

Importancia del laboratorio en el diagnóstico y pronóstico de leucemia aguda linfoblástica de la infancia

QFB Rocío del Carmen Coronel Morán

RESUMEN

La leucemia aguda linfoblástica (LAL) es el padecimiento maligno más frecuente de la población pediátrica. Las pruebas de laboratorio para el diagnóstico y pronóstico de la LAL en la infancia son indispensables para el clínico, sobre todo por el gran avance en el estudio de la biología de esta enfermedad. Estas pruebas permiten definir el riesgo y por ende dar un mejor tratamiento a los pacientes. Este padecimiento no es una entidad única sino una expresión muy amplia de la enfermedad; por esta razón los estudios de citomorfología, inmunofenotipos y citogenética y las técnicas de biología molecular pueden ofrecer un espectro extenso del estudio con alta sensibilidad. Por otro lado se puede lograr la detección temprana de enfermedad mínima residual que hasta el momento sigue siendo un gran reto en la hemato-oncología, para detectar las fallas de la terapéutica. El propósito de este trabajo es dar a conocer al clínico las pruebas necesarias para cada paciente con LAL así como la experiencia del Laboratorio de Hemato-oncología en este tipo de exámenes.

Palabras clave: Leucemia, biología molecular, enfermedad mínima residual, citomorfología, inmunofenotipos.

ABSTRACT

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common malignancy of childhood. The use of specialized laboratory tests is a must in order to establish an exact diagnosis and a correct treatment. Because of the recent advances and knowledge of the biology of this disease those tests should routinely be used. ALL is a disease with a broad spectrum of biologic manifestations, therefore the need to perform in each and every case cytromorphology in the bone marrow cells, immunophenotype, cytogenetic and molecular biology studies is mandatory. Within the scope of laboratory testing there are also other tests to detect minimal residual disease, which can assist the clinician to detect early chemotherapy failures. The purpose of this paper is to review the routine testing that each patient with ALL should have as well as to outline the experience of our laboratory with these tests.

Key words: Leukemia, molecular biology, minimal residual disease, cytromorphology, immunophenotype.

La oncología, como todas las ramas de la medicina, requiere estudios de laboratorio que permitan establecer un diagnóstico y un pronóstico precisos en la leucemia aguda linfoblástica (LAL). Hasta la fecha se han empleado técnicas muy útiles como la citomorfología en aspirados de médula ósea. Cada vez hay más métodos para tener un diagnóstico, pronóstico y un seguimiento más precisos de la enfermedad. Los métodos citoquímicos han permitido conocer la composición

bioquímica de las células, así como de un conjunto de anticuerpos monoclonales para realizar un inmunofenotipo, y técnicas de biología molecular que ayudan al clínico a establecer un diagnóstico certero en leucemias de la infancia.

El concepto leucemia agrupa diversas enfermedades que tienen en común la transformación neoplásica de las células hematopoyéticas. Debido a la frecuencia y pronóstico cada día mejor de este padecimiento, ha sido objeto de intensa investigación clínica y biológica.

La LAL es el padecimiento oncológico más común en pediatría; representa el 23% de los diagnósticos en niños menores de 15 años con cáncer, lo que ocurre con una frecuencia anual de 30 a 40 por millón¹. Se diagnostican aproximadamente 2,400 niños y adolescentes menores de 20 años con LAL cada año en Estados Unidos² y esta cifra ha aumentado

Servicio de Oncología
Instituto Nacional de Pediatría

Correspondencia: QFB Rocío del Carmen Coronel Morán. Instituto Nacional de Pediatría. Insurgentes Sur 3700-C. Col. Insurgentes Cuiculco. México 04530 D.F.

Recibido: febrero, 2005. Aceptado: abril, 2005.

gradualmente en los últimos 25 años ³. En Francia la frecuencia anual es de 400; en España ⁴ de 250/millón. En México en un estudio realizado en el Instituto Nacional de Pediatría, de 4,076 pacientes oncológicos estudiados entre 1980 a 1995, 1,427 tuvieron leucemia aguda; de ellos 1,169 fueron leucemia aguda linfoblástica (81.6%) y 258 leucemia aguda no linfoblástica (18.4%) ⁵. El estudio señala que la frecuencia también va en aumento en la República Mexicana y que probablemente se debe a una menor mortalidad por neumonías, diarreas, padecimientos neonatales y congénitos en la población infantil en vista de su diagnóstico temprano y manejo correcto.

