

Valor pronóstico del inmunofenotipo en la respuesta temprana de la leucemia aguda linfoblástica pre-B en niños

Lourdes Cecilia Correa-González,^{a,b*} Peter B. Mandeville,^c Javier Manrique-Dueñas,^b Francisco Alejo-González,^b Abel Salazar-Martínez,^b Oscar de Jesús Pérez-Ramírez,^c y Juan Francisco Hernández-Sierra.^c

^aServicio de Hematología, Instituto Mexicano del Seguro Social, San Luis Potosí, S.L.P.

^bServicio de Hematología, Hospital Central "Dr. Ignacio Morones Prieto", San Luis Potosí, S.L.P.

^cMaestría en Ciencias en Investigación Clínica, UASLP, San Luis Potosí, S.L.P., México

Recibido en su versión modificada: 16 de abril de 2005

Aceptado: 20 de mayo de 2005

RESUMEN

Objetivo: Determinar el valor pronóstico del inmunofenotipo pre-B con sus variantes en la respuesta temprana al tratamiento de la leucemia aguda linfoblástica pediátrica, ajustando edad y cifra de leucocitos inicial.

Pacientes y método: Se realizó un estudio de casos y controles anidado en una cohorte con pacientes menores de 15 años de edad, de los dos géneros, con leucemia aguda linfoblástica pre-B de diagnóstico reciente. Se utilizó un panel de anticuerpos monoclonales específicos de la estirpe B, T, monocito-mielocito y megacariocítica. Se evaluó la respuesta después de 14 días de tratamiento mediante aspirado de médula ósea.

Resultados: Se incluyeron 54 pacientes. La mediana de edad fue de 7 años (2 m-14 años), la mediana de cifra de leucocitos fue 13,450/mm³ (1200-986,000/mm³). Se identificaron 29 casos con inmunofenotipo Pre-B tardío, 19 casos pre-B común y 6 casos de pre-B precoz. Once pacientes presentaron antígenos mieloideos asociados. Se encontró asociación significativa ($p=0.034$) entre respuesta temprana y la presencia de antígenos mieloideos. No se demostró asociación entre las variantes del inmunofenotipo pre-B, edad y cifra de leucocitos con la respuesta temprana ($p=0.264$).

Conclusiones: Es necesario estudiar directamente la respuesta temprana al tratamiento en los niños con leucemia linfoblástica ya que en nuestra muestra de pacientes los factores clínicos y el inmunofenotipo no fueron predictivos de ésta.

Palabras clave:

Leucemia aguda linfoblástica, inmunofenotipo, respuesta temprana, factor pronóstico.

SUMMARY

Objective: To determine the prognostic value of pre B immunophenotype and its variants on early treatment response among of acute pediatric lymphoblast leukemia.

Patients and methods: A case-control study nested in a cohort was carried out with male and female patients 15 years and younger with recently diagnosed pre-B lymphoblast leukemia. A panel of B, T, -monoclonal antibodies of the myelo-monocytic and megakaryocytic cell type was used. Response was assessed by bone marrow aspiration 14 days post treatment.

Results: 54 patients were included. The median age was 7 years (2 months - 14 years) median leukocyte count was 13,450/mm³ (1200-986,000/mm³). We identified 29 cases with late pre-B immune phenotype, 19 cases with common pre B and 6 cases with early pre-B immunophenotype. Eleven patients also displayed myeloid antigens. A significant association ($p=0.034$) was found between early treatment response and the presence of myeloid antigens. No association was found between the pre-B immunophenotype, age and leukocyte count with early treatment response ($p=0.264$).

Conclusions: We need to pay special emphasis on early treatment response in children with lymphoblast leukemia as our study did not corroborate the common finding that clinical factors and immune phenotype can be predictive factors.

Key words:

Acute lymphoblast leukemia, immunophenotype, early response, prognostic factor.

*Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dr. Juan Francisco Hernández Sierra. Maestría en Ciencias en Investigación Clínica, Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Av. Venustiano Carranza 2405, 78210, San Luis Potosí, SLP. Teléfono: (48) 26-23-45 ext 519, Fax: (48) 26-23-52

Introducción

La leucemia aguda linfoblástica (LAL) es la neoplasia maligna más frecuente en la infancia.^{1,2} Fajardo y colaboradores informan que en México la leucemia aguda ocupa el primer lugar y corresponde a 34.4% del total de neoplasias, de éstas la LAL es la más frecuente (83.3%).¹

