantation for adult acute lymphoblastic leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014;20(10):1522-9
128. **Shah NN**, Borowitz MJ, Steinberg SM, Robey NC, Gamper CJ, Symons HJ, et al. Factors predictive of relapse of acute leukemia in children after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014;20(7):1033-9
129. **Bunin N**, Aplenc R, Kamani N et al. Randomized trial of busulfan vs total body irradiation containing conditioning regimens for children with ALL: a pediatric blood and marrow transplant consortium study. *Bone Marrow Transplant* 2003; 32:543-8
130. **Marmont AM**, Horowitz MM, Gale RP. T-cell depletion of HLA-identical transplants in leukemia. *Blood* 1991;78:2120-2130
131. **Horowitz MM**, Gale RP, Sondel PMI. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 1990;75:555-562
132. **Passweg JR**, Tiberguén P, Cahn JY. Graft versus-leukemia effects in T lineage and B lineage acute lymphoblastic leukemia. 1998;21:153-158
133. **Bradfield SM**, Radich JP, Loken MR. Graft-versus-leukemia effect in acute lymphoblastic leukemia: the importance of tumor burden and early detection. *Leukemia* 2004;18:1156-58

134. **Peters C**, Schrappe M, von Stackelberg A et al. Stem-cell transplantation in children with acute lymphoblastic leukemia: a prospective international multicenter trial comparing sibling donors with matched unrelated donors- The ALL-SCT-BFM-2003 Trial J Clin Oncol 2015;33:1265-74
135. **Borgmann A**, Zinn C, Hartmann R. Secondary malignant neoplasms after intensive treatment of relapsed acute lymphoblastic leukemia in childhood. Cancer 2008; 44:257-268
136. **Manabe A**, Kawasaki H, Shimada H, Kato I, Kodama Y, Sato A, et al. Imatinib use immediately before stem cell transplantation in children with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: results from Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. Cancer Med 2015.
137. **Lee S**, Kim DW, Kim YJ. Minimal residual disease-based role of imatinib as a first-line interim therapy prior to allogeneic stem cell transplantation in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2003; 102: 3068-3070
138. **Carpenter PA**, Snyder DS, Flowers ME, et al. Prophylactic administration of imatinib after HSCT for high risk Philadelphia chromosome-positive leukemia. Blood 2007;109:2791-3
139. **Nishiwaki S**, Miyamura K, Kato C. Impact of post-transplant imatinib administration on Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. Anticancer Res 2010; 30: 2415-2418
140. **Shimoni A**, Volchek Y, Koren-Michowitz M, Varda-Bloom N, Somech R, Shem-Tov N, et al. Phase ½ study of nilotinib prophylaxis after allogeneic stem cell transplantation in patients with advanced chronic myeloid leukemia or Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. Cancer 2015; 121:863-71
141. **Goulmy E**. Minor histocompatibility antigens: allo target molecules for tumor-specific immunotherapy. Cancer J. 2004;10:1-7
142. **Bader P**, Koscielnak E, Schlegel PG. Combined chemo-immunotherapy in children with ALL who relapse after allogeneic stem cell transplantation: an option to induce long term remission. Bone marrow Transplant 2004; 33:220
143. **Bader P**, Klingebiel T, Schaudt A, Theurer-Mainka U, Handgretinger R, Lang P, et al. Prevention of relapse in paediatric patients with acute leukaemia and MDS after allogeneic SCT by early immunotherapy initiated on the basis of increasing mixed chimerism: a single centre experience of 12 children. Leukemia. 1999; 13(12):2079-86.
144. **Choi SJ**, Lee JH, Kim S, Lee YS, Seol M, Ryu SG, et al. Treatment of relapsed acute lymphoblastic leukemia after allogeneic bone marrow transplantation with chemotherapy followed by G-CSF-primed donor leukocyte infusion: a prospective study. Bone Marrow Transplant. 2005; 36(2):163-9.
145. **Yan CH**, Liu DH, Liu KY. Risk stratification-directed donor lymphocyte infusion could reduce relapse of standard-risk acute leukemia patients after allogeneic stem cell transplantation. Blood 2012; 119:3256-3262
146. **Radish JP** and Slovak ML. The detection and significance of minimal residual disease. Thomas´ Haematopoietic Cell Transplantation. 4th Edition. 2009 Blackwell Publishing.
147. **van der Velden VHJ**, Jacobs DC, Wijkhuijs. Minimal residual disease levels in bone marrow and peripheral blood are comparable in children with T cell acute lymphoblastic leukaemia but not in precursor-B-ALL. Leukemia. 2002a; 16:1432-36.
148. **van der Velden V**, Cazzaniga G, Schrauder A, Hancock J, Bader P, Panzer-Grumayer ER, et al. Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR genes rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. Leukemia. 2007;21:604-611

