

## ENFERMEDAD RESIDUAL MEDIBLE MEDIANTE REORDENAMIENTOS DE INMUNOGLOBULINAS Y RECEPTORES DE LINFOCITOS-T

PATRICIA RUBIO<sup>1</sup>, CRISTINA N. ALONSO<sup>2</sup>, MARIA E. DUCATELLI<sup>1</sup>,  
JORGE ROSSI<sup>3</sup>, MYRIAM GUITTER<sup>4</sup>, MARIA S. FELICE<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Diagnóstico Molecular, Servicio de Hematología y Oncología, <sup>2</sup>Unidad de Genómica, <sup>3</sup>Laboratorio de Inmunología Celular, Servicio de Inmunología y Reumatología, <sup>4</sup>Servicio de Hematología y Oncología, Hospital de Pediatría Prof. Dr. Juan P Garrahan, Buenos Aires, Argentina

**Resumen** Las leucemias agudas constituyen la neoplasia más frecuente en pacientes pediátricos. Actualmente, el 80% de los niños con leucemia linfoblástica aguda (LLA) logran curarse con quimioterapia convencional pero el 20% de los mismos presentarán una reaparición de la enfermedad. La enfermedad residual medible (ERM) ha sido descrita como un importante factor pronóstico, que permite evaluar la respuesta de los pacientes al tratamiento. Una de las técnicas más sensibles para estudiar ERM es la cuantificación de reordenamientos génicos de inmunoglobulinas (Ig) y receptores de linfocitos-T (TCR). Los objetivos del presente trabajo fueron describir los reordenamientos detectados de Ig/TCR, evaluar el efecto de la ERM en la supervivencia de niños con LLA y comparar la ERM por Ig/TCR con la cuantificada mediante citometría de flujo multiparamétrica (CFM). Del total de 455 pacientes estudiados, en el 96% fue posible caracterizar al menos un reordenamiento de Ig/TCR. El total de reordenamientos clonales detectados fue de 1550. La ERM pudo ser estudiada en forma exitosa en el 89% de los casos. El valor de ERM positiva combinada al día 33 y 78 de tratamiento, permitió identificar pacientes de alto riesgo, entre los previamente estratificados por la ERM mediante CFM al día 15. La comparación entre la determinación de ERM mediante reordenamientos Ig/TCR y CFM mostró una excelente correlación. El presente trabajo constituye un estudio de ERM mediante Ig/TCR realizado en un número muy significativo de pacientes diagnosticados en forma consecutiva, tratados en el marco de un protocolo homogéneo y con excelente seguimiento clínico.

**Palabras clave:** reordenamientos de inmunoglobulinas, reordenamiento de receptores de linfocitos T, enfermedad residual medible, leucemia linfoblástica aguda

**Abstract** *Measurable residual disease by rearrangements of immunoglobulins and T-lymphocyte receptors.* Acute leukemias are the most common neoplasm in pediatric patients. Currently, 80% of children with diagnosis of acute lymphoblastic leukemia (ALL) are cured with conventional chemotherapy, but 20% of them will have a recurrence of the disease. Measurable Residual Disease (MRD) has been described as an important prognostic factor that allows evaluating the response of patients to treatment. One of the most sensitive techniques to study MRD is the quantification of immunoglobulins (Ig) and T-lymphocyte receptors (TCR) genes rearrangements. The aims of this study were to describe the detected Ig/TCR rearrangements, to evaluate the prognostic impact of MRD in our population of children with ALL and to compare the MRD values by Ig/TCR with those obtained by multiparametric flow cytometry (MFC). A total of 455 patients were studied. In 96% of the cases, it was possible to characterize at least one Ig/TCR rearrangement. The total number of Ig/TCR rearrangements detected was 1550. MRD was successfully applied in 89% of the cases. The combined positive MRD values at day 33 and 78 of treatment allow the identification of high-risk patients in cases previously stratified by MRD using flow cytometry at day 15. The comparison between MRD determination by Ig/TCR rearrangements and FC showed excellent correlation. The present work constitutes a study of MRD by Ig/TCR carried out in a very significant number of patients consecutively diagnosed, treated within a homogeneous protocol and with excellent clinical follow-up.

**Key words:** immunoglobulins rearrangements, T-lymphocyte receptors rearrangements, measurable residual disease, acute lymphoblastic leukemia

**PUNTOS CLAVE**  
**Conocimiento actual**

- Ha sido demostrado que la ERM es un poderoso factor pronóstico en LLA, importante para la toma de decisiones clínicas. Diferentes grupos de tratamiento han incorporado su valor para estratificar a los pacientes en grupos de riesgo. La cuantificación de los reordenamientos Ig/TCR es el método de referencia para tal fin.

**Contribución del artículo al conocimiento actual**

- Los resultados del presente trabajo demuestran que la determinación de ERM mediante reordenamientos de Ig/TCR puede ser aplicada, en forma confiable y robusta, en nuestro grupo de niños con LLA. Además, permite identificar grupos de pacientes con pronósticos diferentes, aun en aquellos previamente estratificados por CFM al día 15.

La leucemia aguda constituye la enfermedad hematológica más frecuente en la edad pediátrica<sup>1</sup>. En la actualidad, en nuestro país alrededor del 70-80% de los niños que padecen leucemia linfoblástica aguda (LLA) lograrán sobrevivir libres de enfermedad y desarrollar una vida absolutamente normal con mínimas o sin secuelas<sup>2-4</sup>. Sin embargo, a pesar de estas altas tasas de curación, alrededor del 20% de estos niños presentan el riesgo de desarrollar la reaparición o recidiva de la enfermedad<sup>5</sup>.