En los últimos años han existido avances notables en su tratamiento, con supervivencia libre de eventos a cinco años de 70-80% en pacientes tratados con quimioterapia múltiple efectiva combinada;³⁻⁵ sin embargo, existe un grupo de pacientes donde el resultado no es exitoso y mueren por actividad leucémica a pesar del uso sistemático de esquemas de tratamiento similares a los de los pacientes curados.⁴⁻⁶ Estas diferencias han llevado al reconocimiento de ciertos factores pronósticos independientes: son de buen pronóstico la edad de 1 a 10 años y leucocitos menores de 10,000/mm³; el índice de ADN > 1.16 (relación del contenido de ADN en las células leucémicas en fase G₀/G₁ y del contenido de ADN de las células normales en G₀/G₁), SNC sin infiltración al momento del diagnóstico, género femenino, ausencia de t (9;22) o t (1;19).⁶⁻¹³

Cuadro I. Clasificación inmunológica de las leucemias agudas linfoblásticas.^{14,15}

Estadio de diferenciación	Inmunofenotipo
Pre B nula	HLA-DR
Pre B precoz	HLA-DR, TDT, CD19, CD22, CD24
Pre B común	HLA-DR, TDT, CD19, CD22, CD24, CD10
Pre B tardío	HLA-DR, TDT, CD19, CD22, CD24, CD10, CD20
Pre B	HLA-DR, TDT, CD19, CD22, CD24, CD10, CD20, IgC
B	HLA-DR, TDT, CD19, CD22, CD24, CD10, CD20, IgC, IgS
Mieloide	CD13, CD33, MPO.

El análisis inmunofenotípico tiene como objetivo asignar el linaje a la proliferación blástica una vez definido el diagnóstico morfológico y es útil para predecir el comportamiento de las poblaciones linfocitarias.¹⁴⁻¹⁷ El fenotipo B común (CD10+) se asocia a mejor pronóstico que el pre B precoz o T. Las LAL B (Slg+) tienen un comportamiento más agresivo y se manejan como un grupo aparte.¹⁸⁻²¹ Se ha establecido también como un grupo agresivo de leucemias, las que expresan antígenos de diferenciación mieloide asociados: CD13, CD33.²²⁻³⁰

Una forma de evaluación, la respuesta temprana al tratamiento, medida por la velocidad de desaparición de blastos en sangre periférica (SP) y en médula ósea (MO), se ha involucrado como un factor pronóstico muy importante.³¹⁻³⁵

Existen informes que indican que el inmunofenotipo no tiene valor para predecir el pronóstico cuando se aplican

tratamientos agresivos a pacientes de diagnóstico reciente y que la intensidad del tratamiento recibido es el factor pronóstico más importante;³⁶⁻³⁸ sin embargo tanto el Pediatric Oncology Group (POG) como el Dana Farber Cancer Institute consideran como factor de riesgo el inmunofenotipo leucémico.¹² El POG, en sus protocolos AlinC 14 y T3 demostró que el inmunofenotipo de células T es un marcador de pobre pronóstico comparado con la LAL de precursor B, con supervivencia libre de eventos a cuatro años de 50 a 60% para el inmunofenotipo T. Por otra parte, el protocolo DFCI 85-01 del Dana Farber Cancer Institute no mostró diferencias en la evolución de los pacientes con inmunofenotipo T comparado con inmunofenotipo no T, aunque los pacientes con LAL "T" fueron asignados para recibir tratamientos de riesgo alto.¹²

Por lo anterior el objetivo del presente trabajo fue determinar si existe asociación independiente entre el inmunofenotipo pre B y la respuesta temprana al tratamiento de LAL, evaluada por el porcentaje de blastos en MO al día 14 del tratamiento, cuando se ajusta por edad y cifra de leucocitos.

Pacientes y métodos

El presente trabajo se realizó en el Hospital General de Zona 1 con Medicina Familiar del IMSS y el Hospital Central Dr. Ignacio Morones Prieto de segundo y tercer nivel de atención, con aprobación de los Comités de Ética e Investigación.

Se realizó un estudio de casos y controles anidados en una cohorte³⁹ de pacientes de uno y otro géneros, menores de 15 años de edad que ingresaron por primera vez con diagnóstico de LAL y reporte inmunológico de estirpe Precursores B y cuyos padres aceptaron participar en el estudio y firmaron hoja de consentimiento. Fueron considerados como casos aquellos pacientes que no cumplieron el criterio de remisión medular a los 14 días del tratamiento de inducción a la remisión y como controles aquéllos con remisión medular en el mismo período. Se excluyeron a los pacientes con síndrome de Down y LAL con inmunofenotipo B o T.