Entre 75 y 80% de niños con LAL presenta remisión continua y sobrevive al menos cinco años sin recaídas después del diagnóstico, debido a los tratamientos modernos con quimioterapia sistémica y terapia presintomática específica al sistema nervioso central ^{1,2,6,7}. A pesar de los avances en el tratamiento de la LAL en pediatría, aún quedan numerosas incógnitas de tipo biológico y terapéutico para lograr la cura de los niños afectados.

Los niños con LAL por lo general reciben tratamiento según grupos de riesgo definidos por características clínicas y de laboratorio. La intensidad del tratamiento requerido para obtener resultados favorables varía mucho para cada grupo. Varios indicadores clínicos y de laboratorio han demostrado tener valor pronóstico.

DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO

Las pruebas de laboratorio oncológico han permitido ampliar la batería de estudios para evaluar a un niño con cáncer y han hecho posible alcanzar el nivel molecular, conociendo los mecanismos más íntimos de la célula maligna, como ocurre en los oncogenes. De ahí que algunos marcadores tengan valor diagnóstico y valor pronóstico.

Existen numerosas pruebas que ayudan en el diagnóstico y seguimiento de estos pacientes; no tienen valor aislado. Es necesario considerar al paciente en forma global, con sus características clínicas y las pruebas de laboratorio pertinentes en cada caso.

No hace muchos años el citólogo con un modesto microscopio de luz y un frotis de sangre o de tejido

hematopoyético teñido con una coloración panóptica afrontaba el reto diagnóstico; afortunadamente en las últimas décadas, el estudio morfológico de las células hematopoyéticas mediante las tinciones clásicas ha sido ampliamente complementado con diversas metodologías.

La histoquímica, el complemento más antiguo de la citología convencional, estudia la composición química de la célula. Permite precisar la localización topográfica de diversas sustancias; se la considera como un nexo entre la morfología y la bioquímica al conjugar forma y función. Con técnicas histoquímicas pueden ponerse de manifiesto el estudio de las células, diversos principios inmediatos, como enzimas oxidantes o hidrolíticas y compuestos inorgánicos entre otros ⁸.

La LAL constituye un grupo heterogéneo de enfermedades con inmunofenotipos, alteraciones cromosómicas y reordenamientos moleculares diferentes ⁹. El pronóstico de la LAL, especialmente en niños, quienes alcanzan tasas de curación hasta de 80% ¹⁰, ha mejorado notablemente gracias a las terapias adaptadas al riesgo. Los criterios actuales para la estratificación de los pacientes en distintos grupos de riesgo no sólo son clínicos (edad, número de leucocitos, infiltración del sistema nervioso central (SNC) y respuesta inicial al tratamiento, entre otros), sino también se basan en inmunofenotipos, alteraciones genéticas y moleculares. El análisis citogenético de las células tumorales ha contribuido enormemente al conocimiento de las características genéticas de las LAL, identificando alteraciones cromosómicas recurrentes con valor pronóstico independiente y de gran valor en la decisión terapéutica ¹¹. Por otra parte, la descripción de alteraciones cromosómicas estructurales en la LAL ha permitido conocer la importancia clínica de dichas alteraciones, y caracterizar molecularmente muchas de ellas, identificando los genes implicados.

La OMS, en 2001 ¹² hizo énfasis en la importancia de las alteraciones genéticas con una nueva clasificación. En esta clasificación, cada enfermedad es una entidad biológica distinta, definida por criterios clínicos y por sus rasgos morfológicos, de inmunofenotipo y genético, tanto citogenético como molecular.

Un estudio en el 2003¹³ muestra la implicación de la expresión génica en la clasificación de la LAL con una distribución de subgrupos; los principales son BCR-ABL, E2A-PBX1, hiperdiploidía con más de 50 cromosomas, MLL, T-ALL, TEL-AML1 entre otros, utilizando técnicas de biología molecular.