ANEXOS

I. Tabla de pacientes

	RC	Tipo de donante	Fuente	EMR pre alo-TPH	EICH A/C	REC	Estado	Causa de éxitus	SG (m)	SLR (m)
1	RC2	DNE	MO	Positivo	IV/NA	No	Éxitus	EICH IV	3	3
2	RC2	HI	MO	Negativo	I/No	No	Vivo en RC	.	109	109
3	RC1	FI	SP	Negativo	No/NA	No	Éxitus	FMO	1	1
4	RC2	DNE	MO	Negativo	IV/NA	No	Éxitus	EICH IV	1	1
5	RC1	DNE	CU	Negativo	I/No	No	Vivo en RC	.	106	106
6	RC4	HI	MO	Negativo	II/No	No	Vivo en RC	.	106	106
7	RC1	DNE	CU	Negativo	II/No	No	Vivo en RC	.	103	103
8	RC1	FNI	SP	Positivo	No/No	Sí	Éxitus	Progresión	6	4
9	RC3	DNE	MO	Positivo	No/NA	No	Éxitus	IFI	3	3
10	RC1	DNE	MO	Negativo	II/No	No	Vivo en RC	.	95	95
11	RC2	FNI	SP	Negativo	III/NA	No	Éxitus	Neuropatía VRS	3	3
12	RC1	DNE	CU	Positivo	No/NA	Sí	Éxitus	Progresión	7	3
13	RC4	HI	CU	Negativo	No/No	No	Vivo en RC	.	92	92
14	RC2	DNE	CU	Negativo	I/No	Sí	Vivo en RC	.	84	10
15	RC2	DNE	MO	Positivo	II/No	No	Éxitus	Hepatopatía	13	13
16	RC1	DNE	CU	Positivo	II/No	Sí	Éxitus	Progresión	9	9
17	RC1	DNE	MO	Positivo	II/Sí, extenso	No	Vivo en RC	.	81	81
18	RC1	DNE	MO	Negativo	No/No	No	Vivo en RC	.	80	80
19	RC1	HI	MO	Negativo	II/Sí, extenso	No	Vivo en RC	.	80	80
20	RC2	HI	MO	Negativo	I/No	No	Vivo en RC	.	79	79
21	RC3	HI	MO	Positivo	I/No	No	Vivo en RC	.	79	79
22	RC2	DNE	MO	Negativo	I/No	No	Vivo en RC	.	78	78
23	RC1	DNE	CU	Negativo	II /No	No	Vivo en RC	.	76	76
24	RC2	DNE	CU	Negativo	II /No	No	Vivo en RC	.	74	74
25	RC2	DNE	CU	Negativo	No/No	Sí	Éxitus	IFI	27	25

26	RC1	DNE	CU	Negativo	No/No	No	Éxito	SLP VEB	5	5
27	RC2	DNE	CU	Negativo	I/No	No	Éxito	PTT	13	13
28	RC1	DNE	CU	Negativo	I/No	No	Éxito	Neumopatía CMV	7	7
29	RC2	HI	MO	Positivo	No/NA	Sí	Éxito	Progresión	6	2
30	RC2	DNE	SP	Negativo	I/No	No	Éxito	Progresión	18	17
31	RC2	DNE	CU	Positivo	III/NA	Sí	Éxito	Progresión	5	4
32	RC1	DNE	CU	Negativo	No/No	No	Vivo en RC		70	70
33	RC1	DNE	CU	Negativo	III/No	No	Éxito	PTT	14	14
34	RC3	DNE	CU	Negativo	III/NA	No	Éxito	Neumopatía	2	2
35	RC1	DNE	MO	Negativo	I/No	No	Éxito	Adenovirus	8	8
36	RC2	DNE	CU	Positivo	No/NA	No	Éxito	IFI	1	1
37	RC1	HI	MO	Positivo	II/Sí, extenso	No	Éxito	EICH crónica	27	27
38	RC2	DNE	CU	Positivo	II/NA	No	Éxito	Adenovirus	2	2
39	RC2	HI	MO	Negativo	III/No	No	Vivo en RC		63	63
40	RC1	DNE	CU	Negativo	II/No	No	Vivo en RC		63	63
41	RC2	DNE	MO	Negativo	I/No	Sí	Éxito	Progresión	4	3
42	RC1	DNE	CU	Negativo	III/No	No	Vivo en RC		57	57
43	RC2	FNI	SP	Negativo	III/Sí, limitado	No	Éxito	EICH crónica	18	18
44	RC1	DNE	CU	Positivo	III/No	No	Vivo en RC		55	55
45	RC1	HI	MO	Positivo	No/No	Sí	Éxito	Progresión	7	6
46	RC3	HI	MO	Positivo	No/No	Sí	Éxito	Progresión	7	5
47	RC2	DNE	CU	Positivo	I/No	No	Éxito	Neumopatía CMV	4	4
48	RC1	HI	MO	Negativo	I/No	Sí	Éxito	Sepsis	10	9
49	RC2	DNE	MO	Negativo	I/No	No	Vivo en RC		43	43
50	RC1	HI	MO	Negativo	IV/Sí, limitado	No	Vivo en RC		42	42
51	RC2	DNE	MO	Positivo	II/Sí, limitado	No	Vivo en RC		42	42
52	RC1	DNE	CU	Negativo	I/No	No	Vivo en RC		41	41
53	RC1	DNE	CU	Negativo	III/Sí, limitado	No	Vivo en RC		40	40
54	RC1	DNE	CU	Negativo	III/No	No	Éxito	Adenovirus	5	5