Se consideró como LAL a la infiltración medular por linfoblastos en un porcentaje > 25%, según la clasificación de la FAB.⁴⁰⁻⁴² Para el riesgo clínico se consideró como de buen pronóstico edad de 2 a 10 años, cifra de leucocitos en SP < 50,000/mm³, sin masa mediastinal y sin infiltración inicial al sistema nervioso central (SNC) y como riesgo alto o de mal pronóstico se consideró a los pacientes menores de dos años de edad o mayores de 10 años, con ≥ 50,000 leucocitos /mm³ en SP.¹²

La respuesta al tratamiento al día 14: se determinó con base en el porcentaje de blastos en MO a este tiempo: respuesta completa < 5% blastos (M1), respuesta parcial con 5-25% de blastos (M2) y sin respuesta > 25% de blastos (M3).

Se determinó la consistencia interobservador del diagnóstico morfológico y de la evaluación de la respuesta al tratamiento, mediante la lectura de los aspirados de MO por dos hematólogos en forma ciega con el cálculo de kappa ponderada,⁴³ que fue de 90%. El tamaño de la muestra se calculó con base en la respuesta al tratamiento por porcentaje de blastos en MO al día 14 (variable dependiente), y 3 covariables: edad, número de leucocitos e inmunofenotipo. Se incluyeron al menos 50 repeticiones.⁴⁴

El inmunofenotipo se realizó en SP y MO por citometría de flujo. Se utilizaron anticuerpos monoclonales murinos, de la compañía Beckton Dickinson o CoulterR. Las muestras de MO se ajustaron a una concentración celular de 10,000 000/mL, las muestras de SP se tomaron directamente y se hicieron alícuotas de 100 microlitros a las que se agregaron anticuerpos monoclonales conocidos marcados con fluoresceína o ficoeritrina, utilizando un panel que incluyó CD2, CD3, CD4, CD8, CD10, CD13, CD14, CD19, CD20, CD33, CD34, CD41, CD45, Anti IgC, Anti IgS, Anti HLA-DR, antimieloperoxidasa, anti-tdt y anti CD22. Se llevaron a cabo tinciones dobles con CD34-CD20, CD34-CD13, CD34-CD33. Se determinó porcentaje e intensidad media de fluorescencia para cada anticuerpo monoclonal. Las gráficas obtenidas de las poblaciones sospechosas se interpretaron por un inmunólogo quien estableció el inmunofenotipo y estado de diferenciación (Cuadro I). Se consideró una leucemia bifenotípica cuando además de los antígenos linfoides probados, se demostró expresión de antígenos mieloides CD13 y/o CD33 con positividad para mieloperoxidasa.^{50,51}

El esquema de quimioterapia de inducción a la remisión con cuatro fármacos se administró independientemente del inmunofenotipo a todos los pacientes, una vez que se tomaron las muestras programadas. Los pacientes iniciaron tratamiento de inducción a la remisión basado en el protocolo Total XI³⁷ con Vincristina 1.5 mg/m² semanal (días 1, 8, 15, 22), daunorubicina u otra antraciclina equivalente 25 mg/m² (día 2, día 15), prednisona 40 mg/m² diariamente del día 1 al 21 en que se inició descenso de dosis y se suspendió el día 28 del tratamiento, de acuerdo con resultados del aspirado de MO. También se les administró L-asparaginasa 10,000 U/m² S.C. tres veces por semana (9 dosis totales) y quimioprofilaxis al SNC con triple fármaco intratecal (metotrexato, hidrocortisona, ara-C) en dosis según la edad, los días 2 y 22.³⁷ El día 14 y 28 del tratamiento se repitió la MO en forma ciega a los factores clínicos e inmunofenotipo. Se tomó citometría hemática completa de control los días 7, 14, 21 y 28 del tratamiento. A los pacientes que no mostraron respuesta en la evaluación del día 14 del tratamiento se consideraron de riesgo alto, independientemente de la evaluación de riesgo inicial y se les modificó el tratamiento de inducción a la remisión y el programado de consolidación y mantenimiento. El resto del grupo de pacientes de alto riesgo y riesgo estándar continuó el tratamiento de inducción-consolidación y mantenimiento basado en el esquema del protocolo pediátrico Total XI de acuerdo al riesgo.³⁷

Se mantuvo contacto con todos los pacientes incluidos en el estudio por lo menos los primeros 14 días de tratamiento y no se registraron pérdidas de pacientes.