La edad al momento del diagnóstico, es de gran importancia pronóstica; refleja las características biológicas de la LAL en los diferentes grupos de edad. Los niños de uno a diez años de edad tienen un pronóstico más favorable que los de mayor edad¹⁴⁻¹⁶. Los menores de un año con LAL tienen un riesgo alto si no responden al tratamiento. Sin embargo, con pruebas de laboratorio que incluyen biología molecular, se pueden relacionar ciertas alteraciones en el reordenamiento del gen MLL en la banda cromosómica 11q23 que se puede detectar en las células leucémicas de un gran porcentaje de niños menores de dos años con LAL¹⁷. Un mal pronóstico en menores de un año con LAL se relaciona con la presencia del reordenamiento del gen MML. Los niños sin reordenamiento genético MLL suelen tener más de seis meses de edad; tienen cifras de leucocitos por debajo de 10,000/mm³ y mejor pronóstico que los que poseen reordenamiento genético MLL^{18,19}.

Cifra de leucocitos al momento del diagnóstico. Una cifra elevada de leucocitos significa mayor riesgo de que el tratamiento fracase en pacientes con LAL de estirpe de células precursoras B y células T. Generalmente la cifra de 50,000/µL leucocitos se considera como el umbral entre un pronóstico bueno y uno desfavorable¹⁴. También son útiles la cuenta de plaquetas inferior a

100mg/dL, la concentración de hemoglobina y el hematocrito, así como un frotis de sangre periférica para hacer la cuenta diferencial de los leucocitos.

Características de las células leucémicas. El diagnóstico de las leucemias se basa en la presencia de blastos en médula ósea, igual o superior al 25% del total de las células. La presencia de blastos en sangre periférica de niños debe sugerir leucemia. Cuando el aspirado de médula ósea es deficiente por carecer de partículas y ser hipocelular, se debe obtener una biopsia de médula ósea.

Los linfoblastos se clasifican morfológicamente como L1, L2 y L3²⁰ de acuerdo al criterio Franco Americano Británico (FAB) (Cuadro 2) (Figuras 1, 2 y 3).

El estado del SNC al momento del diagnóstico también tiene valor pronóstico; quienes padecen del SNC al momento del diagnóstico (≥ 5 WBC/µL con citocentrífuga “cytospin” positiva para blastos), tienen mayor riesgo de fracaso con el tratamiento, tanto el sistémico como el del SNC.

La afectación del SNC por citocentrífuga se clasifica como lo muestra el cuadro 3. Aun cuando haya menos de cinco blastos/µL existe mayor riesgo de una recaída del SNC^{21,22}. Esto obliga a la evaluación de la citología del líquido cefalorraquídeo como prueba diagnóstica en la LAL²³.

La citocentrífugación del LCR es de gran importancia porque identifica con rapidez y precisión las células leucémicas. Sin embargo, se requiere experiencia en la interpretación citomorfológica, ya que elementos celulares benignos pueden interpretarse

Cuadro 1. Clasificación inmunológica de LAL

<i>Tipo celular</i>	<i>Antígeno de expresión</i>
Linaje B	CD22+ o CD79a+ citoplasmático
	CD19+, CD22+, cIgµ-, sIg-
	cIgµ+
	cIgµ+, sIg+, sIgκ-, sIgλ-
Linaje T	sIg+, sIgκ+, sIgλ+
	Citoplasmático CD3+
	CD7+
	CD7+, CD2+, y/o CD5+
Células B	CD1a+
	CD3+
Células T	

Abreviaturas y símbolos: cIg, inmunoglobulina citoplasmática; sIg, inmunoglobulina de superficie; µ, proteína de cadena pesada mu; κ, proteína de cadena ligera kappa; λ, proteína de cadena ligera lambda.