En los últimos años, se han centrado los esfuerzos en identificar factores pronósticos que permitan adaptar la intensidad del tratamiento quimioterápico de acuerdo con el riesgo individual de cada paciente. De esta manera, aquellos con mayor riesgo de presentar recaídas reciben un tratamiento más intenso, mientras que los de menor riesgo de recaer reciben un tratamiento de menor intensidad<sup>6</sup>. Los protocolos actuales estratifican a los pacientes en grupos de riesgo teniendo en cuenta diferentes parámetros al momento del diagnóstico, las características fenotípicas y genéticas de las células leucémicas y la respuesta al tratamiento.

Ha sido ampliamente demostrado que la enfermedad residual medible (ERM), anteriormente denominada enfermedad mínima residual, es uno de los factores pronósticos más importantes para la evaluación de la respuesta al tratamiento en LLA en niños<sup>6,7</sup>. Desde los años noventa, el grupo de estudio internacional multicéntrico BFM (Berlín-Frankfurt-Münster) demostró que determinar la presencia de niveles mínimos de células leucémicas remanentes en dos momentos de tratamiento definidos, en el día 33 (fin de la fase de inducción) y día 78 (previo al inicio de la fase de consolidación), es útil para identificar grupos de pacientes con pronósticos diferentes<sup>8,9</sup>.

Actualmente, en la mayoría de los protocolos internacionales para LLA pediátrica, especialmente en los grupos europeos, se utiliza la determinación molecular de la ERM mediante PCR en tiempo real, utilizando como

blanco de detección a los reordenamientos de los genes de inmunoglobulinas (Ig) y receptores de células T (TCR). La región variable de las Ig y los TCR está codificada por los segmentos génicos V (Variable), D (Diversidad) y J (*Joining*, unión) que se reordenan al azar durante la ontogenia linfocitaria. Dichos reordenamientos Ig/TCR son considerados excelentes marcadores moleculares del clon leucémico que los origina, permitiendo su utilización como blanco de seguimiento durante el tratamiento de los pacientes con LLA<sup>10</sup>.

Los objetivos del presente trabajo son describir los reordenamientos de Ig/TCR caracterizados en la población de estudio, evaluar el efecto de la determinación de ERM mediante Ig/TCR en la supervivencia de los pacientes previamente estratificados de acuerdo con los criterios del protocolo ALLIC-BFM 2009/HPG y comparar los valores de ERM obtenidos mediante Ig/TCR y citometría de flujo multiparamétrica (CFM).

## Materiales y métodos

Se trata de un estudio retrospectivo, observacional no aleatorizado. La población de estudio estuvo constituida por niños con diagnóstico de LLA que ingresaron a los centros participantes de la Sociedad Argentina de Hemato-Oncología Pediátrica (SAHOP), incluidos en el Protocolo de Tratamiento ALLIC-BFM 2009/HPG (Los resultados del protocolo ALLIC-BFM 2009/HPG no han sido publicados aún). Los centros participantes de SAHOP fueron: Hospital de Pediatría Garrahan, Hospital de Niños de San Isidro, Hospital Nacional de Clínicas, Hospital del Niño Jesús de Tucumán, Hospital Eva Perón de Catamarca, Hospital Juan Pablo II de Corrientes y Hospital Avelino Castellán de Chaco.

Un total de 455 casos con LLA, diagnosticados entre octubre de 2009 y febrero de 2016 fueron incluidos en el presente estudio, de los cuales se recolectaron 763 muestras de seguimiento entre octubre de 2009 y enero de 2019. Del total de muestras de seguimiento que pudieron ser cuantificadas, 379 correspondieron al día 33 y 384 del día 78 de tratamiento. No fueron procesadas 27 muestras del día 33 y 7 muestras del día 78 por ser insuficientes o no evaluables. Además, no se evaluaron por no haber sido remitidas a nuestra institución 1 muestra del día 33 y 16 del día 78.

Fueron ingresados todos los pacientes que reunieron los criterios diagnósticos de LLA, menores de 17 años, que tuvieron estudios diagnósticos completos: morfológicos, de citometría de flujo, moleculares y citogenéticos, y en los cuales fue posible la obtención de ADN para la determinación del perfil de reordenamientos de Ig/TCR. Se excluyeron del estudio los que habían recibido algún tipo de tratamiento quimioterápico previo al diagnóstico de LLA, los enfermos con enfermedades subyacentes causantes de comorbilidades (síndrome de Down, inmunodeficiencias, síndromes de fragilidad cromosómica, HIV+), los niños menores de 1 año de edad al momento del diagnóstico y los que no contaban con muestras de seguimiento disponibles.

Los estudios moleculares se realizaron al momento del diagnóstico para la caracterización de los reordenamientos Ig/TCR, a fin de detectar aquellas recombinaciones clonales que pudieran ser utilizadas para el diseño de por lo menos un primer paciente específico (PPE) para la cuantificación de la ERM; en el seguimiento, se realizó la cuantificación de la ERM en la muestra de médula ósea del día 33 del Protocolo

I (fase de inducción) y en médula ósea del día 78 (previo a la consolidación). El protocolo ALLIC-BFM 2009/HPG estratifica los pacientes teniendo en cuenta el valor de la ERM mediante CFM al día 15 de tratamiento, por lo tanto, el análisis de la ERM en el día 33 y día 78 no fueron utilizados para definir grupos de riesgo en dicho protocolo.

Las determinaciones se realizaron a partir de células mononucleares obtenidas por centrifugación con gradiente de densidad de muestras de médula ósea preservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

La caracterización de los reordenamientos de Ig/TCR fue realizada a partir de ADN total correspondiente a  $10^7$  células mononucleares, que fue purificado utilizando *kit* de extracción de ADN QIAamp DNA Mini Kit (*Qiagen*, Alemania). Para comprobar la integridad de las muestras y la ausencia de posibles inhibidores de reacción se realizó la cuantificación del gen control *Albumina*.