Resultados

Se incluyeron 54 pacientes con LAL pre B de nuevo diagnóstico entre mayo de 2000 y diciembre del 2002 que cumplieron con los criterios de selección. Treinta pacientes fueron del género femenino y 24 del género masculino; la mediana de edad fue de 7 años, límites de 0.2 a 14 años.

El diagnóstico morfológico más frecuente fue L1 con 97.5%, seguido de L2 en 2.5% de los casos. No hubo

pacientes con LAL L3. Hubo tres muertes en inducción, al día 15, 18 y 20 de tratamiento; dos por sepsis y uno por probable hemorragia intracranial.

La cuenta de leucocitos al momento del diagnóstico tuvo una mediana de 13,450 leucocitos / mm³, con límites de 1,200 a 986,000/mm³. El inmunofenotipo más frecuente fue “precursor de B-CD10+, CD20+” en 29 casos (53.7%), “Pre B Común CD10+” 19 casos (35.2%) y 6 casos fueron pre B precoz HLA-DR, CD19 (11.1%).^{14,15} En relación con el inmunofenotipo y la respuesta al día 14 de tratamiento se encontró en el análisis bivariado que los casos con antígeno CD10 positivo tuvieron respuesta al tratamiento (total o parcial) en el 93.6% de los casos en tanto que los CD10 negativos tuvieron respuesta sólo en 77.7% (Cuadro II). Se reportaron 11 casos (20.3%) con antígeno mieloide positivo, de ellos 4 LAL pre-B común y 7 LAL pre-B tardío; en 10 de ellos se obtuvo respuesta total al día 14 de tratamiento y sólo en un caso respuesta parcial.

Cuadro II. Respuesta al día 14 y su asociación con el antígeno CD 10 en niños con leucemia aguda linfoblástica

Respuesta	CD 10+ N=48	CD10 – N=6
Total	66.6 % (32)	66.6 % (4)
Parcial	27 % (12)	11 % (1)
Nula	6.25 % (4)	22.2 % (1)

El análisis estadístico fue efectuado a 95% del nivel de confianza con el programa estadístico R versión 1.6.2.⁴⁵ La variable de respuesta (porcentaje de blastos al día 14) mostró distribución con sesgo positivo, por lo que se utilizó el procedimiento de Box Cox que indicó una transformación con logaritmo natural para conseguir normalidad de ésta. El requisito de normalidad de los residuos se probó entonces con Shapiro Wilk ($p=0.0060$)⁴⁶ y el requisito de homogeneidad de las varianzas de los residuos con Brown-Forsythe ($p=0.48$).⁴⁷ Se descartó colinearidad mediante una tabla de coeficientes de determinación (r^2) (Cuadro III).

Se efectuó una regresión escalonada en una y otra direcciones⁴⁸ del porcentaje de blastos al día 14 de tratamiento con respecto a edad, leucocitos, inmunofenotipo Pre B precoz, pre B común, Pre B tardío, antígeno CD10 positivo y antígenos mieloides positivos. Se encontraron 14 modelos equivalentes⁴⁹ con menos de 2 unidades de diferencia por AIC (Cuadro IV); sin embargo el mejor modelo por razón de parsimonia fue In (porcentaje de blastos al día 14) ~ antígeno mieloide positivo, lo que significa que la presencia de antígenos mieloides positivos y el logaritmo natural del porcentaje de blastos al día 14 del tratamiento se asocian a cualquier nivel de edad y número de leucocitos ($p=0.034$). Cuando se analizó la relación de la variable de respuesta al día 14 con respecto a los predictores: leucocitos, edad e inmunofenotipo y sus interacciones, no se encontró asociación significativa ($p=0.264$).⁵⁵

Discusión

El tratamiento de la LAL dirigido al riesgo, evaluado en el momento del diagnóstico, ha mejorado los porcentajes de supervivencia libre de eventos a cinco años en los niños con esta enfermedad.³⁶⁻³⁸ En la mayoría de los ensayos clínicos la clasificación del riesgo se basa en la edad, cuenta de leucocitos al momento del diagnóstico, anomalías genéticas, inmunofenotipo y en algunos estudios el género masculino se considera un factor adverso y una indicación para prolongar el tratamiento de mantenimiento;⁹⁻¹³ sin embargo, la evaluación del riesgo basado en esos factores pudiera ser inadecuada debido a la diferente intensidad de los tratamientos.