Cuadro 2 Clasificación citomorfológica de leucemias agudas linfoblásticas (LAL) de acuerdo al Grupo Cooperativo Franco Americano - Británico (FAB)

Rasgos citológicos	L1	L2	L3
Tamaño celular	Pequeño	Grande heterogéneo	Grande homogéneo
Cromatina nuclear	Homogénea	Variable heterogénea	Finamente homogénea
Forma nuclear	Regular	Irregular comúnmente con indentación	Regular redondo u oval
Nucléolos	Identación ocasional	Visibles	Prominentes uno o más
	Invisibles o pequeños	Grandes uno o más	
Cantidad de citoplasma	Escaso	Variable	Moderada
Basofilia del citoplasma	Claro poco intenso	Moderada	Muy intenso
Vacuolización del citoplasma	Variable	Variable, intenso en algunos	Prominente

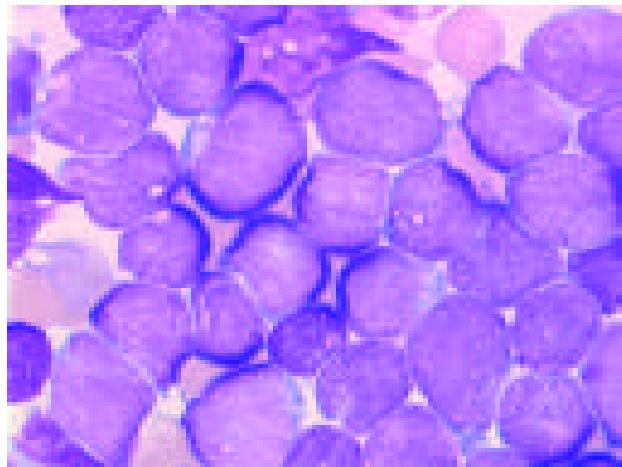


Figura 1. Leucemia aguda linfoblástica clasificación L1.

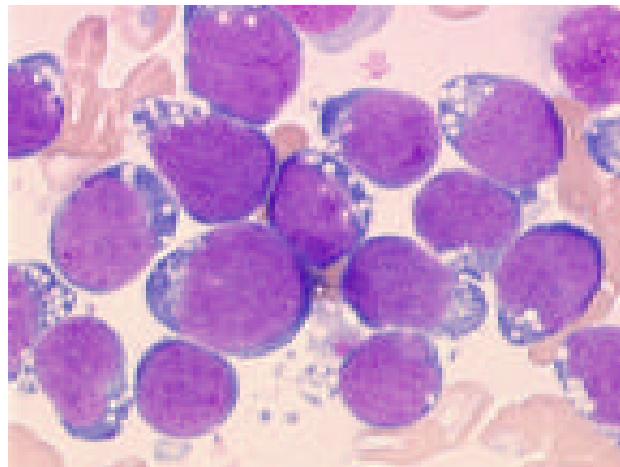


Figura 3. Leucemia aguda linfoblástica clasificación L3.

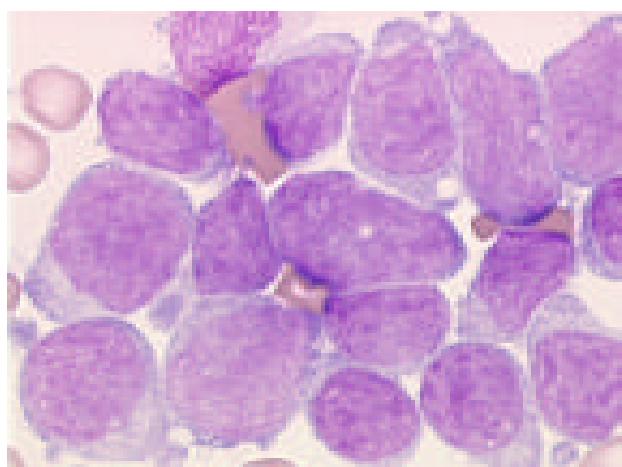


Figura 2. Leucemia aguda linfoblástica clasificación L2.

equivocadamente como malignas incluyendo las células histiocitoides y linfocitoides²⁴. La infiltración del SNC en la experiencia en el Servicio de Oncología del Instituto Nacional de Pediatría en los tres últimos años se muestra en el cuadro 4.