La búsqueda de reordenamientos completos e incompletos de *IGH*, *IGK*, *TCRB*, *TCRG* y *TCRD* fue realizada mediante PCR multiplex y secuenciación utilizando el equipo ABI 3130 y ABI 3500 (*Applied Biosystems*, USA)<sup>11</sup>. A partir de las recombinaciones clonales detectadas, se diseñaron los PPE de acuerdo con criterios estandarizados por el grupo EuroMRD<sup>12</sup>. La cuantificación fue realizada a través de PCR en tiempo real, con un equipo CFX-96 (BioRad, USA), utilizando el PPE diseñado junto con *primers* y sondas del tipo TaqMan que reconocen zonas consenso, previamente establecidas y estandarizadas por el grupo Biomed<sup>11</sup>. La validación de los ensayos, la determinación de rango cuantitativo y sensibilidad, así como la expresión de los resultados siguieron las recomendaciones y procedimientos estandarizados de la ESLHO (*European Scientific foundation for Laboratory Hemato Oncology*)<sup>12</sup>.

En cuanto a la ERM mediante CFM, el análisis de los marcadores fue realizado sobre alícuotas del aspirado de médula ósea, siguiendo estrictamente las pautas de estandarización y calidad establecidas en el protocolo ALLIC-BFM 2009. Las células fueron adquiridas y analizadas en un Citómetro de Flujo FACSCanto II (*Becton-Dickinson*, USA), adquiriendo al menos 300.000 eventos syto16 (+) (*Thermo Fisher Scientific*, USA) por tubo. Fue requerido que la población identificada como ERM (cluster) contuviera al menos 30 células o eventos, a fin de alcanzar una sensibilidad de  $1 \times 10^{-4}$ . Los anticuerpos utilizados fueron anti CD1a, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD10, CD19, CD20, CD34, CD38, CD45, CD58, CD99 y CD3 citoplasmático, TdT.

Fue posible realizar la cuantificación de ERM por ambos métodos en un total de 314 muestras del día 33 y 352 del día 78. En un total de 66 casos (Día 33: 40 y Día 78: 26) no fue posible estudiar la ERM por CFM por tratarse de muestras no evaluables por esta metodología (presencia de al menos 2% de eritroblastos en las muestras).

Los consentimientos informados de los pacientes fueron obtenidos siguiendo los lineamientos éticos señalados en la declaración de Helsinki. Los investigadores se adhieren a los principios bioéticos y son responsables de toda la información obtenida.

Los datos descriptivos fueron expresados como promedio o mediana y rango. Para el análisis de la evaluación de respuesta al tratamiento, análisis de eventos y supervivencia, se definieron como eventos adversos: respuesta nula, muerte durante la fase de inducción, recaída de la enfermedad, muerte en remisión completa y ocurrencia de una segunda enfermedad maligna. La probabilidad de supervivencia libre de eventos (pSLE) fue definida como el tiempo transcurrido desde la fecha del diagnóstico hasta la fecha del último control, o hasta la ocurrencia del primer evento adverso, y la

probabilidad de supervivencia global (pSG), como el tiempo transcurrido desde la fecha del diagnóstico hasta la fecha del último control, o hasta la muerte por cualquier causa. La pSLE y la pSG fueron estimadas utilizando el *software* Statistix, a través del análisis de Kaplan-Meier y calculando el error estándar (EE) por el método de Peto. Las curvas de supervivencia fueron comparadas a través del test de Log-Rank<sup>13,14</sup>.

Para la comparación de la ERM estimada mediante los dos métodos se evaluó la correlación bivariada de Pearson y, para el análisis de concordancia, el coeficiente Kappa de Cohen mediante el programa R versión 1.2.1335<sup>15-17</sup>.

## Resultados

Las características clínicas, de laboratorio, de inmunofenotipo y alteraciones genéticas de los 455 pacientes al momento del diagnóstico se muestran en la Tabla 1.

TABLA 1.— Características clínicas, de laboratorio, inmunofenotipo y alteraciones genéticas de los pacientes estudiados para enfermedad residual medible

	Población Total
Pacientes (n)	455
Sexo (M:F)	264:191
Edad (años)	
Promedio	7.0
Mediana	6.1
Rango	1.1-16.8
Recuento Leucocitario (x10 <sup>9</sup> /l)	
Promedio	64,3
Mediana	13.4
Rango	0.7-720.0
Promedio Hemoglobina (g/dl)	8,1
Promedio Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /l)	85.1
Inmunofenotipo (n)	
LLA Pro B	12
LLA Común	249
LLA Pre B	115
LLA B madura	1
LLA B no determinada	3
LLA T	68
LALA	7
Alteraciones Genéticas Recurrentes (n)	
t(1;19)(q23;p13), <i>TCF3-PBX1</i>	26
t(9;22)(q34;q11), <i>BCR-ABL1</i>	16
t(12;21)(p13;q22), <i>ETV6-RUNX1</i>	61
11q23, <i>KMT2A</i> rearrreglado	8
Hiper > 50 crom.	93
Hipo < 45 crom.	2
Normal	75
Otras Alteraciones	174

Con respecto a la caracterización de reordenamientos de Ig/TCR, en el 96% (n = 435) de los casos, se identificaron uno o más recombinaciones clonales de Ig/TCR. El número de reordenamientos detectados por paciente varió de 0 a 12, con una media de 3 por caso. En total, fueron secuenciados 1550 reordenamientos de Ig/TCR, de los cuales, 692 correspondieron a inmunoglobulinas y de ellos, 406 fueron recombinaciones de cadenas pesadas y 286 de cadenas livianas *kappa*. En cuanto a los receptores de linfocitos T, se caracterizaron en total 858 reordenamientos, de los cuales 122 correspondieron a TCRB, 339 recombinaciones TCRG y 397 a TCRD. En los pacientes con fenotipo LLA precursor B, se observaron reordenamientos de cadenas IGH en el 85% de los casos, el 36% presentó reordenamientos IGK, el 16% TCRB, 48% TCRG y 62% TCRD. En los casos de LLA precursor T, se observaron recombinaciones en cadenas TCRB en el 57%, 72% en TCRG, y 40% en TCRD, mientras que en IGH en 4% e IGK en 3%.