Cuadro III. Coeficientes de determinación (r^2) para los predictores analizados con respecto al porcentaje de blastos al día 14 de tratamiento

Variable explicatoria	Coeficiente de determinación(r^2)
Edad	0.015
Leucocitos al diagnóstico	0.063
LAL PreB precoz	0.000
LAL PreB común	0.030
LAL Pre B tardío	0.025
Antígeno CD 10 positivo	0.000
Antígenos mieloides positivos	0.062

Desde principios de los ochenta la respuesta temprana (al día 14) al tratamiento de inducción a la remisión se reconoció como un factor de pronóstico de supervivencia a largo plazo independiente, debido a que esta respuesta refleja la sensibilidad de las células leucémicas a la quimioterapia y la farmacodinamia del huésped. El examen morfológico de la SP y la MO después de 7 y 14 días de tratamiento, es el método más ampliamente usado.³²⁻³⁵

En la evaluación entre los factores clínicos "edad y leucocitos" y la respuesta temprana a la inducción, no se demostró asociación, sin embargo, el poder alcanzado con nuestra población estudiada es muy bajo (0.11). Para demostrar la diferencia real (poder 0.90) se necesita de 1,800 casos analizados. Los grandes grupos colaborativos en los EUA y Europa han demostrado, mediante análisis multivariado la influencia dominante sobre la duración de la supervivencia libre de enfermedad a largo plazo de la edad y la cifra de leucocitos inicial, siendo este último el predictor más significativo de la evolución.^{4-7,11,36-38} Tampoco el inmunofenotipo pre B con sus variantes y la positividad al antígeno CD10 influyeron en la respuesta temprana en nuestros pacientes. En relación con el antígeno CD10 positivo y la respuesta al tratamiento al día 14 notamos una tendencia clínica favorable en los pacientes con el antígeno positivo, que no se demostró en el análisis estadístico.

En nuestro grupo de pacientes la frecuencia de antígenos mieloides asociados (CD13 y CD33) a la LAL fue de 20.3%. Este fue el único factor significativo que influyó sobre la respuesta al día 14 del tratamiento. La media en el porcentaje de blastos al día 14 de tratamiento fue menor para el grupo de pacientes con antígenos mieloides positivos (0.933%) lo que indica mejor respuesta al tratamiento intensivo inicial que el grupo con antígenos mieloides negativos (4.049%) ($p=0.034$).

Cuadro IV. Modelos equivalentes según AIC mínimo

Modelo	AIC
Antígeno mieloide positivo	54.7
Mieloide positivo+leucocitos al Dx	54.6
Mieloide positivo+Pre B precoz	55.4
Mieloide positivo+Pre B común	55.8
Mieloide positivo+edad	55.9
Mieloide positivo+leucocitos+CD 10	54.0
Mieloide positivo+leucocitos+pre B precoz	55.4
Mieloide positivo+leucocitos+Pre B común	55.4
Mieloide positivo+leucocitos+edad	55.8
Mieloide positivo+leucocitos+edad+CD10	55.2
Mieloide positivo+leucocitos+CD10+común	55.7
Mieloide positivo+leucocitos+CD10+precoz	55.9
Mieloide+leucocitos+CD10+leucocitos:CD10	55.9
Mieloide+leucocitos+CDpos+tardío	56.0

Este resultado se hizo evidente en el análisis exploratorio como un hallazgo que surgió durante el estudio, por lo que su interpretación adecuada requerirá de un trabajo diseñado para evaluar su influencia sobre el pronóstico de nuestros pacientes. Sin embargo, lo anterior concuerda con los reportes del grupo CCG y Pui y cols.^{22,52,53} entre otros, que relacionan la expresión de los antígenos mieloides asociados, con características clínicas favorables y buena respuesta al tratamiento. En el grupo de Pui y cols. la supervivencia libre de eventos a tres años de seguimiento mostró $85 \pm 6\%$ para pacientes con antígeno mieloide positivo comparado con $75 \pm 3\%$ para los negativos ($p=0.58$). En contraste, Wiersma y colaboradores demostraron después de 40 meses de seguimiento una supervivencia libre de eventos para los pacientes con antígenos mieloides positivos de $39 \pm 13\%$ comparado con $78 \pm 5\%$ para los pacientes sin tal expresión ($p=0.0001$).²⁵ De la misma forma, Urbano Ispizua y colaboradores demostraron en un grupo de pacientes adultos con LAL y antígenos mieloides positivos un porcentaje de respuesta completa significativamente más bajo ($p=0.05$) y supervivencia más corta ($p=0.001$) comparado con los pacientes con antígenos mieloides negativos, siendo este hecho independiente de otras variables (edad y elevada cuenta de leucocitos), sin embargo el pequeño número de pacientes pediátricos en su serie, no les permitió analizar el significado pronóstico.⁵⁴