Inmunofenotipos

En los últimos años se ha avanzado mucho en la caracterización fenotípica de las células normales de la médula ósea y las de las neoplasias hematológicas, debido al gran progreso en la citometría, en la química de los fluorocromos, en la tecnología láser y en los métodos de separación celular. Esto ha hecho posible el uso sistemático de inmunofenotipos con múltiples “marcajes”, tanto en el laboratorio clínico como de investigación.

Cuadro 3. Definición de infiltración del sistema nervioso central

Condición	Hallazgos
SCN-1	Sin linfoblastos
SCN-2	< 5 linfoblastos en el LCR
SCN-3	> 5 linfoblastos en el LCR o parálisis de pares craneales

SCN= Sistema Nervioso Central, LCR= Líquido cefalorraquídeo.

Cuadro 4. Líquidos mencionados en el Servicio de Oncología

Condición del LCR por año	2002	2003	2004
SNC-1	433	501	580
SNC-2	2	2	1
SNC-3	4	13	5
Total	439	516	586

Los inmunofenotipos son de gran utilidad en las LAL porque contribuyen a identificar el origen de la célula neoplásica y porque permiten definir grupos de riesgo; pueden emplearse en los estudios de enfermedad mínima residual una vez alcanzada la remisión^{25,26}.

La citometría de flujo es un método rápido, objetivo y cuantitativo de análisis de células u otras partículas en suspensión. Esta técnica se basa en hacer pasar las células u otras partículas en suspensión, alineadas y de una en una, frente a un haz luminoso.

En la actualidad el diagnóstico y la clasificación de las leucemias y linfomas se basan en gran medida en criterios morfológicos y citoquímicos convencionales. Las leucemias se clasifican tradicionalmente por el grado de diferenciación y el tipo celular. El análisis multiparamétrico con citometría de flujo aunado al enorme catálogo de anticuerpos monoclonales que existen ha sido muy valioso para la diferenciación de las células hematopoyéticas normales; también ha permitido clasificar las neoplasias derivadas de estas células de acuerdo con la ontogenia de las células hematopoyéticas²⁷.

El diagnóstico del inmunofenotipo de leucemias se ha centrado fundamentalmente en las leucemias agudas ya que, salvo excepciones, el diagnóstico de las demás hemopatías se ha seguido basando fundamentalmente en criterios morfológicos.

La médula ósea es la fuente más adecuada de las células para la evaluación de las leucemias agudas.

Los objetivos de la determinación de los inmunofenotipos con fines diagnósticos se han centrado en la identificación de la línea celular implicada en el proceso de proliferación clonal: mieloide o linfoides. En este sentido, la descripción de marcadores celulares cuya reactividad está asociada a una de estas series ha servido como punto de partida para el diagnóstico de línea. Los estudios en médula ósea normal y en blastos leucémicos, han demostrado que la especificidad de alguno de estos marcadores para una determinada línea es relativa y en el caso de las leucemias, su expresión dentro de algunos subgrupos morfológicos, fenotípicos o ambos, se asocia frecuentemente con alteraciones citogenéticas concretas.

LAL de precursor B. Las células de precursor B o LAL (de linaje B) definidas mediante la expresión CD19, HLA-DR, CD10 (antígeno común para LAL) y otros antígenos asociados de las células B, representan 80 a 85% de las LAL en pediatría. Aproximadamente el 80% de las LAL de precursores de células B expresan el antígeno CD10. También se ha mostrado en algunas series que la falta de expresión del CD10 se relaciona con un pronóstico pobre; hay una negatividad de CD10 en proporciones mucho mayores en menores de dos años con LAL de precursores B; esto se relaciona con resultados precarios²⁸. Sin embargo, en un estudio²⁹ del INP no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre reactividad o no al CD10 en niños con LAL pre B.

Etapa de maduración de las células B: Aproximadamente tres cuartos de los pacientes con LAL de precursor B, tienen el fenotipo pre B temprano y aparentemente mejor pronóstico. Las células leucémicas de pacientes con LAL pre-B, tienen inmunoglobulina citoplasmática (cIg), una etapa intermedia de células B diferenciadas. El 25% por ciento de los pacientes de LAL pre-B tienen la t(1;19)³⁰. Aproximadamente 3% de los pacientes presentan LAL pre-B expresión transicional, sin implicación del gen C-MYC o morfología L3. Los

pacientes con este fenotipo responden bien a la terapia utilizada para las células B precursoras de LAL³¹. Aproximadamente el 2% de los pacientes presentan LAL de células B (expresión Ig de superficie generalmente con morfología FAB L3 y desplazamiento del gen c-myc)³².