55	RC2	DNE	CU	Negativo	No/NA	No	Éxitus	Fallo Adenovirus	3	3
56	RC1	DNE	MO	Negativo	II/Sí, limitado	No	Vivo en RC		35	35
57	RC1	DNE	MO	Negativo	II/No	No	Vivo en RC		34	34
58	RC1	DNE	CU	Positivo	III/Sí, limitado	Sí	Vivo Recaída		34	34
59	RC2	DNE	CU	Negativo	I/NA	No	Éxitus	Adenovirus	3	3
60	RC2	DNE	MO	Negativo	II/No	No	Vivo en RC		30	30
61	RC2	DNE	CU	Negativo	III/Sí, limitado	No	Vivo en RC		29	29
62	RC1	DNE	CU	Positivo	III/Sí, limitado	No	Vivo en RC		28	28
63	RC2	FNI	CU	Negativo	III/No	No	Vivo en RC		27	27
64	RC1	DNE	CU	Negativo	II/Sí, limitado	No	Éxitus	Neuropatía CMV	10	10
65	RC2	HI	MO	Negativo	I/No	No	Vivo en RC		24	24
66	RC2	DNE	MO	Positivo	II/Sí, limitado	No	Éxitus	Progresión	6	5
67	RC1	DNE	SCU	Positivo	II/Sí, extenso	No	Vivo en RC		21	21
68	RC2	HI	SCU	Positivo	II/No	No	Vivo en RC		20	20
69	RC2	HI	MO	Negativo	IV/Sí, extenso	No	Vivo C		19	19
70	RC2	DNE	SCU	Negativo	I/No	No	Vivo en RC		17	17
71	RC1	DNE	SCU	Positivo	No/No	Sí	Éxitus	Progresión	5	4
72	RC2	DNE	SCU	Negativo	No/No	Sí			16	7
73	RC2	DNE	MO	Negativo	II/Sí, limitado	No			15	15
74	RC2	DNE	SCU	Negativo	III/Sí, limitado	No			15	15
75	RC1	DNE	SCU	Negativo	II/Sí, extenso	No	Éxitus	IFI	11	11
76	RC2	HI	MO	Negativo	II/Sí, limitado	Sí	Éxitus	Progresión	14	10
77	RC2	DNE	SCU	Negativo	II/Sí, limitado	No			14	14
78	RC1	DNE	SCU	Positivo	II/Sí, extenso	No	Éxitus	Neuropatía CMV	8	8
79	RC3	HAP	SP	Negativo	II/Sí, extenso	No	Éxitus	IFI	7	7
80	RC2	HI	SCU	Negativo	I/No	Sí	Éxitus	Progresión	4	3

II. Índice de figuras

INTRODUCCION

Figura I.1 Maduración y diferenciación de las células durante la hematopoyesis

Tabla I.2 Esquema de diferenciación de los linfocitos B

Tabla I.3 Esquema de diferenciación de los linfocitos T

Tabla I.4 Estudios de cohortes de niños con LLA que recibieron un alo-TPH en primera remisión

Tabla I.5 Estudios de cohortes de niños con LLA que recibieron un alo-TPH de hermano HLA-idéntico

Tabla I.6 Estudios de cohortes de niños con LLA que recibieron un alo-TPH de donante emparentado