Es importante reconocer que aplicar tratamientos combinados altamente efectivos elimina la fuerza pronóstica de la mayoría de las características biológicas y que recibir tratamientos contemporáneos intensos es el factor pronóstico más importante al reducir rápidamente la masa de células leucémicas y evitar la adquisición de mutaciones y resistencia a fármacos en forma temprana.³⁷ Este fue el motivo por el cual a todos los pacientes, independientemente del riesgo evaluado con parámetros clínicos iniciales, se les administró el mismo tratamiento intenso durante la inducción a la remisión, basado en protocolos de tratamiento pediátricos.^{22,23,36-38}

Conocer que la respuesta temprana al tratamiento no está determinada por ninguno de los factores clínicos analizados nos obliga a evaluar en todos nuestros pacientes la respuesta temprana al tratamiento mediante un aspirado de médula ósea al día 14, por lo menos. Aquellos que por parámetros clínicos fueron catalogados como de riesgo habitual pero que no tienen respuesta temprana al tratamiento deberán reconsiderarse y entrar a esquemas de quimioterapia intensos, como los pacientes de riesgo alto.

Nosotros analizamos las variables clínicas que influyen en otra variable predictora de la evolución, posiblemente la de más peso, que es la respuesta temprana al tratamiento. La evolución a largo plazo será evaluada en nuestro grupo de pacientes que serán seguidos durante la duración del tratamiento que aún no termina en toda la cohorte.

Se observó una tendencia clínica a mejor respuesta cuando el antígeno CD10 está presente, pero no se demostró significancia estadística con esta variable.

Se concluye que el inmunofenotipo pre B con su variante precoz, común y tardío no influye en la respuesta temprana a la quimioterapia en nuestra muestra de pacientes. Sin embargo, por ser una muestra pequeña es necesario conjuntar esfuerzos e integrar un grupo multicéntrico en nuestro país que asegure un número suficiente de pacientes para probar estas variables.