La LAL de células B es una manifestación sistémica del linfoma no Hodgkin de Burkitt y del similar a Burkitt, y su tratamiento es completamente diferente del de otras formas de LAL infantil³³. Los casos infrecuentes de LAL con expresión Ig de superficie, pero sin desplazamiento del gen C-MYC son tratados apropiadamente como LAL de precursores B y no como LAL de células B³⁴.

LAL de células T: Estas se definen mediante la expresión de células leucémicas de las células T relacionadas a los antígenos CD2, CD7, CD5, o CD3, y frecuentemente se relacionan a ciertas características clínicas tales como sexo masculino, edad mayor de diez años, leucocitosis y una masa mediastinal^{30,35}. Aproximadamente el 12% de los niños recién diagnosticados con LAL presentan el fenotipo de células T. Sin embargo, con terapia apropiada e intensa estos niños pueden lograr una supervivencia similar a los niños con leucemia de precursores B^{30,35}. Las anomalías citogenéticas comunes en la LAL de linaje de células B (por ejemplo, hiperdiploide) no son comunes en la leucemia de células T³⁶.

Expresión del antígeno mieloide: Hasta un tercio de los casos de LAL en pediatría contienen células leucémicas que expresan antígenos de superficie relacionados con la de tipo mieloide. La expresión del antígeno relacionada con la mieloide parece estar vinculado con subgrupos específicos de LAL y de manera notable a aquellos con reordenamiento genético *MLL* y *TEL-AML1*.³⁶ No existe un pronóstico independiente adverso significativo en la expresión del antígeno de superficie mieloide^{37,38}.

Enfermedad mínima residual. Se refiere a la presencia de la clona de células hematopoyéticas neoplásicas persistentes, después de un tratamiento antineoplásico. En la monitorización de pacientes con LAL es importante disponer de técnicas para medir con suficiente sensibilidad la presencia de células leucémicas no detectables con microscopía de luz, durante la remisión clínica, por su alto valor pronóstico

en las primeras fases del tratamiento³⁹. La definición de la remisión morfológica completa (<5% de blastos en médula ósea) es poco sensible para detectar enfermedad residual.

Con métodos más sensibles para valorar la respuesta se puede contribuir a una estratificación más precisa de los pacientes en grupos con riesgo de recaída. La persistencia de enfermedad mínima residual en las primeras semanas del tratamiento es dato de gran utilidad para la asignación más exacta de grupos de riesgo en las leucemias.

Las técnicas que permiten la detección de enfermedad mínima residual (EMR) en LAL con suficiente sensibilidad (10^{-4} - 10^{-6}) son la citometría de flujo que se basa en la detección de fenotipos aberrantes y la PCR, que permite estudiar los reordenamientos de los genes IGH y TCR -que son paciente/específico- y analizar las translocaciones con mayor relevancia pronóstica en LAL que son tumor/específicas (BCR-ABL, TEL-AML1, E2A-PBX1, AF4ML)³⁹. La detección molecular de estas translocaciones puede llevarse a cabo por RT-PCR consecutivas, o en una única RT-PCR (multiplex-PCR)³⁹ lo que agiliza la estratificación de los pacientes en distintos grupos de riesgo. La mayor parte de los análisis mediante PCR al diagnóstico, son cualitativos; indican sólo ausencia o presencia de la alteración.

Sin embargo, en la monitorización, la respuesta inicial al tratamiento es un fuerte factor predictivo de recaída, por lo cual es importante no sólo la detección sino la cuantificación de EMR mediante PCR en tiempo real⁴⁰. En ésta se detecta el producto específico a medida que se produce, de manera que la comparación de su nivel de amplificación con los estándares adecuados proporciona una medida cuantitativa del grado de afectación.