A partir de los 435 casos que presentaban recombinaciones génicas Ig/TCR, fue posible diseñar PPE en 421 casos, ya que en los 14 restantes las secuencias del segmento V-(D)-J de los reordenamientos caracterizados no permitían el diseño de PPE por no cumplir con los criterios definidos para asegurar la especificidad requerida.

En total, fueron diseñados 675 PPE correspondientes a 421 pacientes, con una media de PPE por paciente de 2, con un rango de 1 a 3. El 45% de los PPE fueron específicos para secuencias de reordenamientos IGH, 12% para recombinaciones IGK (56% IGKde), 7% TCRB, 15% TCRG y 21% TCRD. Del total de 34 PPE *reverse* diseñados, 32 (94%) fueron para secuencias TCRD y los 2 restantes para reordenamientos IGK.

La mediana de sensibilidad de los PPE utilizados para ERM fue de  $1 \times 10^{-5}$ . La mediana de rango cuantitativo de los ensayos fue de  $1 \times 10^{-4}$ , en un rango de  $1 \times 10^{-3}$  y  $1 \times 10^{-5}$ .

En cuanto al análisis de la ERM mediante Ig/TCR, de los 421 pacientes en los cuales fue posible diseñar PPE, el seguimiento pudo ser cuantificado exitosamente en 407 pacientes con LLA (89%), de los que 345 fueron LLA precursor B, 56 casos LLA precursor T y 6 leucemias agudas de linaje ambiguo (LALA). Los 14 casos restantes excluidos correspondieron a pacientes con un PPE único que presentaron una sensibilidad menor a  $1 \times 10^{-4}$ .

De los de 407 pacientes estudiados, 39 correspondían al grupo de riesgo estándar, 267 al riesgo intermedio y 101 al grupo de alto riesgo, de acuerdo con la estratificación del protocolo ALLIC-BFM 2009/HPG.

En total, se cuantificaron 763 muestras de seguimiento, correspondiendo a 379 muestras al día 33 y 384 muestras al día 78 del tratamiento. La ERM mediante Ig/TCR fue evaluada en ambos momentos de seguimiento, día 33 y 78, en 356 pacientes. La mediana de seguimiento fue de 54 meses, en un rango de 1 a 104 meses. La mediana de ERM del total de muestras analizadas en el día 33 fue

de  $1 \times 10^{-6}$ , mientras que en el día 78 fue de  $1 \times 10^{-8}$ . En cuanto a las muestras positivas cuantificables, la mediana de ERM positiva al día 33 fue de  $2.1 \times 10^{-3}$ , mientras que al día 78 fue de  $8.9 \times 10^{-4}$ .

En la Tabla 2 se muestran los parámetros de respuesta al tratamiento y la descripción de los eventos presentados en los niños estudiados.

Con el objetivo de evaluar el valor pronóstico de la ERM mediante Ig/TCR, se realizaron curvas de pSLE de los pacientes estudiados de acuerdo con el valor de ERM al día 33 y 78 de tratamiento, definiendo como valor de corte de positividad: 0.01% (Figs. 1A, 1B).

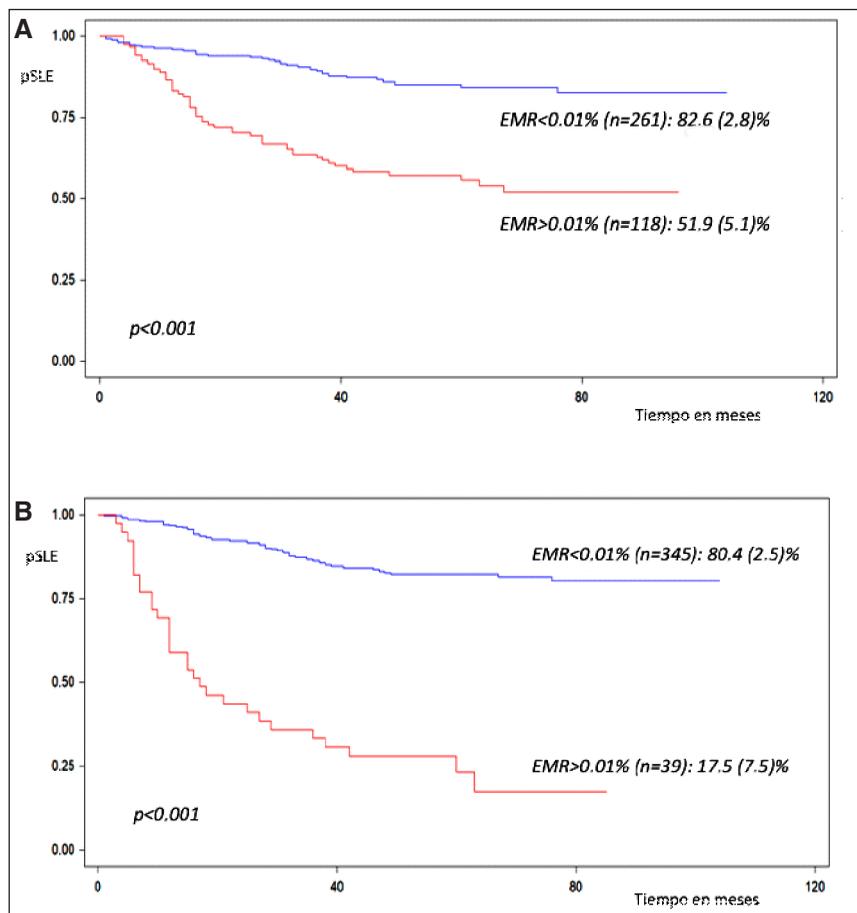
Adicionalmente, los 356 pacientes con ERM analizada al día 33 y 78 fueron clasificados en 3 tipos de respuesta definidos de acuerdo con los resultados de ERM: Respuesta tipo 1: los que presentaron ERM negativa en ambos momentos de seguimiento; Respuesta tipo 2: los que mostraron uno de los dos momentos de seguimiento con valor de ERM positiva; y Respuesta tipo 3: los que tuvieron ERM positiva en ambos momentos de seguimiento. El análisis fue realizado utilizando como valor de corte de positividad: 0.01%. En el grupo de riesgo estándar (n=36), 34 pacientes pertenecieron al grupo 1, con una pSLE(EE) de 93.8(4.2)%, y 2 pacientes se asignaron al grupo 2, los cuales permanecieron en remisión completa (RC), es decir con una pSLE(EE) de 100(0)% (gráfico de pSLE no mostradas por el bajo número de pacientes en el grupo 2 y ausencia de grupo 3). En el grupo de riesgo intermedio (n = 231) y alto (n = 89), las curvas de pSLE(EE) para el valor de corte de 0.01% se muestra en la Figuras 2A y 2B.