Referencias

1. Fajardo-Gutiérrez A, Mendoza Sánchez H, Valdez Martínez E, y cols. Frecuencia de neoplasias malignas en niños atendidos en hospitales del Distrito Federal. Estudio Multicéntrico. Bol Med Hosp Infant Mex 1996;53:57-66.
2. Fajardo-Gutiérrez A, Mejía Aranguré M, Juárez Ocaña S. El cáncer, un problema de salud que incrementa en el niño. Un reto para conocer su epidemiología en los niños mexicanos. Bol Med Hosp Infant Mex 2001;58:721-742.
3. Margolin JF, Steuber ChP, Poplack DG. Acute Lymphoblastic Leukemia. En Principles and Practice of Pediatric Oncology. Pizzo PA, Poplack DG (Eds) JP Lippincott Co. 4a ed. Philadelphia, 2002. p. 431-481.
4. Pui CH. Childhood leukemias. N Engl J Med 1995;332:1618-1630.
5. Kersey JH. Fifty Years of studies of the biology and therapy of childhood leukemia. Blood 1997;90:4243-4251.
6. Romero F, Paredes R. Definición de riesgos en Leucemia Aguda, de acuerdo a la clasificación. En Actualización en Leucemias. Ruiz Argüelles GJ., San Miguel JF (eds). Editorial Médica Panamericana. México DF. 1996. p. 41-49.
7. Advani S, Pai S, Venzon D et al. Acute Lymphoblastic Leukemia in India: An analysis of prognostic factors using a single treatment regimen. Ann Oncol 1999;10:167-176.
8. Sallan SE, Ritz J, Pesando J. Cells Surface antigens: Prognostic implications in childhood acute Lymphoblastic Leukemia. Blood 1980;55:395.
9. Donadieu J, Auclerc MF, Baruchel A, et al. Critical study of prognostic factors in childhood acute Lymphoblastic Leukemia; differences in outcome are poorly explained by the most significant Prognostic variables. Br J Hemat 1998;102: 729-739.
10. Pui CH. Acute Lymphoblastic leukemia in children. Current opinion in Oncology 2000;12:3-12.
11. Miller DR, Leikin S, Albo V, et al. Prognostic factors and therapy in acute lymphoblastic leukemia of childhood: CCG-141: A report from the Children's Cancer Study Group. Cancer 1983;51:1041-1049.
12. Smith M, Arthur D, Camitta B, et al. Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with ALL. J Clin Oncol 1996;14:18-24.
13. Pui CH, Boyett JM, Relling MV, et al. Sex differences in prognosis for children with acute lymphoblastic leukemia. J Clin Oncol 1999;17:818-824.
14. Catovsky D. Clasificación de la leucemia linfoblástica aguda. En: Encyclopedie Iberoamericana de Hematología. López Borrasca A, Arocha Pinango CL., Campos Guerra C (Eds). Ediciones Universidad de Salamanca. 1a. Edición. Salamanca, España, 1992. p. 258-264.
15. Paredes Aguilera R, Romero Guzmán L, López Santiago N, y cols. Inmunofenotipo de la leucemia aguda linfoblástica en niños mexicanos. Sangre 1999;44:188-194.
16. San Miguel JF, Duque R. Utilidad del inmunofenotipo en el diagnóstico y clasificación de las leucemias agudas. En: Actualización en leucemias. Ruiz Argüelles GJ, San Miguel JF (eds) Ed Médica Panamericana 1a ed. México, DF. 1996. p. 25-34.
17. Paietta E, Andersen J, Wiernik PH, et al. A New approach to analyzing the utility of immunophenotyping for predicting clinical outcome in acute leukemia. Leukemia 1996;10:1-4.
18. Crist W, Boyett J, Jackson J, et al. Prognostic importance of the Pre-B-Cell Immunophenotype and other presenting features in B lineage Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: A Pediatric Oncology Group Study. Blood 1995;74: 1252-1259.
19. Reite A, Schrappe M, Tiemann M, et al. Improved Treatment Results in Childhood B-Cell Neoplasm With Tailored Intensification of Therapy: A Report of the Berlin-Frankfurt-Münster Group Trial NHL-BFM 90. Blood 1999;94:3294-3306.
20. Greaves MF, Janossy G, Petz J, et al. Immunologically Defined subclasses of Acute Lymphoblastic Leukaemia in Children: their relationship to presentation features and prognosis. Br J Haematol 1981;48:179-197.
21. Crist W, Boyett J, Roper M, et al. Pre-B Cell leukemia responds poorly to treatment: A Pediatric Oncology Group Study. Blood 1984;63:407-414.
22. Pui CH, Rubinstein JE, Hancock ML, et al. Reappraisal of the clinical and biologic significance of myeloid associated antigen expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. J Clin Oncol 1998;16:3766-3773.
23. Putti MC, Rondelli R, Coccito MG, et al. Expression of myeloid markers lacks prognostic impact in children treated for acute lymphoblastic leukemia: Italian experience in AIEOP-ALL 88-91 studies. Blood 1998;92:795-801.
24. Khalidi HS, Chang KL, Medeiros LJ, et al. Acute Lymphoblastic leukemia. Survey of immunophenotype, French-American-British classification, frequency of myeloid antigen expression and karyotypic abnormalities in 210 pediatric and adult cases. Am J Clin Pathol 1999;111: 467-76.
25. Wiersma SR, Ortega J, Sobel E, et al. Clinical importance of myeloid antigen expression in Acute lymphoblastic leukemia of Childhood. N Engl J Med 1991;324:800-808.
26. Kurec AS, Belair P, Stefanoff C, et al. Significance of aberrant immunophenotypes in childhood acute lymphoblastic leukemia. Cancer 1991;67:3081-3086.
27. Cantu-Rajnoldi A, Putti C, Saitta M, et al. Co-expression of myeloid antigens in childhood acute lymphoblastic leukaemia: Relationship with the stage of differentiation and clinical significance. Br J Haematol 1991;79:40-43.
28. Pui CH, Behm FG, Singh B, et al. Myeloid-associated antigen expression lacks prognostic value in childhood acute lymphoblastic leukemia treated with intensive multiagent chemotherapy. Blood 1990;75:198-202.
29. Pui CH, Schell MJ, Raimondi SC, et al. Myeloid-antigen expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med 1991;325:1378-179.
30. Pui CH, Raimondi SC, Head DR, et al. Characterization of childhood acute leukemia with multiple myeloid and lymphoid markers at diagnosis and at relapse. Blood 1991;78:1327-1337.
31. Griffin TC, Shuster JJ, Buchanan GR, et al. Slow reduction of peripheral blood blast count is an adverse prognostic factor in childhood T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia (T-ALL): A Pediatric Oncology Group study. Thirty-fourth Annual Meeting (2025) Proceedings ASCO 1998. p. 527.
32. Brisco MJ, Sykes PJ, Hughes E, et al. Monitoring minimal residual disease in peripheral blood in B lineage acute lymphoblastic leukaemia. Br J Haematol 1997;99:314-319.
33. Silverman LB, Gelber RD, Young ML, et al. Induction failure in acute Lymphoblastic leukemia of childhood. Cancer 1999; 85: 1395- 1404.
34. Miller DR, Coccia PF, Bleyer WA, et al. Early response to induction therapy predicts disease-free survival and late recurrence of childhood acute lymphoblastic leukemia: A report form the Children's Cancer Study Group. Blood 68 (5, Suppl1):227 a, 1986-abstract #786.
35. Steinherz PG, Gaynon PS, Breneman JC, et al. Cytoreduction and prognosis in Acute Lymphoblastic Leukemia. The importance of Early Marrow Response: Report From the Children's Cancer Group. J Clin Oncol 1996;14:389-398.
36. Frei E, Sallan SE. Acute Lymphoblastic leukemia, treatment. Cancer 1978;42:828-838.
37. Rivera GK, Raimondi SC, Hancock MI, et al. Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukaemia with reinforced early treatment with rotational combination chemotherapy. Lancet 1991;337:61-66.
38. Hann IM, Vora AJ, Harrison G, et al. Determinants of outcome after intensified therapy of childhood lymphoblastic leukaemia-results from MRC UKALL XI. Br J Haematol 2001;113:103-114.
39. Hernández H D, Garduño Espinoza J, Hernández Sierra JF, y cols. Clasificación en niveles de los diseños de investigación clínico epidemiológicas. Rev Invest Clin 1998;50:79-86.