CONCLUSIÓN

El gran avance en el conocimiento de las alteraciones genéticas asociadas a determinados tipos de LAL y en las técnicas de diagnóstico genético tanto de citogenética como de biología molecular, permite la estratificación de los pacientes en grupos de riesgo y el empleo de terapias específicas. En la actualidad hay gran interés en la tecnología de los microarreglos ("microarrays") que con la aplicación de nuevos

sistemas robotizados, permite el análisis simultáneo de miles de genes y de sus niveles de expresión en una muestra, lo cual permitirá modificar los métodos convencionales del diagnóstico genético, delimitar nuevos subtipos de LAL o describir nuevos marcadores moleculares. El conocimiento de las vías reguladoras de la expresión génica activas en cada subtipo de leucemia, permitirá el establecimiento de nuevas terapias específicas, cuyo blanco sea la alteración genética detectada. Sin embargo, a pesar de estos avances, en la actualidad es necesario y de gran importancia practicar diversas pruebas como la citomorfología y el inmunofenotipo para llegar al diagnóstico certero, y dar al clínico las herramientas necesarias para un mejor tratamiento y seguimiento de la leucemia aguda linfoblástica. En suma, el papel del laboratorio es fundamental en este tipo de padecimiento oncológico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ries LA, Kosary CL, Hankey BF, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1973-1996. Bethesda, Md National Cancer Institute 1999. Last accessed December 17, 2004.
2. Smith MA, Ries LA, Gurney JG, et al. Leukemia. In: Ries LA, Smith MA, Gurney JG, et al. eds. Cancer incidence and survival among children and adolescents: United States SEER Program 1975-1995. Bethesda, Md. National Cancer Institute, SEER Program, 1999. Last accessed November 03, 2004, pp 17-34. Last accessed April 14, 2004.
3. Xie Y, Davies SM, Xiang Y, et al. Trends in leukemia incidence and survival in the United States (1973-1998). *Cancer* 2003; 97(9): 2229-35.
4. Peris R. Registro Nacional de Tumores infantiles. Conselleria de Sanitat i Consum de la Generalitat Valenciana, 1994.
5. Rivera LR, Leal LC, Cárdenas CR. A survey of 4076 children with cancer. Certain epidemiological aspects from a single institution. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1996;53(12):508-605.
6. Pui CH, Evans WE. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 1998; 339 (9): 605-15.
7. Pui CH. Acute lymphoblastic leukemia in children. *Curr Opin Oncol* 2000;12(1):3-12.
8. Woessner S, Lafuente R, Florensa L. Contribución de la histoquímica al diagnóstico hematológico. En: Woessner S. La Citología Óptica en el Diagnóstico Hematológico. Barcelona Medici, 1991;pp35-54.
9. Greaves M. Molecular genetics of ALL. *Hematological* 2000. EHAS Educational Book, 2000;p95.
10. Pui CH, Campana D, Evans WE. Childhood acute lymphoblastic leukemia: current status and future perspectives. *Lancet Oncol* 2001;2:597-607.
11. Raimondi SC, Pui CH, Behm FG. Cytogenetically different leukemic clones at relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1993;82:576-80.
12. Harris NL, Jaffe ES, Vardiman JW, Flandrin G. WHO classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues. Lyon. IARC Press, 2001:12-3
13. Ross ME, Zhou X, Song G, Shurtliff SA, Downing JR. Classification of pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Blood* 2003;102:2951-9.
14. Smith M, Arthur D, Camitta B, et al. Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 1996;14 (1):18-24.
15. Trueworthy R, Shuster J, Look T, et al. Ploidy of lymphoblasts is the strongest predictor of treatment outcome in B-progenitor cell acute lymphoblastic leukemia of childhood. Pediatric Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 1992;10 (4):606-13
16. Reiter A, Schrappe M, Ludwig WD, et al. Chemotherapy in 998 unselected childhood acute lymphoblastic leukemia patients. Results and conclusions of the multicenter trial ALL-BFM 86. *Blood* 1994; 84 (9):3122-33.
17. Rubnitz JE, Link MP, Shuster JJ, et al. Frequency and prognostic significance of HRX rearrangements in infant acute lymphoblastic leukemia: A Pediatric Oncology Group study. *Blood*. 1994;84 (2): 570-3.
18. 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(9321):1909-15.
19. Isoyama K, Eguchi M, Hibi S, et al. Risk-directed treatment of infant acute lymphoblastic leukaemia based on early assessment of MLL gene status: results of the Japan Infant Leukaemia Study (MLL96). *Br J Haematol* 2002;118(4):999-1010.
20. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. The morphological classification of acute lymphoblastic leukaemia: concordance among observers and clinical correlations. *Br J Haematol* 1981;47(4):553-61.
21. Mahmoud HH, Rivera GK, Hancock ML, et al. Low leukocyte counts with blast cells in cerebrospinal fluid of children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 1993;329(5):314-9.
22. Bürger B, Zimmermann M, Mann G, et al. Diagnostic cerebrospinal fluid examination in children with acute lymphoblastic leukemia: significance of low leukocyte counts with blasts or traumatic lumbar puncture. *J Clin Oncol* 2003;21(2):184-8.
23. Aronson AG, Hayden SI, Relamed MR. Spinal fluid cytology during chemotherapy of leukemia of the central nervous system in children. *Am J Pathol* 1995;63:528-37.
24. Rivera LR, Martínez GG, Cárdenas CR. La utilidad de la citocentrífuga en la detección temprana de células malignas. *Patología* 1989;27:43-8.
25. Bene MC, Castoldi G, Orfao A, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the immunological characterization of leukemias. *Leukemia* 1995;9:1783-6.
26. Sanchez J, Serrano J, Madero L, et al. Clinical value of immunological monitoring of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia after allogeneic transplantation. *Br J Haematol* 2002;116:686-94.
27. Knapp W, Dörken B, Stein H, von dem Borne AEGR. En: Leucocyte typing. Vol IV. White cell differentiation antigens. New York. Oxford University Press 1989.