TABLA 2.– Parámetros de respuesta al tratamiento y eventos presentados en los 407 pacientes estudiados

	Total
Número de casos	407
Día 8 (% BRP)	86
Día 33 (% RC)	99
Respuesta nula (%)	0.7
Muertes	
En inducción (%)	0
En RC (%)	4
Recaídas	
Médula ósea	54
Combinada	9
Otras	16
Totales	79
pSLE (EE) %	72.5 (2.5)
pSG (EE) %	72.9 (4.3)

D8 BRP: buena respuesta a la prednisona en el día 8 del tratamiento; RC: remisión completa; Combinada: recaída en médula ósea junto con otro sitio; Otros: recaídas en otros sitios sin involucrar médula ósea; pSLE: probabilidad de supervivencia libre de eventos; pSG: probabilidad de supervivencia global; EE: error estándar

Fig. 1.– A: Probabilidad de supervivencia libre de eventos de los 379 pacientes de acuerdo con la enfermedad residual medible al día 33. B: Probabilidad de supervivencia libre de eventos de los 384 pacientes de acuerdo con la enfermedad residual medible al día 78. Los valores indican porcentaje de probabilidad de supervivencia libre de eventos y el error estándar se indica entre paréntesis. Los resultados fueron analizados para un valor de corte 0.01%



Como se puede observar en la Figura 2, tanto en los pacientes de riesgo intermedio como en el alto riesgo, las pSLE de los 3 tipos de respuesta fueron significativamente diferentes ( $p < 0.001$ ).

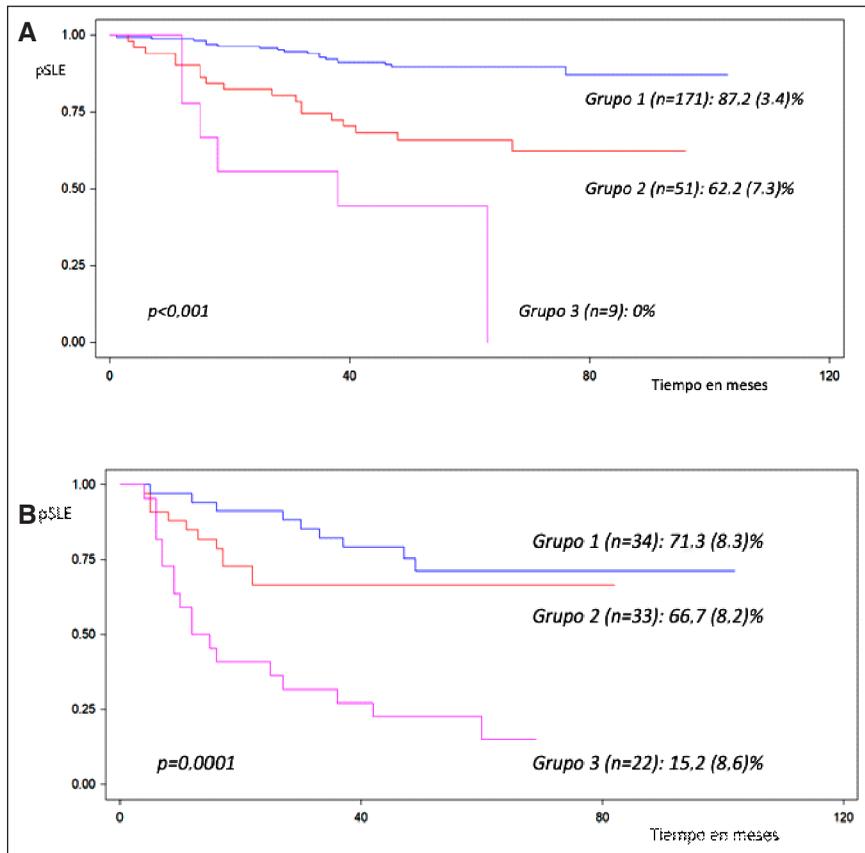
Además, fue realizada la comparación entre los valores de ERM obtenidos mediante los reordenamientos de Ig/TCR y CFM en el total de 407 pacientes. La mediana de sensibilidad obtenida mediante Ig/TCR fue de  $1 \times 10^{-5}$  (equivalente a 0.001%), mientras que para CFM fue de 0.002%.