Figura I.7 Nivel de detección de la EMR

Tabla I.8 Métodos de detección de EMR en LLA

PACIENTES Y METODOS

Tabla M.1 Panel de estudio de EMR mediante CFM

RESULTADOS

Gráfico R.1 Distribución por sexos

Gráfico R.2 Distribución de la edad en el momento de trasplante

Gráfico R.3 Fenotipo de la LLA de los pacientes

Gráfico R.4 Genes de fusión detectados en el grupo de pacientes

Gráfico R.5 Porcentaje de pacientes según estado de remisión pre alo-TPH

Gráfico R.6 Porcentaje de pacientes según su indicación para alo-TPH

Gráfico R.7 Porcentaje de pacientes según su donante

Gráfico R.8 Número de pacientes según la fuente recibida

Gráfico R.9 Porcentaje de pacientes que recibieron radioterapia como parte de su tratamiento de acondicionamiento

Tabla y gráficos R.10 Frecuencia de pacientes que presentaron EICH aguda y según su grado de intensidad

Tabla y gráfico R.11 Frecuencia de pacientes que presentaron EICH crónica y según extensión

Tabla y gráfico R.12 Porcentaje de recaída en la población a estudio

Tabla y gráfico R.13 Porcentaje de éxitos en la población a estudio

Gráfico R.14 Kaplan-Meier y media de supervivencia libre de recaída (SLR) en el grupo completo

Gráfico R.15 Kaplan-Meier de supervivencia libre de eventos (SLE) en el grupo completo

Gráfico R.16 Kaplan-Meier y media de supervivencia global (SG) en el grupo completo

Tabla R.17 Resumen de los pacientes recaídos y fallecidos respecto al grupo completo

Gráfico R.18 Kaplan-Meier de SLR de pacientes LLA-Phi comparado con en el grupo completo

Gráfico R.19 Kaplan-Meier de SG de pacientes LLA-Phi comparado con en el grupo completo

Gráfico R.20 Frecuencia de pacientes según la presencia de EMR pre-TPH

Gráfico R. 21 Media, mediana y Kaplan-Meier de SLR en el grupo EMR-positiva

Gráfico R. 22 Media, mediana y Kaplan-Meier de SLE en el grupo EMR-positiva

Gráfico R.23 Causas de éxitos en el grupo EMR-positiva

Gráfico R.24 Media y mediana y Kaplan-Meier de SG en el grupo EMR-positiva

Gráfico R. 25 Media de supervivencia SLR y Kaplan-Meier en el grupo EMR-negativa

Gráfico R. 26 Media de supervivencia SLE y Kaplan-Meier en el grupo EMR-negativa

Gráfico R.27 Causas de éxitos en el grupo EMR-negativa

Gráfico R. 28 Media de supervivencia (SG) y Kaplan-Meier en el grupo EMR-negativa

Tabla y gráfico R. 29 Media y mediana de tiempo y Kaplan-Meier de SLR según EMR pre-TPH

Tabla y gráfico R. 30 Media y mediana de tiempo y Kaplan-Meier de SG según EMR pre-TPH

Tabla R. 31 Resumen comparativo de los grupos según EMR y grupo completo.

Tablas R.32 Análisis bivariado del estado de EMR pre-TPH y recaída

Tablas R.33 Análisis bivariado y Kaplan-Meier de SLR según el uso de radioterapia en el acondicionamiento

Tablas y gráfico R.34 Análisis bivariado y Kaplan-Meier de la SLR según la presencia de EICH aguda

Tablas R.35 Análisis bivariado del estado de EMR pre-TPH y supervivencia

Tablas y gráfico R.36 Análisis bivariado y Kaplan-Meier de SG según la EICH aguda

Tabla R.37 Análisis bivariado de factores de riesgo de recaída y exitus postrasplante

Tabla y gráfico R.38 Análisis bivariado de uso de radioterapia estratificado por estado de EMR y la recaída

Tablas y gráfico R.39 Análisis bivariado de presencia de EICH aguda estratificada por estado de EMR y la recaída

Tablas y gráfico R.40 Análisis bivariado de presencia de EICH crónica estratificada por estado de EMR y la recaída

Tablas y gráfico R.41 Análisis bivariado de presencia de EICH aguda estratificada por estado de EMR y la mortalidad

Tabla R.42 Resumen de la evolución y seguimiento de los pacientes con EMR positiva mediante citometría de flujo postrasplante

Tabla R.43 Resumen de la evolución y seguimiento de los pacientes con quimerismo mixto postrasplante

Gráfico R.44 Kaplan-Meier supervivencia libre de recaída y supervivencia global. Comparación 2002-2007 y 2008-2012

DISCUSION

Tabla D.1 Grupos de estudio de EMR pretrasplante en niños con LLA

Tabla D.2 Grupos de estudio de EMR post-trasplante en pacientes con LLA.

Tabla D.3 Grupos de estudio de quimerismo post-trasplante en niños con LLA

Tabla D.4 Resumen de análisis bivariado de factores de riesgo de recaída y exitus postrasplante

III Artículo original