28. Reaman GH, Spoto R, Sensel MG, et al. Treatment outcome and prognostic factors for infants with acute lymphoblastic leukemia treated on two consecutive trials of the Children's Cancer Group. *J Clin Oncol* 1999;17(2):445-55.
28. Rivera LR, Cardenas CR, et al. B-Lineage acute lymphoblastic leukemia of childhood. An institutional experience. *Arch Med Res* 1997;28:233.
29. Pui CH. Childhood leukemias. *N Engl J Med* 1995;332(24): 1618-30.
30. Koehler M, Behm FG, Shuster J, et al. Transitional pre-B-cell acute lymphoblastic leukemia of childhood is associated with favorable prognostic clinical features and an excellent outcome: A Pediatric Oncology Group study. *Leukemia* 1993;7(12):2064-8.
31. Pui CH, Evans WE. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 1998;339(9):605-15.
32. Navid F, Mosijczuk AD, Head DR, et al. Acute lymphoblastic leukemia with the (8;14)(q24;q32) translocation and FAB L3 morphology associated with a B-precursor immunophenotype: the Pediatric Oncology Group experience. *Leukemia* 1999;13(1):135-41.
33. Behm FG, Head DR, Pui CH, et al. B-precursor ALL with unexpected expression of surface immunoglobulin (sig) mu and lambda. *Lab Invest* 1995;72:A-613,106a.
34. Uckun FM, Sensel MG, Sun L, et al. Biology and treatment of childhood T-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1998;91(3):735-46.
35. Schneider NR, Carroll AJ, Shuster JJ, et al. New recurring cytogenetic abnormalities and association of blast cell karyotypes with prognosis in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: a pediatric oncology group report of 343 cases. *Blood* 2000;96(7):2543-9.
36. Pui CH, Rubnitz 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(12):3768-73.
37. Baruchel A, Cayuela JM, Ballerini P, et al. The majority of myeloid-antigen-positive (My+) childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemias express TEL-AML1 fusion transcripts. *Br J Haematol* 1997;1:101-6.
38. Szczepanski T, Van Dongen JM. Minimal residual disease in leukemia patients. *Lancet Oncol* 2001;2:409-17.
39. Pine RS, Moy FH, Jayabose S. Real -time quantitative PCR: Standardized detection of minimal residual disease in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol/Oncol* 2003;25:103-8.