40. **Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al.** French- American- British (FAB) Cooperative Group: The morphological classification of Acute Lymphoblastic Leukemia. Concordance among observers and clinical correlations. Br J Haematol 1981;47:553.
41. **Miller DR, Leikin S, Albo V, et al.** Prognostic Importance of Morphology (FAB Classification) in Childhood Acute Lymphoblastic Leukaemia (ALL). A report from Children's Cancer Study Group. Br J Haematol 1981;48:199-206.
42. **Mc Keena RW, Brynes RK, Nesbit ME, et al.** Cytochemical profiles in acute lymphoblastic Leukemia. Am J Pediatr Hematol-Oncol 1979;1:263-275.
43. **Fajardo GA, Yamamoto KL, Garduño EJ, Hernández HD, y cols.** Consistencia y validez de una medición en la investigación clínica pediátrica. Definición, evaluación y su interpretación. Bol Med Hosp Infant Mex 1991;48:367-376.
44. **Feinstein AR.** Clinical Epidemiology. The architecture of clinical research. WB Saunders Co. 1985.
45. **Ihaka R, Gentleman R.** A language for data analysis and graphics. Journal of computational and graphical statistics 1996;5:299-314.
46. **Shapiro SS, Wilk MB.** An analysis of variance test for normality (complete samples). Biometrika 1965;52:591-611.
47. **Conover WJ, Johnson ME, Johnson MM.** A comparative study of test for homogeneity of variances, with applications to the outer continental shelf bidding data. Technometrics 1981;23:351-161.
48. **Venables WN, Ripley BD.** Modern applied statistics with s-plus. In statistics and computing. Venables ed. 4th edition 2002. New York N.Y.
49. **Burnham KP, Anderson DR.** Model selection and multimodel inference: a practical information-theoretic approach. In: Springer-Verlag eds.2nd edition 2002. New York, N.Y
50. **Foon KA, Tood RF,** Immunologic classification of leukemia and lymphoma. Blood 1986;68:1-31.
51. **Paredes Aguilera R, Romero Guzmán L, López Santiago N.** Flow Cytometric Analysis of Cell-surface and intracellular antigens in the diagnosis of Acute Leukemia. Am J Hematol 2001;68:69-74.
52. **Uckun FM, Sather HN, Gaynon PS, et al.** Clinical features and treatment outcome of children with myeloid antigen positive acute lymphoblastic leukemia: A report from Children's Cancer Group. Blood 1997;90: 28-35.
53. **Ng SM, Ariffin WA, Lin HP, et al.** Clinical features and treatment outcome of children with myeloid antigen coexpression in B-lineage acute lymphoblastic leukemia: a study of 151 Malaysian children. J Trop Pediatr 2000;46:73-78.
54. **Urbano Ispizua A, Matutes E, Villamor N, y cols.** Clinical significance of the presence of myeloid associated antigens in acute lymphoblastic leukaemia. Br J Haematol 1990;75:202-207.
55. **Lindman HR.** Analysis of variance, One-way, Fixed effects. In: Analysis of variance in experimental design. Springer – Verlag. New York. 1992. p. 20-37.