Del análisis comparativo de las 314 muestras analizadas por ambas técnicas al día 33 se obtuvo un coeficiente de correlación de Pearson de 0.89 ( $p < 0.00001$ ), mientras que el coeficiente Kappa de Cohen fue de 0.702 ( $p < 0.00001$ ). Del total de muestras analizadas, 245 (78%) fueron negativas y 43 (14%) muestras fueron positivas por ambos métodos. Se observaron discordan-

cias en 26 muestras de seguimiento (8%), de las cuales 7 fueron positivas sólo por CFM, con una mediana de ERM de 0.2 (rango: 0.1-6.8%); mientras que los 19 restantes, fueron positivas sólo por Ig/TCR con una mediana de ERM de 0.2 (rango: 0.1-8.2%). En los 7 pacientes que presentaron ERM positiva sólo por CFM, los valores de ERM detectados al día 78 fueron negativos por ambos métodos. De ellos, 1 paciente murió en RC y 1 presentó recaída en médula ósea. En cuanto a los casos con ERM positiva sólo por Ig/TCR, 7 pacientes recayeron, incluyendo 1 caso en el cual fue cuantificada ERM positiva al día 78 mediante Ig/TCR pero no por CFM.

Con respecto al día 78, el coeficiente de correlación de Pearson obtenido para las 352 muestras analizadas por ambas técnicas fue de 0.63 ( $p < 0.00001$ ), y un coeficiente Kappa de Cohen de 0.607 ( $p < 0.00001$ ). Se observaron resultados concordantes en el 97% de los casos, inclu-

Fig. 2.— A: Probabilidad de supervivencia libre de eventos de los 231 pacientes de riesgo intermedio de acuerdo con los tres tipos de respuesta definidos según el valor de enfermedad residual medible. B: Probabilidad de supervivencia libre de eventos de los 89 pacientes de riesgo alto de acuerdo los tres tipos de respuesta definidos según el valor de enfermedad residual medible. Los valores indican porcentaje de probabilidad de supervivencia libre de eventos y el Error Estándar se indica entre paréntesis. Los resultados fueron analizados para un valor de corte 0.01%



yendo 330 (94%) muestras negativas por ambos métodos y 10 (3%) muestras positivas por ambos métodos. Se observaron discordancias en 12 muestras de seguimiento (3%), de las cuales 5 resultaron positivas sólo por CFM, con una mediana de ERM de 0.3 (rango: 0.1-2.9)%; mientras que los 7 restantes fueron positivas sólo por Ig/TCR con una mediana de ERM de 0.2 (rango: 0.1-1.6)%. Con respecto a los pacientes con ERM positiva sólo por CFM, 3 de ellos presentaron recaída; mientras que, en el grupo de pacientes con ERM positiva sólo por Ig/TCR, 2 murieron en RC y 2 recayeron de la enfermedad.

## Discusión

En el presente trabajo fue evaluada la aplicabilidad de la utilización de los reordenamientos de Ig/TCR para la

determinación de la ERM como marcador pronóstico en un grupo de 455 niños con diagnóstico de LLA que ingresaron a los centros participantes de la SAHOP.

En total, fueron caracterizadas recombinaciones génicas de Ig/TCR en el 96% de los casos estudiados, logrando identificar un total de 1550 reordenamientos. La ERM fue cuantificada en forma exitosa en el 89% de los casos.

Con respecto a la caracterización de las recombinaciones génicas de Ig/TCR, la distribución encontrada de reordenamientos en función al inmunofenotipo fue similar a los resultados publicados por series internacionales<sup>18-22</sup>. La presencia de reordenamientos de TCR en linfoblastos de fenotipo B y, a la inversa, reordenamientos de inmunoglobulinas en blastos de fenotipo T hace referencia al fenómeno de reordenamientos de linaje cruzado, el cual

puede producirse por aberrante actividad de las recombinasas, RAG1 y RAG2, involucradas en el proceso de recombinación V-(D)-J, en las células transformadas<sup>23</sup>.

En cuanto al diseño de los PPE, la selección de los *targets* para ERM fue realizada en base a la estabilidad clonal conocida para los distintos reordenamientos y a la sensibilidad teórica esperada considerando la complejidad y composición de la región V-(D)-J<sup>11, 12</sup>.

Cuando se analizó específicamente el efecto de la ERM en la supervivencia de nuestros pacientes, se pudo observar que el valor de la ERM en el día 33 de tratamiento, y en el día 78, permitiría clasificar a los enfermos en diferentes grupos pronósticos. De esta manera, con un valor de corte de positividad de 0.01% se podrían identificar a aquellos con una menor o mayor probabilidad de presentar recaída de su LLA.

Cabe destacar que los resultados de estudios de ERM realizados por el grupo de estudio internacional BFM han demostrado que la determinación de ERM en solo uno de los momentos de tratamiento no es suficiente para detectar a los pacientes con pronóstico adverso. En cambio, la información combinada sobre la ERM en ambos momentos de tratamiento es claramente informativa sobre la probabilidad de recaída.

Como se puede observar en nuestros resultados, la información combinada de la ERM al día 33 y 78 distingue claramente a grupos de enfermos con diferente pronóstico, tanto dentro del grupo de riesgo intermedio como en los de riesgo alto. Los pacientes con negatividad de ERM en ambos puntos de tratamiento presentan pSLE significativamente mejores que aquellos con ERM positiva en ambos momentos. Es decir que la persistencia de niveles detectables de ERM durante el tratamiento se asocia con una mayor probabilidad de presentar una recaída clínica.

Es probablemente en el grupo de pacientes de riesgo intermedio donde el valor de la ERM tendría su mayor efecto. En este grupo de riesgo, la estratificación basada en ERM permitiría identificar casos con pronóstico más adverso, los cuales se beneficiarían con una mayor intensidad de tratamiento quimioterápico o un trasplante de células precursoras hematopoyéticas (HSCT) durante la primera remisión. Del mismo modo, en el grupo de alto riesgo, se detectan aquellos con una muy alta probabilidad de recaída, justificando la necesidad de indicar HSCT.

Es importante remarcar que los resultados del presente estudio demuestran que la determinación de la ERM en los días 33 y 78, en pacientes previamente clasificados por ERM mediante CFM en el día 15, puede proporcionar información adicional para optimizar la estratificación en grupos de riesgo.

Al analizar las fortalezas y limitaciones de la aplicación de los estudios moleculares mediante Ig/TCR para la determinación de ERM se puede definir que las mayores fortalezas son su amplia aplicabilidad clínica y su alto efecto pronóstico, así como la robustez técnica que

redunda en una altísima reproducibilidad y objetividad analíticas. Mientras que dentro de las limitaciones se encuentran: 1) las técnicas: cantidad y calidad del ADN utilizado, la limitación en la posibilidad de detección de los reordenamientos de Ig/TCR determinado por el grupo de oligonucleótidos seleccionados para las PCR multiplex; y 2) las biológicas: la presencia de oligoclonalidad y evolución clonal que resulte en pérdida del *target*, la baja incidencia de rearrreglos clonales encontradas en algunos fenotipos o grupos etarios.

Con el surgimiento de la secuenciación de nueva generación (*Next Generation Sequencing* – NGS) en el campo de la inmunogenética, se ha logrado obtener mayor información sobre la diversidad del repertorio de Ig/TCR linfocitario, permitiendo su aplicación en el estudio de evaluación de clonalidad, estudio de ERM y análisis de repertorio. La mejor resolución lograda por NGS permitirá detectar con mayor profundidad los perfiles de reordenamientos de Ig/TCR presentes en las muestras de los pacientes, y así poder evaluar la aparición de cualquier recombinación clonal dominante, lo cual contribuirá a lograr una mayor precisión en los estudios clonalidad y permitirá alcanzar una mayor sensibilidad analítica en los estudios de ERM<sup>24-26</sup>.

En el presente trabajo se muestra, además, la comparación de valores de ERM mediante dos metodologías, reordenamientos Ig/TCR y CFM, en un grupo extenso de pacientes (n = 407).

Los resultados demostraron que ambos métodos fueron altamente concordantes, presentando valores coincidentes en el 94% del total de las muestras procesadas. La concordancia observada al día 33 fue del 92%, mientras que al día 78 fue de 97%. Similares resultados de correlación han sido descritos por otros grupos de trabajo, a pesar de tratarse, en algunos casos, de publicaciones con un menor número de pacientes y utilización de células mononucleares aisladas para la determinación de la ERM por CFM<sup>27-31</sup>. Los hallazgos de ERM presentaron discrepancias en 26 (8%) de las 314 muestras estudiadas al día 33, y en sólo 12 (3%) de los 352 casos estudiados al día 78 de tratamiento, con un nivel de positividad mayor o igual a 0.1%. Cuando se analizaron con mayor detalle la magnitud de las discordancias, se pudo observar que los valores de ERM más dispares se encontraron en 4 muestras del día 33, las cuales mostraron valores de ERM de entre 6.4% y 8.2%. En un caso, se trataba de una muestra positiva sólo por CFM, mientras que las tres restantes fueron positivas sólo por reordenamientos Ig/TCR. Los cuatro casos presentaron ERM negativas en el día 78, por ambos métodos. En el total de 12 muestras en las que se obtuvieron valores de ERM positivas por CFM, pero negativas por rearrreglos Ig/TCR, al día 33 y el día 78 de tratamiento, las discrepancias probablemente se debieron a procesos de evolución clonal o presencia de subclones, aunque esto no pudo ser demostrado. Mientras que, en

los 26 casos con ERM positivas sólo por rearrreglos Ig/TCR, en ambos momentos de tratamiento, las diferencias encontradas posiblemente se deban a la mayor sensibilidad alcanzada por los métodos moleculares.

Nuestros resultados muestran una excelente concordancia, corroborando la confiabilidad de la utilización de la CFM en la determinación de la ERM en momentos de tratamiento donde hay signos de regeneración medular.

El método a elección a ser utilizado dependerá de la experiencia, los recursos (humanos y económicos) y el diseño del ensayo clínico establecido en cada centro.

Las ventajas de la utilización de la CFM para la determinación de la ERM radican en su amplia aplicabilidad, la rapidez de obtención de resultados, la amplia disponibilidad de equipos en el país y la capacidad de evaluar la celularidad global de la muestra de médula ósea. Mientras que en la cuantificación de los rearrreglos de Ig/TCR mediante PCR en tiempo real, se destaca su amplia aplicabilidad, objetividad analítica y fundamentalmente la alta sensibilidad lograda.

En conclusión, los resultados que forman parte del presente trabajo son los primeros obtenidos en nuestro país sobre la cuantificación de los reordenamientos génicos de Ig/TCR para la determinación de la ERM en LLA en niños. El estudio ha sido realizado en un número muy significativo de pacientes diagnosticados en forma consecutiva, tratados en el marco de un protocolo homogéneo y con excelente seguimiento clínico.

**Agradecimientos:** Agradecemos a los doctores: María Angélica Fernández Barbieri del Hospital de Niños de San Isidro, Ezequiel Recondo de Hospital Nacional de Clínicas de CABA, Patricia Luna de Hospital del Niño Jesús de Tucumán, María Soledad Vides Herrera de Hospital Eva Perón de Catarmarca, Cristina Cabral de Hospital Juan Pablo II de Corrientes, Vanina Livio de Hospital Avelino Castelnán de Chaco, por sus importantes aportes.

**Conflictos de intereses:** Ninguno para declarar

## Bibliografía

- Moreno F. Registro Oncopediátrico Hospitalario Argentino: incidencia 2000-2016. Sobrevida a 5 años 2005-2011. Tendencia de Supervivencia secular: 2000-04, 2005-09 y 2010-14. 6ta ed.- Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Instituto Nacional del Cáncer, 2018. En: <https://bancos.salud.gob.ar/recurso/registro-oncopediatico-argentino-resultados-2000-2016>; consultado septiembre 2020.
- Sackmann-Muriel, Felice MS, Zubizarreta P, et al. Improved outcome in higher-risk acute lymphoblastic leukaemia with a hybrid (Berlin-Frankfurt-Münster/St Jude's) therapy. *Int J Pediatr Hematol Oncol* 1996; 3: 439.
- Sackmann-Muriel F, Felice MS, Zubizarreta PA, et al. Treatment results in childhood acute lymphoblastic leukemia with a modified ALL-BFM'90 protocol: lack of improvement in high-risk group. *Leukemia Research* 1999; 23: 331-40.
- Garay G, Aversa L, Svarch E, et al. Progress in the treatment of acute lymphoid leukemia in children. Experience of the GATLA/GLATHEM, 1967-1987. *Sangre (Barc)* 1989; 34: 136-43.
- Felice M S, Rossi J, Gallego M S, et al. Evolución en el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda en el Hospital de Pediatría Prof. Dr. Juan P. Garrahan. *Medicina Infantil* 2007; 14: 92-100.
- Flohr T, Schrauder A, Cazzaniga G, 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: 771-82.
- Pui CH, Yang JJ, Hunger SP, Pieters R, et al. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Progress Through Collaboration. *J Clin Oncol* 2015; 33: 2938-48.
- van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grümayer ER, et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet* 1998; 352:1731-8.
- Flohr T, Schrauder A, Cazzaniga G, 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: 771-82.
- van der Velden VHJ, Hochhaus A, Cazzaniga G, et al. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* 2003; 17: 1013-34.
- van Dongen JJ, Langerak AW, Brüggemann M, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2003; 17: 2257-217.
- van Dongen JJ, Langerak AW, Brüggemann M, et al. Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia* 2007; 21: 604-11.
- Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *Journal of American Statistics Association* 1958; 53: 457-81.
- Peto R, Pike MC, Armitage P, et al. Design and analysis of randomized clinical trials requiring prolonged observation on each patient. II. Analysis and examples. *Br J Cancer* 1977; 35: 1-39.
- Hanneman SK. Design, analysis, and interpretation of method-comparison studies. *AACN Advanced Critical Care* 2008; 19: 223-34.
- Kaur P, Stoltzfus J. Bland-Altman plot: A brief overview. *Int J Acad Med* 2017; 3: 110-11.
- Twomey PJ. How to use difference plots in quantitative method comparison studies. *Annals Clinical Biochem* 2006; 43: 124-9.
- Sazawal S, Bhatia K, Gurbuxani S, et al. Pattern of immunoglobulin (Ig) and T cell receptor (TCR) gene rearrangements in childhood acute lymphoblastic leukemia in India. *Leuk Res* 2000; 24: 575-82.
- Barriga FJ, Risueño C, Patillo JC, et al. Analysis of the complementary determining region III of the immunoglobulin heavy chain locus in acute lymphoblastic leukemia in Chilean children. *Leukemia* 1996; 10: 1719-23.
- Dawidowska M, Derwich K, Szczepański T, et al. Pattern of immunoglobulin and T-cell receptor (Ig/TCR) gene rearrangements in Polish pediatric acute lymphoblastic leukemia patients-implications for RQ-PCR-based assessment of minimal residual disease. *Leuk Res* 2006; 30: 1119-25.

21. Thörn I, Forestier E, Thuresson B, et al. Applicability of IG/TCR gene rearrangements as targets for minimal residual disease assessment in a population-based cohort of Swedish childhood acute lymphoblastic leukaemia diagnosed 2002-2006. *Eur J Haematol* 2010; 84: 117-27.
22. Scrideli CA, Queiróz RG, Kashima S, et al. T cell receptor gamma (TCRG) gene rearrangements in Brazilian children with acute lymphoblastic leukemia: analysis and implications for the study of minimal residual disease. *Leuk Res* 2004; 28: 267-73.
23. Szczepanski T, Beishuizen A, Pongers-Willems MJ, et al. Cross-lineage T cell receptor gene rearrangements occur in more than ninety percent of childhood precursor-B acute lymphoblastic leukemias: alternative PCR targets for detection of minimal residual disease. *Leukemia* 1999; 13: 196-205.
24. Langerak AW, Brüggemann M, Davi F, et al. High-Throughput Immunogenetics for Clinical and Research Applications in Immunohematology: Potential and Challenges. *J Immunol* 2017; 198: 3765-74.
25. Armand M, Derrieux C, Beldjord K, et al. A New and Simple TRG Multiplex PCR Assay for Assessment of T-cell Clonality: A Comparative Study from the EuroClonality Consortium. *Hemasphere* 2019; 4; 3: e255.
26. Bystry V, Reigl T, Krejci A, et al. ARResT/Interrogate: an interactive immunoprofiler for IG/TR NGS data; also on behalf of the EuroClonality-NGS consortium. *Bioinformatics* 2017; 33 :435-7.
27. Kerst G, Kreyenberg H, Roth C, et al. Concurrent detection of minimal residual disease (MRD) in childhood acute lymphoblastic leukaemia by flow cytometry and real-time PCR. *Br J Haematol* 2005; 128: 774-82.
28. Ryan J, Quinn F, Meunier A, 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: 107-15.
29. Malec M, van der Velden VH, Björklund E, et al. Analysis of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia: comparison between RQ-PCR analysis of Ig/TcR gene rearrangements and multicolor flow cytometric immunophenotyping. *Leukemia* 2004; 18: 1630-6.
30. Neale GA, Coustan-Smith E, Stow P, et al. Comparative analysis of flow cytometry and polymerase chain reaction for the detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2004; 18:934-8.
31. Primo D, Sanchez ML, Espinosa AB, et al. Lineage involvement in chronic myeloid leukaemia: comparison between MBCR/ABL and mBCR/ABL cases. *Br J Haematol* 2006; 132: 736-9.